



UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU

UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET
MICROBIOLOGIE

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET
CHIMIE APPLIQUEES

N° d'ordre-----



THESE UNIQUE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR ES SCIENCES BIOLOGIQUES APPLIQUEES

**Option: Phytothérapie et Plantes médicinales/Biochimie et
Chimie des Substances Naturelles**

Présentée par

Sahabi BAKASSO

**ETUDES PHYTOCHIMIQUES ET POTENTIALITES
BIOLOGIQUES DE CINQ ESPECES D'INDIGOFERA
(FABACEAE) UTILISEES EN MEDECINE
TRADITIONNELLE AU BURKINA FASO.**

Soutenue le, 8 Août 2009.

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 Jérôme Germain SAWADO, Professeur Titulaire

Ecole Inter Etats des Sciences et Médecines Vétérinaires de Dakar, Sénégal,

Pr Odile Germain NACOULMA, Professeur Titulaire

Université de Ouagadougou, Burkina Faso

DEDICACES

A mon défunt Père Bakasso Sawani et à ma défunte Mère Adama Ango pour votre amour, la confiance que vous aviez placée en moi depuis mon très jeune âge, votre soutien de tout ordre et pour vos encouragements tout au long de ces années jusqu'à ce que vous nous quittiez. Que vos âmes reposent en paix!

A mon épouse HALIMA Sidi Mohamed pour ton soutien moral inestimable et tes conseils pratiques et à notre chère fille NANA Aïcha

A mes Frères et Sœurs, en particulier mon Grand Frère Massalatchi Bakasso qui m'a inscrit à l'école, Parents et Amis pour votre soutien moral et matériel et pour vos encouragements tout au long de ces années.

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 Chimie Appliquées de l'UFR/SVT de l'Université de Ouagadougou grâce au soutien financier du gouvernement du Niger à travers la bourse nationale et de l'Union Economique Monétaire Ouest Africaine (UEMOA) à travers la bourse d'Excellence (2008).

J'adresse mes remerciements:

*Au **Professeur Odile Germaine Nacoulma/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. Pr, 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 SANNI**, qui, malgré ses nombreuses occupations a accepté d'évaluer ce travail et de présider mon jury de soutenance. Qu'il trouve ici nos sincères remerciements.*

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

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

*Au **Professeur Jeanne Millogo/Rasolodimby** qui, malgré ses nombreuses occupations s'est toujours intéressée à apporter son aide dans la réalisation de ce travail. Merci pour tout l'intérêt que vous avez accordé à ce travail et votre disponibilité permanente, vos conseils et soutiens divers.*

Au **Pr Boukary Zeba**, au **Pr Hassanata Millogo**, au **Dr Monique Ouattara**, et à l'ensemble des enseignants de l'UFR/SVT j'adresse mes remerciements pour vos encouragements.

A mes aînés, dans le désordre: **Dr Làmien-Meda Aline**, **Dr Sawadogo Wantaga**, **Dr Hilou Adama**, **Dr Kiendrébiogo Martin**, **Dr Lamien Charles Euloge**, **Dr Tibiri André**. Parmi ces personnes je tiens à remercier très particulièrement **Dr Aline Lamien-Meda**, **Dr Kiendrébiogo** et **Dr Lamien Charles Euloge** pour leur agréable compagnie et leurs conseils, pour votre gentillesse, leur disponibilité et tout l'intérêt que vous avez accordé à ce travail à travers votre participation à la conception de toutes les publications issues de ce travail, et cela malgré vos préoccupations.

Mes collègues du laboratoire de Biochimie et Chimie Appliquées pour leur contribution à travers les conseils et suggestions mais aussi pour leur agréable compagnie et leurs soutiens.

. Dans le désordre: **Boniface, Roland, Moussa, Eric, Hervé, Ahmed, Fernand, Jean, Ubert** Je remercie 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 :

- **Messieurs Aziz Traoré, Ladjì Sidibé et Justin Nikiema** pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de ces années de labeur.

- **Messieurs Naroua Sani, Issa M. Bachar, Namata Hamidou, Boukary Salif et Seydou Djika** pour leur soutien et leur agréable compagnie tout au long de ces années de labeur.

Enfin, j'exprime mes plus vifs remerciements et ma profonde gratitude à la famille **El Hadji Naroua** pour l'aide multiforme qu'elle m'a apporté toutes ces années.

RESUME

Indigofera colutea (Burm.) Murril., *I. macrocalyx* Guill. et Perr., *I. nigritana* Hook F., *I. pulchra* Willd et *I. tinctoria* L (Fabaceae) sont des herbacées largement utilisées en médecine traditionnelle au Burkina Faso et dans certains pays d'Afrique et d'Asie. Cependant il existe peu de données sur leur profil phytochimique et biologique, d'où la nécessité d'étudier la phytochimie et l'activité biologique de ces espèces afin de justifier leurs utilisations en médecine traditionnelle. Les méthodes standards de caractérisation ainsi que la CCM ont été utilisées pour le criblage phytochimique des extraits acétoniques 80% de ces espèces. Les flavonoïdes, les tanins, les flavonols et les phénoliques totaux ont été quantifiés par la méthode spectrophotométrique. Ces extraits ont aussi été testés pour leurs potentiels biologiques en évaluant leur activité antioxydante par les méthodes FRAP, DPPH et ABTS, leur activité enzymatique "in vitro" sur la LOX, la XO, l'AChE et la CE, enzymes qui sont impliquées dans l'étiologie de l'inflammation, de la goutte et la maladie d'Alzheimer. Leur activité antibactérienne a aussi été testée sur cinq souches de références de types ATCC. Les investigations phytochimiques ont montré la présence des flavonoïdes, des saponines, des quinones, des stérols/triterpènes et des tannins dans toutes les espèces à l'exception de *I. pulchra* qui n'a pas présenté de quinones. L'acide gallique, l'acide caféique, la rutine, la quercitrine et la myricétine ont été identifiés. *I. colutea*, *I. tinctoria*, *I. nigritana* et *I. macrocalyx* ont respectivement présenté les plus fortes teneurs en polyphénols (54,27 %), en tanins (26,63 %), en flavonoïdes (9,63 %) et en flavonols (2,93%) totaux. Ce sont les extraits qui ont présenté les plus fortes teneurs en phénoliques, qui présentent des fortes capacités antioxydantes d'où les corrélations positives obtenues entre les deux paramètres ($R^2 = 0,8959$ pour FRAP; $R^2 = 0,8383$ pour ABTS et $R^2 = 0,9800$ pour DPPH). Les meilleures inhibitions enzymatiques et activités bactériennes ont été obtenues avec *I. macrocalyx* et *I. nigritana* qui ont présenté les plus fortes teneurs en flavonoïdes et en flavonols. Toutefois la plus forte inhibition de la LOX est obtenue avec l'extrait de *I. colutea*, meilleur antioxydant, riche en acide gallique et acide caféique. Il ressort que les espèces testées, constituent des bonnes sources des drogues antioxydantes, inhibitrices d'enzymes et à activités antibactériennes. Ces activités peuvent justifier leur usage dans le traitement du paludisme, de dysenterie, des dermatoses et de maladies inflammatoires et des hépatites. L'extrait d'*I. macrocalyx* bon inhibiteur de la XO, peut être utilisé dans le traitement de la goutte.

Mots-clé: *Indigofera*, phytochimie, phénoliques, tanins et flavonoïdes totaux, activité antioxydante, enzymes, bactéries, Burkina.

