

UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU

ECOLE DOCTORALE
SCIENCES ET TECHNOLOGIES

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET DE
CHIMIE APPLIQUEES (LABIOCA)



THESE UNIQUE

Présentée par Mindiédiba Jean BANGOU

Diplômé en Etudes Approfondies

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Ouagadougou

**Option: Sciences Appliquée
(Plantes médicinales et Phytothérapie)**

Spécialité: Biochimie et Chimie des Substances Naturelles

Thème

**ETUDE PHYTOCHIMIQUE et ACTIVITES
BIOLOGIQUES des tiges feuillées de *Lantana camara* L.
et de *Lippia chevalieri* Moldenke: deux VERBENACEAE
du BURKINA FASO**

Soutenu le 09 juin 2012

Devant le jury composé de:

Président : Pr. Ambaliou SANNI, Professeur Titulaire, Université d'Abomey-Calavi, Benin

Membres : Pr. Innocent Pierre GUISSOU, Professeur Titulaire, Université de Ouagadougou, Burkina Faso

Pr. Emmanuel BASSENE, Professeur Titulaire, Université Cheick Anta Diop (UCAD), Sénégal

Pr. Odile Germaine NACOULMA/OUEDRAOGO, Professeur Titulaire, Université de Ouagadougou, Burkina Faso

DEDICACE

A la mémoire de :

Mon grand-père Yaldia GBANGO, Homme de sagesse et de tradition, ancien combattant de la 1^{ère} et 2^{ème} guerre mondiale (1981).

Ma grand-mère Miyéba NABA sa première épouse (29 mars 2004).

Ma grand-mère Possibo ONADJA sa deuxième et dernière épouse (16 avril 2001), accoucheuse villageoise.*

Mon oncle Yemtema GBANGO, le fils aîné de la famille (30 Avril 1987).

Mon défunt père Frédéric Bouampoundi BANGO (17 octobre 2002 à 2h du matin à 44 ans), juste après son service militaire.

A ma petite famille :

Bouama Alex Maire, Mélayé Esther Félicia et leur mère Kabou Evéline KOHO.

Ma mère Mimboaba NABA.

A ma famille et parents dans le désordre :

Apollinaire, Grégoire, Simani THIOMBIANO, Apollinaire LOMPOet

Possibo Dorcas, Ahadi, Thérèse, Marimpo, Tani, Evariste T.D., Yombo, Modiédi, Yamdié, Polinli, Clarisse, Emma, Boaris, Maïga Alidou, Ouoba Daniel, Adeline.....

Pour votre soutien moral et matériel et pour vos encouragements tout au long de ces années.

Dédicace spéciale à El'Adj Issaka SINO pour son soutien financier sans faille tout au long de ce travail, et ce depuis le DEA.

A tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au *laboratoire de Biochimie et de Chimie Appliquées (LABIOCA)* de l'Unité de Formation et de recherche en Science de la Vie et de la Terre de l'Université de Ouagadougou grâce au soutien financier du *Conseil Interuniversitaire de la Communauté française de Belgique/ Commission Universitaire pour le Développement (CIUF/CUD)* à travers la bourse d'Excellence (2009-2012).

J'adresse mes remerciements:

Au Professeur Odile Germaine NACOLMA/OUEDRAOGO ma directrice de Thèse, pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire, avoir guidé mes premiers pas dans la recherche et avoir cultivé en moi la passion de la biochimie. Je vous remercie également pour votre disponibilité à notre endroit et votre assistance sans faille. Ce qui nous a permis d'acquérir beaucoup d'expériences dans l'exécution des travaux scientifiques. **Professeur**, permettez nous de vous remercier aussi en tant que mère car, au delà du rôle de Directrice de thèse, j'ai trouvé en vous une mère qui s'est toujours souciée de ses enfants.

Au Professeur Ambaliou SANI, qui, malgré ses nombreuses occupations a accepté d'évaluer ce travail et de présider mon jury de soutenance. Merci pour tout l'intérêt que vous avez accordé à ce travail.

Au Professeur Innocent Pierre GUISSOU, pour avoir accepté d'évaluer ce travail, malgré ses nombreuses occupations. Merci pour tout l'intérêt que vous avez accordé à ce travail.

Au Professeur Emmanuel BASSENE pour avoir accepté d'être membre de mon jury, malgré ses nombreuses occupations. Merci pour tout l'intérêt que vous avez accordé à ce travail.

Au Professeur Jérôme Germain SAWADOGO, pour avoir accepté d'évaluer ce travail, malgré ses nombreuses occupations. Merci pour tout l'intérêt que vous avez accordé à ce travail.

Au Professeur Almaraz-Abarca Norma, l'auteur responsable de la méthode du dosage des flavonols totaux, pour avoir permis la réalisation des études HPLC-DAD dans le Département Centro Interdisciplinario de Investgacion para el Desarrollo Integral Regional, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Durango. Becaria COFAA ; Sigma 119, Fraccionamiento 20 de Noviembre II, Durango, Dgo., 34220, México.

Au Dr. Félix KINI pour sa contribution à l'interprétation des Profils chromatographique HPLC-DAD.

A Madame YOUGBARE-ZIEBROU M. pour sa participation à l'étude de l'activité antibactérienne.

A madame Emma YAMEOGO, Major du Laboratoire du CMA de Kossodo, pour avoir permis la quantification des ions dans nos extraits de plantes.

Je remercie très particulièrement le **Professeur Jeanne MILLOGO-RASOLODIMBY** et le **Professeur Boukaré ZÉBA** toujours disponible pour ce qui concerne nos travaux. Vous aviez été d'un soutien inestimable. Vous

avez facilité l'exécution de certains travaux de cette thèse. Vos conseils, votre disponibilité ont donné un élan à l'aboutissement de ce travail.

Je remercie le **Professeur Hassanata MILOGO** pour ces multiples conseils.

Je remercie tous les aînés, dans le désordre: **Dr LAMIEN-MEDA Aline, Dr KIENDREBIOGO Martin, Dr HILOU Adama, Dr LAMIEN Charles Euloge, Dr TIBIRI André, Dr SAWADOGO Wantaga, Dr MEDA N. T. Roland, Dr Moussa, Dr OUATTARA Monique, Dr SESSOUMA Bintou**, et surtout à mon jeune frère depuis le Brésil: le **Dr COULIDIATI Hervé Tangbadioa**.

Parmi ces personnes je tiens à remercier très particulièrement **Dr Martin KIENDREBIOGO, Dr MEDA N. T. Roland** et **Dr COMPAORE Moussa** pour leurs conseils pratiques et participation active à toutes les activités de ce travail.

Mes remerciements vont également à tous les enseignants- chercheurs, les techniciens et l'administration de l'UFR/SVT de l'Université de Ouagadougou pour leurs aides multiformes et enseignements reçus lors de mes cycles de formation.

Je remercie mes collègues du laboratoire de Biochimie et de Chimie Appliquées pour leur contribution à travers les conseils et suggestions mais aussi pour leur agréable compagnie et leurs soutiens; dans le désordre: **Samson, Micheline, Harouna, Bagora, Eric, Ahmed, Hubert, Emmanuel, Kjiessoum, Nabère, Jonas, Mariam**. C'est l'occasion pour moi de remercier également tous mes aînés et amis de l'UFR/SVT, pour leur franche collaboration tout au long de ces années.

J'exprime mes sincères remerciements à :

À la famille **OVEDRAOGO**, particulièrement au **Colonel Kassoum** pour ses sages conseils et soutien multiformes qui m'ont galvanisé.

À la famille **SINOU**, particulièrement à **El'Adj Issaka SINOU** pour son soutien financier sans faille tout au long de ce travail, et ce depuis le DEA.

À monsieur **Aziz TRAORE** pour son soutien et encouragement tout au long de ces années de labeur.

À la grande famille **GBANGOU** à travers le chef du village, sa **Majesté Yimbilima de KOMADOUGOU**.

Je remercie mon ami de tous les jours, monsieur **MILLOGO Walter**.

RESUME

Lantana camara L., *Lippia chevalieri* Moldenke, (Verbenaceae) sont des herbacées largement utilisées en médecine traditionnelle au Burkina Faso et dans certains pays d'Afrique, d'Amérique et d'Asie. La composition en huiles essentielles de ces plantes est connue et les activités biologiques associées. Mais il existe peu de données sur celle des polyphénols et de leurs activités, d'où la nécessité de cette étude afin de justifier leurs utilisations en médecine traditionnelle.

Les investigations phytochimiques de *L. camara* et *L. chevalieri* au moyen des tests en tubes et des coupes histochimiques ont permis de mettre en évidence les flavonoïdes, tanins, stérols/triterpènes et les saponosides dans les deux espèces. Les alcaloïdes ont été détectés uniquement dans *L. camara*. La CCM nous a permis d'identifier l'acide caféique dans les extraits méthanoliques des deux plantes et la rutine dans celui de *L. chevalieri*. Les meilleures teneurs en phénoliques totaux et en tanins ont été obtenues par *L. chevalieri* avec respectivement $17,88 \pm 0,90$ mg EAG et $7,62 \pm 0,37$ mg EAT pour 100 mg extrait. Par contre *L. camara* a présenté la plus forte teneur en flavonoïdes ($8,28 \pm 0,77$ mg EQ/100 mg extrait). La méthode d'analyse par HPLC-DAD nous a permis de mettre en évidence les acides : cinnamique (11), rosmarinique (2), phénols (2) ainsi que la lutéoline (2), saponarine (1) et les flavones (8) dans les deux extraits de plantes. Les teneurs des quatre ions dosés ont varié de $0,41 \pm 0,02$ mmol/L (Ca^{2+}) à $4,81 \pm 0,10$ mmol/L (K^+).

En ce qui concerne le criblage des activités biologiques, *L. chevalieri* a montré la meilleure activité antioxydante. En effet, le pouvoir antiradicalaire par la méthode DPPH a donné une IC_{50} de $6,23 \pm 0,15$ $\mu\text{g/mL}$ et la capacité réductrice des ions ferriques (FRAP), $15,26 \pm 0,11$ mmol EAA/g. Pour ce qui concerne les activités antibactériennes, Le meilleur diamètre d'inhibition a été obtenu avec *L. camara* sur *S. flexneri* ($12,33 \pm 0,35$ mm). Cette activité a concerné 17 souches bactériennes et une concentration de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a été utilisée. Les activités des polyphénols "in vitro" sur la GST, la XO, l'AChE et la CE ont montré des inhibitions intéressantes. La meilleure inhibition est obtenue par l'extrait de *L. camara* sur la CES ($50,20 \pm 3,05$ %) pour des concentrations tests de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. L'extrait de *L. chevalieri* a présenté également des inhibitions intéressantes sur la GST ($42,99 \pm 3,03$ %), suivi de l'AChE ($39,26 \pm 2,18$ %) et de la CES ($37,68 \pm 1,18$ %).

L'ensemble de ces activités peuvent justifier leur usage dans le traitement du paludisme, de la dysenterie, des dermatoses, des maladies inflammatoires et des hépatites.

Mots-clés: Verbenaceae, phytochimie, phénoliques, tanins et flavonoïdes totaux, activité antioxydante, enzymes, bactéries.

ABSTRACT

Lantana camara L. and *Lippia chevalieri* Moldenke, are Verbenaceae largely used in folk medicine in Burkina Faso, in certain African, American and Asian countries. The composition out of essential oils of these plants is known and the associated biological activities. But there exists little of data on that of polyphenols and their activities, from where need for this study in order to justify their uses in traditional medicine.

Phytochemical investigation showed that methanolic extracts of *L. camara* and *L. chevalieri* are rich in phenols acids and flavonoids. The general characterization tests were permitted to detect flavonoids, tanins, sterols/triterpenes and the saponosides in the two species. The alkaloids were detected only in *L. camara*. Histochemical study showed alkaloids and flavonoids in the extract of *L. camara*; and polyphenolics/tannins like flavonoids in the extract of *L. chevalieri*. TLC enabled us to identify the caffeic acid in the methanolic extracts of the two plants and rutin in the extract of *L. chevalieri*. The best contents of totals phenolic and tanins were obtained by *L. chevalieri* 17.88 ± 0.90 mg EAG/100 mg and 7.62 ± 0.37 mg EAT/100 mg extracted, respectively. On the other hand *L. camara* presented more the content of flavonoids (8.28 ± 0.77 mg EQ/100 mg extracted) and the total flavonol low value (0.18 ± 0.01 mg EQ/100 mg extracted). The method of analysis by HPLC-DAD was permitted to detect different acids: cinnamic (11), rosmarinic (2), phenols (2) as well as the luteolin (2), saponarin (1) and flavones (8) in the two extracts of plants. The contents of the four proportioned ions varied from 0.41 ± 0.02 mmol/L (Ca^{2+}) to 4.81 ± 0.10 mmol/L (K^+).

With regard to the sifting of the biological activities, *L. chevalieri* showed the best antioxydant activity. Indeed, the antioxidant capacity by DPPH method gave 6.23 ± 0.15 $\mu\text{g/mL}$ and the reducing capacity of the ions ferric (FRAP) was 15.26 ± 0.11 mmol EAA/g. Concerning the antimicrobial activities, the best diameter of inhibition was obtained with *L. camara* on *S. flexneri* (12.33 ± 0.35 mm) This activity related to 17 bacterial stocks and a concentration of $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ were used. Polyphenolics activities "in vitro" on the GST, the XO, the AChE and the CES showed interesting inhibitions. Best inhibition is obtained by the extract of *L. camara* on CES (50.20 ± 3.05 %) for concentrations tests of $100 \mu\text{g ml}^{-1}$. The extract of *L. chevalieri* also presented interesting inhibitions on the GST (42.99 %), followed of AChE (39.26 %) and the CES (37.68 %).

These activities can justify their use in the treatment of malaria, dysentery, skin disease, inflammatory and hepatitis.

Key words: Verbenaceae, phytochemistry, phenolic, tannins and flavonoids, antioxidant activity, enzymes, bacteria.

LISTE DES PUBLICATIONS

Publication en rapport avec la thèse

Bangou M.J., Kiendrebeogo M., Méda N.T.R., Coulibaly A.Y., Compaoré M., Zeba B., Millogo-Rasolodimby J. and Nacoulma O.G. (2011). Evaluation of Enzymes Inhibition Activities of Medicinal Plant from Burkina Faso. *Pak. J. Biol. Sci.*, 14 (2) 99-105.

Mindiédiba Jean Bangou, Martin Kiendrebeogo, Moussa Compaoré, Ahmed Yacouba Coulibaly, Nâg-Tiero Roland Meda, Norma Almaraz Abarca, Boukaré Zéba, Jeanne Millogo-Rasolodimby and Odile G. Nacoulma. (2011). Enzymes inhibition effect and polyphenolic content of medicinal plant extracts from Burkina Faso. *J. Biol. Sci.*, 11 (1) 31-38.

M.J. Bangou, N. Almaraz-Abarca, N.T.R. Méda, B. Zéba, M. Kiendrebéogo, J. Millogo-Rasolodimby, O.G. Nacoulma (2012). Polyphenolic composition of *Lantana camara* and *Lippia chevalieri*, and their Antioxidant and Antimicrobial Activities. *International Journal of Phytomedicine* (soumis).

M.J. Bangou, N.T.R. Méda, Y.D. Couliadiaty, M. Kiendrebéogo, B. Zéba, J. Millogo-Rasolodimby and O.G. Nacoulma. Antibacterial and Antioxidant Activities of five Verbenaceae species from Burkina Faso. *Current Research Journal of Biological Sciences* (accepté)

Autre publication

Meda Nâg-Tiéro Roland, Konaté Kiessoun, **Bangou Mindiédiba Jean**, Kiendrebeogo Martin, Boukaré Zéba, Millogo-Rasolodimby Jeanne and Nacoulma Odile Germaine. (2011). Antibacterial and Anti-inflammatory Activities of Galls and Leaves from *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. (Balanitaceae). *Asian Journal of Pharmaceutical and Biological Research*, 1(3), 289-295.

LISTE DES POSTERS

Bangou M.J., Méda N.T.R., Compaoré M., Traoré A., et Nacoulma O.G. (2001). Inhibition de la glutathion-S-transférase, de l'acétylcholinestérase, de la carboxylestérase et de la xanthine oxidase par les extraits méthanoliques de *Sclerocarya birrea* (A. Rich) Hochst. Université de Ouagadougou, 3^{ème} édition JPO, Février 2011. (**Compétition**)

Mindiédiba Jean Bangou, Moussa Compaoré, Nâg-Tiero Roland Meda, et Odile Germaine Nacoulma. (2011). Enzymes inhibition effect and polyphenolic content of medicinal plant extracts from Burkina Faso. Université de Ouagadougou, 3^{ème} édition JPO, Février 2011.

LISTE DES ABBREVIATIONS

AChE	: Acétylcholinestérase
ACh	: Acétylcholine
ADN	: Désoxyribonucléique
AIS	: Anti-inflammatoire stéroïdiens
AINS	: Anti-inflammatoire non stéroïdiens
AMPc	: Adénosine monophosphate cyclique
ARN	: Ribonucléique
ATB	: Antibiotique
ATCC	: American Type Culture Collection
ATCI	: Iodure d'acétylthiocholine
ATP	: Adénosine-5''-triphosphate
CAF	: Citrate d'Ammonium Ferrique
CAT	: Catalase
CCM	: Chromatographie sur couche mince
CDNB	: 1-Chloro-2,4-dinitrobenzène
CEF	: Chloroforme-Acétate d'éthyle-Acide formique
CES	: Carboxylestérase
CIB	: Centre d'information sur la Biodiversité
CMB	: Concentration minimale bactéricide
COX	: Cyclo-oxygénase
CMI	: Concentration minimale inhibitrice
DAD	: Détecteur UV à barrette diodes
DGISS	: Direction Générale de l'Information et des Statistiques Sanitaires
DHHDP	: Déshydrohéxahydroxydiphénique
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
DNTB	: 5, 5''-dithiobis-2-nitrobenzoïc acid
DO	: Densité optique
DPPH	: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
DTNB	: Acide 5,5''-dithiobis-2-nitrobenzoïque
EAG	: Equivalent Acide Gallique
EAT	: Equivalent Acide Tannique

EO	: Espèces oxygénées réactives
EC	: Enzyme Commission
EQ	: Equivalent Quercétine
FADH₂	: Flavine adénine dinucléotide
FCR	: Folin Ciocalteu Reagent
FMN	: Flavines mononucléotides
FRAP	: Ferric reducing antioxidant power
GPx	: Glutathion peroxydase
GSH	: Glutathion
GST	: Glutathion S-transférase
HHDP	: Héxahydroxydiphénique
HPLC	: Chromatographie en phase liquide à haute performance
HTA	: Hypertension Artérielle
IC₅₀	: Concentration inhibitrice 50
INSD	: Institut National de la Statistique et de la Démographie
LABIOCA	: Laboratoire de biochimie et de chimie appliquée
LPS	: Lipopolysaccharide
MA	: Maladie d'Alzheimer
MM	: Macéré Méthanolique
MTT	: 3 [4,5-diméthylthiazol-2yl] -bromure de diphenyltétrazolium
NADPH	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.
NADH	: Nicotinamide adénine dinucléotide
ROS	: Reactives oxygen species
SIDA	: Syndrome de l'Immuno-déficience Acquise
SOD	: Super oxyde dismutase
TEAC	: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TNF	: Tumor necrosis factor
TPA	: Tetradecanoylphorbol-13-acétate
TXA	: Thromboxane
UV	: Ultra violet
VIH	: Virus de l'immunodéficience humaine
XO	: Xanthine oxydase

SOMMAIRE

DEDICACE	i
REMERCIEMENTS	ii
RESUME	iv
ABSTRACT	v
LISTE DES PUBLICATIONS	vi
LISTE DES POSTERS	vi
LISTE DES ABBREVIATIONS	vii
SOMMAIRE	ix
LISTE DES FIGURES	xiii
LISTE DES TABLEAUX	xiv
LISTE DES PHOTOS	xiv
INTRODUCTION	ix
INTRODUCTION	1
PARTIE I: GENERALITES	x
Chapitre 1: Présentation de <i>Lantana camara</i> L. et <i>Lippia chevalieri</i> Moldenke	4
I.1. <i>Lantana camara</i> L.....	4
I.1.1. Classification selon Cronquist (1988).....	4
I.1.2. Description	4
I.1.3. Habitat et historique.....	6
I.1.4. Utilisations traditionnelles.....	7
I.2. <i>Lippia chevalieri</i> Moldenke.....	7
I.2.1. Classification selon Cronquist (1988).....	7
I.2.2. Description	8
I.2.3. Habitat et historique.....	10
I.2.4. Utilisation traditionnelles	10
Chapitre II: Etudes antérieures sur <i>Lantana camara</i> L. et <i>Lippia chevalieri</i> Moldenke	10
II.1. Etudes phytochimiques sur les deux espèces	10
II.1.1. Mono- et sesquiterpènes.....	10
II.1.2. Les triterpènes	12
II.1.3. Les glycosides iridoïdes	13
II.1.4. Furanonaphthoquinones	14
II.1.5. Les flavonoïdes.....	15
II.1.6. Glycoside phenyl éthanoïde	16
II.1.7. Les composés miscellanées	16
II.2. Etudes pharmacologiques sur les deux espèces	17
II.2.1. Activités antimicrobienne et antiparasitaire	17

II.2.2.	Activités antiinflammatoires	18
II.2.3.	Toxicités.....	19
II.2.4.	Activités antivirale et anticancéreuse.....	19
II.2.5.	Autres activités	20
Chapitre III: Généralités sur quelques activités biologiques		21
III.1.	Activités enzymatiques	21
III.1.1	. Définition de l'enzyme.....	21
III.1.2.	Rôles des enzymes dans l'organisme vivant	21
III.1.3.	Quelques enzymes impliquées dans les maladies métabolites.....	22
III.1.3.1.	La xanthine oxidase.....	22
III.1.3.2.	L'acétylcholinestérase	22
III.1.3.3.	La glutathion-S-transférase	24
III.1.3.4.	La carboxylestérase.....	24
III.2.	Activités antibactériennes.....	25
III.2.1.	Bactéries pathogènes.....	25
III.2.2.	Classification des bactéries	25
III.2.3.	Mode d'action des composés sur les bactéries	29
III.2.4.	La résistance bactériennes.....	32
III.2.5.	Support génétique de la résistance bactériennes/ mécanisme de la résistance.....	33
III.2.6.	Effets antimicrobiens des flavonoïdes	33
III.3.	Les activités antioxydantes	34
III.3.1.	Définition	34
III.3.2.	Radicaux libres et formes réactives dérivées de l'oxygène	35
III.3.3.	Principale source de radicaux libres: la mitochondrie.....	36
III.3.4.	La production d'espèces oxygénées réactives (EOR)	37
III.3.5.	Mécanisme de défense contre les radicaux libres	38
III.3.6.	Méthode d'évaluation de l'activité anti-oxydante.....	39
III.3.7.	Les végétaux (sources d'antioxydants naturels)	39
III.4.	Activité anti-inflammatoire	43
III.4.1.	Généralités	43
III.4.2.	Réactions inflammatoires.....	43
III.4.3.	Les anti-inflammatoires	44
III.4.4.	Mécanisme d'action des anti-inflammatoires	47
III.4.5.	Méthode d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	49
PARTIE II: MATERIEL ET METHODES		56
A. Matériel		51
I.	Cadre de L'étude.....	51
II.	Matériel de laboratoires.....	51
III.	Solvants et réactifs	52
IV.	Matériels biologiques.....	54
IV.1.	Matériel végétal	54
IV.2.	Souches bactériennes	54
B. Méthodes.....		55
Chapitre I.	Etudes phytochimiques	55
I.	Histochimie	55
I.1.	Double coloration au carmino-vert pour l'identification des tissus	55
I.2.	Détection des métabolites secondaires	55

II.	Extraction	56
III.	Criblage Phytochimique.....	58
IV.	Etude qualitative par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)	58
	IV.1. Définition et principe de la CCM	58
	IV.2. Chromatographie sur Couches Minces des acides phénols et flavonoïdes de nos extraits de plantes.	59
V	Dosage des composés polyphénoliques.....	59
	V.1. Dosage des polyphénols totaux	59
	V.2. Dosage des flavonoïdes totaux	60
	V.3. Dosage des flavonols totaux	60
	V.4. Dosage des Tanins totaux	60
VI	Quantification du Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , K ⁺ et du Na ⁺	61
	VI.1. Evaluation de la teneur en calcium	61
	VI.2. Evaluation de la teneur en magnésium	61
	VI.3. Evaluation de la teneur en potassium	61
	VI.4. Evaluation de la teneur en sodium	62
VII.	Détermination HPLC/DAD des polyphénols.....	62
	VII.1. Définition	62
	VII.2. Préparation des solutions standards	63
	VII.3. Préparations des solutions tests et conditions d'analyse	63
	VII.4. Principe et paramètres chromatographiques	63
Chapitre 2.	Etudes biologiques	65
I.	Evaluation des activités antioxydantes.....	65
	I.1. Pouvoir réducteur par la méthode FRAP	65
	I.2. Activité anti-radicalaire par la méthode d'inhibition du radical DPPH	65
II.	Etude de l'activité antibactérienne	66
	II.1. Préparation des Milieux de culture	66
	II.2. Préparations des solutions	66
	II.3. Préparation de l'inoculum bactérien	67
	II.4. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits	67
	II.5. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	67
III.	Détermination du pouvoir inhibiteur d'enzymes	68
	III.1. Inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE)	68
	III.2. Inhibition de la Carboxylestérase (CE)	70
	III.3. Inhibition de la xanthine oxydase (XO)	71
	III.4. Inhibition de Glutathion-S-transférase (GST)	73

PARTIE III: RESULTATS ET DISCUSSION.....75

Chapitre 1: Etudes phytochimiques75

I.	Résultats	75
	I.1. Histochimie	75
	I.2. Rendement d'extraction	77
	I.3. Criblage des différents groupes chimiques.....	77
	I.3.1. Criblages phytochimiques	77
	I.3.2. Chromatographie sur Couche Mince (CCM) des flavonoïdes et des acides phénols des macérés méthanoliques des espèces étudiées.	78
	I.4. Dosage des composés polyphénoliques.....	80
	I.5. Quantification des ions (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Na ⁺ et K ⁺).....	81
	I.6. Identification des acides phénols et des flavonoïdes par la HPLC-DAD	81

I.6.1. Chromatogrammes correspondant à <i>L. chevalieri</i>	84
I.6.2. Chromatogrammes correspondants à <i>L. camara</i>	85
II. Discussion	86
III. Conclusion partielle	89
Chapitre 2: activité antioxydante	90
I. Résultats	90
I.1. Evaluation du pouvoir réducteur (FRAP).....	90
I.2. Détermination de l'activité antiradicalaire (DPPH)	91
II. Discussion	92
III. Conclusion partielle	96
Chapitre 3: l'activité antibactérienne.....	97
I. Résultats	97
I.1. Détermination des diamètres d'inhibition	97
I.2. Concentration minimale inhibitrice.....	98
II. Discussion	100
III. Conclusion partielle	104
Chapitre 4: Etudes des inhibitions enzymatiques	105
I. Résultats	105
II. Discussion	106
III. Conclusion partielle	111
CONCLUSION.....	112
&.....	112
PERSPECTIVES.....	112
CONCLUSION & PERSPECTIVES.....	112
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	114
REFERENCES BIBILOGRAPHIQUES.....	114
PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES.....	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
ANNEXES.....	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
ANNEXES.....	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
Annexe I	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
Annexe II.....	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
Annexe III (les ions)	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Molécules de base pour les mono- et sesquiterpènes (Ghisalberti, 2000).....	11
Figure 2: Quelques mono/sesquiterpènes mis en évidence dans les deux plantes	11
Figure 3: quelques triterpènes (partie 1)	12
Figure 4: Quelques triterpènes (parties 2)	13
Figure 5: Glycosides iridoïdes isolés de <i>L. camara</i>	14
Figure 6: Quelques molécules de furanonaphthoquinones.....	15
Figure 7: Quelques flavonoïdes isolés de <i>L. camara</i>	15
Figure 8: Les principaux glycosides phényl éthanoïde	16
Figure 9: Les composés miscélanés.....	17
Figure 10: Classification des cocci	26
Figure 11: Classification des bacilles.....	29
Figure 12: Schéma des sites d'actions des antibiotiques chez les bactéries.....	30
Figure 13: Les antibiotiques à noyau β -lactames ou β -lactamines	31
Figure 14: Les antibiotiques à larges spectres	32
Figure 15: Un antibiotique dérivé du nitroimidazole	32
Figure 16: La chaîne respiratoire mitochondriale, source de production des radicaux libres dans l'organisme	37
Figure 17: Piégeages des ROS (R^{\cdot}) par les flavonoïdes	40
Figure 18: Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Me^{n+}) (D'après Van Acker <i>et al.</i> , 1996).....	41
Figure 19: Comparaison entre deux pentahydroxyphénols (Harborne et Williams 2000).....	41
Figure 20: Valeurs de TEAC montrant l'importance du groupement catéchol au niveau du cycle B pour l'activité antioxydante des flavonols (Rice-Evans, 1996).....	42
Figure 21: Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes (Rice-Evans <i>et al.</i> , 1996).	42
Figure 22: Diagramme général de la réaction inflammatoire (Timbo, 2003).....	46
Figure 23: Quelques structures des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)	47
Figure 24: Inhibition de la lipoxygénases et de la cyclo-oxygénases sous l'action de différents flavonoïdes.	48
Figure 25: schéma de fractionnement des extraits.....	57
Figure 26: Structure du DPPH et sa réduction par l'antioxydant RH.....	66
Figure 27: INT, réactif d'accouplement pour l'analyse colorimétrique	68
Figure 28: Système de contrôle de la production des radicaux libres (Watson <i>et al.</i> , 2000).....	71
Figure 29: Mécanisme de la production de l'acide urique.....	72
Figure 30: Réaction de catalyse de la GST (Habdous <i>et al.</i> , 2002; Ibarra <i>et al.</i> , 2003).....	73
Figure 31: Teneur des quatre ions dosés	81
Figure 32: (E) = fraction d'acétate d'éthyle (50%); (J) = fraction aqueuse (12,5); (1)=dérivé d'acide cinnamique; (3)=dérivé d'acide rosmarinique; (6)=dérivé saponarine.....	84
Figure 33: (A) = fraction aqueuse (12,5%); (N) = fraction d'acétate d'éthyle (12,5%); (2)=flavone; (4)=acide phénol.....	85
Figure 34: Inhibition du DPPH par les extraits de plantes	91
Figure 35: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	Figure 36: Courbe d'étalonnage de la quercétine
(flavonoïdes)	Erreur ! Signet non défini.

Figure 37: Courbe d'étalonnage de la quercétine (flavonols) l'acide tannique (tanins)
 Figure 38: Courbe d'étalonnage de l'acide tannique (tanins) **Erreur ! Signet non défini.**
 Figure 39: Courbe d'étalonnage de l'acide (DPPH).
 Figure 40: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique **Erreur ! Signet non défini.**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: La microflore humaine: quelques unes des bactéries associées au corps et maladies causées	27
Tableau 2: tableau d'identification de quelques bactéries de l'étude	28
Tableau 3 : Lieu, organe, période de récolte des espèces végétales de l'étude	54
Tableau 4: Tableau des rendements d'extraction	77
Tableau 5:Caractérisation des différents groupes chimiques des plantes	78
Tableau 6: Résultats du dosage des composés polyphénoliques de 2 Verbenaceae	81
Tableau 7: Longueur d'onde caractéristique des acides phénols et flavonoïdes détectés	83
Tableau 8: Structures des composés polyphénoliques identifiés	89
Tableau 9 : Valeurs de la capacité antioxydante des extraits méthanoliques	90
Tableau 10: Tableau récapitulatif des diamètres d'inhibition	99
Tableau 11: Concentrations minimales inhibitrice et bactéricide, et CMB/CMI.	100
Tableau 12: Résultats des activités inhibitrices des extraits de plantes	106
Tableau 13: Tableau donnant le coefficient de corrélations entre activités enzymatiques et les groupes chimiques quantifiés	107
Tableau 14:: Protocole du dosage des phénoliques totaux	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 15: Protocole du dosage des flavonoïdes totaux	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 16: Protocole du dosage des flavonols totaux	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 17: Protocole du dosage des tanins	Erreur ! Signet non défini.

LISTE DES PHOTOS

Photo 1 : <i>Lantana camara</i> L. (A) et <i>Lantana rhodesiensis</i> Moldenke (B).	5
Photo 2: fruits de <i>Lantana camara</i> L. (BANGOU M. Jean, 12/08 2011 à 14h 43mn)	6
Photo 3: Photo de <i>Lippia chevalieri</i> Moldenke. PHOTO A = Jeune plante, PHOTO B = Plante adulte (Photo de BANGOU M. Jean)	9
Photo 4: Coupes histochimiques de la feuille (A & C) et de la tige (B & D) : coloration au carmino-vert	75
Photo 5: Identification des alcaloïdes (lugol) dans la tige de <i>L. camara</i>	76
Photo 6: Identification des flavonoïdes, <i>L. camara</i> (e & f) et <i>L. chevalieri</i> (g & h)	76
Photo 7: Identification des tanins/ou polyphénols dans le <i>L. chevalieri</i> (I : feuilles, J : tige)	77
Photo 8: Chromatographie des flavonoïdes et des acides phénols des extraits méthanoliques des plantes de l'étude	79
Photo 9: Chromatographie des flavonoïdes et des acides phénols des extraits méthanoliques de plantes	80
Photo 10: Diamètre d'inhibition de <i>Shigella flexneri</i> (A) et <i>Pantoea</i> sp (B).	97

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La culture des soins basée sur l'usage des ressources naturelles constitue un élément important de santé publique dans beaucoup de pays africains pour des raisons historique, culturelle et sociale (Bouquet, 1969; Kerharo, 1974). De manière générale, Foster et Anderson (1978) définissent la médecine traditionnelle comme la totalité des savoirs, valeurs, connaissances en santé, croyances, compétences et pratiques des membres d'une société y compris toutes les activités cliniques et non cliniques liées à ses besoins de santé. La définition de l'OMS précise qu'elle comprend diverses pratiques, approches, connaissances et croyances sanitaires intégrant des médicaments à base de plantes, d'animaux et/ou de minéraux, des traitements spirituels, des techniques manuelles et exercices, appliqués seuls ou en association afin de maintenir le bien-être et traiter, diagnostiquer ou prévenir la maladie mais aussi protéger du mauvais sort ou des ennemis.

A cet effet, *Lantana camara* L. et *Lippia chevalieri* Moldenke, deux espèces de plantes appartenant à la famille des Verbenaceae sont largement répandues dans le monde (Nacoulma, 1996; Ghisalberti, 2000; Pascual *et al.*, 2001; Mevy *et al.*, 2007, Saxena *et al.*, 2012). Ces deux espèces sont traditionnellement utilisées dans diverses pathologies. En effet *Lantana camara* (feuilles et fleurs) est utilisé contre les maux d'estomac, la bronchite, le rhumatisme, l'hypertension, pour soigner les blessures, les cancers, les tumeurs et les maladies parasitaires (Nacoulma, 1996; Ghisalberti, 2000; Geissler *et al.*, 2002; Agra *et al.*, 2007; Chowdhury *et al.*, 2007; Ganjewala *et al.*, 2009; Dua *et al.*, 2010; N'guessan *et al.*, 2011). Tandis que *L. chevalieri* est utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement des maladies respiratoires, les diarrhées, l'hypertension artérielle, les rhumatismes goutteux, les plaies douloureuses et infectées, les pathologies du foie, les candidoses bucco-anales et digestives, le paludisme, les règles douloureuses et les nervosités (Gasquet *et al.*, 1993; Nacoulma, 1996; Bassolé *et al.*, 2003; Mevy *et al.*, 2007).

En effet, les Verbenaceae appartiennent à l'ordre des Lamiales qui sont réputés pour leurs compositions en huiles essentielles (Nacoulma, 1996). Ainsi les investigations phytochimiques antérieures les plus élucidées sur les deux espèces de notre étude ont été surtout sur les huiles essentielles (Ghisalberti, 2000; Pascual *et al.*, 2001). Les polyphénoliques totaux, les flavonoïdes et/ou flavonols totaux ainsi que les tanins totaux ont été les moins étudiés. A notre connaissance les composés polyphénoliques mise en évidence dans *Lantana camara* ont été faits par Ghisalberti (2000). Il a rapporté que six flavonoïdes ont

été identifiés dans les extraits acétoniques des feuilles et fleurs de *L. camara*. Des traces d'euphanes, de triterpènes et de lactones dans les extraits méthanoliques de racines, et des furanonaphthoquinones dans les extraits hexaniques. Ces groupes de composé polyphénoliques sont connus pour leurs propriétés antiinflammatoire (triterpènes) et antimicrobienne (triterpènes pentacycliques), spécialement contre les bactéries à gram-négatifs (furanonaphthoquinones) (Ghisalberti, 2000; Pascual *et al.*, 2001). Le premier centre d'intérêt de notre étude est de contribuer à une meilleure connaissance de la phytochimie des tiges feuillées de *Lantana camara* et de *Lippia chevalieri*, qui sont les parties les plus utilisées en médecine traditionnelle.

Le deuxième centre d'intérêt sera l'implication de ces métabolites secondaires avec les usages des extraits des plantes en médecine traditionnelle et ceux de nos plantes d'étude en particulier. En effet plusieurs études antérieures soutiennent l'utilisation des plantes dans le processus de soin. Selon l'OMS (2002) la médecine traditionnelle est largement plus disponible que la médecine moderne. D'autres auteurs ont montré que plus de 50% des produits prescrits dans plusieurs pays d'Europe ou d'Amérique sont soit des produits naturels ou leurs dérivés (Newman *et al.*, 2003; Gurib-Fakim, 2006; Krzaczkowski, 2008). En Afrique, l'OMS (2002) estime que 80% de la population utilise la médecine traditionnelle pour répondre à ses besoins de santé. La principale raison est la faiblesse des ressources économiques des populations, qui limite l'achat des produits pharmaceutiques (Nikiéma, 2005). Selon INSD (2000), seulement 30% de la population a accès aux médicaments essentiels, tandis que 98% de ces médicaments sont importés à un coût prohibitif.

Alors que les diarrhées et les méningites ont causées à elles seules 17,8% des décès dans les districts sanitaires du Burkina Faso en 2008 (DGISS, 2009). 48,3% de l'ensemble des décès ont été causés par le paludisme grave au cours de cette année 2008. A côté de cette faiblesse économique et d'insuffisance quantitative et qualitative des types de médicaments, plusieurs souches de grandes familles de bactéries pathogènes sont devenues résistantes à un ou plusieurs antibiotiques (Zéba, 2006). La prolifération de ces microorganismes résistants pose un grave problème de santé à l'échelle mondiale (Zéba, 2006). Cette complexité thérapeutique prouve la nécessité à rechercher de nouvelles molécules à base des usages traditionnels des plantes. Cependant le « naturel » n'étant pas synonyme de « sans danger » comme le prétendent certaines conceptions erronées. Il est donc nécessaire de recourir aux preuves scientifiques, seules qui peuvent justifier d'une utilisation traditionnelle de ces plantes sans danger.

Les investigations antérieures montrent que parmi les potentialités biologiques reconnues des plantes, vient en premier lieu l'activité antioxydante face à l'arsenal des radicaux libres qui sont produits dans l'organisme. Les composés antioxydants retrouvés dans les plantes vont jouer un rôle important dans le traitement et la prévention des maladies du stress oxydatif (Cole *et al.*, 2005; Boligon *et al.*, 2009). En plus, le potentiel inhibiteur ou activateur des extraits de plantes sur les enzymes, est de plus en plus exploité *in vitro*. Plusieurs enzymes sont en effet impliquées dans les maladies métabolites. C'est l'exemple de la glutathion-S-transférase (GST), de l'acétylcholinestérase (AChE), de la carboxylestérase (CES) et de la xanthine oxydase (XO) qui sont impliqués respectivement dans l'étiologie, des maladies tumorales, de la maladie d'Alzheimer, des rhumatismes et de la goutte. Inhiber ces enzymes, c'est aussi lutter contre ces maladies mais aussi contre le stress oxydatif (Rodinbo *et al.*, 2003; Filha *et al.*, 2006; Hayeshi *et al.*, 2007; Djeridane *et al.*, 2008).

En somme nous attendons contribuer à détecter les polyphénols et étudier leurs potentialités biologiques de manière générale.

De façon spécifique, ce travail vise à :

- ✚ quantifier les polyphénols, les flavonoïdes, les flavonols, les tanins et les teneurs en ions (Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+);
- ✚ cribler les extraits pour rechercher les acides phénols et les flavonoïdes;
- ✚ évaluer le pouvoir antioxydant;
- ✚ évaluer les activités antibactériennes sur de souches bactériennes référentielles, cliniques et sauvages;
- ✚ évaluer l'inhibition de l'AChE, la GST, la CES et la XO par nos extraits de plantes.

PARTIE I: GENERALITES

Chapitre 1: Présentation de *Lantana camara* L. et *Lippia chevalieri* Moldenke

I.1. *Lantana camara* L.

I.1.1. Classification selon Cronquist (1988)

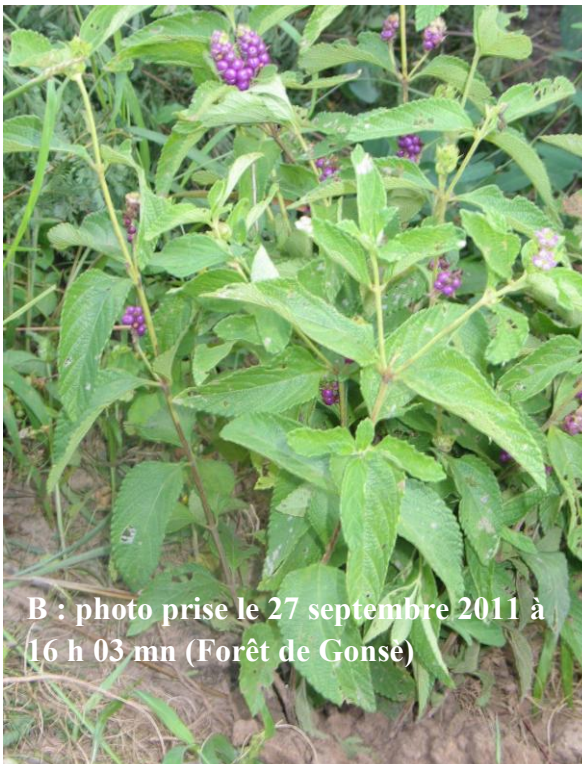
Embranchement :	Spermaphytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Sous-classe :	Asteridae
Ordre :	Lamiales
Famille :	Verbenaceae
Genre :	<i>Lantana</i>
Espèces :	<i>Lantana camara</i> L.

Synonymes et noms locaux

- ✓ **Synonymes:** *Lantana aculeata* L. *Lantana antidotalis* Thon.
- ✓ **Nom local** (Français) : Mille fleurs
- ✓ **Nom local** (Mooré) : Nasar liuli sibi

I.1.2. Description

Lantana camara est un arbuste dressé ou buisson sarmenteux de 2 à 5 m de haut, à nombreux rameaux anguleux partant dès le collet et garnis de protubérances épineuses plus ou moins recourbées. L'écorce est grise à beige, lenticellée, à tranche jaune verdâtre. Le rameau est carré, pubescent à scabre, épineux, gris beige. Les feuilles sont opposées, plus ou moins scabres dessus, pubescentes dessous, ovales et oblonques, de 2-7x2-4 cm, à sommet atténué en triangle, à base en coin ou arrondie, à bord régulièrement denté, dégageant une odeur camphrée plus ou moins désagréable au froissement. La floraison dure presque toute l'année, surtout à proximité des habitations. Les nervures sont saillantes sur la face inférieure. La plante possède également des poils épidermiques sécréteurs. Elle colonise les lieux relativement humides, bosquets, bordures de bas-fond (Ghisalberti, 2000; Arbonnier, 2002; Cavalli, 2002; Judd *et al.*, 2002). Photo 1 : A



Lantana rhodesiensis
Moldenke est l'espèce locale.
La photo ci-contre représente *L.*
rhodesiensis en période de
fructification. Les fruits sont
comestibles.

Photo 1 : *Lantana camara* L. (A) et *Lantana rhodesiensis* Moldenke (B).

L'inflorescence axillaire est en capitule hémisphérique constituée de 30 à 50 petites fleurs jaune orangé, tournant au rose en vieillissant. Les fleurs sont typiques de la famille :

- ✓ à calice court et vert (3 mm) ;
- ✓ à corolle en tube terminé par quatre lobes inégaux de 6 à 8 mm ;
- ✓ à quatre étamines insérées sur le tube à deux niveaux différents ;
- ✓ à ovaire supère et possédant deux carpelles par ovule.

Les fruits sont noirâtres et drupacés (fruit charnu à noyau). La floraison et la fructification se déroulent presque toute l'année.

Les fruits sont noirâtres et drupacés (fruit charnu à noyau). La floraison et la fructification se déroulent presque toute l'année. Photo 2.



Photo 2: fruits de *Lantana camara* L. (BANGOU M. Jean, 12/08 2011 à 14h 43mn)

I.1.3. Habitat et historique

Le genre *Lantana* appartient à la famille des Verbenaceae et a été décrit par Linnaeus en 1753 comme comportant 7 espèces, dont 6 provenant de l'Amérique du Sud et le dernier de l'Éthiopie.

Lantana camara L. est l'espèce la plus répandue du genre *Lantana*. Originnaire de l'Amérique tropicale et subtropicale, les Hollandais l'importèrent du Brésil en Hollande au 16^{ème} Siècle et plus tard les graines furent vendues en Europe, en Grande Bretagne et en Amérique du Nord (Ghisalberti, 2000, Ethnopharmacologia, 2009). Par la suite elle fut introduite à Hawaï, au

Pacifique, en Australie et en Asie du Sud. Cette introduction fut aidée par les oiseaux et très rapidement elle fut répandue dans toutes les aires de l'Afrique du Sud. Entre le 18^{ème} et le 19^{ème} siècle l'espèce est commercialisée comme plante ornementale partout dans le monde. 4 millions d'hectare d'espace cultivable furent aménagés en Australie contre 160 000 en Hawaï (Ross, 1999; Ghisalberti, 2000). Elle est citée pour sa capacité à améliorer la fertilité des sols, à fixer l'humus et à lutter contre l'érosion des sols (Ross, 1999). C'est une plante rudérale très répandue en milieu humide, dans la végétation secondaire et les lisières de forêts, surtout sur les plateaux et la côte Est de Madagascar, les Mascareignes et les Comores. C'est une espèce ornementale disséminée par les oiseaux et devenue localement spontanée et envahissante. (Ghisalberti, 2000; Arbonnier, 2002; Cavalli, 2002; Judd *et al.*, 2002)

I.1.4. Utilisations traditionnelles

Lantana camara est utilisé dans la plupart des pays du monde pour traiter des pathologies. La plante est traditionnellement utilisée pour soigner les cancers et les tumeurs (Forestieri, 1996; Ross, 1999; Ghisalberti, 2000; Chowdhury *et al.*, 2007). Le thé de *Lantana camara* (feuilles et fleurs) est utilisé contre la fièvre, la grippe et les maux d'estomac (Nacoulma, 1996; Ross, 1999; Ghisalberti, 2000; Geissler *et al.*, 2002). En Amérique du centre et du sud, les feuilles sont utilisées en cataplasme pour soigner les blessures, la variole aviaire ainsi que la rougeole. L'extrait de la plante entière est utilisé contre la fièvre, le rhumatisme, l'asthme et l'hypertension (Ghisalberti, 2000; Agra *et al.*, 2007; Ganjewala *et al.*, 2009; Ethnopharmacologia, 2009; Dua *et al.*, 2010; N'guessan *et al.*, 2011). Au Ghana, la plante entière est utilisée contre la bronchite et la poudre des racines additionnée au lait est donnée aux enfants pour les maux de ventre (Irvine, 1961). Dans les pays asiatiques, les feuilles sont utilisées pour traiter les blessures par coupure, les rhumatismes, les ulcères et les maladies parasitaires (Ghisalberti, 2000). Les décoctions sont utilisées en application externe contre la lèpre et la gale. (Ghisalberti, 2000).

I.2. *Lippia chevalieri* Moldenke

I.2.1. Classification selon Cronquist (1988)

Embranchement :	Spermaphytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Sous-classe :	Asteridae
Ordre :	Lamiales

Famille :	Verbenaceae
Genre :	<i>Lippia</i>
Espèces :	<i>Lippia chevalieri</i> Moldenke.

Synonymes et noms locaux

- ✓ **Synonymes:** *Lippia adoensis* Hochs; *Lippia rugosa* A. Chev.
- ✓ **Nom vernaculaire :** Moore Tang Wisao
- ✓ **Nom Bamana (Mali) :** N°ganiba

I.2.2. Description

Lippia chevalieri est un arbrisseau ou sous-ligneux dressé atteignant 2 à 5 m de haut, à souche vivace, à tiges ramifiées aux inflorescences. Ces inflorescences sont étagées en plusieurs verticilles de glomérules moins longs (0,5 à 1 cm) et composées de fleurs blanchâtres. L'écorce est brun clair, plus ou moins lisse, à tranche fibreuse jaune verdâtre. Le rameau est anguleux et pubescent à scabre, vert, pourpre ou jaunâtre. Les feuilles verticillées par 2 à 4 oblongues ou étroitement elliptiques, à bord denté, plus ou moins scabres, à pubescence blanchâtre dessous, de 5 à 18 x 1,5 à 5 cm, à sommet acuminé et pointu, à base atténuée ou en coin. Photo 3 (A & B).

La différenciation de *Lippia chevalieri* avec *Lippia multiflora* Moldenke est délicate. *Lippia multiflora* est connue sous le nom de « Thé de Gambie ». Ses feuilles, bleutées, ont une odeur de camphre plus forte au froissement. Cette espèce se trouve souvent à l'ombre, dans les endroits humides (Nacoulma, 1996; Arbonnier, 2002; Mevy *et al.*, 2007).



PHOTO A : Jeune plante, prise dans la forêt de
Gonsè le 04/07/2011 à 15 h 35 mn



PHOTO B : plante adulte, prise le 23/01/2011 à
11 heures 17 minute (Forêt de Gonsè)

Photo 3: Photo de *Lippia chevalieri* Moldenke. PHOTO A = Jeune plante, PHOTO B = Plante adulte (Photo de BANGOU M. Jean)

I.2.3. Habitat et historique

Le genre *Lippia* appartient à la famille des Verbenaceae, et comprend environ 200 espèces originaires de l'Amérique centrale et sud, mais aussi de l'Afrique tropicale (Mevy *et al.*, 2007). *L. chevalieri* Moldenke est un arbuste répandue en Afrique de l'ouest. La floraison se fait en saison pluvieuse. Son habitat est la savane soudano-guinéenne et guinéenne. Spontanée dans les jachères et sur les talus, généralement sur sols cuirassés ou gravillonnaires (Nacoulma, 1996; Arbonnier, 2002; Mevy *et al.*, 2007). Cela lui a valu le nom en Mooré de « Tang Wisao », contrairement au *L. multiflora* appelée « Kuilg-Wisao ». L'espèce a une grande fréquence du Sénégal au Cameroun.

I.2.4. Utilisation traditionnelles

Le genre *Lippia* est utilisé pour préparer des tisanes et fournissent des huiles essentielles (Judd *et al.*, 2002). En Afrique, certaines espèces telles que *L. chevalieri* est utilisée en médecine traditionnelle dans les pathologies liées au paludisme, comme un sédatif mais aussi dans le traitement des maladies respiratoires (Gasquet *et al.*, 1993; Mukherjee, 1991). D'autres chercheurs ont indiqué que les feuilles de la plantes sont utilisées dans les maladies respiratoires, les diarrhées et l'hypertension artérielle (Nacoulma, 1996; Bassolé *et al.*, 2003; Mevy *et al.*, 2007). Particulièrement au Burkina Faso, Nacoulma (1996) a recensé les utilisations traditionnelles de *L. chevalieri* et les a classés en fonction des utilisations internes et/ou externes. Comme utilisations traditionnelles externes, on peut retenir l'utilisation contre les rhumatismes goutteux, les plaies douloureuses et infectées. Par contre les sommités fleuries sont utilisées contre les pathologies du foie, les candidoses bucco-anales et digestives, les anémies, les nervosités de la ménopause, les ménorragies de la ménopause, le paludisme, les règles douloureuses, les insomnies, les nervosités, les fièvres, les hépatites, la goutte et les troubles nerveuses.

Chapitre II: Etudes antérieures sur *Lantana camara* L. et *Lippia chevalieri* Moldenke

II.1. Etudes phytochimiques sur les deux espèces

II.1.1. Mono- et sesquiterpènes

L'investigation phytochimique de *Lantana camara* a suscité un intérêt considérable résultant principalement de la présence des composés toxiques dans certaines espèces. Les premiers travaux réalisés sur *Lantana camara* ont concerné les huiles essentielles (Gildermeister et Hoffmann, 1961; Chowdhury *et al.*, 2007). Les huiles essentielles de

l'espèce de *L. camara* provenant du Brésil a une odeur de terpène. Ces constituants se sont avérés principalement des dérivés de bisabolène (monoterpène), avec une teneur de 65%. Les sesquiterpènes présents sont : β -curcumène (1,5%), (*E*)-nuciferal et (*Z*)-nuciferol (3,9%), (-)- α -curcumèn-15-al (5,6%), γ -curcumène (8%), α -curcumène (9,7%), (-)-*epi*- β -bisabolol (environ 10%), (-)- γ -curcumèn-15-al (14,9%). 5% des composés de ces huiles incorporent le squelette italicène, épimères en C10 et 7,2% d'helifolène aldéhydes épimères en C7 (Ghisalberti, 2000). **Figure 1.**

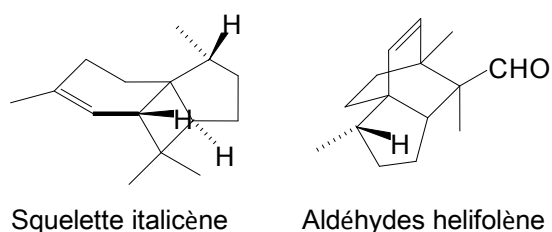


Figure 1: Molécules de base pour les mono- et sesquiterpènes (Ghisalberti, 2000)

L'étude de *Lippia chevalieri* montre que les huiles essentielles les plus fréquemment rencontrées sont : limonène, β -caryophyllène, *p*-cymène, camphre, linalol, α -pinène et le thymol (Pascual *et al.*, 2001). Une étude menée au Burkina Faso a montré que les huiles essentielles des feuilles de *Lippia chevalieri* sont majoritairement composées de thymol (27,4 %), *p*-cymène (21,1 %), 2-phenyléthylproprionate (12,6 %) (Bassolé *et al.*, 2003). Les fleurs sont essentiellement composées de β -caryophyllène, du 1,8-cinéole, de germacrène (Menut *et al.*, 1993). **Figure 2.**

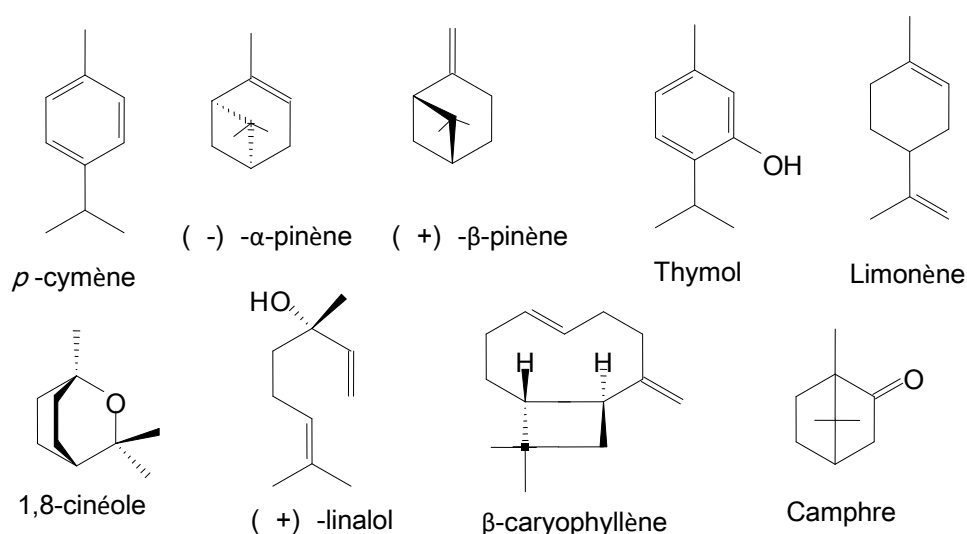


Figure 2: Quelques mono/sesquiterpènes mis en évidence dans les deux plantes

II.1.2. Les triterpènes

Les premiers travaux sur les triterpènes de *Lantana camara* ont concerné l'élucidation de la structure de la lantadène A et B, premières molécules reconnues être toxiques (Ghisalberti, 2000). Il a donc été démontré que les deux composés varient en fonction du climat. La lantadène A isolée d'Australie a une structure différente et on observe des traces pour la lantadène B. Plus de lantadènes ont été élucidés à savoir la lantadène A, B, C, D et la lantadène A réduite, par le fait qu'elles présentent des toxicités similaires. Le lupéol analogue de l'acide lantique et de lantanolique a aussi été isolé (Sharma & Sharma 1989). Figure 3.

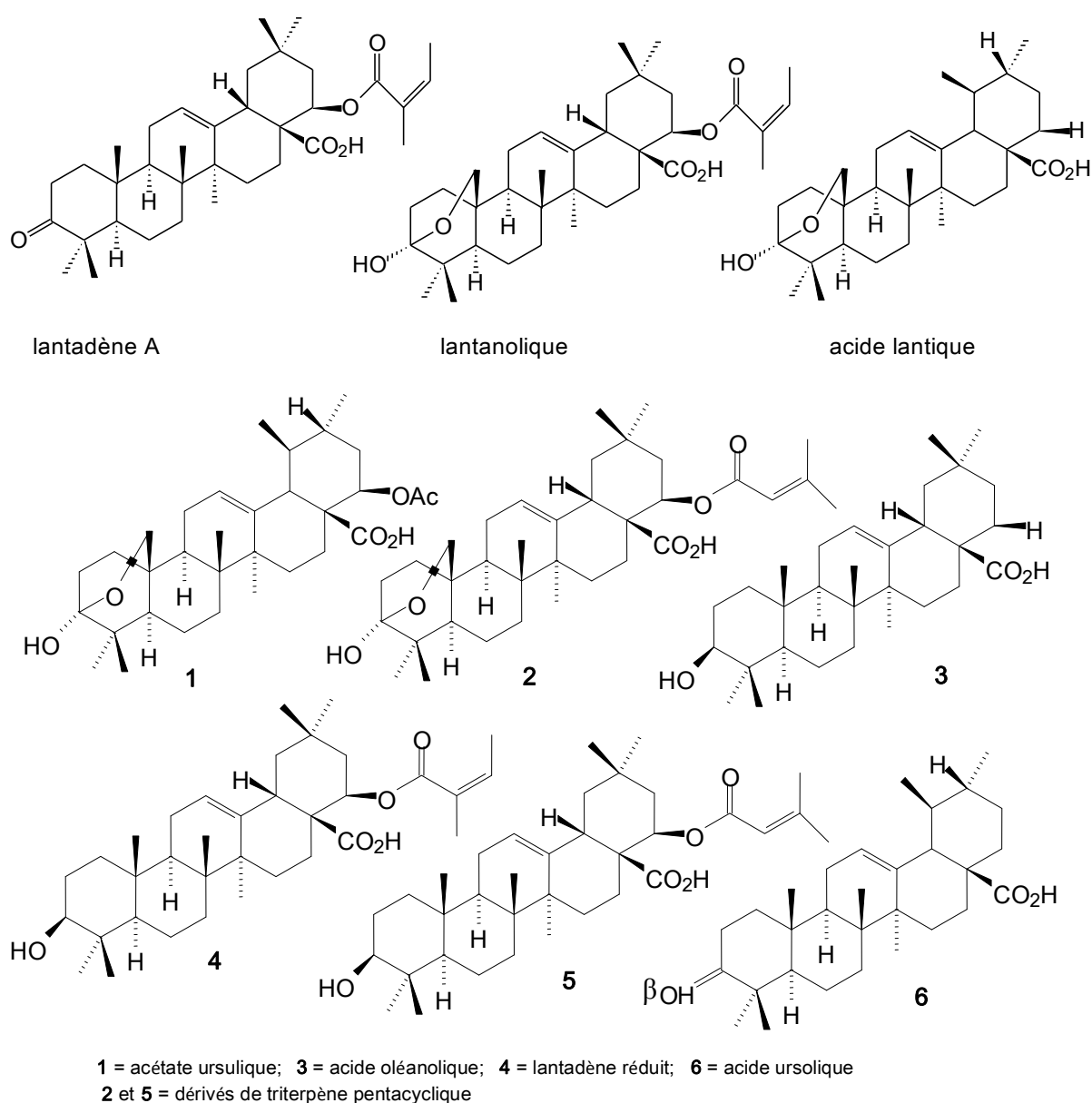
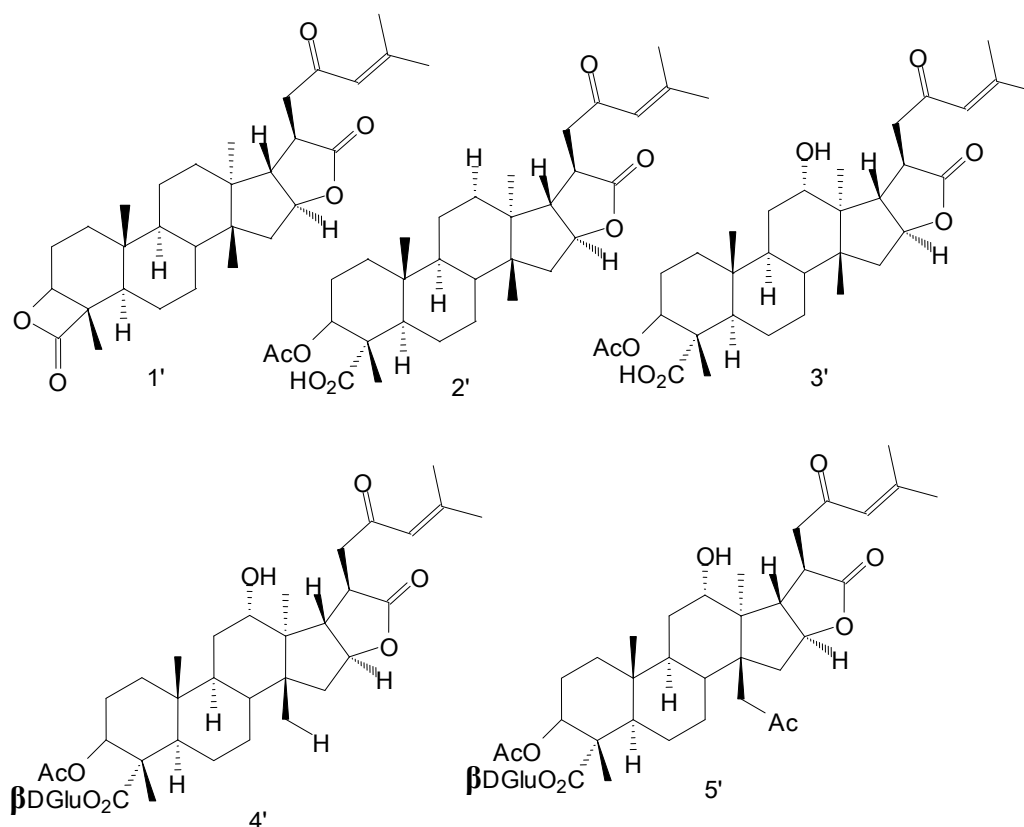


Figure 3: quelques triterpènes (partie 1)

Ghisalberti en 2000 ont montré que l'exsudation à la surface des feuilles est un mélange de flavonoïdes, de lantadène A et d'acide ictérogénique. Dans les racines l'acide oléanolique est le composant majoritaire (Ghisalberti, 2000). Une étude récente d'extrait méthanolique de *Lantana camara* a mis en évidence des traces d'euphane, triterpènes et de lactones (0,00004 – 0,0002%). Dans cette étude cinq principes actifs ont été isolés (1' – 5') à travers la spectrophotométrie de masse couplée au RX (Ghisalberti, 2000). Figure 4.



1', 2', 3', 4', 5' = lactones d'euphane

Figure 4: Quelques triterpènes (parties 2)

II.1.3. Les glycosides iridoïdes

Un nombre important de glycosides iridoïdes a été isolé de *Lantana camara*. Les fleurs de couleurs blanches, rose et rouge en produisent suffisamment de thevesides qui sont présent sous forme de sel sodique (Ghisalberti, 2000). Il a également montré que les feuilles et les racines contiennent du sel sodique, de theveside, mais le theviridoside et son ester correspondant sont retrouvé seulement dans les racines (Rimpler *et al.*, 1986). D'autres composés tels que le géniposide (précurseur du theveside), 8-épiloganine, méthyle ester de

shanzhside et le lamiridoside ont aussi été isolé des racines de *L. camara* (Ghisalberti, 2000).

Figure 5.

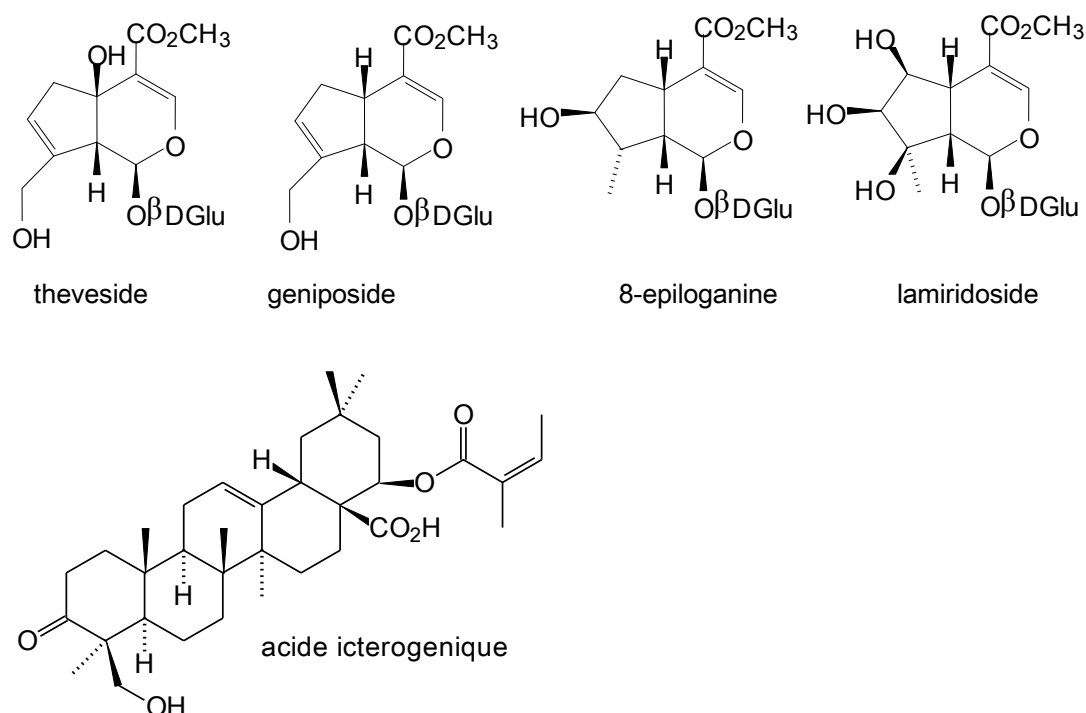


Figure 5: Glycosides iridoïdes isolés de *L. camara*

II.1.4. Furanonaphthoquinones

Ghisalberti (2000) a rapporté que le diodantunezone quinone a été isolé de *L. camara* ainsi que ses isomères correspondants au Sri-Lanka en 1983. Ces composés ont été isolés dans les racines d'un extrait hexanique. D'autres composés furanonaphthoquinones ont été isolés d'extrait méthanolique des racines de *L. camara* en 1991 (Ghisalberti, 2000). Figure 6.

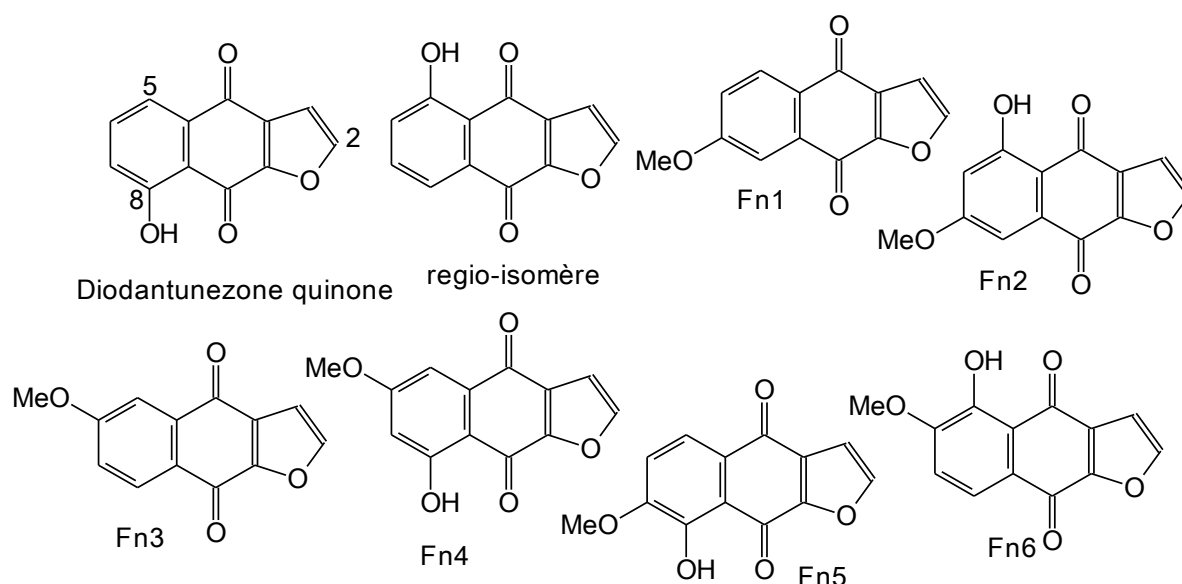
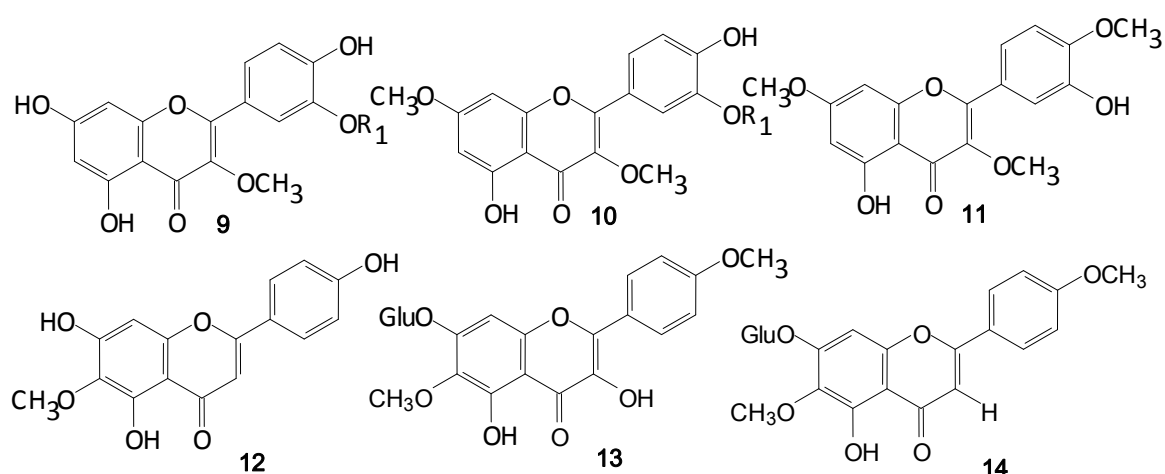


Figure 6: Quelques molécules de furanonaphthoquinones

II.1.5. Les flavonoïdes

Ghisalberti (2000) a montré que l'extrait acétonique des feuilles de *L. camara* contient le 3-méthoxy-, 3,7-diméthoxy- et le 3,7,4'-triméthoxyquercétine (9-14); tandis que l'hispiduline a été isolé de la tige. Le glycoside camaraside (flavone) a également été isolé (Verma *et al.*, 1997). Ce composé avait déjà fait l'objet d'isolement dans *L. camara* en même temps que le pectolarigenin 7-O- β -D-glucoside (Verma *et al.*, 1997). Figure 7.