ABSTRACT

Indigofera colutea (Burm.) Murril., *I macrocalyx* Guill. et Perr., *I. nigritana* Hook f., *I. pulchra* Willd and *I. tinctoria* L are Fabaceae largely used in folk medicine in Burkina Faso, in certain African and Asian countries. However it exist few data on their phytochemical and biological profile, from where need to study phytochemistry and biological activities of these plants in order to justify their uses in traditional medicine Thus standard methods and TLC were used to screen the phytochemical composition sifting of an aqueous acetone extracts prepared from five *Indigofera* species. The total phenolic, tannins, flavonoid and flavonols content of extracts were assessed. These extracts were also evaluated for their biological potential by antioxidant activity using FRAP, DPPH and ABTS assays, enzymes inhibition activity for their lipoxygenase, xanthine oxidase and acetylcholinesterase inhibition that are implied in inflammatory, gout and Alzheimer etiology. Also our studies were carried on antibacterial tests to justify their uses in traditional medicine. Flavonoids, saponins, quinones, sterols/triterpenes and tannins were present in all these species except for *I. pulchra* where quinones were not found. Gallic acid, caffeic acid, quercetrin, galangin, rutin and myricetin were identified by thin layer chromatography. Moreover, proportioning showed that *I. colutea*, *I. tinctoria*, *I. nigritana* and *I. macrocalyx* respectively presented the strongest of phenols (54,27 %), in tannins (26,63 %), in flavonoid of (9,63 %) and flavonols (2,93 %) contents. Among these, plants, which had the highest phenolic content, were also found to possess the best antioxidant activities. From where the results indicated a good correlation between antioxidant activities and total phenolic content ($R^2 = 0,8959$ for FRAP; $R^2 = 0,8383$ for ABTS et $R^2 = 0,9800$ for DPPH). *I. macrocalyx* and *I. nigritana* which presented the strongest of flavonoïdes and flavonols contents presented best enzymes inhibitions and antibacterial activities. However the strongest inhibition of the LOX is obtained with *I. colutea* extract, better antioxidant and rich in gallic and caffeic acid. It arises that the species tested, constitute good sources of antioxidant, drugs for anti-inflammatory purpose, anti Alzheimer disease and antibacterial activities. These activities can justify their use in the treatment of malaria, dysentery, skin disease, inflammatory and hepatitis. *I. macrocalyx* extract, good inhibitor of the XO, can be used in the treatment of gout.

Key words: *Indigofera*, phytochemistry, phenolic, tannins and flavonoids, antioxidant activity, enzymes, bacteria, Burkina.

LISTE DES PUBLICATIONS

PUBLICATIONS EN RAPPORT AVEC LA THESE

1. **S. Bakasso**, A. Lamien-Meda, C.E. Lamien, M. Kiendrebeogo, J. Millogo, A.G. Ouedraogo, O.G. Nacoulma (2008). Polyphenol contents and antioxidant activities of five *Indigofera* species (Fabaceae) from Burkina Faso. *Pakistan Journal of Biological sciences*, 11(11), 1429-1435.
2. **S. Bakasso**, A. Lamien-Meda, C.E. Lamien, M. Kiendrebeogo, A.Y. Coulibaly, O.G. Nacoulma (2009). In vitro inhibition of Acetylcholinesterase, Lipoxygenase and Xanthine oxidase and antibacterial activities of five *Indigofera* (Fabaceae) aqueous acetone extracts from Burkina Faso. (*Pakistan Journal of Biological sciences*).

POSTER EN RAPPORT AVEC LA THESE

S. Bakasso, A. Lamien-Meda, C.E. Lamien, M. Kiendrebeogo, O.G. Nacoulma (2008). Polyphenol contents and antioxidant activities of five *Indigofera* species (Fabaceae) from Burkina Faso.

AUTRE PUBLICATION

Couldiati T.H., Millogo-Koné H., Lamien-Méda A., Lamien C.E., Lompo M., Kiendrébéogo M., **Bakasso S.**, Yougbaré-Ziébro M., Millogo-Rasolodimby J., Nacoulma O.G. (2009). Antioxidant and antibacterial activities of *Combretum niroense* Aubrév. ex Keay (Combretaceae). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(3), 264-269.

LISTE DES ABREVIATIONS

AEAC	: Ascorbic acid Equivalent Antioxidant Content
AChE	: Acétylcholinestérase
ABTS	: 2,2'-azinobis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonate)
AOA	: Activité antioxydante
B F	: Burkina Faso
CE	: Carboxylestérase
CMB	: Concentration Minimale
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
COX	: Cyclo-oxygénase
DAD	: Diode Array Detector
DPPH	: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EME	: extrait méthanolique épuisé
FRAP	: Ferric ion Reducing Antioxidant Power
GAE	: Gallique Acide Equivalent
IC ₅₀	: Concentration qui provoque 50 % d'inhibition
LABIOCA	: Laboratoire de Biochimie et Chimie Appliquées
LOX	: Lipoxygénase
QE	: Quercétine Equivalent
TRAP	: Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter
TEAC	: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
UV	: Ultra Violet
XO	: Xanthine oxydase

TABLE DES MATIERES

DEDICACES-----	I
REMERCIEMENTS -----	II
RESUME-----	IV
LISTE DES PUBLICATIONS-----	VI
LISTE DES ABREVIATIONS -----	VII
TABLE DES MATIERES -----	VIII
LISTE DES TABLEAUX-----	XIII
LISTE DES FIGURES -----	XIV
LISTE DES PHOTOS-----	XV
INTRODUCTION-----	1
PREMIERE PARTIE: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE-----	5
CHAPITRE I. PRESENTATION DU GENRE <i>INDIGOFERA (FABACEAE)</i> -----	5
I. LA FAMILLE DES FABACEAE-----	5
II. PHYTOCHIMIE DE QUELQUES ESPECES DU GENRE <i>INDIGOFERA</i> .-----	6
III. PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DE QUELQUES ESPECES DU GENRE <i>INDIGOFERA</i> ----	7
III.1. <i>Propriété anti-protozoaire du genre Indigofera</i> -----	7
III.2. <i>Propriété anti-microbienne</i> -----	7
III.3. <i>Utilisations comme anti-plasmodique et anti-protozoaire</i> -----	8
III.4. <i>Propriétés anti-tumorale et anti-inflammatoire</i> -----	9
III.5. <i>Propriété anti-radicalaire des extraits des Indigofera</i> -----	9
III.6. <i>Propriété hépatoprotectrice</i> -----	9
III.7. <i>Autres propriétés des Indigofera</i> -----	10
IV. GENERALITES SUR LES ESPECES ETUDIEES-----	10
IV.1. <i>Classification (Cronquist, 1988)</i> -----	10
IV.2. <i>Indigofera colutea (Burm. f.) Merr.</i> -----	11
IV.3. <i>Indigofera macrocalyx Guill. and Perr.</i> -----	12
IV.4. <i>Indigofera nigriflora Hook F.</i> -----	13
IV.5. <i>Indigofera pulchra Willd.</i> -----	15
IV.6. <i>Indigofera tinctoria L.</i> -----	16

CHAPITRE II. GRANDS GROUPES CHIMIQUES DES ESPECES DU GENRE *INDIGOFERA*----- 19

I.	LES ALCALOÏDES -----	19
I.1.	<i>Classification et biosynthèse</i> -----	19
I.2.	<i>Activité biologique</i> -----	19
II.	LES COMPOSES PHENOLIQUES -----	20
II.1.	<i>Les Acides phénols et les phénols simples</i> -----	20
II.2.	<i>Les Flavonoïdes</i> -----	22
II.3.	<i>Roténoïdes</i> -----	27
II.4.	<i>Coumarines</i> -----	27
II.5.	<i>Tanins</i> -----	28
II.6.	<i>Quinones</i> -----	29
II.7.	<i>Anthocyanosides</i> -----	30
III.	COMPOSES TERPENIQUES -----	31
III.1.	<i>Classification et biosynthèse</i> -----	31
III.2.	<i>Saponines</i> -----	31
III.3.	<i>Caroténoïdes</i> -----	32
III.4.	<i>Hétérosides cardiotoniques</i> -----	33

CHAPITRE III: GENERALITES SUR QUELQUES ACTIVITES BIOLOGIQUES ----- 34

I.	ACTIVITE ANTIOXYDANTE-----	34
I.1.	<i>Définition</i> -----	34
I.2.	<i>Radicaux libres et formes réactives dérivées de l'oxygène</i> -----	34
I.3.	<i>Origine des espèces oxygénées réactives (ROS)</i> -----	35
I.4.	<i>Stress oxydatif</i> -----	36
I.5.	<i>Mécanisme de défense contre les radicaux libres</i> -----	36
I.6.	<i>Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante</i> -----	37
II.	ACTIVITES ENZYMATIQUES-----	38
II.1.	<i>Définition de l'homéostasie et de l'enzyme</i> -----	38
II.2.	<i>Rôle des enzymes dans l'organisme vivant</i> -----	38
II.3.	<i>Quelques inhibiteurs enzymatiques connus</i> -----	39
II.4.	<i>Quelques enzymes impliquées dans les maladies métaboliques</i> -----	39
III.	ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE-----	42
III.1.	<i>Généralités</i> -----	42
III.2.	<i>Réactions inflammatoires</i> -----	42
III.3.	<i>Les anti-inflammatoires</i> -----	43
III.4.	<i>Mécanisme d'action des anti-inflammatoires</i> -----	44
III.5.	<i>Méthode d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire</i> -----	44
IV.	ACTIVITE ANTI-BACTERIENNE -----	45
IV.1.	<i>Bactéries pathogènes</i> -----	45
IV.2.	<i>Mode d'action des composés sur les bactéries</i> -----	46

IV.3.	<i>Résistances bactériennes</i>	46
IV.4.	<i>Support génétique de la résistance</i>	47
DEUXIEME PARTIE: MATERIEL ET METHODES		49
A.	/ MATERIEL	49
I.	CADRE DE L'ETUDE	49
II.	MATERIELS	49
II.1.	<i>Appareillages</i>	49
II.2.	<i>Matériel de laboratoire</i>	49
II.3.	<i>Solvants et Réactifs</i>	50
II.4.	<i>Matériel biologique</i>	51
B.	/ METHODES	52
CHAPITRE I: ETUDE PHYTOCHIMIQUE		52
I.	ETUDES HISTOCHIMIQUES	52
I.1.	<i>Double coloration au carmino-vert pour l'identification des tissus</i>	52
I.2.	<i>Détection des métabolites secondaires</i>	52
II.	EXTRACTIONS ET FRACTIONNEMENTS	53
II.1.	<i>Extraction hydroacétonique</i>	53
II.2.	<i>Fractionnement des extraits</i>	53
II.3.	<i>Extraction en continu</i>	53
III.	TESTS GENERAUX DE CARACTERISATION	54
IV.	ANALYSE CCM DES COMPOSES PHENOLIQUES	54
IV.1.	<i>Analyse CCM des Alcaloïdes</i>	55
IV.3.	<i>Analyse CCM des flavonoïdes et acides phénols</i>	55
V.	DOSAGES DES PHENOLIQUES TOTAUX	56
VI.	DOSAGE DES TANINS	56
VII.	DOSAGE DES FLAVONOÏDES TOTAUX	57
VIII.	DOSAGE DES FLAVONOLS	57
CHAPITRE II: ACTIVITES BIOLOGIQUES		58
I.	DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE	58
I.1.	<i>Pouvoir réducteur par la méthode FRAP</i>	58
I.2.	<i>Activité anti-radicalaire par la méthode d'inhibition du radical cation ABTS</i>	59
I.3.	<i>Activité anti-radicalaire par inhibition du DPPH</i>	59
II.	ISOLEMENT DES COMPOSES PAR LA METHODE BIO- AUTOGRAPHIQUE	61
II.1.	<i>Etudes spectrales des composés isolés</i>	61
III.	INHIBITION DE L'ACETYLCHOLINESTERASE (AcHE)	62
IV.	INHIBITION DE LA CARBOXYLESTERASE (CE)	64
V.	L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE PAR INHIBITION DE LA LIPOXYGENASE (LOX)	65

VI.	INHIBITION DE LA XANTHINE OXYDASE (XO)	68
V.	DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTI-BACTERIENNE	69
VI.1.	<i>Milieux de culture</i>	69
VI.2.	<i>Préparations des solutions</i>	70
VI.3.	<i>Méthode de disques pour le test de sensibilité (Cos et al., 2006; NCCLS, 2000)</i>	70
VI.4.	<i>Méthode des micro-dilutions (Cos et al., 2006; NCCLS, 2000)</i>	71
V.	ANALYSES STATISTIQUES	72
TROISIEME PARTIE: RESULTATS ET DISCUSSIONS		73
CHAPITRE I. ETUDES PHYTOCHIMIQUES		73
I. RESULTATS		73
I.1.	<i>Résultats sur la revue bibliographique</i>	73
I.2.	<i>Etude histochimique</i>	74
I.3.	<i>Criblages phytochimiques</i>	77
I.4.	<i>Analyses CCM des acides phénols et des flavonoïdes</i>	78
I.5.	<i>Dosages spectrophotométriques des polyphénols</i>	81
II. DISCUSSION		86
III. CONCLUSION PARTIELLE		88
CHAPITRE II. CRIBLAGE DES PROPRIETES BIOLOGIQUES		90
I. ACTIVITES ANTIOXYDANTES		90
I.1.	<i>Résultats</i>	90
I.2.	<i>Discussion</i>	95
I.3.	<i>Conclusion partielle</i>	96
II. ACTIVITES ENZYMATIQUES		97
II.1.	<i>Résultats</i>	97
II.2.	<i>Relation entre activité enzymatique, composés polyphénolique et activité antioxydante</i>	98
II.3.	<i>Discussion</i>	101
II.4.	<i>Conclusion partielle</i>	105
III. ACTIVITES ANTI-BACTERIENNES		106
III.1.	<i>Résultats</i>	106
III.2.	<i>Relation entre activité anti-batérienne, composés polyphénolique et activité antioxydante</i>	109
III.3.	<i>Discussion</i>	112
III.4.	<i>Conclusion partielle</i>	113
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES		114
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		117

ANNEXES	I
ANNEXE I: CRIBLAGES PHYTOCHIMIQUES	I
ANNEXE II: PROTOCOLES DE PREPARATION DES TAMPONS	III

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: COMPOSES IDENTIFIES ET/OU ISOLES DE QUELQUES ESPECES DU GENRE <i>INDIGOFERA</i>	6
TABLEAU 2: PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DE QUELQUES ESPECES DU GENRE <i>INDIGOFERA</i>	8
TABLEAU 3 : STRUCTURE DE QUELQUES ACIDES PHENOLS ET PHENOLS SIMPLES	21
TABLEAU 4: STRUCTURES DE QUELQUES FLAVONOÏDES	25
TABLEAU 5: QUELQUES INHIBITEURS D'ENZYMES ET MALADIES CIBLEES.	39
TABLEAU 6: QUELQUES BACTERIES ET MALADIES	45
TABLEAU 7: PROTOCOLE D'INHIBITION DE LA CARBOXYLESTERASE	65
TABLEAU 8: PROTOCOLE D'INHIBITION DE LA LIPOXYGENASE.....	67
TABLEAU 9: PROTOCOLE D'INHIBITION DE LA XANTHINE OXYDASE	69
TABLEAU 10: UTILISATION EN MEDECINE TRADITIONNELLE DE CINQ ESPECES D' <i>INDIGOFERA</i>	74
TABLEAU 11: GROUPE CHIMIQUES DES EXTRAITS HYDRO-ACETONNIQUES DE CINQ ESPECES D' <i>INDIGOFERA</i>	78
TABLEAU 12: CORRELATION (R) ENTRE LES TENEURS ENTRE POLYPHENOLS DOSES	86
TABLEAU 13: POLYPHENOLS TOTAUX ET ACTIVITES ANTIOXYDANTES DES EXTRAITS DE CINQ D' <i>INDIGOFERA</i>	94
TABLEAU 14: ACTIVITES INHIBITRICES D'ENZYMES DES EXTRAITS DE CINQ <i>INDIGOFERA</i> (100 µG/M _L) ET DES SUBSTANCES DE REFERENCES	97
TABLEAU 15: DIAMETRE D'INHIBITION (MM) DE CINQ ESPECES D' <i>INDIGOFERA</i> , CMI, CMB ET CMB/CMI (N = 3).	108
TABLEAU 16: COEFFICIENT DE CORRELATION (R) ENTRE LES POLYPHENOLS ET LES SOUCHES BACTERIENNES	109