9 = 3-méthoxyquercétine; 10 = 3,7-diméthoxyquercétine; 11 = 3,7,4'-triméthoxyquercétine
 12 = hispiduline; 13 = glycoside camaraside flavone; 14 = pectolarigenine 7-O - β -D-glucoside

Figure 7: Quelques flavonoïdes isolés de *L. camara*

Verbascoside est un phényléthanoïde très répandue qui a été isolé dans *Lantana camara* (Syah *et al.*, 1996). Son isomère (Z) a également été isolé dans *Lantana camara* (Verma *et al.*, 1997). D'autres composés tels que l'isoverbascoside, martynoside, derhamnosylverbascoside, l'isonuomioside A et le calceolarioside ont aussi été isolés dans *Lantana camara* (Taoubi *et al.*, 1997; Syah *et al.*, 1996). Figure 8.

II.1.6. Glycoside phényl éthanoïde

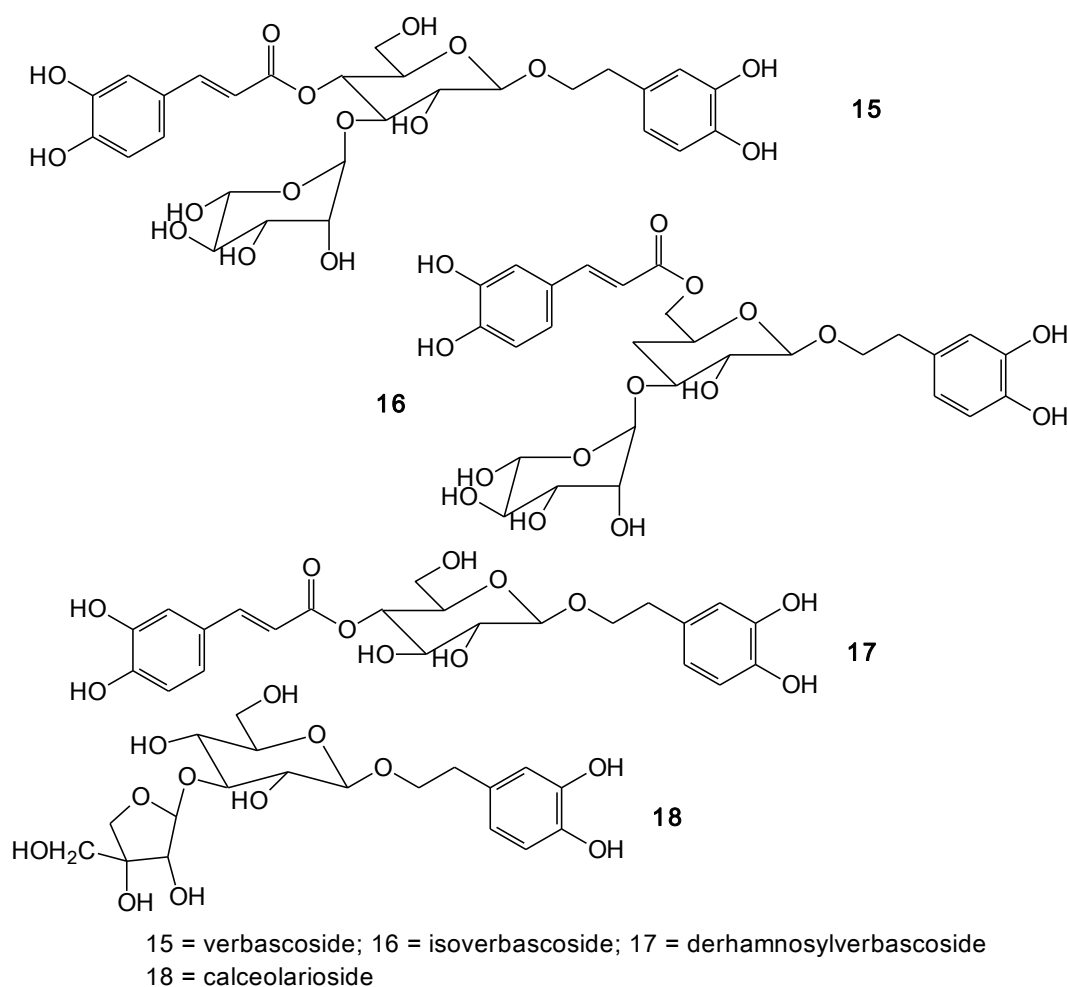


Figure 8: Les principaux glycosides phényl éthanoïde

II.1.7. Les composés miscellanées

La plupart des Verbenaceae produisent des diterpènes avec exceptionnellement le phytol. Les composés tels que les stéroïdes, les β -sitostérol, campestérol, stigmastérol aussi bien que le glycoside β -sitostérol ont été isolé en grandes quantités dans *Lantana camara* (Ghisalberti, 2000). Egalement six oligosaccharides à savoir : ajugose, stachyose,

verbascotetraose, verbascose et les lantanose A et B ont été isolé dans les racines (Ghisalberti, 2000). Figure 9.

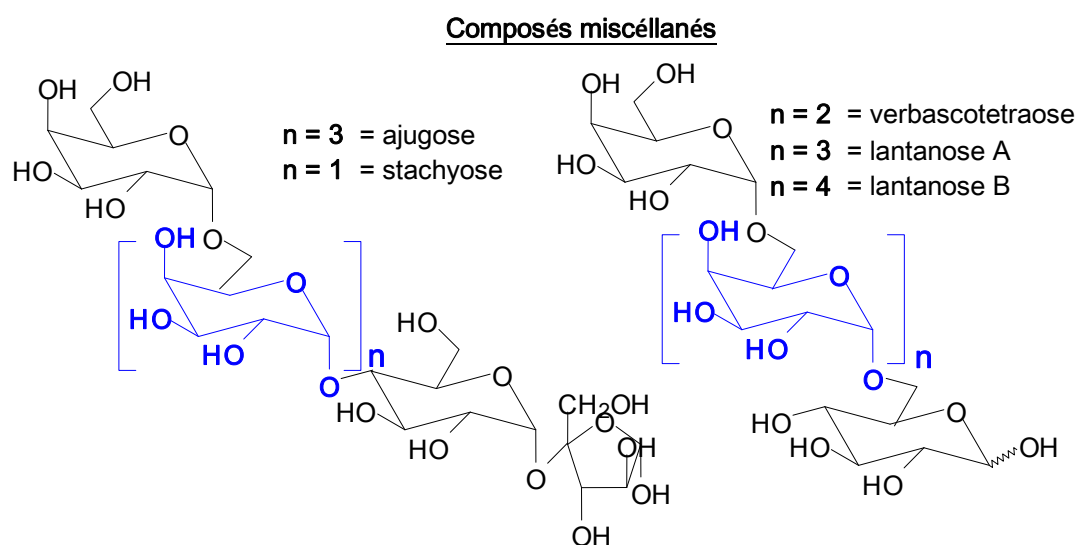


Figure 9: Les composés miscellanés

II.2. Etudes pharmacologiques sur les deux espèces

II.2.1. Activités antimicrobienne et antiparasitaire

Ursulate acétique qui est un triterpène pentacyclique et a été trouvé actif à 30 $\mu\text{g}/\text{disque}$ contre *Staphylococcus aureus* et *Salmonella Typhi*. Ce résultat s'est trouvé comparable au diamètre d'inhibition produit par le chloramphénicol (sur *Staphylococcus aureus*) et la tétracycline (sur *Salmonella Typhi*) pour des mêmes concentrations (Barre *et al.*, 1997). Les furanonaphthoquinones sont actifs sur les bactéries, surtout celles à gram positif, les mycètes et possède une très bonne activité contre les *Trypanosoma* (Nagata *et al.*, 1998; Ghisalberti, 2000; Ethnopharmacologia, 2009). Le verbascoside présente une activité antibactéricide contre *E. coli* (Ghisalberti, 2000). Bassolé *et al.* (2003) ont montré que les huiles essentielles des feuilles de *L. chevalieri* du Burkina Faso sont antibactériennes. En effet, ils ont évalué les concentrations minimales inhibitrice/bactéricide et ont trouvé respectivement les CMI et CMB suivants : *B. cereus* LMG13569 (0,5 et 1 %), *P. mirabilis* CIP588104 (2 et 2 %) et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (1 et 4 %). Dans cette même étude une CMI de 8 % a été trouvé sur *Escherichia coli* CIP105182 contre une CMB négative. D'autres études concernant *L. chevalieri* ont rapporté que certains composés tels que l'élémol,

1,8-cinéole, le camphre et le p-cymène sont bien connus pour leurs effets antimicrobiens très prononcés (Baydar *et al.*, 2004; Burt, 2004; Leung et Foster, 1996; Pauli et Schulcher, 2004).

II.2.2. Activités antiinflammatoires

Les triterpènes possèdent des activités anti-inflammatoires. Par exemple l'acide oléanolique et l'acide ursolique (isolés de *L. camara*) ont donné des activités significatives (IC_{50} 2-4,6 μ M) sur l'inhibition leucocyte élastase humain (LEH). Cette enzyme participe à la destruction de l'élastine et joue un rôle dans les troubles chroniques telles que l'emphysème pulmonaire, la fibrose cystique, l'hépatite et l'arthrite rhumatoïdale (Ghisalberti, 2000). La découverte d'au moins 2 isoenzymes de la cyclooxygénase, dénommées COX-1 et COX-2, et la perspective de pouvoir distinguer les rôles physiopathologiques des médiateurs qu'elles produisent, a naturellement fait naître l'espoir de développer de nouveaux inhibiteurs de COX qui maintiendraient les propriétés thérapeutiques des anti-inflammatoires non stéroïdiens sans en conserver les effets indésirables (Ghisalberti, 2000; Jouzeau et al., 2004). Dans les conditions normales les niveaux de COX-2 sont très bas dans les cellules; mais une augmentation se produit après une induction des cytokines, des facteurs de croissances et des oncogènes. L'augmentation de la prostaglandine observée lors de l'inflammation aiguë est due en partie à une forte régulation de la cyclo-oxygénase. Les acides ursulique et oléanolique possèdent des effets inhibiteurs sur l'inflammation et sur les diverses étapes du développement des tumeurs (Ghisalberti, 2000). Il a également montré que l'acide ursulique a un effet inhibiteur sur la COX-2 avec une IC_{50} de 130 μ M et un rapport de sélectivité de 0,6 (COX-2/COX-1). Dans cette étude l'acide oléanolique a donné une IC_{50} de 295 μ M avec un ratio de 0,8. Les lactones isolées en 1998, sont des inhibiteurs potentiels de l' α -thrombine et à un moindre degré de l' α -chymotrypsine ainsi que d'autres protéases de la série (Ghisalberti, 2000). L' α -thrombine est une protéase de la sérine qui appartient à la famille de la trypsine et joue un rôle central dans le processus hémostatique, où elle régule l'activité de la coagulation (Ghisalberti, 2000). L'inhibition de la protéase implique l'ouverture de l'anneau de lactone et de l'acylation de la sérine sur le site actif. Une IC_{50} de 0,004 ; 0,07 et 0,07 a été trouvé pour respectivement avec l' α -thrombine, α -chymotrypsine et la trypsine. Bien que certains de ces composés aient montré une activité inhibitrice significative sur les LEH (leucocyte élastase humain), la chymotrypsine et l' α -thrombine humaine, elle est relativement instable dans le plasma, par contre les composés contenant une fraction lactone donnent une activité plus stable. De même, on a constaté que la géniposide possède une activité inhibitrice sur l'AMPc phosphodiésterase (Ghisalberti, 2000).

II.2.3. Toxicités

Certaines descriptions de *L. camara* ont montré la toxicité de cette plante sur les petits ruminants et l'effet intoxicant. La mortalité a été particulièrement démontrée avec les espèces d'Australie et d'Inde. Parmi les 29 descriptions trouvées dans la littérature australienne sur *L. camara*, huit (8) font cas du caractère toxique sur le bétail (Ghisalberti, 2000). Toutes les descriptions de toxicité font cas du lantadène A et B surtout sur les moutons. Le 3- β -hydroxy analogue du lantadène A est aussi toxique à 40 mg/kg. L'estimation de la toxicité des feuilles de *Lantana* est de 3 mg/kg. Cette toxicité n'est pas cumulative, toutes les espèces de *L. camara* ne sont pas toxiques et celles qui sont susceptibles d'intoxication varient en fonction des animaux. Il est généralement accepté que les composés de lantadènes tels que: les lantadènes A, B, D et l'acide ictérogénique sont toxiques sur les moutons et les chèvres (Pass *et al.*, 1991). Mais la lantadène A ne présente aucune toxicité pour les chevaux, les rats, les veaux et les agneaux. La toxicité par voie orale du lantadène A est de 60 mg/kg contre 1,3 mg/kg (voie intraveineuse) (Pass *et al.*, 1991). Les toxines absorbées par le rumen et l'intestin grêle sont transportées au foie par sang portique. Elles sont métabolisées dans le foie et rejeté dans les vésicules biliaires compromettant ainsi la sécrétion biliaire. Les effets cholestatiques sont le maintien de l'ictère, la rétention de la bilirubine qui maintient le niveau élevé des toxines dans le rumen entraînant une détérioration progressive du foie (Pass *et al.*, 1991). Le diodantunezone a été évalué pour l'activité cytotoxique contre les lignées cellulaires nasopharynx : lymphocytaire, épidermoïdes humaines, de leucémies K562 et de P388. Les résultats respectifs suivant ont été obtenus: 6,76 ; 9,2 et 7,94 μ mol. L'analogue éther de méthyle a donné une meilleure activité avec respectivement des IC₅₀ de 1,3; 1,32 et 1,86 μ mol/L (Mukherjee *et al.*, 2007).

II.2.4. Activités antivirale et anticancéreuse

Les lantadènes A, C et le lantadène réduit inhibent l'activation du virus d'Epstein-Barr dans les cellules Raja, induite par le 12-O-tétradecanoylphorbol-13-acétate (TPA) (Ghisalberti, 2000). 10 mol de triterpène contenant les lantadènes B et C, en association avec une mole de TPA sont indiqués pour une promotion du traitement des tumeurs (Ghisalberti, 2000). Les lantadènes A et B possèdent également des effets inhibiteurs sur la carcinogénèse. La lantadène B (47 μ g) appliqué à chaque traitement de TPA, retarde la formation des papillomes sur la peau des souris, réduit ce taux à 15% à 20 semaines et le nombre moyen des souris affectées à 50% (Ghisalberti, 2000). Le verbascoside qui est présent dans plusieurs familles de plantes de *Lantana* joue un rôle crucial dans la prolifération cellulaire et la

différentiation (Ghisalberti, 2000). Il a montré *in vivo* une activité contre la leucémie lymphocytaire minime P388 comparée à l'activité antiproliférative de l'isoverbasoside (Ghisalberti, 2000). Selon Ghisalberti (2000), les acides ursuliques et oléanoliques possèdent des propriétés antitumorales sur les diverses étapes de leur développement. De même les genres *Lantana* et *Lippia* sont riches en composés verbascoside qui sont des antiprolifératifs cellulaires (Ghisalberti, 2000; Tsiba *et al.*, 2010).

II.2.5. Autres activités

En ce qui concerne les autres activités biologiques, les études menées au Kenya ont montré que les huiles essentielles de *Lippia chevalieri* sont larvicides, surtout l'élémol dont la teneur évaluée au niveau des feuilles est de 22,0 % contre 11,9 % dans les fleurs (Mwangi *et al.*, 1992; Mevy *et al.*, 2007).

Egalement parmi les iridoïdes isolés de *L. camara*, seul le géniposide a été étudié en détail. Il empêche l'hépatotoxicité et la synthèse de réparation de l'ADN, induite par l'aflatoxine B₁ dans les hépatocytes primaires de rat (50 à 100 mg/kg). Le mécanisme implique la hausse du niveau de la Glutathion-S-transférase et du glutathion peroxydase. Le verbascoside protège de l'hémolyse oxydative (Ghisalberti, 2000). Génipine et géniposide ont montré une activité hypolipidémique chez les rats hyperlipidémiques. De même, on a constaté que le géniposide possède une activité inhibitrice sur l'AMPc phosphodiésterase (Ghisalberti, 2000). Barre *et al.* (1997) ont montré que l'ursulate acétique et un dérivé d'acide oléanolique, deux dérivés triterpènes pentacycliques exercent une grande activité antimutagénique sur les souris. Les verbascosides inhibent l'aldolase réductase, ainsi que la peroxydation lipidique. Il a également présenté une activité immunomodulatrice, des propriétés immunosuppressives et a apparemment renforcé l'effet anti-tremblement de la L-DOPA (Ghisalberti, 2000).

Il est indiqué que les composés issus des feuilles tels que les stéroïdes, lancamarone expose aux propriétés cardiotoniques et que la lantamine qui est un alcaloïde de l'écorce de la tige et des racines possède des propriétés antispasmodique et antipyrétique comparable à la quinine. Une fraction alcaloïdique qui diminue la pression sanguine, accélère le rythme cardiaque et provoque le tremblement du chien est isolée des feuilles et l'on suggère d'être capable de réduire la fièvre, les troubles et l'hypertension (Ghisalberti, 2000).

Chapitre III: Généralités sur quelques activités biologiques

III.1. Activités enzymatiques

III.1.1 . Définition de l'enzyme

Les enzymes sont des biocatalyseurs protéiques qui activent chacune, une réaction biochimique spécifique (Granner *et al.*, 1989). Les enzymes sont classées, depuis 1961, en plusieurs grandes catégories dépendant du type de réactions qu'elles contrôlent. Ainsi, les hydrolases accélèrent des réactions faisant intervenir des molécules d'eau, au cours desquelles une substance est décomposée (hydrolysée) en molécules plus simples. Les oxydoréductases accélèrent les réactions d'oxydation ou de réduction. Citons également les transférases (transfert d'un groupement chimique actif d'une molécule à une autre), les lyases (transfert d'un groupe chimique, avec formation d'une double liaison), les ligases (catalyse des réactions de synthèse) et les isoméras (réarrangement de la structure moléculaire du substrat). Ce sont des protéines agissant comme des catalyseurs de nombreuses réactions biochimiques. Actuellement, près de 1000 enzymes différentes ont été identifiées. La science qui étudie les enzymes est l'enzymologie.

III.1.2. Rôles des enzymes dans l'organisme vivant

Les enzymes participent à la quasi-totalité des réactions biochimiques à l'intérieur et à proximité immédiate d'une cellule. Les enzymes de l'appareil digestif dégradent les glucides, les lipides et les protéines qui proviennent de l'alimentation en éléments simples, facilement assimilables par les cellules du tube digestif. Certaines enzymes, présentes en très faibles quantités sur la peau, détruisent la paroi et le matériel génétique des virus, participant ainsi à la défense passive de l'organisme. À l'intérieur des cellules, les enzymes permettent l'utilisation du glucose, le stockage d'énergie chimique sous forme d'ATP, la dégradation des molécules « usagées », la réplication des molécules d'ADN, la transcription (ARN), la formation de nouvelles protéines, etc. Ces enzymes n'ont pas que des effets bénéfiques pour l'homme et son environnement, on rencontre également des enzymes qui favorisent des résistances et rendant ainsi inefficaces certains traitements (Haubruge & Amichot, 1998). Trois des quatre enzymes de notre étude telles que l'AChE, les CES et les GSTs sont impliquées dans la résistance des insectes aux insecticides (Haubruge & Amichot, 1998).

III.1.3. Quelques enzymes impliquées dans les maladies métabolites

III.1.3.1. La xanthine oxydase

La xanthine oxydase à un poids moléculaire de 270 000 c'est une grosse protéine et chaque unité enzymatique est liée à deux molécules de flavine (liée sous forme de FAD), deux atomes de molybdène et huit atomes de fer. C'est une enzyme du foie, du rein et du petit intestin. Elle catalyse le métabolisme des nucléotides puriques et pyrimidiques, elle joue à cet effet, un rôle important dans la santé de l'Homme. En effet, elle catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine, puis de la xanthine en acide urique.

Chez l'Homme, la xanthine oxydase se retrouve normalement dans le foie et sous une forme non libre dans le sang. En cas d'atteinte hépatique grave, la xanthine oxydase est larguée dans le sang, si bien qu'une mesure sanguine de XO permet de déceler les dommages hépatiques. Les maladies qui comportent les anomalies dans le métabolisme des purines et des pyrimidines comprennent la goutte, le syndrome de Lesch-Nyhan, le syndrome de Rye, la déficience d'adénosine désaminase et la déficience de purine nucléoside phosphorylase (Granner *et al.*, 1989). De plus, la maladie de Von Gierke ou de déficit en glucose-6-phosphatase qui résulte d'une augmentation de la production de ribose-5-P (précurseur du PRPP) entraîne aussi une excrétion excessive d'urate. De même, l'acidose lactique associée élève le seuil rénal de la sécrétion des urates, augmentant les urates organiques totaux.

Dans le cas de la goutte, c'est l'accumulation accrue de l'acide urique au niveau des articulations qui provoque la maladie. La xanthine oxydase est une voie métabolique de la formation de l'acide urique; l'allopurinol, qui est un inhibiteur de la xanthine oxydase, est utilisé dans le traitement de la goutte; cependant il présente des effets secondaires.

Les inhibiteurs connus sont : Arava^R (Léflunomide) comme antirhumatismal et Zyloric^R (Allopurinol) comme antigoutteux (Garnier *et al.*, 2006; Vidal, 2009).

III.1.3.2. L'acétylcholinestérase

L'acétylcholinestérase est une enzyme impliquée dans l'étiologie des maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer (Wang *et al.*, 2007). Sur le plan purement pathologique, la maladie d'Alzheimer se caractérise par une destruction plus ou moins rapide des cellules nerveuses du cerveau.

Or, plusieurs études d'imagerie cérébrale confirment que les atteintes d'une zone spécifique du cerveau, la zone hippocampale, constituent un des premiers éléments caractéristiques de cette terrible affection. Les neurobiologistes, intéressés par la démence Alzheimer, ont démontré sur le plan biochimique une accumulation excessive d'une protéine normalement peu abondante dans le cerveau de sujets sains, l'amyloïde (Ferreira *et al.*, 2006). On suspecte que l'amyloïde est impliquée dans l'apparition des processus menant à la mort neuronale, notamment de l'apoptose. Les études des marqueurs biochimiques de la maladie d'Alzheimer, indiquent également la présence d'altération de l'activité phospholipasique de type A2 (PLA2) dans les régions du cerveau touchées par cette maladie. Les chercheurs n'ont jusqu'ici accordé qu'assez peu d'attention aux enzymes PLA2 comme mécanisme initiateur de la maladie d'Alzheimer, un système cellulaire pourtant particulièrement important dans les processus d'inflammation et d'apoptose à l'échelle de l'organisme (Rhee *et al.*, 2001). L'AChE est retrouvée chez les insectes et par son action d'hydrolyse de l'acétylcholine aide les insectes à résister aux insecticides (Yi *et al.*, 2006). Au niveau des insectes (*Drosophila melanogaster*), plusieurs mutations de l'AChE ont été identifiées autour du site d'action des insecticides. Quatre sites de mutations ont été identifiés à savoir : I161V, G265A, F330Y et G368A (Shi *et al.*, 2004). Ces mutations compromettent l'attaque des molécules d'insecticides. Chacune de ces quatre enzymes mutées, peuvent seule ou en association hydrolyser l'acétylcholine à une teneur variant entre 2 μ M à 300 mM (Shi *et al.*, 2004). En effet chez les insectes, l'AChE se trouve essentiellement dans le système nerveux central. L'influx nerveux arrivant dans la terminaison présynaptique entraîne une libération d'acétylcholine (ACh) qui se fixe sur des récepteurs placés sur la membrane post-synaptique. Cette fixation permet l'ouverture des canaux sodium et potassium, laquelle entraîne la dépolarisation à l'origine de l'influx nerveux sur l'élément post-synaptique. Le rôle de l'AChE est d'hydrolyser l'acétylcholine ce qui permet la fermeture des canaux associés au récepteur du neurotransmetteur. Si l'action de cette enzyme est bloquée, la membrane post-synaptique se trouve continuellement excitée. Les organophosphorés et les carbamates agissent en inhibant l'activité catalytique de l'AChE. Ils se fixent en effet sur le site actif de l'enzyme, à la place de l'acétylcholine. L'accumulation de l'ACh dans la région synaptique provoque une hyperexcitation des liaisons cholinergiques causant finalement la mort de l'insecte (Haubruge & Amichot, 1998).

Les inhibiteurs du cholinestérase sont : Aricept^{MD} (Donépézy), Exelon^{MD} (Rivestigmine) et la Reminyl^{MD} (Galantamine) (Centre d'information sur le médicament, 2006; Garnier *et al.*, 2006; Bennys, 2009).

III.1.3.3. La glutathion-S-transférase

Les GSTs sont une famille diverse d'enzyme omniprésent dans les organismes aérobies. Elles représentent un groupe d'enzymes qui catalysent la conjugaison des composés ayant un centre réactif électrophile avec le groupement thiol (nucléophile) du tri peptide du glutathion (Feng *et al.* 2001). Ce sont des enzymes cruciales et potentiellement impliquées dans la régulation des cancers, ainsi que leurs capacités à synthétiser les métabolites réagissant avec les carcinogènes (Zanden *et al.*, 2003; Zanden *et al.*, 2004).

Parmi ces enzymes, les classes *pi* et *alpha* sont les plus visées du fait de leurs hautes expression dans les différentes pathologies comme les cancers et les maladies de foie et rénale (Habdous *et al.*, 2002).

D'autres études ont montré que la classe *pi* peut être exploitée en immunohistologie impliquant le cancer. Leur forte expression est reconnue d'être un précurseur des cancers et impliqués dans diverses tumeurs malignes. Au niveau du plasma la classe *pi* potentialise l'hépatite chronique, les maladies cholestatiques chroniques, les cirrhoses biliaires primaires et le rejet de la transplantation. La classe *pi* est localisée dans les hépatocytes tandis que la classe *alpha* est confinée dans les cellules intrahépatiques de la bile (Habdous, 2002).

Il existe deux formes de GST chez les insectes. Elles sont surtout localisées dans le cytoplasme des cellules des corps gras et des muscles alaires (Franciosa, Bergé, 1995). Depuis la découverte des glutathion S-transférases dégradant des organophosphorés (Fukami, Shishido, 1966), de nombreuses études montrent l'importance de ce système enzymatique dans la résistance aux insecticides (Haubruge & Amichot, 1998).

Comme anticancéreux, on peut citer : Chloraminophène^R (Chlorambucil) et le Cisplatyl^R (Cisplatine) (Garnier *et al.*, 2006; Vidal, 2009).

III.1.3.4. La carboxylestérase

Les CES sont des isoenzymes (EC: 3.1.1.1.) appartenant à la famille des sérines estérase et sont largement distribuées dans différents tissus des animaux (estomac, intestin grêle, colon, cerveau, sang, plasma, foie, cœur, poumon, pancréas, rate, testicules et prostate),

avec une affinité pour les fractions microsomale hépatique (Djeridane *et al.*, 2006; Djeridane *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2010).

Cette famille d'enzymes représente celle qui hydrolyse les groupes fonctionnels tels que les esters d'acide carboxylique (procaïne), les amides (procanamide) et les thioesters (spironolactone) qui catalysent aussi bien l'hydrolyse des composés endogènes à courte et longue chaîne des acyl-glycérols; traduisant ainsi le rôle physiologique joué par les carboxylestérases (Djeridane *et al.*, 2006).

En ce qui concerne la résistance aux insecticides, on distingue deux catégories d'estérases: (i) les carboxylestérases ayant une action directe dans la dégradation d'organophosphorés et (ii) les estérases non spécifiques qui fixent l'insecticide sans le dégrader. Chez les insectes, les estérases sont impliquées dans la reproduction, dans le métabolisme des hormones, dans la digestion ainsi que dans la neurotransmission. Elles sont surtout localisées dans le cytoplasme et sur le réticulum endoplasmique des cellules du tube digestif, des tubes de Malpighi, du système reproducteur et du corps gras (Haubruge & Amichot, 1998).

Au niveau de la carboxylestérase, nous avons les antispasmodiques tels que le Ditropan (Oxybutynine/Ditroptane) et les anesthésies locale d'infiltration et de conduction telles que : Lavoisier^R (Procaïne) et le Fluorouracile^{ICN} (Flumazénil) (Garnier *et al.*, 2006; Vidal, 2009).

III.2. Activités antibactériennes

III.2.1. Bactéries pathogènes

Le tableau 1 donne quelques unes des bactéries de la microflore humaine, ainsi que les maladies associées. Ce tableau est suivi de celui du critère biochimique d'identification des bactéries de l'étude (Tableau 2).

III.2.2. Classification des bactéries

Les bactéries peuvent se différencier, par exemple, par leur forme, leur taille ou leur structure, par leurs activités chimiques, par les éléments nutritifs qui leur sont nécessaires, par la forme de l'énergie qu'elles utilisent, par des conditions physiques dans lesquelles elles peuvent croître, par leurs réactions à certains colorants. De tels caractères facilement vérifiables même dans un laboratoire modestement équipé sont largement utilisés pour

classifier les bactéries. Comme les autres règnes biologiques, les bactéries sont réparties en catégories hiérarchisées (familles-genres-espèces). Les *espèces* qui sont suffisamment semblables sont placées dans un même *genre*, et les genres qui montrent une certaine similarité sont groupés dans la même *famille*. Une espèce peut être subdivisée en deux *souches* ou plus. Il s'agit d'organismes qui correspondent à la même définition d'espèces, mais qui présentent entre eux des différences mineures. (Singleton, 2004).

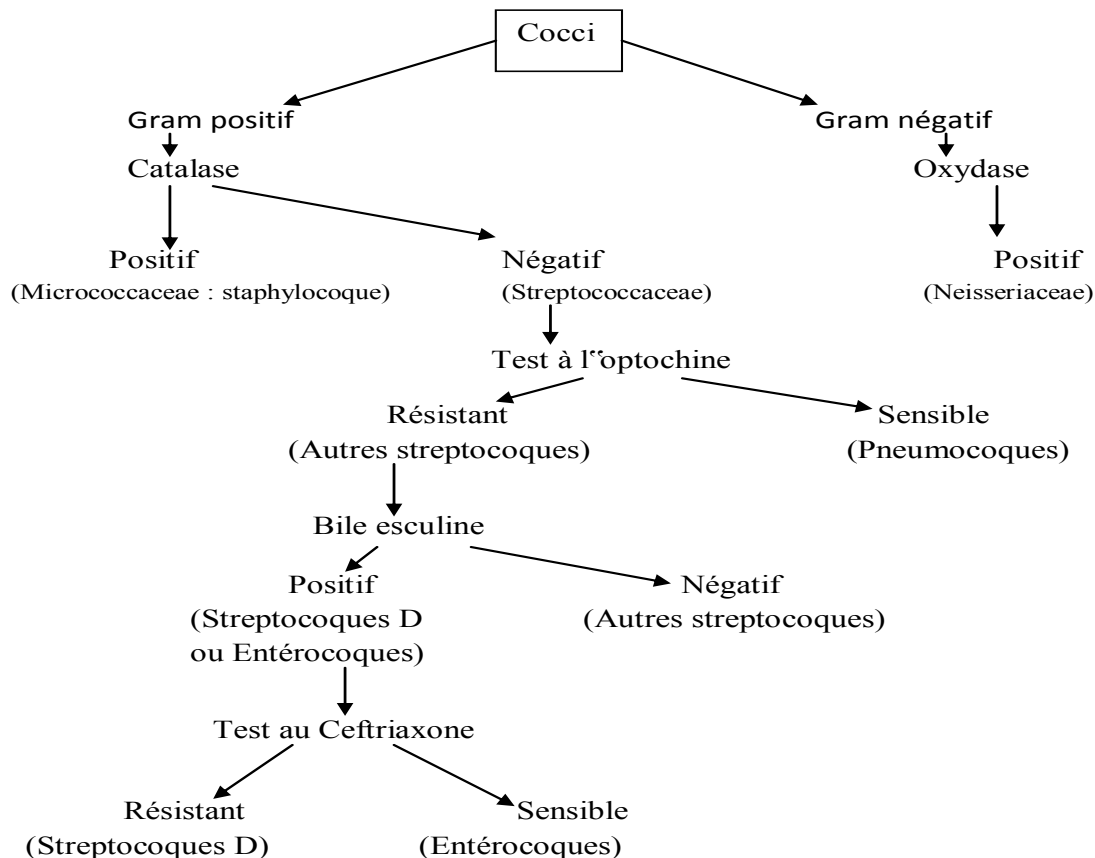


Figure 10: Classification des cocci

En général, les membres d'une même famille bactérienne auront une structure similaire, utiliseront la même forme d'énergie, et réagiront d'une même façon typique à certains colorants. Dans une telle famille, les espèces seront groupées en genres sur la base de leurs activités chimiques, de leurs exigences nutritives, des conditions dans lesquelles elles peuvent croître et selon leur forme et leur taille.

Dans cette présente étude, nous classerons les bactéries principalement sur la base de leur colorant gram. Cependant toutes les bactéries ne se colorent pas au gram, et dans ce cas des colorants spéciaux sont utilisés.

Tableau 1: La microflore humaine: quelques unes des bactéries associées au corps et maladies causées

Espèces du genre	Localisation	Exemples d'espèces	Gram	Maladies causées
<i>Bacillus</i> (AS : aérobie stricte)		<i>B. cereus</i>	Gram positif	Toxi-infection; infections oculaires et respiratoires
<i>Eschericia</i> (AAF : aéro-anaérobie facultative)	Iléon	<i>E. coli</i>	Bacille gram négatif	Infections urinaires, méningite surtout néonatale, leucorrhéa, septicémie, endocardite
<i>Proteus</i>		<i>P. mirabilis</i>		
<i>Haemophilus</i>	Rhino-pharynx, conduit auditif externe, sang, LCR	<i>H. influenzae de type b</i>	Bacille gram négatif	Méningite, pneumonie, sinusite, septicémie, infection ORL, endocardite
<i>Mycobacterium</i>	Alveolus pulmonaires	<i>M. leprae, M. arium, M. tuberculosis</i>	Bacille immobile	Lèpre; pneumonie; tuberculose
<i>Neisseria</i> (AS)	Gorge, sang, LCR	<i>N. aeruginosa</i>	Cocci gram négatif	Blennorrhagie, méningite
<i>Pseudomonas</i> (AS)	Intestinale, muqueuse	<i>P. aeruginosa</i>	Bacille gram négatif	Septicémie, surinfections des plaies
<i>Salmonella</i>	Intestinale, vésicule biliaire	<i>S. typhimurium</i>	Bacille gram négatif	Fièvre typhoïde, gastroentérite, septicémie
<i>Shigella</i>	anthérocytes	<i>Shigella flexneri, S. boydii</i>	Bacille gram négatif	Gastroentérite, dysenterie bacillaire
<i>Staphylococcus</i> (coagulase-négatif)	Yeux	<i>S. aureus, S. intermedius, S. epidermidis, S. saprophyticus</i>	Cocci gram positifs	Pneumonie, endocardite, infection du tractus urinaire
	Oreille		Cocci gram positifs	
	Voie nasales			
<i>Staphylococcus</i> (AAF)	Peau et muqueuse, bouche, aisselles, anus	<i>S. aureus</i>	Cocci gram positifs	Embole septique, abcès, panaris furoncle, sinusite, hidrosadénite, otite, thrombophlébite, TIA
	Bouche (gorge), muqueuse génitale, sphère ORL	<i>Strep. pyogènes (S.A.)</i>	Cocci gram positifs	Insuffisance rénale, angine érythémateuse, RAA, GNA, vulvo-vaginite, cellulite
<i>Streptococcus</i> (AAF : aéro-anaérobie facultative)	Muqueuse génitale	<i>Strep. agalactiae (S.B.)</i>		Urétrite, vaginite avec leucorrhée, vulvo-vaginite
<i>Staphylococcus</i>	Urètre	<i>S. epidermidis, S. saprophyticus</i>	Cocci gram positifs	Infection du tractus urinaires
<i>Eschericia</i>			Bacille gram négatif	
<i>Staphylococcus</i>	Vagin (pré-ménopausé)		Cocci gram positifs	
<i>Streptococcus</i>	Rhino-pharynx, voies respiratoires supérieures	<i>Strep. pneumoniae</i>	Cocci gram positifs	Pneumonie, inflammation, bronchite, méningite, grippe
<i>Vibrio</i>	Intestinale	<i>V. cholerae</i>	Bacille gram négatif	Choléra

GNA : glomérule néphrite aigüe, ORL : Oto-rhino-laryngologie, RAA : rhumatisme articulaire aigüe, TIA : toxi-infection alimentaire

Tableau 2: tableau d'identification de quelques bactéries de l'étude

TEST																					
Oxy	Cat	Glu	Lact	Malt	Sacch	NO ₃ R	ONPG	Indole	H ₂ S	Urée	Mannit	TDA	VP	ODC	CS	DNase	P.A	Coagul	Optochine	Genre	Espèce
-	+	+	+			+	+	+	-	-		-	-							<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>
-	-	+	-/+				-	-	+	-		-	-		+					<i>Salmonella</i>	<i>S. Typhi</i>
-		+	-				-	-	-	-	+		-							<i>Shigella</i>	<i>S. flexneri</i>
-			-/+					-	+	+		+								<i>Proteus</i>	<i>P. mirabilis</i>
-	+		+					-		+		-	+	-						<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i>
+		+	+		+		+	+	-	-	+				-					<i>Vibrio</i>	<i>V. cholerae</i>
+	+	-	-		-			-	-	-	-									<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	+					+					+					+	+	+		<i>Staph.</i>	<i>S. aureus</i>
	+										+					-	-	-		<i>Staph.</i>	<i>S. epidermidis</i>
-																			Résistant	<i>Streptocoque</i>	<i>S. pyogènes</i>

CS: citrate de simmons; **ODC:** ornithine de carboxylase; **ONPG:** ortho-nitro-phenyl-β-D-galactosidase; **NO₃R:** nitrate réductase; **PA:** protéine A; **Oxy:** oxydase ; **TDA:** tryptophane désaminase; **VP:** voges-proskauer (met en évidence l'acétyle méthyle carbinol); **-/+:** fermente en cas d'acquisition d'un plasmide.

Les mycobactéries qui regroupent principalement *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* et *Mycobacterium ulcerans* se colorent au Ziehl Neelsen. Les tréponèmes se colorent au Fontana Tribondeau. En fonction de la coloration nous distinguons les cocci (pluriel latin de coccus qui signifie bactérie de forme arrondie) (figure 10) et les bacilles ou le nom générique des microbes revêtant la forme d'un bâtonnet (figure 11).

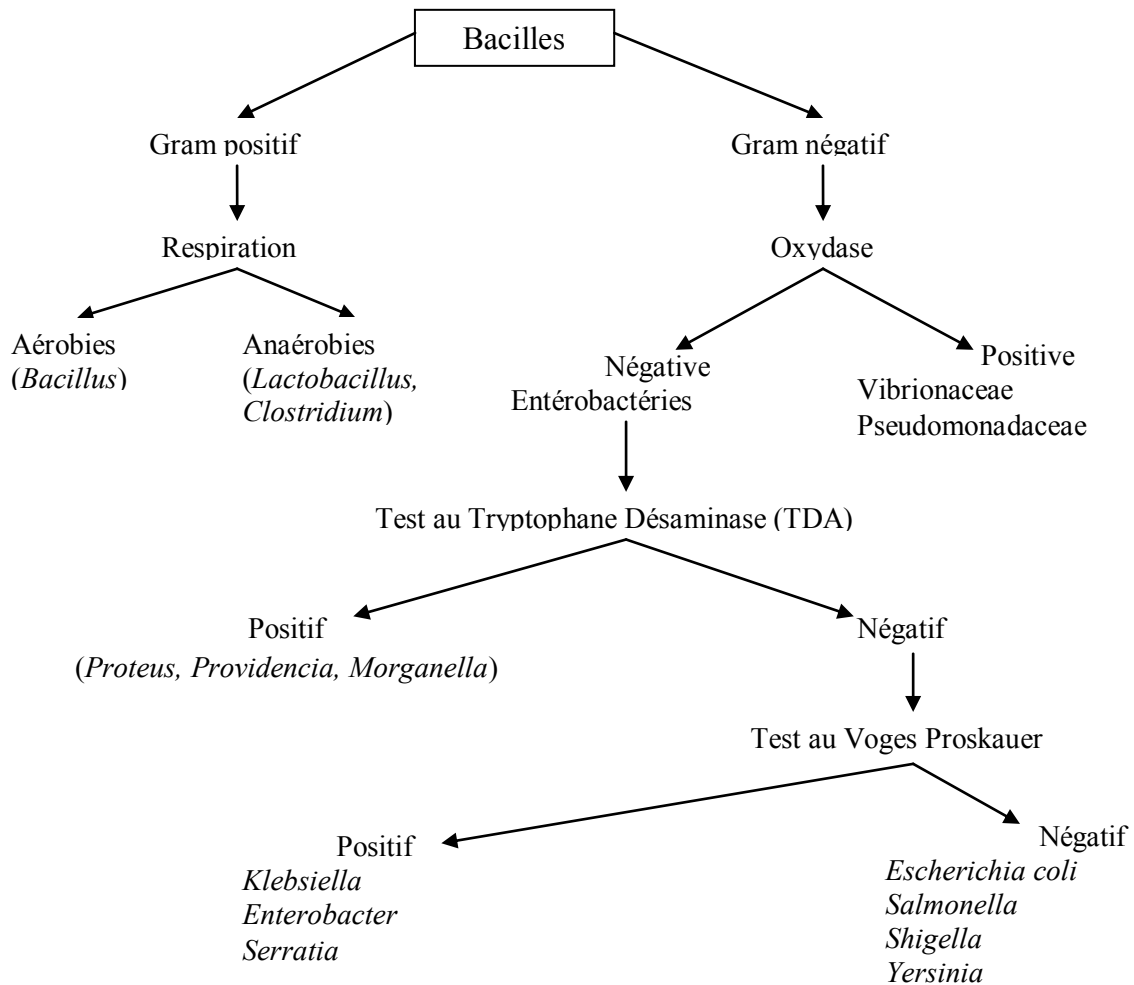


Figure 11: Classification des bacilles

III.2.3. Mode d'action des composés sur les bactéries

Il existe plusieurs types d'agents anti-microbiens (figure 12). C'est le cas des agents physiques (Radiations UV, rayon γ), des agents chimiques (alcools, phénols, métaux lourds, agents alkylants, détergents, aldéhydes, halogènes, antibiotiques et composés polyphénoliques

dont ceux d'extraits de plantes). Les métabolites secondaires des plantes tels que les polyphénols agissent par plusieurs mécanismes:

- **par la modification de la perméabilité membranaire**

La membrane plasmique agit comme une barrière sélective. Elle régularise l'entrée et la sortie des substances chez les microbes. Une altération de la membrane plasmique peut inhiber la croissance de la bactérie ou conduire à sa mort. Dans ce cas, les antibiotiques utilisés sont les *polymixines*.

- **par inhibition de la paroi bactérienne**

Certains agents anti-bactériens affectent la paroi de la bactérie en inhibant sa synthèse. C'est l'exemple de l'inhibition du peptidoglycane par la pénicilline ou par les polyphénols. **Les antibiotiques utilisés sont :** *β-lactamines; glucopeptides et les dérivés acides isonicotiniques*. Figure 13 et 14.

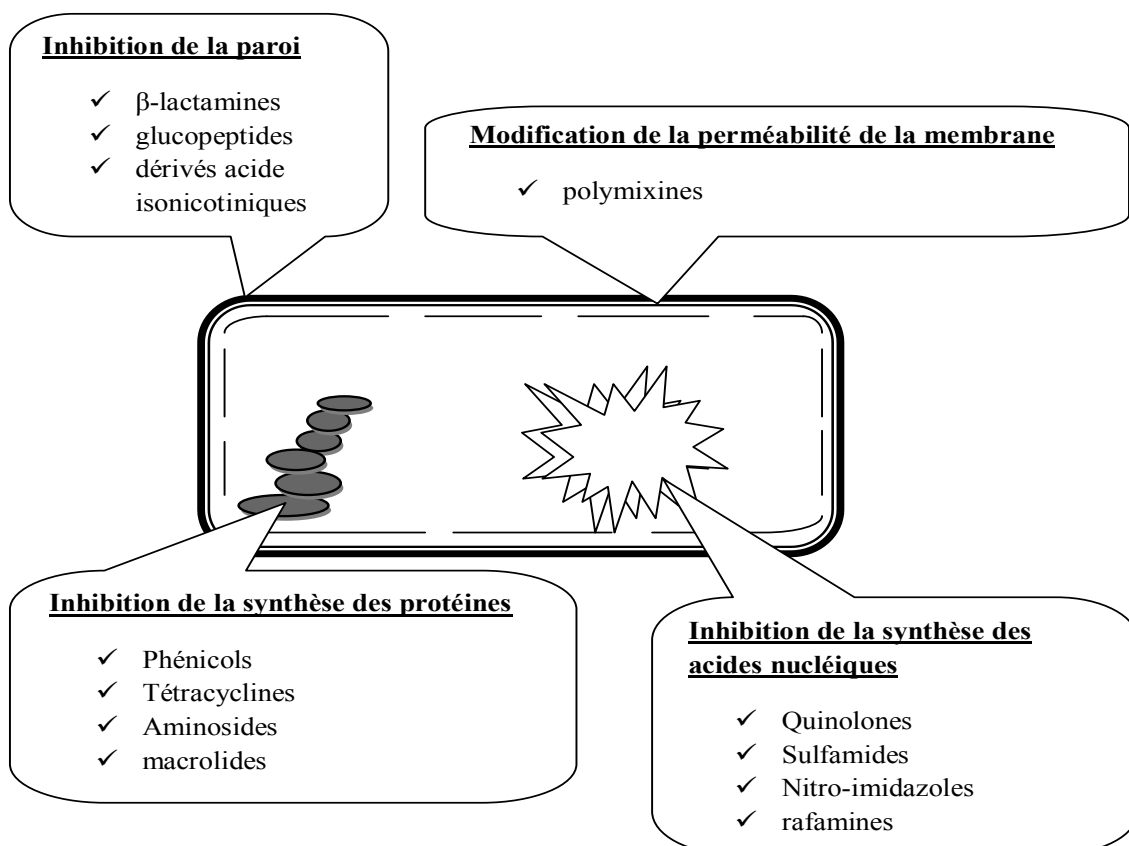


Figure 12: Schéma des sites d'actions des antibiotiques chez les bactéries

- **par inhibition de la synthèse des protéines**

C'est le cas des antibiotiques ou extraits de plantes qui agissent en inhibant l'incorporation des acides aminés dans les chaînes polypeptidiques. D'autres composés inhibent la combinaison aminoacide: ARN de transfert (ARNt) avec le ribosome. Par contre d'autres inhibent même la formation de la liaison peptidique par les peptidyltransférases dans la bactérie. **Les antibiotiques utilisés sont:** *phénicolis; tétracyclines; aminosides et les macrolides.*

- par inhibition de la synthèse des acides nucléiques

La vie de la bactérie peut être compromise par toute perturbation du fonctionnement de l'ARN et de l'ADN. Ce faisant les métabolites secondaires de plantes peuvent bloquer la synthèse de l'ADN ou de l'ARN. **Les antibiotiques utilisés sont:** *quinolones; sulfamides; nitro-imidazoles et les rafamines.* (Figure 15).

- par inhibition de l'activité enzymatique

La cellule bactérienne renferme une multitude d'enzymes. De nombreux composés de plantes ou antibiotiques entravent les réactions biochimiques. Ils se lient aux groupes thiols des enzymes et entraînent l'altération des structures tertiaires et quaternaires des enzymes bactériennes (Cos *et al.*, 2006; Zéba, 2006).

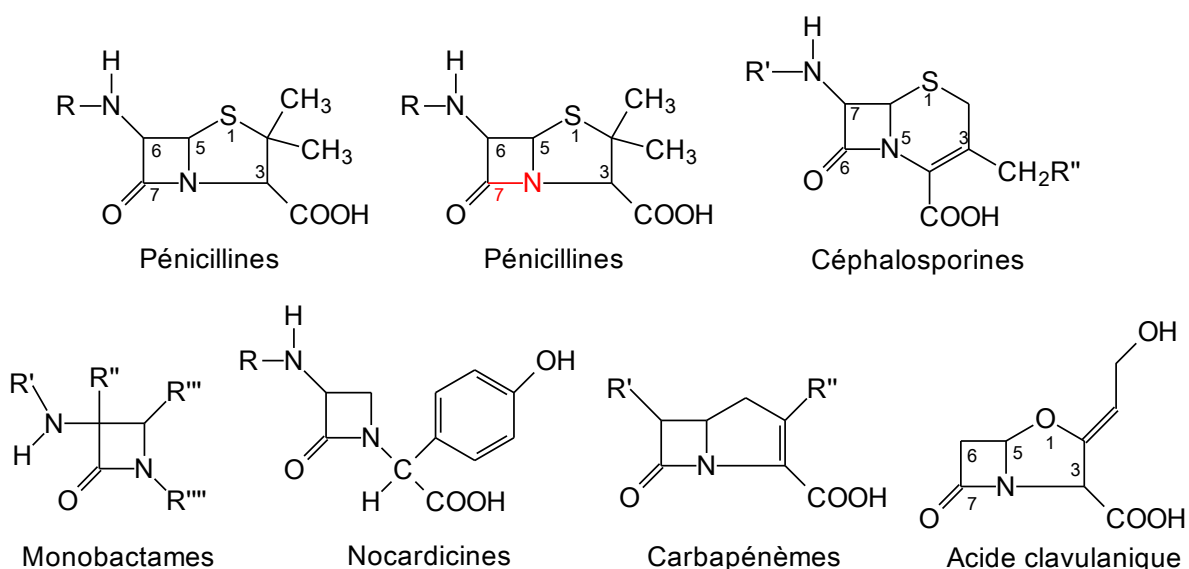


Figure 13: Les antibiotiques à noyau β -lactames ou β -lactamines

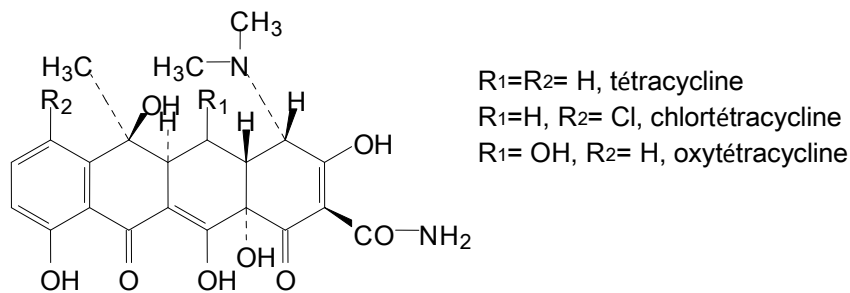


Figure 14: Les antibiotiques à larges spectres

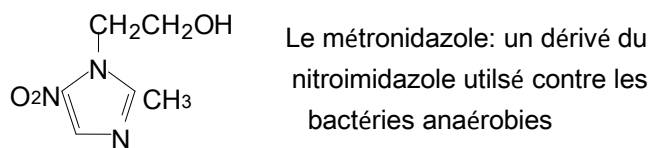


Figure 15: Un antibiotique dérivé du nitroimidazole

III.2.4. La résistance bactériennes

La résistance micro biologique est la possibilité pour une bactérie de se multiplier en présence de concentrations antibiotiques supérieures à celles qui permettent normalement d'inhiber la croissance des bactéries de même espèce. Selon la concentration, on parle de résistance de haut ou de bas niveau (Ouattara, 2005). La résistance aux antibiotiques peut impliquer l'un des mécanismes suivants: la mutation, l'inactivation ou la dégradation des antibiotiques par les enzymes (Zéba, 2006), les mécanismes d'efflux (certains systèmes de transports sont capables de pomper vers l'extérieur, à travers la membrane cytoplasmique ou l'enveloppe cellulaire, des antibiotiques particuliers), diminution de la perméabilité, augmentation de la synthèse du métabolite cible, la résistance inductible aux antibiotiques et de l'acquisition d'un déterminant de résistance exogène. Exceptionnellement, une résistance apparente à un antibiotique peut être due à une métabolisation anormale de la drogue par le patient. Par exemple, le traitement de la syphilis par une dose de pénicilline, normalement adéquate, a échoué dans quelques cas, chez des patients qui sécrètent la pénicilline rapidement. En de très rares cas, on a récupéré de ces patients des tréponèmes sensibles à la pénicilline qui, inoculés dans des lapins, ont provoqué les lésions typiques (Singleton, 2004).

III.2.5. Support génétique de la résistance bactériennes/ mécanisme de la résistance

La résistance peut être naturelle (espèces bactériennes héréditairement insensibles) ou acquise (résistance se développent au fur et à mesure de l'administration de l'ATB chez une espèce habituellement sensible). La résistance acquise se traduit par une augmentation de la CMI.

Remarque : la résistance naturelle intéresse toutes les souches d'une espèce, alors que la résistance acquise n'intéresse que certaines souches pour une espèce considérée. 10% des résistances acquises sont dues à des modifications chromosomiques de la bactérie ; elle ne concerne que les bactéries de la même espèce avec un seul antibiotique. 90% de ces résistances sont dues à l'acquisition de plasmides qui sont des molécules extra chromosomiques que l'on trouve dans le cytoplasme des cellules bactériennes. Ces plasmides se transmettent d'une bactérie à l'autre par simple contact (conjugaison) ou par l'intermédiaire de bactériophages (transduction). La résistance plasmidique permet d'élaborer des enzymes capables de détruire la molécule d'antibiotique. Exemple : les β -lactamases pour les β -lactamines (pénicillines, céphalosporines) ; Les adénylases-acétylases-phosphorylases pour les aminosides ; La facilité du transfert des plasmides parmi les BGN explique le caractère épidémique de ce type de résistance aux ATB surtout ceux à spectre large. La meilleure façon de venir à bout de cette résistance plasmidique est l'utilisation d'ATB à spectre étroit chaque fois que cela est possible (Ouattara, 2005).

III.2.6. Effets antimicrobiens des flavonoïdes

Les propriétés antimicrobiennes des flavonoïdes vis-à-vis de différents micro-organismes pathogènes ont été mises en évidence (Jassim et Naji, 2003 ; Taguri et *al.*, 2004; Takahashi et *al.*, 2004; Yadava et Tiwari, 2005). Les extraits de plantes et beaucoup d'autres préparations phytochimiques riches en flavonoïdes ont été rapportés comme possédant une activité antimicrobienne (Tereschuk *et al.*, 1997 ; Essawi et Srour, 2000). Beaucoup de groupes de recherche ont franchi une étape plus loin. Ils ont isolé et identifié la structure des flavonoïdes qui possèdent l'activité antimicrobienne ou ont mesuré l'activité des flavonoïdes disponibles dans le commerce (Sakar 1992; Kono et *al.*, 1994; Verma et *al.* 1997; Hamilton-Miller et Shah, 2000). Les propriétés antibactériennes de propolis ont été attribuées à sa teneur élevée en flavonoïdes (Yakhlef, 2010). Sato et ses collaborateurs (1995), ont démontré l'effet bactéricide de différentes flavanones sur un *Staphylococcus aureus*. Une étude plus

récente a montré le pouvoir antibactérien d'un flavonoïde glycoside contre des souches de bactéries gram (+) et gram (-) (Harikrishna et *al.*, 2004).

En raison de la capacité répandue des flavonoïdes d'inhiber la germination des spores pathogènes des plantes, on leur a proposé pour l'usage contre les microbes fongiques pathogènes de l'homme (Harborne et Williams, 2000). Deux nouveaux flavonoïdes, un flavone et un flavanone, respectivement isolés des fruits de *Terminalia bellerica* et de l'arbuste *Eysenhardtia texana* ont été montrés comme posséder l'activité contre le microbe pathogène opportuniste *Candida albicans* (Valsaraj et *al.*, 1997; Wachter 1999). Deux autres flavones isolés de la plante *Artemisia giraldi* ont été rapportés avoir une activité contre l'espèce *Aspergillus flavus*, une espèce de mycète qui cause la maladie envahissante chez les patients immunosuppresseurs (Zheng, 1996). Galangine, un flavonol généralement trouvé dans des échantillons de propolis a été montré avoir l'activité inhibitrice contre *Aspergillus tamarii*, *A. flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum* (Afolayan et Meyer, 1997).

Des travaux ont mis en évidence un impact des flavonoïdes sur le rétrovirus HIV responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Récemment, des chercheurs ont montré que les flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du virus HIV, empêchant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte (Mahmood et *al.*, 1993).

Le mécanisme des effets antimicrobiens des flavonoïdes est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, on va citer :

- ✓ Inhibition de la synthèse d'acide nucléique (Hilliard, 1995),
- ✓ Inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique (Tsuchiya et Iinuma, 2000),
- ✓ Séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne, inhibition du métabolisme énergétique microbien (Haraguchi et *al.*, 1998).

III.3. Les activités antioxydantes

III.3.1. Définition

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron. Il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en céder un (agissant alors comme un réducteur). Cette première réaction

conduit généralement à la formation en chaîne de nouveaux radicaux ; ceci explique que la production d'un premier radical libre puisse causer d'importantes lésions dans une cellule. L'O₂ est une molécule biradicalaire formée de deux atomes présentant sur leurs orbitaux externes deux électrons non appariés. Il est donc susceptible de capter facilement 1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit en O₂^{•-} puis en H₂O₂. Il est ainsi à l'origine de la formation d'espèces réactives oxygénées (EOR ou Reactive Oxygen Species : ROS) L'appellation ROS inclut les radicaux libres de l'oxygène : anion superoxyde (O₂^{•-}), radical hydroxyle (OH[•]) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Balendiran *et al.*, 2004; Korsloot *et al.*, 2004).

III.3.2. Radicaux libres et formes réactives dérivées de l'oxygène

L'appellation EOR inclut les radicaux libres de l'oxygène: anion superoxyde (O₂^{•-}), radical hydroxyle (OH[•]) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

L'anion superoxyde (O₂^{•-}) est un radical chargé négativement provenant de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire qui capte un électron. La dismutation de cet O₂^{•-} entraîne la formation d'oxygène fondamental et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). L'H₂O₂ n'est pas un radical libre au sens propre mais il est extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant. De plus, sa capacité à traverser les membranes biologiques fait qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de production.

Selon la réaction de Fenton, l'H₂O₂ se décompose, en présence d'ions ferreux (Fe²⁺), en un ion OH⁻ et un radical hydroxyle (OH[•]) [H₂O₂ + Fe²⁺ → OH⁻ + OH[•] + Fe³⁺]. Cette réaction s'interrompt rapidement par épuisement du fer ferreux, excepté en présence d'anion superoxyde (O₂^{•-}) qui régénère Fe³⁺ en Fe²⁺ selon la réaction d'Haber-Weiss [O₂^{•-} + Fe³⁺ → O₂ + Fe²⁺]. Ainsi, la présence simultanée de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), d'anion superoxyde (O₂^{•-}) et de fer permet la production de radical hydroxyle (OH[•]). L'OH[•], avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde, est la plus instable et la plus réactive de toutes les espèces dérivées de l'oxygène. La diffusion limitée de ce radical lui permet de réagir avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant à proximité (protéines, lipides, ADN...) entraînant ainsi de multiples dommages cellulaires. L'OH[•] apparaît comme l'espèce

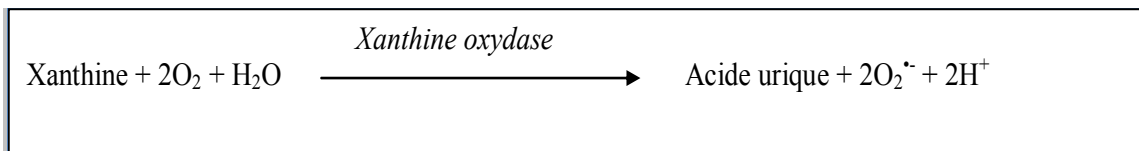
radicalaire ayant un rôle majeur dans la cytotoxicité des EOR (Balendiran *et al.*, 2004; Garait, 2006; Thamocharan *et al.*, 2010).

III.3.3. Principale source de radicaux libres: la mitochondrie

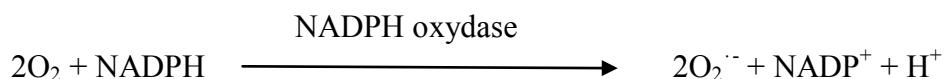
Dans l'organisme, il existe de nombreuses sources de EOR parmi lesquelles l'autooxydation des petites molécules, la xanthine oxydase et la NADPH oxydase, le réticulum endoplasmique, les peroxysomes.

L'autooxydation de molécules telles que la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones est une importante source de EOR. Le produit direct de ces auto-oxydations est souvent l' $O_2^{\cdot-}$. Ainsi, l'autooxydation de la dopamine est en partie impliquée dans le processus apoptotique lors de pathologies neurodégénératives, notamment lors de la maladie de Parkinson (Garait, 2006).

La xanthine oxydase catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique en condition de forte demande d'ATP et de déficit en oxygène. Mais elle peut également catalyser l'oxydation de la xanthine en acide urique, notamment lors d'ischémie-reperfusion ou d'hypoxie. Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi l' $O_2^{\cdot-}$.



La NADPH oxydase joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes (Garait, 2006). En effet, lors de la phagocytose, cette enzyme présente dans la membrane plasmique des phagocytes, catalyse la formation d' $O_2^{\cdot-}$. Il existe aussi une NADPH oxydase dans des cellules non phagocytaires dont le rôle serait de réguler la croissance cellulaire (Garait, 2006).



Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent une série de réactions pour détoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques. La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras

insaturés et les xénobiotiques, produisant ainsi des EOR. Il semble que cette production radicalaire régule certaines fonctions du réticulum.

Les peroxysomes sont une importante source de production d' H_2O_2 cellulaire. Toutefois, l' H_2O_2 est utilisé comme substrat de la catalase peroxysomale (enzyme antioxydante) afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans le processus de détoxification présent dans le foie et le rein. Seule une faible quantité d' H_2O_2 produit au niveau du peroxysome pourrait échapper à la catalase.

Cependant, la principale source d'EOR est la mitochondrie par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire. Elle produirait en effet 90% des EOR cellulaires (Garait, 2006).

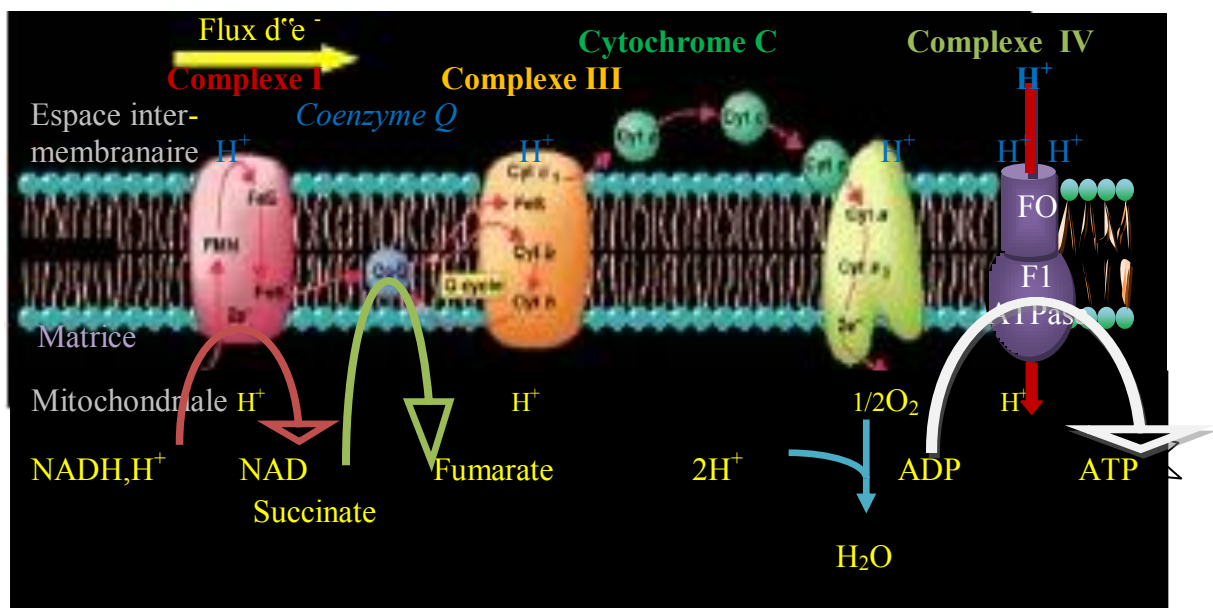


Figure 16: La chaîne respiratoire mitochondriale, source de production des radicaux libres dans l'organisme

III.3.4. La production d'espèces oxygénées réactives (EOR)

La chaîne respiratoire est une source permanente d'EOR. Selon certains auteurs, environ 1 à 3% de l'oxygène utilisés par la mitochondrie sont incomplètement réduits et produisent des EOR. Mais ces estimations sont réalisées à partir de mesure *in vitro* sur des mitochondries isolées en présence d'une pression partielle en oxygène non physiologique et de concentration saturante en substrats. Il est vraisemblable que la production mitochondriale de EOR *in vivo* soit beaucoup plus faible (0,4 à 0,8%). Il existe deux sites de production d'EOR: les complexes I et III (figure 16).

Le complexe III a longtemps été considéré comme le plus important site de production d' $O_2^{\cdot-}$ et le complexe I comme un acteur secondaire. Cependant, ces premières études utilisaient comme un substrat respiratoire du succinate (fournisseur de $FADH_2$) combiné à de la roténone (inhibiteur du complexe I). Or, en ajoutant successivement le succinate puis la roténone, de récentes mesures ont permis de mettre en évidence l'existence d'un flux inverse d'électrons. Ce flux d'électrons issus de l'oxydation du $FADH_2$ remonte du complexe II vers le complexe I atteignant ainsi le site de production d'EOR du complexe I. Il a alors été clairement défini que la source majeure d'EOR était le complexe I *via* ce flux inverse d'électrons. Ce flux d'électrons entraîne également la réduction du NAD^+ en $NADH$ (Liu *et al.*, 2002).

A ce jour, le site exact de la production d'EOR du complexe I reste encore controversé. Trois hypothèses sont émises : cette production aurait lieu au niveau 1°) des quinones (Q) (Cadenas *et al.*, 1977), 2°) du groupe des flavines mononucléotides (FMN) (Liu *et al.*, 2002) ou 3°) du groupe fer-soufre [Fe/S] (Kushnareva *et al.*, 2002). Comme ces trois structures sont très proches les unes des autres et interagissent les unes avec les autres (Herrero et Barja, 2000), il est difficile de dire laquelle intervient spécifiquement dans la production de EOR.

III.3.5. Mécanisme de défense contre les radicaux libres

-Mécanisme de l'inhibition des radicaux libres

La migration des leucocytes et la phagocytose amorcée sur les sites de l'inflammation sont accompagnées comme nous l'avons dit plus haut, de changements d'activité métabolique et en particulier de la formation d'anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), de radicaux libres ($\cdot OH$), d'hydroperoxydes (H_2O_2)...

Ces molécules très réactives et cytotoxiques (également dotées, après transformation, d'activité bactéricide) sont les substrats de diverses enzymes intracellulaires : superoxyde dismutase, peroxydase, glutathion peroxydase et catalase. Lorsque ces enzymes sont saturées (en particulier la glutathion peroxydase), ces intermédiaires sont engagés dans les voies métaboliques de l'acide arachidonique et favorisent ainsi la synthèse de prostaglandines inflammatoires. En conséquence, plus l'infiltration des neutrophiles est prononcée, plus le système dépendant du glutathion est saturé et le risque d'accumulation d'acides éicosaénoïques élevé. Il est donc plausible d'envisager que les AINS puissent capter et

désactiver ces radicaux libres et cette action a été partiellement démontrée, *in vitro*, pour les salicylates (Schorderet, 1998; Korsloot *et al.*, 2004).

III.3.6. Méthode d'évaluation de l'activité anti-oxydante

L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des EOR est particulièrement fragile. Les mécanismes de défense contre la toxicité des EOR sont nombreux et proviennent de sources diverses (Bakasso, 2009). Notre organisme possède un certain nombre de moyens de défenses contre les atteintes des radicaux libres mettant en jeu le système immunitaire et des enzymes.

Dans le système enzymatique il existe deux niveaux de défenses, les défenses primaires où interviennent la SOD (Super Oxyde Dismutase), la glutathion peroxydase (GPx) et certaines catalases (EC 1.11.1.6). Dans les défenses secondaires interviennent la glutathion-S-transférase et la glutathion réductase qui constituent une source endogène (Thamotharan *et al.*, 2010).

Selon Bakasso (2009), d'autres protéines comme la ferritine, la transferrine, la céruléoplasmine et l'albumine interviennent dans l'activité antioxydante.

Les antioxydants tels que les vitamines (A, E et C), les β -carotène, lycopène, ubiquinol-10, bilirubine, les oligo-éléments comme le zinc, le sélénium, le cuivre, le manganèse, certains polyphénols (les flavonoïdes, les acides phénols, les coumarines, les quinones), les alcaloïdes et certaines huiles essentielles, constituent la seconde source de défense de l'organisme contre les radicaux libres. Les parties les plus actives de ces molécules sont les hydroxyles libres, les noyaux aromatiques, les doubles liaisons éthyléniques souvent conjuguées, qui permettent de donner des électrons et de rester stables par mésomérisation (Raj Narayana *et al.*, 2001).

La formation de radicaux libres dans l'organisme est constante et nécessaire à la vie, mais les excès dépendent de facteurs extérieurs tels que le stress, la fatigue et les exercices physiques intensifs.

III.3.7. Les végétaux (sources d'antioxydants naturels)

Les antioxydants d'origines naturelles sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures et sont en générales des composés phénoliques. Ils agissent par la désactivation des radicaux par création d'addition covalente, la réduction des métaux ou de peroxydes, la

complexation d'ions et de métaux de transition et le captage de l'oxygène singlet (Timbo, 2003).

Les flavonoïdes sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, ces activités sont attribuées en partie aux propriétés antioxydantes de ces composés naturels. Les flavonoïdes sont susceptibles de réagir avec la plupart des espèces réactives oxygénées (Fuhrman *et al.*, 1995). L'action antioxydante de ces phytonutriments ne s'exerce pas seulement par l'inhibition et la désactivation des radicaux libres, elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation des traces d'ions métalliques responsables de la production de ROS (Halliwell, 1994; Cotelle, 2001). A cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R[•]), comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle, par transfert d'hydrogène et le radical flavonoxy (Fl-O[•]) qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (Jovanovic *et al.*, 1998). Figure 17.

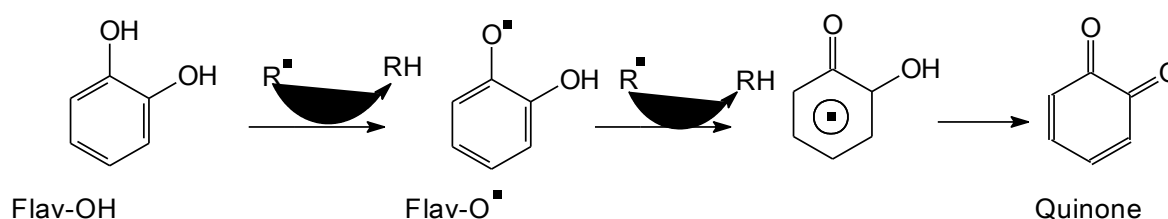


Figure 17: Piégeages des ROS (R[•]) par les flavonoïdes

D'autres études ont montré que les flavonoïdes sont des bons inhibiteurs d'enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la xanthine oxydase qui est une source biologique importante du radical superoxyde (Hansaki *et al.*, 1994; Cos *et al.*, 1998). Les flavonoïdes sont aussi considérés comme de bons chélateurs d'ions métalliques (Brown *et al.*, 1998; Dacosta, 2003), comme les ions du fer (Fe²⁺) et du cuivre (Cu⁺) qui sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques, mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante:



La quercétine est la plus active des flavonoïdes étudiés. La **Figure 18** résume les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques : (a) un noyau catéchol sur le cycle B, (b) les

groupes 3- hydroxyle et 4-oxo du cycle C, et (c) les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C (Van Acker *et al.*, 1996).

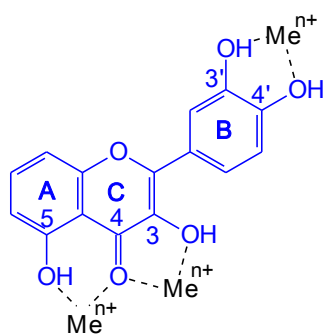


Figure 18: Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Me^{n+}) (D'après Van Acker *et al.*, 1996)

Plusieurs travaux décrivent les relations structures-activités des flavonoïdes (Rice-Evans *et al.*, 1996; Van Acker *et al.*, 1996; Harborne et Williams 2000; Woodman *et al.* 2005). Ces travaux permettent de connaître les activités antioxydantes de ces molécules en fonction de leurs caractéristiques structurales (figure 19). En fait, leur activité antiradicalaire nécessite que:

_ Les molécules possédant une double liaison entre les carbones C2 et C3 et un groupement carbonyle en C4 sont les flavonoïdes dont les activités antioxydantes sont les plus marquées, ainsi l'activité de la quercétine (un flavonol) est deux fois plus élevée que celle de la catéchine (un flavan-3-ol). Ceci est dû au fait que la quercétine possède une double liaison C2-C3 et une fonction 4-oxo (Van Acker *et al.*, 1996; Harborne et Williams 2000).

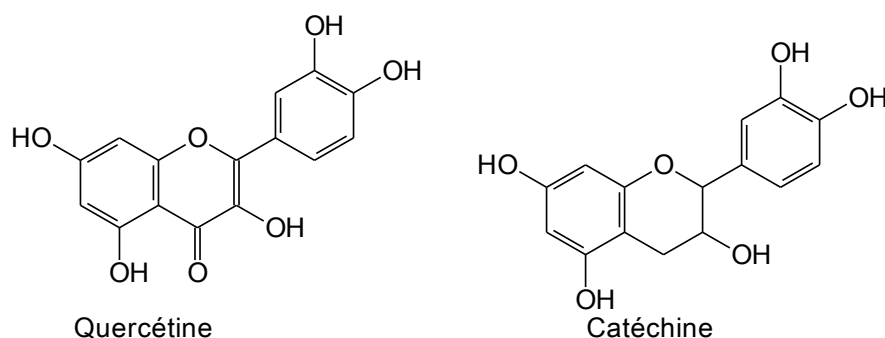


Figure 19: Comparaison entre deux pentahydroxyphénols (Harborne et Williams 2000).

_ La structure ortho-diphénolique du cycle B (=les groupements hydroxyles en position C3'-C4') ainsi qu'un nombre important de résidus hydroxyles augmenteraient le potentiel antioxydant des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé (Fuhrman *et al.*, 1995;

Woodman *et al.* 2005). Rice-Evans et ses collaborateurs (1996) ont développé un test basé sur la capacité d'un antioxydant à piéger le radical cation chromophore, l'activité des flavonoïdes est comparée avec celle du Trolox (une forme soluble de l' α -tocophérol), et exprimée en TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Il est à noter que plus la valeur de TEAC est élevée plus la molécule est active. Les résultats de cette étude ont montré que la morine avec deux groupements hydroxyles en méta et le kaempférol avec un seul groupement hydroxyle sont moins actifs que la quercétine (deux groupements hydroxyle en ortho). Figure 20.

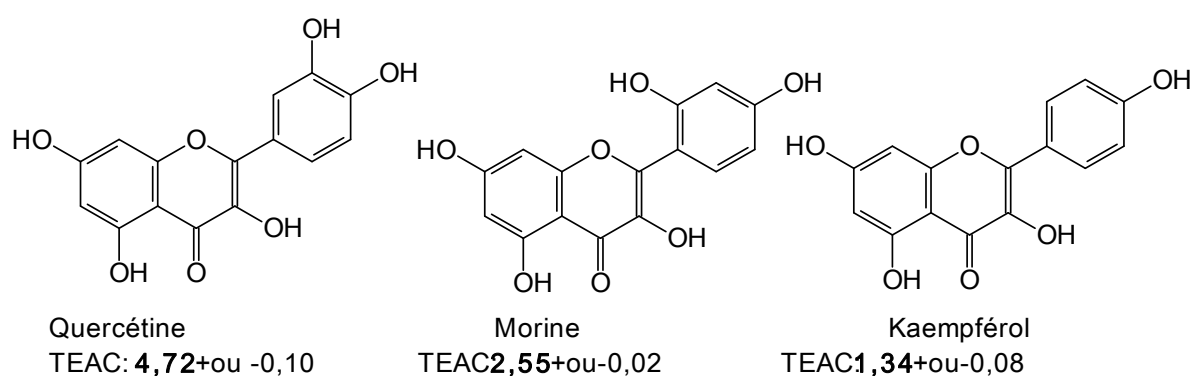


Figure 20: Valeurs de TEAC montrant l'importance du groupement catéchol au niveau du cycle B pour l'activité antioxydante des flavonols (Rice-Evans, 1996).

_ Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (C3-OH) fortement réactif. Rice-Evans et ses collaborateurs (1996) ont démontré l'importance de ce dernier. En effet, La glycosylation du groupe 3-OH de la quercétine (cas de la rutine) ou sa suppression (cas de la lutéoline) diminue l'activité antioxydante. Figure 21.

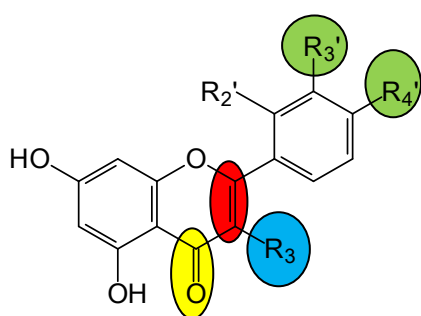


Figure 21: Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes (Rice-Evans et *al.*, 1996).

En analysant tous ces résultats concernant la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres on peut conclure que la quercétine satisfait à tous ces critères, elle dérive du motif flavonol, sa structure particulière lui confère les caractéristiques les plus souvent mises

en avant dans l'activité d'un flavonoïde. Elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes (Rice-Evans *et al.*, 1996).

III.4. Activité anti-inflammatoire

III.4.1. Généralités

L'inflammation est une réaction des tissus vivants à une lésion ou une stimulation cellulaire excessive ou normale due à une agression d'origine mécanique, chimique ou immunologique. L'inflammation est impliquée dans de nombreuses maladies incluant non seulement des pathologies articulaires mais aussi les maladies cardio-vasculaires ou les cancers (Garnier *et al.*, 2006; Bakasso, 2009).

L'inflammation est caractérisée par des niveaux élevés de métabolites de l'acide arachidonique qui sont produits à travers deux voies enzymatiques différentes, celles des cyclo-oxygénases (COX) et des lipoxygénases. A partir de l'acide arachidonique, les COX (COX2) vont permettre la production des prostaglandines et de thromboxanes, tandis que les lipoxygénases (LOX) vont synthétiser les leucotriènes, les lipoxines et les acides eicosatétraénoïques (Bakasso, 2009).

Les leucotriènes sont de puissants médiateurs inflammatoires liés à l'allergie qui ont un rôle important dans les réactions allergiques mais, également, dans l'ischémie, les accidents cérébro-vasculaires ou la maladie d'Alzheimer (Lopez *et al.*, 2002)

III.4.2. Réactions inflammatoires

L'inflammation est une réaction de l'organisme à une irritation d'origine diverse: infection, traumatisme mécanique, traumatisme chimique, trouble métabolique, brûlure, irradiation. C'est une réaction du tissu conjonctif et des vaisseaux dans laquelle on distingue plusieurs phases successives : congestive, exsudative, proliférative, nécrotique (figure 22).

On distingue les inflammations primaires et secondaires.

Les inflammations primaires ou aiguës ont une cause immédiate et localisée. Les inflammations secondaires ou chroniques sont des réactions systémiques qui se développent à distance. Elles sont dues à une réaction immunitaire. Sous l'influence d'un agent phlogogène, la réaction inflammatoire classique se développe en quatre phases plus ou moins distinctes et d'importance variable :

- La première est une vasodilatation artériolaire qui entraîne un érythème, un dégagement de chaleur locale, une hyperesthésie. La peau de la zone enflammée est rouge, la douleur apparaît à la pression. En même temps, l'observation démontre une stase du sang dans les vaisseaux capillaires, une augmentation de la perméabilité capillaire, un afflux des leucocytes par diapédèse.
- La seconde phase est caractérisée par la formation d'un œdème. Le liquide plasmatique passe dans le compartiment interstitiel du derme. Les cavités séreuses (plèvre, péritoine, synovie) se remplissent de liquide.
- La troisième phase consiste en la formation d'un tissu de granulation (infiltration cellulaire). Les leucocytes affluents, des macrophages et des fibroblastes apparaissent. Le tissu de granulation est un tissu conjonctif jeune, riche en fibroblastes et en capillaires, pauvre en fibres conjonctives. Ce tissu nouvellement formé peut s'individualiser en granulome.
- La quatrième phase est une phase de sclérose du tissu nouvellement formé qui envahi par les fibres conjonctives, perd son élasticité et se sclérose (Nikiéma, 2005).

III.4.3. Les anti-inflammatoires

Le traitement de l'inflammation se fait par différentes substances appelées anti-inflammatoires. Ce sont des médicaments qui antagonisent les processus inflammatoires. A côté des analgésiques antipyrétiques tels que l'acide acétylsalicylique (Aspirine) doués, à forte dose ou à doses continues, de propriétés anti-inflammatoires, on distingue des médicaments à activité anti-inflammatoire plus spécifiques. Ce sont des hormones stéroïdiques (glucocorticoïdes) dites Anti-inflammatoires Stéroïdiens (AIS), des substances de synthèse dites Anti-inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS) et des substances antirhumatismales (Cohen, 1987 ; Timbo, 2003 ; Nikiéma, 2005).

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) sont des dérivés des hormones stéroïdes de la corticosurrénale. En effet, les glucocorticoïdes antagonisent les processus inflammatoires, inhibent la réaction aux agressions du tissu mésenchymateux, empêchent l'activation de la phospholipase A₂ qui libère l'acide arachidonique des phospholipides de la membrane cellulaire (Cohen, 1987; Schorderet, 1998; Nikiéma, 2005).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) comprennent les dérivés pyrazoles et salicylés auront une action sur la phase initiale de l'inflammation, l'indométacine et ses

dérivés qui ont un effet sur la phase initiale et les phases tardives de l'inflammation, ils inhibent la cyclooxygénase et la synthèse des prostaglandines (Cohen, 1987 ; Schorderet, 1998).

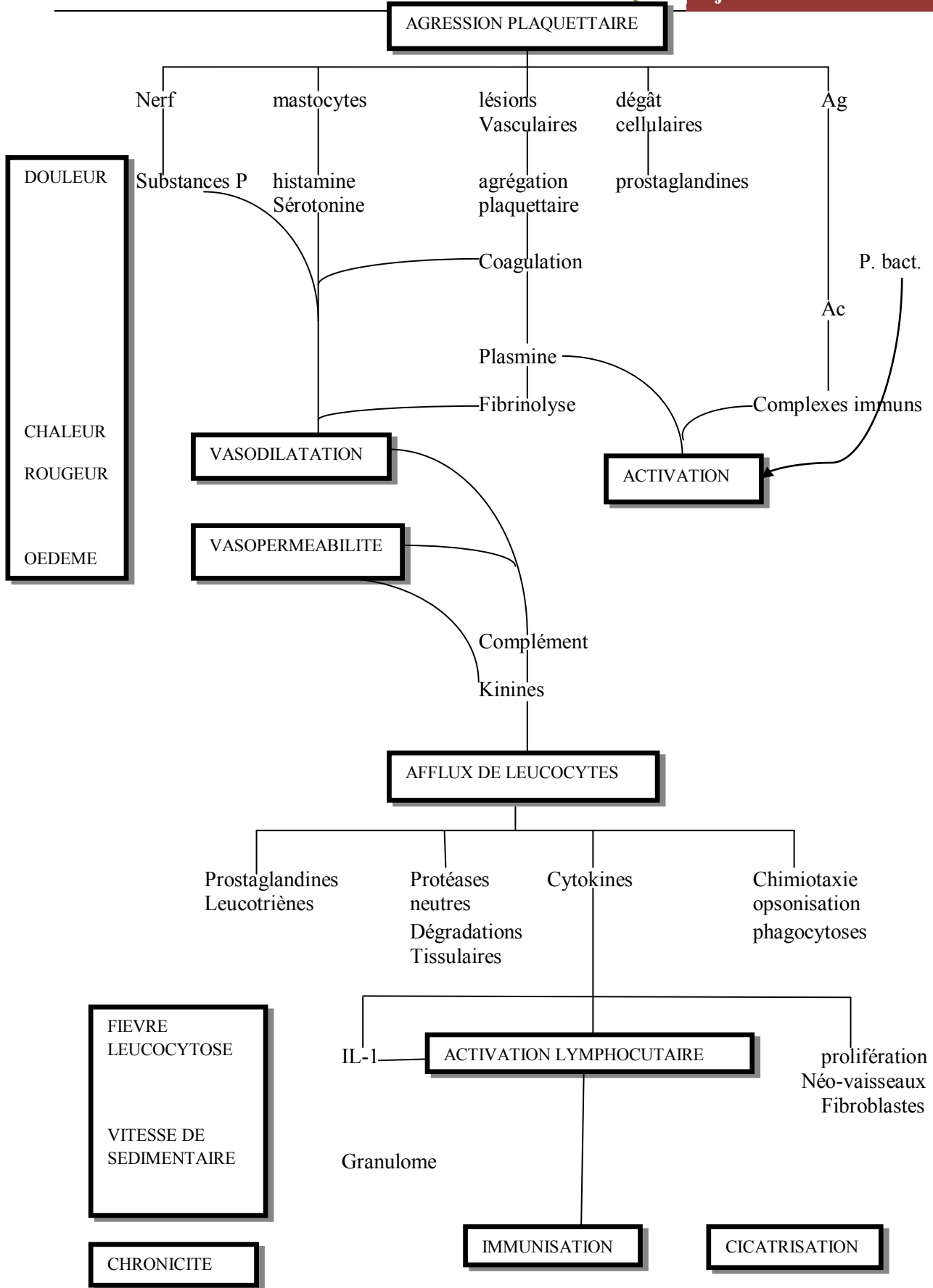


Figure 22: Diagramme général de la réaction inflammatoire (Timbo, 2003)

Ils empêchent la biosynthèse des acides eicosaénoïques et des leucotriènes par inhibition des lipoxgénases. Ils exercent une inhibition de la biosynthèse du Thromboxane (TXA₂), une inhibition des réactions cellulaires de nature défensive ou immunologique, une inhibition de la migration des leucocytes et des macrophages, une stabilisation des membranes lysosomales et une inhibition de la libération d'enzymes hydrolytiques (Phosphatases acides et β -glucuronidase). Figure 23.

Les AINS regroupent:

- les dérivés de la pyrazolone (Butazolidine*, Tandénil*...)
- les dérivés salicylés (Aspirine*, Aspégic*...)
- les dérivés de l'acide phényl-acétique (Voltarène*...)
- les dérivés de l'indole (Indocid*...)
- les dérivés anthraniliques (Nufluril*, Ponstyl*...)
- les dérivés de l'acide phénylpropionique (Brufen*, Profénid*...)
- les dérivés des acides de la phénothiazine (Pirocid*...)
- les dérivés carboxamidés du benzothiazine- dioxyde (Feldène*...)

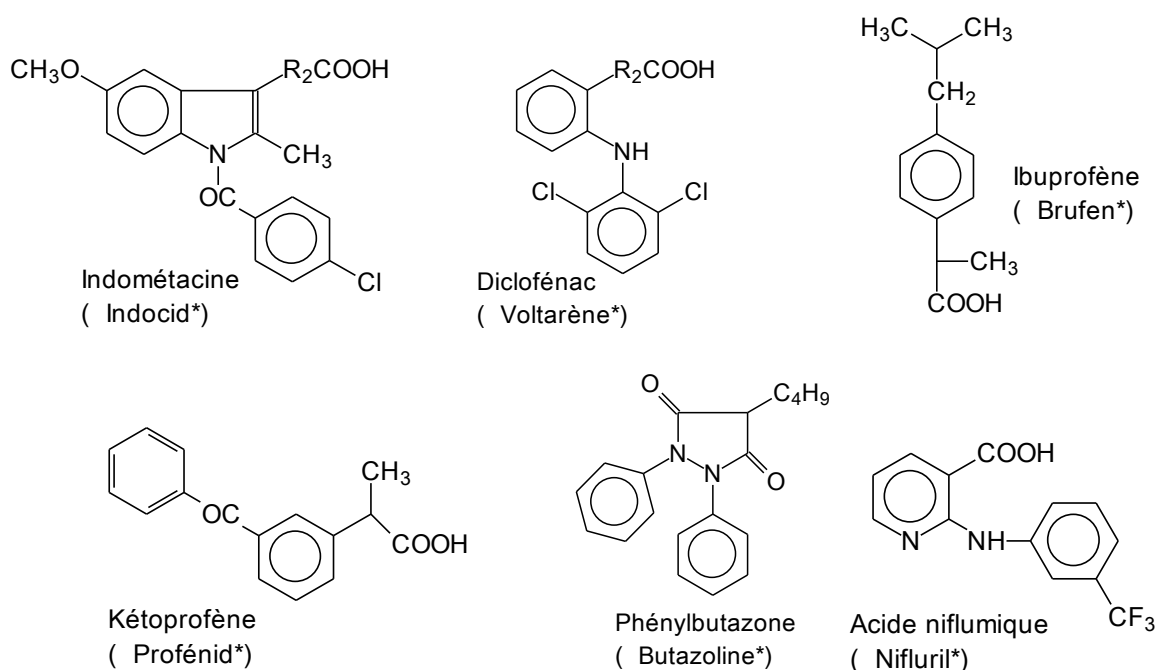


Figure 23: Quelques structures des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

III.4.4. Mécanisme d'action des anti-inflammatoires Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibent la cyclooxygénase (COX) (Tenenbaum, 1999; Jouzeau *et al.*, 2004) qui transforme les phospholipides membranaires en prostaglandines. Les prostaglandines agissent sur l'inflammation en inhibant la migration des

polynucléaires et l'adhésion des plaquettes qui sont les étapes initiales du processus inflammatoire. Les AINS non spécifiques inhibent les deux isoenzymes de la COX. La COX-1 est l'isoenzyme constitutionnelle. Elle intervient au niveau du tube digestif dans la synthèse de mucus et l'accroissement du débit sanguin muqueux qui permettent le maintien de l'intégrité des muqueuses gastroduodénales face à des agents érosifs. La COX-2 est une enzyme inductible, exprimée dans les sites inflammatoires dans les monocytes, les macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales, tandis que la COX-1 n'est plus exprimée (Schmassmann *et al.*, 1998; Jouzeau *et al.*, 2004).

Anti-inflammatoires stéroïdiens ou glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes empêchent la formation de glycérophospholipides membranaires en acide arachidonique par la production d'enzyme lipocortine. Ils diminuent la migration des polynucléaires, monocytes, macrophages vers les sites de l'inflammation et la production de médiateurs comme la sérotonine, l'histamine et les cytokines.

Les effets des flavonoïdes

Sous l'action de la cyclooxygénase et la lipoxygénase, l'acide arachidonique (acide gras C20 : 4) se métabolise respectivement en prostaglandines + thromboxane et en leucotriènes, molécules fortement impliquées dans le processus inflammatoires. *In vitro*, plusieurs flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique plaquettaire (Middleton, 1998; Pelzer *et al.*, 1998; Yeon, 2001). Ils ont même reporté que les effets de la quercétine et la myricétine sont dose-dépendants. A de fortes concentrations, ils inhibent la cyclooxygénase et la lipoxygénase. Cependant à de faibles concentrations, seule la lipoxygénase est affectée.

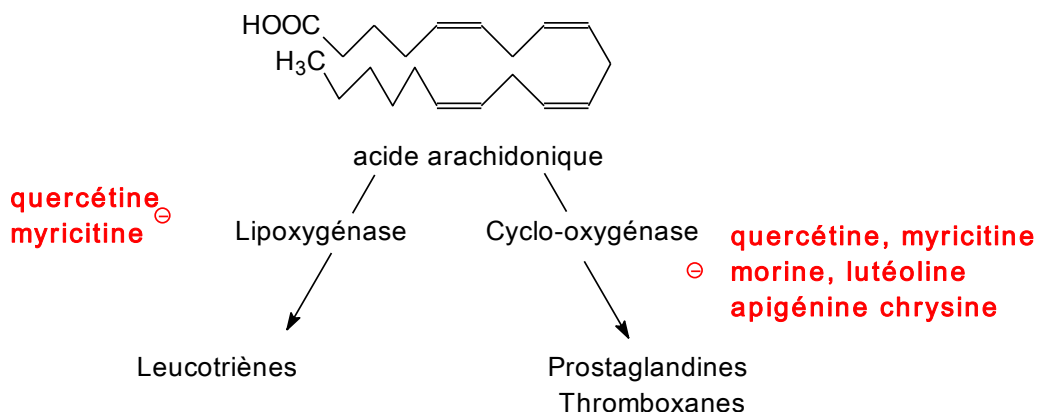


Figure 24: Inhibition de la lipoxygénases et de la cyclo-oxygénases sous l'action de différents flavonoïdes.

En outre, d'autres flavonoïdes tels que la lutéoline, la morine, l'apigénine et la chrysin agissent principalement sur l'activité de la cyclooxygénase (Laughton, 1991; Read, 1995; Sánchez de Medina et *al.*, 2002). Figure 24.

III.4.5. Méthode d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire

Les méthodes d'étude des anti-inflammatoires sont nombreuses. On recherche les effets sur les premières phases de l'inflammation primaire et les effets sur l'inflammation secondaire. Sur l'inflammation primaire, on recherche les effets antiérythémateux, antioedémateux, les effets de réduction du granulome. On étudie l'inflammation primaire et secondaire sur l'arthrite à l'adjuvant de Freund.

-Erythème aux rayons ultraviolets chez le cobaye

On apprécie l'intensité de la coloration rouge de la peau épilée du dos du cobaye soumise aux rayons ultraviolets, en absence et en présence d'anti-inflammatoires (Coyen, 1990; Timbo, 2003).

-Perméabilité capillaire chez le lapin

On applique de l'essence de térébenthine ou de l'huile de croton sur la peau épilée du lapin albinos. On met en évidence une exsudation plasmatique par l'injection intra-veineuse de bleu Trypan ou de bleu Evans qui se lie aux protéines plasmatiques. L'étendue de la diffusion du bleu dans la substance fondamentale du derme est réduite en présence d'anti-inflammatoires. On peut injecter l'agent phlogogène (agent qui provoque l'inflammation) dans le péritoine ou la plèvre de l'animal, il se produit un exsudat séreux dont l'intensité est évaluée à l'aide d'albumine radio-iodée préalablement administrée par voie intra veineuse (Coyen, 1990; Timbo, 2003).

-Œdème de la patte du rat

L'exsudation est évaluée par le gonflement de la patte postérieure du rat après injection intra-articulaire d'un agent phlogogène: formol, ovalbumine, Kaolin, carragénine (sulfopolygalactoside extrait du lichen d'Islande, *Chondrus crispus*). On mesure le diamètre de l'articulation tibiotarsienne à l'aide d'un pied à coulisse, on en estime le volume à l'aide d'un pléthysmomètre ou l'on pèse la patte sectionnée à l'articulation. Seul l'œdème à la carragénine paraît spécifique, les autres agents inflammatoires sont antagonisés par les vasoconstricteurs, des antihistaminiques, des antisérotinines (Coyen, 1990; Timbo, 2003).

-Granulome à la carragénine chez le rat

On insère dans le tissu cellulaire sous-cutané contre la cage thoracique une petite boule de coton imprégnée de carragénine. Au bout de 7 jours, on prélève le tissu de prolifération qui englobe le pellet et on pèse. Sur ce test, les corticoïdes sont très actifs. L'anti-inflammatoire est donné pendant l'essai pour empêcher la formation du granulome. La carragénine peut être remplacée par de l'agar ou par certaines matières plastiques. La poche granulomateuse consiste à insuffler de l'air au point d'injection d'une solution de carragénine. Il se forme en quelques jours un exsudat dont on mesure le volume et dans lequel on dénombre les cellules : polynucléaires, lymphocytes, histiocytes, mastocytes (Coyen, 1990; Timbo, 2003).

-Arthrite à l'adjuvant de Freund

L'injection intra-articulaire dans la patte postérieure du rat d'adjuvant de Freund (suspension de bacilles tuberculeux tués ou émulsion de cire D de bacille tuberculeux) détermine une réaction œdémateuse qui se développe immédiatement (inflammation primaire). En deux ou trois semaines apparaissent à distance, sur la patte postérieure contralatérale, sur les pattes antérieures, à la queue, aux oreilles, une réaction inflammatoire avec gonflement, rougeur, échauffement et douleur (inflammation secondaire). On observe ainsi une réaction d'ordre immunitaire qui rappelle l'hyper-immunisation de certaines maladies rhumatismales. Les anti-inflammatoires administrés pendant l'essai empêchent la réaction primaire et la réaction secondaire. La réaction immunitaire secondaire n'apparaît pas chez tous les rats traités, ce qui rend délicate la mise en œuvre de cet essai (Coyen, 1990; Timbo, 2003).

-Tests divers

En complément aux essais d'activité anti-inflammatoires, on procède à des études diverses pour mettre en évidence d'éventuels effets secondaires sur la pression artérielle (hypertension), la sécrétion gastrique (hyperacidité, apparition d'ulcères), l'hémostase (hypo ou hypercoagulabilité), la prise de poids (catabolisme azoté), la rétention hydrosodique et la déplétion potassique, sur les glandes endocrines (effet diabétogène, hypercorticisme, inhibition de sécrétion d'ACTH), sur le psychisme (tests des psychotropes) (Coyen, 1990).

PARTIE II: MATERIEL ET METHODES

A. Matériel

I. Cadre de L'étude

Les travaux de la présente thèse ont été réalisés dans trois (03) laboratoires :

- ✓ Laboratoire de Biochimie et de Chimie Appliquées (LABIOCA) de l'Unité de Formation et Recherche en Science de la Vie et de la Terre (URF/SVT), Université de Ouagadougou (UO) a abrité les travaux sur l'étude phytochimique, l'évaluation des activités antioxydantes, l'étude sur l'activité antibactérienne et le pouvoir inhibiteur des enzymes.
- ✓ Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Durango. Becaria COFAA ; Sigma 119, Fraccionamiento 20 de Noviembre II, Durango, Dgo., 34220, México. Ce laboratoire a permis de faire l'identification des molécules par la méthode HPLC-DAD.
- ✓ Laboratoire du CMA de Kossodo du district sanitaire de Nongr-Massom. Ce laboratoire a permis de faire la quantification des minéraux (Calcium, Sodium, Potassium et Magnésium).

II. Matériel de laboratoires

Balances (DHAUS) pour prendre les masses d'échantillons et produits

Congélateurs pour conserver les produits

Cuves HPTLC (Macherey-Nagel)

Etuve (momment, Beschickung, Loadig, Model 100-800) pour les incubations

Evaporateur rotatif (Büchi 461) muni d'une pompe à vide pour concentrer les extraits

Filtres de 0.2µm de type PTFE membrane pour filtrer les extraits

Hottes à flux laminaire vertical (Activité microbienne) pour inoculer les bactéries

Hottes (Captair) pour solvants organiques

Lampe UV (Spectroline, model ENF, 206c/FE, 254 et 365nm) pour les révélations de chromatogramme

Lyophilisateur (Telstar cryodos 50) pour lyophiliser les extraits

Micropipettes stériles utilisées dans les activités antibactériennes

Microplaques de 96 puits pour la réalisation des CMI et la lecture au spectrophotomètre

Microscope BA 200 Motic couplé à un Camera, Canon Power, pour réaliser les photos de coupes histochimiques

Plaques CCM en aluminium (HPTLC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄) et en plastique (Polygram^R SIL G/UV₂₅₄ für die DC), Germany

Pompe hydraulique manuelle (Le Speec) pour fabriquer les pastilles de spectre IR

Spectromètre IR (Perkin Elmer) pour réaliser les spectres IR

Spectrophotomètres UV (Epoch Biotek), il est utilisé dans les lectures d'absorbance dans le cas des activités antioxydantes, enzymatiques, le dosage de composés polyphénoliques, la réalisation de spectres UV, HPLC 1100 (Agilent, UAS) avec un dégazeur G13223A

Spectrophotomètre spinreact (Microtech-3000)

Pompe à gradient quartenaire (G1311) et une auto injectrice (G1313A)

Autoclave (prestige Medical, 2100 classic) pour la stérilisation de matériels dans les activités antibactériennes

Boîte de Pétri stériles à usage unique de 13 cm de diamètre (Sigma) pour la détermination de diamètres d'inhibition

Pipettes pour les pipetages de solvants et de solutions

Ampoule à décanter pour le fractionnement des extraits

Béchers et éprouvettes et Tube à essais

Plaques chauffantes pour les extractions au soxhlet

III. Solvants et réactifs

Solvants

- | | |
|---|---|
| ✓ Acétate d'éthyle (SDS, analyse) | ✓ Eau distillée |
| ✓ Acétone (FLUKA, analyse ; SSI, technique) | ✓ Ethanol (Merk, analyse) |
| ✓ Tween 80 pur | ✓ Hexane (SDS, analyse) |
| ✓ Chloroforme (SDS, analyse) | ✓ Méthanol FLUKA, analyse ; SDS, technique) |
| ✓ Dichlorométhane (SDS, analyse) | ✓ Méthanol (grade HPLC) |
| ✓ n-hexane (grade HPLC) | ✓ Eau de javel |

Réactifs

- | | |
|---------------------------|------------------------------------|
| ✓ Acide formique | ✓ NaH ₂ PO ₄ |
| ✓ Acide trichloroacétique | ✓ Na ₂ HPO ₄ |
| ✓ NaOH | ✓ FeCl ₃ |
| ✓ KBr | ✓ Réactif de Mayer |
| ✓ KOH | ✓ Folin-Ciocalteu |

- ✓ Chlorure de Magnesium (SIGMA-ALDRICH, Germany)
- ✓ Citrate ammonium ferrique: C.A F (28% de fer; 3.5g/l): tanins
- ✓ Acides concentrés (HCl ; H₂SO₄)
- ✓ AlCl₃
- ✓ Anhydre acétique (LABOSI, analyse)
- ✓ Carbonate de sodium
- ✓ N/PEG ST
- ✓ NaCl
- ✓ Réactif de NEU
- ✓ **Enzymes**
- ✓ Glutathion-S-transférase
- ✓ Acétylcholinestérase
- ✓ Xanthine oxidase
- ✓ Carboxylestérase
- ✓ **Substrats**
- ✓ **Inhibiteurs**
- ✓ Allopurinol
- ✓ Galanthamine
- ✓ Acide ascorbique
- ✓ Acide éthacrinyque
- ✓ Quercétine
- ✓ SbCl₃
- ✓ Ammoniaque
- ✓ Lugol
- ✓ Carmino-vert
- ✓ Diméthylsulfoxyde (DMSO)
- ✓ Mac Farland
- ✓ 2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl (DPPH)
- ✓ Potassium hexacyanoferrate [K₃Fe(CN)₆]
- ✓ Potassium persulfate
- ✓ 1-Chloro2,4-dinitrobenzène
- ✓ Iodure d'acétylthiocholine
- ✓ Xanthine
- ✓ 4-nitrophényl acétate
- ✓ **Tampon**
- ✓ Tampon borate
- ✓ Tampon phosphate
- ✓ Tampon Tris-HCl
- ✓ Tampon A, B, C

Substances de références

Acide ascorbique (pour la CES), acide caféique, acide tannique (pour les tanins), acide cinnamique, acide ellagique, acide hydroxycinnamique, acide gallique, rhamnétine, galangine, kaempférol, chrysine, quercitrine, catéchine, lutéoline, rutine, myricétine, naringénine, acacétine, quercétine (flavonoïdes et flavonols), apigénine, épigallocatechine gallate, épigallocatechine, allopurinol, gentamicine, ampicilline, amoxicilline, fungizone. Les acides rosmarinique, p-coumarique, férulique, syringique et p-hydroxybenzoïque et la quercétine-3-O-rhamnoside, myricétine-3-O-rhamnoside, hespéridine, lutéoline-7-glycoside.

IV. Matériels biologiques

IV.1. Matériel végétal

Différentes parties (tiges feuillées et/ou rameau) de *Lantana camara* et de *Lippia chevalieri* ont été fraîchement collectées et identifiées au Laboratoire d'Ecologie Végétale et de Botanique de l'Université de Ouagadougou par le Professeur Jeanne Millogo/Rasolodimby (Tableau 3). Des spécimens ont été déposés à l'herbier OUA du Centre d'Information sur la Biodiversité (CIB). Les plantes ont été d'abord séchées dans les conditions de laboratoire et pulvérisées ensuite pour les différentes extractions.

Tableau 3 : Lieu, organe, période de récolte des espèces végétales de l'étude

Binôme latin	Date et lieu de récolte	Organe	Code de l'herbier
<i>Lantana camara</i> L.	16 juin 2010 UFR/SVT université de Ouagadougou	Rameau	BK-lc2793
<i>Lippia chevalieri</i> Moldenke	Le 08 novembre 2009 à Gonsè (environ 30 km de Ouagadougou)	Tiges feuillées	BK-la2775

IV.2. Souches bactériennes

Bactéries gram positifs

- | | |
|---|-------------------------------------|
| ✓ <i>Bacillus cereus</i> ATCC9144 | ✓ <i>Staphylococcus aureus</i> |
| ✓ <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | ✓ <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| | ✓ <i>Streptococcus agalactiae</i> |

Bactéries gram négatifs

- | | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| ✓ <i>Citrobacter freundii</i> | ✓ <i>Salmonella Typhi</i> (poisson) |
| ✓ <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | ✓ <i>Salmonella Typhi</i> (salade) |
| ✓ <i>Escherichia coli</i> uro | ✓ <i>Shigella flexneri</i> |
| ✓ <i>Klebsiella pneumoniae</i> | ✓ <i>Vibrio cholerae</i> (eau) |
| ✓ <i>Proteus mirabilis</i> ATCC35659 | ✓ <i>Vibrio cholerae</i> (salade) |
| ✓ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ✓ <i>Pantoea</i> sp. Hémoculture |

B. Méthodes

Chapitre 1. Etudes phytochimiques

I. Histochimie

I.1. Double coloration au carmino-vert pour l'identification des tissus

Les coupes ont été trempées dans l'eau de javel pendant 15 à 20 mn (afin de détruire le contenu cellulaire), puis rincées 3 fois à l'eau distillée. Elles ont ensuite été trempées dans l'acide acétique 20 % pendant 5 mn afin d'éliminer le résidu d'eau de javel qui autrement détruirait le Carmino-vert. Après rinçage les coupes sont trempées dans le Carmino-vert de Mirande (5mn) et rincées à l'eau distillée puis observées entre lame et lamelle dans une goutte de glycérine aux objectifs X10 ou X40 (Ciulei, 1982).

Ainsi:

Les cellules qui gardent leur paroi pecto-cellulaire sont colorées en rose c'est le cas du parenchyme en rose pâle, le phloème en rose vif, le collenchyme en rose violacé.

Les cellules à paroi lignifiée sont colorées en vert comme le xylème en vert, le sclérenchyme en vert-bleu, le suber en vert-jaunâtre. On peut en outre observer des cristaux de certains acides organiques quand ils y existent (Ciulei, 1982).

I.2. Détection des métabolites secondaires

Détection des alcaloïdes

La présence des alcaloïdes est témoignée par un précipité brun dans les vacuoles des cellules en utilisant le lugol comme réactif (Ciulei, 1982).

Détection des tanins

Les coupes ont été montées avec une goutte du FeCl_3 1 % entre lame et lamelle pour l'observation. La plante contient des tanins si on observe un précipité noirâtre dans les vacuoles des cellules (Ciulei, 1982).

Détection des flavonoïdes

Les coupes ont été montées avec du NaOH 5 % entre lame et lamelle pour l'observation. La présence des flavonoïdes (flavones) est indiquée par la coloration jaune dans les tissus.

II. Extraction

Macération méthanolique

Vingt cinq grammes (25 g) de poudre de chaque espèce ont été soumis à une extraction par macération méthanolique (250 mL) pendant 72 heures. Après filtration et concentration au rotavapor (évaporateur rotatif), les extraits sont mis dans des boîtes de pétri et conservés à l'étuve à 37 °C pour le séchage. Le résidu obtenue est utilisée pour les différents tests.

Fractionnement des macérés méthanoliques

10 ml (0,1 g/mL) d'une solution de méthanol-eau (V/V) sont extraits avec 2x5 mL d'acétate d'éthyle. Les deux fractions obtenues (acétate d'éthyle et aqueuse) sont utilisées pour le criblage des acides phénols et des flavonoïdes à travers la méthode d'analyse par HPLC. En ce qui concerne la CCM, nos extraits ont été soumis à une série de partage liquide-liquide avec des solvants organiques. Le principe se basant sur la non miscibilité et de polarité différente, on recueille les différentes phases l'une après l'autre. Figure 25.

- ✓ FH : 25 mL des macérés méthanoliques sont extraits avec 2 x 25 mL de n-hexane. Les solutions hexaniques sont rassemblées puis concentrées sous pression réduite. Les concentrés obtenus constituent des hexaniques (FH).
- ✓ FDCM : les phases épuisées à l'hexane sont de nouveau extraites comme ci-dessus indiqué mais avec le dichlorométhane comme solvant. Les solutions rassemblées, concentrées et séchées pour donner les fractions dichlorométhanes (FDCM).
- ✓ FAE : la phase aqueuse résiduelle est maintenant extraite avec 2 x 25 mL d'acétate d'éthyle. Les solutions d'acétate d'éthyle sont rassemblées puis traitées comme précédemment pour donner les fractions d'acétate d'éthyle (FAE).

Hydrolyse des macérés méthanoliques

20 mg de la poudre résiduelle sont dissous dans 25 mL d'éthanol. On y ajoute 15 mL d'acide chlorhydrique (HCl 10%) et l'ensemble est chauffé au reflux pendant 30 min. durant l'hydrolyse, la solution devient opalescente à cause de la précipitation des aglycones obtenus par hydrolyses des hétérosides. Après refroidissement, les solutions ont été ensuite extraites chacune avec 30 mL d'acétate d'éthyle dans une ampoule à décanter. Les fractions acétate d'éthyle (hydrolysats) récupérés sont concentrées à sec sous pression réduite et utilisés pour la CCM des acides phénols et des flavonoïdes.

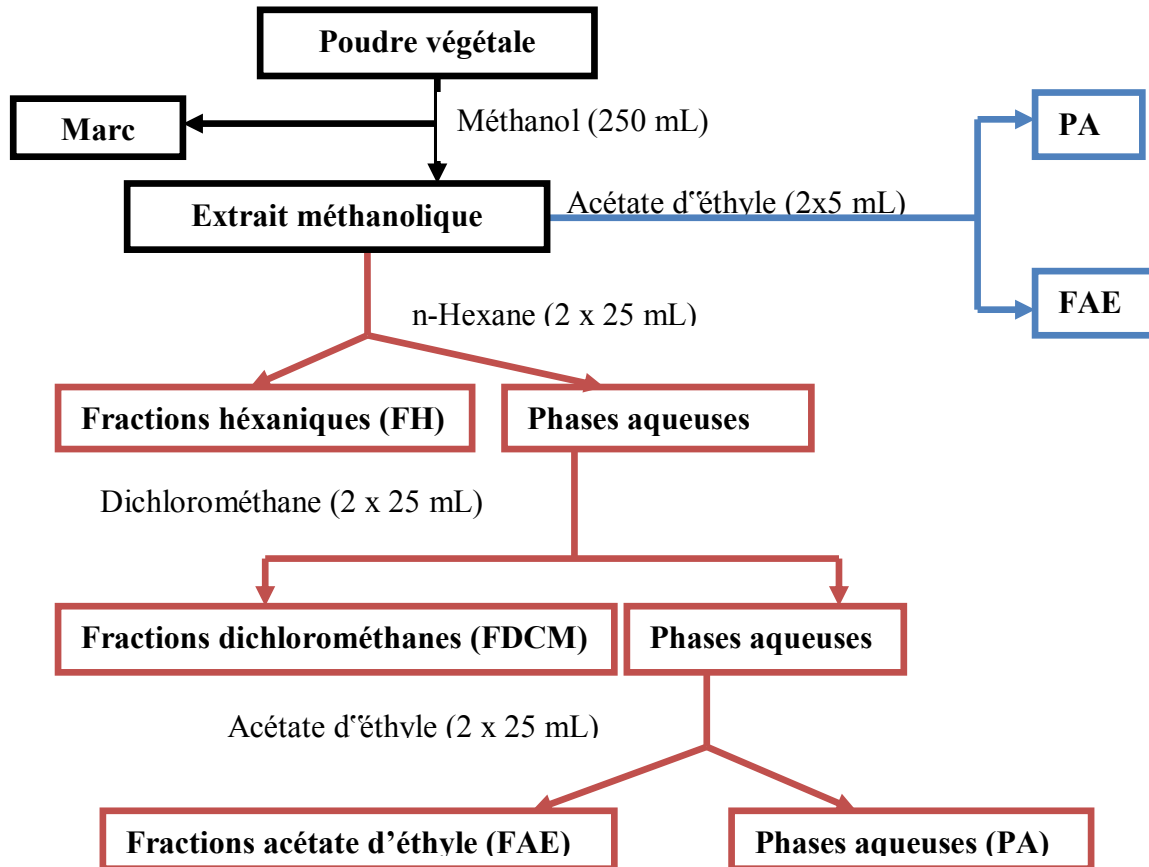


Figure 25: schéma de fractionnement des extraits

III. Criblage Phytochimique

Les tests généraux de caractérisation ont pour objet la révélation des grands groupes de métabolites secondaires présents dans les extraits des plantes (Ciulei, 1982). Ces tests ont été réalisés sur les macérés méthanoliques des plantes étudiées :

- ✓ La réaction au FeCl_3 est mise en œuvre pour les tanins et polyphénols;
- ✓ Le test de Shibata pour les flavonoïdes;
- ✓ Le test de Bornträger pour les anthraquinones;
- ✓ Le test de Feiggl-Frehden pour les coumarines;
- ✓ Le test de Liebermann/Buchard pour les triterpènes/stéroïdes;
- ✓ Le test de Keller-Kiliani pour les cardenolides;
- ✓ Le test de mousse pour les saponosides.

IV. Etude qualitative par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

IV.1. Définition et principe de la CCM

La chromatographie est une méthode physique de séparation de mélanges en leurs constituants; elle est basée sur les différences d'affinité des substances à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. La chromatographie sur couche mince, ou sur plaque (CCM), est effectuée surtout en vue d'une analyse d'un mélange. La phase stationnaire solide est fixée sur une plaque, et la phase mobile liquide, nommée éluant, est un solvant ou un mélange de solvants. On dépose sur la phase fixe une petite quantité du mélange à séparer et on met cette phase au contact de la phase mobile. La phase mobile migre de bas en haut, par capillarité, le long de la phase fixe en entraînant les constituants du mélange. C'est le phénomène d'élution, qui permet la séparation des constituants du mélange à analyser. Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale (R_f) :

$$R_f = \frac{\text{hauteur de la tâche}}{\text{hauteur du front du solvant}}$$

Chaque tache correspond à un constituant et on l'identifie par comparaison du R_f avec un témoin (une même substance migre à la même hauteur dans des conditions opératoires identiques; même R_f).

IV.2. Chromatographie sur Couches Minces des acides phénols et flavonoïdes de nos extraits de plantes.

Les analyses sur couche mince sont réalisées en phase normale sur des plaques en plastique Silicagel 60 F254 (Merck) et en aluminium (HPTLC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄). Les CCM des macérés méthanoliques des feuilles des deux espèces de plantes ont été réalisées pour la recherche des flavonoïdes et des acides phénols suivant la procédure décrite par Wagner et Bladt (1996). Le développement des plaques s'effectue dans une cuve en verre saturée avec l'éluant approprié. Cette phase mobile est constituée d'un mélange tertiaire de solvants selon le type de séparation souhaitée.

Dans notre cas, les systèmes de solvants pour les différentes classes de composés sont les suivants:

(S1) : Hexane/Acétate d'éthyle/Acide acétique (6:6:1)

(S2) : Acétate d'éthyle/Acide formique/Acide acétique glacial/Eau (10:1,1:1,1:2)

Après les avoir visualisés en UV 254 nm, les chromatogrammes ont été révélés par pulvérisation avec le réactif de NEU (Diphénylboryloxyéthylamine à 1% dans le méthanol) suivie d'une pulvérisation avec une solution à 5% de Polyéthylène glycol4000 dans l'éthanol. La plaque est ainsi visualisée à l'UV à 365 nm.

Le kaempférol et la rutine ont été utilisés comme références pour l'identification des flavonoïdes des extraits tandis que l'acide caféique a servi pour la recherche des acides phénols.

V Dosage des composés polyphénoliques

V.1. Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux des extraits ont été déterminés par la méthode décrite par Lamien-Meda *et al.* (2008). Les extraits sont dissous dans du méthanol pur pour avoir une concentration de 10 mg/ml, puis dilués au 1/100 dans l'eau distillée. Un volume de 0.5 ml de la solution diluée a été alors mélangé à 2.5 ml du réactif de Folin-ciocalteu à 0.2 N et incubé pendant 5 min. 2 ml d'une solution de carbonate de sodium à 75 g/l dans l'eau distillée est ensuite ajoutée et le mélange incubé pendant 2 heures. A la fin de l'incubation, les densités optiques sont lues à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Epoch, Biotek) Séries. Les

teneurs en phénoliques totaux sont déterminées à l'aide d'une courbe de référence avec l'acide gallique (0-100 mg/L) comme standard (figure 35: annexe I). Au total, trois (3) analyses sont effectuées pour chaque extrait et le résultat donné est une moyenne à partir de ces analyses. Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent acide gallique pour 1 g d'extrait sec (mg EAG/ g).

V.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes totaux ont été déterminés par la méthode de Dowd telle qu'adaptée par Lamien-Meda *et al.* (2008). Un volume de 5 ml de $AlCl_3$ à 2% dans du méthanol pur est mélangé avec un volume égal d'extrait à 1 mg/ml dans le méthanol. Les densités optiques sont lues après 10 min à 415 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Epoch, Biotek). La quercétine (0-100 mg/L) a servi comme standard pour l'élaboration de la courbe d'étalonnage (figure 36: annexe I). Un mélange de 5 ml d'extrait et de 5 ml de méthanol sans $AlCl_3$ a servi de blanc. Au total, trois (3) analyses sont effectuées pour chaque extrait et le résultat donné est une moyenne des trois lectures. Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent quercétine pour 1 g d'extrait sec (mg EQ/ g).

V.3. Dosage des flavonols totaux

Les flavonols totaux ont été dosés selon la méthode d'Almaraz-Abarca *et al.* (2007). La lecture est faite contre une courbe standard de quercétine et trois lectures sont effectuées par échantillon. Dans un tube à essai on additionne 1 ml d'extrait (0.1mg/ml) à 1 ml de $AlCl_3$ (20%). La lecture est faite en 10 mn et à 425 nm. Les concentrations en flavonols totaux sont exprimées en mg Equivalent Quercétine (mg EQ) dans 100mg d'extrait (figure 37: annexe I). Les concentrations sont calculées selon la formule $C = (CI \times D) \times 100/Ci$

C = concentration en flavonols totaux en mg EQ/100mg d'extrait sec

CI = concentration de l'échantillon lue

D = facteur de dilution

Ci = concentration de la solution initiale

V.4. Dosage des Tanins totaux

Ce dosage est réalisé selon la méthode proposée par European Commission (2000). Brièvement 1 ml d'extrait à doser est mélangé avec 5 ml d'eau au vortex auquel est ajouté 1 ml de citrate d'ammonium ferrique (28 % de fer; 3.5 g/L) (datant de 24 h) et 1 ml d'ammoniaque (8 g /L). L'absorbance de la solution est mesurée à 525 nm au bout de 10 min contre un blanc

(1 ml d'extrait à doser + 6 ml d'eau + 1 ml d'ammoniaque) pour 3 lectures. L'acide tannique a été utilisé comme standard pour tracer la courbe d'étalonnage (figure 38: annexe I).

VI Quantification du Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ et du Na^+

VI.1. Evaluation de la teneur en calcium

Distribuer 1 mL de la solution de travail [mélange de (éthanolamine 500 mmol/L) et de (*O*-cresolphtalein 0,62 mmol/L; 8-hydroxyquinolein 69 mmol/L)] dans trois tubes correspondant à ceux du blanc, de l'étalon (10 mg/dl) et l'échantillon (10 mg/mL). Ajouter 10 μL de l'étalon et 10 μL de l'échantillon. Laisser incuber 5 min et lire l'absorbance à 520 nm. La teneur en calcium est donnée par la formule suivante :

$[(A \text{ échantillon} / (A \text{ étalon})) \times 10 = X \text{ mg/dl. } (2,25 \leq \text{Valeur normale} \leq 2,65 \text{ mmol/L})$ (Siest *et al.*, 1981; Young, 2001)

VI.2. Evaluation de la teneur en magnésium

Distribuer 1 mL de la solution de travail [(mélange de : amino-méthylpropanol 1 mmol/L + l-EGTA 0,21 mmol/L) et de (calmagite 0,30 mmol/L)] dans trois tubes correspondant à ceux du blanc, de l'étalon (2 mg/dl) et l'échantillon (10 mg/mL). Ajouter 10 μL de l'étalon et 10 μL de l'échantillon. Laisser incuber 5 min et lire l'absorbance à 520 nm. La teneur en magnésium est donnée par la formule suivante :

$[(A \text{ échantillon} / (A \text{ étalon})) \times 2 = X \text{ mg/dl où } X \text{ mg/dl} \times 0,412 = X \text{ mmol/L. } (0,66 \leq \text{Valeur normale} \leq 1,03 \text{ mmol/L})$ (Siest *et al.*, 1981; Young, 2001)

VI.3. Evaluation de la teneur en potassium

Mélanger 50 μL de l'échantillon (10 mg/mL) et 500 μL de solution de précipitation (acide trichloroacétique : TCA 0,3 mol/L), bien homogénéiser et centrifuger pendant 5 min à 4000 trs/min. Recueillir le surnageant = solution de l'échantillon.

Mélanger volume à volume R1 (tétraphénylboron de sodium : TPB-Na 0,2 mol/L) et R2 (hydroxyde de sodium 2,0 mol/L), bien homogénéiser et l'utilisé comme solution de travail. Dans le tube test, prendre 1 mL de la solution de travail et 100 μL de la solution du surnageant, bien homogénéiser et lire l'absorbance à 578 nm après 5 d'incubation. La teneur en potassium est donnée en mmol/L par la formule suivante :

$[(A \text{ échantillon})/(A \text{ étalon})] \times 5 = \text{teneur en potassium. } (3,5 \leq \text{Valeur normale} \leq 4,8 \text{ mmol/L})$
(Siest *et al.*, 1981; Young, 2001)

VI.4. Evaluation de la teneur en sodium

Mélanger dans un tube 1 mL de la solution de précipitation (uranyl acetate : 19 mmol/L et magnésium acetate : 140 mmol/L) et 20 μL d'extrait (10 mg/mL), faire autant avec l'étalon, vortexer et centrifuger les deux tubes pendant 10 min à 1500 trs/min et recueillir les surnageant.

Distribuer dans trois tubes correspondant au blanc, étalon (150 mmol/L) et de la solution du surnageant 1 mL de la solution de travail (mélange de : ammonium thioglycolate : 550 mmol/L et ammoniacque : 550 mmol/L). Ajouter 40 μL de la solution du surnageant dans le tubes de l'étalon et celui du test. Incuber 5 min et lire au spectrophotomètre l'absorbance à 410 nm. La teneur en sodium est donnée par la formule suivante :

$[(A \text{ blanc} - A \text{ échantillon}) / (A \text{ blanc} - A \text{ étalon})] \times 150 = X \text{ mmol/L. } (133 \leq \text{Valeur normale} \leq 143 \text{ mmol/L})$ (Siest *et al.*, 1981; Young, 2001)

VII. Détermination HPLC/DAD des polyphénols

VII.1. Définition

La Chromatographie liquide à haute performance (CLHP ou HPLC en anglais) classique fait intervenir des mécanismes d'échange soluté / phase mobile / phase stationnaire, basés sur les coefficients de partage ou d'adsorption selon la nature des phases en présence. Les adsorbants en HPLC sont caractérisés par leur structure et la taille des particules. On distingue des adsorbants poreux en surface et ceux totalement poreux. Plus la taille des particules est petite, plus on observe une résistance à l'écoulement de l'éluant (de 10 μm à 5 μm la résistance est multipliée par 4) par conséquent la pression à appliquer à l'entrée de la colonne est plus grande. Ce problème est résolu par la fabrication d'adsorbant à particules sphériques (5 à 10 μm) et totalement poreuses. L'apparition des adsorbants greffés pour la chromatographie liquide a quelque peu éclipsé les adsorbants poreux. Les greffages sont surtout pratiqués sur la silice dont les groupements silanols réagissent avec différents radicaux (silanisation). La classification de ces silices greffés se fait selon la nature des liaisons ou selon la polarité des radicaux greffés. Différentes types de liaisons ont été utilisées : -Si-O-C(R)₃, -Si-C-(R)₃, =Si-N= (Bassène, 2012).

Ces trois types de liaisons présentent l'inconvénient d'être facilement hydrolysables en milieu aqueux ou alcoolique. Les liaisons les plus utilisées sont les siloxanes obtenues par silanisation (-Si-O-Si-C). Elles sont stables thermiquement et peu hydrolysables en milieu aqueux ou hydroorganique (entre pH2 et 9) (Bassène, 2012).

VII.2. Préparation des solutions standards

Six (06) acides phénols de référence : les acides rosmarinique, gallique, p-coumarique, férulique, syringique et p-hydroxybenzoïque et six (06) flavonoïdes de référence : quercétine, quercétine-3-O-rhamnoside, myricétine-3-O-rhamnoside, hespéridine, lutéoline-7-glycoside et naringénine ont été utilisés pour la préparation des solutions standards à une concentration de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dans du méthanol grade HPLC. Avant l'analyse chaque solution est convenablement diluée avec de l'eau distillée.

VII.3. Préparations des solutions tests et conditions d'analyse

1 g de chaque échantillon a été dissout dans 10 mL de méthanol-eau (50% v/v), puis concentré à autour de 5mL et fractionné deux fois avec 10 mL d'acétate éthylique. Les fractions organiques combinées (fraction acétate d'éthylique) et la fraction aqueuse ont été concentrées à sec avant d'être ré-dissout dans 1,5 mL de méthanol (100 μL de la fraction). Les deux fractions sont analysés par HPLC/DAD sur un système de Perkin Elmer comportant une colonne C18 analytique de Perkin Elmer Brownlee (4.6 x 250 millimètres, 5 μm) et un gradient d'acétonitrile-eau acidifié (Campos, 1997). Des chromatogrammes standards ont été tracés à 260 et à 340 nm. Des données spectrales pour toutes les crêtes ont été accumulées dans la gamme 200-400 nm en utilisant un détecteur à barrettes d'iodes (série 200 de Perkin Elmer). Des comparaisons entre les temps de rétention et les spectres UV des composés résolus avec ceux des standards ont été employées pour obtenir l'information structurale des flavonoïdes détectés. Cette étude est faite selon la méthode par Mabry *et al.*, (1970) et Campos et Markham (2007).

VII.4. Principe et paramètres chromatographiques

L'échantillon doit être totalement soluble dans la phase mobile qui sera appelé solvant d'élution (solvant ou mélange de solvants). Celui-ci doit être poussé à haute pression afin d'assurer un débit constant dans la colonne et y éviter toute perte de charges. Ce débit élevé diminue le temps nécessaire pour séparer les composants le long de la phase stationnaire. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants. En effet, pour un même volume de phase stationnaire la surface d'échange augmente si les

« grains » qui la composent sont de diamètre plus petit. Les pics obtenus sont plus étroits donc la résolution est améliorée (les pics sont bien séparés, on peut donc bien les différencier), le seuil de détection est également plus bas (des pics étroits et hauts sont plus faciles à isoler du bruit de fond que des pics larges et bas). La combinaison de ces attributs - rapidité et résolution élevées conduit à l'appellation « haute performance ». Les solvants utilisés sont des combinaisons miscibles d'eau et de divers liquides organiques (alcools, acétonitrile, dichlorométhane...).

Souvent, la composition de la phase mobile est modifiée au cours de l'analyse, c'est le mode dit « gradient » ou « élution graduée » (en opposition au mode « isocratique », pour lequel la composition de la phase mobile reste la même tout au long de l'analyse). Par exemple, sur une colonne apolaire, en utilisant un mélange eau/méthanol comme phase mobile, les composants les plus hydrophobes sont élués avec une concentration élevée en méthanol alors que les composants plus hydrophiles sont élués préférentiellement avec une concentration faible en méthanol. Selon la nature de la phase stationnaire, on commencera par une concentration élevée en méthanol ou le contraire.

La qualité et la durée d'une séparation peuvent changer avec la nature de la phase stationnaire et de la phase mobile utilisées. Mais pour un même type de phase stationnaire et une même phase mobile, la qualité et la durée d'une séparation peuvent aussi être modifiées par les caractéristiques géométriques et opératoires de ces deux phases.

Caractéristiques géométriques de la phase stationnaire :

- la longueur L et le diamètre interne d_c de la colonne
- et le diamètre des particules de phase stationnaire d_p .

Caractéristiques géométriques de la phase mobile :

- la vitesse linéaire de l'écoulement u
- la perte de charge ou pression appliquée ΔP entre l'entrée et la sortie de la colonne (la pression de sortie étant généralement atmosphérique). Elle est donnée par la loi de Darcy, où η est la viscosité de la phase mobile et Φ est le facteur de résistance à l'écoulement qui dépend de la forme des particules et de la qualité du remplissage de la phase stationnaire.

$$\Delta P = \Phi \cdot \frac{\eta \cdot L \cdot u}{d_p^2}$$

Pour des colonnes bien remplies de particules sphériques ou irrégulières, la formule empirique suivante, établie avec les unités usuelles, permet le calcul commode d'une estimation de ΔP en fonction du débit F de la phase mobile avec une incertitude inférieure à 25%.

$$\Delta P(MPa) = 400 \cdot \frac{F(ml/min) \cdot L(cm) \cdot \eta(cP)}{d_p(\mu m)^2 \cdot d_c(mm)^2}$$

Chapitre 2. Etudes biologiques

I. Evaluation des activités antioxydantes

I.1. Pouvoir réducteur par la méthode FRAP

La méthode FRAP (Ferric reducing antioxidant power) est basée sur l'habilité des extraits à réduire l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}). La capacité totale en antioxydant de chaque extrait de plante a été déterminée par la méthode Hinneburg *et al.* (2006). Ainsi 1 ml d'une solution aqueuse de chaque extrait (10 mg/ml diluée au 100^{ème} pour obtenir 0,1 mg/ml), a été mélangé avec 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M; pH 6,6) et 2,5 ml de la solution aqueuse (1%) d'hexacyanoferrate de potassium [$K_3Fe(CN)_6$]. Après 30 mn d'incubation à 50°C; 2,5 ml d'acide trichloracétique (10%) a été ajouté. Le mélange a ensuite été centrifugé à 2000 tr/min pendant 10 mn. 100 μ l du surnageant ont ensuite été mélangés au même volume d'eau et 20 μ l d'une solution aqueuse fraîchement préparée de $FeCl_3$ (0,1%) a été ajoutée.

Les absorbances ont été lues à 700 nm contre une courbe d'étalonnage obtenue à partir de l'acide ascorbique (0-100 mg/L) (figure 39). Le pouvoir réducteur a été exprimé en équivalent acide ascorbique (EAA) (mmol acide ascorbique /g d'extrait sec).

I.2. Activité anti-radicalaire par la méthode d'inhibition du radical DPPH

L'activité anti-radicalaire des extraits végétaux traduit leur aptitude à piéger les radicaux libres de l'organisme. L'activité anti-radicalaire est évaluée sur les macérés acétoniques des trois plantes et leurs fractions. Les extraits sont solubilisés dans du méthanol pour obtenir des concentrations mères de 10 mg/ml. Cette concentration est diluée au 100^{ème} pour le test. La méthode spectrophotométrique au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) décrite par Velazquez *et al.* (2003) est utilisée avec quelques modifications.

Introduire 1,5 ml d'une solution méthanolique de DPPH à 20mg/l dans des tubes à essais contenant au préalable 0,75 ml d'extraits à tester. Un témoin ne contenant pas d'extrait

végétal est aussi préparé. Les absorbances ont été lues à 700 nm contre une courbe d'étalonnage (figure 40: annexe I) obtenue à partir de l'acide ascorbique (0-200 mg/L). Chaque essai est réalisé en triple. Le pouvoir anti-radicalaire a été exprimé en équivalents acide ascorbique (EAA) (mmol acide ascorbique /g d'extrait sec). Figure 26.

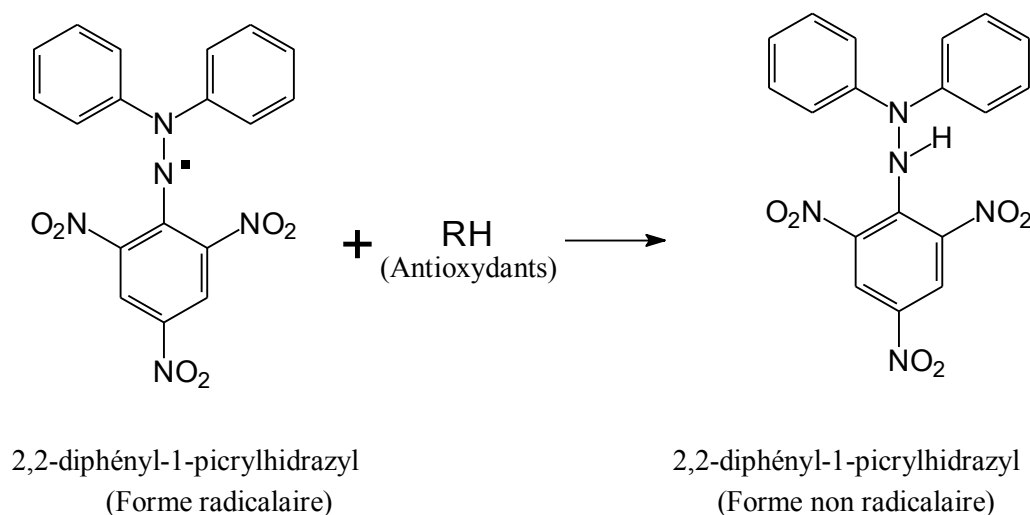


Figure 26: Structure du DPPH et sa réduction par l'antioxydant RH

II. Etude de l'activité antibactérienne

II.1. Préparation des Milieux de culture

Le milieu Müller Hinton gélosé (MH) obtenu en dissolvant 38 g du milieu MH dans 1L d'eau distillée (Le pH est de $7,5 \pm 0,2$) et le bouillon M.H. (21g/L dans l'eau distillée) ont été utilisés dans la présente étude. Chaque milieu a été stérilisé à l'autoclave à la température de 121°C pendant environ 15 min.

II.2. Préparations des solutions

Le Mac Farland 0,5 est obtenu en mélangeant 0,5 ml de la solution1 de BaCl₂ hydraté (BaCl₂, 5H₂O) (1,17g ont été dissous dans 100 ml d'eau distillée) et 99,9 ml de H₂SO₄ 1%

Les extraits sont dissous dans le méthanol 1% avec l'eau distillée stérile pour une concentration finale de 1 mg/ml. Les disques antibiotiques de référence ont été utilisés.

La solution mère bactérienne est préparée en prélevant les colonies à l'aide d'une pipette pasteur à bout flambé, elles sont ensuite inoculées dans une solution de bouillon MH stérile contenu dans une série de tubes à vice stérilisés. La solution est homogénéisée et conservée à l'étuve à la température de 37°C pendant au moins 18 h.

II.3. Préparation de l'inoculum bactérien

L'inoculum bactérien est préparé en prélevant un aliquote de la solution mère bactérienne, qu'il faut ensuite introduite dans un autre tube à vice stérilisé contenant un liquide physiologique (NaCl 0,9 %). La solution est comparée à la turbidité de la solution de Mc Ferland. Lorsque les deux solutions sont identiques alors notre inoculum final contient 10^6 à 10^7 UFC/ml.

II.4. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits

L'efficacité des extraits par rapport aux microorganismes a été évaluée selon la méthode d'Arias *et al.* (2004) avec quelques modifications. Nous avons coulé 10ml de gélose ont été coulés dans des boîtes de pétri et mis en incubation pendant 24 h pour vérifier la stérilité. L'ensemencement est alors effectué par la technique par inondation. Cette technique consiste à inonder la surface de la gélose avec une suspension bactérienne d'une densité de 10^6 - 10^7 bactéries/ml. L'excès est prélevé et éliminé. Des disques constitués de papier Whatman n°1 de 6 mm (stérilisé) sont déposés sur la gélose. Un volume de 15 μ l d'extrait d'une concentration de 25 μ g/ml dans le méthanol 1% est déposé sur chaque disque. Les boîtes de pétri ont alors été mises en incubation pour 24h. Les diamètres des zones d'inhibition, matérialisées par des zones claires autour des disques sont alors mesurés à l'aide d'une règle graduée. Les extraits induisant des zones d'inhibition ≥ 3 mm autour du disque sont considérés comme antibactériens (Schulz *et al.*, 1995). Chaque essai est réalisé 3 fois. Le méthanol 1% est utilisé comme contrôle négatif.

II.5. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La CMI est définie comme étant la concentration minimale d'extrait pour laquelle on n'observe pas de croissance visible à l'œil nu des bactéries. Les suspensions bactériennes ont été diluées avec du bouillon et distribuées dans les plaques à 96 puits stérile contenant une gamme de concentrations d'extraits. Pour ce faire chaque puits reçoit 100 μ l de bouillon MH; 100 μ l d'extrait (25 μ g/ml) aux premiers puits suivi d'une dilution en cascade auxquelles sont ajoutés 10 μ l de l'inoculum bactérien. Les colonnes (test) reçoivent l'inoculum (témoin de la fertilité du milieu de culture), tandis que celui de la colonne témoins est sans inoculum pour tester la stérilité du milieu (Témoin négatif). Les derniers puits des deux colonnes ne reçoivent pas d'extraits. Après une incubation de 24 heures à 37°C, on y ajoute le para Iodonitrotétrazolium violet (INT) comme indicateur de croissance bactérienne. La CMI est déterminée après 30 minutes d'incubation à 37°C. Les puits dans lesquels la croissance bactérienne a eu lieu sont signalés par une coloration rouge/rose tandis que les puits ayant

connu une inhibition de la croissance bactérienne ont une coloration claire. La CMI correspond à la plus petite concentration d'extrait inhibant la croissance bactérienne.

La réaction de l'INT est basée sur le transfert d'électron sur le NADH; un produit comme la thréonine déshydrogénase (TDH) catalyse cette réaction à la coloration du tétrazolium (*p*-iodonitrotétrazolium violet). La TDH des bactéries catalyse l'oxydation de la thréonine à NAD-dépendant en 2-amino-3-ketobutyrate et NADH. Durant cette phase active de croissance des bactéries, un électron est transféré sur le NADH au *p*-iodonitrotétrazolium violet, un colorant formazan qui est pourpre-rouge en couleurs. L'inhibition est matérialisée par des zones claires en lieu et place de coloration pourpre-rouge. Cela est représenté par la figure 27.

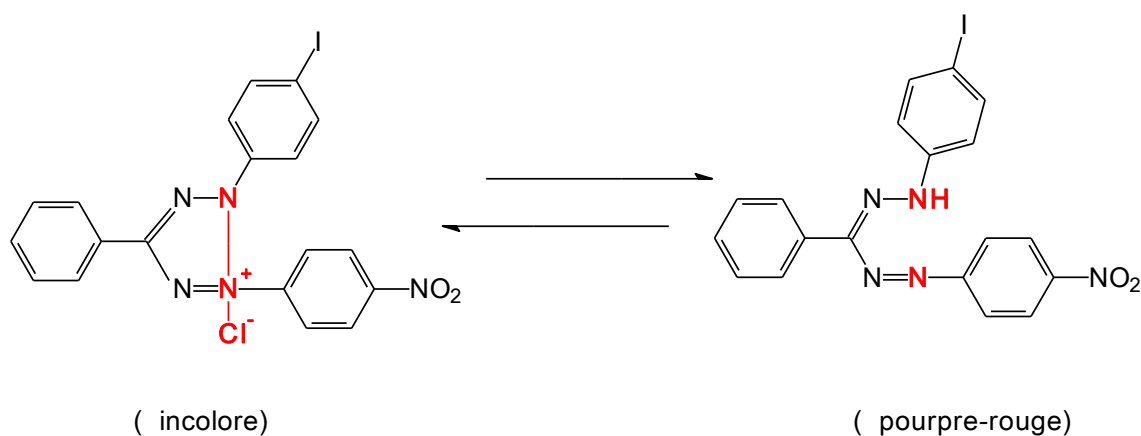


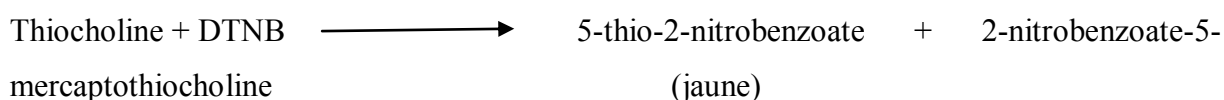
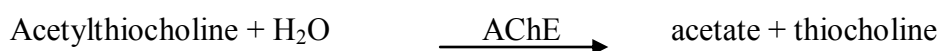
Figure 27: INT, réactif d'accouplement pour l'analyse colorimétrique

III. Détermination du pouvoir inhibiteur d'enzymes

III.1. Inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE)

Principe

L'acétylcholinestérase hydrolyse le substrat ATCI (Iodure d'acétylthiocholine) en thiocholine et en acétate, produits non colorés. La thiocholine en présence du DTNB (acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque) donne un produit jaune, le 5-thio-2-nitrobenzoate, ce qui permet de suivre la cinétique au spectrophotomètre à 405 nm.



Enzyme et réactifs

Les réactifs sont constitués du Tampons A, B et C (Annexe), de la solution de substrat, l'iodure d'acétylthiocholine (ATCI) à 15 mM. Le substrat utilisé est l'iodure d'acétylthiocholine (ATCI) à 15 mM; il est conservé à -20°C.

Solution du substrat 15 mM.

Le substrat utilisé est l'iodure d'acétylthiocholine (ATCI) à 15 mM. Il a été obtenu en dissolvant 434,1 mg dans 100 ml d'eau distillée ; il est conservé à -20°C.

Solution d'enzyme 0,22 U/ml.

L'acétylcholinestérase commercial (0,95 mg soit 1ku) a été dissout dans 1 ml de tampon A pour constituer une solution mère de 1000 U/ml qui est diluée à 0,22U/ml pour les différents tests. Les solutions enzymatiques sont conservées au congélateur.

Inhibiteurs

Constitués de chacune des solutions mères (1 mg/ml dans le tampon méthanol 1%) des macérés méthanoliques et de substance de référence.

Réactif d'Ellman ou DTNB (acide 5,5"-dithiobis-2-nitrobenzoïque) 3 mM. Une masse de 120 mg de DTNB a été dissoute dans un volume final de 100 ml de tampon C et conservée au réfrigérateur.