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: CLASSIFICATION DES ESPECES RETENUES.....	10
FIGURE 2: STRUCTURE DE L'INDIGOTINE (COLORANT BLEU) ET DE L'INDICAN.....	18
FIGURE 3 : STRUCTURES CHIMIQUES DE QUELQUES ALCALOÏDES (BRUNETON, 1993; NACOLMA, 1996).....	20
FIGURE 4: STRUCTURES CHIMIQUES DE QUELQUES PHENOLS SIMPLES (BRUNETON, 1993).	20
FIGURE 5: SQUELETTE DE BASE DES FLAVONOÏDES	22
FIGURE 6: REACTIONS ENZYMATIQUES CONDUISANT AUX PRINCIPALES FAMILLES DES FLAVONOÏDES.....	26
FIGURE 7: QUELQUES STRUCTURES DES ROTENOÏDES	27
FIGURE 8: STRUCTURES DE QUELQUES COUMARINES (BRUNETON, 1993; WAGNER ET BLADT., 1996).....	28
FIGURE 9: STRUCTURES DES TANINS NON HYDROLYSABLES ET HYDROLYSABLES (CIULEI, 1982).	28
FIGURE 10 : STRUCTURES CHIMIQUES DES ANTHRACENOSIDES (BRUNETON, 1993).	29
FIGURE 11: STRUCTURES DES PRINCIPAUX ANTHOCYANIDOLS (BRUNETON, 1993 ; WAGNER ET BLADT, 1996). ..	31
FIGURE 12 : STRUCTURES CHIMIQUES DE QUELQUES SAPONOSIDES	32
FIGURE 13: STRUCTURES CHIMIQUES DE QUELQUES CAROTENOÏDES (WAGNER ET BLADT, 1996).....	32
FIGURE 14: STRUCTURES DES HETEROSIDES CARDIOTONIQUES (BRUNETON, 1993; WAGNER ET BLADT, 1996). ..	33
FIGURE 15: REDUCTION DU DPPH (ROLLAND, 2004).....	60
FIGURE 16: METABOLISME DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE VIA LES CYCLES DE LA CYCLOOXYGENASE ET DE LA LIPOXYGENASE.	66
FIGURE 17: OXYDATION DE L'HYPOXANTHINE EN XANTHINE PUIS EN ACIDE URIQUE PAR LA XANTHINE OXYDASE	68
FIGURE 18: RENDEMENT DES EXTRACTIONS A L'ACETONE 80 %	77
FIGURE 19: COURBE ETALON ACIDE GALLIQUE	82
FIGURE 20: COURBE ETALON ACIDE TANNIQUE	83
FIGURE 21 : COURBE ETALON QUERCETINE DOSAGE FLAVONOÏDES TOTAUX.....	84
FIGURE 22 : COURBE ETALON QUERCETINE POUR LE DOSAGE DES FLAVONOLS	85
FIGURE 23: TENEURS EN POLYPHENOLS DES MACERES HYDRO-ACETONIQUES DE CINQ <i>INDIGOFERA</i>	85
FIGURE 24: COURBE ETALON ACIDE ASCORBIQUE POUR LA DETERMINATION DU POUVOIR REDUCTEUR (FRAP) ..	90
FIGURE 25: INHIBITIONS DU DPPH PAR LES EXTRAITS ACETONIQUES (80 %) DES 5 <i>INDIGOFERA</i> ET LES SUBSTANCES DE REFERENCES.	91
FIGURE 26 : COURBE ETALON ACIDE ASCORBIQUE POUR LA METHODE ABTS.....	92
FIGURE 27 : COEFFICIENTS DE CORRELATION ENTRE LES PHENOLIQUES TOTAUX ET ABTS; 1/DPPH ET FRAP ...	93
FIGURE 28: CORRELATIONS ENTRE PHENOLIQUES TOTAUX ET LE POURCENTAGE D'INHIBITION.	99
FIGURE 29: CORRELATIONS ENTRE FLAVONOÏDES TOTAUX ET POURCENTAGE D'INHIBITION.	100
FIGURE 30: CORRELATIONS ENTRE FLAVONOLS ET POURCENTAGE D'INHIBITION	100
FIGURE 31: CORRELATIONS ENTRE CAPACITE ANTIOXYDANTE DES EXTRAITS ET POURCENTAGE D'INHIBITION. ...	101
FIGURE 32: CORRELATIONS ENTRE PHENOLIQUES TOTAUX ET DIAMETRE D'INHIBITION SUR GRAM NEGATIFS	109
FIGURE 33: CORRELATIONS ENTRE PHENOLIQUES TOTAUX ET DIAMETRE D'INHIBITION SUR GRAM POSITIFS	110
FIGURE 34: CORRELATIONS ENTRE CAPACITE ANTIOXYDANTE ET DIAMETRE D'INHIBITION SUR GRAM NEGATIFS	111
FIGURE 35: CORRELATIONS ENTRE CAPACITE ANTIOXYDANTE ET DIAMETRE D'INHIBITION SUR GRAM POSITIFS.	111

LISTE DES PHOTOS

PHOTO 1: <i>INDIGOFERA COLUTEA</i> (BURM. F.) MERR, RECOLTEE A TAAB-TENGA PROVINCE DE KADIOGO,.....	11
PHOTO 2: <i>INDIGOFERA MACROCALYX</i> GILL. AND PERR. , RECOLTEE A TAAB-TENGA PROVINCE DE KADIOGO,.....	12
PHOTO 3: <i>INDIGOFERA NIGRITANA</i> HOOK F., RECOLTEE A TAAB-TENGA PROVINCE DE KADIOGO,.....	14
PHOTO 4: <i>INDIGOFERA PULCHRA</i> WILLD., RÉCOLTÉE À TAAB-TENGA PROVINCE DE KADIOGO, SEPTEMBRE, 2005, BAKASSO.....	15
PHOTO 5: <i>INDIGOFERA TINCTORIA</i> LINN. RÉCOLTÉE À TAAB-TENGA PROVINCE DE KADIOGO, SEPTEMBRE, 2005, BAKASSO.....	17
PHOTO 6: COUPES HISTOCHIMIQUES DES TIGES DE CINQ (5) ESPECES DU GENRE <i>INDIGOFERA</i>	76
PHOTO 7: CCM DES EXTRAITS A L'ACETONE 80 % DE CINQ ESPECES D' <i>INDIGOFERA</i> A UV254 NM AVANT REVELATION AU NEU (A) ET A UV365 NM APRES REVELATION AU NEU (B).....	79
PHOTO 8: CCM DES EXTRAITS A L'ACETONE 80 % HYDROLYSES (C) ET NON HYDROLYSES (D) DE CINQ ESPECES D' <i>INDIGOFERA</i> A UV365 NM APRES REVELATION AU NEU.	80
PHOTO 9: CCM DES EXTRAITS A L'ACETONE 80 % DE CINQ ESPECES D' <i>INDIGOFERA</i>	80

INTRODUCTION

L'utilisation des plantes médicinales pour guérir ou prévenir certaines maladies est une pratique rencontrée dans tous les pays du monde. Le règne végétal, parce qu'autotrophe, est une source inépuisable de molécules pouvant présenter un intérêt thérapeutique. La mise au point continue de méthodes de criblage biochimique et biologique contribue à l'isolement de composés bioactifs à partir d'extraits végétaux (Poubelle et Borgeat, 2000). De plus, la performance croissante des techniques analytiques et préparatives, ainsi que l'accès de plus en plus facilité à la littérature, rendent leur caractérisation plus aisée.

De nos jours entre 20 000 et 25 000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée humaine. On estime jusqu'à 75% les médicaments qui ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une plante ou une molécule active d'origine végétale (Newman *et al.*, 2000). Selon l'OMS (2003), près de 6 000 espèces de plantes sont utilisées en Afrique, dont plus de 4 000 sont des plantes médicinales, cela représente environ 90 % de la médecine traditionnelle en Afrique. Il faut noter que particulièrement en Afrique, les populations, en majorité rurales, sont confrontées à une insuffisance de la couverture en besoins sanitaires et à l'inaccessibilité des médicaments essentiels souvent à prix élevés (OMS, 2003).

Les plantes médicinales peuvent être donc une alternative pour ces populations, cependant il existe peu de preuves systématiques de leur innocuité et de leur efficacité. En effet, malgré une connaissance certaine des plantes et de son environnement, l'Homme demeure cependant fréquemment victime d'intoxications accidentelles dues aux plantes.

Dans le contexte sanitaire actuel, il y a un besoin continu de nouvelles molécules pour prévenir et/ou soigner de nombreuses pathologies comme le VIH-SIDA et les infections opportunistes (tuberculoses, diarrhées, maladies cutanées,...), le paludisme, les infections bactériennes et fongiques ainsi que les maladies associées aux stress oxydatif (hypertension artérielle, cancers, diabète, artériosclérose, rhumatismes, la goutte, la maladie d'Alzheimer, les maladies cardiovasculaires, respiratoires et inflammatoires) (Halliwell *et al.*, 1990; Sweeney *et al.*, 2001).

De plus en plus, des résistances aux médicaments les plus utilisés, souvent les moins chers, se répandent sans oublier les effets secondaires liés à la prise de certains médicaments d'origine synthétique ou naturels.

Parmi les potentialités biologiques reconnues des plantes, l'activité antioxydante présente un intérêt de plus en plus grandissant à cause des rôles importants que jouent les composés antioxydants, retrouvés au niveau des plantes, dans le traitement et la prévention des maladies du

stress oxydant (Cole *et al.*, 2005; Liu, 2003; Riboli and Norat, 2003). En plus, le potentiel inhibiteur ou immunostimulateur des extraits de plantes sur les enzymes, sont de plus en plus exploités in vitro et in vivo. Car il faut noter que plusieurs enzymes sont impliquées dans les maladies métaboliques. C'est l'exemple de la xanthine oxydase (XO), de la lipoxigénase (LOX) et de l'acétylcholinestérase (AChE) qui sont impliqués, respectivement, dans l'étiologie de la goutte, de l'inflammation et de la maladie d'Alzheimer.