Evaluation de l'activité enzymatique

La procédure décrite par Lopez *et al.* (2002), inspirée de la méthode d'Ellman (1961) a été légèrement modifiée à cet effet. Dans une cuve spectrophotométrique, il a été successivement mis 200µL de tampon B, 100µL d'échantillon, 100µl d'enzyme et 500µl de DTNB. La cuve est placée dans le spectrophotomètre et 100µL d'ATCI sont rapidement ajoutés. La cinétique est alors suivie à 405 nm pendant 4 minutes. La variation d'absorbance (ΔDO) mesurée entre une et trois minutes (ΔT) a permis de lire les vitesses d'hydrolyse (V_{hyd} en U/min).

Au préalable, la cinétique du control négatif (sans inhibiteur) a été suivie selon la même procédure en mettant simplement à la place de l'échantillon 100 µl de tampon B méthanol 1%.

Chaque essai est répété 3 fois. Les pourcentages d'inhibition de l'activité enzymatique sont calculés selon la formule suivante :

$$I (\%) = \frac{V (\text{control}) - V (\text{test})}{V (\text{control})} \times 100$$

III.2. Inhibition de la Carboxylestérase (CE)

Principe

L'évaluation de l'activité de la Carboxylestérase est basée sur la mesure de la cinétique relative à la libération du 4-nitrophenol à 414 nm. L'enzyme utilisée provient du foie de porc et l'acétate de 4-nitrophenyl a été utilisé comme substrat.

Enzyme et réactifs

Tampon Tris-HCl 50 Mm, pH8 (voir annexe II).

Solution du substrat (1mM)

Le substrat est le 4-nitrophényl acétate PM = 181,15: la solution de substrat (1mM) est obtenue en dissolvant 18,115mg dans 100ml de tampon Tris.

Solution d'enzyme: 0,027 U/ml.

L'enzyme utilisée est la Carboxylestérase (EC 3.1.1.1). On prépare d'abord une solution mère d'enzyme de 1mg/ml soit 27 U/ml (5 mg d'enzyme dans 5ml de tampon Tris). La solution obtenue est diluée 1000 fois (10 µl de la solution mère dans 9990 µl de tampon Tris) pour obtenir une solution test de l'enzyme égale à 0,027 U/ml.

Inhibiteurs

Des solutions méthanoliques à 100 mg/ml d'extraits ont été préparées puis diluées dans du tampon Tris-HCl/MeOH 1% pour obtenir des solutions de concentration finale 1 mg/ml.

Evaluation de l'activité enzymatique

La méthode de Djeridane *et al.* (2006) a été utilisée avec quelques modifications. L'acide ascorbique (50 µg mL⁻¹) est utilisé comme substance de référence. La solution test comprend 400 µL de la solution de tampon Tris-HCl/MeOH 1% (50 mM, pH 8), 100 µL de la solution de l'extrait (100 µL), 100 µL de la solution de l'enzyme (0,027 U mL⁻¹) et après 3

min d'incubation, 400 µL du substrat (le 4-nitrophényl : 1mM) est additionné. L'absorbance est lue à 414 nm et les résultats sont exprimés de la manière suivante :

$$I\% \text{ (CES)} = (1 - B/A) \times 100$$

A = activité de l'enzyme sans inhibiteur ($\Delta\text{abs. avec enzyme} - \Delta\text{abs. sans enzyme}$)

B = activité de l'enzyme avec inhibiteur ($\Delta\text{abs. avec enzyme} - \Delta\text{abs. sans enzyme}$)

Chaque essai est répété 3 fois.

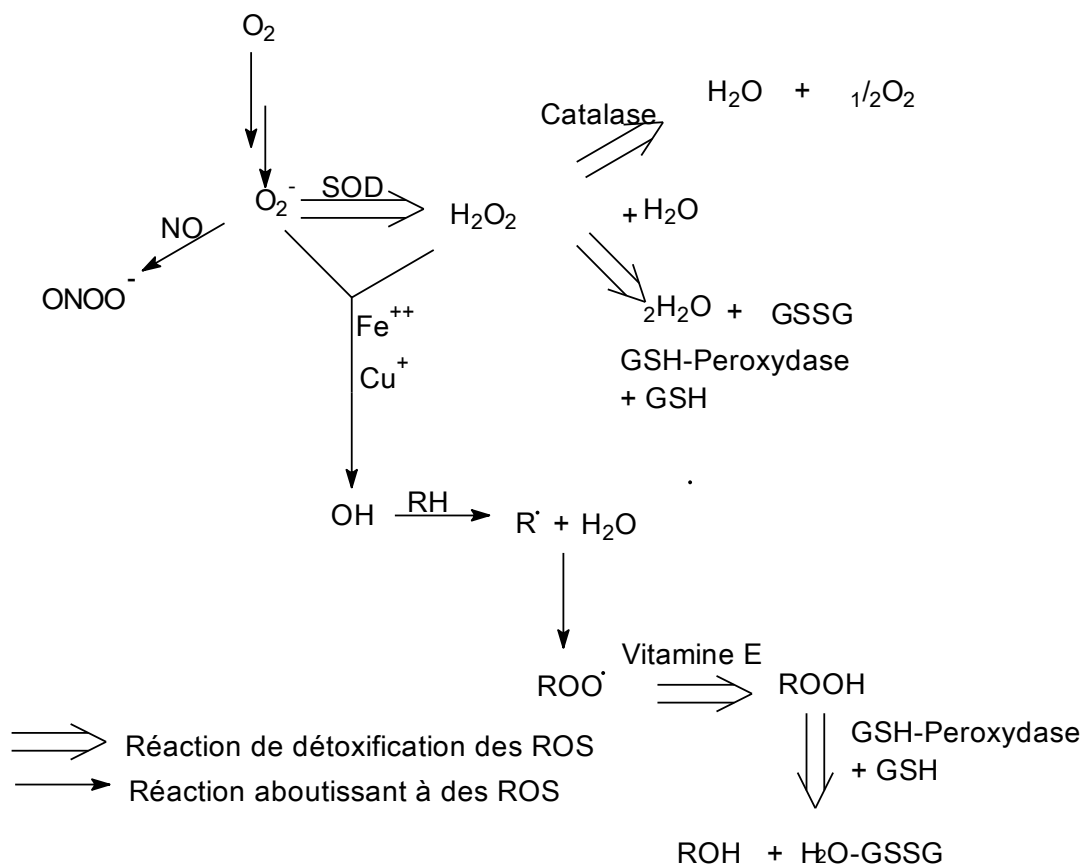


Figure 28: Système de contrôle de la production des radicaux libres (Watson *et al.*, 2000).

III.3. Inhibition de la xanthine oxydase (XO)

Principe

La xanthine oxydase est une voie métabolique de la formation de l'acide urique. Les inhibiteurs de la xanthine oxydase sont utilisés dans le traitement de la goutte due à une accumulation de l'acide urique chez l'Homme. La xanthine oxydase (XO) ou la xanthine déshydrogénase, est une enzyme (n° EC 1.1.3.32) qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et qui de plus catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique. Figure 29.

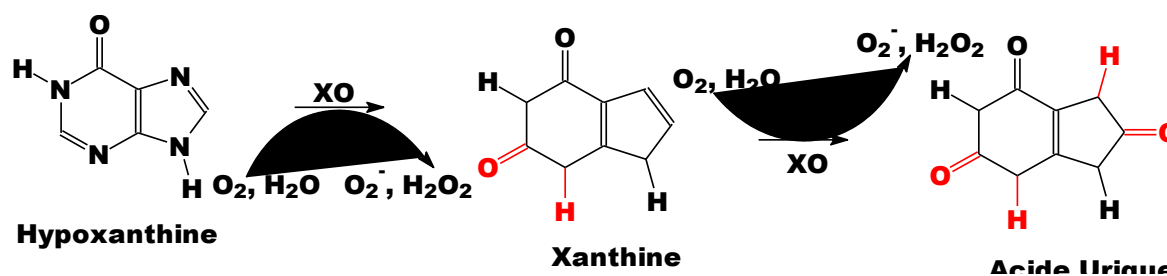
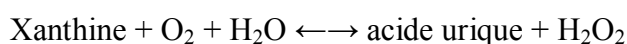
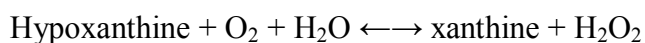


Figure 29: Mécanisme de la production de l'acide urique



Enzyme et réactifs

Tampon phosphate, 0.2 M, pH 9.00 (Voir annexe II).

Solution de substrat: Le substrat est constitué de la solution aqueuse de Xanthine (0,15 mM).

Solution d'enzyme

La solution d'enzyme a été préparée à partir de la xanthine oxydase (0,28 U/mL) dans le tampon phosphate, 0.2 M, pH 9.00.

NB: l'enzyme et le substrat sont utilisés immédiatement après leur préparation.

Inhibiteur

Les extraits sont solubilisés dans le tampon Méthanol 0,1%. L'allopurinol (inhibiteur de référence de la XO) a été utilisé.

Evaluation de l'activité enzymatique

La méthode de Ferraz Filha *et al.* (2006) a été utilisée avec quelques modifications. Les extraits ou les fractions sont directement solubilisés dans le tampon phosphate-MeOH (1%) et l'activité inhibitrice de la xanthine oxydase a été réalisée à une concentration finale de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. L'activité proprement dite a consisté en un mélange de $100 \mu\text{L}$ de la solution d'extrait, de $300 \mu\text{L}$ de tampon phosphate (pH 7,49) et de $100 \mu\text{L}$ de la solution d'enzyme ($0,28 \text{ U mL}^{-1}$ dans le tampon phosphate). Le mélange a été ensuite incubé à la température ambiante pendant 2 min. la réaction a été initiée par ajout de $500 \mu\text{L}$ de la solution de substrat (0,15 mM dans le tampon phosphate) et la cinétique de la réaction est suivie pendant 2 min à 295 nm.

L'activité inhibitrice, exprimée en pourcentage d'inhibition de la xanthine oxydase est calculée de la manière suivante :

$$\text{I\%} = (1 - \text{B/A}) \times 100$$

A = activité de l'enzyme sans inhibiteur (Δ abs. avec enzyme – Δ abs. sans enzyme)

B = activité de l'enzyme avec inhibiteur (Δ abs. avec enzyme – Δ abs. sans enzyme)

Trois essais ont été réalisés pour chaque échantillon.

III.4. Inhibition de Glutathion-S-transférase (GST)

Principe

La procédure décrite par Habdous *et al.* (2002), inspiré de la méthode de Habig *et al.* (1974) a été légèrement modifiée à cet effet. (Figure 30). Au stade 1 il y a ionisation du glutathion réduit en proton (H^+) et en un anion thiolate $[GS]^-$. L'attaque nucléophile de l'anion thiolate en C1 du noyau aromatique; formation d'un complexe Mesenheimer 1-(S-glutathionyl-2,4-dinitrobenzène) (GS-DNB) observé à 340nm (Voie 1). L'électrophile peut être inactivée lors de la conjugaison au GSH et cet ensemble va inhiber l'action de l'enzyme (Voie 2). Ou l'électrophile peut s'accrocher à l'enzyme et empêcher son action (Voie 3).

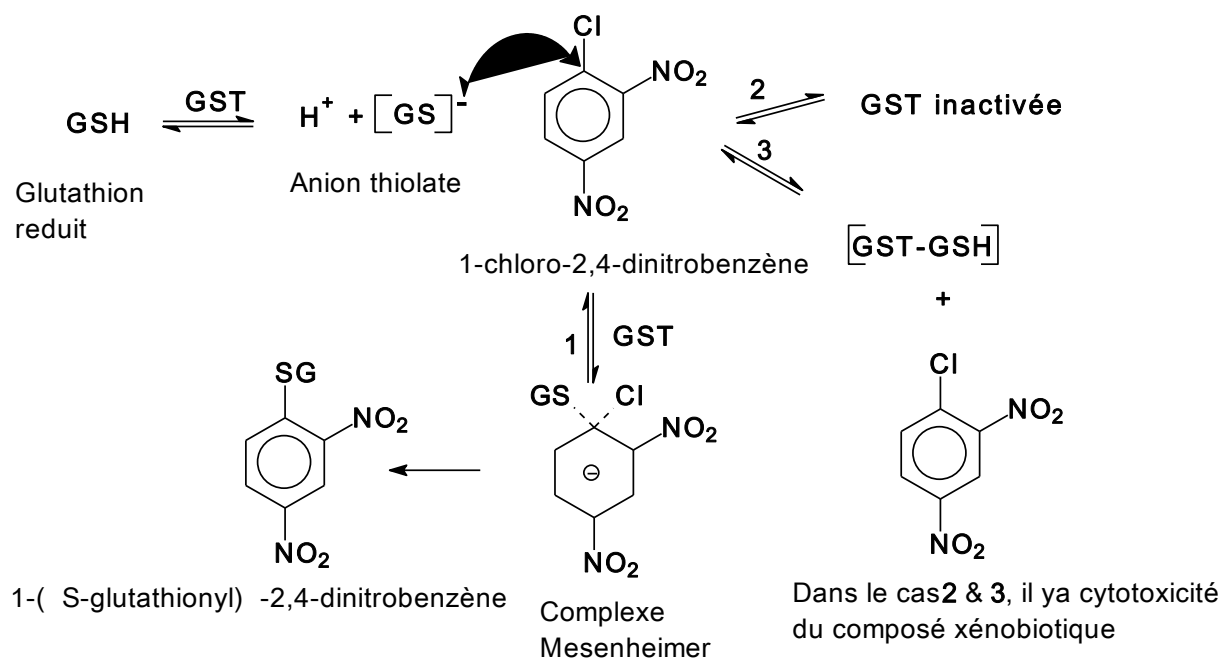


Figure 30: Réaction de catalyse de la GST (Habdous *et al.*, 2002; Ibarra *et al.*, 2003)

Enzymes et réactifs

La glutathion-S-transférase (GST) (1mg soit 13.3U/mg) a été dissoute dans 13.3ml de tampon pour constituer une solution mère de 1U/ml; diluée pour effectuer les différents tests.

Le substrat utilisé est le glutathion réduit (GSH) 5mM. Il a été préparé en dissolvant 30.733 mg dans 100 ml du tampon: il est conservé au congélateur.

20.225mg de 1-Chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) sont dissous dans 100ml du tampon pour obtenir une concentration de 1mM qui a été conservé au réfrigérateur.

Tampon Phosphate de Potassium 100mM pH6.432- 6.483 : 17.42g de phosphate de potassium dibasique (K_2HPO_4) ont été dissous dans 100ml d'eau distillée et 13.609g de phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4), dissous également dans 100ml d'eau distillée. Ensuite on a prélevé 33ml de K_2HPO_4 et 67ml de KH_2PO_4 . Le mélange de ces deux volumes est ajusté minutieusement avec de l'eau distillée à 1L. L'ajustement du pH6,432-6,483 se fait soit avec le K_2HPO_4 ou le KH_2PO_4 .

Test sur les échantillons de plantes

100 μ l de chacune des solutions initiales (200mg/ml dans méthanol), ont été prélevées et évaporisés à sec pour obtenir 20mg. A chaque extrait est additionné 1ml de la solution tampon/tween 1% qui donne une concentration de 20mg /ml dans le tween 1%. Ces dernières solutions sont diluées au 1/20 soit 50 μ l ajoutée à 950 μ l du tampon, donnant une concentration de 1mg/ml dans le tween 0.05%. Dans une cuve spectrophotométrique, il a été successivement mis 200 μ l du tampon, 100 μ l de l'extrait et 100 μ l de l'enzyme. La cuve est placée dans le spectrophotomètre et 100 μ l de GSH (5mM) et 500 μ l de CDNB (1mM) sont additionnés rapidement après 3 minutes d'incubation.

La cinétique est alors suivie à 340 nm pendant 5 minutes. Les pourcentages d'inhibition de l'activité enzymatique sont calculés selon la formule suivant :

$$I\% \text{ (GST)} = (1 - B/A) \times 100$$

A = activité de l'enzyme sans inhibiteur (Δ abs. avec enzyme – Δ abs. sans enzyme)

B = activité de l'enzyme avec inhibiteur (Δ abs. avec enzyme – Δ abs. sans enzyme)

Trois essais ont été réalisés pour chaque échantillon.

PARTIE III: RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1: Etudes phytochimiques

I. Résultats

I.1. Histochimie

L'étude histochimique permet d'identifier les localisations tissulaires des composés (Ciulei, 1982). A travers cette étude nous avons d'abord pu localiser les tissus constitutifs des feuilles des différentes plantes grâce à la coloration au carmino-vert (photo 4). Après la localisation des différents tissus, l'utilisation des réactifs spécifiques a permis de caractériser certaines classes de composés polyphénoliques.

Les alcaloïdes ont été détectés dans la coupe de *L. camara* par la coloration au lugol (photo 5: A). Elles sont détectées dans le xylème et le phloème. La coloration jaune (NaOH) dans le phloème et le xylème indique la présence des flavonoïdes (photo 6 : e, f, g, & h).

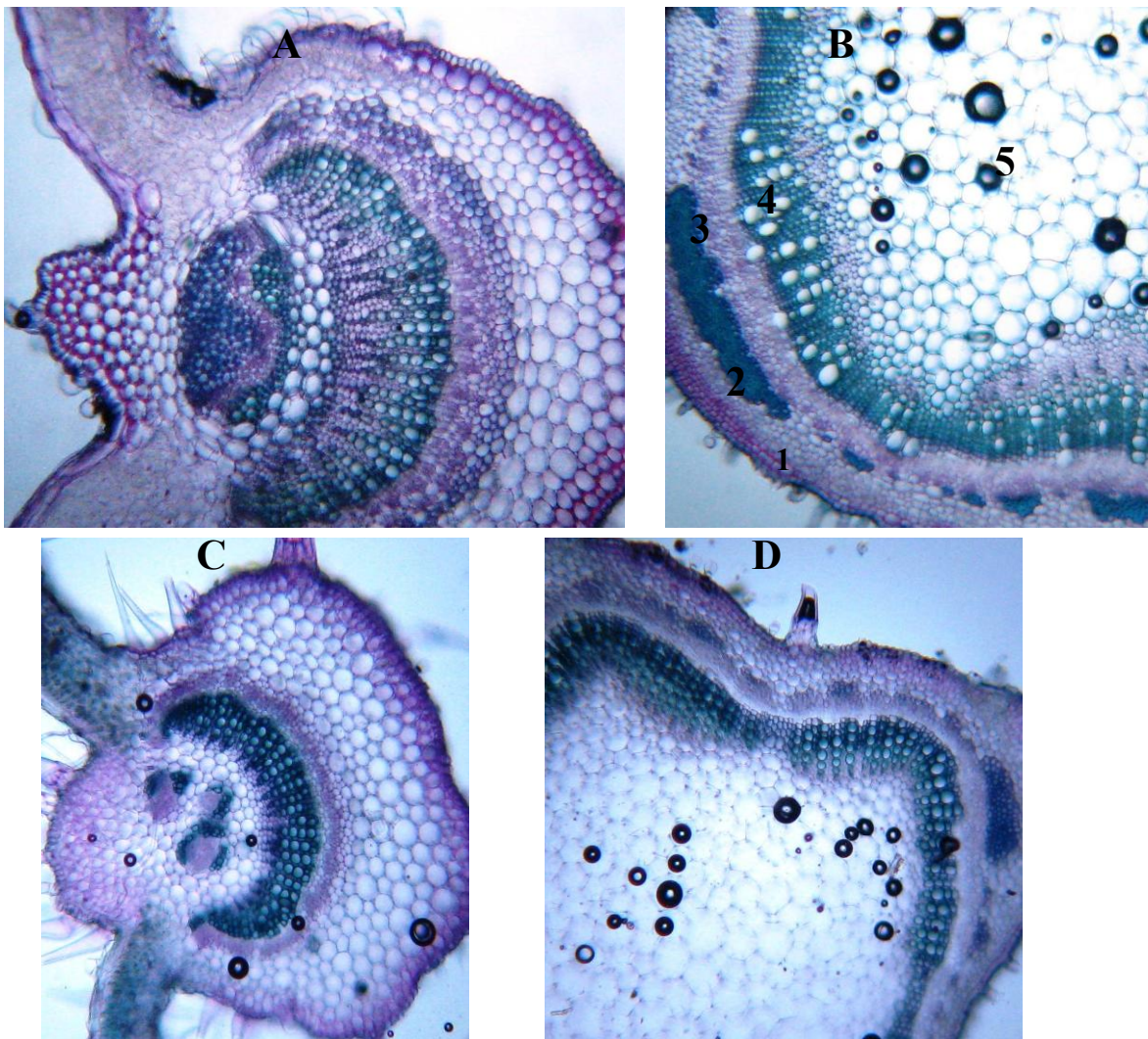
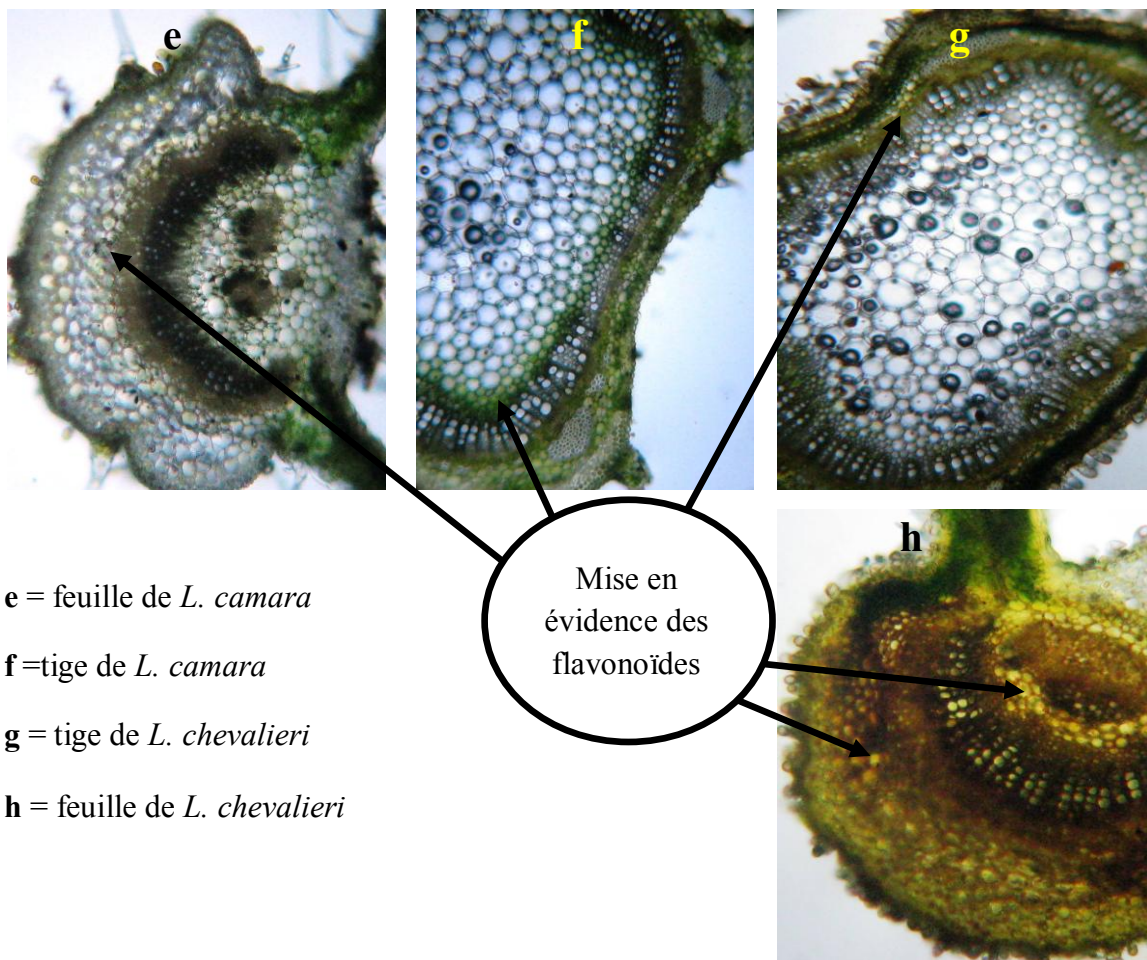


Photo 4: Coupes histochimiques de la feuille (A & C) et de la tige (B & D) : coloration au carmino-vert

1 : Collenchyme ; 2 : Parenchyme cortical ; 3 : Phloème ; 4 : Xylème ; 5 : Parenchyme médullaire



Photo 5: Identification des alcaloïdes (lugol) dans la tige de *L. camara*



e = feuille de *L. camara*
 f = tige de *L. camara*
 g = tige de *L. chevalieri*
 h = feuille de *L. chevalieri*

Photo 6: Identification des flavonoïdes, *L. camara* (e & f) et *L. chevalieri* (g & h)

La présence des précipités noirâtres avec le FeCl_3 1%, sur les coupes réalisées au niveau de la feuille et de la tige (photo 7 I et J) indique la présence des polyphénols et/ou des tanins dans le parenchyme cortical et parenchyme médullaire.

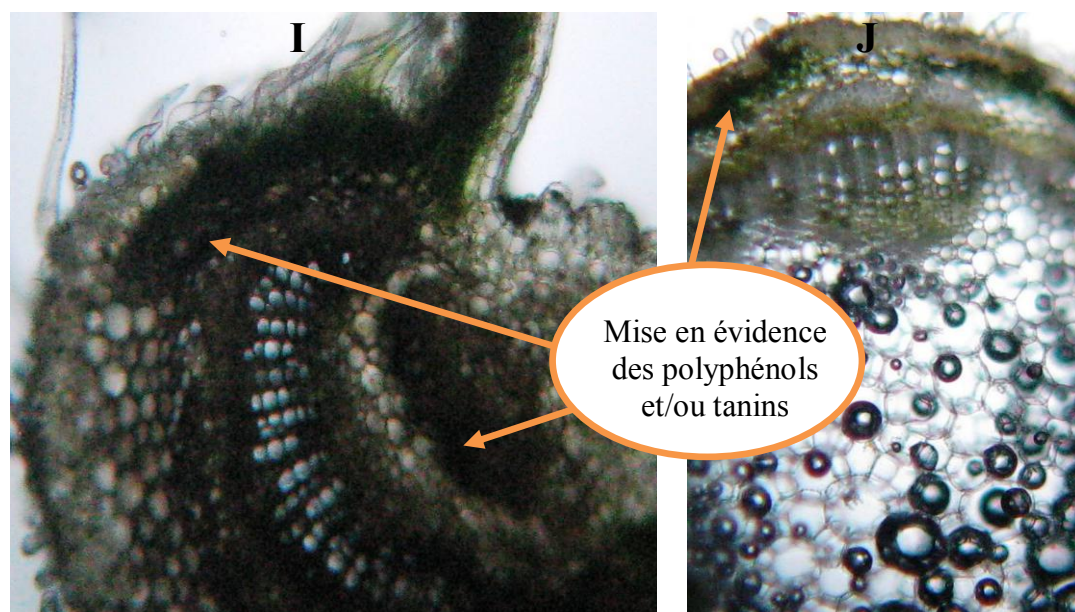


Photo 7: Identification des tanins/ou polyphénols dans le *L. chevalieri* (I : feuilles, J : tige)

I.2. Rendement d'extraction

Le tableau 4 indique les rendements d'extraction obtenus pour chaque espèce végétale. Le rendement d'extraction de *L. camara* est de 21,35 % contre 22,93 % pour *L. chevalieri*. Les deux espèces végétales ont présenté à peu près le même rendement d'extraction avec une légère hausse pour *L. chevalieri* qui est de 22,93%.

Tableau 4: Tableau des rendements d'extraction

Extraits	<i>Lantana camara</i>	<i>Lippia chevalieri</i>
Rendement (%)	21,35	22,93

I.3. Criblage des différents groupes chimiques

I.3.1. Criblages phytochimiques

L'application de la méthode de Ciulei (1982) sur les extraits a permis d'obtenir les résultats indiqués dans le tableau 5.

Les tests en tube ont permis de mettre en évidence la présence des tanins, des saponines et des stérols/triterpènes dans tous les extraits et les flavonoïdes seulement dans *L. chevalieri*. Nous notons des tests négatifs pour les anthraquinones, les alcaloïdes et les coumarines dans les extraits.

Tableau 5:Caractérisation des différents groupes chimiques des plantes

Espèces	<i>L. camara</i>	<i>L. chevalieri</i>
Type de test		
Aglycones des flavonoïdes	–	+
Anthraquinones	–	–
Alcaloïdes	–	–
Coumarines	–	–
Tanins	+	+
Saponosides	+	+
Stérols et triterpènes	+	+

I.3.2. Chromatographie sur Couche Mince (CCM) des flavonoïdes et des acides phénols des macérés méthanoliques des espèces étudiées.

La chromatographie sur couche mince (CCM) joue un rôle très important dans l'investigation phytochimique d'un extrait brut (Wolfender et Hostettmann, 1996). Cette technique fut utilisée pour analyser nos macérés méthanoliques afin d'avoir des indications sur la nature des constituants que l'on peut rencontrer chez ces espèces pour mieux apprécier les résultats précédents. Pour cette étude deux (2) composés de références ont été utilisés en vue de l'identification de composés similaires dans nos extraits.

Les photos 8 (A) et (B) représentent le profil des flavonoïdes et des acides phénols des macérés méthanoliques des extraits de plantes séparé avec le système 1 (n-hexane/acétate d'éthyle/acide acétique, 6:6:1). L'acide caféique et le kaempférol ont été utilisés dans ce système pour l'identification des composés identiques dans nos extraits. La photo (B) montre une référence frontale ($R_f = 0,65$) identique de l'acide caféique (AC) et des fractions acétate d'éthyle de *L. camara* (1) et de *L. chevalieri* (2). Les deux extraits contiennent donc de l'acide caféique.

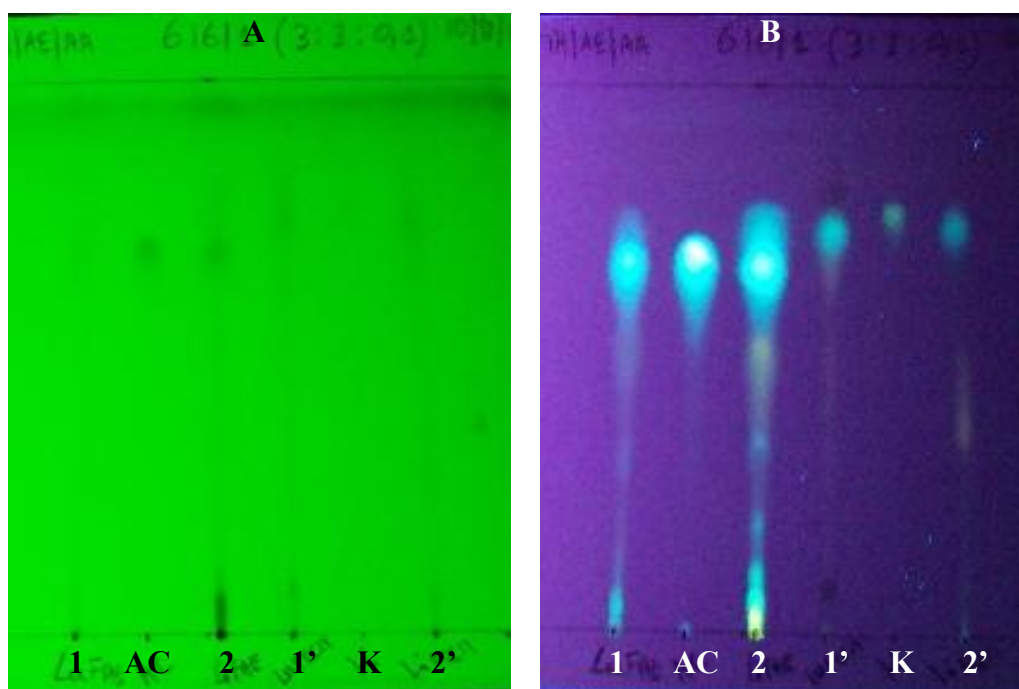


Photo 8: Chromatographie des flavonoïdes et des acides phénols des extraits méthanoliques des plantes de l'étude

Système 1: n-hexane/acétate d'éthyle/acide acétique (3:3:0,5). (A) = UV₂₅₄, (B) = réactif de NEU + PEG + UV₃₆₅. *L. camara*: **1** = Fraction acétate d'éthyle et **1'** = fraction dichlorométhane, *L. chevalieri*: **2** = Fraction acétate d'éthyle et **2'** = fraction dichlorométhane, **AC** = acide caféique et **K** = kaempférol.

Nous observons également dans la photo 8, deux composés identiques dans les extraits (fractions dichlorométhane) des deux plantes non identifiés (Rf = 0,68).

Les photos 9 représentent les profils des composés phénoliques des deux macérés méthanoliques élués dans le système 2 (acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique glacial/eau, 10:1,1:1,1:2). Les chromatogrammes (Photo D) montre un spot (Rf = 0,575) qui semble être identiques à celui de la rutine dans l'extrait de *L. chevalieri*. La photo (C), observée avant pulvérisation illustre bien la correspondance.

A l'issue de cette étude comparative, on note la présence de l'acide caféique dans les extraits de deux plantes et la rutine dans celui de *L. chevalieri*. Par ailleurs, il existe des composés phénoliques non identifiés dans chaque système en fonction de nos composés de références.

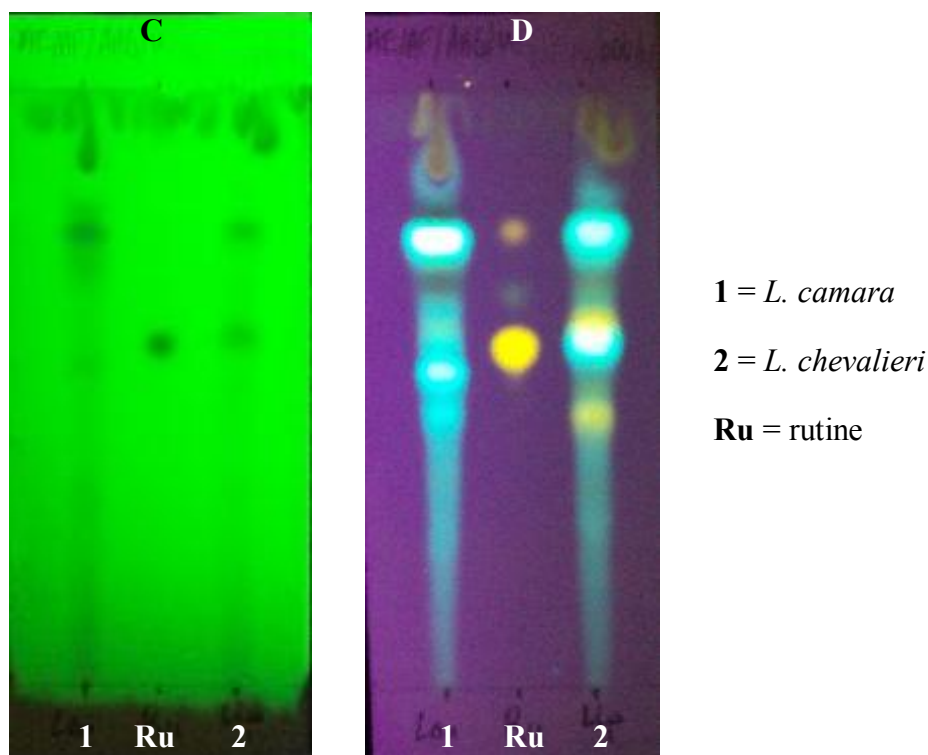


Photo 9: Chromatographie des flavonoïdes et des acides phénols des extraits méthanoliques de plantes

Système 2: acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique glacial/eau (4 :0,44 :0,44 :0,8). (C) = UV₂₅₄ et (D) = réactif de NEU + PEG + UV₃₆₅.

I.4. Dosage des composés polyphénoliques

Les résultats des dosages sont consignés dans le tableau 6. Les dosages ont été effectués contre des courbes étalons d'acide gallique, d'acide tannique et de quercétine (Annexe I).

Les teneurs en phénoliques totaux ont varié de $10,03 \pm 0,75$ à $17,88 \pm 0,90$ mg EAG/100 mg extrait. La meilleure teneur est obtenue par *L. chevalieri* avec $17,88 \pm 0,90$ mg EAG/100 mg extrait. En ce qui concerne les flavonoïdes totaux, les teneurs ont varié de $4,91 \pm 0,47$ à $8,28 \pm 0,77$ mg EQ/ 100 mg extrait. La plus forte teneur est obtenue par *L. camara* comparativement à celle de *L. chevalieri*. De même les flavonols totaux donne ont varié de $0,18 \pm 0,01$ à $2,46 \pm 0,01$ mg EQ/ 100 mg extrait. La meilleure valeur a été obtenue par l'extrait de *L. chevalieri*. Nous notons un fort pourcentage des flavonols (50,10 %) dans les flavonoïdes obtenus par l'extrait de *L. chevalieri*. Enfin les teneurs en tanins ont varié de $0,48 \pm 0,09$ à $7,62 \pm 0,37$ mg EAT/100 mg extrait. La forte teneur en tanins est obtenue par *L. chevalieri*. La teneur des tanins représentent $42,61 \pm 0,41$ % dans la part des teneurs en

phénoliques totaux. De façon générale les deux espèces ont présenté des faibles teneurs en composés polyphénoliques. Les composés phénoliques dosés dans l'extrait de *L. camara* sont presque des flavonoïdes. Leurs pourcentages représentent 82,55 % des polyphénols.

Tableau 6: Résultats du dosage des composés polyphénoliques de 2 Verbenaceae

Espèces	Teneur en composés polyphénoliques (mg Eq/100 mg extrait)			
	Phénoliques totaux	Flavonoïdes totaux	Flavonols totaux	Tanins
<i>L. camara</i>	10,03 ± 0,75	8,28 ± 0,77	0,18 ± 0,01	0,48 ± 0,09
<i>L. chevalieri</i>	17,88 ± 0,90	4,91 ± 0,47	2,46 ± 0,01	7,62 ± 0,37

(Moyenne ± déviation standard de 3 essais)

1.5. Quantification des ions (Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺ et K⁺)

Les teneurs des quatre ions dosés ont varié de 0,41 ± 0,02 mmol/L (pour le calcium) à 4,81 ± 0,10 mmol/L (pour le potassium) (figure 31). Le potassium est l'ion majoritaire avec 4,81 ± 0,10 mmol/L pour *L. chevalieri* et 3,1 ± 0,39 mmol/L pour *L. camara*. Le magnésium vient en deuxième position avec 1,765 ± 0,03 mmol/L pour *L. chevalieri* et 0,69 ± 0,03 mmol/L pour *L. camara*. Ces résultats montrent que les deux espèces sont pauvres en calcium et en sodium.

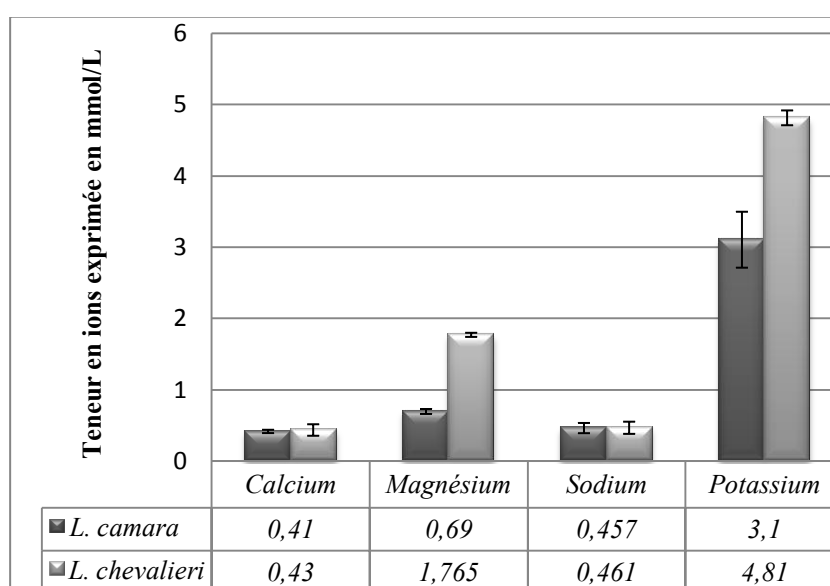


Figure 31: Teneur des quatre ions dosés

1.6. Identification des acides phénols et des flavonoïdes par la HPLC-DAD

La HPLC couplée au détecteur UV à barrette diodes (DAD) exploite les interactions entre les solutés et les deux phases (mobile et stationnaire) pour séparer les solutés en fonction de leurs affinités et ainsi les identifier et/ou les doser (Randimby, 2002; Panaira, 2006;

Yakhlef, 2010). Elle met en œuvre, selon la nature de la phase stationnaire, aussi bien des phénomènes de partage, que des phénomènes d'adsorptions, d'échanges d'ions ou d'exclusion. La méthode de séparation qu'elle utilise fait sensiblement appel aux mêmes éléments de base que ceux employés pour la chromatographie classique sur colonne, soit un ou plusieurs solvants et une colonne remplie avec une phase stationnaire. Ainsi 12 composés polyphénoliques ont été recherchés dans deux types d'extraits (fraction acétate d'éthyle et la fraction aqueuse) en fonction du temps de rétention et de la longueur d'onde du spectre UV. En somme 27 composés polyphénoliques ont été mis en évidence dans les extraits des deux plantes. Soit 20 composés dans l'extrait de *L. chevalieri* et 07 dans celui de *L. camara* (Tableau 7). L'étude a permis de mettre en évidence 11 dérivés d'acide cinnamique, 8 flavone, 2 dérivés d'acide rosmarinique, 3 acides phénols, 2 dérivés de la lutéoline et 1 dérivée de la saponarine.

Les chromatogrammes de la fraction acétate d'éthyle (12,5% et 50%) et de la fraction aqueuse (12,5%) de nos deux plantes à 260 et 340 nm sont représentés par les figures 32 et 33.

En tenant compte des bandes d'apparition des différents chromatogrammes, on peut penser que les 11 flavonoïdes détectés dans nos deux fractions sont essentiellement des flavones. En effet les spectres UV-visibles des flavonoïdes est caractérisé par la longueur d'onde maximale d'absorbance des cycles B (bande I) et A (bande II) (Kiendrebéogo, 2005; Rice-Evans *et al.*, 1996). Flavones et flavonols sont caractérisés par une bande I dans la région 320-385 nm et une bande II dans l'intervalle 250-285 nm; la bande I des flavones étant toujours plus courte de 20 à 30 nm par rapport à celle des flavonols équivalents.

Les flavanones et les dihydroflavonols par contre ont leur maximum (bande II) entre 270-285 nm et seulement un épaulement pour la bande I. Les anthocyanes sont caractérisés par une bande I entre 450-560 nm et une bande II dans l'intervalle 240-280 nm. L'augmentation du nombre de groupements hydroxyles induit un déplacement des λ_{\max} vers la droite (effet bathochrome); glycosylations et O-méthylations induisant un effet hypsochrome (déplacement des λ_{\max} vers la gauche) (Kiendrebéogo, 2005). Le spectre UV-visible des acides phénols est elle comprise entre 210-273 nm. Cela nous permet de distinguer 16 acides phénols.

Tableau 7: Longueur d'onde caractéristique des acides phénols et flavonoïdes détectés

Nature et type d'extrait, pourcentage	Polyphénols	Temps de rétention (min)	λ_{\max} (nm) Bande II	λ_{\max} (nm) Bande I
<i>L. camara</i>, fraction acétate d'éthyle, 12,5%	acide phénols	35,456	248sh, 284sh	330
	flavone	46,449	274	329
<i>L. camara</i>, fraction aqueuse, 12,5%	acide phénols	35,002	247sh, 285sh	327
		36,564	247sh, 287sh	325
	flavone	39,504	275	330
		46,07	275	322, 353sh
		46,537	275	324, 351sh
<i>L. chevalieri</i>, fraction acétate d'éthyle, 50%	dérivée d'acide cinnamique	34,353	286sh	328
		34,734	289sh	326
	dérivée lutéoline	35,306	288sh	328
		35,585	288sh	322
		37,05	286sh	327
		37,8	284sh	326
		38,665	284sh	327
		42,625	285sh	328
		51,234	273sh	349
		51,894	254sh, 272	347
flavone	58,318	251, 274	341	
	60,416 *	238sh, 277sh	328	
	61,266 *	239sh, 276	333	
	29,073*	272	334	
	33,902	248sh, 286sh	325	
<i>L. chevalieri</i>, fraction aqueuse, 12,5%	Dérivée acide cinnamique	36,637	245sh, 284	327
		37,326	244sh, 284sh	328
	Dérivée acide rosmarinique	34,855	249sh, 286sh	324
	35,097	249sh, 284sh	322	
	Dérivée saponarine	28,49	271	333

* : soupçon de flavone, sh : épaulement

Les tests en tube ont été négatifs pour les coumarines, et ce pour les extraits de deux plantes. De même, la HPLC qui est une étude de résolution supérieure ne nous a pas permis de mettre en évidence les coumarines.

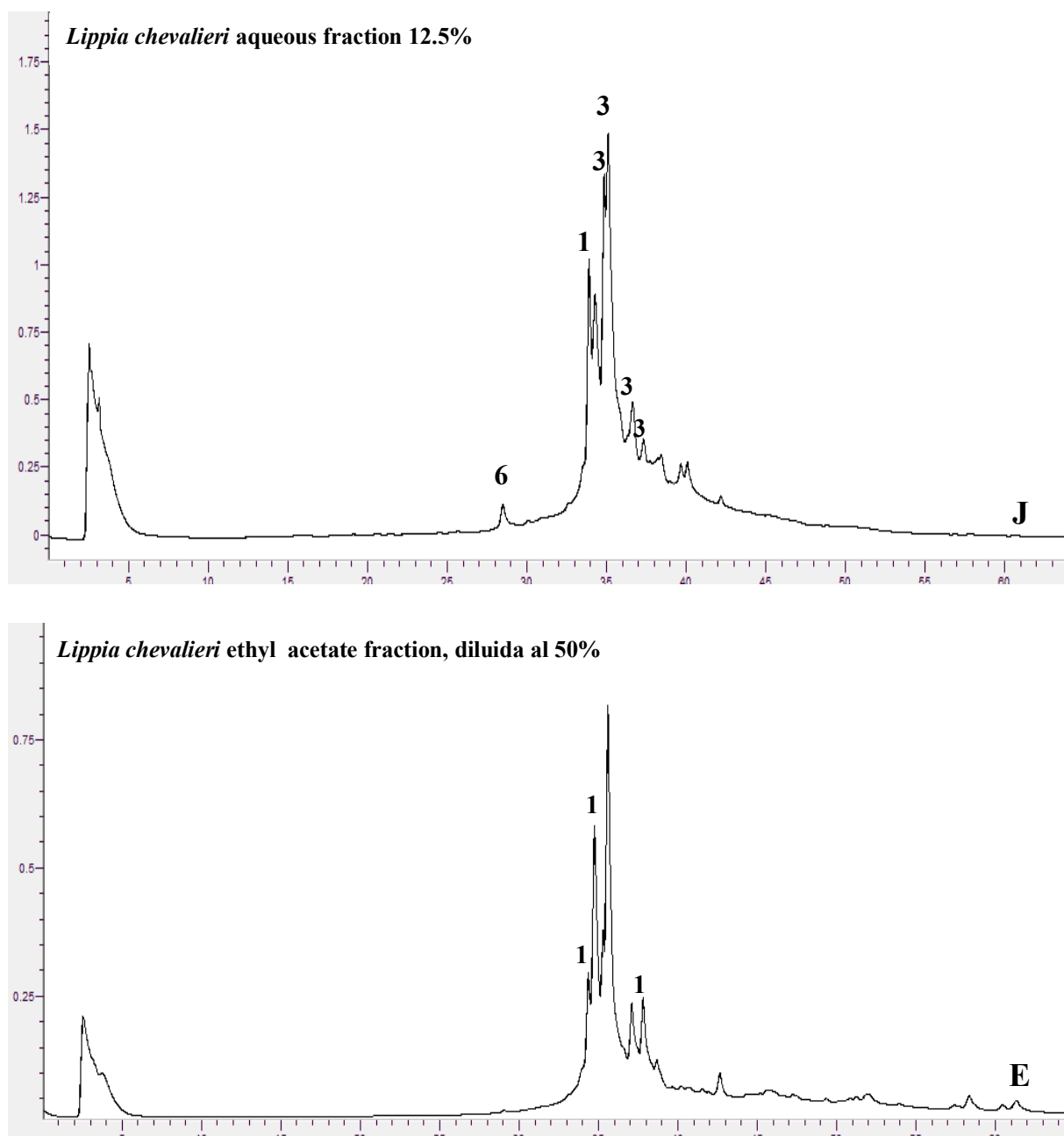
I.6.1. Chromatogrammes correspondant à *L. chevalieri*.

Figure 32: (E) = fraction d'acétate d'éthyle (50%); (J) = fraction aqueuse (12,5); (1)=dérivé d'acide cinnamique; (3)=dérivé d'acide rosmarinique; (6)=dérivé saponarine

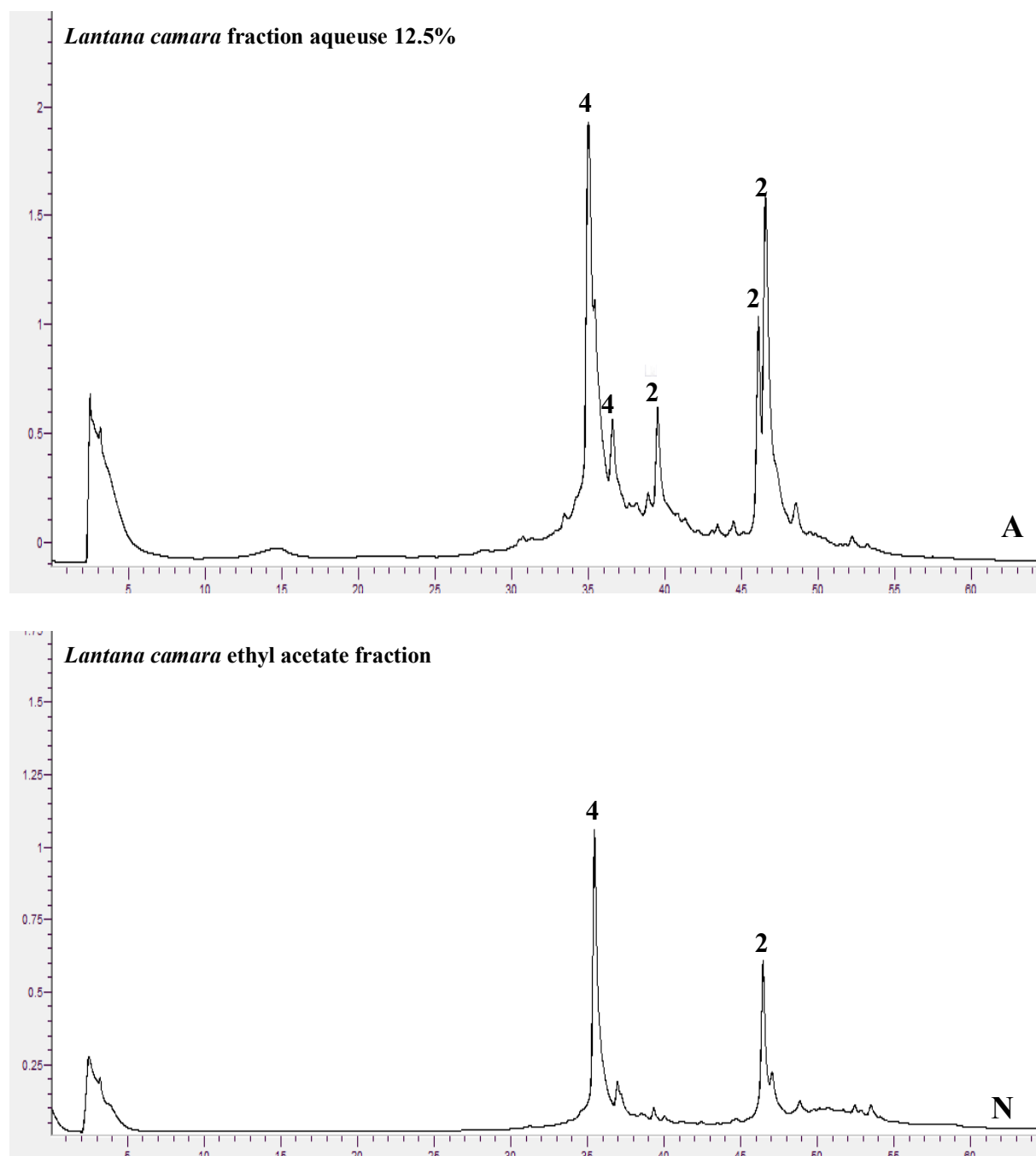
I.6.2. Chromatogrammes correspondants à *L. camara*.

Figure 33: (A) = fraction aqueuse (12,5%); (N) = fraction d'acétate d'éthyle (12,5%); (2)=flavone; (4)=acide phénol

NB : les dérivés de lutéoline portant le numéro (5) n'est pas placé

II. Discussion

Les tests classiques de caractérisation phytochimique en tube tels que décrit par Ciulei (1982) ont permis de mettre en évidence un certain nombre de composés polyphénoliques dans les deux espèces de plantes. Ainsi les tanins, les stérols/triterpènes et les saponosides ont été détectés dans les extraits des deux plantes. Les flavonoïdes aglycones uniquement dans l'extrait de *L. chevalieri*, Les tests en tube n'ont pas révélé la présence des alcaloïdes avec le réactif de Dragendorff. Par contre on note leur présence (dans *L. camara*) en histochimie au niveau de la coupe de la tige après ajout du lugol. Aussi, il a été rapporté par Nacoulma (1996) de la présence des alcaloïdes dans *L. chevalieri*. Egalement les tests classiques de caractérisation aux anthraquinones et aux coumarines ont été négatifs dans nos macérations méthanolique.

Les composés polyphénoliques ont par la suite été localisés par histochimie dans les tissus des feuilles et tiges des deux espèces. Ainsi les flavonoïdes ont été détectés dans les tissus des deux plantes. Les tanins/polyphénols dans les feuilles et tiges de *L. chevalieri* et les alcaloïdes dans les tiges de *L. camara*. La présence des flavonoïdes et des tanins dans les deux plantes, et surtout au niveau du parenchyme cortical leurs protègent contre les rayonnements ultra-violets (Nacoulma, 1996). Le caractère hydrolysable ou non hydrolysable des tanins n'a pas été établi, toutefois l'absence d'acide gallique dans nos extraits nous permet de dire que ce sont essentiellement des tanins catéchiques. Particulièrement Nacoulma (1996) avait indiqué que *L. camara* contient des tanins catéchiques.

La chromatographie sur couche mince a permis de mettre en évidence la présence des flavonoïdes (rutine dans *L. chevalieri*) et des acides phénols (acide caféique dans les deux espèces). Par ailleurs on a noté la présence de plusieurs flavonoïdes et acide phénols non identifiés dans nos extraits à partir des substances de références utilisées. Notons que la quercétine a fait d'investigation dans cette activité. Cependant on n'a pas pu le mettre en évidence. Mais nous ne pouvons pas affirmer que les extraits de nos deux plantes n'en contiennent pas. En effet des études antérieures ont montré que l'extrait acétonique des feuilles de *L. camara* contient le 3-méthoxy-, 3,7-diméthoxy- et le 3,7,4'-triméthoxyquercétine (Ghisalberti, 2000). Ainsi on s'attendait à ce que l'hydrolyse de nos extraits méthanoliques donne la quercétine. Ce qui n'a pas été le cas. Ayant tous utilisé les parties aériennes de la plante, cette anomalie ne pourrait se justifier que par la différence des solvants d'extractions.

La HPLC-DAD ne nous a pas permis d'identifier des composés précis, mais de caractériser des noyaux de composés donnés. Ainsi nous avons mis en évidence des dérivés : d'acide cinnamique, d'acide rosmarinique, d'acides phénols, de saponarine, de lutéoline et de flavone. Le profil des polyphénols de *Lantana camara* est différent de celui de *Lippia chevalieri*, ceci soutient la tendance spécifique des marqueurs chimiques de chaque espèce comme précédemment rapportés par plusieurs auteurs (Abdala et Seeligmann, 1995; Almaraz-Abarca *et al.*, 2009). Au total 27 composés ont été détectés dont 11 flavonoïdes qui seraient essentiellement des flavones selon les 2 régions d'absorbance (bande I et bande II). A notre connaissance, les flavonoïdes ayant faits l'objet d'isolement dans *L. camara* sont : le 3-méthoxy-, 3,7-diméthoxy- et le 3,7,4''-triméthoxyquercétine, l'hispiduline, le glycoside camaraside (flavone) et le pectolarigénin 7-O- β -D-glucoside (Verma *et al.*, 1997; Ghisalberti, 2000). Les seules études les plus élucidées sur les deux espèces sont sur les huiles essentielles. Dans la présente activité, la quercétine a été utilisé comme un composé de référence et s'est avéré absent. Dans l'analyse de nos extraits par la méthode HPLC-DAD, la rutine et l'acide caféique n'ont pas été utilisés comme substances de références. Par conséquent, nous n'avons pas pu les mettre dans cette activité. Mais vu que nos deux extraits sont riches en acides phénols et en flavonoïdes, nous pouvons supposer de la présence de ces composés identifier en CCM, ne serait-ce qu'en dose infirme. L'investigation sur l'acide *p*-coumarique a été négative. Il en de même des acides férulique, gallique, syringique et *p*-hydroxybenzoïde. Cependant les acides cinnamiques mise en évidence proviennent de l'acide shikimique par biosynthèse et conduisent à la formation de phénols simples (catéchol, guaiacol, phloroglucinol...), des acides phénols (acides *p*-coumariques, caféique, férulique, sinapique...), des coumarines et des lignanes (Bruneton, 1993). De ce fait, nous ne pouvons pas d'embler exclure la présence des coumarines dans nos extraits.

D'autres groupes de chercheurs ont montré que les groupements hydroxyles et méthoxyles jouaient un rôle important dans l'analyse des composés par la HPLC. Cette tendance s'observe aussi bien en CCM (Greenham *et al.*, 2003; Tsimogiannis *et al.*, 2007). Ils ont soutenu que les flavones tels que scutellarein (5,6,7,4''-Tétrahydroxyflavone) 7 et 4''-methyl esters, qui sont similaires de l'apigénine et de leurs homologues peuvent être distingués par leurs références frontales et par leurs spectres UV, mais ne sont pas séparables en HPLC (Greenham *et al.*, 2003; Tsimogiannis *et al.*, 2007). Selon Greenham *et al.* (2003), les flavones et les dérivés lutéolines comporteraient des groupements méthoxyles, vu que ces composés présentent les plus grand temps de rétention. En effet le nombre de substitution

hydroxyle augmente non seulement la polarité du composé (molécule) mais aussi diminue son temps de rétention. Par contre une substitution importante en méthoxyles rend le composé lipophile et allonge son temps de rétention (Greenham *et al.*, 2003). Dans notre étude les temps de rétention obtenus par les flavones et les dérivés lutéolines ont été de loin les plus longs avec un maximum de 61,266 minutes. Nous notons qu'un seul pic correspondant au flavone issu de *Lippia chevalieri* a présenté le deuxième temps de rétention le plus faible de 29,093 minutes. Nous pouvons donc supposer que ce composé au lieu d'être multi-méthoxylé comme les précédents et au contraire multi-hydroxylé. Parmi les flavones multi-hydroxylés que nous avons rencontré dans la littérature et en rapport avec notre étude, on peut citer la lutéoline (5,7,3'',4''-Tétrahydroxyflavone), tricetine (5,7,3'',4'',5''-Pentahydroxyflavone), 6-hydroxylutéoline (5,6,7,3'',4''-Pentahydroxyflavone), 6,8-dihydroxyapigénine (5,6,7,8,4''-Pentahydroxyflavone) et l-hypolaetine (5,7,8,3'',4''-Pentahydroxyflavone). Ces composés susnommés sont générales très difficiles à séparer en HPLC et chacun d'eux pourrait être le flavone ayant présenté le temps de rétention le plus faible. Surtout que les longueurs d'ondes maximales de ces composés sont de 266 nm (Bande II) et 334 nm (Bande I), parallèlement au flavone incriminés dans notre étude qui est de 272 nm (Bande II) et 334 nm (Bande I).

La quantification des ions ont montré que les ions potassiques sont majoritaires dans les extraits de ces deux plantes. Les teneurs tournent autour de la valeur normale autorisée dans le sérum ou le plasma sanguin (2,25 à 2,65 mmol/L). Sur le plan ionique et tenant compte de nos résultats sur ces deux plantes ne seraient pas dangereuses à l'utilisation traditionnelle. En effet le sodium étant parmi ces ions, l'ion déconseillé aux hypertendus a montré une faible teneur. Les ions sodium sont en moyennes 300 fois inférieurs à la teneur normale dans le sang. Nous n'avons pas trouvé des travaux sur le dosage des teneurs des ions de façon spécifique. Les études ont surtout porté sur leurs implications dans des activités données. D'une manière générale, ils sont des cofacteurs enzymatiques et participent de manière indirecte à la constitution des signaux hormonaux (Buyck, 2008). La littérature indique que la carence en magnésium entraîne des syndromes d'hyperirritabilité neuromusculaire, spasmophilie et état épileptique, les accidents cardiovasculaires et thrombotiques (Nacoulma, 1996). Tandis que le potassium est indiqué dans l'obésité par rétention d'eau et les rhumatismes (Nacoulma, 1996).

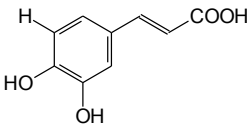
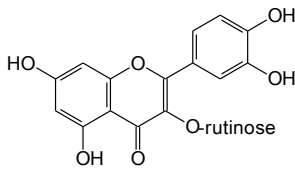
Les propriétés des métabolites secondaires sont largement connues et sont très importantes pour la vie de chaque espèce de plantes. En effet ces composés sont impliqués dans la protection des plantes face au rayonnement solaire (contre les radiations UV), la

protection contre les insectes et les herbivores. Les différents métabolites rencontrés dans les espèces étudiées pourraient expliquer leur potentiel thérapeutique (troubles nerveux et cardiaque, rhumatismes, HTA, pathologies hépatiques) tel qu'il en ressort dans les utilisations traditionnelles de certains de ces espèces.

III. Conclusion partielle

Le criblage phytochimique de ces deux (2) espèces de Verbenaceae a permis de mettre en évidence la présence des tanins, des flavonoïdes, des stérols et triterpènes, des alcaloïdes et des flavonoïdes. Les coupes histochimiques et les tests de caractérisations ont été négatifs pour les anthraquinones et les coumarines dans les deux plantes de l'étude.

Tableau 8: Structures des composés polyphénoliques identifiés

Composés identifiés	Structures	Classe
Acide caféique		Acide phénol
Rutine		Flavone

La CCM nous a permis mettre en évidence la rutine dans l'extrait méthanolique de *L. chevalieri*. L'acide caféique a été identifié dans les extraits de deux espèces de plantes. La CCM a montré plusieurs autres composés non identifié en fonctions de nos références utilisés. La procédure HPLC-DAD optimisée a permit de mettre en évidence 27 composés dont 16 acides phénols et le reste essentiellement des flavones. Notons que cette méthode ne nous a pas permis de mettre évidence l'acide *p*-coumarique et la quercétine. Les métabolites secondaires ayant été identifiés dans cette étude sont consignés dans le tableau 8.

Chapitre 2: activité antioxydante

Les études sur la recherche des composés antioxydants s'avèrent très importantes de nos jours, vu le rôle que ces composés peuvent jouer en matière de préservation de la santé. Plusieurs méthodes ont été développées pour évaluer le potentiel antioxydant des extraits de plantes. Elles sont fondées sur la détermination de produits résultant de l'oxydation ou, au contraire, mesurent l'efficacité d'une substance à piéger des radicaux, souvent en donnant une forme H[•] (Marc *et al.*, 2004). Des études récentes ont montré qu'il peut y avoir des différences dans la détermination de l'activité antioxydante d'un produit selon la méthode antioxydante utilisée (Schlesier *et al.*, 2002; Nsimba *et al.*, 2008). Ainsi pour mieux évaluer le potentiel antioxydant d'un extrait de plante il est nécessaire d'utiliser au moins deux méthodes. Dans la présente étude nous avons utilisés deux méthodes (FRAP et DPPH) pour évaluer l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de nos deux plantes.

I. Résultats

I.1. Evaluation du pouvoir réducteur (FRAP)

Dans le mécanisme de l'activité antioxydante des phénoliques, la réduction de Fe(III) est souvent utilisée comme un indicateur de donneur d'électrons (Hinneburg *et al.*, 2006). La méthode FRAP permet de mesurer l'habilité des phénoliques de réduire les ions Fe(III) en Fe(II). L'acide ascorbique a servi de standard pour l'élaboration de la courbe d'étalonnage dont l'équation de régression est: $y = 0,0094x - 0,0828$; $R^2 = 0,998$ (annexe I: figure 39). Les résultats de cette étude sont indiqués dans le tableau 9. Le pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique de *L. chevalieri* est de $15,16 \pm 0,11$ mmol EAA g⁻¹ et celui de *L. camara* est de $8,17 \pm 0,04$ mmol EAA g⁻¹. Ces résultats montrent que *L. chevalieri* réduit presque deux fois plus le Fe(III) que *L. camara*.

Tableau 9 : Valeurs de la capacité antioxydante des extraits méthanoliques

Echantillons	FRAP (mmol EAA g ⁻¹)	DPPH : IC ₅₀ (µg/mL)
<i>L. camara</i>	$8,17^d \pm 0,04$	$16,13^a \pm 0,35$
<i>L. chevalieri</i>	$15,16^b \pm 0,11$	$6,23^b \pm 0,15$
Acide gallique	$18,46^a \pm 1,51$	$0,60^d \pm 0,01$
Quercétine	$13,19^c \pm 2,17$	$0,93^d \pm 0,02$
Acide ascorbique	$5,86^e \pm 0,51$	$1,8^c \pm 0,43$

Chaque résultat constitue la moyenne des trois valeurs obtenues (n = 3). Les lettres différentes dans la même colonne indiquent des différences significatives (p < 0,05).

Nous notons que les capacités antioxydantes de *L. camara* ($8,17 \text{ mmol EAA g}^{-1}$) et de *L. chevalieri* ($15,16 \text{ mmol EAA g}^{-1}$) sont respectivement meilleures à celui de l'acide ascorbique ($5,86 \pm 0,51 \text{ mmol EAA g}^{-1}$), utilisé comme substance de référence. Comparativement à la quercétine ($13,19 \pm 2,17 \text{ mmol EAA g}^{-1}$) et à l'acide gallique ($18,46 \pm 1,51 \text{ mmol EAA g}^{-1}$), le pouvoir réducteur de *L. chevalieri* n'est pas significativement différent. Par contre ces deux derniers composés de références ont présentés des résultats largement supérieurs à celui de *L. camara*.

I.2. Détermination de l'activité antiradicalaire (DPPH)

La méthode DPPH est une des méthodes qui permettent d'évaluer l'activité antiradicalaire des extraits qui est basée sur la mesure de l'inhibition des radicaux libres (Tiwari, 2004).

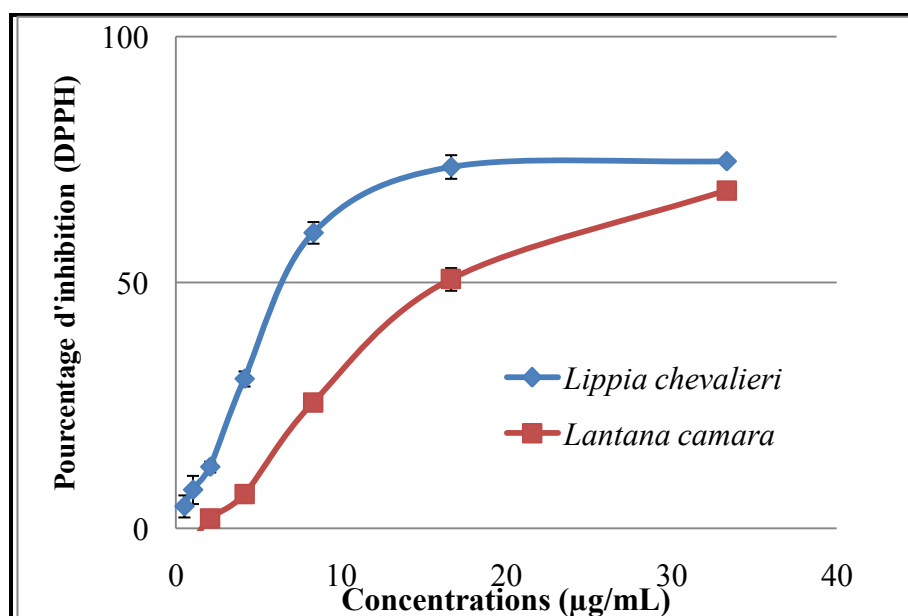


Figure 34: Inhibition du DPPH par les extraits de plantes

L'acide ascorbique a servi comme standard pour l'élaboration de la courbe d'étalonnage dont l'équation de régression est: $y = -0,0344x + 0,2881$; $R^2 = 0,998$ (annexe I: figure 40). Ainsi les composés ou extraits qui sont capables, à très faible concentration, de changer la couleur du radical libre DPPH, du violet au jaune sont considérés antioxydants, par conséquent anti-radicalaires (Hinneberg et al., 2006). Les résultats sont consignés dans le tableau 9. L'activité antioxydante est exprimée en concentration inhibitrice 50 (IC₅₀) c'est-à-dire la concentration de l'extrait susceptible de provoquer 50% d'inhibition. La capacité

antiradicalaire de l'extrait méthanolique de *L. chevalieri* est de $6,23 \pm 0,15$ $\mu\text{g/mL}$ et celui de *L. camara* est de $16,13 \pm 0,35$ $\mu\text{g/mL}$. Ces résultats montrent que *L. chevalieri* a une activité réductrice deux fois plus sur le radical DPPH que *L. camara*. Comparativement aux substances de références, le pouvoir antiradicalaire des deux extraits est très faible. Les IC_{50} ont été calculées sur la base de l'inhibition du radical DPPH par les extraits méthanoliques de nos deux plantes (figure 34).

II. Discussion

Dans cette étude utilisant deux méthodes antioxydantes (FRAP et DPPH), nous avons démontré que les deux plantes étudiées présentent des activités antioxydantes. La meilleure activité a été obtenue par *L. chevalieri* que ce soit sur l'activité réductrice des ions ferriques ($15,16 \pm 0,11$ mmol EAA/g) que sur la capacité antiradicalaire ($6,23 \pm 0,15$ $\mu\text{g/mL}$). L'activité antiradicalaire de l'extrait de *L. chevalieri* est trois fois inférieure à celle de l'acide ascorbique ($1,8 \pm 0,43$ $\mu\text{g/mL}$) et six fois faible par rapport à la quercétine ($0,93 \pm 0,02$ $\mu\text{g/mL}$).

Nous notons que *L. chevalieri* qui a présenté les meilleures activités antioxydantes a également donné la meilleure teneur en phénoliques totaux et en tanins. Aussi la contribution en tanins dans cette activité est de 42,61 %. Nous constatons que la capacité antiradicalaire n'est pas liée à la teneur en flavonoïdes totaux. Cela se justifie par le fait que l'extrait de *L. camara* qui a présenté la meilleure contribution en flavonoïdes (82,55 %) a donné le plus faible pouvoir antiradicalaire ($16,13 \pm 0,35$ $\mu\text{g/mL}$). Mais il est possible que les flavonols aient contribué dans ces activités. Puisque leurs parts dans la teneur de phénoliques totaux pour *L. chevalieri* est de $13,76 \pm 0,01$ qui sont à peu près treize fois supérieurs à celles de *L. camara* ($1,79 \pm 0,12$).

Selon les résultats antérieurs sur l'habilité des extraits à réduire l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}), il a été difficile d'établir une liaison très claire entre le taux de flavonoïdes et le pouvoir réducteur. Tantôt une bonne corrélation a été démontrée (Lamien-Meda *et al.*, 2008) tantôt une mauvaise corrélation et/ou contribution (Coulidiati, 2010) comme dans ce cas-ci. Ces observations pourraient s'expliquer par plusieurs possibilités: (i) les composés existant dans les extraits ont de gros poids moléculaires ou sont hétérosidiques (Manzi *et al.*, 2004), (ii) la majorité des flavonoïdes sont non antioxydants (Gursoy *et al.*, 2009), (iii) la sous estimation des flavonoïdes par la méthode de AlCl_3 (Meda *et al.*, 2005). La deuxième et la troisième hypothèse semblent convenir dans ce cas au regard de la teneur élevée en

flavonoïdes de *L. camara* (Tableau 9). Selon Cai *et al.* (2006) ce sont les flavanols qui présentent une meilleure activité anti-DPPH, alors que la méthode utilisée dans cette étude sous-estime ces types de flavonoïdes d'après Chang *et al.* (2002).

D'autres études ont montré qu'il existe bien un lien étroit entre les teneurs en polyphénols totaux et l'activité antioxydante de plusieurs composés d'origine végétale. Cette activité serait proportionnelle à la teneur en phénoliques totaux (Djeridane *et al.*, 2006; Lamien-Meda *et al.*, 2008; Zhang et Wang, 2009; Amaral *et al.*, 2009; Ciz *et al.*, 2010; Cèspeles *et al.*, 2010). Ainsi les teneurs en phénoliques totaux pourraient justifier la meilleure activité de *L. chevalieri* par rapport à *L. camara*. En effet la quantification polyphénolique et en particulier l'étude HPLC-DAD ont permis de mettre en évidence, plus de dérivés phénoliques dans l'extrait de *L. chevalieri* que dans celui de *L. camara*. Ces résultats sont en accord avec ceux de Couliadiati, 2010 et Méda, 2010 qui ont montré qu'il existe une bonne corrélation entre les activités antioxydantes et la teneur en composés phénoliques. Ceux de Couliadiati (2010) ont concerné divers types de fractions de trois espèces de la famille des Combretaceae. Il a obtenu $R^2 = 0,597$ comme la plus faible corrélation entre FRAP, DPPH et les teneurs en tanins et en phénoliques totaux. Dans l'ensemble les corrélations ont été largement supérieures à 0,60 pour ces deux groupes de composés. Par contre la plus forte corrélation pour ce qui concerne les teneurs en flavonoïdes a été de $R^2 = 0,22$. Plusieurs autres chercheurs ont également montré l'implication de certains groupes de composés phénoliques et leurs capacités antioxydantes. Ainsi selon Surveswaran *et al.* (2007) qui ont évalué la corrélation entre activité antioxydante et phénolique totaux de 133 espèces de plantes de la médecine Indienne (notamment le DPPH et FRAP), ont trouvé une corrélation significative comprise entre $R^2 = 0,89$ et $R^2 = 0,97$. Ils ont pu montrer l'implication des composés phénoliques et des tanins dans 83 des espèces de plantes de leur étude. Egalement, Patil *et al.* (2009) ont mesuré les IC_{50} d'un certain nombre d'activités parmi lesquelles on compte l'activité antiradicalaire d'extrait méthanolique de *Gmelina arborea* (Verbenaceae) comparée à celle de l'acide ascorbique par la méthode du DPPH. Ils ont trouvé que la IC_{50} de l'extrait ($46,2 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$) est faible par rapport à la référence ($28,80 \pm 0,50 \mu\text{g/mL}$). Ils en ont en même temps prouvé que l'effet antioxydant du DPPH est dû à leur capacité à céder de l'hydrogène. Ainsi ils ont montré que le pouvoir réducteur de l'extrait sur les ions Fe^{3+} est fonction de la teneur en composés polyphénoliques. Plus récemment, Awah *et al.* (2010) ont étudié l'effet simultané phénoliques totaux et des tanins sur le pouvoir antiradicalaire et le potentiel immunomodulateur de l'extrait éthanolique des feuilles de *Stachytarpheta*

angustifolia (Verbenaceae). Selon le groupement radical mis en évidence, ils ont trouvé les capacités antioxydantes suivantes: anion oxygène ($IC_{50} = 64,68 \pm 1,15 \mu\text{g/mL}$); anion hydroxyle ($IC_{50} = 99,43 \pm 1,71 \mu\text{g/mL}$) et la peroxydation lipidique ($IC_{50} = 282,91 \pm 3,62 \mu\text{g/mL}$).

Toutes ces études antérieures ont montré l'implication des phénoliques totaux et des tanins dans les activités antioxydantes. Nous pouvons constater que comparativement à nos résultats, les extraits méthanoliques sont meilleurs.

Thamotharan *et al.* en (2010) ont montré que l'extrait de *L. camara* serait impliqué dans l'augmentation du taux du superoxyde dismutases (SOD), de la catalase (CAT) et du glutathion (GSH) qui sont fortement impliquées dans les activités antioxydantes des cellules. En effet les SOD sont les premières lignes défensives contre les espèces oxygénées réactives (EOR), tandis que les CAT préviennent les dommages oxydatives en assurant le passage de H_2O_2 en H_2O et en O_2 . Le GSH quant à lui, est un tripeptide et un puissant antioxydant présent dans le cytosol des cellules. Le GSH est indispensable pour le maintien du groupe thiol ainsi que d'autres molécules telles que les protéines et régule le thiol-disulfide de la cellule. C'est un puissant détoxifiant des composés xénobiotiques et des radicaux libres.

D'autres chercheurs ont mis en évidence l'action de certains métabolites secondaires sur le pouvoir antioxydant. Ainsi il a été prouvé dans une étude *in vitro* que la rutine possède une activité antioxydante à partir de 500 ng (Nuengchamnong *et al.*, 2004). Dans cette présente étude la rutine a été mise en évidence dans l'extrait de *L. chevalieri* par la technique de la chromatographie sur couche mince. Notons également que parmi les trois plantes de l'étude de Couliadiati en 2010, *Combretum acutum* Laws dans laquelle la rutine a été identifiée a présenté les meilleures activités anti DPPH et FRAP. Ainsi ce métabolite secondaire pourrait expliquer la plus grande activité antioxydante de *L. chevalieri* par rapport à *L. camara*. L'étude HPLC-DAD nous a permis de mettre en évidence 2 dérivés lutéolines dans la fraction acetate d'éthyle de *L. chevalieri*. D'autres chercheurs ont montré que la lutéoline est un composé qui présente des propriétés antiradicalaires et réductrices (Tsimogiannis & Oreopoulou, 2004; Compaoré *et al.*, 2011). Plusieurs autres composés ont été trouvés ayant des propriétés antioxydantes. Dans ce sens, Penchev *et al.* en (2010) ont montré que l'acide rosmarinique est un agent antioxydant. Aussi les acides phénols sont de façon générale doués de pouvoir antioxydant. C'est ainsi que les acides tels que l'acide caféique empêche la peroxydation lipidique des aliments et les maladies induites par les radicaux libres telles que

le cancer, l'athérosclérose et le vieillissement des tissus (Li *et al.*, 2003; Anselmi *et al.*, 2005; Katsube *et al.*, 2006; Gülçin, 2006; Itagaki *et al.*, 2009; Méda, 2010). Ashidate *et al.* (2005) ont également démontré que l'acide gentisique agit contre l'oxydation des LDL. Les flavones sont également identifiés dans les tissus de *L. camara* et de *L. chevalieri*, parmi eux, les dérivés de lutéoline, dont leurs capacités antioxydantes ont été démontrés (Rice-Evans, 1999). Les tanins hydrolysables inhibent la peroxydation des lipides tandis que les tanins condensés inhibent la formation des superoxydes. Les catéchols du thé piègent les radicaux libres, chélatent les ions métalliques et préservent d'autres antioxydants comme la vitamine E (Nacoulma, 1996; Pithayanukul *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007). Le magnésium est également impliqué dans certaines activités antioxydantes. Il lui est reconnu d'être incriminé dans l'inhibition de l'oxydation des acides gras et dans l'influence du taux de cholestérol (Buyck, 2008).

Les deux plantes doivent également leurs capacités antioxydantes aux huiles essentielles dont les études antérieures ont beaucoup soutenu. Mevy *et al.* en 2007 ont montré que le β -caryophyllène, 1,8-cinéole et le germacrène sont antioxydantes. De même, il a été démontré que le géniposides et le verbascoside, isolés de *L. camara* possèdent des propriétés antioxydantes (Tsiba *et al.*, 2010). Le verbascoside protège l'hémolyse oxydative, inhibe l'aldolase réductase ainsi que la peroxydation lipidique. Il a également présenté une activité immunomodulatrice, des propriétés immunosuppressives et a apparemment renforcé l'effet anti-tremblement de la L-DOPA (Ghisalberti, 2000). Barre *et al.* (1997) ont montré que l'ursulate acétique et un dérivé d'acide oléanolique, deux dérivés triterpènes pentacyclique exercent une grande activité antimutagénique sur les souris.

Notons que les activités mesurées, évaluent la capacité de nos extraits à inhiber les radicaux libres. Les radicaux libres par leurs capacités à détériorer les muqueuses et à dégrader les éléments constitutifs des cellules épithéliales entraînent ainsi une altération complète du métabolisme (Thamotharan *et al.*, 2010). Cette détérioration des protéines membranaires diminue la perméabilité membranaire, l'activité enzymatique et celle des récepteurs ainsi que l'activation cellulaire. Ils peuvent ainsi être capturés à travers la chimio-prévention utilisant les composés antioxydants présents dans l'alimentation de l'homme et des plantes médicinales (Fu *et al.*, 2010; Thamotharan *et al.*, 2010). *L. chevalieri* qui a donné une activité antioxydante plus significative, pourraient être exploités pour la recherche de nouvelles molécules antioxydantes.

III. Conclusion partielle

Il ressort de cette investigation que *L. chevalieri* possède plus de capacité antioxydante que *L. camara*. Ce constat a été établi, en évaluant leur activité à travers deux méthodes à savoir la méthode par le DPPH et celle de FRAP. Les activités de *L. chevalieri* se justifieraient par ses fortes teneurs en phénoliques totaux et tanins totaux, ainsi que par sa teneur en flavonols totaux. Des métabolites secondaires tels la rutine, l'acide caféique, les dérivés de la lutéoline et de l'acide rosmarinique ont été mis en évidence et dont leurs propriétés antioxydantes sont connues. Les résultats obtenus dans cette étude montre que ces plantes sont sources de composés antioxydants qui pourraient être des solutions pour les multiples conséquences du stress oxydatif. Ces plantes pourraient être utilisées contre les maladies induites par les radicaux libres telles que le cancer, l'athérosclérose et le vieillissement des tissus.

Chapitre 3: l'activité antibactérienne

Pour cette étude nous avons utilisé des souches bactériennes de référence ATCC et des souches cliniques pour évaluer l'activité antibactérienne des nos extraits méthanoliques. La détermination de la sensibilité des extraits et la concentration minimale inhibitrice ont été déterminé en milieu solide par la technique de diffusion des disques. Quatre antibiotiques de référence à savoir la Gentamicine, la Ciprofloxacine, le Cotrimoxazole et l'Ampicilline ont été utilisés dans cette étude afin de pouvoir apprécier l'activité des extraits par rapport à ces antibiotiques.

I. Résultats

I.1. Détermination des diamètres d'inhibition

Les diamètres ont été déterminés selon la méthode d'Arias *et al.* (2007) (photo 10). Cette activité a été réalisée sur douze souches bactériennes à gram négatifs et cinq souches bactériennes à gram positifs.

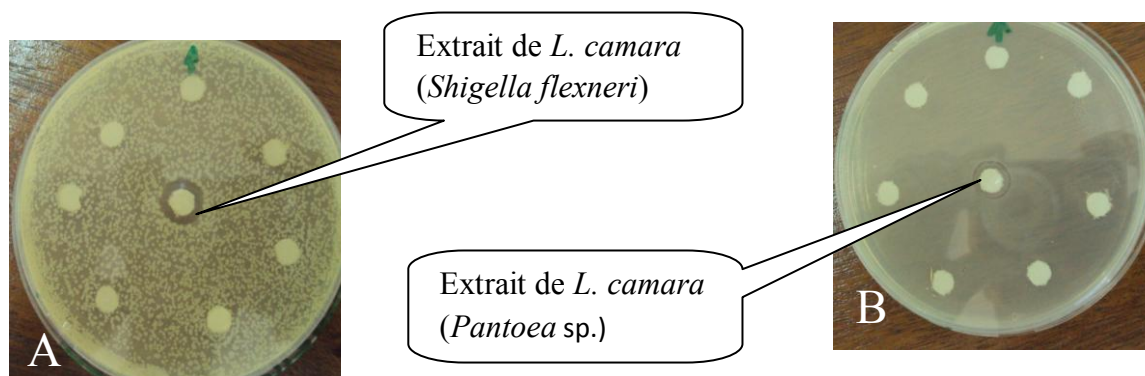


Photo 10: Diamètre d'inhibition de *Shigella flexneri* (A) et *Pantoea sp* (B).

Le tableau 10 indique les résultats de l'inhibition bactérienne obtenus à partir des macérés méthanoliques des deux espèces. Pour cette étude, la concentration de nos extraits a été de 25 µg/mL.

Les diamètres d'inhibition des bactéries à gram négatifs sont compris entre 8 et 12,33 ± 0,35 mm. Les meilleures activités ont été obtenues avec l'extrait de *L. camara* sur *S. flexneri* et sur *Pantoea sp* avec des diamètres de 12,33 mm et de 12 mm, respectivement. De faibles inhibitions (8 mm) ont été obtenus avec les macérés des deux espèces sur *P. mirabilis* (ATCC35659), *S. Typhi* (poisson) et *S. Typhi* (salade). Les résultats montrent que certaines bactéries telles que *E. coli* (uro); *V. cholerae* (eau) et *V. cholerae* (poisson) ne sont pas sensibles aux différents extraits à la concentration de 25 µg/mL. En ce qui concerne le test sur

les bactéries à grams positifs, les diamètres d'inhibition ont variés entre 8 mm et 11,33 mm. Les meilleurs diamètres d'inhibition ont été obtenus avec *L. camara* ($11,33 \pm 0,35$ mm) sur *S. aureus* ATCC25923 suivi de *L. chevalieri* ($10,67 \pm 0,35$ mm) sur *S. epidermidis*. Les résultats montrent que l'inhibition de l'extrait de *L. chevalieri* est meilleure à celui de *L. camara* sur *S. epidermidis*. Dans l'ensemble, *L. camara* donne un diamètre d'inhibition avec la plupart des souches bactériennes, excepté les trois souches (*E. coli*-clinique, *V. cholerae* (eau) et *V. cholerae* (poisson)) qui sont restées insensible à nos deux extraits.

Ces résultats montrent que les zones d'inhibition sont fonctions d'une espèce bactérienne à une autre et de la composition chimique de l'extrait de chaque plante. Il ressort également de nos résultats que nos extraits sont plus sensibles sur les bactéries à gram négatifs que sur celles à gram positifs. Tenant compte des diamètres de sensibilité et comparativement à ceux de l'ampicilline, nous pouvons dire que l'extrait de *L. camara* a une meilleure activité inhibitrice surtout sur *B. cereus* et *Staphylococcus aureus*. En effet pour ces diamètres d'inhibition, la sensibilité à l'ampicilline a été de 0,6 mm, tandis que pour les souches bactériennes ont données pour *B. cereus* (ATCC9144) = 11 mm, *P. mirabilis* (8 mm), *Salmonella Typhi* (salade) (8 mm) et *Staphylococcus aureus* (11,33 mm). Selon Schulz *et al.* (1995) les extraits induisant des zones d'inhibition ≥ 3 mm autour du disque sont considérés comme antibactériens. Dans ce cas nous disons que nos extraits possèdent une activité antibactérienne sur *E. coli* (ATCC25922) (11,33 mm), *S. flexneri* (12,33 mm) et *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) = 11,33 mm.

I.2. Concentration minimale inhibitrice

A l'issue de la mesure des zones d'inhibition, nous avons réalisé les CMI dans le but de déterminer les concentrations minimales inhibitrices de nos extraits. Pour ce faire nous avons considéré les extraits qui ont au moins un diamètre d'inhibition supérieur ou égal 9 mm (Tableau 11). Les CMI ont varié de 12,5 à 25 $\mu\text{g/mL}$. La meilleure activité inhibitrice a été obtenue par l'extrait de *L. camara* sur *S. flexneri*, *Pantoea* sp, *K. pneumoniae* et *E. coli* ATCC 25922. Nous notons que ces résultats sont obtenus sur des souches à gram négatifs.

Tableau 10: Tableau récapitulatif des diamètres d'inhibition

Souches bactériennes	<i>L. camara</i> (0,375 µg/disque)	<i>L. chevalieri</i>	Ampi (10 µg/d)	Cipro (5 µg/d)	Genta (10 µg/d)	Co-tri (25 µg/d)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC9144	11 ± 1	-	-	25	18,5	24
<i>Citrobacter freundii</i>	8,67 ± 0,35	-	ND	ND	ND	ND
<i>Escherichia coli</i> (isolat)	-	-	26,5	33,5	28	28
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	11,33 ± 0,35	8	19	23,5	20	ND
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	9,67 ± 0,35	ND	ND	ND	ND
<i>Pantoea sp</i>	12	9,67 ± 0,35	ND	ND	ND	ND
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC35659	8	8	-	27	20	29
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	8	ND	ND	ND	ND
<i>Shigella flexneri</i>	12,33 ± 0,35	-	18	31	34	30
<i>Salmonella Typhi</i> (poisson)	8	8	22	31	20,5	ND
<i>Salmonella Typhi</i> (salade)	8	8	ND	ND	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	11,33 ± 0,35	9	-	30	20	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> (isolat)	9	-	16	31	27	35
<i>Staphylococcus épidermidis</i>	8	10,67 ± 0,35	-	24	18	ND
<i>Streptococcus agalactiae</i> (isolat)	11,16 ± 0,28	-	ND	ND	ND	ND
<i>Vibrio cholerae</i> (poisson)	-	-	8,5	31	19	ND
<i>Vibrio cholerae</i> (eau)	-	-	ND	ND	ND	ND

Ampi: Ampicilline; **Cipro:** Ciprofloxacine; **Genta:** Gentamicine; **Cotri:** Cotrimoxazole; -: Inactif; **ND:** Non déterminée.

NB: l'isolement de *Proteus* doit se faire sur gélose bien sèche. En effet leur croissance est ralentie (inhibée) en présence du méthanol ou de l'éthanol déposé à la surface interne du couvercle de la boîte de pétri.

Tableau 11: Concentrations minimales inhibitrice et bactéricide, et CMB/CMI.

Echantillons (µg/mL)		E. c s	K. p.	P.	S. fle.			
CMI	<i>L. camara</i>	12,5	25	25	12,5	25	12,5	25
CMB	<i>L. camara</i>	-	-	-	12,5	12,5	12,5	12,5
CMB/CMI	<i>L. camara</i>			1	2	1	2	

CMI: Concentration minimale inhibitrice; **CMB**: Concentration minimale bactéricide; **E. c. s**: *Escherichia coli* ATCC; **K.p.**: *Klebsiella pneumoniae*; **P.**: *Pantoea* et **S. fle.**: *Shigella flexneri*.

A l'issue de la détermination des concentrations minimales pour lesquelles nos souches sont sensibles, nous avons évalué les concentrations minimales qui tueraient un germe (CMB). Ces résultats ont varié dans le même ordre que les CMI, c'est-à-dire de 12,5 à 25 µg/mL (tableau 11). Les souches bactériennes qui sont restées sensibles à l'extrait de *L. camara* sont *Pantoea* sp et *Shigella flexneri*. Par la suite les rapports CMB/CMI ont été mesurés pour déterminer le caractère bactéricide et/ou bactériostatique de l'extrait. Le rapport CMB/CMI a varié de 1 à 2 pour *Pantoea* sp et *Shigella flexneri*. Au vue des résultats obtenus, nous pouvons dire que l'extrait de *L. camara* a un effet bactéricide sur ces deux souches bactériennes.

II. Discussion

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de nos extraits méthanoliques à consister à mesurer les diamètres de sensibilités et d'en étudier les caractères bactéricide et bactériostatique. Les meilleures activités inhibitrices sur les bactéries à gram négatifs ont été obtenues avec l'extrait de *L. camara* sur *S. flexneri* et sur *Pantoea* sp. En ce qui concerne les bactéries à gram positifs *L. camara* a donné les meilleurs diamètres d'inhibitions sur *S. aureus* ATCC, tandis que *L. chevalieri* l'a été avec *S. epidermidis*. Les résultats de cette étude ont montré que les souches bactériennes ont été plus sensibles à l'extrait de *L. camara* et les meilleures diamètres d'inhibition ont été obtenues sur *S. flexneri* et *Pantoea* sp qui sont des bactéries à gram négatifs. Aligiannis *et al.* (2001) ont proposés une classification des extraits du matériel végétal sur la base des résultats des CMI, comme suit: forte inhibition (CMI inférieure à 500 µg/mL); – inhibition modérée (CMI varie de 600 µg/mL à 1 500 µg/mL); – faible inhibition (CMI supérieure à 1 600 µg/mL). Ainsi, selon cette classification, on constate une très forte inhibition avec l'extrait de *L. camara*.

En se basant sur les teneurs des composés polyphénoliques quantifiés pour comprendre la meilleure activité antimicrobienne de *L. camara*, on se rend compte que seuls les teneurs en flavonoïdes pourraient justifier cette activité. En effet le pourcentage des flavonoïdes dans les polyphénols totaux mesurés est de 82,55 %. D'autres chercheurs ont également cherché à comprendre le rapport de cause à effet entre les diamètres de sensibiles des divers types d'extraits avec les différents groupes chimiques. C'est ainsi que Vaquero *et al.* en 2007 ont testé les composés polyphénoliques de différents vins sur *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis* et bien d'autres souches en rapport avec la quercétine, la rutine, l'acide gallique et l'acide caféique. Ils n'ont pas observé de zone d'inhibition majeure avec la rutine qui est un flavone et ce, sur aucune souche bactérienne. De même, l'acide gallique et l'acide caféique n'ont donné aucun résultat sur *S. aureus* ATCC 25923. Les concentrations testées ont varié de 2 µg/mL à 1000 µg/mL. Par contre la quercétine et la catéchine ont donné des zones d'inhibition de l'ordre de 4 à 5 mm pour 1mg/mL et supérieure à 9 mm pour la même concentration. Vaquero et ses collaborateurs (2007) ont observé une zone d'inhibition sur *P. mirabilis* avec la quercétine (10 µg/mL) et sur *K. pneumoniae* et *E. coli* à partir de 25 µg/mL. Le Chloramphénicol a été utilisé comme référence à 1 mg/mL. Non seulement ces résultats montrent que la rutine n'est pas un bon inhibiteur de bactéries, mais justifie aussi la meilleure activité de l'extrait de *L. camara*.

De même Ksouri *et al.* (2009) ont montré que l'isoquercétine aussi bien que la catéchine sont des composés phénoliques majeurs impliqués dans les activités antibactériennes.

Les tests de caractérisation en tubes ont permis de mettre en évidence les stérols/triterpènes, les tanins et les saponosides dont leur activités antibactériennes ont été déjà démontrées (Ojala, 2001; Falleh *et al.*, 2008; Tomczyka et Latte, 2009). En effet les tanins sont susceptibles de précipitation dans l'espace pendant les réactions d'oxydations, et cela pourrait être un facteur de toxicité vis-à-vis des microorganismes (Kujumgiev *et al.*, 1999; Raj Narayana *et al.*, 2001). Mais cela n'explique pas le fait que *L. chevalieri* (42,61 % de tanins) inhibe moins que *L. camara* qui est à 4,78 %. Les études antérieures sur *L. camara* ont montré que cette plante comporte des molécules toxiques dont les lantadène A à D sans être limitatif (Ghisalberti, 2000). Selon Bakasso (2009), le mécanisme de toxicité des polyphénols contre les microorganismes pourrait s'expliquer par l'inhibition des enzymes hydrolytiques (protéases et carbohydrates) ou à d'autres interactions pour inactiver l'adhésine microbienne, les protéines de transport de l'enveloppe cellulaire et l'interaction non spécifique avec les

carbohydrates. Ainsi, ces mécanismes d'inhibition se situent à plusieurs niveaux, les polymères polyamides des bactéries peuvent favoriser la réactivité de leurs protéines, mais aussi les composés phénoliques peuvent être à la base de la privation de fer ou des liaisons hydrogènes des protéines vitales c'est-à-dire les enzymes bactériennes. Ainsi nous pourrions justifier la plus forte activité antibactérienne de *L. camara* par sa teneur en composés toxiques. De même l'ursalate acétate (un triterpène pentacyclique isolé de *L. camara*) possède des propriétés antimicrobiennes comparée au chloramphénicol. Son activité étant plus prononcée sur *Staphylococcus aureus* et *Salmonella Typhi* à une concentration de 30 µg/disque.

Pour ce qui concerne le rapport CMB/CMI, un extrait est dit bactéricide lorsque ce rapport est égal à 1 ou 2 et il est bactériostatique si ce rapport est supérieur à 2 (Kanta, 2008). Dans ce cas, on peut dire que l'extrait de *L. camara* a un effet bactéricide sur *S. flexneri* et *Pantoea* sp mais bactériostatique sur *E. coli* ATCC 25922 et *K. pneumoniae*. Toutes les bactéries sous citées sont de gram négatifs, dont leurs structures sont moins riches en peptidoglycane (10% de la paroi), comportent moins de couches de peptidoglycane (1 à 3 couches) et ces peptidoglycans sont moins réticulés que ceux des bactéries à gram positifs (Corvec, 2009). En effet, comparativement aux bactéries gram négatifs; celles à gram positifs sont très riches en peptidoglycane/muréine (50 à 80% de la paroi), comportent plusieurs couches de peptidoglycane et ayant une réticulation importante. La structure chimique et moléculaire de la paroi bactérienne montre également une absence en acide teichoïque et en acide lipoteichoïque. Le rôle des peptidoglycans sans être limitatif est d'assurer la rigidité et la solidité des parois bactérienne ainsi que la protection de la membrane cytoplasmique contre la lyse osmotique (Corvec, 2009). La complexité des bactéries à gram positifs pourraient expliquer l'inactivité de nos extraits.

L'investigation de l'activité antibactérienne a montré que nos extraits méthanoliques (particulièrement l'extrait de *L. camara*) sont plus sensibles sur les bactéries à gram négatifs. Rivero-Cruz en 2008 a étudié les CMI des extraits méthanoliques des écorces de *Haematoxylon brasiletto* sur *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, de *K. pneumoniae* et de *P. aeruginosa* et a trouvé respectivement les valeurs suivantes: 16; supérieure à 128 µg/mL; 128 et supérieure à 128 µg/mL. De même les travaux de Vaquero *et al.*, 2007, ont montré une activité antibactérienne sur les souches bactériennes à gram négatifs et en particulier sur *E. coli* ATCC 35218 et ATCC25922 mais avec les composés polyphénoliques non-flavonoïques. La meilleure activité antibactérienne a été obtenue avec l'acide gallique sur

Klebsiella pneumoniae humain, à partir de 100 mg/ mL. Suivi de l'acide vanillique sur *Klebsiella pneumoniae* et les *E. coli* à partir 200 mg/mL et de l'acide caféique à la même concentration. D'autres chercheurs ont également montré que les composés furanonaphthoquinones possèdent des propriétés antibactériennes sur les bactéries à gram négatifs (Nagata *et al.*, 1998; Ghisalberti, 2000). Par contre une CMI de 8 % et une CMB négative ont été trouvés en utilisant les huiles essentielles de *L. chevalieri* sur *Escherichia coli* CIP105182 (Bassolé *et al.*, 2003). Buyck (2008) quant à lui, a montré l'implication du calcium et des transports ioniques de l'épithélium des voies aériennes dans la réponse à l'agression septique par *Pseudomonas aeruginosa*. Ces résultats montrent que l'augmentation du calcium intracellulaire déclenchée par le LPS est due à un relargage des stocks intracellulaires et à un influx de calcium extracellulaire à travers des canaux membranaires. Cette augmentation de sécrétion peut être un avantage pour l'hôte car cela améliore la clairance et donc permet une meilleure élimination du pathogène. Les épithéliums (Fibrose Cystique) sont hautement sensibles aux infections du fait d'un défaut de sécrétion de fluide apicale et d'un épaissement du mucus, l'augmentation de sécrétion en réponse aux bactéries pourrait être un mécanisme de défense passif de l'épithélium.

Dans l'ensemble les diamètres d'inhibition des antibiotiques testés montrent que la majorité des souches bactériennes est sensible à la Ciprofloxacine et à la Gentamicine. Ces résultats démontrent que ces deux antibiotiques présentent un large spectre d'activité. Sur les dix souches bactériennes testées dont sept de gram négatifs, nous n'avons pas observé de résistance complète. Considérant les diamètres de sensibilité supérieurs à 10 mm, l'extrait de *L. camara* a été actif sur sept souches bactériennes particulièrement sur *Shigella flexneri*.

Les *Shigelles* sont des bacilles à gram négatif qui résistent à l'acidité gastrique. Après donc leurs transmissions, elles vont traversées l'estomac et atteindre l'intestin, gagnent ensuite les anthérocytes où elles se multiplient et produisent des toxines. Ce sont des bactéries invasives, incriminées dans les gastroentérites et les dysenteries bacillaires.

L'activité antimicrobienne mise en évidence confirmerait l'utilisation thérapeutique des feuilles de *L. camara* en médecine traditionnelle dans les traitements des affections buccales, des toux, des pneumopathies, des diarrhées, de la grippe et comme antibiotique bien que orienté vers les bacilles à gram positifs (Nacoulma, 1996). On pourrait donc exploiter l'extrait de cette plante pour remédier à ces maladies, en particulier celle causées par *S. flexneri*.

III. Conclusion partielle

La présente étude montre un large spectre d'activité de l'extrait de *L. camara* sur plusieurs souches bactériennes, aussi bien sur les bactéries à gram négatifs que les bactéries à gram positifs. Plus singulièrement sur *Shigella flexneri*, un des agents de la dysenterie épidémique, dite pour cette raison dysenterie bacillaire. Cette activité est certainement due à la nature et à la teneur des composés polyphénoliques mais aussi aux saponosides stéroïdiques contenue dans l'extrait. Ainsi cette plante pourrait être exploitée dans le traitement des affections buccales et cutanées, des dysenteries bacillaires, des intoxications alimentaires et des pneumopathies.

Chapitre 4: Etudes des inhibitions enzymatiques

Les enzymes sont des marqueurs de maladies et de ce fait impliquées dans diverses pathologies humaines. Connaître leurs mécanismes d'inhibitions est intéressant, surtout de leurs inhibitions par les molécules biologiques. Cela contribuera pour beaucoup dans les soins de certaines pathologies à étiologie enzymatique. Pour la présente étude nous sommes intéressés à quatre enzymes que sont : la xanthine oxydase (XO), la glutathion-S-transférase (GST), l'acétylcholinestérase (AChE) et la carboxylestérase (CES). La littérature fait cas de l'implication de ces enzymes, non seulement dans la résistance des insectes aux insecticides mais surtout dans les pathologies humaines telles que: la maladie d'Alzheimer, les maladies tumorales, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires en générales (Filha *et al.*, 2006; Habdous *et al.*, 2002; Lopez *et al.*, 2002; Djeridane *et al.*, 2006).

I. Résultats

Les activités inhibitrices des macérés méthanoliques de *L. camara* et de *L. chevalieri* sur les enzymes ont été testées à une concentration de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ et les résultats sont consignés dans le tableau 12. Pour ces quatre enzymes le pourcentage d'inhibition a varié de $14,00 \pm 2,6$ pour la xanthine oxydase à $56,20 \pm 2,67$ % pour la carboxylestérase.

L'analyse des résultats sur de l'inhibition de la glutathion-S-transférase par nos deux extraits a montré que *L. chevalieri* a le meilleur pourcentage d'inhibition ($42,99 \pm 3,03$ %) comparativement à celui de *L. camara* ($21,83 \pm 1,62$ %).

La meilleure activité antiAChE est obtenue par *L. chevalieri* ($39,26 \pm 2,18$ %), valeur double de celle de *L. camara* ($18,59 \pm 5,25$ %). La galanthamine a été utilisée comme composé de référence et a lui-même donné un pourcentage d'inhibition de $50,76 \pm 0,68$ % à la concentration $100 \mu\text{g/mL}$. Les deux extraits inhibent à plus de 30 % la carboxylestérase avec $56,20 \pm 3,05$ % pour *L. camara* et $37,68 \pm 1,18$ pour *L. chevalieri*. L'acide ascorbique qui a servi de référence a donné un pourcentage d'inhibition de $56,72 \pm 0,85$ % à une concentration de $50 \mu\text{g/mL}$. En ce qui concerne l'inhibition de la xanthine oxydase aucun extrait n'a donné un pourcentage d'inhibition au-delà de 25 %. La plus forte inhibition est obtenue par *L. camara* avec $20,76 \pm 2,67$ %. Pour cette enzyme, l'allopurinol a été utilisé comme composé de référence à une concentration de $100 \mu\text{g/mL}$. Le pourcentage d'inhibition de cet extrait est très faible comparée à celle de l'allopurinol ($96,38 \pm 0,59$ %).

Parmi les quatre enzymes utilisées pour notre étude, la meilleure inhibition est obtenue avec l'extrait de *L. camara* sur la carboxylestérase (inhibition supérieure à 50 %). Par contre

l'extrait de *L. chevalieri* a inhibé à plus de 35 % la CES ($37,68 \pm 1,18$ %), l'AChE ($39,26 \pm 2,18$ %) et la GST ($42,99 \pm 3,03$ %).

Tableau 12: Résultats des activités inhibitrices des extraits de plantes

Espèces	I% AChE	I% GST	I% CES	I% XO
<i>L. camara</i>	$18,59 \pm 5,25$	$21,83 \pm 1,62$	$56,20 \pm 3,05$	$20,76 \pm 2,67$
<i>L. chevalieri</i>	$39,26 \pm 2,18$	$42,99 \pm 3,03$	$37,68 \pm 1,18$	$14,00 \pm 2,16$
Composés de références				
Galanthamine	$50,76 \pm 0,68$			
Acide ethacrynique		Non déterminée		
Acide ascorbique			$56,72 \pm 0,85$	
Allopurinol				$96,38 \pm 0,59$

(Moyenne \pm déviation standard de 3 essais)

II. Discussion

Dans cette partie de l'étude, nous avons évalué les activités inhibitrices de quatre enzymes qui sont impliquées dans diverses étiologies pathologiques. Ces enzymes sont toutes incriminées dans les diverses résistances des insectes aux insecticides mais également dans les pathologies telles que la maladie d'Alzheimer, la goutte, les rhumatismes et sans être limitatif les maladies tumorales.

Parmi les deux extraits testés seul celui de *L. chevalieri* a inhibé à plus de 35 % la CES ($37,68 \pm 1,18$ %), l'AChE ($39,26 \pm 2,18$ %) et la GST ($42,99 \pm 3,03$ %). La plus forte inhibition de cet extrait est obtenue sur la glutathion-S-transférase ($42,99 \pm 3,03$ %). L'extrait de *L. camara* n'a donné une bonne inhibition qu'avec la CES ($56,20 \pm 3,05$ %). Les autres valeurs inhibitrices étant inférieures à 25 %. Cependant la meilleure plante pour ces activités reste *L. chevalieri* pour avoir donné une inhibition intéressante simultanément sur trois des quatre enzymes de l'étude. L'explication que nous pouvons donner suite à cette activité de l'extrait de *L. chevalieri* et sa forte teneur en phénoliques totaux et en tanins totaux. De même que la teneur en flavonols totaux de *L. chevalieri* ($2,46 \pm 0,01$ mg EQ/100 mg extrait) contre $0,18 \pm 0,01$ pour *L. camara*. Si les inhibitions enzymatiques étaient fonction des teneurs en flavonoïdes totaux, l'extrait de *L. camara* présenterait les meilleures inhibitions. En effet la part des flavonoïdes totaux dans les phénoliques totaux de cette plante est de 82,55 %.

Une étude corrélative entre les pourcentages d'inhibitions et les teneurs en composés polyphénoliques a été effectuée dans le but d'identifier le groupe de composé chimique impliqué dans chaque inhibition enzymatique (Tableau 13). Les coefficients de corrélation ont varié de 0,0003 à 0,99. La meilleure corrélation a été obtenue entre les phénoliques totaux et le pourcentage d'inhibition de la CES ($R^2 = 0,99$). Elle est suivie de celle des tanins et la CES

($R^2 = 0,91$). D'autres corrélations intéressantes ont été obtenues entre les teneurs en flavonols et les pourcentages d'inhibitions de l'AChE ($R^2 = 0,82$) et de la GST ($R^2 = 0,87$). La plus forte corrélation avec les flavonoïdes totaux a été obtenue avec l'AChE ($R^2 = 0,36$).

Tableau 13: Tableau donnant le coefficient de corrélations entre activités enzymatiques et les groupes chimiques quantifiés

Espèces (4 Verbenaceae)	Teneur en composés polyphénoliques (mg EQ/ 100 mg extrait)			
	Phénoliques ttx	Flavonoïdes ttx	Flavonols ttx	Tanins
<i>L. camara</i>	10,03 ± 0,75	8,28 ± 0,77	0,18±0,01	0,48 ± 0,09
<i>L. chevalieri</i>	17,88 ± 0,90	4,91 ± 0,47	2,46 ± 0,01	7,62 ± 0,37
<i>L. multiflora</i> Moldenke	20,20 ± 0,75	10,90 ± 0,11	1,09 ± 0,01	10,9 ± 0,09
<i>L. camara</i> Moldenke	21,55 ± 0,75	05,09 ± 0,19	0,7 ± 0,02	14,52 ± 0,27
	Pourcentage d'inhibition (%)			
	I% AChE	I% GST	I% CES	I% XO
<i>L. camara</i>	18,59 ± 5,25	21,83 ± 1,62	56,20 ± 3,05	20,76 ± 2,67
<i>L. chevalieri</i>	39,26 ± 2,18	42,99 ± 3,03	37,68 ± 1,18	14,00 ± 2,16
<i>L. multiflora</i> Moldenke	17,65 ± 6,35	39,76 ± 2,41	32,37 ± 1,81	ND
<i>L. camara</i> Moldenke	17,59 ± 2,29	21,03 ± 0,36	33,32 ± 0,68	14,67 ± 0,47
Coefficients de corrélations entre groupe de composés polyphénoliques et les activités enzymatiques				
	AChE	GST	CES	XO
Polyphénols totaux	0,0003	0,21	0,99	ND
Flavonoïdes totaux	0,36	0,2	0,02	ND
Flavonols totaux	0,82	0,87	0,21	ND
tanins	0,016	0,4	0,91	ND

Cette étude corrélative montre que les flavonols sont impliqués dans l'activité inhibitrice de la GST et que *L. chevalieri* serait parmi les deux plantes, bien indiqué pour la recherche de molécules biologiques inhibitrice. Bien que la corrélation entre inhibition enzymatique et les teneurs en flavonoïdes soit faible, les travaux menés par Zanden *et al.*, 2004, ont prouvé que les flavonoïdes tels que la galangine, la quercétine et le kaempferol sont des potentiels inhibiteurs de la glutathion-S-transférase seulement à une concentration de 25µM. De même, Hayeshi *et al.*, 2007 ont montré que la quercétine inhibait la GST à une concentration variant entre 0,04 à 5 µM.

Cette enzyme comporte plus de dix (10) classes et ne possède pas que des effets néfastes sur l'organisme humain (Sheehan *et al.*, 2001; Enayati *et al.*, 2005). Elle joue un rôle central dans la détoxification endogène des composés xénobiotiques, facilite les transports intracellulaires, la biosynthèse des hormones et la protection contre le stress oxydatif (Enayati *et al.*, 2005). Cependant lorsqu'elle est surexprimée, elle participe dans la tolérance des

insectes aux insecticides, ainsi qu'à la résistance des cellules tumorales à la chimiothérapie (Zanden *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2009). Cette résistance est d'autant élevée que les taux d'expression de ces diverses classes sont élevés (Sheehan *et al.*, 2001; Zanden *et al.*, 2003; Enayati *et al.*, 2005).

L'activité inhibitrice des extraits méthanoliques des tiges feuillées de *L. camara* ($18,59 \pm 5,25$ %) et de *L. chevalieri* ($39,26 \pm 2,18$ %) testées sur l'acétylcholinestérase ont donné de faibles pourcentages comparativement à la galanthamine ($50,76 \pm 0,68$ %) qui est un alcaloïde de référence couramment utilisé. Mais en tant qu'extraits bruts, ils seraient bien indiqués pour la recherche de molécules impliquée dans cette inhibition, surtout l'extrait de *L. chevalieri*. L'AChE est impliquée dans la maladie d'Alzheimer (MA) et à travers son rôle neurotransmetteur, intervient aussi dans la résistance des insectes aux insecticides. En effet la maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative évolutive caractérisée par une perte de la mémoire et une altération progressive des fonctions cognitives. Un déficit important en neurotransmetteur acétylcholine (ACh) (neurotransmetteur du système nerveux central et périphérique), a été constaté dans le cerveau des patients atteints par cette maladie. Cela a été démontré de diverses manières. Les travaux de Yi *et al.*, 2006 ont montré que la toxicité des insecticides est due à une inhibition progressive de l'AChE dans les tissus nerveux conduisant à l'accumulation de l'ACh d'où la neurotoxicité. Ainsi donc, ces observations sont à la base de « l'hypothèse cholinergique » qui a servi au développement de composés capables d'augmenter la transmission cholinergique en inhibant l'acétylcholinestérase (AChE), qui dégrade l'ACh dans la fente synaptique. Des travaux antérieures ont montré que les polyphénols comme les alcaloïdes, les terpénoïdes, les glucosides et les coumarines sont les principales familles de composés reconnues étant des inhibiteurs de l'AChE (Howes *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004). Cela pourrait expliquer les faibles corrélations obtenues dans cette étude, surtout avec les teneurs en flavonoïdes. Bakasso en 2009, a également montré que les bons inhibiteurs de l'AChE est à chercher du côté des composés phénoliques. En effet il a évalué les corrélations entre l'AChE et les teneurs en phénoliques, flavonoïdes et les flavonols totaux et a trouvé respectivement : $R^2 = 0,51$; $R^2 = 0,06$ et $R^2 = 0,05$. De même Lopez *et al.* en 2002 ont trouvé des inhibitions intéressantes entre les alcaloïdes et l'AChE, en évaluant les IC_{50} . Une IC_{50} de $0,10 \pm 0,01$ μM a été trouvée entre la sanguinine et l'AChE. Nos résultats sont en accord avec ceux des travaux de Bakasso, 2009 et de Lopez *et al.* en 2002.

En ce qui concerne les carboxylestérases (CES), elles représentent la famille des estérases qui hydrolysent une large variété de substrats comprenant les drogues thérapeutiques

et les xénobiotiques. Ces enzymes constituent un groupe hétérogène d'isoenzymes qui catalysent l'hydrolyse d'une large variété des esters xénobiotiques, des amides et des thioesters. Ces composés sont dominants dans le foie et jouent un rôle important dans le métabolisme et la détoxification des xénobiotiques ainsi que les composés endogènes. Il est aussi reconnu qu'ils ont un rôle protecteur contre la toxicité des organophosphorés (Bakasso, 2009). D'autres chercheurs ont rapporté que les CES sont capables d'hydrolyser les esters y compris certains médicaments comme la mépéridine, le flumazénil et des anticancéreux tels que les agents chimio-thérapeutiques (Crow *et al.*, 2008; Djeridane *et al.*, 2008).

Partant de ces constatations, la recherche de molécules biologiques qui inhiberaient cette enzyme (CES) renforceraient l'activité des insecticides sur les insectes ainsi que l'efficacité des médicaments anticancéreux. Nos deux extraits utilisés ont été actifs (plus de 30 %) sur la carboxylestérase, surtout celui de *L. camara* ($56,20 \pm 3,05$ %) qui a donné une inhibition intéressante. L'étude corrélative montre une implication des phénoliques totaux ($R^2 = 0,99$) et les teneurs en tanins ($R^2 = 0,91$). Des résultats similaires ont été obtenus par Couliadiati en 2010. En effet, il a trouvé une corrélation de 0,81 (CES et phénoliques totaux) et 0,89 (entre CES et teneurs en tanins). Dans le cadre de l'inhibition de la CES, il convient de remarquer que la meilleure activité est obtenue par *L. camara* qui a présente la plus faible proportion en tanins ($4,78 \pm 0,12$ %). En plus de sa plus faible teneur en phénoliques totaux, *L. camara* a présenté la plus forte inhibition de la CES. Ce qui peut expliqué cette forte activité inhibitrice est la teneur des flavonoïdes. *L. camara* a donné une proportion en flavonoïdes de $82,55 \pm 1,03$ % contre $27,46 \pm 0,52$ pour *L. chevalieri*. Il a été rapporté par Bakasso en 2009 de la corrélation de 0,98 entre les flavonoïdes et la CES. La part des flavonols dans les flavonoïdes a été de 68 %. D'autres chercheurs qui ont travaillé sur les plantes médicinales ont relié l'activité inhibitrice de la CES à leur teneur en flavonoïdes (Stocker *et al.* 2004; Djeridane *et al.*, 2007). Ces travaux sont en accord avec nos résultats obtenus.

Dans le cadre de l'activité anti-XO, Wu et Ng (2008) ont indiqué qu'elle est une enzyme qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et qui de plus catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique, produisant ainsi des espèces oxygénées réactives telles que les radicaux superoxydes et les peroxydes d'hydrogènes. Cette enzyme est impliquée dans l'étiologie de la goutte qui se caractérise par le dépôt de l'acide urique au niveau des articulations, entraînant ainsi des inflammations articulaires (Sweeney *et al.* 2001; Gagliardi *et al.*, 2009; Iswantini *et al.*, 2009; Havlik *et al.*, 2010). C'est aussi une importante

source biologique des radicaux libres qui contribuent aux dommages des tissus. Ces radicaux sont impliqués dans le processus de plusieurs pathologies telles que le vieillissement, le cancer, les inflammations et l'athérosclérose. Chez l'homme, la XO est normalement retrouvée dans le foie et est absente dans le sang. Pendant les dommages sévères du foie, la XO est libérée dans le sang, diagnostiqué la XO dans le sang est un test de confirmation des dommages du foie.

Les résultats sur l'inhibition de la XO n'ont pas donné de valeurs intéressantes comparées à celui de l'allopurinol ($96,38 \pm 0,59$ %) couramment utilisé comme référence. Le plus fort pourcentage d'inhibition est obtenu avec *L. camara* ($20,76 \pm 2,67$ %). Selon la quantification polyphénolique, seule la teneur en flavonoïdes totaux ($8,28 \pm 0,77$ EQ/ 100mg extrait) pourrait justifier cette inhibition. Les travaux antérieurs d'autres chercheurs ont prouvés que les flavonoïdes sont des bons inhibiteurs de la xanthine oxidase (Cos *et al.*, 1998; Nagao *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2002; Muraoka et Miura, 2004). Ainsi Méda en 2010 a trouvé une corrélation de $R^2 = 0,8573$ entre les teneurs en flavonoïdes totaux et la XO. D'autres travaux ont également démontré que les flavonoïdes et principalement la rutine et la quercétine diminuaient le taux sérique de l'urée chez des souris hyperurémiques (Han, 2009). Nagao *et al.* (1999) ont montré que la lutéoline et la rutine inhibent le radical DPPH avec respectivement des IC_{50} de $0,96 \mu\text{M}$ et $46,8 \mu\text{M}$. La rutine et 2 dérivés lutéolines ont été mise en évidence dans les extraits de *L. chevalieri* en CCM et en HPLC-DAD. Cependant *L. chevalieri* a présenté la plus faible activité inhibitrice comparée à l'extrait de *L. camara*.

Par contre les travaux de Couliadiati en 2010, montre que l'inhibition de la XO sont corrélées par les phénoliques totaux et les teneurs en tanins dont les meilleures corrélations sont respectivement $R^2 = 0,89$ et $R^2 = 0,98$. La plus faible corrélation qu'il ait obtenue avec les différentes fractions de chacune de ces trois espèces est $R^2 = 0,65$. Mais la plus forte corrélation obtenue avec les teneurs en flavonoïdes est de $R^2 = 0,35$. De même les travaux d'Owen et Johns, 1999 ont montré que le composé polyphénolique tel que l'acide *p*-coumarique inhibait la xanthine oxidase. En effet la XO est une métallo-enzyme ayant 2 Mo^{2+} et 8 Fe^{2+} dont le molybdène constitue le site actif. Pour continuer sa fonction catalytique, le molybdène perd deux électrons qui seront repris par la chaîne de transport et acheminés vers l'accepteur final (deux protéines à fer et à soufre, puis par une molécule de FADH_2). Ainsi les chélateurs des cations divalents tels que les polyphénols peuvent également inhiber la fonction catalytique en empêchant la transformation de l'hypoxanthine en xanthine et de la

xanthine en acide urique. Notons qu'il est aussi reconnu que les inhibiteurs de la XO peuvent être utilisés dans le traitement des hépatites ainsi que les tumeurs du cerveau.

Au regard des potentialités inhibitrices, les deux espèces sont indiquées pour la recherche molécules biologiques qui incriminent les enzymes de l'étude. *L. camara* pour ce qui concerne la goutte, les troubles hépatiques et les rhumatismes. Tandis que *L. chevalieri* va concerner les pathologies qui impliquent la GST, l'AChE et la CES (la maladie d'Alzheimer, les maladies tumorales, les démences séniles et dans la maladie de Parkinson).

L'ensemble de ces activités pourraient justifier les nombreuses utilisations traditionnelles de *L. camara* dans les traitements des tumeurs, des rhumatismes et les pathologies du foie. Ainsi que celles de *L. chevalieri* dans les utilisations traditionnelles contre les pathologies liées au foie, les rhumatismes goutteux, les nervosités de la ménopause, les ménorragies de la ménopause, les nervosités, les hépatites, la goutte et sans être limitatif les troubles nerveux.

III. Conclusion partielle

Les investigations menées sur les activités inhibitrices des quatre enzymes (AChE, GST, CES et XO) ont donné des résultats intéressants. Surtout l'extrait méthanolique de *L. camara* qui a donné un pourcentage d'inhibition supérieure à 50 % sur la CES à une concentration de 100 µg/ mL. Cependant, *L. chevalieri* reste la meilleure espèce pour la recherche d'inhibiteurs contre les pathologies liées à l'acétylcholinestérase, la glutathion-S-transférase et la carboxylestérase. A travers cette étude, il ressort que les flavonoïdes seraient plus impliqués dans les activités inhibitrices d'enzymes. La rutine identifiée dans l'extrait de *L. chevalieri* justifierait les activités observées. Au vu de ces résultats, les deux espèces de l'étude peuvent constituer des sources potentielles dans les traitements des maladies liées à ces enzymes, plus spécifiquement dans les traitements des maladies inflammatoires, de la goutte, des maladies tumorales, de la maladie d'Alzheimer ainsi que des maladies cardiovasculaires en générales.

CONCLUSION

&

PERSPECTIVES

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Cette étude a eu pour objectif de contribuer à une meilleure connaissance de la phytochimie et des activités biologiques (antioxydante, antibactérienne et inhibitrice d'enzyme) de *Lantana camara* et *Lippia chevalieri* appartenant à la famille des Verbenaceae.

Le premier volet a concerné l'investigation phytochimique. Il ressort de cette étude que nos deux plantes renferment des flavonoïdes, des acides phénols, des flavonols, des tanins, des saponosides et des stérols et triterpènes. Nous n'avons pu mettre évidence les coumarines et les anthraquinones.

De façon spécifique les coupes histochimiques ont permis de mettre en évidence les alcaloïdes dans l'extrait de *L. camara* et les tanins/polyphénoliques dans celui de *L. chevalieri*. La CCM des flavonoïdes et acides phénols a permis d'identifier la rutine dans l'extrait de *L. chevalieri* et l'acide caféique dans les extraits méthanoliques de deux plantes. Les différents dosages effectués montrent que les deux plantes sont pauvres en composés polyphénoliques. La plus forte valeur étant obtenue avec l'extrait de *L. chevalieri* ($17,88 \pm 0,90$ mg EAG/100 mg extrait). Notons que cette plante est riche en tanins (7,62 mg EAT/100 mg extrait) par rapport à sa teneur phénoliques totaux.

La méthode d'analyse par HPLC-DAD nous a permis de mettre en évidence 27 flavonoïdes et acides phénols dans les deux plantes et dans trois types de fractions (fraction d'acétate d'éthyle 12,5 et 50 % et la fraction aqueuse 12,5 %). Ainsi on a mis en évidence 11 dérivés d'acide cinnamique, 2 dérivés d'acide rosmarinique, 2 acides phénols ainsi que 2 dérivés lutéoline, 1 dérivé saponarique et 8 flavones dans les deux extraits de plantes.

Le deuxième volet qui a concerné l'étude biologique, portait sur la détermination des activités antioxydantes, antibactérienne ainsi que le potentiel inhibiteur de la glutathion-S-transférase, l'acétylcholinestérase, la carboxylestérase et la xanthine oxydase. L'activité antioxydante a montré une inhibition intéressante des extraits méthanoliques de nos deux plantes. Le meilleur potentiel antioxydant a été obtenue avec *L. chevalieri* et ce sur les deux méthodes utilisées. Ces activités antioxydantes sont liées à leur teneur en polyphénoliques, surtout aux tanins et dans la moindre mesure aux flavonols.

Concernant les activités antibactériennes, notre étude montre un large spectre d'activité antimicrobienne de l'extrait de *L. camara*. En effet l'extrait de cette plante s'est montré actif sur les bactéries à gram négatifs que sur celles à gram positifs. Plus particulièrement *S. flexneri*, *Pantoea* sp, *K. pneumoniae*, *E. coli* ATCC 5922, *S. aureus* ATCC et *B. cereus* ont été sensible à l'extrait de *L. camara*. Les analyses montrent que les activités antimicrobiennes observées seraient liées aux teneurs en flavonoïdes et en flavonols.

Nous retenons des activités enzymatiques que les deux extraits sont plus actifs sur la Carboxylestérase avec $56,20 \pm 3,05\%$ et $37,68 \pm 1,18\%$, respectivement sur *L. camara* et *L. chevalieri*. Mais que *L. chevalieri* inhibe à plus de 35% la CES, la GST et l'ACHé, contrairement à *L. camara* qui inhibe seul la CES.

Les activités antioxydantes, antibactériennes et inhibitrice d'enzymes vues peuvent justifier et encourager l'utilisation de ces deux plantes dans les traitements des tumeurs, les pathologies du foie, les rhumatismes goutteux, les nervosités de la ménopause, les maladies respiratoires, les nervosités, les hépatites, les dysenteries bacillaires, les infections urinaires et les troubles nerveuses.

Les conclusions de cette étude nous permettent de dégager un certains nombre de perspectives quant à la suite à donner à ce travail. Ainsi, nous envisageons :

- ✚ Isoler et identifier les composés mis en évidence par la HPLC/DAD afin d'évaluer leurs propriétés biologiques,
- ✚ Isoler et identifier les molécules antioxydantes ainsi que les inhibiteurs des enzymes étudiées,
- ✚ Tester *in vivo* la toxicité des molécules isolées,
- ✚ Approfondir les études de *L. chevalieri* et *L. camara* pour leurs capacités antioxydantes et/ou antibactériennes,
- ✚ Mesurer la capacité de *L. chevalieri* et /ou autres Verbenaceae à augmenter le taux des superoxydes dismutase (SOD), catalase et glutathion dans l'organisme humain.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBILOGRAPHIQUES

1. **Abena A.A., Ngondzo-Kombeti G.R., Bioka D., (1998).** Psychopharmacologic properties of *Lippia multiflora*. *Encephale*, **24**, 449-454.
2. **Abdala L.R. & Seeligmann P. (1995).** Flavonoids in *Tagetes zipaquirensis* and their chemosystematic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, **23**, 871-872.
3. **Afolayan A.J. et Meyer J.J. (1997).** The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. *Journal of Ethnopharmacology*, **57**:177-1781.
4. **Agra M.F., Baracho G.S., Nurit K., Basilio I.J.L.D., Coelho V.P.M. (2007).** Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, **111**; 383-395.
5. **Aligiannis N., Kalpotzakis E., Mitaku S., Chinou I.B. (2001).** Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**: 4168-4170.
6. **Almaraz-Abarca N., Campos M.G., Reyes .J.A.A. Jiménez N.N., Corral J.H. and Valdez S.G. (2007).** Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *Journal of Food Composition and Analysis*, **20**, 119-124.
7. **Almaraz-Abarca N., Delgado-Alvarado E.A., Hernández-Vargas V., Ortega-Chávez M., Orea-Lara G., Cifuentes-Díaz de León A., Ávila-Reyes J.A. & Muñoz-Martínez R. (2009).** Profiling of phenolic compounds of somatic and reproductive tissues of *Agave durangensis* Gentry (Agavaceae). *American Journal of Applied Sciences*, **6**, 1076-1085.
8. **Amaral S. Mira L. Nogueira J.M.F. Silva A.P. & Florencio M.H. (2009).** Plant extracts with anti-inflammatory properties. A new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure-antioxidant activity relationships. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **17** (5), 1876-1883.

9. Anselmi C., Bernardi F., Centini M., Gaggelli E., Gaggelli N., Valensin D. & Valensin G. (2005). Interaction of ferulic acid derivatives with human erythrocytes monitored by pulse field gradient NMR diffusion and NMR relaxation studies. *Chemistry and Physics of Lipids*, **134**, 109-117.
10. Arbonnier M. (2002). *Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest*. Ed. ISBN CIRAD, Pont-sur-Yonne, 392, 574 p.
11. Arias M.E., Gomez J.D., Cudmani N.M., Vattuone M.A. and Isla M.I. (2004). Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill. ex Hook et Arn, *Life Sciences*, **75**: 191-202.
12. Ashidate K., Kawamura M., Mimura D., Tohda H., Miyazaki S., Teramoto T., Yamamoto Y. & Hirata Y. (2005). Gentisic acid, an aspirin metabolite, inhibits oxidation of low-density lipoprotein and the formation of cholesterol ester hydroperoxydes in human plasma. *European Journal of Pharmacology*, **513**, 173-179.
13. Awah F.M., Uzoegwu P.N., Oyugi J.O., Rutherford J., Ifeonu P., Yao X-J., Fowke K.R., Eze M.O. (2010). Free radical scavenging activity and immunomodulatory effect of *Stachytarpheta angustifolia* leaf extract. *Food Chemistry*, **119**: 1409 – 1416.
14. Bakasso S. (2009). *Etudes phytochimiques et potentialités biologiques de cinq espèces d'Indigofera (Fabaceae) utilisées en médecine traditionnelle au Burkina Faso*. Thèse de Doctorat unique, Université de Ouagadougou, 135p.
15. Balendiran G.K., Dabur R. et Fraser, D. (2004). The role of glutathione in cancer. *Cell Biochemistry and Function*, **22**, 343-352.
16. Barton D.H.R., Kirby G.W., Taylor J.B. and Thomas G.M. (1963). Phenol oxidation and biosynthesis. Part VI. The biogenesis of Amaryllidaceae alkaloids. *Journal of Chemical Society*, 4545-4558.
17. Barre J.T., Bowden B.F., Coll J.C., Jesus J., Fuente V., Janairo G.C. and Ragasa C.Y. (1997). A bioactive triterpenoid from *Lantana camara*. *Phytochemistry*, **4**, 321-324.
18. Bassène, E. (2012). Initiation à la recherche sur les Substances Naturelles. Extraction-Analyse-Essais Biologiques. *Presses Universitaires de Dakar*. 144p.

19. **Bassolé I.N.H., Ouattara A.S., Nebie R., Ouattara .A.T., Kabore Z.I. and Traore S.A. (2003).** Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry*, **62**, 209-212.
20. **Baydar H., Sagdiç O.,Özkan, G. and Karadogan T. (2004).** Antibacterial activity and composition of essential oils from Origanum, Thymbra and Sajureja species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, **15**, 169-172.
21. **Bennys K. (2009).** Nouvelles thérapeutiques et optimisation des traitements disponibles. Praticien Hospitalier. Alzheimer, 79p.
22. **Boligon A.A., Peaira R.P., Feltrin A.C., Machado M.M., Javonic V., Rocha J.B.T. & Athayde M.L. (2009).** Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark, of *Scutia buxifolia* Reiss. *Bioresource Technology*, **100**, 6592-6598.
23. **Bouquet A. (1969).** Féticheurs et médecines traditionnelles du Congo (Brazzaville). Mémoires O.R.S.T.O.M. N° 36, 305p.
24. **Brown J.E., Khodr H., Hider R.C., Rice-Evans C. (1998).** Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions. *Biochemical Journal*, **330**: 1173-1178.
25. **Bruneton J. (1993).** *Pharmacognosie: phytochimie-plantes médicinales*. 2^e. éd. Tec. et Doc. Lavoisier, Paris, 915 p.
26. **Burt S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, **94**, 223-253.
27. **Buyck J. (2008).** Rôles du calcium et des transports ioniques de l'épithélium des voies aériennes dans la réponse à l'agression septique par *Pseudomonas aeruginosa*. Université du Droit et de la santé – Lille 2 Ecole Doctorale Biologie – Santé de Lille 175p.
28. **Cadenas E., Boveris A., Ragan C.I. and Stoppani A.O. (1977).** Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **180**, 248-257.

29. **Cai Y-Z., Sun M., Xing J., Luo Q., Corke H. (2006).** Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences* **78**: 2872-2888.
30. **Campos M.G. (1997).** Caracterização do pólen apícola pelo seu perfil em compostos fenólicos e pesquisa de algumas actividades biológicas. Dissertação de candidatura au grau de Doutor. Universidade de Coimbra, Portugal.
31. **Campos M.G., Markham K.R. (2007).** Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra: flavones, flavonols and phenolic acids. University of Coimbra, Portugal.
32. **Carnat A., Carnat A.P., Fraisse D., Ricoux L., Lamaison J.L. (2004).** The aromatic and polyphenolic composition of Roman Camomile Tea. *Fitoterapia*, **75**, 32-38.
33. **Cavalli J-F. (2002).** Caractérisation par CPG/IK, CPG/MS et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar. Université de Corse Pascal Paoli. Thèse de doctorat. 230p.
34. **Centre d'information sur le médicament. Bulletin d'information. (2006).** Evaluation comparative des inhibiteurs de l'Acétylcholinestérase dans la démence de type Alzheimer. Centre Hospitalier Universitaire de Quebec. Volume **6**, numéro 2, 6p.
35. **Céspedes C.L., Valdez-Morales M., Avila J.G., El-Hafidi M., Alarcon J. & Paredes Lopes O. (2010).** Phytochemistry profile and antioxidant activity of Chilean wild black-berry fruits, *Aristotella chilensis* (Mol) Stuntz (Elaeocarpaceae). *Food Chemistry*, **119**, 886-895.
36. **Chang C. Yang M. Wen H., & Chein J. C. (2002).** Estimation of total flavonoids content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and Drug Analysis*, **10** (3): 178-182.
37. **Chowdhury J.U., Nandi N.C. and Bhuiyan N.I. (2007).** Chemical composition of leaf essential oil of *Lantana camara* L. from Bangladesh. Short communication. *Bangladesh Journal of Botany*, **36**(2): 193-194.

38. Ciulei I. (1982). *Practical manuals on the industrial utilization of chemical and aromatic plants. Methodology for analysis of vegetable drugs* Ed. ministry of chemical industry, Bucharest. 67p.
39. Ciz M., Cizova H., Denev P., Kratchanova M., Slavov A. and Lojek A. (2010). Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control*, **21**, 518-523.
40. Cohen Y. (1997). *Les antiinflammatoires, in Abrégé de pharmacologie. Ed.4 Masson, Paris, 465 P.*
41. Cole G.M., Lim G.P., Yang F., Teter B., Begum A., Ma Q., Harris-White M.E. & Frautschy A. (2005). Prevention of Alzheimer's disease: Omega-3 fatty acid and phenolic anti-oxidant intervention. *Neurobiology of Aging*, **26**, 133-136.
42. Compaore M., Lamien-Meda A., Mogosan C., Lamien C.E., Kiendrebeogo M., Vostinaru O., Vlase L., Ionescu C. and Nacoulma O.G. (2011). Antioxidant, diuretic activities and polyphenol content of *Stereospermum kunthianum* Cham. (Bignoniaceae). *Natural Product Research*, Vol. 25, No. 19, 1777-1788.
43. Corvec S. (2009). Anatomie fonctionnelle bactérienne. Laboratoire de Bactériologie de Nante. UFR de médecine, 32p.
44. Cos P., Vlietinck A.J.; Vanden Berghe D., Maes L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, **106**, 290-302.
45. Cos P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Poel, B.V., Pieters, L., Vlietinck, A.J. and Berghe, D.V. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and super oxide scavengers. *Journal of Natural Products*, **61**, 71-76.
46. Cotelle N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **1**: 569-590.
47. Couliadiati H.T. (2010). Phytochimie et activités biologiques d'extraits de trios (3) Espèces de Combretaceae du Burkina Faso: *Combretum acutum* Laws; *Combretum*

- nioroens* Aubrex. Ex Keay et *Combretum sericeum* G. Don. Thèse unique de doctorat, 148p.
48. **Coyen Y. (1990).** *Les médiateurs chimiques de l'inflammation, in Abrégé de pharmacologie. Ed. 3 Masson, Paris, 333-350.*
49. **Cronquist A. (1988).** *The Evolution and Classification of Flowering Plants.* The New York Botanical Garden, New York, éd. 2.
50. **Crow J.A., B.L. Middleton, A. Borazjani, M.J. Hatfield, P.M. Potter and M.K. Ross, (2008).** Inhibition of carboxylesterase 1 is associated with cholesteryl ester retention in human THP-1 monocyte/macrophages. *Biochemistry et Biophysica Acta*, **1781**; 643-654.
51. **Dacosta Y. (2003).** Les phytonutriments bioactifs. *Ed Yves Dacosta. Paris. 317 p.*
52. **Direction Générale de l'Information et des Statistiques Sanitaires/Ministère de la Santé. (2009).** *Tableau de bord santé 2008*, Burkina Faso, 57p.
53. **Djeridane A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Maamrim, S., Djireb, F., and Stocker, P. (2006).** Phenolic extracts from various Algerian plants as strong inhibitors of porcine liver carboxylesterase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **21**, 719-726.
54. **Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna, Stocker P., Vidal N., (2007).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, **97**, 654-660.
55. **Djeridane A., Brunel J.M., Vidal N., Yousfi M., Ajandouz E.H., Stocker P. (2008).** Inhibition of porcine liver carboxylesterase by a new flavones glycoside isolated from *Deverra Scoparia*. *Chemico-Biological Interactions*, **172**; 22-26.
56. **Dua V.K., Pandey A.C. and Dash A.P. (2010).** Adulticidal activity of essential oil of *Lantana camara* leaves against mosquitoes. *Indian Journal of Medical Research*, **131**, 434-439.
57. **Ellman G. L., Lourtney D. K., Andres V. and Gmelin G. (1961).** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, **7**, 88-95.

58. Enayati A.A., Ranson H. and hemingway J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, **14**, 3-8.
59. Essawi T. et Srour M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **70**: 343-349.
60. **Ethnopharmacologia (2009)**. Pratiques traditionnelles de santé à travers le monde. *Bulletin de la Société Française d'Ethnopharmacologie et de la Société Européenne d'Ethnopharmacologie*. N° 44, 91p. ISSN: 1261-4572.
61. **European Commission. (2000)**. Reference method for the tannins quantification. *Journal Officiel des Communautés Européennes*, L **197**, 18-20.
62. Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. and Abdelly C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, **331**: 372-379.
63. Feng Q.L., Kenneth G.D., Anthony S.D.P., Tim R.L., Arthur R., Tomkins B.L., Zheng S. and Subba R.P. (2001). Developmental expression and stress induction of glutathione S-transferases in the spruce budworm, *choristoneura fumiferana*. *Journal of Insect Physiology*, **47**, 1-10.
64. Ferraz Filha, Z.S, Vitolo, I.F., Fietto, L.G., Lombardi, J.A. and Saude-Guimaraes, D.A. (2006). Xanthine oxidase inhibitory activity of *Lychnophora* species from Brazil ("Arnica"). *Journal Ethnopharmacology*, **107**, 79-82.
65. Ferreira A., Proença C., Serralheiro M. L. M., Araujo M. E. M. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal Ethnopharmacology*, **108**(1), 31-37.
66. Forestieri A.M., Monforte M.T., Ragusa S., Trovato A., Iauk L. (1996). Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activity in Rodents of Plant Extracts used in African Medicine, *Phytotherapy Research*, **10**, 100-106.
67. Foster G.M. & Anderson B.G. (1978). *Medical Anthropology*, John Wiley and Sons Ltd, New York.

68. **Franciosa H., Bergé JB. (1995).** Glutathione S-transferases in housefly (*Musca domestica*): location of GST-1 and G S T-2 families. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, **25**, 311-317.
69. **Fu L., Xu B-T., Xu X-R., Qin X-Q., Gan R-Y. and Li H-B. (2010).** Antioxidant Capacities and Total Phenolic Contents of 56 Wild Fruits from South China. *Molecules*, **15**, 8602-8617.
70. **Fuhrman B., Lavy A., Aviram M. (1995).** Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *American Journal of Clinics Nutrition*, **61**: 549-554.
71. **Fukami J., Shishido T. (1966).** Nature of a soluble, glutathione-dependent enzyme system active in cleavage of methyl parathion to desmethyl parathion. *Journal of Economic Entomology*, **59**, 1338-1349.
72. **Gagliardi A.C.M., M.H. Miname and R.D. Santos, (2009).** Uric acid: A marker of increased cardiovascular risk. *Atherosclerosis*, **202**; 11-17.
73. **Ganjewala D., Sam S., Khan K.H. (2009).** Biochemical compositions and antibacterial activities of *Lantana camara* plants with yellow, lavender, red and white flowers. *EurAsia Journal of BioSciences*, **3**, 69-77.
74. **Garait B. (2006).** Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la Glisodin. Université Joseph Fourier-Grenoble 1. Sciences-Technologie-Santé. 196p.
75. **Garnier M., Delamare V., Delamare J. et Delamare T. (2006).** Dictionnaire illustré des termes de médecine. 29^{ème} édition. Maloine, 1048p.
76. **Gasquet, M., Delmas F., Timon-David P., Keita A., Guindo M., Koita N., Diallo D., Doumbo O., (1993).** Evaluation *in vitro* and *in vivo* of a traditional antimalarial, „Malarial-5. *Fitoterapia*, **64**, 423-426.
77. **Geissler P.W., Harris S.A., Prince R.J., Olsen A., Odhiambo R.A., Oketch-Rabah H., Madiega P.A., Andersen A., Mølgaard P. (2002).** Medicinal plants used by Luo mothers and children in Bondo district, Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, **83**, 39-54.

78. Ghisalberti E.L. (2000). *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Fitoterapia*, **71**: 467-486.
79. Gildermeister E., Hoffmann F. (1961). Die Ätherischen Öle, vol. VI. Berlin: Akademie-Verlag.
80. Granner D.K., Mayes P.A., Murray R.K., Rodwell V.W. (1989). *Précis de Biochimie*. 7^e édition, Québec/Paris.
81. Grange J.M. & Davey R.W. (1990). Antibacterial properties of propolis. *J. R. Soc. Med.* **83**, 159-160.
82. Greenham J., Harborne J.B. and Williams C.A. (2003). Identification of Lipophilic Flavones and Flavonols by Comparative HPLC, TLC and UV Spectral Analysis. *Phytochemical Analysis*, **14**, 100-118.
83. Gülçin I. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, **217**, 213-220.
84. Gurib-Fakim A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, **27**, 1-93.
85. Gursoy N, Sarikurkcu C., Cengiz M., Solak M. H. (2009). Antioxidant activities, metal contents, total phenolics and flavonoids of seven *Morchella* species. *Food and Chemical Toxicology*, **47** (9): 2381-2388.
86. Habdous M., Vincent-Viry M., Visvikis S. and Siest G. (2002). Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. *Clinica Chimica Acta*, **326**, 131-142.
87. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, **249**; 7130-7139.
88. Halliwell B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence. *Lancet*, **344** (8924), 721-724.
89. Hamilton-Miller J.M.T., Shah S. (2000). Activity of the tea component epicatechin gallate and analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **46**: 852-853.