Inhiber ces enzymes c'est aussi lutter contre ces maladies mais aussi contre le stress oxydatif (Ferraz Filha *et al.* 2006; Salah *et al.*, 2005; Sweeney *et al.*, 2001).

Vu, l'intérêt scientifique que suscitent les médicaments d'origine végétale, on assiste, ces dernières années, à la valorisation thérapeutique des molécules biologiquement actives contenues dans les espèces végétales. Cela se traduit par la naissance de nouvelles molécules d'origine naturelle parmi lesquels on peut citer le taxol (issu de *Taxus baccata* L. (*Taxaceae*)) et ayant des propriétés anticancéreuses remarquables (cancers de l'ovaire et du sein) et de l'artémisinine (isolée de *Artemisia annua* L. (*Asteraceae*)) pour ses propriétés antipaludiques (Hostettmann, 2001).

Malgré cette multiplicité des recherches déjà menées sur les plantes, les résultats restent insuffisants quand on pense que seul environ 15 % du nombre de plantes ont fait l'objet d'une étude systématique en vue de la recherche de composés bioactifs (Cragg *et al.*, 1997).

Dans la recherche de nouveaux médicaments à partir des plantes, l'utilisation de données de la médecine traditionnelle locale comme source primaire d'informations s'avère d'une importance capitale. A travers ces études sont recherchées l'innocuité, l'efficacité, la qualité, pour un usage rationnel des drogues à base de plantes ce qui répond bien aux besoins du moment.

Dans ce cadre, le genre *Indigofera* (Fabaceae), riche en polyphénols, constitue un immense réservoir de métabolites secondaires bio-actifs nouveaux. Leurs potentiels anti-plasmodique (Nacoulma, 1996), antimicrobien (Adamu *et al.*, 2005; Dahot *et al.*, 1999; Esimone *et al.*, 1999; Leite *et al.*, 2006; Thangadurai *et al.*, 2002), hepatoprotecteur (Shahjahan *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2006; Sreepriya *et al.*, 2001), anti-oxydant (Bakasso *et al.*, 2008; Gyamfi *et al.*, 1999; Sreepriya *et al.*, 2001), anti-tumorale (Han, 1994; Christina *et al.*, 2003; Raj Kapoor *et al.*, 2004; Viera *et al.*, 2006), anti-inflammatoire (Aziz-Ur-Rehman *et al.*, 2005; Christina *et al.*, 2003; Esimone *et al.*, 1999; Perumal Samy *et al.*, 1998; Sharif *et al.*, 2005) et insecticide (Kamal et Mangla, 1993) ont également été démontrés.

Nos travaux précédents (Bakasso, 2004) ont permis de caractériser des groupes chimiques à savoir les flavonoïdes, les tanins, les anthraquinones, les saponosides, les stérols

et triterpènes dans les extraits de tiges feuillées d'*Indigofera nigrifolia* Hook F.. Les composés phénoliques et flavonoïdes totaux ont aussi été dosés et l'extrait méthanolique épuisé (EME) a donné respectivement $15,99 \pm 0,28$ mg GAE et $12,52 \pm 0,10$ mg QE pour 100g d'extrait. Le même extrait avait donné une bonne activité antioxydante, avec une IC_{50} de l'ordre de 8 μ g/ml vis-à-vis du DPPH.

C'est au vu de tous ces résultats et observations que nous avons jugé utile d'aller plus loin, en approfondissant nos études sur cette espèce mais aussi sur d'autres espèces du même genre à savoir *I. colutea* (Burm.) Murrill, *I. macrocalyx* Guill. et Perr., *I. pulchra* Willd et *I. tinctoria* L.

Les cinq (5) espèces, qui ont fait l'objet de la présente étude, sont largement utilisées en médecine traditionnelle. Ainsi au Burkina Faso, au Niger, au Nigeria tout comme dans certains pays asiatiques, ces plantes sont utilisées dans le traitement du paludisme, des infections bactériennes, de la constipation, des dermatoses et des plaies (Kerharo et Adams, 1974; Nacoulma, 1996; Perumal Samy *et al.*, 1998). Des études récentes ont démontré que les extraits de *Indigofera tinctoria* ont des activités hépatoprotectrices (Singh *et al.*, 2006). Cependant nous disposons de peu de données sur le profil phytochimique et biologique complet des espèces de la présente étude malgré leur large utilisation en médecine traditionnelle.

Tous ces faits nous ont amené à juger nécessaire d'étudier ces 5 espèces à travers des criblages phytochimiques et biologiques dans le but de confirmer ou d'infirmer le bien-fondé de leurs utilisations pour le traitement de certaines maladies.

Notre travail s'inscrit donc dans le cadre d'une contribution à une meilleure connaissance de la phytochimie et des activités biologiques de cinq espèces du genre *Indigofera*.

De façon spécifique, il s'est agi de:

- rechercher les tissus de biosynthèse ou de stockage des métabolites secondaires à travers une étude histochimique des cinq espèces.
- caractériser et doser les principaux métabolites secondaires pour une meilleure connaissance de la phytochimie de ces plantes.
- évaluer les activités biologiques afin d'infirmer ou de confirmer le bien-fondé des utilisations de ces plantes sur la base de criblages biologiques à savoir les activités antioxydante, anti-bactérienne et inhibitrice de certaines enzymes "marqueurs" de certaines maladies comme l'acétylcholinestérase pour la maladie d'Alzheimer, la lipoxigénase pour les inflammations (asthme), la xanthine oxydase pour la goutte

Ce présent document s'articulera sur trois parties:

La première partie de ce travail concerne tout d'abord l'étude bibliographique des plantes. Cette étude commence par une présentation des Fabaceae en particulier du genre *Indigofera*. Elle se poursuit par une synthèse des principaux résultats phytochimiques antérieurs et des propriétés biologiques relatives aux espèces du genre *Indigofera*.

La deuxième partie traite des matériels et méthodes utilisés dans cette étude.

Enfin, le troisième volet est consacré aux résultats phytochimiques et biologiques personnels obtenus à partir des tiges feuillées des cinq *Indigofera* et de discussion des résultats, cette partie se termine par une conclusion générale suivie des perspectives de recherche.

PREMIERE PARTIE: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I. PRESENTATION DU GENRE *Indigofera* (FABACEAE)

I. LA FAMILLE DES FABACEAE

Les Fabaceae représentent une grande famille constituée de plantes ligneuses (zones tropicales) et herbacées (zones tempérées) avec quelques arbres et arbustes qui regroupent environ 12 000 espèces réparties en 400 à 500 genres dont le genre *Indigofera*. La distribution des Fabaceae est très cosmopolite, on les trouve partout dans le monde.

Les espèces de la famille des Fabaceae possèdent des feuilles généralement alternes, imparipennées, trifoliolées et stipulées. Cependant on peut noter quelques légères variations sur le nombre et la forme de folioles. Leurs racines sont généralement pivotantes et laissent apparaître des nodosités à rhizobium qui se forment si le sol est pauvre en azote.

Les Fabaceae possèdent un seul carpelle et un ovaire unique qui est supère, surmonté d'un style et d'un stigmate. Les inflorescences sont en grappes plus ou moins allongées, les fleurs sont cyclisées, hermaphrodites et fortement zygomorphes par la corolle. La corolle présente une forme dite "papilionacée" c'est à dire à symétrie bilatérale et une préfloraison imbriquée, descendante ou vexillaire. Elle est constituée de cinq pétales disposés en forme de papillon. La grande famille des Fabaceae doit son unité à son fruit, appelé gousse ou légume et à sa corolle papilionacée d'où le nom de Légumineuses sous lequel cette famille est plus connue.

La gousse est un follicule déhiscent qui s'ouvre par deux fentes longitudinales en deux valves portant chacune une rangée de graines exalbuminées.

Le genre *Indigofera* représente à lui seul plus de 700 espèces réparties dans les régions tropicales et subtropicales Africaines, Asiatiques, Australiennes, Sud et Nord Américaines (Hassen *et al.*, 2006). Les *Indigofera* en dehors de leurs rôles prépondérants dans les fourrages des animaux, car peu toxiques, et dans l'industrie textile, constituent de nos jours une source importante de métabolites secondaires (flavonoïdes, roténoïdes et acides phénols) dont le rôle pharmacologique est bien connu (Tableau 1). Ces plantes sont en outre largement utilisées en médecine traditionnelle et des propriétés pharmacologiques leurs sont attribuées (Tableau 2).

II. PHYTOCHIMIE DE QUELQUES ESPECES DU GENRE *Indigofera*.

La revue bibliographique sur la phytochimie de quelques espèces du genre *Indigofera* est résumée dans le tableau 1.

Tableau 1: Composés identifiés et/ou isolés de quelques espèces du genre *Indigofera*

<i>Indigofera</i> sp.	Composés identifiés et/ou isolés	Références Bibliographiques
<i>I. colutea</i> (Burm.) Murrill	Composés phénoliques	Sekar <i>et al.</i> , 1999
<i>I. dendroides</i> Jacq.	Tanins, flavonoïdes, saponosides, glycosides cyanogeniques	Esimone <i>et al.</i> , 1999
<i>I. aspalathoides</i> Vahl	Flavonoïdes et alcaloïdes N-nitrosodiethylamine	Rajkapoor <i>et al.</i> , 2004
<i>I. hetrantha</i> Wall.	Acides phénoliques Flavonoïdes, stérols et triterpènes	Aziz-Ur-Rehman <i>et al.</i> , 2005
<i>I. hebepetala</i>	Flavonoïdes triglycosylés	Hasan <i>et al.</i> , 1996
<i>I. longeracemosa</i>	Indigoferabietone decahydropyridoquinoline, xanthene	Thangadurai <i>et al.</i> , 2002 Thangadurai <i>et al.</i> , 2001
<i>I. oblongifolia</i> Forsk	Indigotine, xanthene et acide indigoferique	Sharif <i>et al.</i> , 2005
<i>I. tinctoria</i> L.	Roténoïdes Indigodoïdes, indirubine Furanoflavonoïdes Acide trans-tetraco-15-enoïque Indirubine	Kamal et Mangla 1993 Andreotti <i>et al.</i> , 2004 Narender <i>et al.</i> , 2006 Singh <i>et al.</i> , 2006 Han, 1994

Partant des propriétés biologiques de chacun des composés identifiés ou caractérisés (roténoïdes, terpénoïdes, stérols, saponosides, isoflavonoïdes) dans le genre *Indigofera*, certaines propriétés de ces espèces peuvent être justifiées. En effet, des investigations faites "in vitro" et "in vivo" des roténoïdes retrouvées dans les extraits de *I. tinctoria* sur les larves des moustiques (*Anopheles stephensi*) et sur les *Callosobruchus chinensis* adultes, ont montré

que ces composés ont des propriétés insecticides et antiplasmodiques (Kamal et Mangla 1993). On leur attribue aussi des propriétés anti-tumorales (Han, 1994).

La composition en polyphénols d'*Indigofera tinctoria* peut aussi justifier son pouvoir antioxydant (Singh *et al.*, 2001) et dans une moindre mesure son rôle hépatoprotecteur (Singh *et al.*, 2006). Il a par ailleurs été rapporté que *I. arecta*, *I. macrocalyx* et *I. nigritana* sont riches en flavonoïdes et isoflavonoïdes en plus *I. macrocalyx* et *I. nigritana* sont particulièrement riches en saponosides et en triterpènes (Nacoulma, 1996).

III. PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DE QUELQUES ESPECES DU GENRE *Indigofera*

Les espèces du genre *Indigofera* connues surtout pour leur potentiel en indigo (colorant), sont de plus en plus étudiées pour leurs propriétés biologiques. Les propriétés biologiques attribuées à certaines de ces espèces, sont regroupées dans le tableau 2.

III.1. Propriété anti-protozoaire du genre *Indigofera*

Des études ont montré que *I. leptoclada* et *I. tinctoria* sont utilisées pour leurs propriétés anti-protozoaires dans le plateau central du Burkina Faso (Nacoulma, 1996). Kamal et collaborateurs (1993) ont pu isoler des roténoïdes dans l'extrait de *I. tinctoria* à qui les propriétés anti-protozoaires ont été attribuées. Les propriétés anti-protozoaires de cette plante, rapportées par Nacoulma (1996), peuvent donc être attribuées aux roténoïdes.

III.2. Propriété anti-microbienne

Plusieurs espèces du genre *Indigofera* ont montré des propriétés antimicrobiennes. En effet, les travaux réalisés sur le décocté de *I. pulchra* par Adamu et collaborateur (2005) ont montré des activités inhibitrices sur *Proteus mirabilis* et *Staphylococcus aureus*; l'extrait méthanolique de *I. colutea* inhibe *Proteus vulgaris* (Puremal Samy *et al.*, 1998). D'autres travaux ont montré que les extraits de *I. dendroïdes* (Esimone *et al.*, 1999), *I. doleoides* (Mathabe *et al.*, 2006), *I. oblongifolia* (Dahot *et al.*, 1999), et *I. suffruticosa* (Leite *et al.*, 2006) ont des propriétés anti-bactériennes. En plus *I. oblongifolia* (Dahot *et al.*, 1999) et *I. suffruticosa* (Leite *et al.*, 2006) ont montré des propriétés antifongiques.

Tableau 2: Propriétés pharmacologiques de quelques espèces du genre *Indigofera*

Propriétés	<i>Indigofera sp.</i>	Références
Anti-plasmodique	<i>I. arrecta</i> Hochst. ex A. Rich , <i>I. leptoclada</i> Harms. <i>I. macrocalyx</i> Guill. & Perr., <i>I. nigritana</i> Hook f.	Nacoulma, 1996
Anti-protazoaire	<i>I. leptoclada</i> Harms <i>I. tinctoria</i> L.	Nacoulma, 1996 ; Kamal et Mangla., 1993
Anti-bactérienne	<i>I. arrecta</i> Hochst., <i>I. daleoides</i> Benth. <i>I. dendroides</i> Jacq. <i>I. longeracemosa</i> Stem. <i>I. oblongifolia</i> Forsk <i>I. pulchra</i> Willd. <i>I. suffruticosa</i> Mill	Nacoulma, 1996 Mathabe <i>et al.</i> , 2006 Esimone <i>et al.</i> , 1999 Thangadurai <i>et al.</i> , 2002. Dahot <i>et al.</i> , 1999 Adamu <i>et al.</i> , 2005; Leite <i>et al.</i> , 2006
Anti-fongique	<i>I. nigritana</i> Hook F. <i>I. oblongifolia</i> Forsk <i>I. suffruticosa</i> Mill.	Nacoulma, 1996 Dahot <i>et al.</i> , 1999 Leite <i>et al.</i> , 2006
Antidyslipidémique	<i>I. tinctoria</i> L.	Narender et al, 2006
Hepatoprotectrice	<i>I. tinctoria</i> L. <i>I. oblongifolia</i> Forsk	Singh <i>et al.</i> , 2006; Spreepriya <i>et al.</i> , 2001; Shahjahan <i>et al.</i> , 2005
Anti-tumorale	<i>I. suffruticosa</i> Mill. <i>I. tinctoria</i> L. <i>I. aspalathoides</i> Vahl	Vieira <i>et al.</i> , 2006 Han, 1994 Christina <i>et al.</i> , 2003 Raj Kapoor <i>et al.</i> , 2004.
Anti-oxydante	<i>I. tinctoria</i> L. <i>I. arrecta</i> Hochst. ex A. Rich	Spreepriya <i>et al.</i> , 2001 Gyamfi <i>et al.</i> , 1999
Anti-venimeux	<i>I. tinctoria</i> L. <i>I. pulchra</i> Willd	Nacoulma, 1996 Abubakar <i>et al.</i> , 2006
Insecticide	<i>I. tinctoria</i> L.	Kamal et Mangla, 1993
Anti-épileptique, anti-hémorroïdaire	<i>I. tinctoria</i> L.	Singh <i>et al.</i> , 2006

III.3. Utilisations comme anti-plasmodique et anti-protazoaire

Les études réalisées par Nacoulma (1996) ont rapporté que *I. arrecta*, *I. leptoclada*, *I. macrocalyx* et *I. nigritana* sont utilisés dans le traitement du paludisme au Burkina Faso.

Selon les enquêtes ethnobotaniques réalisées par Adamu *et al.* (2005) dans l'état de Bauchi (Nigeria), la plante entière de *I. pulchra* est utilisée dans le traitement du paludisme mais aussi contre la dysenterie.

III.4. Propriétés anti-tumorale et anti-inflammatoire

Selon les travaux de Raj Kapoor et collaborateur (2004) et ceux de Christina et collaborateurs (2003), les extraits de *I. aspalathoides* inhibent la prolifération de certaines cellules tumorales comme *Ehrlich ascites* et *ascitic lymphoma* leur conférant ainsi des propriétés antitumorales. En Chine, l'utilisation traditionnelle d'*Indigofera tinctoria* en médecine traditionnelle a permis d'identifier l'indirubine qui serait efficace contre les leucémies chroniques (Han, 1994).