90. Han Y. (2009). Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *International Immunopharmacology*, **9**, 207-211.
91. Hanasaki Y., Ogawa, S., Fukui, S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biological Medicine*, **16**: 845-850.
92. Haraguchi H., Tanimoto K., Tamura Y., Mizutani K. & Kinoshita T. (1998). Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*, **48**, 125-129.
93. Harborne J.B., Williams, C.A. (2000). Advances in Flavonoid Research since 1992. *Phytochemistry*, **55**, 481-504.
94. Harikrishna D., Appa Rao A.V.N., Prabhakar M.C. (2004). Pharmacological investigation of a flavonoid glycoside. *Indian Journal of Pharmacology* **36**: 244-250.
95. Haubruge E. & Amichot M. (1998). Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. *Biotechnology Agronomy Society and Environment*, **2** (3), 161-174.
96. Havlik J., Huebra R.G., Hejtmankova K., Fernandez J., Simonova J., Martin Melich M., Vojtech Rada V. (2010). Xanthine oxidase inhibitory properties of Czech medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **132**, 461-465.
97. Hayeshi R, Mutingwende I., Mavengere W., Masiyanise V., Mukanganyama S. (2007). The inhibition of human glutathione S-transferases activity by plant polyphenolics compounds ellagic acid and curcumin. *Food and Chemical Toxicology*, **45**, 286-295.
98. Herrero A. and Barja G. (2000). Localization of the Site of Oxygen Radical Generation inside the Complex I of Heart and Non synaptic Brain Mammalian Mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **32**, 609-615.
99. Hilliard J.J., Krause H.M., Bernstein J.I., et autre (1995). A comparison of active site binding of 4- quinolones and novel flavone gyrase inhibitors to DNA gyrase. *Advances in Experimental Medical and Biology*, **390**: 59-69.

100. **Hinneburg I., Dorman, H.J.D. and Hiltunen, R. (2006).** Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food chemistry*, 97, 122-129.
101. **Howes M.R., Perry, N.S.L. and Houghton, P.J. (2003).** Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Phytotherapy Research*, 17, 1-18.
102. **Ibarra C., Grillo M.P., Bello M.L., Nucettelli M., Bammler T.K. and Atkins W.M. (2003).** Exploration of in vitro pro-drug activation and futile cycling by glutathione S-transferases: thiol ester hydrolysis and inhibitor maturation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 414, 303-311.
103. **Institut National de la Statistique et de la Démographie (2000).** *Profil et évolution de la pauvreté au Burkina Faso*, Direction des Statistiques Générales, Etude et Statistique Nationale, Ouagadougou, 145p.
104. **Irvine F.R. (1961).** Woody plants of Ghana. London: Oxford University Press.
105. **Iswantini D., L.K. Darusman and R. Hidayat, (2009).** Indonesian *Sidaguri (Sida rhombifolia L.)* as antigout and inhibition kinetics of flavonoids crude extract on the activity of xanthine oxidase. *Journal of Biological Sciences*, 9: 504-508.
106. **Itagaki S., Kurokawa T., Nakata C., Saito Y., Oikawa S., Kobayashi M., Hirano T. & Iseki K. (2009).** In vitro and in vivo antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibition. *Food Chemistry*, 114, 466-471.
107. **Jassim S.A. & Naji M.A. (2003).** Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Applied Microbiology*, 95 (3): 412-27.
108. **Jouzeau J.Y., Daouphars M., Benani A., Netter P. (2004).** Pharmacologie et classification des inhibiteurs de la cyclooxygénase. *Gastroenterology Clinical and Biological*, 28, C7-C17.
109. **Jovanovic S.V., Steenken S., Simic M.G., Hara Y. (1998).** Antioxidant properties of flavonoids. *AHDIEQ Journal*. 7: 137-161.
110. **Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A. et Stevens P. (2002).** Botanique Systématique. Une perspective phylogénétique. 420p.

111. **Kanta S. (2008).** *Antibiothérapie dans le service de Pédiatrie du centre hospitalier universitaire Gabriel Touré.* De janvier à juin 2007. Diplôme d'Etat de Pharmacie. Université de Bamako, 54p.
112. **Katsube T., Imawaka N., Kawano Y., Yamazaki Y., Shiwaku K. & Yamane Y. (2006).** Antioxidant flavonolglycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Food Chemistry*, **97**, 25-31.
113. **Kerharo J., Adam J.G. (1974).** *La pharmacopée Sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques.* Editions Vigot Frères. 1012 p.
114. **Kiendrebeogo M. (2005).** *Phytochimie et propriétés biologiques de Striga hermonthica (Del) Benth. (Scrophulariaceae).* Thèse de Doctorat unique, Université de Ouagadougou, 179p.
115. **Kono K., Tatara I., Takeda S., Arakawa K., Hara Y. (1994).** Antibacterial activity of epigallocatechin gallate against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Kansenshogaku Zasshi*. **68**: 1518–1522.
116. **Korsloot A., van Gestel, C.A.M. and van Straalen, N.M. (2004).** Environmental stress and cellular response in arthropods, *CRCPress, États-Unis*, 197 p.
117. **Ksouri R., Falleh H., Megdiche W., Trabelsi N., Mhamdi B., Chaieb K., Bakrouf A., Magné C. and Abdelly C. (2009).** Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology*, **4**: 2083-2091.
118. **Kujungiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Y., Bankova V., Christov R. and Popov S. (1999).** Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, **64**: 235-240.
119. **Kushnareva Y., Murphy A.N. and Andreyev A. (2002).** Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Journal of Biochemistry*, **368**, 545-553.
120. **Lamien-Meda A., Lamien, C.E., Compaoré, M.M.Y., Meda, R.N.T., Kiendrebeogo, M., Zéba, B., Millogo, J.F. and Nacoulma, O.G. (2008).** Polyphenol content and

- antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. *Molecules*, **13**: 581-594.
- 121. Laughton M.J., Evans P.J., Moroney M.A. et autre (1991).** Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. *Biochemical Pharmacology*, **42**: 1673-1681.
- 122. Lee J.H., Lee, K.T., Yang, J.H., Baek, N.I., Kim, D.K. (2004).** Acetylcholinesterase inhibitors from twigs of *Vaccinium oldhami* Miquel. *Archives of Pharmacal Research*, **27**, 53-56.
- 123. Leung A.Y., & Foster S. (1996).** Encyclopaedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics (2nd ed.). New York: John Wiley & Sons, pp. 232-233.
- 124. Li R.W., Lin G. D., Myers S.P. and Leach D.N. (2003).** Anti-inflammatory activity of Chinese medicinal vine plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **85**, 61-67.
- 125. Lin C.M., Chen, C.S., Chen, C.T., Liang, Y.C. et Lin, J.K. (2002).** Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **294**, 167-172.
- 126. Liu Y., Fiskum G. and Schubert, D. (2002).** Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Neurochemistry*, **80**: 780-787.
- 127. Lopez S., Batisda J., Viladomat F. and Codina C. (2002).** Acetylcholine inhibitory activity of some Amarayllidaceae alkaloids and anrcissus extracts. *Life Sciences*, **71**, 251-2529.
- 128. Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B. (1970).** The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, New York.
- 129. Mahato S.B., Sahu N.P., Roy S.K. & Sharma O.P. (1994).** *Tetrahedron*, **50**, 9439.
- 130. Mahmood N., Pizza C., Aquino R. et autre (1993).** Inhibition of HIV infection by flavonoids. *Antiviral Research*, **46** (7): 1257-1271.
- 131. Manzi P., Marconi S., Aguzzi A., (2004).** Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. *Food Chemistry* **84**: 201-206.

132. Marc F., Davin A., Deglène-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M. and Fritsch P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Medecine/Sciences*, 20, 458-463.
133. Méda N-T.R. (2010). Etude phytochimique et activités biologiques des galles et des feuilles de *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. (Balanitaceae) utilisées en médecine traditionnelle au Burkina Faso. 154p.
134. Meda A. (2005). *Utilisations thérapeutiques des produits de la ruche, étude phytochimique et activités biologiques des miels du Burkina Faso*. Thèse de Doctorat, Université de Ouagadougou, 139p.
135. Menut C., Lamaty G., Samate D., Nacro M. and Bessiere, J-M. (1993). Contribution à l'étude des *Lippia* africaines: constituants volatils de trois espèces du Burkina Faso. *Revista Italiana Eppos*, 11, 23-29.
136. Mevy J.P., Bessiere J.M., Dherbomez M., Millogo J. and Viano J. (2007). Chemical composition and some biological activities of the volatile oils of a chemotype of *Lippia chevalieri* Moldenke. *Food Chemistry*, 101, 682–685.
137. Middleton E.J. (1998). Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 439: 175-182.
138. Middleton E, Dagger J., Kandaswami C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications on inflammation, heart disease and cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*, 52 (4), 673-751.
139. Mukherjee T., (1991). Antimalarial herbal drugs. A review. *Fitoterapia*, 62, 197-204.
140. Mukherjee P.K., Kumar V., Mal M. and Houghton P.J. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14, 289-300.
141. Muraoka S. et Miura T. (2004). Inhibition of xanthine oxidase by phytic acid and its antioxidative action. *Life Sciences*, 74, 289-300.
142. Mwangi J.W., Addae-Mensah I., Muriuki G., Munavu R., Lwande W., Hassanali A. (1992). Essential oils of *Lippia* species in Kenya. IV. Maize weevil (*Sitophilus zeamais*) repellancy and larvicidal activity. *International Journal of Pharmacognosy*, 30, 9-16.

143. **Nacoulma O.G. (1996).** *Plantes médicinales et Pratiques médicales Traditionnelles au Burkina Faso: cas du plateau central T1&T2.* Thèse Doctorat d'Etat ès Sciences Naturelles. Université de Ouagadougou, 242 et 285.
144. **Nagata K., Hirai K.I., Koyama J., Wada Y. and Tamura T. (1998).** Antimicrob Agents Chemother; 42: 700.
145. **Nagao A., M. Seki and H. Kobayashi, (1999).** Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Biosciences Biotechnology and Biochemistry*, **63** (10); 1787-1790.
146. **Newman D.J., Cragg G.M. and Snader K.M. (2003).** Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981- 2002. *Journal of Natural Products*, **66**, 1022-1037.
147. **N'guessan K., Soro D. & Amon A.D.E. (2011).** Plantes utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement des maladies cardiovasculaires, en pays Abbey et Krobou, dans le Sud de la Côte-d'Ivoire. *Phytothérapie*, **9**, 199-208.
148. **Nikiéma W.P.R. (2005).** Propriétés Pharmacochimiques de *Calotropis procera* ait. (Asclepiadaceae) récolte au mali : étude préclinique des effets anti- inflammatoires et antimicrobiens des extraits des écorces de racines. 162p.
149. **Nsimba R.Y., Kikuzaki H. and Konishi Y. (2008).** Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus spp.* seeds. *Food Chemistry*, **106**, 760-766.
150. **Nuengchamnon N., Hermans-Lokkerbol A. and Ingkaninan K. (2004).** Separation and Detection of the Antioxidant Flavonoids, Rutin and Quercetin, Using HPLC Coupled on-line With Colorimetric Detection of Antioxidant Activity. *Naresuan University Journal*, 12(2): 25-37.
151. **Ojala T. (2001).** *Biological screening of plant coumarins.* Academic Dissertation, University of Helsinki, 62p.
152. **OMS (2002).** *Stratégie de l'OMS pour la Médecine Traditionnelle pour 2002-2005.* WHO/EDM/TRM/2002.1, 78p.
153. **Orhan I., Sener B., Choudhary M.I., Khalid A. (2004).** Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **91**, 57-60.

154. **Ouattara F.O. (2005).** Traitement des infections sexuellement transmissibles au Mali: Etude de la phytochimie et des activités Biologiques de *Annona senegalensis* (Annonaceae) et de *Stachytarpheta angustifolia* Valh (Verbenaceae). Université de Bamako, 237p.
155. **Owen P.L. et Johns T. (1999).** Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*, **64**, 149-160.
156. **Panaira L. (2006).** Les techniques chromatographiques : orientées sur les matériaux composites. *Conférences Eurocopter*, 13p.
157. **Park K.M., Kwon O.T., Ahn S.M., Lee J.H. and Chang P.-S. (2010).** Characterization and optimization of carboxylesterase-catalyzed esterification between capric acid and glycerol for the production of 1-monocaprin in reversed micellar system. *New Biotechnology*, **27**, Number **1**: 46-52.
158. **Pass M.P. (1991).** Poisoning of livestock by *Lantana* plants. In: Keeler RF, Tu AT, editors. Handbook of natural toxins, vol. VI, toxicology of plants and fungal compounds. New York: Marcel Dekker, 297-311.
159. **Pascual M. E., Slowing K., Carretero E., Sanchez Mata D., & Villar A. (2001).** *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, **76**, 201–214.
160. **Patil S.M., Kadam V.J. and Ghosh R (2009).** *In vitro* antioxidant activity of methanolic extract of stem bark of *Gmelina arborea* roxb. (Verbenaceae). *International Journal of PharmTech Research*, **1**, No.4, 1480-1484.
161. **Pauli A. and Schilcher H. (2004).** Specific selection of essential oil compounds for treatment of children's infection diseases. *Pharmaceuticals*, **1**, 1-30.
162. **Pelzer L.E., Guardia T., Juarez A.O., et al. (1998).** Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. *Farmaco*. **53** (6): 421-424.
163. **Penchev P., Angelov G. and Condoret J-S. (2010).** Extraction des agents antioxydants (acide rosmarinique) à partir de la mélisse (*Melissa officinalis* L.). *Revue de génie industriel*, **5**, 115-123.

164. Pithayanukul P., Ruenraroengsak P., Bavovada R., Pakmanee N., Suttisri R. and Saen-oon S. (2005). Inhibition of *Naja kaouthia* venom activities by plant polyphenols. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 527–533.
165. Raj Narayana K., Reddy M.S., Chaluvadi M.R. and Krishna D.R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacal, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33(1), 2-16.
166. Randimby F.M. (2002). Intérêt de l'HPLC et des Ptéridines fluorescentes pour estimer l'âge d'anophèles adultes de l'espèce *Anophele gambiae*. *Arch Inst Pasteur de Madagascar*, 68 (1 & 2), 86-89.
167. Read M.A., (1995). Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents Vascular. *American Journal of Pathology*, 147 (2) : 235-237.
168. Rhee I.K., Van Rijin R.M., Verpoorte R. (2003). Qualitative determination of falsepositive effects in the Acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography. *Phytochemical Analysis*, 14, 127-131.
169. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20 (7) 933-956.
170. Rice-Evans C. (1999). Screening of phenolics and flavonoids for antioxidant activity. In L. Packer, M. Hiramatsu, & T. Yoshikawa (Eds.), *Antioxidant Food Supplements in Human Health* (pp. 239-253). San Diego, CA, USA: Academic Press.
171. Rimpler H. & Sauerbier H. (1986). Iridoid glucosides as taxonomic markers in the genera *Lantana*, *Lippia*, *Aloysia* and *Phyla*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 14, 307-310.
172. Rivero-Cruz J.F. (2008). Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*. *Journal of Ethnopharmacology*, 119: 99-103.
173. Rodinbo M.R., Bencharit S. and Potter P.M. (2003). Human carboxylesterase 1: from drug metabolism to drug discovery. *Biochemical Society Transactions*, 31(3), 620-624.

174. **Ross I.A. (1999).** Medicinal plants of the world. Chemical constituents, traditional and modern medical uses. New Jersey: *Humana Press*.
175. **Sakar M.K., Engelshowe R., Tamer A.U. (1992).** Isolation and antimicrobial activity of flavonoids from *Prunus spinosa* L. flowers. *Hacettepe Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*.12 : 59-63.
176. **Sánchez de Medina F., Vera B., Gálvez J., et al. (2002).** Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life Sciences*, **70** (26): 3097-3108.
177. **Sato M., Tsuchiya H., Takase I., Kureshiro H., Tanigaki S., Iinuma M. (1995).** Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics. *Phytotherapy Research*, **9**: 509-512.
178. **Saxena M., Saxena J. and Khare S. (2012).** A brief review on: Therapeutical values of *Lantana camara* plant. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*. **Vol. 3, Issue 3, 1551-1554**
179. **Schlesier K., Harwat M., Bohm V. and Bitsh R. (2002).** Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*, **36**, 177-187.
180. **Schmassmann A., Peskar B.M., Stettler C. et al. (1998).** Effects of inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in chronic gastro-intestinal ulcer models in rats. *British Journal of Pharmacology*, **123**: 795-804.
181. **Schorderet M. (1998) :** Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Editions FRISON – ROCHE. (PARIS) et SLATKINE (GENEVE). 3ème Ed., 569-589.
182. **Schulz B., Sucher J., Aust H.J., Krohn K., Ludwig K., Jones P.J. & Döring D. (1995).** Biological active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species. *Mycological Research*, **99**, 1007-1015.
183. **Sharma O.P. & Sharma P.D. (1989).** Natural products of the *Lantana* plant- the present and prospects. *Journal of Scientific and Industrial Research*, **48**, 471-474.

184. Sheehan D., Meade G., Foley V. M. and Dowd C. A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione S-transferases: implications for classification of non-mammalian members, of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, **360**, 1-16.
185. Shi M.A., Lougarre A., Alies C., Frémaux I., Tang Z.H., Stojan J., and Fournier D. (2004). Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance. *BioMed Central Evolutionary Biology*, 4:5, 1-8.
186. Siest G., Statland B.E. et al. (1981). Interprétations des examens de laboratoires, valeurs de référence et variations biologiques. Beckman 2^{ème} trimestre. Centre de Medecine Préventive de Nancy 1/Medical Center Sacramento, California.
187. Singleton P. (2004). Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. 6^{ème} édition, 525p.
188. Stocker P., Yousfi M., Djeridane O., Perrier J., Amziani R., El Boustani S. and Moulin A., (2004). Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie*, **86**; 919-925.
189. Surveswaran S., Cai Y-Z., Corke H., Sun M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, **102**: 938-953.
190. Syah Y.M. & Ghisalberti, E.L. (1996). Biologically active cyanogenetic, iridoid and lignan glycosides from *Eremophila maculata*. *Fitoterapia*, **67**, 447-451.
191. Sweeney A.P., Wyllie, S.G., Shalliker, R.A. and Markhan, J.L. (2001). Xanthine oxidase inhibitory activity of selected Australian native plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **75**, 273-277.
192. Taguri T., Tanaka T., Kouno I. (2004). Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **27** (12): 1965-1969.
193. Takahashi T, Kokubo R, Sakaino M. (2004). Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. *Letters Applied Microbiology*, **39** (1): 60-4.

194. Taoubi K., Fauvel, M.T., Gleye, J., Moulis, C. and Fouraste I. (1997). Phenylpropanoid glycosides from *Lantana camara* and *Lippia multiflora*. *Planta Medica*, **63**, 192-193.
195. Tenenbaum J. (1999). The epidemiology of non steroidal anti-inflammatory drugs. *Canadian Journal of Gastroenterology*, **13**: 119-22.
196. Tereschuk M.L., Riera M.V., Castro G.R., Abdala L.R. (1997). Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. *Journal of Ethnopharmacology*, **56**: 227-232.
197. Thamotharan G., Sekar G., Ganesh T , Sen S., Chakraborty R. and Kumar N.S. (2010). Antiulcerogenic effects of *lantana camara* linn. leaves on *in vivo* test models in rats. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, **3** (3), 57-60.
198. Timbo B. (2003), Etude phytochimique et des activités biologiques de *Trichilia emetica* Vahl (*Meliaceae*) ; thèse de pharmacie Bamako (Mali) 108p.
199. Tiwari A.K. (2004). Antioxidants: New-generation therapeutic base for polygenic disorders. *Current Science*, **86**(8), 1092-1102.
200. Tomczyka M., & Latte K.P. (2009). Potentilla-A review of its phytochemical and pharmacological profile. *Journal of Ethnopharmacology*, **122**: 184-204.
201. Tsiba G., Nkounkou C.L., Yaya M., Ouamba J-M., Abena A.A., Chalchat J-C. and Figueredo G. (2010). Variation in the chemical composition of the essential oils of different organs of domesticated *Lippia multiflora* Moldenke. Full Length Research Paper. *African Journal of Biotechnology* Vol. **9**(41), 7009-7013.
202. Tsimogiannis D.I. and Oreopoulou V. (2004). Free radical scavenging and antioxidant activity of 5,7,3V,4V-hydroxy-substituted flavonoids. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **5**, 523-528.
203. Tsimogiannis D., Samiotaki M., Panayotou G. and Oreopoulou V. (2007). Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules*, **12**, 593-606.
204. Tsuchiya H. & Iinuma M. (2000). Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine* **7**:161-5.

205. Valsaraj R., Pushpangadan P., Smitt U.W., et al. (1997). New anti-HIV-1, antimalarial, and antifungal compounds from *Terminalia bellerica*. *Journal of Natural Products*, **60**: 739-742.
206. Van Acker S.A.B.E., van den Berg D.J., Tromp M.N.J.L., et al. (1996). Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, **20**: 331-342.
207. Vaquero M.J.R., Alberto M.R., M.C. Manca M.C. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, **18**: 93-101.
208. Velazquez E., Tournier H.A., Mordujovichole B.P., Saavedra G. and Scinella G.R. (2003). Antioxydant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*, **74**, 91-97.
209. Verma D.K., Singh S.K., Tripathi V. (1997). A rare antibacterial flavone glucoside from *Lantana camara*. *Indian Drugs*. **34**: 32-35.
210. Vidal. (2009). Le Dictionnaire. ISBN 978-2-85091-178-1. 2666p.
211. Wachter G.A., Hoffmann J.J., Furbacher T., Blake M.E., Timmermann B.N. (1999). Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochemistry* **52**: 1469-1471.
212. Wagner H. and Bladt S. (1996). *Plant drug analysis: a thin layer chromatography*. Atlas, Second edit. Springer, 384p.
213. Wang H., Zhou G., Gao X., Wang Y. and Yao W. (2007). Acetylcholinesterase inhibitory-active components of *Rhodiola rosea* L. *Food Chemistry*, **105**, 24-27.
214. Watson W.H., Cai J. and Jones D.P. (2000). Diet and apoptosis. *Annual Review of Nutrition*, **20**, 485-505.
215. Woodman O.L., Meeker W.F., Boujaoude M. (2005). Vasorelaxant and antioxidant activity of flavonols and flavones. *J. Cardiovasc.Pharmacol.* **46**: 302-309.
216. Wolfender J-L., and Hotsttmann K. (1996). Importance of LC/MS in plants analysis. *Journal of mass Spectrometry*, **8**, 7-12.

217. Wu S.J. and Ng L.T. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn var. abbreviate Ser.) in Taiwan. *LWT*, **41**, 323-330.
218. Yadava R.N., Tiwari L. (2005). A potential antiviral flavone glycoside from the seeds of *Butea monosperma*. O. Kuntze. *Journal of Asian Natural Products Research*, **7** (2): 185-188.
219. Yakhlef G. (2010). Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris* L. et *Laurus nobilis* L. Université El Hadj Lakhdar-Batna.
220. Yeon S.C., Hyon G.J., Kun H. S., et al. (2001). Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: Cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochemical Pharmacology*, **62**: 1185-1191.
221. Yi M.Q., Liu H.X., Shi X.Y., Liang P., Gao X.W. (2006). Inhibitory effects of four carbamate insecticides on acetylcholinesterase of male and female *carassius auratus* *in vitro*. *Comparative Biochemistry and Physiology, part C*, **143**, 113-116.
222. Young, DS (2001). Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed ACCC.
223. Zanden J.J., Hamman O.R., van Iersel M.L.P.S., Boeren S, Cnubben P.J. and Rietjens I.M.C. (2003). Inhibition of human glutathione S-transferases P1-1 by the flavonoid quercetin. *Chemico-Biological Interactions*, **145**,139-148.
224. Zanden J.J., Geraets L., Wortelboer H.M., Bleren.P.J., Rietjens I.M.C.M. and Cnubben N.H.P. (2004). Structure requirements for the flavonoid-mediated modulation of glutathione S-transferase P1-1 and GS-X pump activity in MCF7 breast cancers cells. *Biochemical Pharmacology*, **67**, 1607-1617.
225. Zeba, B. (2006). *Etude des supports enzymatiques de la résistance bactérienne aux antibiotiques : Application aux noyaux β -lactame/ β -lactamases; Epidémiologie*. Thèse de doctorat d'Etat ès Sciences Biologiques Appliquées. Université de Ouagadougou. 174p.
226. Zeng S., Liu W., Nie F., Zhao Q., Rong J., Wang J., Tao L., Qi Q., Lu N., Li Z. and Guo Q. (2009). LYG-202, a new flavonoid with a piperazine substitution, shows

- antitumor effects in vivo and in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **385**; 551-556.
- 227. Zhang Y. & Wang Z. (2009).** Phenolic composition and antioxidant activities of two *Plomis* species: A correlation study. *Comptes Rendus Biologies*, **332**, 816-826.
- 228. Zheng W.F., Tan R.X., Yang L., Liu Z.L. (1996).** Two flavones from *Artemisia giraldii* and their antimicrobial activity. *Planta Medica*, **62**: 160-162.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe I

Tableau 1:: Protocole du dosage des phénoliques totaux

Solution	Test de l'échantillon	Blanc
Réactifs		
Solution d'échantillon	20 µL	--
FCR (0,2 N)	100 µL	80 µL
1^{ère} incubation : 05 minutes		
Carbonate de sodium NaCO ₃ 75g/L	80 µL	160 µL
2^{ème} incubation : 2 heures		

Tableau 2: Protocole du dosage des flavonoïdes totaux

Solution	Test de l'échantillon	Blanc
Réactifs		
Solution d'échantillon	100 µL	--
Méthanol	--	100 µL
AlCl ₃ (2%)	100 µL	100 µL
Temps d'incubation : 10minutes		

Tableau 3: Protocole du dosage des flavonols totaux

Solution	Test de l'échantillon	Blanc
Réactifs		
Solution d'échantillon	100 µL	--
Ethanol	--	100 µL
AlCl ₃ (20%)	100 µL	100 µL
Temps d'incubation : 10minutes		

Tableau 4: Protocole du dosage des tanins

Solution	Test de l'échantillon	Blanc
Réactifs		
Solution d'échantillon	20 µL	--
Citrate d'ammonium ferrique 28%; 3,5g/L	20 µL	20 µL
Eau distillée	100 µL	120 µL
Ammoniaque (20%; 8g/L)	20 µL	20 µL
Temps d'incubation : 10minutes		

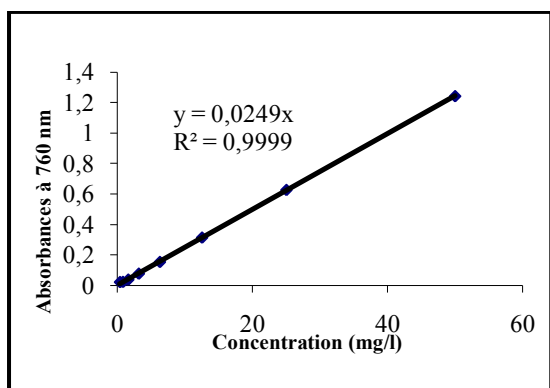


Figure 1: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

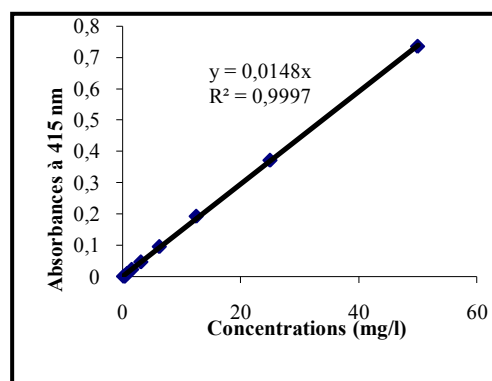


Figure 2: Courbe d'étalonnage de la quercétine (flavonoïdes)

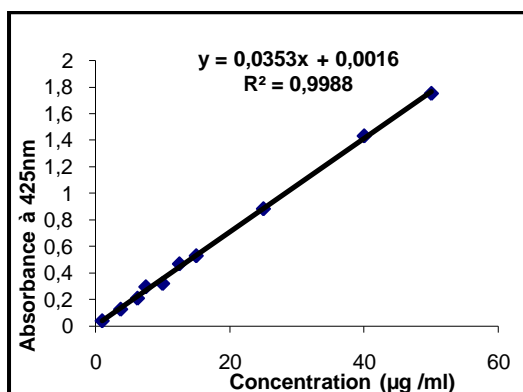


Figure 3: Courbe d'étalonnage de la quercétine (flavonols)

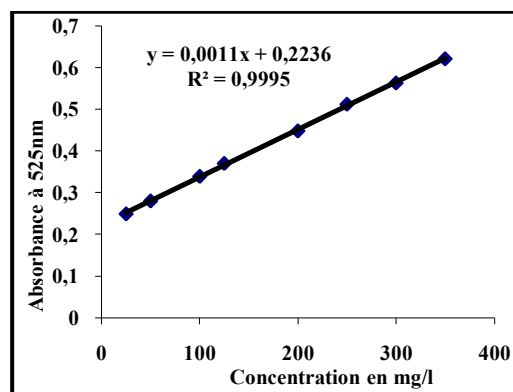


Figure 4: Courbe d'étalonnage de l'acide tannique (tanins)

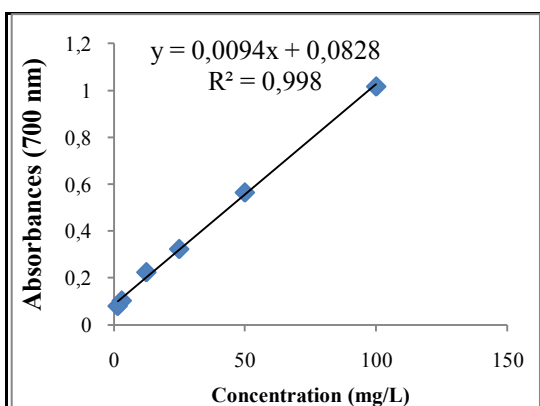


Figure 5: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (FRAP).

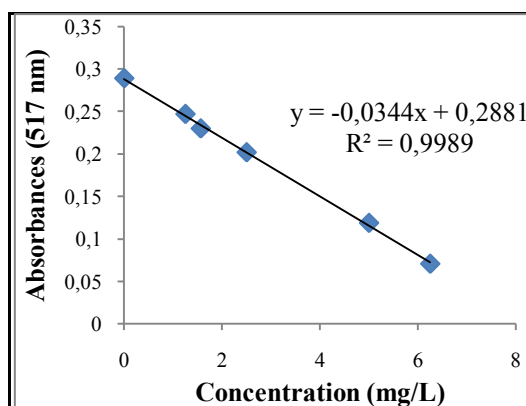


Figure 6: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (DPPH).

Annexe II

Tampon Borate : 0,2 M, pH 9,0

Dissoudre 19,05 g de Sodium tetraborate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) [(0,2 M) : FW 381,37] dans 250 mL d'eau distillée afin d'obtenir une solution (S1) de concentration 76,2g/L. Dissoudre 4,34 g d'Acide borique (H_3BO_3 : 0,2 M, PM = 61,83) dans 350 mL d'eau distillée afin d'obtenir une concentration S2 = 12,4g/L. Le tampon borate buffer 0.2 M, est obtenu en ajoutant S2 à S1 jusqu'à obtention du pH 9.0, le volume est ensuite complété à 1L.

Tampon phosphate: 0,066 M, pH 7,5: 9.46 g de sodium hydrogénophosphate (ou disodium hydrogénophosphate dodecahydré ou sodium phosphate dibasique ou sodium phosphate disodique= $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) dans 1L d'eau distillée. 9.06 g de potassium phosphate monopotassique (ou potassium dihydrogénophosphate ou potassium phosphate monobasique = KH_2PO_4) dans 1 L d'eau distillée. Prendre 1 grand Becher (1 L) y verser environ 1 L de la solution de potassium phosphate. Mettre le Becher sur un agitateur magnétique. Utiliser un PH mètre précis. Le pH doit être proche de 4.5. Ajouter ne goutte à goutte la solution de sodium hydrogénophosphate jusqu'à l'obtention du PH désiré (de 5.3 à 8).

Tampons Tris-HCL

Tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,008 (Tampon A) : 12,109 g de Tris (hydroxyméthyl aminométhane) est dissout dans environ 1,8 L d'eau distillé ; 54,3 ml de HCl aqueux 1N est ajouté et le pH est ajusté à 8 avec des gouttes de HCl ou de NaOH. Le volume final est complété à 2 L avec de l'eau distillée. Tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,008, 0,1% BSA (Tampon B) : 1,003 g de BSA est dissout dans 1L de tampon A. Tampon Tris-HCl 50 mM pH8,008, 0,1M NaCl, 0,02 M MgCl_2 (Tampon C): 5,853 g de NaCl et 4,08 g de MgCl_2 sont dissous dans 1 ml de tampon A.

Annexe III (les ions)

La valeur normale du Ca^{2+} dans l'organisme humain est comprise entre 2,25 et 2,65 mmol/L. Il est indispensable à notre équilibre, surtout au bon fonctionnement des neurotransmetteurs (Nacoulma, 1996). Au delà de la valeur supérieure (2,65 mmol/L) les conséquences suivantes sont observées: toxicose parathyroïdienne, coma hypercalcémique,

myélome néoplasie, hypervitaminose D, hypercalcémie infantile, idiopathie, hyperparathyroïdisme primaire et sarcoïdose. Pour une valeur inférieure à la normale, on assiste à une hypercalcémie néonatale et des prématurés, ostéoporose, entéropathie, cirrhose, tétanos, malnutrition, diarrhée, syndrome néphrotique, glomérulonéphrite ostéomolaire, maladie de Paget, pancréatite aiguë et chronique, hyperparathyroïdie chronique.

La valeur normale du potassium chez les humains est comprise entre 3,5 et 4,8 mmol/L. Un régime alimentaire riche en potassium prévient et réduit l'hypertension artérielle, les calculs rénaux et les accidents vasculaires cérébraux (Nacoulma, 1996). Supérieure à 4,8 on a des fibrillation ventriculaire, alcalose métabolique par vomissement, acidose hyperkaliémique, trouble de la conduction cardiaque, coma diabétique, syndrome hémolytique, lyse cellulaire, anoxie, insuffisance rénales, alcalose respiratoire, myotonie hyperkaliémique familiale. En dessous de 3,5 mmol/L, on a une cirrhose, acidoses métabolique, hyperinsulinémie, malnutrition, vomissement, diarrhées, néphropathies (Nacoulma, 1996).

La valeur normale du sodium chez l'homme est comprise entre 133 et 143 mmol/L. Il est indispensable à la transmission de l'influx nerveux. Au-delà de 143 mmol/L on assiste à un coma hyperosmolaire, diabète insipide, transfusion sanguine répétées, déshydratation, HTA, acidose diabétique. En dessous de 133mmol/L on a une hyponatrémie par hyperlipémie (restriction du compartiment aqueux), syndrome néphrotique, hyperventilation, diarrhées, vomissement, syndrome de malabsorption, maladie d'Addison, insuffisance hépatique et cardiaque, hyper sécrétion d'hormone antidiurétique (ADH), coma diabétique (Nacoulma, 1996).

La valeur normale du magnésium varie entre 0,66 à 1,03 mmol/L. le besoins quotidien de l'organisme est de 300 à 500 mg. Son métabolisme est lié à ceux de Ca et de P. C'est un facteur de croissance, un régénérateur cellulaire, régulateur de l'équilibre nerveux, draineur hépatique, lutte contre le vieillissement, augmente les réactions de défense de l'organisme, s'oppose aux thromboses et aux artérioscléroses, préserve l'organisme contre les agressions virales et bactériennes, contre la nervosité et l'irritabilité, contre les allergies et les inflammations et retarde le vieillissement. Sa carence entraine des syndromes d'hyperirritabilité neuromusculaire, les accidents cardiovasculaires et thrombotiques.

HPLC-DAD de *Lippia chevalieri* Moldenke (Cliv 01): **fraction aqueuse 12,5%**.

Software Version	: 6.3.1.0504	Date	: 31/08/2011 06:54:13 p.m.
Operator	: ciidir	Sample Name	: Cliv 01extracto acuoso (C)
Sample Number	: 001	Study	: Compuestos fenolicos
Auto Sampler	: SER200	Rack/Vial	: 0/63
Instrument Name	: LCDAD	Channel	: A
Instrument Serial #	: None	A/D mV Range	: 1000
Delay Time	: 0.00 min	End Time	: 65.19 min
Sampling Rate	: 2.2727 pts/s	Area Reject	: 0.000000
Sample Volume	: 1.000000 ul	Dilution Factor	: 1.00
Sample Amount	: 1.0000	Cycle	: 6
Data Acquisition Time	: 31/08/2011 12:54:54 p.m.		

Raw Data File : c:\resultados\muestras del extranjero de la dra. norma\dilución al 87.5 %\fase acuosa\cliv 01 (12.5 %) acuosa.raw

Result File : C:\resultados\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\Dilución al 87.5 %\Fase acuosa\cliv 01 (12.5 %) acuosa.rst [Editing in Progress]

Inst Method : c:\metodos\compuestos fenolicos 65 min 260 (100ul) from c:\resultados\muestras del extranjero de la dra. norma\dilución al 87.5 %\fase acuosa\cliv 01 (12.5 %) acuosa.raw

Proc Method : c:\metodos\compuestos fenolicos 65 min 260 (100ul) from C:\resultados\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\Dilución al 87.5 %\Fase acuosa\cliv 01 (12.5 %) acuosa.rst [Editing in Progress]

Calib Method : c:\metodos\compuestos fenolicos 65 min 260 (100ul) from C:\resultados\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\Dilución al 87.5 %\Fase acuosa\cliv 01 (12.5 %) acuosa.rst [Editing in Progress]

Report Format File: c:\metodos\reporte flavo.rpt

Sequence File : C:\secuencia\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\31 Agosto 2011.seq

REPORTE

Pico Tiempo # [min]	Area [uV*sec]	Altura [uV]	Area Norm. [%]	Area BL [%]	Raw Amount	Adjusted Amount	Area/ Amount
1 2.541	23907236.81	720008.62	10.40	10.40 BV	23.9072	23.907	
2 3.169	26864206.83	519359.95	11.69	11.69 VB	26.8642	26.864	1.000e+06
3 22.624	6208.51	309.62	0.00	0.00 BB	0.0062	0.006	1.000e+06
4 24.522	17721.84	652.42	0.01	0.01 BB	0.0177	0.018	1.000e+06
5 25.691	34814.67	1010.52	0.02	0.02 BB	0.0348	0.035	
6 28.491	1588182.63	81453.74	0.69	0.69 BB	1.5882	1.588	
7 29.696	18681.90	1894.27	0.01	0.01 BV	0.0187	0.019	1.000e+06
8 30.089	317559.97	13514.61	0.14	0.14 VV	0.3176	0.318	1.000e+06
9 31.153	852531.13	21095.94	0.37	0.37 VV	0.8525	0.853	1.000e+06
10 32.618	3256484.88	69403.02	1.42	1.42 VV	3.2565	3.256	1.000e+06
11 33.902	23656934.03	968024.11	10.29	10.29 VV	23.6569	23.657	1.000e+06
12 34.282	21949534.22	835885.02	9.55	9.55 VV	21.9495	21.950	1.000e+06
13 34.852	17941915.54	1.28e+06	7.81	7.81 VV	17.9419	17.942	1.000e+06
14 35.100	49951682.70	1.43e+06	21.74	21.74 VV	49.9517	49.952	1.000e+06

31/08/2011 06:54:13 p.m. Result: C:\resultados\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\Dilución al 87.5 %\Fase acuosa\cliv 01 (12.5 %) acuosa.rst

REPORTE

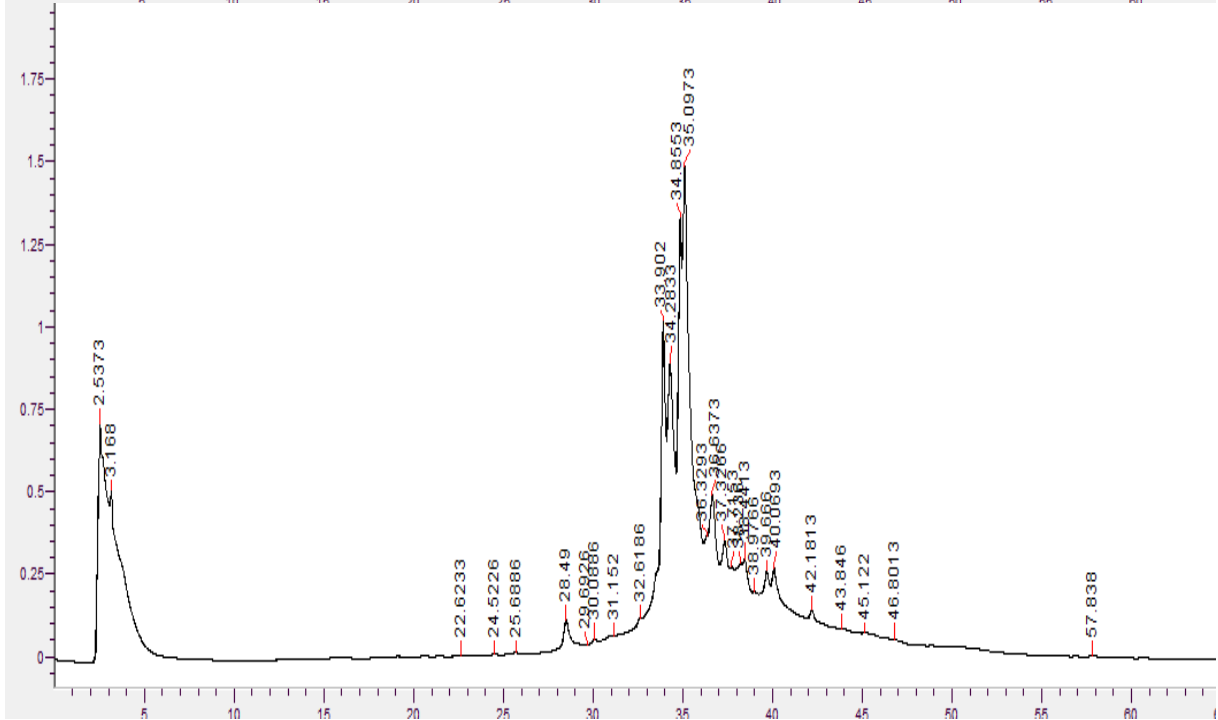
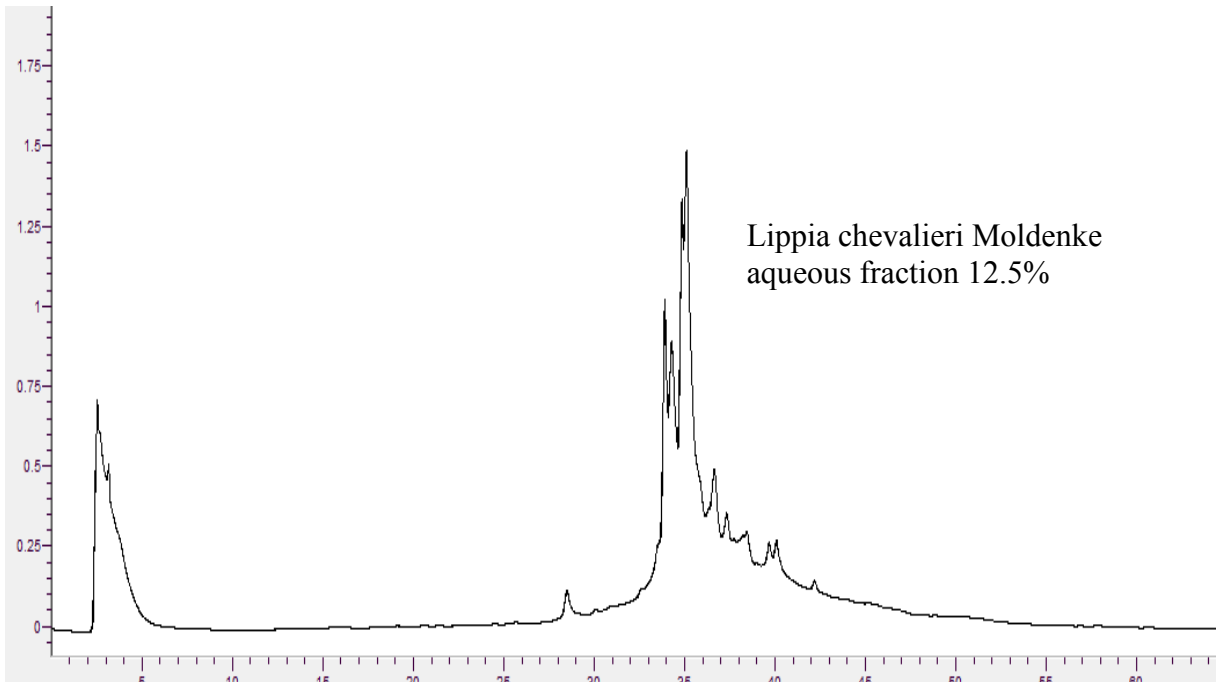
Pico Tiempo # [min]	Area [uV*sec]	Altura [uV]	Area Norm. [%]	Area BL [%]	Raw Amount	Adjusted Amount	Area/ Amount
15 36.329	3985234.29	305293.99	1.73	1.73 VV	3.9852	3.985	1.000e+06
16 36.638	13156143.38	428038.52	5.73	5.73 VV	56.8375	56.838	231469.226
17 37.325	7778913.86	286863.40	3.39	3.39 VV	7.7789	7.779	1.000e+06
18 37.716	3281731.03	206511.11	1.43	1.43 VV	3.2817	3.282	1.000e+06
19 38.236	5418542.37	212668.96	2.36	2.36 VV	5.4185	5.419	1.000e+06
20 38.441	5909415.71	226397.28	2.57	2.57 VV	5.9094	5.909	1.000e+06
21 38.974	2526587.25	123445.99	1.10	1.10 VV	2.5266	2.527	1.000e+06
22 39.669	5613058.56	185986.78	2.44	2.44 VV	5.6131	5.613	
23 40.071	9819958.96	190929.94	4.27	4.27 VV	9.8200	9.820	
24 42.181	1681289.92	56470.27	0.73	0.73 VB	1.6813	1.681	1.000e+06
25 43.844	80176.77	3709.09	0.03	0.03 BB	0.0802	0.080	1.000e+06
26 45.122	23834.58	2391.06	0.01	0.01 BB	0.0238	0.024	1.000e+06
27 46.798	90842.34	4590.40	0.04	0.04 BB	0.0908	0.091	
28 57.833	62214.25	3678.10	0.03	0.03 BB	0.0622	0.062	1.000e+06
	2.30e+08	8.18e+06	100.00	100.00	273.4730	273.473	2.723e+07

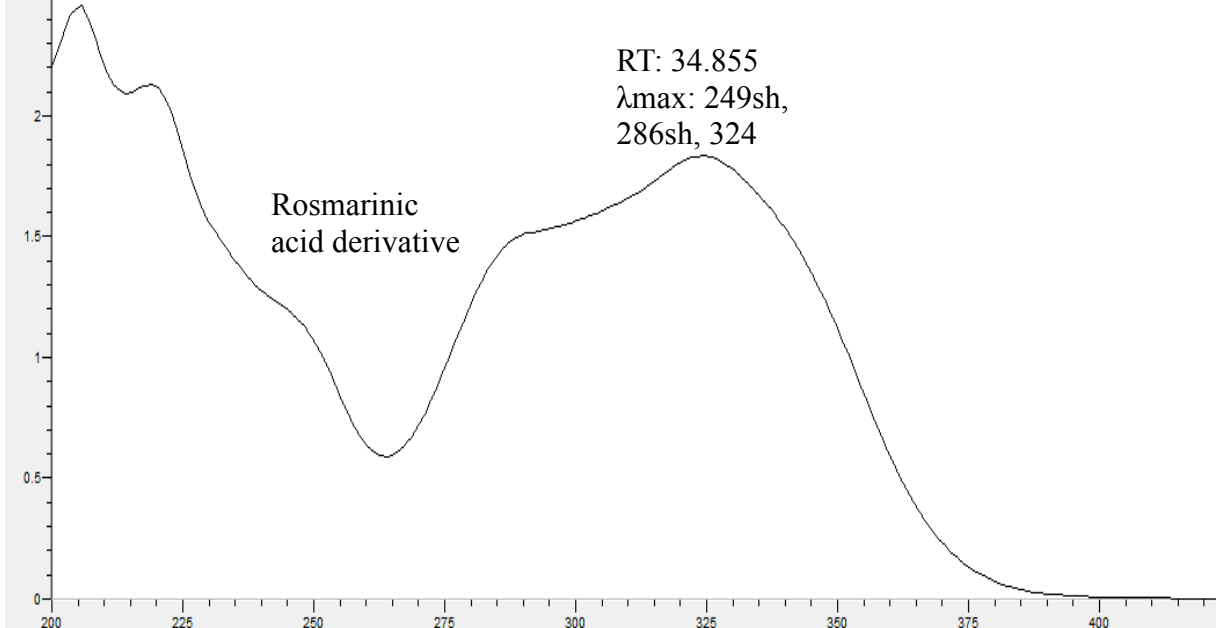
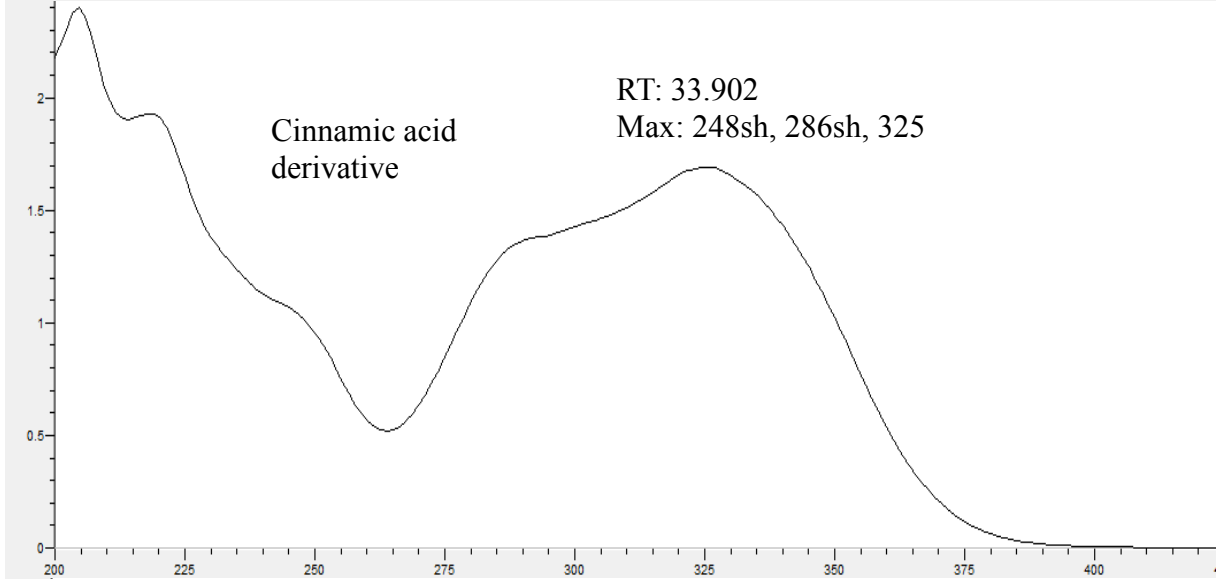
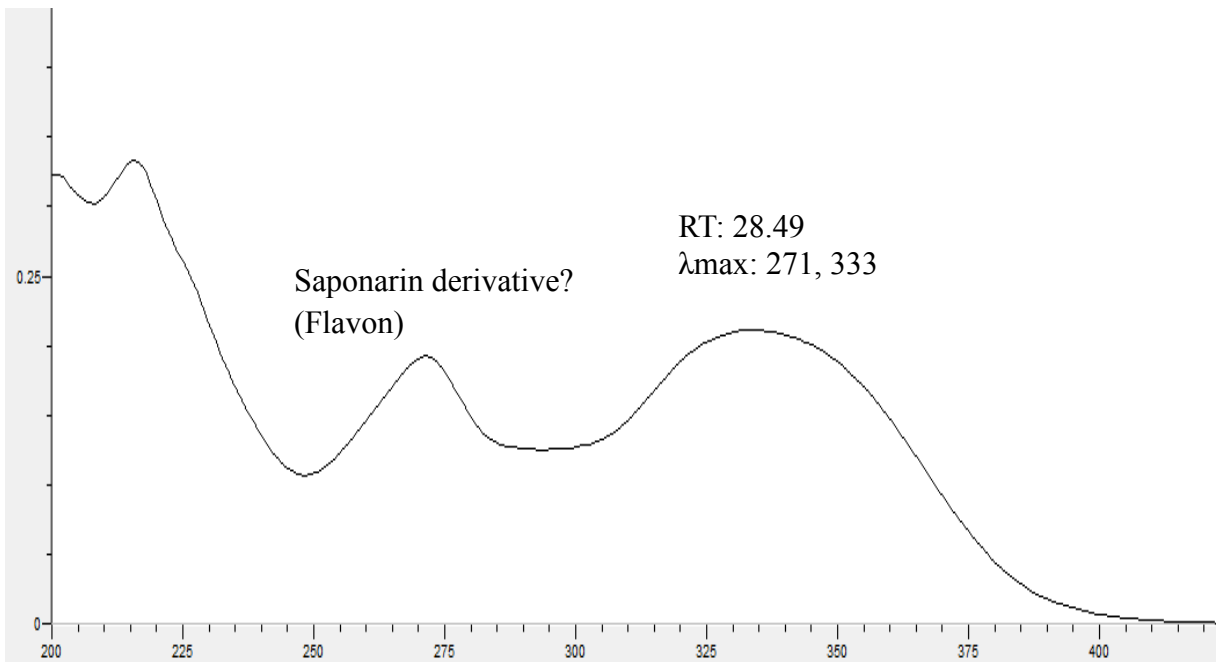
Pico #	Area/ Amount	Lambda Max	Cal. Range	Component Name	Pico #	Area/ Amount	Lambda Max	Cal. Range	Component Name
1	1.0000e+06	-----			14	1.0000e+06			
2	1.0000e+06	-----			15	1.0000e+06			
3	1.0000e+06	-----			16	2.3147e+05	+		Quercitr
4	1.0000e+06	-----			17	1.0000e+06			
5	1.0000e+06	-----			18	1.0000e+06			
6	1.0000e+06	-----			19	1.0000e+06			
7	1.0000e+06	-----			20	1.0000e+06			
8	1.0000e+06	-----			21	1.0000e+06			peak4
9	1.0000e+06	-----			22	1.0000e+06			
10	1.0000e+06	-----			23	1.0000e+06			
11	1.0000e+06	-----			24	1.0000e+06			
12	1.0000e+06	-----			25	1.0000e+06			
13	1.0000e+06	-----			26	1.0000e+06			
					27	1.0000e+06			
					28	1.0000e+06			
						2.7231e+07		0.0000	

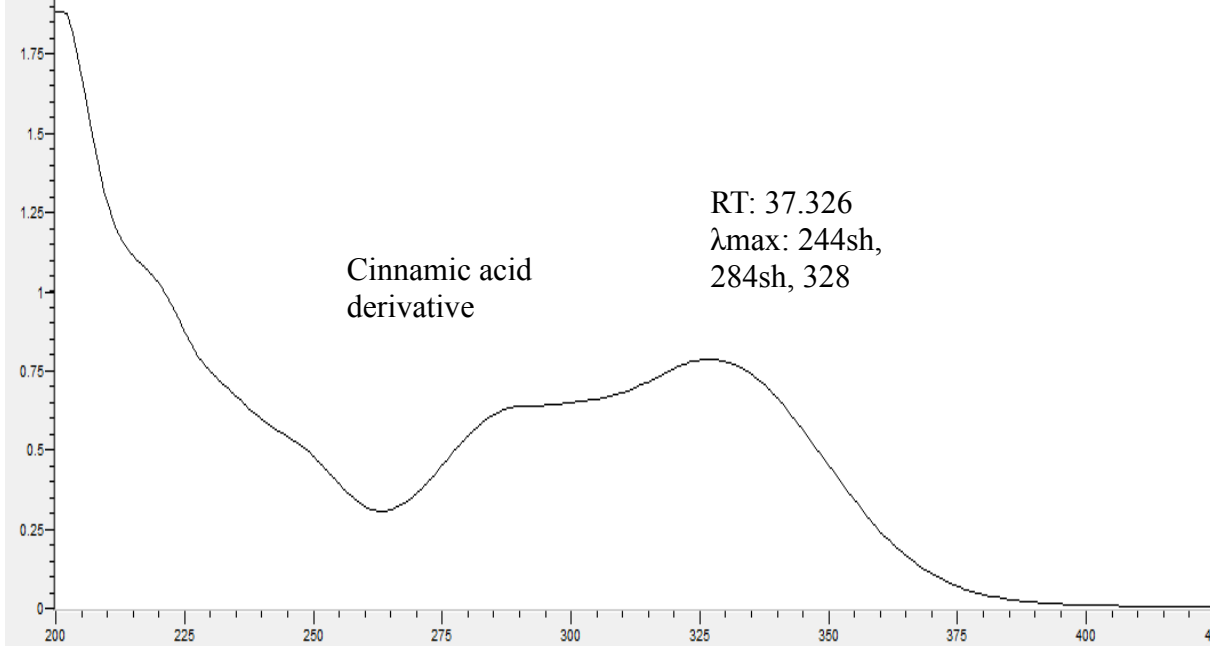
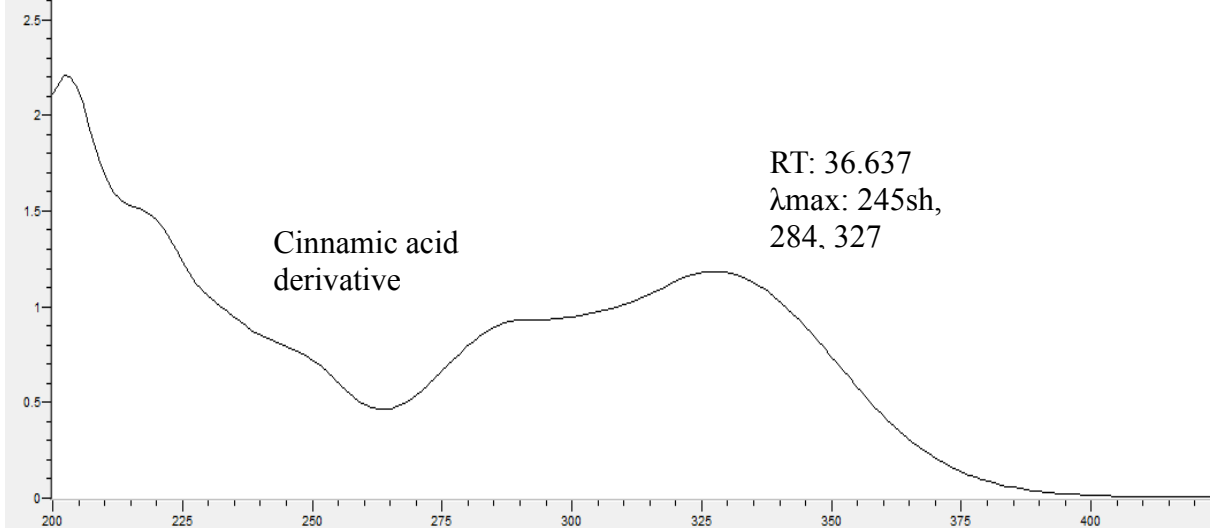
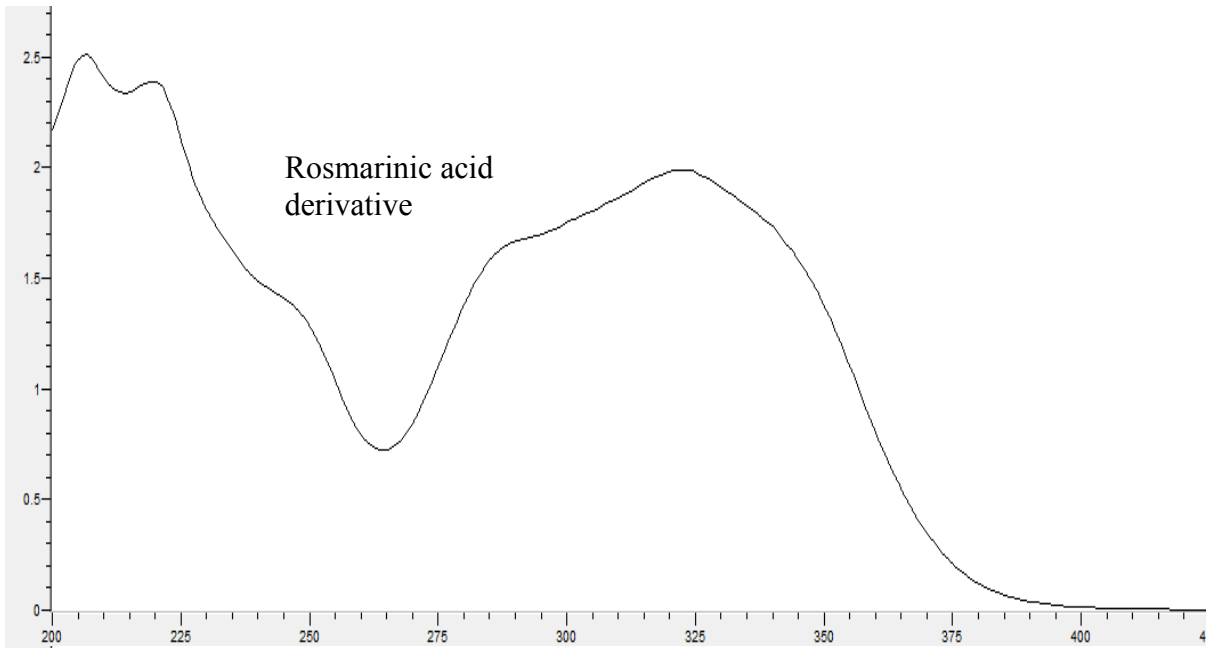
31/08/2011 06:54:13 p.m. Result: C:\resultados\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\Dilución al 87.5 %\Fase acuosa\cliv 01 (12.5 %) acuosa.rst (Number 14 to 28).

Missing Component Report
Component Expected Retention (Calibration File)

Acido galico 4.170







HPLC-DAD de *Lippia chevalieri* Moldenke (Cliv 01): **fraction acétate d'éthyle 50%**.

Software Version	: 6.3.1.0504	Date	: 31/08/2011 06:54:13 p.m.
Operator	: ciidir	Sample Name	: Cliv 01extracto organico (B)
Sample Number	: 001	Study	: Compuestos fenolicos
Auto Sampler	: SER200	Rack/Vial	: 0/53
Instrument Name	: LCDAD	Channel	: A
Instrument Serial #	: None	A/D mV Range	: 1000
Delay Time	: 0.00 min	End Time	: 65.19 min
Sampling Rate	: 2.2727 pts/s	Area Reject	: 0.000000
Sample Volume	: 1.000000 ul	Dilution Factor	: 1.00
Sample Amount	: 1.0000	Cycle	: 2
Data Acquisition Time	: 30/08/2011 11:03:55 a.m.		