Plusieurs espèces du genre *Indigofera* ont aussi montré des propriétés anti-inflammatoires, c'est le cas de *I. aspalathoides* (Amala *et al.*, 1982; Christina *et al.*, 2003), de *I. dendroides* (Esimone *et al.*, 1999) et *I. hetrantha* (Aziz-Ur-Rehman *et al.*, 2005) et *I. colutea* (Perumal Samy *et al.*, 1998). *I. oblongifolia* qui, à travers l'indigotine et l'acide indigoferique qu'il contient, inhibe la lipoxigenase. Cette inhibition *in vitro* confère à cette plante des propriétés anti-inflammatoires (Sharif *et al.*, 2005).

III.5. Propriété anti-radicalaire des extraits des *Indigofera*

L'activité antioxydante des extraits de certaines espèces du genre *Indigofera* a été aussi prouvée. Ainsi les extraits de *I. tinctoria* et *I. arrecta* ont montré des activités antioxydantes d'après les travaux de Spreepriya *et al.* (2001) et ceux de Gyamfi *et al.* (1999) respectivement, en inhibant le DPPH.

III.6. Propriété hépatoprotectrice

Les études de toxicité induite par le tétrachlorure de carbone et le D-galactosamine, réalisées sur les rats ont montré l'effet protecteur de *I. oblongifolia* (Sharif *et al.*, 2005) et de *I. tinctoria* (Singh *et al.*, 2006; Spreepriya *et al.*, 2001) vis à vis du foie des rats.

III.7. Autres propriétés des *Indigofera*

Nacoulma (1996) a rapporté l'utilisation de *I. nigritana* et *I. macrocalyx* comme étant des plantes immunostimulantes. La poudre de *I. tinctoria* est utilisée en combinaison avec les intestins calcinés de hérisson dans le traitement de la maladie de Newcastle. En outre *I. tinctoria* a montré des propriétés insecticides (Kamal et Mangala, 1993), anti-hémorroïdaires, anti-épileptique et anti-ulcéreuse (Singh *et al.*, 2006). En plus, l'extrait de cette plante réduit considérablement le taux de cholestérol sanguin (Narender *et al.*, 2006). *I. mysorensis*, quand à elle, a montré des propriétés antidiabétiques (Chakrabarti *et al.*, 2006).

IV. GENERALITES SUR LES ESPECES ETUDIEES

Les cinq espèces du genre *Indigofera*, qui ont fait l'objet de la présente étude à savoir *Indigofera colutea* (Burm. f.) Merr., *Indigofera macrocalyx* Guill. et Perr, *Indigofera nigritana* Hook F., *Indigofera pulchra* Willd. et *Indigofera tinctoria* Linn., sont représentées sur les photo n°1, 2, 3, 4 et 5 respectivement.

IV.1. Classification (Cronquist, 1988)

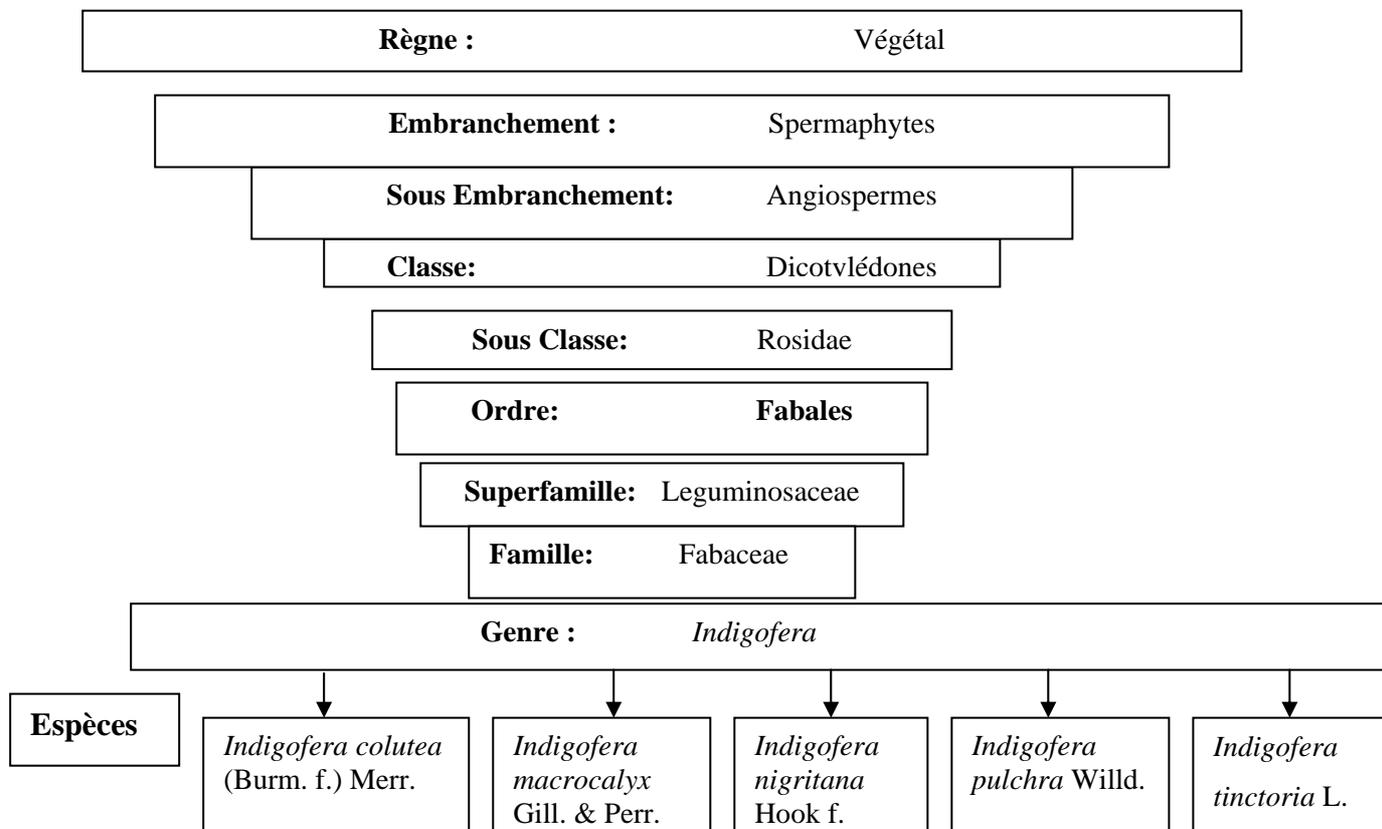


Figure 1: Classification des espèces retenues.

IV.2. *Indigofera colutea* (Burm. f.) Merr.

Synonyme: *Indigofera viscosa* Lam.

Description



Photo 1: *Indigofera colutea* (Burm. f.) Merr, récoltée à Taab-Tenga province de Kadiogo, Septembre, 2005, Bakasso.

Indigofera colutea (Burm. f.) Merr. (photo1) est une plante annuelle ou vivace, herbe à 50 cm de hauteur, avec des tiges sur lesquelles apparaissent des poils. Elle présente des feuilles longues de 3,5 cm; à stipules linéaires de 2 à 3 mm de long. Les inflorescences de longueur qui varient entre 1,5 et 4,5 cm. Les gousses, longues de 15 à 25 mm, sont toujours glandulaires avec plusieurs graines.

Données phytochimiques

Il existe peu de données sur la phytochimie de *I. colutea*. Sekar *et al.* (1999) ont rapporté l'existence de composés phénoliques dans l'extrait de *I. colutea*.

Utilisation traditionnelle et pharmacologie

D'après les travaux de Puremal Samy (1998), *I. colutea* est utilisée dans le traitement des douleurs de l'estomac. Les mêmes auteurs ont démontré que la fraction méthanolique de

I. colutea est active sur le *Proteus vulgaris*. Des travaux récents réalisés par Maregisis *et al.* (2008) sur les jeunes pousses de la même espèce, ont montré que les extraits hexanique et méthanolique sont actives sur *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*.

IV.3. *Indigofera macrocalyx* Guill. and Perr.

Nom local mooré: Tebeg poonré

Description



Photo 2: *Indigofera macrocalyx* Gill. and Perr. , récoltée à Taab-Tenga province de Kadiogo, Août, 2005, Bakasso.