Raw Data File : c:\resultados\muestras del extranjero de la dra. norma\dilución al 50 %\fase organica (dilucion 50%\cliv 01 (50%).raw

Result File : C:\resultados\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\Dilución al 50 %\Fase organic (dilucion 50%\cliv 01 (50%).rst [Editing in Progress]

Inst Method : c:\metodos\compuestos fenolicos 65 min 260 (100ul) from c:\resultados\muestras del extranjero de la dra. norma\dilución al 50 %\fase organica (dilucion 50%\cliv 01 (50%).raw

Proc Method : c:\metodos\compuestos fenolicos 65 min 260 (100ul) from C:\resultados\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\Dilución al 50 %\Fase organica (dilucion 50%\cliv 01 (50%).rst [Editing in Progress]

Calib Method : c:\metodos\compuestos fenolicos 65 min 260 (100ul) from C:\resultados\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\Dilución al 50 %\Fase organica (dilucion 50%\cliv 01 (50%).rst [Editing in Progress]

Report Format File: c:\metodos\reporte flavo.rpt

Sequence File : C:\secuencia\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\30 Agosto 2011.seq

REPORTE

Pico Tiempo # [min]	Area [uV*sec]	Altura [uV]	Area Norm. [%]	Area BL [%]	Raw Amount	Adjusted Amount	Area/Amount
1 2.233	6065.85	2875.54	0.01	0.01 BV	0.0061	0.006	1.000e+06
2 2.534	7818397.86	196757.13	10.00	10.00 VV	7.8184	7.818	1.000e+06
3 3.319	1687458.49	101989.21	2.16	2.16 VV	1.6875	1.687	1.000e+06
4 3.761	4225432.92	85301.55	5.40	5.40 VB	4.2254	4.225	1.000e+06
5 29.061	40260.80	3008.18	0.05	0.05 BB	0.0403	0.040	1.000e+06
6 34.354	7350703.86	255650.95	9.40	9.40 BV	7.3507	7.351	1.000e+06
7 34.745	12570735.31	539873.12	16.07	16.07 VV	12.5707	12.571	1.000e+06
8 35.288	4608272.58	333655.54	5.89	5.89 VV	4.6083	4.608	1.000e+06
9 35.589 22503201.63 770665.40			28.77	28.77 VV	22.5032	22.503	1.000e+06
10 37.095	5483673.86	185323.86	7.01	7.01 VV	5.4837	5.484	1.000e+06
11 37.805	5760981.43	195153.17	7.37	7.37 VV	24.8888	24.889	231469.226
12 38.673	2124338.71	70751.15	2.72	2.72 VV	2.1243	2.124	1.000e+06
13 39.638	419513.19	14795.25	0.54	0.54 VV	0.4195	0.420	1.000e+06
14 40.199	355596.98	15161.77	0.45	0.45 VV	0.3556	0.356	1.000e+06
15 40.702	302565.34	10810.11	0.39	0.39 VB	0.3026	0.303	1.000e+06

31/08/2011 06:42:59 p.m. Result: C:\resultados\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\Dilución al 50 %\Fase organica (dilucion 50%)\cliv 01 (50%).rst

REPORTE

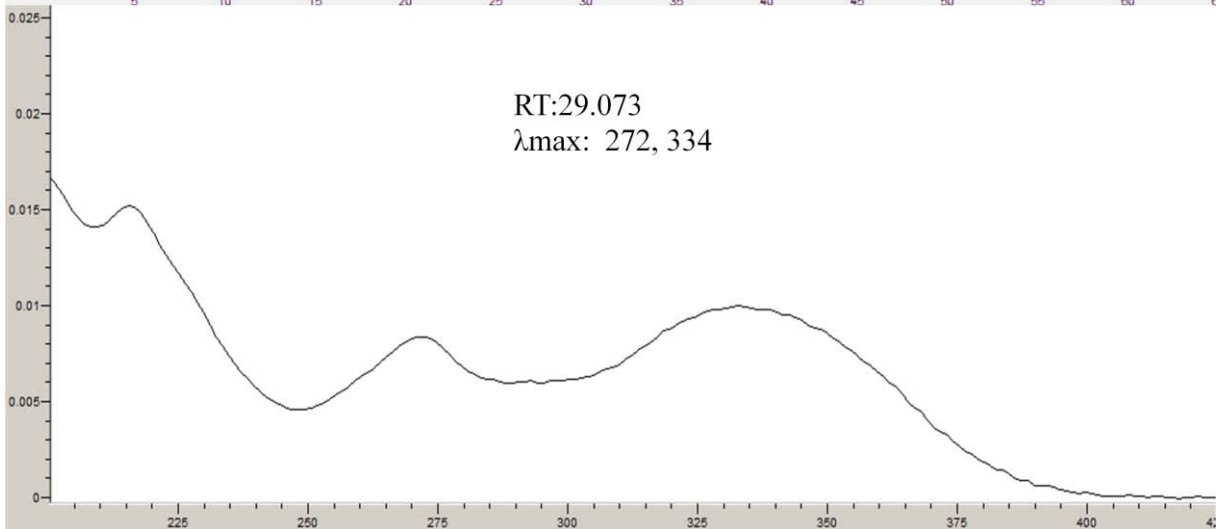
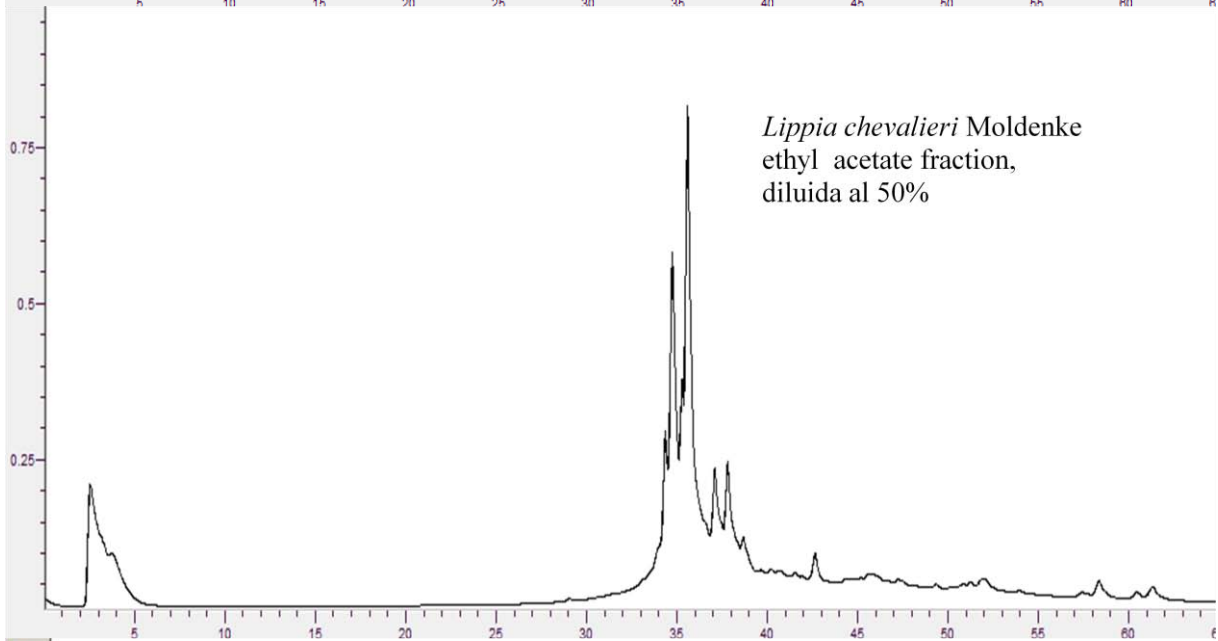
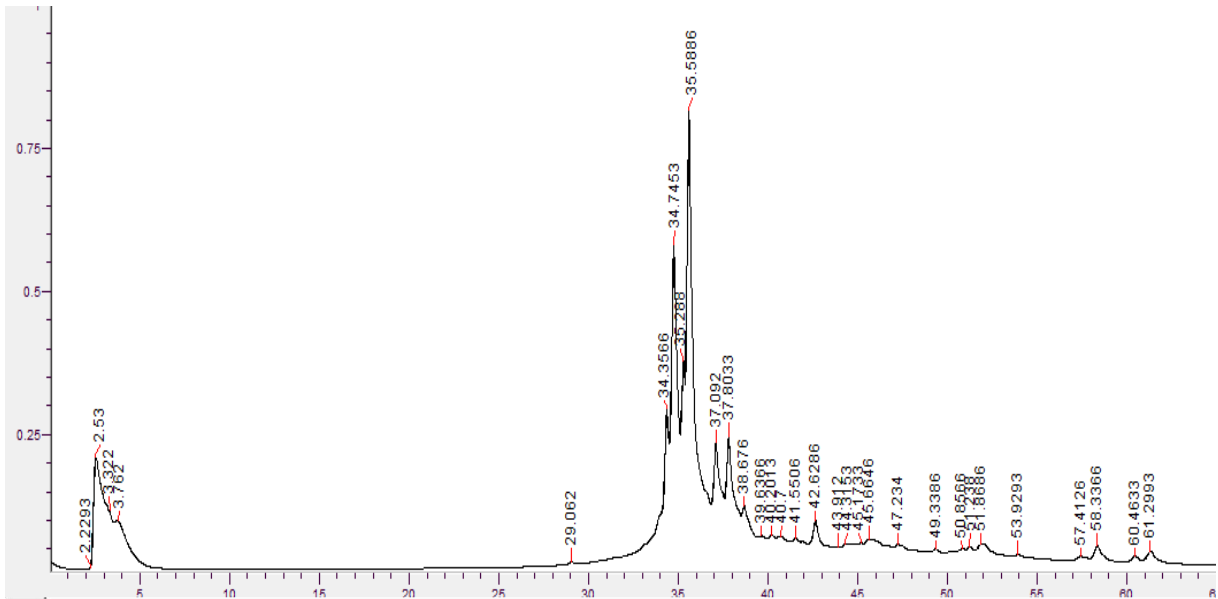
Pico Tiempo # [min]	Area [uV*sec]	Altura [uV]	Area Norm. [%]	Area BL [%]	Raw Amount	Adjusted Amount	Area/ Amount
16 41.551	88263.92	7061.05	0.11	0.11 BB	0.0883	0.088	.000e+06
17 42.632	783727.26	43683.51	1.00	1.00 BB	0.7837	0.784	1.000e+06
18 43.920	7068.69	619.03	0.01	0.01 BB	0.0071	0.007	1.000e+06
19 44.316	15123.24	1413.13	0.02	0.02 BB	0.0151	0.015	1.000e+06
20 45.171	36070.94	2122.64	0.05	0.05 BB	0.0361	0.036	
21 45.668	81146.81	3693.68	0.10	0.10 BB	0.0811	0.081	
22 47.233	50970.75	4841.19	0.07	0.07 BB	0.0510	0.051	1.000e+06
23 49.340	72341.77	4735.46	0.09	0.09 BB	0.0723	0.072	1.000e+06
24 50.852	60921.86	3558.67	0.08	0.08 BV	0.0609	0.061	1.000e+06
25 51.239	96269.75	6150.55	0.12	0.12 VB	0.0963	0.096	1.000e+06
26 51.869	33415.03	2407.63	0.04	0.04 BB	0.0334	0.033	1.000e+06
27 53.932	50810.96	2966.37	0.06	0.06 BB	0.0508	0.051	1.000e+06
28 57.410	43696.80	2896.12	0.06	0.06 BB	0.0437	0.044	1.000e+06
29 58.331	637726.57	23005.20	0.82	0.82 BB	0.6377	0.638	1.000e+06
30 60.458	260547.20	9831.23	0.33	0.33 BV	0.2605	0.261	1.000e+06
31 61.299	633570.09	19351.85	0.81	0.81 VB	0.6336	0.634	1.000e+06
	78208870.47	2.92e+06	100.00	100.00	97.3366	97.337	3.023e+07

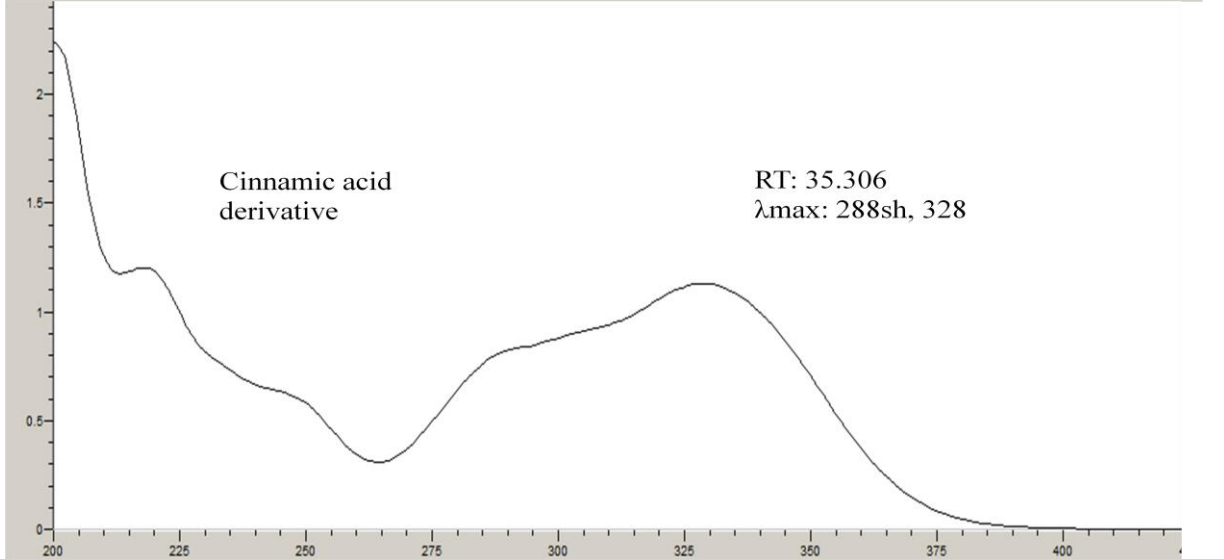
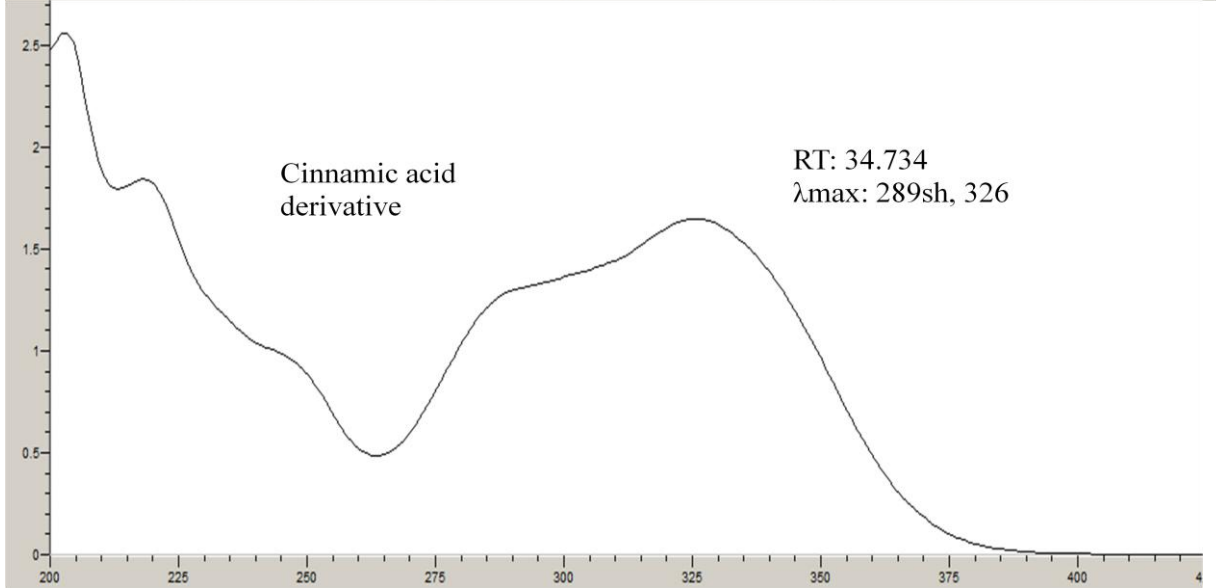
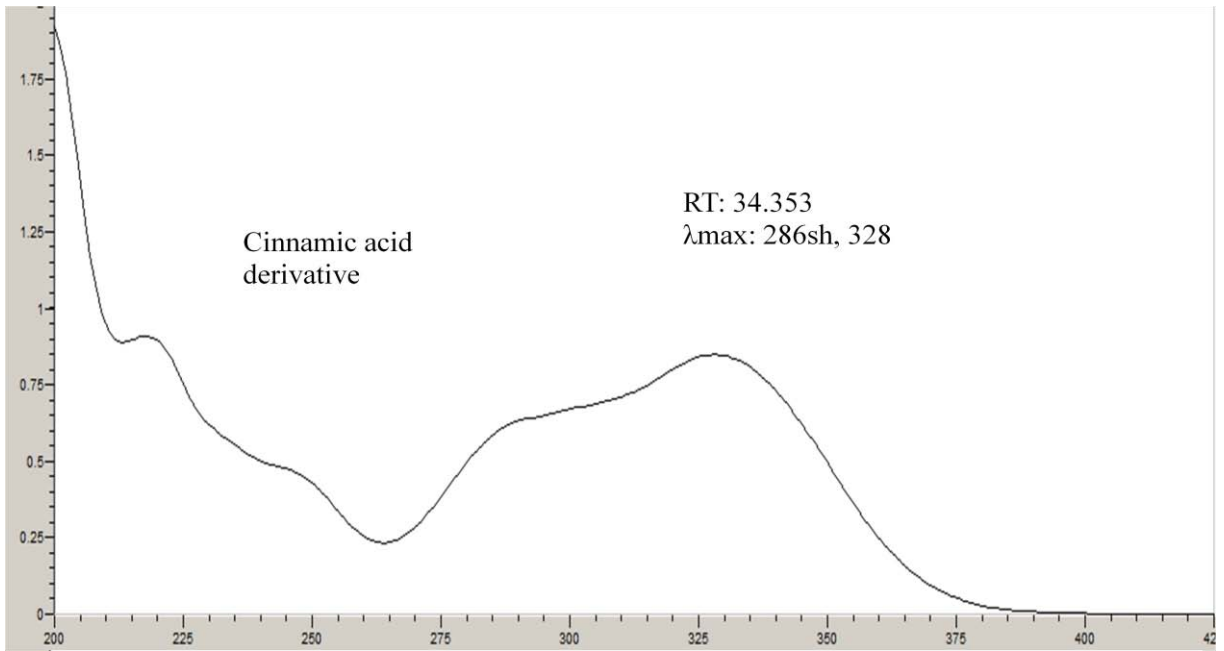
Pico #	Area/ Amount	Lambda Max	Cal. Range	Component Name	Pico #	Area/ Amount	Lambda Max	Cal. Range	Component Name
1	1.0000e+06				12	1.0000e+06			peak4
2	1.0000e+06				13	1.0000e+06			
3	1.0000e+06				14	1.0000e+06			
4	1.0000e+06				15	1.0000e+06			
5	1.0000e+06				16	1.0000e+06			
6	1.0000e+06				17	1.0000e+06			
7	1.0000e+06				18	1.0000e+06			
8	1.0000e+06				19	1.0000e+06			
9	1.0000e+06				20	1.0000e+06			
10	1.0000e+06				21	1.0000e+06			
11	2.3147e+05	--	Quercitr		22	1.0000e+06			
					23	1.0000e+06			
					24	1.0000e+06			
					25	1.0000e+06			
					26	1.0000e+06			
					27	1.0000e+06			
					28	1.0000e+06			
					29	1.0000e+06			
					30	1.0000e+06			
					31	1.0000e+06			
						3.0231e+07		0.0000	

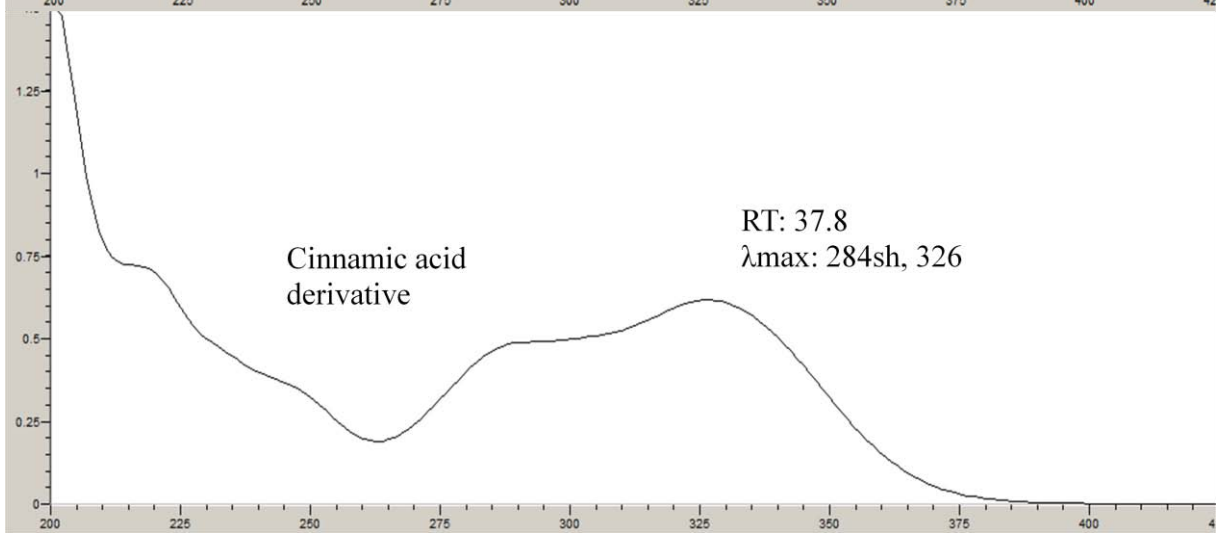
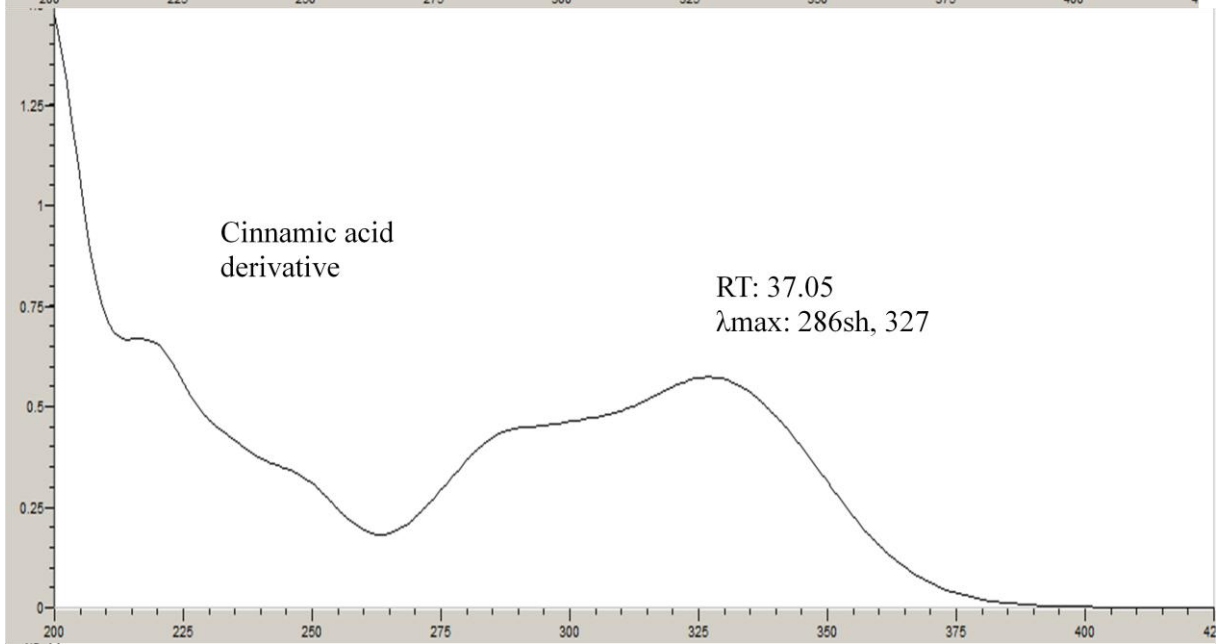
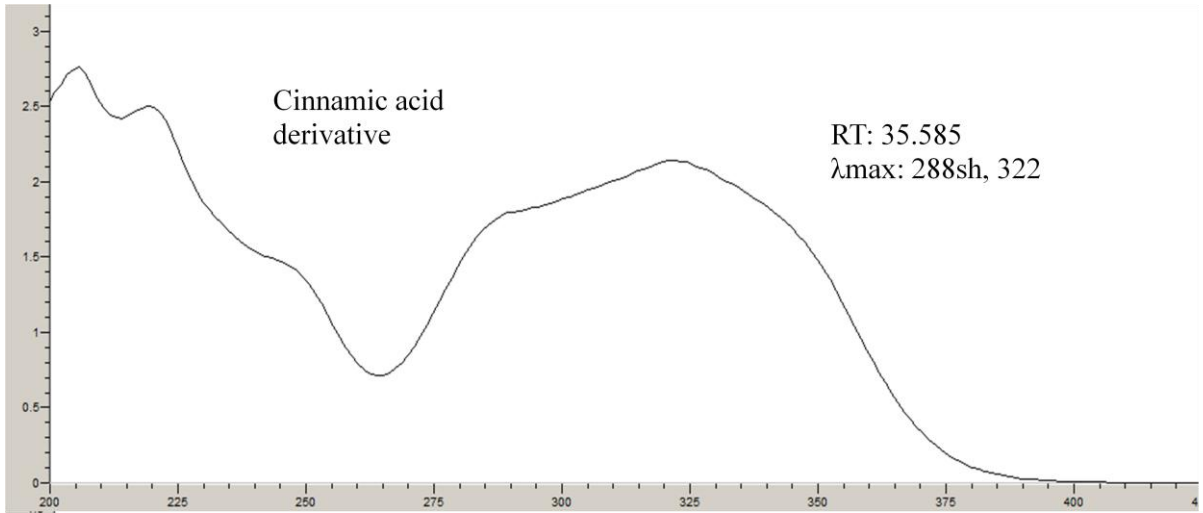
31/08/2011 06:42:59 p.m. Result: C:\resultados\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\Dilución al 50 %\Fase organica (dilucion 50%)\cliv 01 (50%).rst (Number 12 to 31).

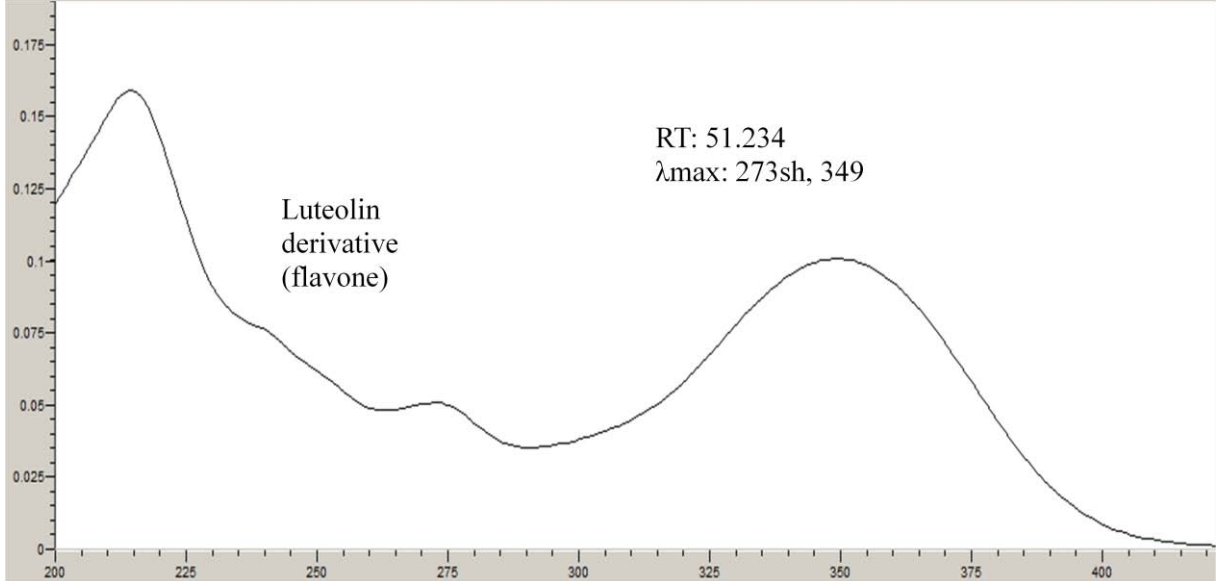
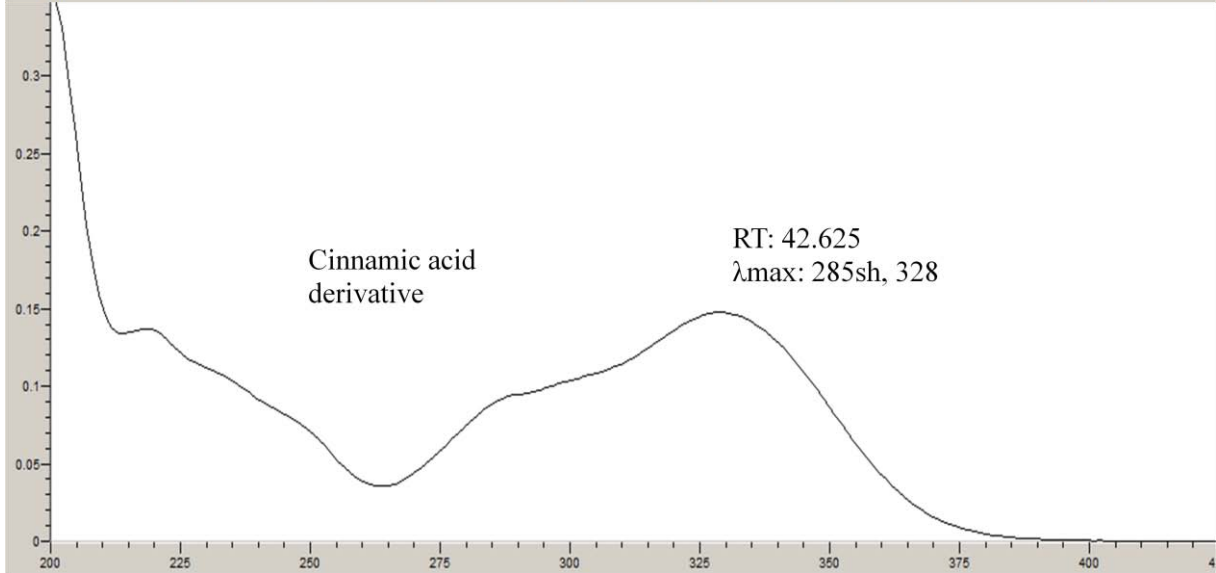
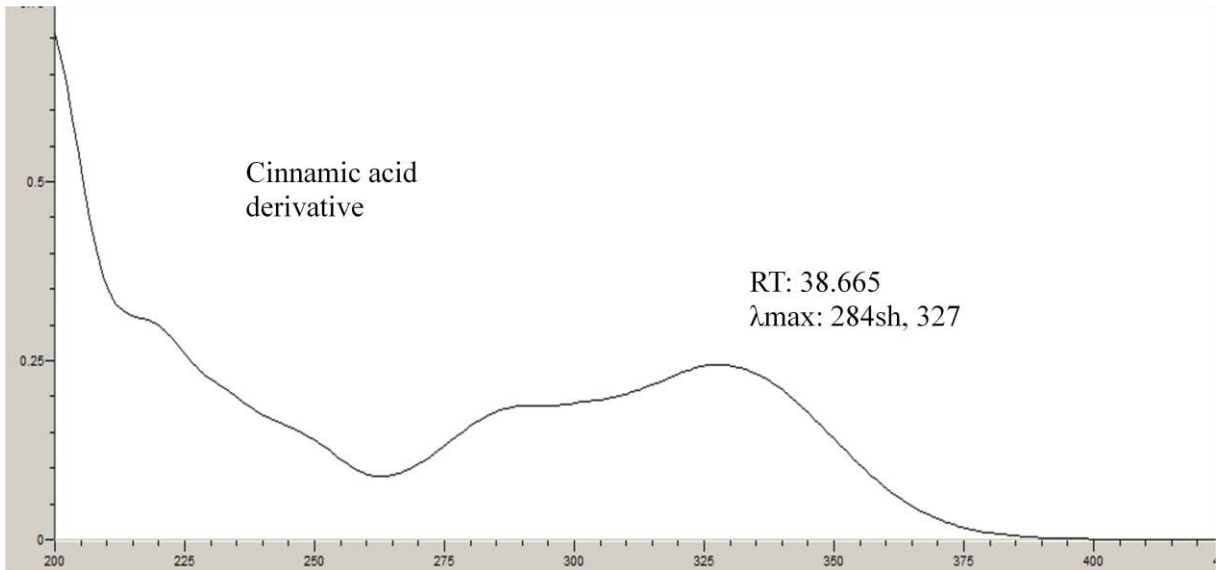
Missing Component Report
Component Expected Retention (Calibration File)

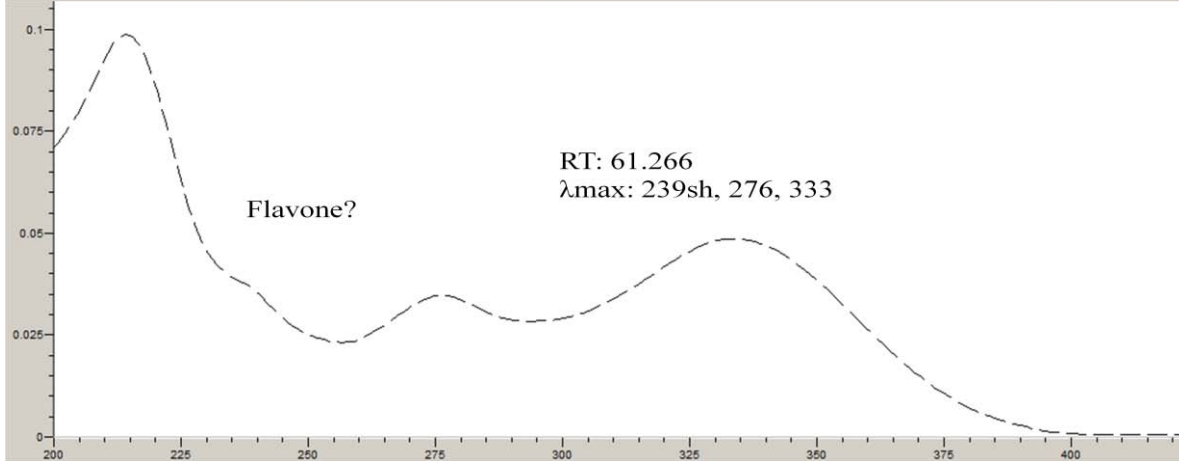
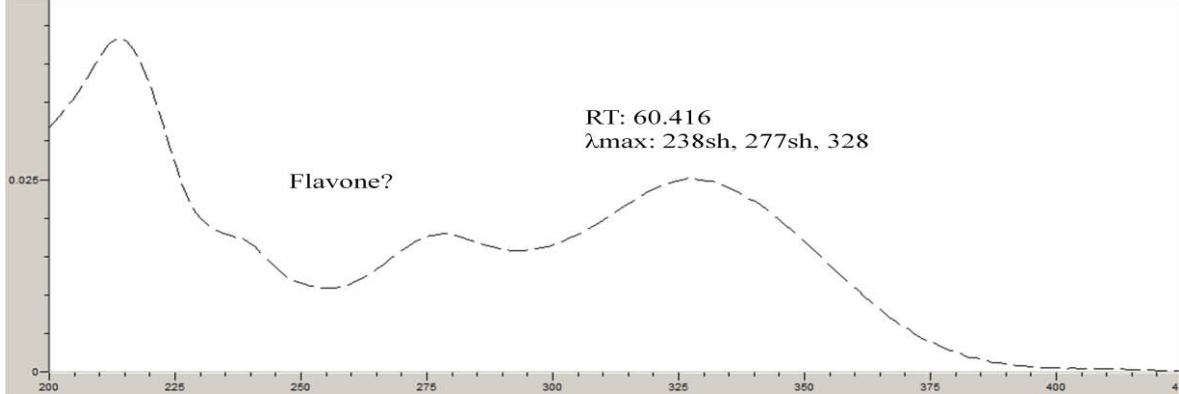
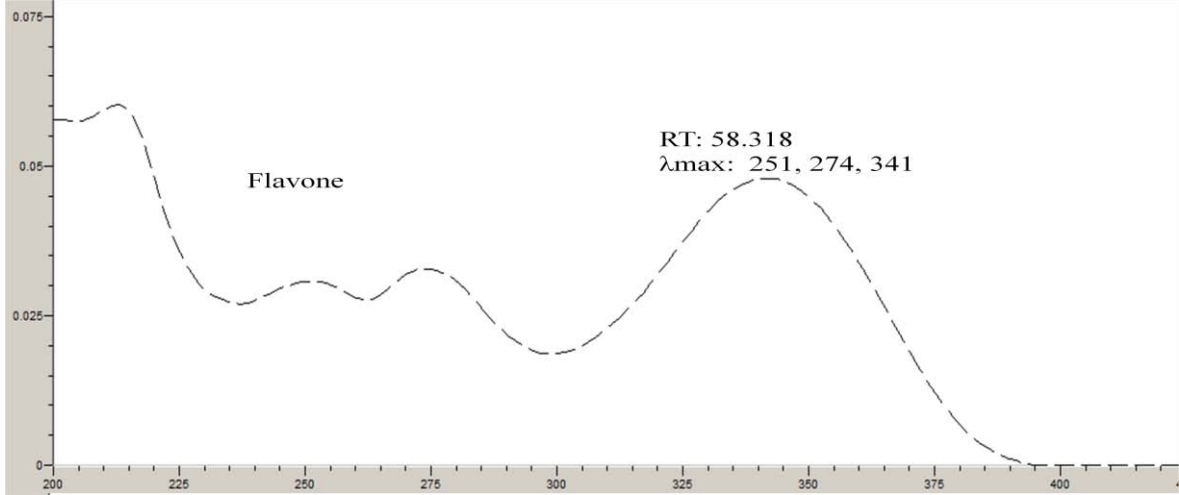
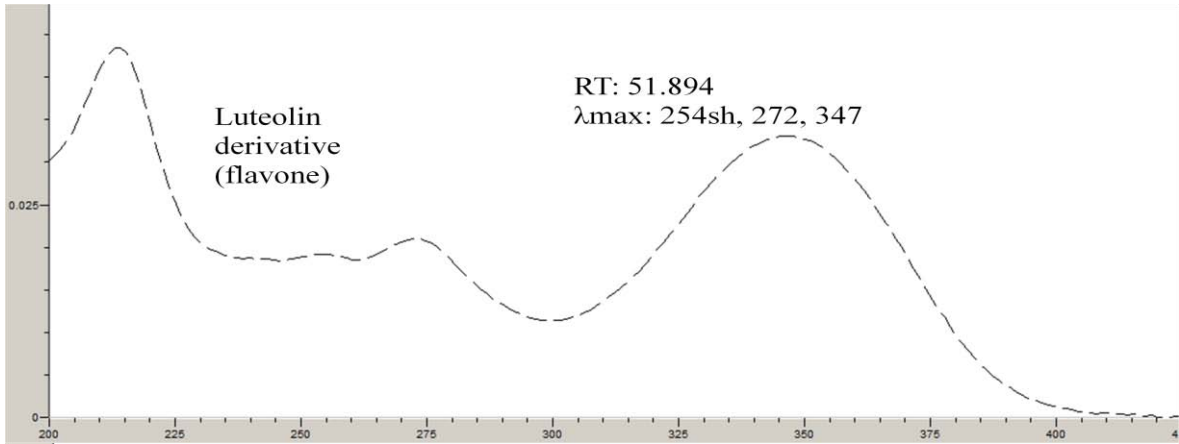
Acido galico 4.170











HPLC-DAD de *Lantana camara* L. (Clv 02): **fraction aqueuse 12,5%**.

Software Version	: 6.3.1.0504	Date	: 31/08/2011 06:57:12 p.m.
Operator	: ciidir	Sample Name	: Clv 02 extracto acuoso (C)
Sample Number	: 001	Study	: Compuestos fenolicos
Auto Sampler	: SER200	Rack/Vial	: 0/64
Instrument Name	: LCDAD	Channel	: A
Instrument Serial #	: None	A/D mV Range	: 1000
Delay Time	: 0.00 min	End Time	: 65.19 min
Sampling Rate	: 2.2727 pts/s	Area Reject	: 0.000000
Sample Volume	: 1.000000 ul	Dilution Factor	: 1.00
Sample Amount	: 1.0000	Cycle	: 8
Data Acquisition Time	: 31/08/2011 02:10:02 p.m.		

Raw Data File : c:\resultados\muestras del extranjero de la dra. norma\dilución al 87.5 %\fase acuosa\clv 02 (12.5%) cuosa.raw

Result File : C:\resultados\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\Dilución al 87.5 %\Fase acuosa\clv 02 (12.5%) cuosa.rst [Editing in Progress]

Inst Method : c:\metodos\compuestos fenolicos 65 min 260 (100ul) from c:\resultados\muestras del extranjero de la dra. norma\dilución al 87.5 %\fase acuosa\clv 02 (12.5%) cuosa.raw

Proc Method : c:\metodos\compuestos fenolicos 65 min 260 (100ul) from C:\resultados\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\Dilución al 87.5 %\Fase acuosa\clv 02 (12.5%) cuosa.rst [Editing in Progress]

Calib Method : c:\metodos\compuestos fenolicos 65 min 260 (100ul) from C:\resultados\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\Dilución al 87.5 %\Fase acuosa\clv 02 (12.5%) cuosa.rst [Editing in Progress]

Report Format File: c:\metodos\reporte flavo.rpt

Sequence File : C:\secuencia\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\31 Agosto 2011.seq

REPORTE

Pico Tiempo # [min]	Area [uV*sec]	Altura [uV]	Area Norm. [%]	Area BL [%]	Raw Amount	Adjusted Amount	Area/ Amount
1 2.516	26336037.72	770922.48	7.29	7.29 BV	26.3360	26.336	1.000e+06
2 3.188	44249300.05	614892.49	12.24	12.24 VB	44.2493	44.249	1.000e+06
3 14.719	256413.81	1223.48	0.07	0.07 BB	0.2564	0.256	1.000e+06
4 20.516	170938.88	5172.51	0.05	0.05 BB	0.1709	0.171	1.000e+06
5 24.324	10170.87	475.69	0.00	0.00 BB	0.0102	0.010	1.000e+06
6 28.043	676842.34	18340.20	0.19	0.19 BV	0.6768	0.677	1.000e+06
7 28.374	525573.13	19809.82	0.15	0.15 VV	0.5256	0.526	
8 29.319	706864.59	16955.25	0.20	0.20 VV	0.7069	0.707	
9 30.507	1986122.24	58961.44	0.55	0.55 VV	1.9861	1.986	1.000e+06
10 30.734	1626190.24	73608.59	0.45	0.45 VV	1.6262	1.626	1.000e+06
11 31.298	2361522.91	61881.26	0.65	0.65 VV	2.3615	2.362	1.000e+06
12 32.886	5552791.62	97025.85	1.54	1.54 VV	5.5528	5.553	1.000e+06
13 33.426	5400800.55	165347.80	1.49	1.49 VV	5.4008	5.401	1.000e+06
14 35.002	64057534.92	1.96e+06	17.72	17.72 VV			

31/08/2011 06:57:12 p.m. Result: C:\resultados\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\Dilución al 87.5 %\Fase acuosa\clv 02 (12.5%) cuosa.rst

REPORTE							
Pico Tiempo # [min]	Area [uV*sec]	Altura [uV]	Area Norm. [%]	Area BL [%]	Raw Amount	Adjusted Amount	Area/ Amount
15 35.413	39078376.67	1.14e+06	10.81	10.81 VV	39.0784	39.078	1.000e+06
16 36.568	24039036.98	591055.57	6.65	6.65 VV	24.0390	24.039	
17 37.662	3901368.64	199300.11	1.08	1.08 VV	3.9014	3.901	.000e+06
18 38.147	7870583.96	203658.90	2.18	2.18 VV	7.8706	7.871	1.000e+06
19 38.897	7092229.33	244476.19	1.96	1.96 VV	7.0922	7.092	1.000e+06
20 39.507	24098037.07	635077.46	6.67	6.67 VV	104.1090	104.109	231469.226
21 40.807	2994026.31	145049.16	0.83	0.83 VV	2.9940	2.994	
22 41.292	4610035.47	116913.01	1.28	1.28 VV	4.6100	4.610	1.000e+06
23 42.107	2090729.14	62927.73	0.58	0.58 VV	2.0907	2.091	1.000e+06
24 43.065	1666365.46	56372.57	0.46	0.46 VV	1.6664	1.666	1.000e+06
25 43.420	2243443.44	81657.02	0.62	0.62 VV	2.2434	2.243	1.000e+06
26 44.466	2763184.42	97401.26	0.76	0.76 VV	2.7632	2.763	
27 45.090	1128428.09	40940.46	0.31	0.31 VV	1.1284	1.128	1.000e+06
28 46.077	20097152.05	1.03e+06	5.56	5.56 VV	20.0972	20.097	1.000e+06
29 46.537	56966882.21	1.59e+06	15.76	15.76 VE	-----	-----	-----
30 48.532	4498080.32	141108.15	1.24	1.24 EV	4.4981	4.498	1.000e+06
31 49.429	608318.45	29634.12	0.17	0.17 VV	0.6083	0.608	1.000e+06
32 49.818	320502.71	19502.75	0.09	0.09 VB	0.3205	0.321	1.000e+06
33 51.425	77756.59	7844.11	0.02	0.02 BB	0.0778	0.078	1.000e+06
34 51.759	100646.26	8868.38	0.03	0.03 BV	0.1006	0.101	1.000e+06
35 52.195	969787.65	44984.23	0.27	0.27 VB	0.9698	0.970	1.000e+06
36 53.203	310776.26	19120.67	0.09	0.09 BB	0.3108	0.311	
	3.61e+08	1.04e+07	100.00	100.00	320.4294	320.429	3.323e+07

31/08/2011 06:57:12 p.m. Result: C:\resultados\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\Dilución al 87.5 %\Fase acuosa\clv 02 (12.5%) cuosa.rst (Number 6 to 36).

Pico #	Area/Amount	Lambda Max	Cal. Range	Component Name	Pico #	Area/Amount	Lambda Max	Cal. Range	Component Name
1	1.0000e+06				6	1.0000e+06			
2	1.0000e+06				7	1.0000e+06			
3	1.0000e+06				8	1.0000e+06			
4	1.0000e+06				9	1.0000e+06			
5	1.0000e+06				10	1.0000e+06			
					11	1.0000e+06			
					12	1.0000e+06			
					13	1.0000e+06			
					14	-----			
					15	1.0000e+06			
					16	1.0000e+06			
					17	1.0000e+06			
					18	1.0000e+06			
					19	1.0000e+06	-----		peak4
					20	2.3147e+05	-----	+	Quercitr
					21	1.0000e+06	-----		
					22	1.0000e+06	-----		
					23	1.0000e+06	-----		
					24	1.0000e+06	-----		
					25	1.0000e+06	-----		
					26	1.0000e+06	-----		
					27	1.0000e+06	-----		
					28	1.0000e+06	-----		
					29	-----			
					30	1.0000e+06			
					31	1.0000e+06			
					32	1.0000e+06			
					33	1.0000e+06			
					34	1.0000e+06			
					35	1.0000e+06			
					36	1.0000e+06			
						3.3231e+07		0.0000	

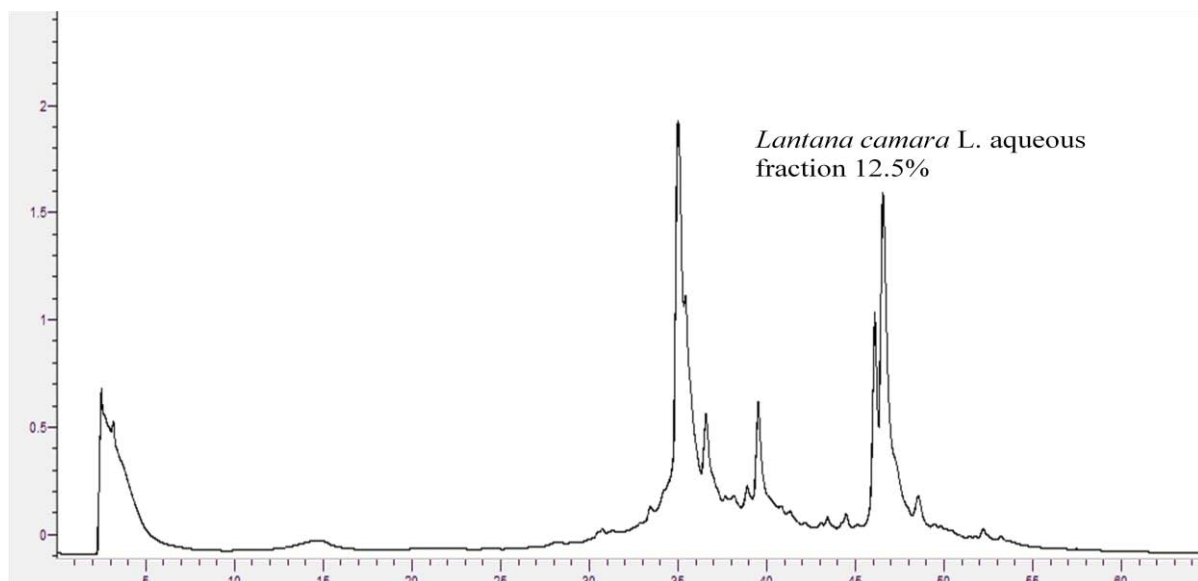
Warning -- Signal level out-of-range in peak

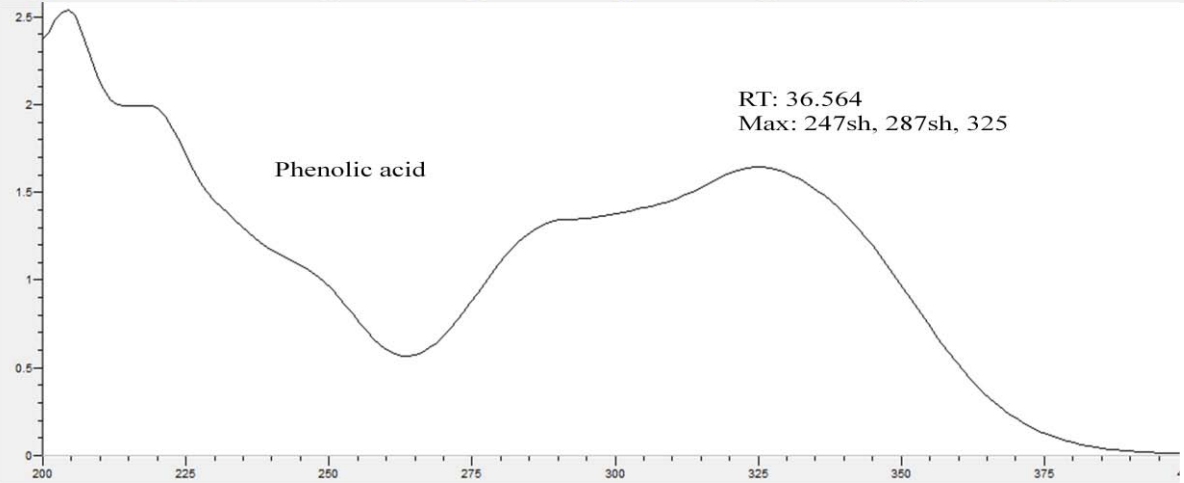
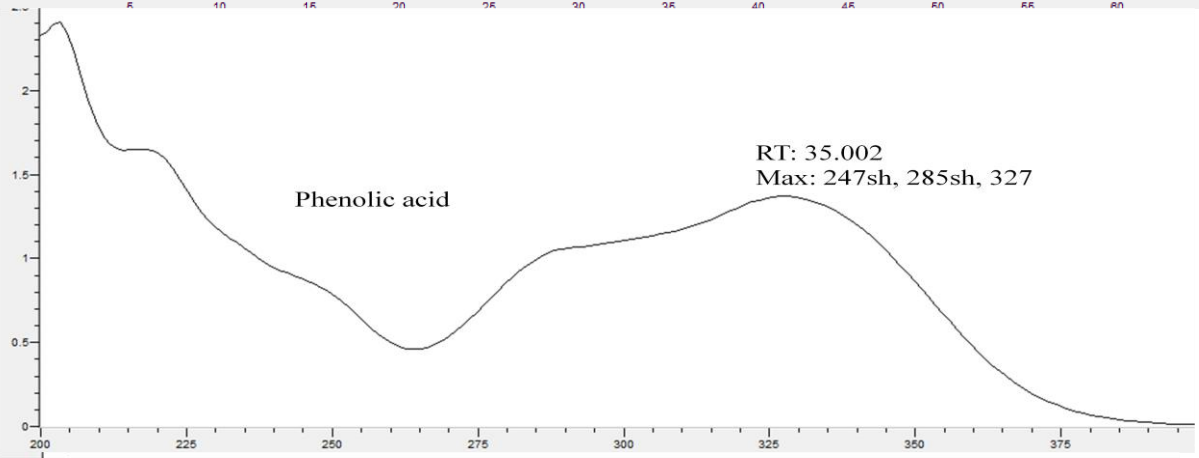
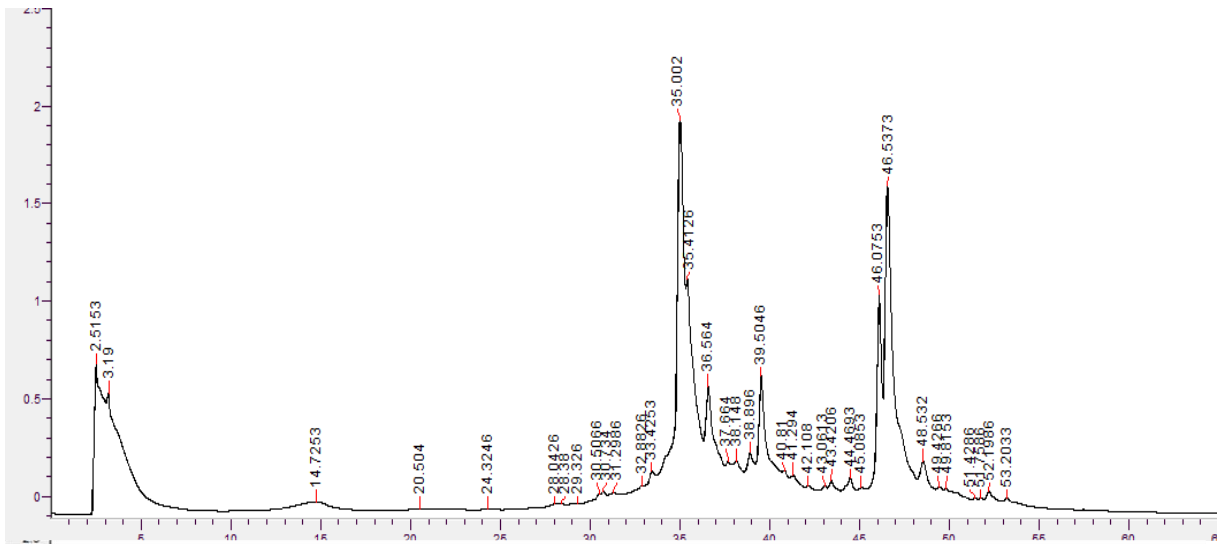
Missing Component Report

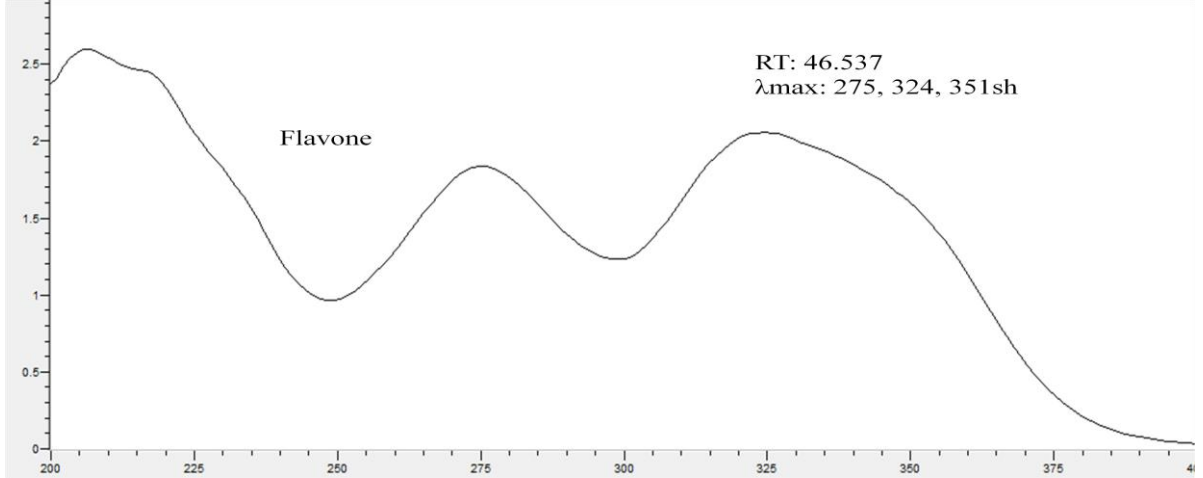
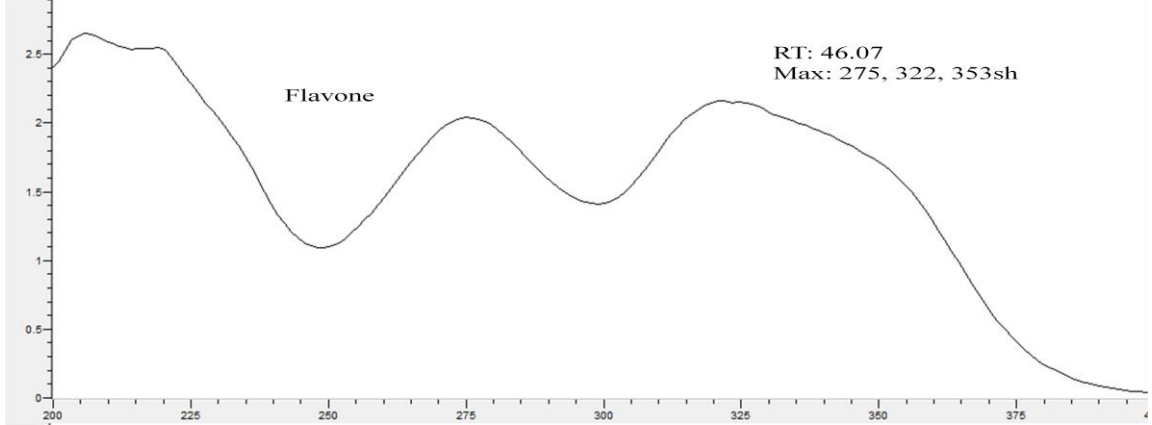
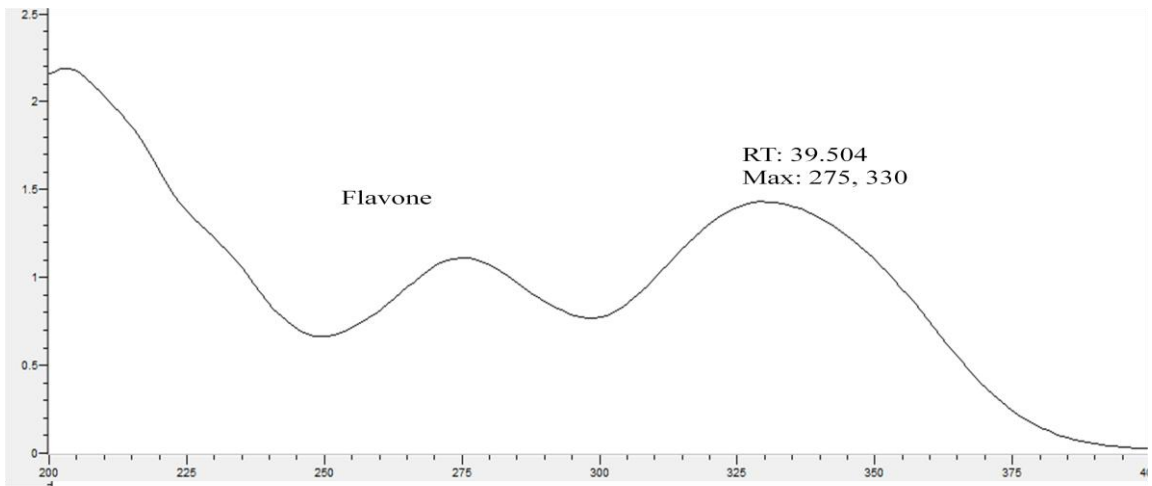
Component Expected Retention (Calibration File)

Acido galico

4.170







HPLC-DAD de *Lantana camara* L. (Clv 02): **fraction acetate d'éthyle 12,5%**.

Software Version	: 6.3.1.0504	Date	: 31/08/2011 07:00:54 p.m.
Operator	: ciidir	Sample Name	: Clv 02 extracto
Sample Number	: 001		òrganico (C)
Auto Sampler	: SER200	Study	: Compuestos fenolicos
Instrument Name	: LCDAD	Rack/Vial	: 0/61
Instrument Serial #	: None	Channel	: A
Delay Time	: 0.00 min	A/D mV Range	: 1000
Sampling Rate	: 2.2727 pts/s	End Time	: 65.19 min
Sample Volume	: 1.000000 ul		
Sample Amount	: 1.0000	Area Reject	: 0.000000
Data Acquisition Time	: 31/08/2011 10:24:38 a.m.	Dilution Factor	: 1.00
		Cycle	: 2

Raw Data File : c:\resultados\muestras del extranjero de la dra. norma\dilución al 87.5 %\fase organica\clv 02 (12.5 %).raw

Result File : C:\resultados\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\Dilución al 87.5 %\Fase organica\clv 02 (12.5 %).rst [Editing in Progress]

Inst Method : c:\metodos\compuestos fenolicos 65 min 260 (100ul) from c:\resultados\muestras del extranjero de la dra. norma\dilución al 87.5 %\fase organica\clv 02 (12.5 %).raw

Proc Method : c:\metodos\compuestos fenolicos 65 min 260 (100ul) from C:\resultados\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\Dilución al 87.5 %\Fase organica\clv 02 (12.5 %).rst [Editing in Progress]

Calib Method : c:\metodos\compuestos fenolicos 65 min 260 (100ul) from C:\resultados\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\Dilución al 87.5 %\Fase organica\clv 02 (12.5 %).rst [Editing in Progress]

Report Format File: c:\metodos\reporte flavo.rpt

Sequence File : C:\secuencia\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\31 Agosto 2011.seq

REPORTE

Pico Tiempo # [min]	Area [uV*sec]	Altura [uV]	Area Norm. [%]	Area BL [%]	Raw Amount	Adjusted Amount	Area/ Amount
1 2.491	10693814	94 259061.91	13.11	13.11 BV	10.6938	10.694	1.000e+06
2 3.225	8891688.42	184417.41	10.90	10.90 VB	8.8917	8.892	1.000e+06
3 31.262	90868.90	3835.96	0.11	0.11 BB	0.0909	0.091	
4 33.849	581154.30	18845.52	0.71	0.71 BV	0.5812	0.581	1.000e+06
5 35.459	31957273.40	1.02e+06	39.18	39.18 VE	31.9573	31.957	1.000e+06
6 36.962	5836138.83	132112.28	7.16	7.16 EV	25.2135	25.213	231469.226
7 37.992	680541.86	32438.26	0.83	0.83 VV	0.6805	0.681	
8 38.516	1367637.29	35831.67	1.68	1.68 VV	1.3676	1.368	1.000e+06
9 39.325	1116182.59	52289.69	1.37	1.37 VV	1.1162	1.116	1.000e+06
10 40.034	578660.44	24654.47	0.71	0.71 VB	0.5787	0.579	1.000e+06
11 41.024	19316.27	1996.77	0.02	0.02 BB	0.0193	0.019	1.000e+06
12 42.423	150505.65	9533.91	0.18	0.18 BB	0.1505	0.151	
13 43.490	56839.43	3762.90	0.07	0.07 BB	0.0568	0.057	1.000e+06
14 43.970	10632.91	583.90	0.01	0.01 BB	0.0106	0.011	1.000e+06
15 44.707	358362.71	14447.31	0.44	0.44 BB	0.3584	0.358	1.000e+06
16 46.450	12050982.62	544311.98	14.78	14.78 BV	12.0510	12.051	

31/08/2011 07:00:54 p.m. Result: C:\resultados\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\Dilución al 87.5 %\Fase organica\clv 02 (12.5 %).rst

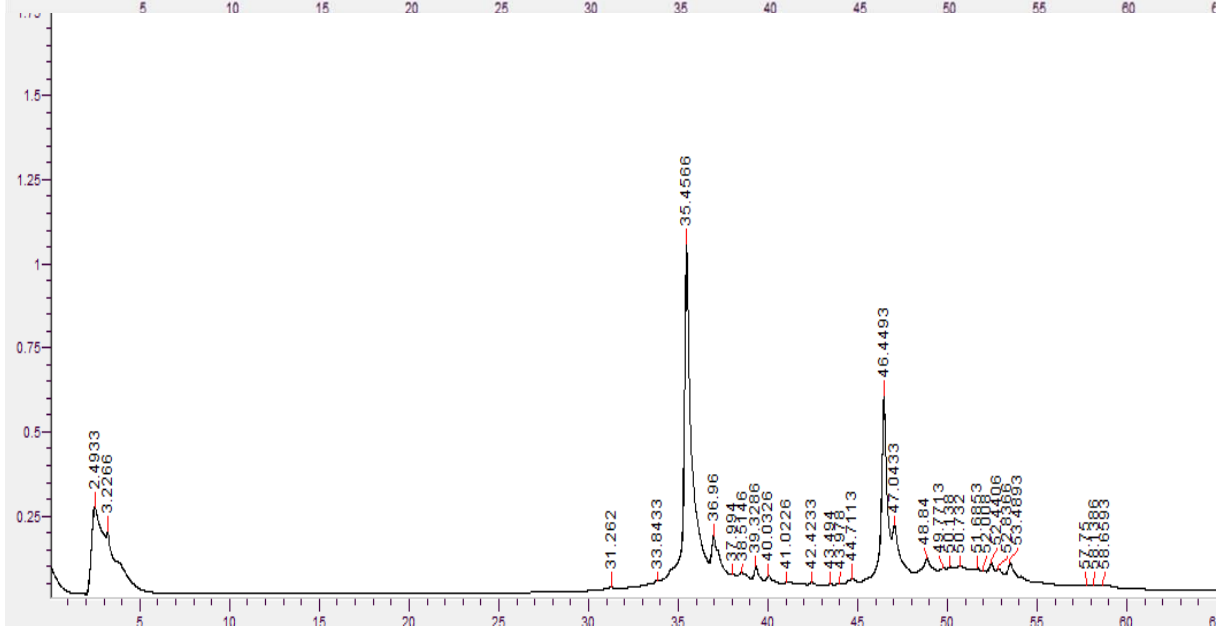
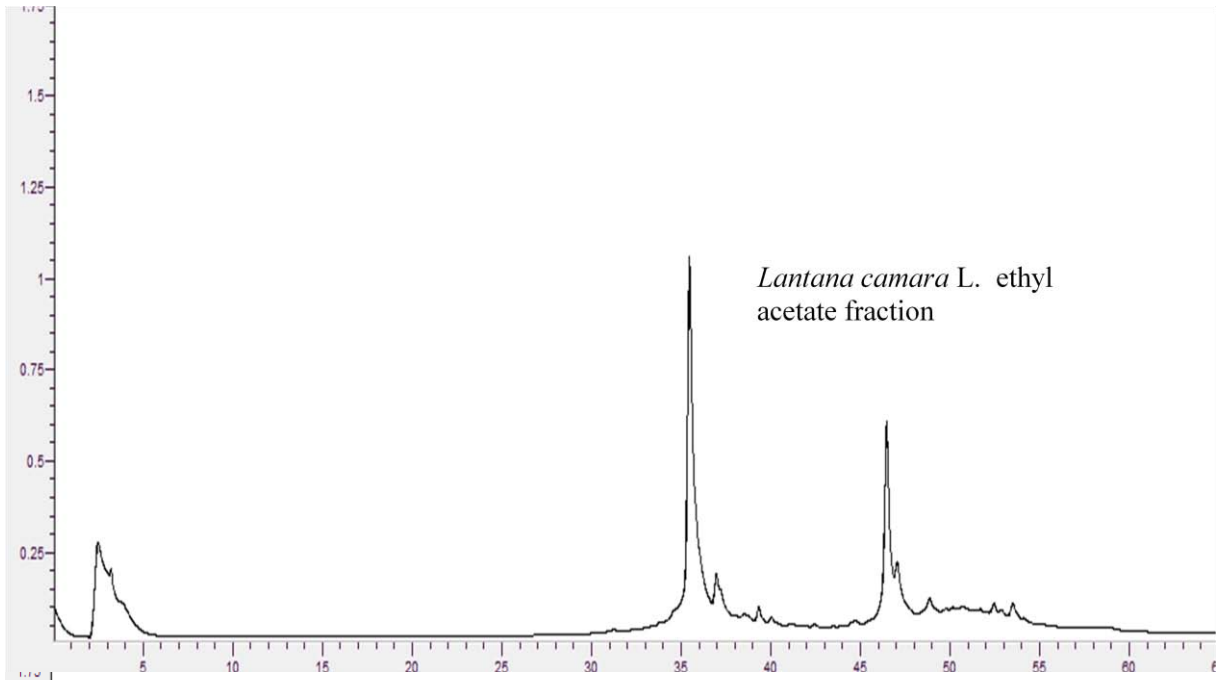
REPORTE							
Pico Tiempo # [min]	Area [uV*sec]	Altura [uV]	Area Norm. [%]	Area BL [%]	Raw Amount	Adjusted Amount	Area/ Amount
17 47.040	4411275.23	155302.79	5.41	5.41 VV	4.4113	4.411	
18 48.839	1078981.46	41741.59	1.32	1.32 VB	1.0790	1.079	
19 49.777	47865.84	3568.15	0.06	0.06 BV	0.0479	0.048	1.000e+06
20 50.136	36297.54	3381.54	0.04	0.04 VB	0.0363	0.036	1.000e+06
21 50.730	89806.65	5692.12	0.11	0.11 BB	0.0898	0.090	1.000e+06
22 51.685	74845.73	6892.21	0.09	0.09 BV	0.0748	0.075	
23 52.013	34118.39	3193.80	0.04	0.04 VB	0.0341	0.034	1.000e+06
24 52.439	386523.12	26560.54	0.47	0.47 BV	0.3865	0.387	1.000e+06
25 52.833	218722.56	13475.90	0.27	0.27 VB	0.2187	0.219	1.000e+06
26 53.487	628836.53	35917.31	0.77	0.77 BB	0.6288	0.629	1.000e+06
27 57.749	46675.35	3368.02	0.06	0.06 BV	0.0467	0.047	1.000e+06
28 58.137	36074.91	2691.10	0.04	0.04 VB	0.0361	0.036	1.000e+06
29 58.658	30689.04	2366.58	0.04	0.04 BB	0.0307	0.031	1.000e+06
	81561312.89	2.64e+06	100.00	100.00	100.9386	100.939	2.823e+07

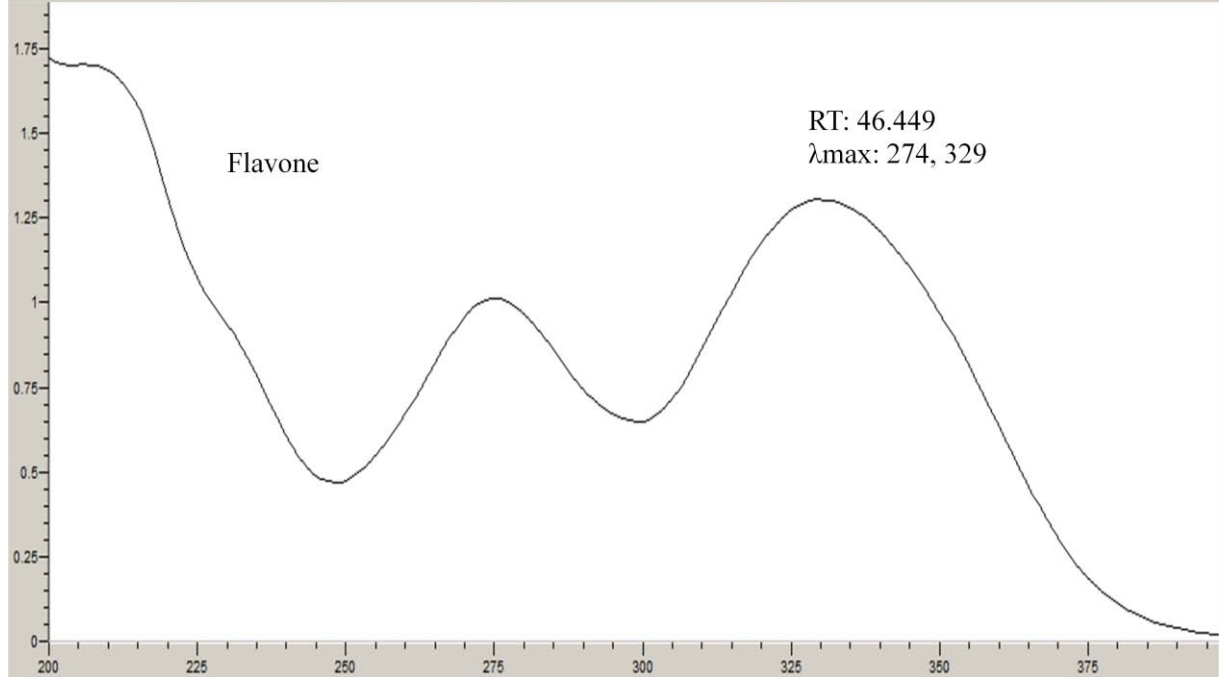
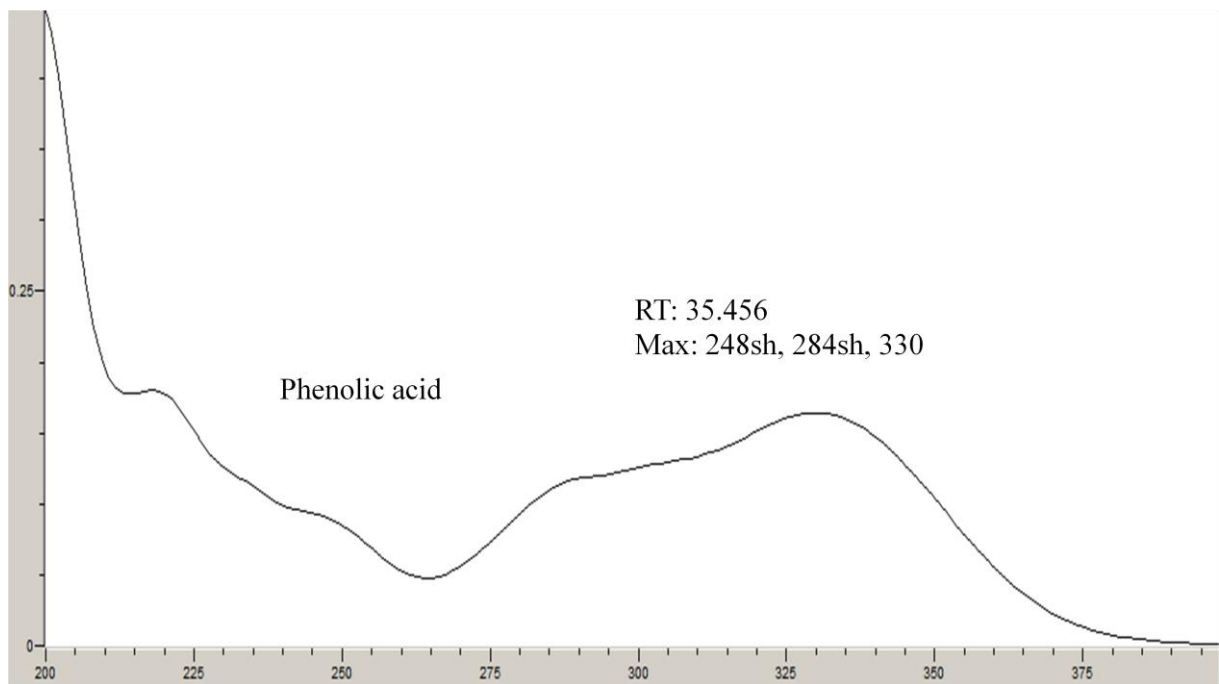
Pico #	Area/ Amount	Lambda Max	Cal. Range	Component Name	Pico #	Area/ Amount	Lambda Max	Cal. Range	Component Name
1	1.0000e+06				15	1.0000e+06			
2	1.0000e+06				16	1.0000e+06			
3	1.0000e+06				17	1.0000e+06			
4	1.0000e+06				18	1.0000e+06	-----		
5	1.0000e+06				19	1.0000e+06	-----		
6	2.3147e+05	Quercitr			20	1.0000e+06	-----		
7	1.0000e+06				21	1.0000e+06	-----		
8	1.0000e+06	peak4			22	1.0000e+06	-----		
9	1.0000e+06				23	1.0000e+06	-----		
10	1.0000e+06				24	1.0000e+06	-----		
11	1.0000e+06				25	1.0000e+06	-----		
12	1.0000e+06				26	1.0000e+06	-----		
13	1.0000e+06				27	1.0000e+06	-----		
14	1.0000e+06				28	1.0000e+06	-----		
					29	1.0000e+06	-----		
						2.8231e+07	0.0000		

31/08/2011 07:00:54 p.m. Result: C:\resultados\Muestras del extranjero de la Dra. Norma\Dilución al 87.5 %\Fase organica\clv 02 (12.5 %).rst

Missing Component Report
Component Expected Retention (Calibration File)

Acido galico 4.170





PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Evaluation of Enzymes Inhibition Activities of Medicinal Plant from Burkina Faso

¹Mindiédiba Jean Bangou, ¹Martin Kiendrebeogo, ¹Nâg-Tiero Roland Meda, ¹Ahmed Yacouba Coulibaly,
¹Moussa Compaoré, ²Boukaré Zeba, ³Jeanne Millogo-Rasolodimby and ¹Odile Germaine Nacoulma
¹Laboratoire de Biochimie et de Chimie Appliquées (L.A.BIO.C.A), U.F.R/S.V.T,
Université de Ouagadougou, 09 BP 848 Ouagadougou 09, Burkina Faso
²Laboratoire d'Enzymologie de la Chimio-Résistance Bactérienne (L.E.CR.B), U.F.R/S.V.T,
Université de Ouagadougou, 09 BP 848 Ouagadougou 09, Burkina Faso
³Laboratoire de Biologie et d'Ecologie Végétales, U.F.R/S.V.T, Université de Ouagadougou,
09 BP 848 Ouagadougou 09, Burkina Faso

Abstract: The aim of the present study was to evaluate some enzymes inhibitory effects of 11 plant species belonging to 9 families from Burkina Faso. Methanolic extracts were used for their Glutathione-s-transferase (GST), Acetylcholinesterase (AChE), Carboxylesterase (CES) and Xanthine Oxidase (XO) inhibitory activities at final concentration of 100 µg mL⁻¹. The total phenolics, flavonoids and tannins were also determined spectrophotometrically using Folin-Ciocalteu, AlCl₃ and ammonium citrate iron reagents, respectively. Among the 11 species tested, the best inhibitory percentages were found with *Euphorbia hirta*, *Sclerocarya birrea* and *Scoparia dulcis* (inhibition >40%) followed by *Annona senegalensis*, *Annona squamosa*, *Polygala arenaria* and *Ceratotheca sesamoides* (inhibition >25%). The best total phenolic and tannin contents were found with *S. birrea* with 56.10 mg GAE/100 mg extract and 47.75 mg TAE/100 mg extract, respectively. *E. hirta* presented the higher total flavonoids (9.96 mg QE/100 mg extract). It's was found that *Sclerocarya birrea* has inhibited all enzymes at more than 30% and this activity is correlated to total tannins contents. Contrary to *S. birrea*, the enzymatic activities of *E. hirta* and *S. dulcis* are correlated to total flavonoids contents. Present findings suggest that the methanolic extracts of those plant species are potential inhibitors of GST, AChE, CES and XO and confirm their traditional uses in the treatment of mental disorders, gout, painful inflammations and cardiovascular diseases.

Key words: Polyphenolic compounds, glutathione-s-transferase, acetylcholinesterase, carboxylesterase, xanthine oxidase

INTRODUCTION

The renewed interest in natural healing methods and the use of natural product treatments has led to a steadily growing interest in medicinal plants and the classical methods of plant extract preparations (Sweeney *et al.*, 2001). Medicinal plants are well-known natural sources for the treatment of various diseases since antiquity. In Burkina Faso, medicinal plants are increasingly used by the tradipractitioners and herbalists for the treatment of various ailments i.e. nervous system diseases, neuralgia, rheumatism, arterial hypertension, mental disorder, antitumoral, gout, skin cancer and inflammation (Table 1). Some enzymes are known to be involved in these diseases. For example, Xanthine Oxidase (XO) which is responsible for gout, also serves as an important biological source of oxygen-derived free

radicals that contribute to oxidative damage to living tissues that are involved in many pathological processes such as inflammation, atherosclerosis, cancer and aging (Wu and Ng, 2008; Havlik *et al.*, 2010). Principal role of Acetylcholinesterase (AChE) is the termination of nerve impulse transmission at the cholinergic synapses by rapid hydrolysis of acetylcholine (Adersen *et al.*, 2007; Vinutha *et al.*, 2007; Mukherjee *et al.*, 2007; Bonesi *et al.*, 2010). Carboxylesterases (CES) play a key biological role as they are able to hydrolyse numerous endogen and xenobiotic ester-containing substances and the over expression of Glutathione-S-Transferase (GST) in cancer results in resistance to chemotherapeutic agents. Thus, controlling the activity of these enzymes would be highly useful for the treatment of gout and Alzheimer's disease and for the management of the biological impact of ester compounds consumed by humans through different ways

(Orhan *et al.*, 2004; Sweeney *et al.*, 2001; Mukherjee *et al.*, 2007; Djeridane *et al.*, 2008). Furthermore, the use of GST inhibitors as therapeutic agents has been proven to be useful in endeavours to modulate anticancer drug-resistance (Van-Zanden *et al.*, 2003; Hayeshi *et al.*, 2007).

In a search for new plant-derived biologically active extracts against those diseases, we have carried out the screening of medicinal plant from Burkina Faso for AChE, GST, XO and CES inhibitory activities *in vitro*. To obtain more accuracy data on these activities, the total phenolics, flavonoids and tannins contents were also estimated using spectrophotometric methods.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials: Plant materials constituted of 11 medicinal plants from interior of Burkina Faso were collected at Ouagadougou in July 2006. The plants were botanically identified by Professor Millogo-Rasolodimby from Ecology Laboratory of the University of Ouagadougou. Voucher specimens (Table 1) were deposited in the herbarium of the La.B.E.V. (Laboratoire de Biologie et d'Ecologie Végétales) from the University of Ouagadougou.

Chemicals: Reagents come from (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Germany): L-Glutathione reduced (GSH), Glutathione-S-Transferase (GST) from rat liver, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), Albumin from Bovine Serum (BSA), potassium phosphate monobasic (KH₂PO₄) and dibasic (K₂HPO₄). Acetylcholinesterase (AChE) from electric eel, acetylcholine iodide (ATCI), 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), tannic acid, gallic acid, quercetin were provided from Sigma-Germany. HCl and sodium carbonate were from Labosi-France.

Folin-Ciocalteu reagent was from Sigma-USA. Carboxylesterase from pig liver, Xanthine oxidase, DMSO and Tween were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Germany). Aluminum trichloride (AlCl₃), Na₂HPO₄ and NaH₂PO₄ were purchased from Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Germany).

Preparation of plant extracts: The dried and powdered samples (10 g) of each plant were extracted with 3×100 mL of technical methanol by steeping over night. Each extract was filtered and concentrated to dryness in a rotary evaporator (BÜCHI Rotavapor R-200, Switzerland).

BIOLOGICAL ACTIVITY

Acetylcholinesterase activity: The AChE inhibition was conducted according to the protocol described by Lopez *et al.* (2002) with some modifications. Briefly described, the assay mixture consisted of 200 µL of Tris-HCl 50 mM pH 8, 0.1% BSA buffer, 100 µL of extracts solution (final concentration: 100 µg mL⁻¹) and 100 µL of AChE (0.22 U mL⁻¹). The mixture was incubated at room temperature for 2 min before adding 500 µL of DTNB (3 mM) and 100 µL of substrate (ATCI 15 mM). The developing yellow color was measured at 405 nm after 4 min (Cecil CE 2041, England). Galanthamine was used as a positive control at a final concentration of 0.2 µg mL⁻¹ in the assay mixture. AChE inhibitory activity was expressed as:

$$\text{Inhibition percentage of AChE (\%)} = \frac{((A-B) \times 100)}{A}$$

where, A is the change in absorbance of the assay without the plant extract and B is the change in absorbance of the assay with the plant extract.

Table 1: Traditional uses of 11 medicinal plant species

Species	Traditional uses	Part used	Herbarium numbers
<i>Scoparia dulcis</i> L. (Scrophulariaceae)	Diabetes, hyperglycemia, fever, antispasmodic (Nacoulma, 1996)	Stem-leaves	BK-sd2784
<i>Euphorbia hirta</i> L. (Euphorbiaceae)	Arterial hypertension, anti-inflammatory, anti-cancer, anti-leukemia (Nacoulma, 1996)	Stem-leaves	BK-eh2797
<i>Sclerocarya birrea</i> (A. Rich) Hochst (Anacardiaceae)	Anti-inflammatory, arterial hypertension, spleen and pancreas inflammation, (Nacoulma, 1996; Lamien-Meda <i>et al.</i> , 2008)	Leaves	BK-sb2795
<i>Calotropis procera</i> Ait. F. (Asclepiadaceae)	Anti-inflammatory/anti-asthmatic, stimulant, rheumatism, headaches (Nacoulma, 1996)	Leaves, bark root	BK-calp2791
<i>Ceratotheca sesamoides</i> Endl. (Pedaliaceae)	Diabetes, spleen cancer, stimulant, anti-inflammatory (Nacoulma, 1996)	Stem-leaves	BK-cs2805
<i>Annona senegalensis</i> Pers (Annonaceae)	Anti-inflammatory, insecticidal, rheumatism, neuralgia (Nacoulma, 1996)	Leaves bark root	Bk-as2776
<i>Annona squamosa</i> L. (Annonaceae)	Fever, diarrhoea, spasmolytic (Nacoulma, 1996)	Leaves	BK-asq2086
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss (Meliaceae)	Fever, insecticidal, anti-inflammatory (Nacoulma, 1996)	Leaves	BK-ai2794
<i>Polygala arenaria</i> Willd (Polygalaceae)	Anti-inflammatory, generalized pains (Nacoulma, 1996)	Stem-leaves	BK-pa2822
<i>Securidaca longepedunculata</i> Fresen (Polygalaceae)	Rheumatism, headache, antitumor (Nacoulma, 1996)	Root	BK-sl2777
<i>Tribulus terrestris</i> L. (Zygophyllaceae)	Malaria, urinary infections, anti-inflammatory (Nacoulma, 1996)	Stem-leaves, seed	BK-tt2787

Inhibition of glutathione-S-transferase: GST inhibitory assay were conducted as described by Habdous *et al.* (2002). The reaction mixture was consisted of 200 μL of phosphate buffer 100 mM (pH 6) and respectively 100 μL of enzyme (1 U mL^{-1}) and 100 μL of extract (1 mg mL^{-1}). The reaction was initiated with 100 μL of GSH (5 mM) and 500 μL CDNB (1 mM). Enzyme preparation for each extract were assayed in triplicate. GST inhibitory activity was expressed as:

$$\text{Inhibition percentage of GST (\%)} = \frac{((A-B) \times 100)}{A}$$

where, A is the change in absorbance of the assay without the plant extract and B is the change in absorbance of the assay with the plant extract.

Assay of xanthine oxidase activity: The XO inhibitory activities were measured spectrophotometrically by using Filha *et al.* (2006) procedure with some modifications. The extracts were directly dissolved in phosphate buffer-MeOH (1%) and screened for XO inhibitory activity at final concentration of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The assay mixture was consisted of 100 μL of extracts, 300 μL of phosphate buffer 0.2 M (pH 9) and 100 μL enzyme solution (0.28 U mL^{-1} in phosphate buffer). The mixture was incubated at room temperature for 2 min. Then, the reaction was initiated by adding 500 μL of xanthine oxidase solution (0.15 mM in phosphate buffer) and the change in absorbance was recorded at 295 nm for 2 min at room temperature. Allopurinol, was used as a positive control at a final concentration of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The results were expressed as:

$$\text{Inhibition percentage of xanthine oxidase (\%)} = \frac{((A-B) \times 100)}{A}$$

where, A is the change in absorbance of the assay without the plant extract and B is the change in absorbance of the assay with the plant extract.

Assay of Carboxylesterase activity: The method of Djeridane *et al.* (2008) was used with some modifications. Ascorbic acid (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was used as reference. Test solution contained 400 μL of Tris-HCl 50 mM buffer (pH 8), 100 μL of plant extract at final concentration of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 100 μL of enzyme solution (0.027 U mL^{-1}) and 400 μL of 4-nitrophenyl (1 mM) was add after incubation at 3 min. The absorbance was readed at 414 nm. The results were expressed as:

$$\text{Inhibition percentage of CES (\%)} = \frac{((A-B) \times 100)}{A}$$

where, A is the change in absorbance of the assay without the plant extract and B is the change in absorbance of the assay with the plant extract.

Determination of polyphenolics compounds

Determination of total phenolic content: The total phenolics of plant extract were determined by the Folin-Ciocalteu reagent method (Lamien-Meda *et al.*, 2008). The diluted solution of each extract (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was mixed with Folin-Ciocalteu reagent method (0.2 N, 2.5 mL). This mixture was allowed to stand at room temperature for five min and then, 2 mL of sodium carbonate solution (75 g L^{-1}) was add. After 2 h incubation, the absorbancies were measured at 760 nm against water blank. A standard calibration curve was plotted using gallic acid (0-200 mg L^{-1}) ($Y = 0.0249x$; $R^2 = 0.9999$). The results were expressed in mg of gallic acid equivalents (mgGAE) per 100 mg extract.

Determination of tannins content: Tannins content was determined according to the European Commission (2000) method. One milliliter of plant extract (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was mixed in mixer with: 5 mL of water, 1 mL of ammonium citrate iron (3, 5 g L^{-1}) old of 24 h and 1 mL of ammoniac (8 g L^{-1}). The absorbance was read at 525 nm after ten min against a blank consisting of: extract (1 mL), water (6 mL), ammoniac (1 mL). Tannic acid (25-350 mg L^{-1}) was used as reference to produce the standard curve ($Y = 0.0011x + 0.2236$; $R^2 = 0.9995$) and the results were expressed in mg tannic acid equivalents (mg TAE) per 100 mg extract.

Determination of flavonoids contents: The total flavonoids were estimated according to the Dowd method as adapted by Lamien-Meda *et al.* (2008). A diluted methanolic solution (2 mL) of each extract (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was mixed with 2 mL of AlCl_3 (2%). The absorbance was read at 415 nm after 10 min against a blank consisting of 2 mL of methanol and 2 mL of extract (without AlCl_3). Quercetin (0-50 mg L^{-1}) was used as reference to produce the standard curve ($Y = 0.0148x$; $R^2 = 0.9997$) and the results were expressed in mg of quercetin equivalents (mgQE) per 100 mg extract.

Statistical analysis: The results are presented as Means \pm standard deviation (SD) of three determinations. Statistical analysis (ANOVA with a statistical significance level set at $p < 0.05$ and linear regression) was carried out with XLSTAT 7.1.

RESULTS AND DISCUSSION

Biological investigations

AChE inhibitory activity: The extracts bearing AChE inhibitory activities are shown in Table 2. The inhibitory percentages varied from 2.94 to 45.88%. The highest inhibition percentages were obtained with *S. dulcis* (45.88%) and *S. birrea* (41.12%) followed by *A. squamosa* (28.80%) and *P. arenaria* (25.17%). The lowest values were registered for *A. senegalensis* (2.94%) and *C. sesamoides* (4.71%). The results obtained with *S. dulcis* and *S. birrea* were moderate compared to Galanthamine (50.76±0.68%) at a final concentration 100 µg mL⁻¹. Recently, AChE inhibitory activity has been investigated on the dichloromethane and methanol fractions obtained from young stem of *S. birrea* (Moyo *et al.*, 2010). The IC₅₀ obtained was 150 µg mL⁻¹ for dichloromethane fraction and 470 µg mL⁻¹ for methanol fraction. Ones can speculate that the AChE inhibitors are more extractible by dichloromethane solvent.

GST inhibitory activity: Methanolic extract of each sample were assayed for GST inhibitory activity at a concentration of 100 µg mL⁻¹ in the assay mixture, these results are shown in Table 2. Of the 11 plant samples used, it was evident that methanolic extract of *E. hirta* exhibited a greater inhibitory activity (47.87%) followed by *S. birrea* (44.34%) and *S. dulcis* (41.55%). The lowest inhibition were obtained for *P. arenaria* (3.46%) and *A. squamosa* (3.89%). Previous study have showed that overexpression of GST is associated with multidrug resistance of tumor cells (Hayeshi *et al.*, 2007; Van-Zanden *et al.*, 2004). The results of the present study suggest that *E. hirta*, *S. birrea* and *S. dulcis* might possess GST inhibitors potential to be used in the treatment of cancer diseases. This can justify their traditional use as indicated by Nacoulma (1996).

CES inhibitory activity: The CES inhibitory activity results were presented in Table 2. According to this table the inhibition percentages were ranged between 1.93% and 34.06%. The best inhibition was found with *S. birrea* (34.06%) and *E. hirta* presented the lowest inhibition (1.93%). *A. senegalensis* and *C. sesamoides* presented a same inhibitory percentage (25.97%). Ascorbic acid was used as reference (56.72±0.85%) at a same concentration (100 µg mL⁻¹). CES are enzymes omnipresent (high levels in a large array of animal tissues) responsible to the detoxication to numerous endogen and xenobiotic. CES also hydrolyse aspirin and some anti-cancerous such as chemotherapeutic agents (Djeridane *et al.*, 2008). In this way, their inhibition can contribute to strengthen these drug effects (Crow *et al.*, 2008; Rodinbo *et al.*, 2003). Present results suggest that extracts of *S. birrea* is good candidates to play that role under appropriate treatments.

XO inhibitory activities: Two extracts inhibited XO at a level higher than 25% (Table 2). The highest inhibition percentages were obtained with *E. hirta* and *S. Birrea* extract with 44.44 and 44.07%, respectively. The lowest values were obtained with *P. arenaria* (6.91%) and *S. longepedunculata* (5.93%). The results obtained in this study showed that the XO inhibitory activities of *E. hirta* and *S. birrea* are moderated, compared to allopurinol (96.38±0.59%) at the same concentration (100 µg mL⁻¹). Our results justify the traditional use of *S. Birrea* and *E. hirta* in the treatment of inflammatory diseases and gout.

Phytochemical analysis: Total phenolics of extracts ranged from 6.18 to 56.10 mg GAE/100 mg extract (Table 3). The highest value of total phenolic content was obtained with *S. birrea* (56.10 mg GAE/100 mg extract) followed by *C. sesamoides* (29.83 mg GAE/100 mg extract). The lowest contents of total phenolics were found in

Table 2: Enzymes inhibitory activities (%)

Species	AChE	GST	CES	XO
<i>A. indica</i>	15.65±0.55 ^{def}	6.32±0.79 ^{cd}	19.380±0.54 ^{cd}	ND
<i>A. senegalensis</i>	2.94±2.88 ^f	12.59±1.75 ^{bc}	25.970±3.83 ^{bc}	ND
<i>A. squamosa</i>	28.80±4.62 ^{bcd}	3.89±2.92 ^{cd}	8.530±1.98 ^{fg}	ND
<i>C. procera</i>	19.50±4.49 ^{def}	19.63±1.09 ^b	22.870±1.97 ^e	ND
<i>C. sesamoides</i>	4.71±3.46 ^f	19.09±3.96 ^b	25.970±0.54 ^{bc}	25.17±8.22 ^c
<i>E. hirta</i>	10.58±1.73 ^{def}	47.87±5.42 ^a	1.930±1.36 ^f	44.44±4.80 ^b
<i>P. arenaria</i>	25.17±13.51 ^{cd}	3.46±1.69 ^{cd}	12.020±1.09 ^{def}	6.91±0.88 ^{de}
<i>S. birrea</i>	41.12±2.90 ^{bc}	44.34±2.52 ^a	34.060±3.62 ^b	44.07±3.66 ^b
<i>S. dulcis</i>	45.88±2.92 ^b	41.55±0.87 ^a	17.390±2.05 ^{cd}	18.99±0.00 ^{cd}
<i>S. longepedunculata</i>	6.95±2.36 ^{ef}	ND	7.730±4.48 ^{de}	5.93±1.04 ^e
<i>T. terrestris</i>	18.81±6.30 ^{def}	6.43±2.61 ^{cd}	5.800±3.55 ^{de}	21.51±1.75 ^c
Galanthamine	50.76±0.68 ^a			
Ascorbic Acid			56.720±0.85 ^a	
Allopurinol				96.38±0.59 ^a

ND: Not determined. Result within each column with different letters (a-g) differs significantly (p<0.05)

Table 3: Polyphenols contents

Species	TP	TAN	TF
<i>A. indica</i>	6.82±0.47 ^f	0.60±0.10 ^h	0.15±0.02 ^f
<i>A. senegalensis</i>	17.77±1.13 ^d	5.63±0.52 ^e	9.19±0.51 ^{ab}
<i>A. squamosa</i>	20.53±0.76 ^{cd}	6.68±0.25 ^d	5.86±0.33 ^d
<i>C. procera</i>	10.83±0.27 ^a	0.63±0.09 ^h	7.88±0.13 ^c
<i>C. sesamoides</i>	29.83±0.73 ^b	18.70±0.24 ^b	9.47±0.46 ^{ab}
<i>E. hirta</i>	23.05±1.67 ^c	15.13±0.34 ^c	9.96±0.62 ^a
<i>P. arenaria</i>	6.18±0.78 ^f	2.33±0.10 ^g	3.81±0.11 ^e
<i>S. birrea</i>	56.10±1.16 ^e	47.75±0.25 ^a	0.85±0.15 ^f
<i>S. dulcis</i>	17.52±1.96 ^d	2.73±0.28 ^f	8.49±0.34 ^{bc}
<i>S. longepedunculata</i>	12.10±0.50 ^f	1.55±0.10 ^{gh}	0.38±0.01 ^f
<i>T. terristris</i>	11.15±1.05 ^e	2.38±0.13 ^g	3.57±0.11

^aTP: Total phenolics (mg GAE/100 mg extract), TF: Total flavonoids (mg QE/100 mg extract), TAN: Tannins content (mg TAE/ 100 mg extract). Result within each column with different letters (a-h) differs significantly (p<0.05)

P. arenaria and *A. indica* with 6.18 and 6.82 mg GAE/100 mg extract, respectively. Previous phytochemical studies have been conducted on *S. birrea* and it was found that the methanolic extracts of young stem of this species contain total phenolics at a level of 14.15 mg GAE/g extract (Moyo *et al.*, 2010). This result means that old stem barks contain more total phenolic than young stem bark. Among the 11 extracts of plants analyzed, *S. birrea* and *C. sesamoides* showed the highest tannin contents with 47.75 and 18.70 mg TAE/100 mg extract, respectively (Table 3). The lowest values were obtained with *A. indica* (0.60 mg TAE/100 mg extract) and *S. longepedunculata* (1.55 mg TAE/100 mg extract). Compared to total phenolic contents, our finding was that the tannins of *S. birrea* (85%), *E. hirta* (65%) and *C. sesamoides* (62%) are major compounds.

The total flavonoid contents varied from 0.15 to 30.43 mg QE/100mg extract (Table 3). *E. hirta*, *C. sesamoides* and *A. senegalensis* presented the high levels with 9.96, 9.47 and 9.15 mg QE/100 mg extract, respectively. The lowest total flavonoid contents were obtained with *A. indica* (0.15 mg QE/100 mg extract), *S. longepedunculata* (0.38 mg QE/100 mg extract) and *S. birrea* (0.85 mg QE/100 mg extract).

Plant secondary metabolites have also been reported to possess a range of pharmacological activities, including antimicrobial, anti-inflammatory, anti-diabetic and enzymes inhibitory effects. Ours founding was that *S. birrea* has inhibited all enzymes at more than 30% and this activity is correlated to total tannins contents. Contrary to *S. birrea*, the enzymatic activities of *E. hirta* and *S. dulcis* are correlated to total flavonoids contents. It's also demonstrated that hydroquinones and tannins are the inhibitors of XO and AChE (Owen and Johns, 1999; Wang *et al.*, 2007; Pithayanukul *et al.*, 2005). The inhibition of XO, GST, CES and AChE is correlated to the total flavonoid contents (Narayana *et al.*, 2001; Van-Zanden *et al.*, 2004; Senol *et al.*, 2010; Meda *et al.*,

2010). Hence, the presence of these phenolic compounds in methanolic extracts of these species would have contributed towards XO, GST, CES and AChE inhibition. *E. hirta*, *S. birrea* and *S. dulcis* could then contain bioactive substances useful in the treatment of gout or other xanthine oxidase induced diseases, Alzheimer's disease and cancer, justifying the popular use of these species in inflammatory and mental disorders in Burkina Faso folk medicine.

CONCLUSION

Methanolic extracts of 11 species were analyzed for their acetylcholinesterase, glutathione-S-transferase, carboxylesterase and xanthine oxidase inhibitory activities. The results obtained in this study showed that among these species, 7 are potential inhibitors of AChE, GST, CES and XO, which confirm the traditional uses of these plants in the treatment of mental disorders, gout, painful inflammations and cardiovascular diseases. *S. birrea* was effective inhibitors for all the four enzymes at 25%. The activities seem to be partially correlated to the flavonoid and tannin contents. *S. birrea* is indicated for the investigation of new molecules to relieve the diseases which involved these enzymes. Future studies aim to isolate and identify these active constituents that exhibit significant AChE, GST, CES and XO inhibitory activity through bioassay-guided fractionation.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by the International Fondation of Sciences through the grant F3979-1 allowed to Dr. Martin Kiendrebeogo. The authors gratefully acknowledge the financial support by the CIUF/CUD (Conseil Interuniversitaire de la Communauté française de Belgique/Commission Universitaire pour le Développement).

REFERENCES

- Adersen, A., A. Kjolbye, A. Dall and A.K. Jager, 2007. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* Schweigg and Kort. J. Ethnopharmacol., 113: 179-182.
- Bonesi, M., F. Menichini, R. Tundis, M.R. Loizzo and F. Conforti *et al.*, 2010. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of Pinus species essential oils and their constituents. J. Enzym. Inhib. Med. Chem., 25: 622-628.
- Crow, J.A., B.L. Middleton, A. Borazjani, M.J. Hatfield, P.M. Potter and M.K. Ross, 2008. Inhibition of carboxylesterase 1 is associated with cholesteryl ester retention in human THP-1 monocyte/macrophages. Biochim. Biophys. Acta, 1781: 643-654.
- Djeridane, A., J.M. Brunel, N. Vidal, M. Yousfi, E.H. Ajandouz and P. Stocker, 2008. Inhibition of porcine liver carboxylesterase by a new flavones glucoside isolated from *Deverra scoparia*. Chemico-Biological Interactions, 172: 22-26.
- European Commission, 2000. Reference method for the tannins quantification. JOCE, L197: 18-20.
- Filha, F.Z.S., I.F. Vitolo, L.G. Fietto, J.A. Lombardi and D.A. Saude-Guimaraes, 2006. Xanthine oxidase inhibitory activity of *Lychnophora* species from Brazil (Arnica). J. Ethnopharmacol., 107: 79-82.
- Habdous, M., M. Vincent-Viry, S. Visvikis and G. Siest, 2002. Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. Clinica Chimica Acta, 326: 131-142.
- Havlik, J., R.G. Huebra, K. Hejtmankova, J. Fernandez and J. Simonova *et al.*, 2010. Xanthine oxidase inhibitory properties of Czech medicinal plants. J. Ethnopharmacol., 132: 461-465.
- Hayeshi, R., I. Mutingwende, W. Mavengere, V. Masiyamise and S. Mukanganyama, 2007. The inhibition of human glutathione S-transferases activity by plant polyphenolics compounds ellagic acid and curcumin. Food Chem. Toxicol., 45: 286-295.
- Lamien-Meda, A., C.E. Lamien, M.M.Y. Compaore, R.N.T. Meda and M. Kiendrebeogo *et al.*, 2008. Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. Molecules, 13: 581-594.
- Lopez, S., J. Bastida, F. Viladomat and Carles, 2002. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts. Life Sci., 71: 2521-2529.
- Meda, N.T.R., A. Lamien-Meda, M. Kiendrebeogo, C.E. Lamien, A.Y. Coulibaly, J. Millogo-Rasolodimby and O.G. Nacoulma, 2010. *In vitro* antioxidant, xanthine oxidase and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. (Balanitaceae). Pak. J. Biol. Sci., 13: 362-368.
- Moyo, M., A.R. Ndhala, J.F. Finnie and J.V. Staden, 2010. Phenolic composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Sclerocarya birrea* and *Harpephyllum caffrum* (Anacardiaceae) extracts. Food Chem., 123: 69-76.
- Mukherjee, P.K., V. Kumar, M. Mal and P.J. Houghton, 2007. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. Phytomedicine, 14: 289-300.
- Nacoulma, O.G., 1996. Medicinal plants and their traditional uses in Burkina Faso. Ph.D. Thesis, University of Ouagadougou.
- Narayana, K.R., M.S. Reddy, M.R. Chaluvadi and D.R. Krishna, 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. Ind. J. Pharmacol., 33: 2-16.
- Orhan, I., B. Sener, M.I. Choudhary and A. Khalid, 2004. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. J. Ethnopharmacol., 91: 57-60.
- Owen, P.L. and T. Johns, 1999. Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. J. Ethnopharmacol., 64: 149-160.
- Pithayanukul, P., P. Ruenraroengsak, R. Bavovada, N. Pakmanee, R. Suttisri and S. Saenoon, 2005. Inhibition of *Naja kaouthia* venom activities by plant polyphenols. J. Ethnopharmacol., 97: 527-533.
- Rodinbo, M.R., S. Bencharit and P.M. Potter, 2003. Human carboxylesterase 1: From drug metabolism to drug discovery. Biochem. Soc. Trans., 31: 620-624.
- Senol, F.S., I. Orhan, F. Celep, A. Kahraman, M. Dogan, G. Yilmaz and B.B. Sener, 2010. Survey of 55 Turkish salvia taxa for their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities. Food Chem., 120: 34-43.
- Sweeney, A.P., S.G. Wyllie, R.A. Shalliker and J.L. Markham, 2001. Xanthine oxidase inhibitory activity of selected Australian native plants. J. Ethnopharmacol., 75: 273-277.
- Van Zanden, J.J., L. Geraets, H.M. Wortelboer, P.J. van Bladeren, I.M.C.M. Rietjens and N.H.P. Cnubben, 2004. Structure requirements for the flavonoid-mediated modulation of glutathione S-transferase P1-1 and GS-X pump activity in MCF7 breast cancers cells. Biochem. Pharmacol., 67: 1607-1617.

- Van Zanden, J.J., O.R. Hamman, M.L.P.S. van Iersel, S. Boeren, P.J. Cnubben and I.M.C. Rietjens, 2003. Inhibition of human glutathione S-transferases P1-1 by the flavonoid quercetin. *Chemico-Biological Interactions*, 145: 139-148.
- Vinutha, B., D. Prashanth, K. Salma, S.L. Sreeja and D. Pratiti *et al.*, 2007. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.*, 109: 359-363.
- Wang, H., G. Zhou, X. Gao, Y. Wang and W. Yao, 2007. Acetylcholinesterase inhibitory-active components of *Rhodiola rosea* L. *Food Chem.*, 105: 24-27.
- Wu, S.J. and L.T. Ng, 2008. Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan. *LWT*, 41: 323-330.

Enzyme Inhibition Effect and Polyphenolic Content of Medicinal Plant Extracts from Burkina Faso

¹Mindiédiba Jean Bangou, ¹Martin Kiendrebeogo, ¹Moussa Compaoré, ¹Ahmed Yacouba Coulibaly,

¹Nâg-Tiero Roland Meda, ²Norma Almaraz Abarca, ³Boukaré Zeba,

⁴Jeanne Millogo-Rasolodimby and ¹Odile Germaine Nacoulma

¹Laboratoire de Biochimie et de Chimie Appliquées (L.A.BIO.C.A), U.F.R/S.V.T,
Université de Ouagadougou, 09 BP 848 Ouagadougou 09, Burkina Faso

²Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Instituto Politécnico Nacional,
Unidad Durango. Becaria COFAA; Sigma 119, Fraccionamiento 20 de Noviembre II,
Durango, Dgo., México

³Laboratoire d'Enzymologie de la Chimio-Résistance Bactérienne (L.E.CR.B)

U.F.R/S.V.T, Université de Ouagadougou, 09 BP 848 Ouagadougou 09, Burkina Faso,

⁴Laboratoire de Biologie et d'Ecologie Végétales, U.F.R/S.V.T, Université de Ouagadougou,
09 BP 848 Ouagadougou 09, Burkina Faso

Abstract: In the present study, 36 plant extracts, belonging to 6 families from Burkina Faso were used to evaluate their glutathione-S-transferase (GST), acetylcholinesterase (AChE), carboxylesterase (CES) and xanthine oxidase (XO) inhibitory activities and their phenolic, tannin and flavonoids contents by using spectrophotometrical methods. At 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, *Lippia chevalieri*, *Eclipta prostrata*, *Lantana camara* and *Indigofera pulchra* extracts showed the best percentage of inhibition by regulating GST, AChE, CES and XO activities, respectively. The phytochemical investigations showed that all plant extracts were rich in biological compounds, namely phenolic, tannin and flavonoids. Particularly *Cassia mimosoides* extract presented the best phenolic, tannin and flavonoid contents. This result indicated that phenolic from Caesalpiniaceae, flavonoids from Combretaceae and tannin from Verbenaceae contribute significantly to the inactivation of CES, AChE and GST, respectively. However, no significant correlation was found between polyphenolic compounds content and XO inhibitory activity. Present findings could partially justify the traditional uses of these plants in the treatment of mental disorders, gout, painful inflammations and cardiovascular diseases.

Key words: Medicinal plant, phenolic content, tannin content, flavonoid content, enzymes inhibition

INTRODUCTION

Glutathione-s-transferase (GST), Acetylcholinesterase (AChE) and Carboxylesterase (CES) are known for their participation on the development of Alzheimer's disease (AD), gout, cancer and cardiovascular diseases (Djeridane *et al.*, 2008; Hayeshi *et al.*, 2007). These diseases are becoming now-a-days a threat to public health (Orhan *et al.*, 2004). Some previous investigations showed that the inhibition of these enzymes was a good way for biological molecules research against those diseases (Orhan *et al.*, 2004; Trumbeckaite *et al.*, 2006; Wu and Ng, 2008; Havlik *et al.*, 2010). Furthermore, it is well demonstrated that medicinal plants were a promising way for obtaining biological molecules (Djeridane *et al.*, 2006). In Burkina Faso, some

ethnobotanical investigations showed the popular use of medicinal plants in the treatment of cardiovascular diseases, gout and cancer (Nacoulma, 1996). Table 1 shows the traditional uses of 36 well-known plants from Asteraceae, Caesalpiniaceae, Combretaceae, Fabaceae, Lamiaceae and Verbenaceae families.

Previous biological investigations showed that *E. prostrata* and *L. camara* extracts possess AChE inhibitory activities (Vinutha *et al.*, 2007). Nevertheless, the phytochemical studies demonstrated that flavonoids, tannins, polyphenolic were founds in *T. indica*, *Indigofera* species, *E. prostrata* and *O. americanum* extracts (Paarakh, 2010; Lamien-Meda *et al.*, 2008; Bakasso *et al.*, 2008; Gopiesh and Kannabiran, 2007; Vieira *et al.*, 2003). Other previous results have shown the secondary metabolite such as flavonoids and tannins

Table 1: Traditional use, part used and herbarium numbers of plants

Family/species	Traditional use	Parts used	Herbarium numbers
Asteraceae			
<i>Acanthospermum hispidum</i> DC	Stem, stem leaves: nevralgy, stomach aches, colic, headaches, rheumatism	WP	BK-ah2796
<i>Ageratum conyzoides</i> L.	Leaves: anti-inflammatory, ulcer, snakes bites and headaches	WP	BK-ac2800
<i>Chrysanthellum americanum</i> L.		L	BK-cra2782
<i>Bidens engleri</i> O. E. Shulz	Stem leaves: antibiotic, fever, snakes bites, colic, skin inflammation	WP	BK-be2802
<i>Dicoma tomentosa</i> Cass	Stem leaves: anti-inflammatory, rheumatism	L	BK-dt2819
<i>Eclipta prostrata</i> L.		L	BK-ep2801
<i>Tridax procumbens</i> L.	Whole plant: icterus, arterial hypertension and hepatitis	L	BK-tp2789
<i>Vernonia colorata</i> (Willd) Drake	Leaves and flower: fever, diarrhoea, jaundice, antibiotic and anti-biotic	L	BK-vc2798
Caesalpinaceae			
<i>Cassia absus</i> L.		SL	BK-cab2809
<i>Cassia alata</i> L.	Leaves: mental disorder, headache, anti-inflammatory, rheumatism, arterial hypertension,	SL	BK-cal2807
<i>Cassia minosoides</i> L.	Stem leaves: anti-inflammatory, stimulant	WP	BK-cam2812
<i>Cassia nigricans</i> Vahl	Stem leaves: uterus tumors	WP	BK-cn2780
<i>Cassia obtusifolia</i> L.	Stem leaves: headache, junction ache, hepatitis	SL	BK-co2792
<i>Cassia occidentalis</i> L.	Leaves: anti-rheumatism, diarrhoea, headaches,	SL	BK-coc2799
<i>Cassia singueana</i> Del	Skin ulcers, stomach aches,	SL	BK-case2808
<i>Cassia italica</i> (Mill)	Stem leaves, root: skin ulcers, teeth aches, venereal disease	SL	BK-it2813
<i>Tamarindus indica</i> L.	Bark: cardiac weakness, diabetes, hypotension	SL	BK-ti2804
Combretaceae			
<i>Combretum aculeatum</i> Vent	Stem leaves, root: arterial hypertension, fever, teeth aches	SL	BK-ca2779
<i>Combretum adenogonium</i> Stend	Leaves, stem: arterial hypertension, hepatitis, anti-inflammatory, urinary disease	L	BK-cad2820
<i>Combretum crotonoides</i> Hutch	Stem leaves, mistletoe: hepatitis, rheumatism	SL	BK-ccr2821
<i>Combretum micranthum</i> G. Don.	Leaves, mistletoe: hepatitis, fever, mental disorder, antibiotic	SL	BK-cm2778
<i>Combretum paniculatum</i> Vent	Flower, root: anti-inflammatory, antitumoral	SL	BK-cp2785
Fabaceae			
<i>Indigofera colutea</i> (Burm) Merr	Whole plant: stomach aches	SL	BK-ico2814
<i>Indigofera macrocalyx</i> L.	Whole plant, stem leaves: tireness, stimulant	SL	BK-im2788
<i>Indigofera nigriflora</i> Hook F.	Stem leaves: stomach aches, malaria, stimulant	SL	BK-in2815
<i>Indigofera pulchra</i> L.		SL	BK-ip2816
<i>Indigofera tinctoria</i> Var. A. Benth	Leaves: nervous system diseases, fever, sexual transmitted diseases, colic	SL	BK-it2790
Lamiaceae			
<i>Hyptis spicigera</i> Lam	Stem leaves/flower: fever, headaches, uterus diseases, cephalic	SL	BK-2811
<i>Hyptis suaveoleus</i> (L.) Poit	Stem leaves: insecticidal, icterus, antispasmodic and stimulant	WP	BK-hs2781
<i>Leucas martinicensis</i> Jacq R. Br.	Leaves: fever, headaches and stimulant; Flower: gout	SL	BK-lm2803
<i>Ocimum americanum</i> L.	Leaves: spleen inflammation, stomach tumor, malaria, stimulant	SL	BK-oca2783
<i>Ocimum basilicum</i> L.	leaves: fever, mental disorder and stimulant	SL	BK-oba2817
Verbenaceae			
<i>Lantana camara</i> L.	Stem-leaves, anti-rheumatic, and antidiabetic	SL	BK-lc2793
<i>Lantana rhodesiensis</i> Moldenke	Stem leaves: arterial hypertension, stimulant	SL	BK-lar2810
<i>Lippia chevalieri</i> Moldenke	Stem leaves/ stem leaves flower: liver pathologies (hepatitis, inflammation, jaundice)	WP	BK-la2775
<i>Lippia multiflora</i> Moldenke	Stem leaves/ stem leaves flower: liver pathologies, anti-inflammatory	WP	BK-lmu2818

L: Leaves, SL: Stem leaves, WP: Whole plant

presented some interesting enzyme inhibition activities (Senol *et al.*, 2010). Flavonoids for example are known to inhibit a number of enzymes such as xanthine oxidase, acetylcholinesterase, glutathione-s-transferase and carboxylesterase (Bonesi *et al.*, 2010; Iswantini *et al.*, 2009; Senol *et al.*, 2010; Soeksmanto *et al.*, 2010). But, according to present knowledge, there is little scientific information about the enzyme inhibition properties of most of these plants. In the present study, 36 medicinal plant extracts, according to their traditional utilizations, were used to assess: (1) their AChE, GST, CES and XO inhibitory capacities and (2) their phenolic, tannin and flavonoid content.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals: Reagents come from Sigma Aldrich Chemie GmbH, Germany: L-Glutathione reduced (GSH),

glutathione-S-transferase (GST) from rate liver, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), Albumin from bovine serum (BSA), potassium phosphate monobasic (KH₂PO₄) and dibasic (K₂HPO₄). Acetylcholinesterase (AChE) from electric eel, acetylcholine iodide (ATCI), 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), tannic acid, gallic acid, quercetin were provided from Sigma-Germany. HCl and sodium carbonate were from Labosi-France. Folin-Ciocalteu reagent was from Sigma-USA. Carboxylesterase from pig liver, Xanthine oxidase, DMSO and Tween were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Germany). Aluminum trichloride (AlCl₃), Na₂HPO₄ and NaH₂PO₄ were purchased from Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Germany).

Plant materials: Plant materials constituted of 36 medicinal plants from interior of Burkina Faso were collected at Ouagadougou in July 2006. The

plants were botanically identified by Professor Millogo-Rasolodimby from Ecology Laboratory of the University of Ouagadougou. Voucher specimens (Table 1) were deposited in the herbarium of the Laboratory of Biology and Vegetal Ecology, UFR/SVT of the University of Ouagadougou.

Preparation of plant extracts: Tissue samples (leaves, stems-leaves and whole plant) of each plant were dried at room temperature and ground to fine powder; using a grinder. The extraction was processed using ten gram of each sample in 3×100 mL by technical methanol steeping during one night. The extracts were filtered and evaporated until they dry.

BIOLOGICAL ACTIVITY

Acetylcholinesterase activity: The AChE inhibition was conducted according to the protocol described by Lopez *et al.* (2002) with some modifications. Briefly described, the assay mixture consisted of 200 µL of Tris-HCl (50 mM pH8), 0.1% BSA buffer, 100 µL of extracts solution (final concentration: 100 µg mL⁻¹) and 100 µL of AChE (0.22 U mL⁻¹). The mixture was incubated at room temperature for 2 min before adding 500 µL of DTNB (3 mM) and 100 µL of substrate (ATCI 15 mM). The developing yellow color was measured at 405 nm after 4 min (Cecil CE 2041, England). Galanthamine was used as a positive control at a final concentration of 100 µg mL⁻¹ in the assay mixture. AChE inhibitory activity was expressed as percent inhibition of AChE, calculated as:

$$\text{Inhibition percentage of AChE} = ((A - B) \times 100) / A$$

where, A is the change in absorbance of the assay without the plant extract and B is the change in absorbance of the assay with the plant extract.

Inhibition of glutathione-S-transferase: GST inhibitory assays were conducted as Habdous *et al.* (2002).

Assay of xanthine oxidase activity: The XO inhibitory activities were measured spectrophotometrically by using Filha *et al.* (2006) procedure with some modifications. The extracts were directly dissolved in phosphate buffer-MeOH (1%) and screened for XO inhibitory activity at final concentration of 100 µg mL⁻¹. The assay mixture consisted of 100 µL of extracts, 300 µL of phosphate buffer (0.2 M pH9) and 100 µL enzyme solution (0.28 U mL⁻¹ in phosphate buffer). The mixture was incubated at room temperature for 2 min. Then, the reaction was initiated by adding 500 µL of xanthine solution (0.15 mM in phosphate buffer) and the change in absorbance was recorded at 295 nm for 2 min at room

temperature. Allopurinol was used as a positive control at a final concentration of 100 µg mL⁻¹. The results were expressed as percent inhibition of xanthine oxidase, calculated as:

$$\text{Inhibition percentage of XO} = ((A - B) \times 100) / A$$

where, A is the change in absorbance of the assay without the plant extract and B is the change in absorbance of the assay with the plant extract.

Assay of carboxylesterase activity: The method of Djeridane *et al.* (2008) was used with some modifications. Test solution contained 400 µL of Tris-HCl (50 mM pH8) buffer, 100 µL of plant extract at final concentration of 100 µg mL⁻¹. One hundred of enzyme solution (0.027 U mL⁻¹) and 400 µL of 4-nitrophenyl (1 mM) was added after incubation at 3 min. The absorbance was read at 414 nm. Ascorbic acid (50 µg mL⁻¹) was used as reference. The results were expressed as percent inhibition of CES, calculated as:

$$\text{Inhibition percentage of CES} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

where, A is the change in absorbance of the assay without the plant extract and B is the change in absorbance of the assay with the plant extract.

Determination of polyphenolics compounds

- **Determination of total phenolic content:** The total phenolics of plant extract were determined by the Folin-Ciocalteu method (Lamien-Meda *et al.*, 2008)
- **Determination of tannins content:** Tannins content was determined according to the European Commission (2000)
- **Determination of flavonoids contents:** The total flavonoids were estimated according to the Dowd method as adapted by Lamien-Meda *et al.* (2008)

Statistical analysis: The data are expressed as the Means±Standard Deviation (SD) of three determinations. Statistical analysis (ANOVA with a statistical significance level set at p< 0.05 and linear regression) was carried out with XLSTAT 7.1.

RESULTS AND DISCUSSION

Biological investigations

AChE inhibitory activity: The highest inhibition activities were obtained with *L. chevalieri*, *C. mimosoides*, *C. nigricans* and *C. singueana* extracts. The lowest inhibitory effects were obtained with *C. absus*,

Table 2: Acetylcholinesterase (AChE), glutathione-S-transferase (GST), carboxylesterase (CES) and xanthine oxidase (XO) Percentage Inhibition Activities

Species	AChE	GST	CES	XO
Asteraceae				
<i>A. conyzoides</i>	24.71±1.44 ^{bc}	4.96±3.04 ^{mno}	21.97±1.93 ^{ij}	27.69±5.75 ^{gh}
<i>A. hispidum</i>	12.55±3.85 ^{feh}	19.34±5.07 ^{feh}	16.29±3.75 ^{klm}	20.00±2.51 ^{kl}
<i>B. engleri</i>	4.70±1.04 ^{ij}	17.68±5.42 ^{hi}	15.89±1.45 ^{klmn}	ND
<i>C. americanum</i>	22.00±2.80 rd	15.76±3.84 ^{hij}	25.97±0.54 ^{gh}	30.82±0.88 ^{gh}
<i>D. tomentosa</i>	8.04±2.64 ^{hij}	34.73±3.00 ^{bc}	19.77±0.94 ^{ijk}	67.93±3.08 ^f
<i>E. prostrata</i>	9.22±2.21 ^{hi}	61.89±5.71 ^a	27.27±0.92 ^{gh}	26.72±3.23 ^{hij}
<i>T. procumbens</i>	19.22±1.26 ^{de}	10.92±2.74 ^{kl}	9.09±1.60 ^{opq}	7.88±1.71 ^{mno}
<i>V. colorata</i>	4.12±2.09 ⁱ	38.46±1.49 ^{abc}	15.91±2.78 ^{klm}	8.65±0.95 ^{mno}
Caesalpiniaceae				
<i>C. absus</i>	1.76±2.99 ^k	22.46±1.52 ^{def}	11.83±2.01 ^{mno}	72.11±2.54 ^{bc}
<i>C. alata</i>	17.59±5.40 ^{fg}	15.39±3.22 ^{hij}	24.73±4.02 ^{gh}	35.50±0.61 ^{fg}
<i>C. italica</i>	27.21±6.54 ^{bcd}	3.33±0.80 ^{no}	18.99±1.97 ^{jk}	56.60±1.54 ^d
<i>C. mimosoides</i>	39.12±1.42 ^{bij}	20.04±3.30 ^{fg}	49.76±2.98 ^{ab}	41.56±4.24 ^e
<i>C. nigricans</i>	37.42±4.33 ^b	27.60±2.12 ^{cd}	15.05±2.74 ^{lmn}	18.18±1.83 ^{kl}
<i>C. obtusifolia</i>	14.90±4.7 ^g	7.46±1.23 ^{im}	9.14±0.76 ^{opq}	16.02±3.06 ^{lm}
<i>C. occidentalis</i>	ND	20.98±2.64 ^{fg}	9.18±1.81 ^{opq}	25.97±1.06 ^{ij}
<i>C. singuana</i>	35.30±2.99 ^{bc}	8.86±1.61 ^{lm}	48.93±2.01 ^{ab}	34.63±2.20 ^{gh}
<i>T. indica</i>	14.51±1.43 ^{fg}	0.66±0.08 ^p	40.58±1.18 ^{cd}	7.33±3.30 ^{mno}
Combretaceae				
<i>C. paniculatum</i>	3.33±1.00 ^k	26.11±6.25 ^{de}	2.27±0.92 ^{pr}	13.08±2.60 ^{lm}
<i>C. aculeatum</i>	12.47±2.52 ^{feh}	23.94±0.75 ^{def}	2.27±1.60 ^m	3.82±1.64 ^p
<i>C. adenogonium</i>	10.39±0.27 ^{feh}	28.16±1.87 ^{cd}	6.06±2.14 ^{qr}	3.56±1.29 ^p
<i>C. crotonoides</i>	22.45±3.45 ^{cd}	16.21±1.14 ^{hij}	47.35±1.93 ^{bc}	64.82±4.53 ^{cd}
<i>C. micranthum</i>	19.22±4.66 ^{de}	4.92±1.97 ^{mno}	ND	6.33±1.79 ^{no}
Fabaceae				
<i>I. colutea</i>	10.78±4.73 ^{gh}	5.40±2.60 ^{mn}	10.45±1.21 ^{nop}	37.95±1.91 ^{ef}
<i>I. macrocalyx</i>	20.39±1.46 ^{de}	4.88±3.10 ^{mno}	21.39±3.06 ^{ij}	72.82±1.45 ^{bc}
<i>I. nigritana</i>	6.47±3.36 ^{gh}	11.86±6.69 ^{jk}	11.94±2.43 ^{mno}	36.41±3.83 ^{fg}
<i>I. pulchra</i>	17.06±5.41 ^{ef}	21.01±1.13 ^{qf}	10.49±2.43 ^{nop}	77.44±0.72 ^b
<i>I. tinctoria</i>	20.78±12.37 ^{cd}	5.28±3.10 ^{lmn}	8.46±2.81 ^{pq}	31.80±0.72 ^{gh}
Lamiaceae				
<i>H. spicigera</i>	7.25±1.00 ^{hij}	27.41±0.96 ^{cd}	0.48±1.81 ^s	ND
<i>H. suaveoleus</i>	21.32±4.17 ^{cd}	33.31±3.75 ^{bc}	11.11±1.81 ^{no}	3.58±1.01 ^p
<i>L. martinicensis</i>	12.70±6.63 ^{feh}	11.78±3.88 ^{jk}	9.66±0.68 ^{op}	ND
<i>O. americanum</i>	9.62±2.32 ^h	24.15±3.21 ^{de}	ND	ND
<i>O. basilicum</i>	5.88±6.30 ^{ij}	22.46±5.11 ^{def}	17.83±0.55 ^{klm}	25.85±0.96 ^{ij}
Verbenaceae				
<i>L. camara</i>	18.59±5.25 ^{def}	21.83±1.62 ^{ef}	56.20±3.05 ^a	20.76±2.67 ^{kl}
<i>L. chevalieri</i>	39.26±2.18 ^f	42.99±3.03 ^{ab}	37.68±1.18 ^{bc}	14.00±2.16 ^{lm}
<i>L. multiflora</i>	17.59±2.29 ^{ef}	21.03±0.36 ^{qf}	33.82±0.68 ^{def}	14.67±0.47 ^{lm}
<i>L. rhodesiensis</i>	17.65±6.35 ^{ef}	39.76±2.41 ^{ab}	32.37±1.81 ^{efg}	ND
Reference compound				
Galanthamine	50.76±0.68 ^g			
Ascorbic acid			56.72±0.85 ^a	
Allopurinol				96.38±0.59 ^a

ND: not determined; Result within each column with different letters (a-s) differs significantly (p< 0.05).

C. paniculatum, *V. colorata* and *B. engleri* extracts. All extracts of AChE inhibitory activities were less than Galanthamine inhibitory effect. Previous studies showed *E. prostrata* and *L. camara* extracts AChE inhibitory activity (Vinutha *et al.*, 2007). According to the cholinergic hypothesis memory impairment in patients suffering from Alzheimer’s disease is a result of decreased levels of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) in the cortex. In the healthy brain AChE is the most important enzyme regulating the ACh level (Ahmad *et al.*, 2003; Adersen *et al.*, 2007). In this way, it would be relevant to search for substance capable of inhibiting AChE activity in Alzheimer’s disease patients to increase their ACh levels such as Galanthamine that is used in this treatment.

Table 2 showed the 36 extracts AChE inhibitory activities that were compared with Galanthamine activity. Present result could probably justify the plant traditional uses in cancer treatment. Among the five species, which inhibited AChE at more than 25%, four are included in Caesalpiniaceae family. In this way, Caesalpiniaceae is most indicated to search acetylcholinesterase inhibitors.

GST inhibitory activity: Table 2 showed 36 extracts GST inhibitory activities. The best activities were obtained with *E. prostrata*, *L. chevalieri*, *L. rhodesiensis* and *V. colorata* extracts. The lowest inhibition were obtained with *T. indica*, *C. italica* and *C. macrocalyx* extracts. Previous investigations showed that GST was implicated

Table 3: Result of polyphenolic quantification

Species	TP (mgGAE/100mg)	TF (mgQE/100mg)	TN (mgTAE/100mg)
Asteraceae			
<i>A. conyzoides</i>	21.10±1.17 ^{gh}	6.50±0.27 ^k	2.90±0.22 ^{no}
<i>A. hispidum</i>	12.18±0.37 ^{op}	2.78±0.15 ^{no}	2.27±0.22 ^{op}
<i>B. engleri</i>	15.83±0.60 ^{kl}	6.55±0.07 ^k	9.08±0.06 ^g
<i>C. americanum</i>	10.15±0.37 ^{pa}	6.31±0.10 ^k	4.38±0.14 ^{km}
<i>D. tomentosa</i>	12.08±0.82 ^{op}	9.14±0.10 ^{gh}	5.57±0.16 ^{jk}
<i>E. prostrata</i>	27.90±0.70 ^{ab}	18.93±0.13 ^b	14.45±0.18 ^d
<i>T. procumbens</i>	17.40±0.85 ^{jk}	0.29±0.01 ^p	1.27±0.10 ^{pa}
<i>V. colorata</i>	13.62±0.43 ^{no}	1.81±0.32 ^o	5.15±0.31 ^{kl}
Cesalpiniaceae			
<i>C. absus</i>	17.23±0.19 ^{jk}	15.88±0.53 ^c	4.47±0.17 ^{km}
<i>C. alata</i>	14.68±0.93 ^{mno}	11.23±0.25 ^e	6.37±0.51 ^j
<i>C. italica</i>	15.48±0.67 ^{mn}	9.37±0.09 ^{gh}	4.68±0.29 ^{km}
<i>C. mimosoides</i>	51.3±0.49 ^a	30.43±0.28 ^a	33.60±0.57 ^a
<i>C. nigricans</i>	23.82±0.98 ^{gh}	9.03±0.08 ^{hi}	20.73±0.53 ^b
<i>C. obtusifolia</i>	14.52±1.41 ^{mno}	10.66±0.04 ^f	3.78±0.09 ^{mn}
<i>C. occidentalis</i>	13.58±1.02 ^{no}	11.29±0.15 ^e	1.25±0.07 ^{pa}
<i>C. singueana</i>	43.68±1.30 ^f	11.15±0.37 ^f	15.67±0.93 ^c
<i>T. indica</i>	36.33±1.47 ^e	3.41±0.05 ⁿ	17.30±0.41 ^b
Combretaceae			
<i>C. aculeatum</i>	11.68±0.08 ^{op}	5.75±0.56 ^{kl}	4.73±0.06 ^{km}
<i>C. adenogonium</i>	25.08±2.79 ^{ef}	6.62±0.06 ^k	12.30±0.21 ^e
<i>C. micranthum</i>	45.50±0.30 ^b	5.09±0.13 ^l	2.08±0.02 ^{op}
<i>C. crotonoides</i>	37.28±0.23 ^c	4.64±0.03 ^{lm}	2.29±0.06 ^{op}
<i>C. paniculatum</i>	20.67±2.4 ^{gh}	8.74±0.15 ^{hi}	8.88±0.38 ^{gh}
Fabaceae			
<i>I. colutea</i>	19.27±0.56 ^{ijk}	3.66±0.16 ^{mn}	11.95±0.12 ^{ef}
<i>I. macrocalyx</i>	30.05±2.76 ^d	13.39±0.09 ^d	5.17±0.13 ^{kl}
<i>I. nigritana</i>	29.70±2.94 ^d	11.53±0.24 ^e	12.12±0.02 ^e
<i>I. pulchra</i>	19.17±0.5 ^{ijk}	18.88±0.82 ^b	4.73±0.18 ^{km}
<i>I. tinctoria</i>	21.63±3.02 ^{gh}	1.76±0.09 ^o	4.18±0.05 ^{kl}
Lamiaceae			
<i>H. spicigera</i>	14.98±0.12 ^{mno}	7.91±0.22 ^{ij}	9.13±0.37 ^g
<i>H. suaveoleus</i>	12.17±0.90 ^{op}	11.15±0.28 ^f	4.48±0.27 ^{km}
<i>L. martinicensis</i>	12.68±0.26 ^{op}	2.72±0.25 ^{no}	2.72±0.15 ^{no}
<i>O. americanum</i>	12.72±0.94 ^{op}	10.61±0.34 ^f	5.55±0.12 ^{jk}
<i>O. basilicum</i>	17.15±0.79 ^{jk}	7.77±0.68 ⁱ	7.73±0.33 ^{hi}
Verbenaceae			
<i>L. camara</i>	10.03±0.75 ^{pa}	8.28±0.77 ^{hi}	0.48±0.09 ^q
<i>L. chevalieri</i>	17.88±0.90 ^{jk}	3.19±0.15 ⁿ	7.62±0.37 ^{kl}
<i>L. multiflora</i>	20.20±0.75 ^{gh}	10.90±0.11 ^f	10.9±0.09 ^f
<i>L. rhodesiensis</i>	21.55±0.75 ^{gh}	5.09±0.19 ^f	14.52±0.27 ^{od}

TP: Total phenolic content TF: Total flavonoid content TN: Tannins content Result within each column with different letters differs significantly (p<0.05)

Table 4: Correlative study between polyphenolics compounds and the enzymes inhibition

Enzymes	Phenolic			Tannin			Flavonoid		
	R ²	p-value	Families	R ²	p-value	Families	R ²	p-value	Families
AchE				0.89	0.015	Fabaceae	0.79	0.041	Lamiaceae
CES	0.99	0.0008	Verbenaceae	0.61	0.037	Caesalpiniaceae	0.92	0.008	Combretaceae
			Caesalpiniaceae			Verbenaceae			0.60
GST	0.87	0.0009		0.54	0.036	Caesalpiniaceae	0.98	0.006	Verbenaceae
						Asteraceae			

in tumor cell resistance to antitumoral drug treatment (Hayeshi *et al.*, 2007). So, the inhibition of GST activity become a promising way to develop antitumoral drugs, particularly, drugs from medicinal plant. Present results demonstrated that these extracts contained some compounds with GST inhibitory activities singularly in *E. prostrata* extract. These observations could be partially supported by the plant traditional use in cancer treatment indicated in Nacoulma (1996) ethnobotanical

investigations. Between the six families which were studied Fabaceae species have not presented any inhibition for the enzymes.

CES inhibitory activity: The CES inhibitory effect of extracts were shown in Table 2. The best inhibition activity was found with *C. mimosoides*, *C. crotonoides*, *C. singueana* and *L. camara* extracts. Interestingly, ascorbic acid and *L. camara* extract have shown similar

CES inhibition activities. Verbenaceae was the most CES inhibitor among the families. CES are enzymes omnipresent (high levels in a large array of animal tissues) responsible of the detoxication to numerous endogen and xenobiotic. Now-a-days, their biological role are not clearly delimited. For example CES also hydrolyse aspirin and some anti-cancerous such as chemotherapeutic agents (Djeridane *et al.*, 2008). In this way, their inhibition can contribute to strengthen these drug effects (Crow *et al.*, 2008; Rodinbo *et al.*, 2003). Present results indicated that different extracts contain some molecules which were able to inhibit this enzyme, particularly in *L. camara* extract, while species from Lamiaceae and Fabaceae seem to be poor in CES compound inhibitor. Plant extract CES inhibitory properties evaluated in the first time could partially justify the traditional uses found in Burkina Faso (Nacoulma, 1996). In the CES inhibition, some extracts of plants show that they possess interesting activities as compared to ascorbic acid (56.72±0.85). *L. camara* (Verbenaceae) which has the best inhibition activity, inhibited CES at 56.20%.

XO inhibitory activities: The extracts XO inhibitory activities compared to allopurinol effect were shown in Table 2. Sixteen extracts inhibited XO at a level higher than 25%. The highest inhibitions were obtained with *C. absus*, *I. macrocalyx* and *I. pulchra* extracts (72.11±2.55, 72.82±1.45 and 77.44±0.73%, respectively) and the lowest are obtained with *C. adenogonium*, *H. suaveolens*, *C. aculeatum*. The Indigofera family presented a greater XO inhibitory effect than other families. But, all extracts have not reached the reference compound in XO inhibitory activity, i.e., allopurinol with 96.38±0.58%. The role of xanthine oxidase is to catalyze the oxidation of hypoxanthine to xanthine and generates uric acid, hydrogen peroxide and superoxide anion (Wu and Ng, 2008). Clinical reports have shown that uric acid is the key factor of risk of gout and cardiovascular disorders, nephrolithiasis and diabetes (Havlik *et al.*, 2010; Iswantini *et al.*, 2009; Gagliardi *et al.*, 2009). Thus, xanthine oxidase inhibition is useful in the prevention and/or treatment of hepatic diseases and gout, and also for the reduction of harmful hydrogen peroxide and superoxide anion productions. Present results suggest that respective extracts contained XO inhibitors compounds. These observations could justify the traditional use of particularly *I. pulchra* (cellulites), *C. crotonoides* and *D. tomentosa* (rheumatism). No species of Verbenaceae family inhibited XO but all species of Fabaceae family inhibited at more than 30%.

Phytochemical analysis: The total tannin and phenolic content of the extracts were determined spectrophotometrically (Table 3), because polyphenols

present in vegetable and fruit are responsible for many biological activities (Arct and Pytkowska, 2008; Soobrattee *et al.*, 2005). Total phenolics of extracts were ranging from 51.3±0.49 to 10.03 ± 0.75 mg GAE/100 mg. The highest values of total phenolics were in the following order: *C. mimosoides* > *C. micranthum* = *C. singueana*. The lowest ones were found in *L. camara* and *C. americanum* with 10.03±0.75 to 10.15±0.37 mg GAE/100 mg extract plant, respectively. Among the 36 extracts of plants analyzed, *C. mimosoides* (33.60±0.57 mg TAE/100 mg extract) and *C. nigricans* (20.73±0.53 mg TAE/100 mg extract) showed the highest tannin contents. The lowest values were found in *L. camara* and *C. occidentalis* extracts. Previously, the polyphenolic contents were evaluated in Fabaceae family extracts (Bakasso *et al.*, 2008), *T. indica* extracts (Lamien-Meda *et al.*, 2008) and the tannin content in *E. prostrata* extract (Gopiesh and Kannabiran, 2007).

Many flavonoids possess anti-tumor activity against various human cancer cell lines and xenograft systems of human tumors, suggesting that they may be promising anticancer agents (Zeng *et al.*, 2009; Paarakh, 2010; Soeksmanto *et al.*, 2010). In this way, flavonoids contents were estimate in 36 plant extracts (Table 3). Total flavonoid contents varied from 30.43±0.28 to 0.29±0.01 mg QE/100 mg plant extract. The best flavonoids contents were obtained with *I. pulchra*, *E. prostrata*, *C. mimosoides* extracts and the lowest contents with *A. hispidum*, *L. martinicensis*, *V. colorata*, *T. procumbens* and extracts. In previous phytochemical investigations, Bakasso *et al.* (2008), Lamien-Meda *et al.* (2008), Gopiesh and Kannabiran (2007) and Vieira *et al.* (2003) have found the flavonoids in *Indigofera* species, *T. indica*, *O. americanum* and *E. prostrata* extracts, respectively.

Relationship between enzyme activities, total phenolic, tannin and flavonoids contents: In the present study we were interested by the evaluation of the phenolic, flavonoid and tannin of extracts capacities to inhibit the different enzymes (Table 4). Tannin from Fabaceae, Caesalpiniaceae, Verbenaceae and Asteraceae families extracts contributed significantly to inhibit AChE, CES and GST, respectively. The same observation was notified concerning the flavonoids from Lamiaceae, Combretaceae, Asteraceae and Verbenaceae on these enzyme inhibition activities. Only the phenolic from Caesalpiniaceae and Verbenaceae families extracts presented a significant correlation to CES inhibitory activities. Nevertheless any correlation was found concerning the XO activity and the metabolites from different family extracts, although this enzyme was inhibited, interestingly, by *indigofera* species (Fabaceae) extracts. These results indicated the enzyme inhibition did not only depend on the metabolite

quantities. Consequently, *L. camara* extract presented little phenolic as tannin contents (10.03 mg GAE/100 mg and 0.48 mgTA/100mg) with interesting AChE, GST and CES inhibitory activities. Also *C. absus* extract was a good XO inhibitor with little phenolic and flavonoids contents.

These are several reasons to explain the ambiguous relationship between the inhibitory potency and the phenolic, tannins and flavonoids. The total phenolics content did not include all the possible inhibitors; the synergism among the inhibitors in the mixture accounted for the inhibition but was not only dependent of the concentration of individual inhibitors but also on the structure and interaction among them. Previous studies showed the structure relationship of flavonoids in CES (Stocker *et al.*, 2004), GST (Van Zanden *et al.*, 2004), AChE (Ji and Zhang, 2006) and XO (Nagao *et al.*, 1999) inhibitory activities. On the other hand, the method used to quantify the flavonoids was limited to flavone and flavonol (Meda *et al.*, 2004). A detailed examination of phenolic of different plant extracts is necessary for a comprehensive assessment of the individual compounds enzyme inhibitory ability.

CONCLUSION

This study has showed that the methanolic extracts of 28 on 36 species are potential inhibitors of AChE, GST, CES and XO which could support the traditional uses of these plants in the treatment of mental disorders, gout, painful inflammations and cardiovascular diseases. Fabaceae family is particularly important as a source of natural XO inhibitors. Considering the correlation analysis, Combretaceae and Caesalpinaceae could also be relevant sources of inhibitors. Some plant extracts were effective inhibitors for three of the four enzymes at 25% such as *E. prostrata*, *L. chevalieri*, *C. nigricans* and *C. mimosoides*. Those activities seem to be partially correlated to the flavonoid and tannin contents. Those plant species were indicated for new molecules to relieve the diseases, which involved these enzymes. Future studies aim to isolate and identify these active constituents that exhibit significant AChE, GST, CES and XO inhibitory activity through bioassay-guided fractionation.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by the International Fondation of Sciences through the grant F3979-1 allowed to Dr. Martin Kiendrebeogo. The authors gratefully acknowledge the financial support by the Conseil

Interuniversitaire de la Communauté française de Belgique/ Commission Universitaire pour le Développement (CIUF/CUD).

REFERENCES

- Adersen, A., A. Kjolbye, A. Dall and A.K. Jager, 2007. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* Schweigg and Kort. J. Ethnopharmacol., 113: 179-182.
- Ahmad, W., B. Ahmad, M. Ahmad, Z. Iqbal, M. Nisar and M. Ahmad, 2003. *In vitro* Inhibition of acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and lipoxygenase by crude extract of *Myricaria elegans* royle. J. Biol. Sci., 3: 1046-1049.
- Arct, J. and K. Pytkowska, 2008. Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. Clin. Dermatol., 26: 347-357.
- Bakasso, S., A. Lamien-Meda, C.E. Lamien, M. Kiendrebeogo, J. Millogo, A.G. Ouedraogo and O.G. Nacoulma, 2008. Polyphenol content and antioxidant activities of five *Indigofera* species (Fabaceae) from Burkina Faso. Pak. J. Biol. Sci., 11: 1429-1435.
- Bonesi, M., F. Menichini, R. Tundis, M.R. Loizzo and F. Conforti *et al.*, 2010. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of *Pinus* species essential oils and their constituents. J. Enzym. Inhib. Med. Chem., 25: 622-628.
- Crow, J.A., B.L. Middleton, A. Borazjani, M.J. Hatfield, P.M. Potter and M.K. Ross, 2008. Inhibition of carboxylesterase 1 is associated with cholesteryl ester retention in human THP-1 monocyte/macrophages. Biochim. Biophys. Acta, 1781: 643-654.
- Djeridane, A., M. Yousfi, B. Nadjemi, D. Boutassouna, P. Stocker and N. Vidal, 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chem., 97: 654-660.
- Djeridane, A., J.M. Brunel, N. Vidal, M. Yousfi, E.H. Ajandouz and P. Stocker, 2008. Inhibition of porcine liver carboxylesterase by a new flavones glucoside isolated from *Deverra scoparia*. Chemo-Biological Interactions, 172: 22-26.
- European Commission, 2000. Reference method for the tannins quantification. JOCE, L197: 18-20.
- Filha, F.Z.S., I.F. Vitolo, L.G. Fietto, J.A. Lombardi and D.A. Saude-Guimaraes, 2006. Xanthine oxidase inhibitory activity of *Lychnophora* species from Brazil (Arnica). J. Ethnopharmacol., 107: 79-82.
- Gagliardi, A.C.M., M.H. Miname and R.D. Santos, 2009. Uric acid: A marker of increased cardiovascular risk. Atherosclerosis, 202: 11-17.

- Gopiesh, K.V. and K. Kannabiran, 2007. Larvicidal effect of *Hemidesmus indicus*, *Gymnema sylvestre* and *Eclipta prostrata* against *Culex quinquefasciatus* mosquito larvae. African J. Biotechnol., 6: 307-311.
- Habdous, M., M. Vincent-Viry, S. Visvikis and G. Siest, 2002. Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. Clinica Chimica Acta, 326: 131-142.
- Havlik, J., R.G. Huebra, K. Hejtmankova, J. Fernandez and J. Simonova *et al.*, 2010. Xanthine oxidase inhibitory properties of Czech medicinal plants. J. Ethnopharmacol., 132: 461-465.
- Hayeshi, R., I. Mutingwende, W. Mavengere, V. Masiyamise and S. Mukanganyama, 2007. The inhibition of human glutathione S-transferases activity by plant polyphenolics compounds ellagic acid and curcumin. Food Chem. Toxicol., 45: 286-295.
- Iswantini, D., L.K. Darusman and R. Hidayat, 2009. Indonesian *Sidaguri* (*Sida rhombifolia* L.) as antigout and inhibition kinetics of flavonoids crude extract on the activity of xanthine oxidase. J. Biol. Sci., 9: 504-508.
- Ji, H.F. and H.Y. Zhang, 2006. Theoretical evaluation of flavonoids as multipotent agents to combat Alzheimer's disease. J. Mol. Struct. THEOCHEM., 767: 3-9.
- Lamien-Meda, A., C.E. Lamien, M.M.Y. Compaore, R.N.T. Meda and M. Kiendrebeogo *et al.*, 2008. Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. Molecules, 13: 581-594.
- Lopez, S., J. Bastida, F. Viladomat and Carles, 2002. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. Life Sci., 71: 2521-2529.
- Meda, A., C.E. Lamien, J. Millogo, M. Romito and O.G. Nacoulma, 2004. Therapeutic uses of honey and honeybee larvae in central Burkina Faso. J. Ethnopharmacol., 95: 103-107.
- Nacoulma, O.G., 1996. Medicinal plants and their traditional uses in Burkina Faso. Ph.D. Thesis, University of Ouagadougou, pp: 328
- Nagao, A., M. Seki and H. Kobayashi, 1999. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. Biosci. Biotechnol. Biochem., 63: 1787-1790.
- Orhan, I., B. Sener, M.I. Choudhary and A. Khalid, 2004. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. J. Ethnopharmacol., 91: 57-60.
- Paarakh, P.M., 2010. *Terminalia arjuna* (Roxb) Wt. and Arn.: A review. Int. J. Pharmacol., 6: 515-534.
- Rodinbo, M.R., S. Bencharit and P.M. Potter, 2003. Human carboxylesterase 1: From drug metabolism to drug discovery. Biochem. Soc. Trans., 31: 620-624.
- Senol, F.S., I. Orhan, F. Celep, A. Kahraman, M. Dogan, G. Yilmaz and B.B. Sener, 2010. Survey of 55 Turkish salvia taxa for their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities. Food Chem., 120: 34-43.
- Soeksmanto, A., M.A. Subroto, H. Wijaya and P. Simanjuntak, 2010. Anticancer activity test for extracts of sarang semut plant (*Myrmecodya pendens*) to HeLa and MCM-B2 cells. Pak. J. Biol. Sci., 13: 148-151.
- Soobrattee, M.A., V.S. Neergheen, A. Luximon-Ramma, O.I. Aruoma and T. Bahorun, 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. Mutation Res., 579: 200-213.
- Stocker, P., M. Yousfi, O. Djerridane, J. Perrier, R. Amziani, S. El-Boustani and A. Moulin, 2004. Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. Biochimie, 86: 919-925.
- Trumbeckaite, S., J. Bernatoniene, D. Majiene, V. Jakstas, A. Savickas and A. Toleikis, 2006. The effect of flavonoids on rat heart mitochondrial function. Biomed. Pharmacother., 60: 245-248.
- Van Zanden, J.J., L. Geraets, H.M. Wortelboer, P.J. van Bladeren, I.M.C.M. Rietjens and N.H.P. Cnubben, 2004. Structure requirements for the flavonoid-mediated modulation of glutathione S-transferase P1-1 and GS-X pump activity in MCF7 breast cancers cells. Biochem. Pharmacol., 67: 1607-1617.
- Vieira, R.F., R.J. Grayer and A.J. Paton, 2003. Chemical profiling of *Ocimum americanum* using external flavonoids. Phytochem., 63: 555-567.
- Vinutha, B., D. Prashanth, K. Salma, S.L. Sreeja and D. Pratiti *et al.*, 2007. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. J. Ethnopharmacol., 109: 359-363.
- Wu, S.J. and L.T. Ng, 2008. Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan. LWT, 41: 323-330.
- Zeng, S., W. Liu, F. Nie, Q. Zhao and J. Rong *et al.*, 2009. LYG-202, a new flavonoid with a piperazine substitution, shows antitumor effects *in vivo* and *in vitro*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 385: 551-556.