Indigofera macrocalyx Gill. and Perr. (Photo 2) ou plante à grand calice est une herbacée annuelle à tiges étalées pouvant atteindre 0,5 mètre de haut, à feuilles imparipennées alternes. Chaque feuille est composée d'un rachis long de 2 à 4 cm, pouvant porter 2 à 8 paires de folioles opposées. Les folioles sont elliptiques et longues de 6 à 12 mm, larges de 3 à 6 mm. La foliole terminale est généralement plus longue que les autres, avec un sommet arrondi. Le pétiole est de long de 2 à 6 mm avant les premières folioles.

Elle présente des fleurs en glomérule et une corolle rouge brique longue de 3 mm et un calice à 5 dents foliacées longues de 4 mm.

Les fruits se présentent sous forme de petites gousses, à l'intérieur de chacune d'elles se forme une seule graine rousse suborbiculaire large de 1 à 5 mm.

Données phytochimiques

La présence des saponosides, des isoflavones et des triterpénoïdes a été rapportée dans les tiges feuillées de *Indigofera macrocalyx* par Nacoulma (1996).

Utilisation traditionnelle et pharmacologie

Une étude ethnobotanique de *Indigofera macrocalyx* a été menée auprès de plusieurs herboristes du plateau central du Burkina. Cette plante s'avère être très utilisée dans le traitement de plusieurs pathologies.

En effet, les tiges feuillées et la plante entière sont utilisées en interne tout comme en externe contre la fatigue, les retards locomoteurs des enfants, le paludisme, la constipation et l'impuissance. Les racines sont en outre utilisées contre les poux (Nacoulma, 1996). D'autre part il a été rapporté que le décocté d'inflorescences séchées, additionné de jus de citron et de sel, est donné en boisson, comme purgatif (Berhaut, 1974).

IV.4. *Indigofera nigriflora* Hook F.

Nom local Mooré: bugvan yénéga

Français: Indigotier du Niger

Description et habitat

Indigofera nigriflora Hook f. (Photo 3) est une herbacée annuelle ou vivace pouvant atteindre plus de 150 cm de long. Elle présente des feuilles alternes imparipennées, minuscules et très variables. Sur les tiges principales sont observés des longs rachis portant 2 à 6 paires de folioles et des poils naviculaires des deux cotés. Ces feuilles sont homogènes, isolées au sommet et portées par un pédoncule axillaire long de 10 à 12 mm.

Les fleurs, de couleur rouge brique, sont petites (3 mm). Les fruits sont des gousses cylindriques, pubescentes et portant un court bec au sommet. Ils sont de formes très variables.

(Berhaut, 1974; Nacoulma, 1996). Cette plante appelée aussi indigotier du Niger était récoltée d'abord sur les bords du fleuve Niger. Elle est fréquente sur le bord des cours d'eau, des galeries forestières et les terres inondables (Berhaut, 1974; Nacoulma, 1996).



Photo 3: *Indigofera nigritana* Hook F., récoltée à Taab-Tenga province de Kadiogo, Septembre, 2005, Bakasso.

Données phytochimiques

La plante contient des flavonoïdes, des saponosides, des tanins galliques, des stérols, des triterpènes, des isoflavones, des huiles essentielles, des alcaloïdes quinolizidiniques et des colorants rouges (Bakasso, 2004; Nacoulma, 1996).

Utilisation traditionnelle et pharmacologie

Les tiges feuillées de la plante sont largement utilisées en tradithérapie en usage interne ou externe selon les résultats des travaux effectués dans le plateau central du Burkina Faso (Nacoulma, 1996).

Usage interne

Les tiges feuillées de cette plante sont utilisées dans le traitement du paludisme, des douleurs gastro-intestinales chez l'enfant, des dermatoses, des mycoses, de la boubouille, des infections sexuellement transmissibles (I.S.T.), des néphrites, de l'épilepsie, du diabète, de l'hypogalactie et de la fatigue (Nacoulma, 1996).

Usage externe

Les mêmes parties de la plante sont utilisées pour soigner les mycoses, les dermatoses, les furoncles, les plaies, les brûlures et les aphtes. On l'utilise en outre comme source de colorants rouges dans les textiles (Nacoulma, 1996). *Indigofera nigriflora* pourrait donc avoir des propriétés fortifiante, tonique, stimulante, dépurative, antifongique, antiseptique et fébrifuge et même colorante.

IV.5. *Indigofera pulchra* Willd.

Description



Photo 4: *Indigofera pulchra* Willd., récoltée à Taab-Tenga province de Kadiogo, Septembre, 2005, Bakasso.

Indigofera pulchra Willd (Photo 4), est une plante suffrutescente, jusqu'à 1 m de haut. Elle présente des feuilles simples ou trifoliolées sur les rameaux avec des poils naviculaires parfois peu visibles.

Données phytochimiques

Nous ne disposons pas de données phytochimiques sur *Indigofera pulchra*.

Utilisation traditionnelle et pharmacologie

Selon les travaux de Abubakar *et al.* (2006), les extraits de *I. pulchra* donnent jusqu'à 40 % de protection contre une dose minimale létale de venin provenant de cobra (*Naja nigricollis*) administrée aux souris. D'autres auteurs après avoir rapporté que la plante entière est traditionnellement utilisée dans le traitement de la malaria et la dysenterie, ont démontré que le macéré aqueux de la plante a une activité sur *Staphylococcus aureus* et sur *Proteus mirabilis* (Adamu *et al.*, 2005).

IV.6. *Indigofera tinctoria* L.

Mooré: Garga (sing), garsé (plu)

Haousa: bâba

Français: *Indigotier*

Description et habitat

Indigofera tinctoria Linn. (Photo 5) est une plante arbustive, vivace buissonnante haute de 1 m à 1 m 50, à feuilles imparipennées alternes. Les rachis long de 5 à 6 cm portent 4 à 6 paires de folioles généralement bien opposées. Les folioles en formes ovales et elliptiques sont longues de 10 à 25 mm, larges de 7 à 12 mm, de base en coin large ou arrondies; sommet arrondi et souvent légèrement émarginé.

Les fleurs en racème axillaire sont longues de 3 à 10 cm avec des corolles longues de 5 mm avec une pubescence blanchâtre sur les calices et les boutons floraux.

Les fruits, gousses linéaires légèrement arquées, sont longs de 25 à 30 mm, larges de 2 à 2,5 mm, ils contiennent 12 à 13 graines.

Cette plante se rencontre surtout aux environs des villages et des lieux habités. Sa région d'origine serait les Indes (Behaut, 1973).

Indigofera tinctoria est répandue dans les îles du Cap Vert, en Afrique tropicale, Madagascar et Asie du Sud-Est (Adjanooun *et al.*, 1985).



Photo 5: *Indigofera tinctoria* Linn. récoltée à Taab-Tenga province de Kadiogo, Septembre, 2005, Bakasso.

Données phytochimiques

Plusieurs métabolites secondaires ont été identifiés et isolés des extraits de *I. tinctoria*. En effet, Kamal et Mangla (1993) ont pu isoler et identifier des roténoïdes à savoir la degueline, la dehydrodegueline, le roténol, la roténone, la tephrosine et le sumatrol. Une année plus tard, Han (1994) a pu isoler l'indirubine de *I. tinctoria*, d'autres auteurs ont isolé le même composé en 2004 en plus de l'indigodoïde (Andreotti *et al.*, 2004),

Singh et collaborateurs ont d'abord isolé l'indigotine en 2001 puis l'acide trans-tetracos-15-énoïque en 2006 dans l'extrait de *I. tinctoria*. Narender et collaborateurs (2006) ont pu isoler trois furano-flavones ainsi qu'un flavonol glucoside rare.

Utilisation traditionnelle et pharmacologie

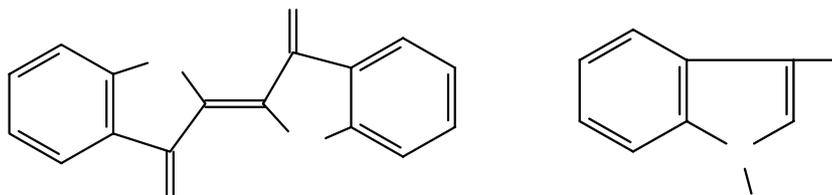
Les feuilles pilées se mettent sur les dartres blanches, elles s'emploient aussi en bains comme fébrifuges. La poudre de feuilles déterge les plaies anciennes. Les racines sont diurétiques, et utilisées contre la blennorragie (Behaut, 1973).

La partie aérienne est utilisée en préalable à une autre médication pour en accentuer l'effet, et en association dans des préparations utilisées contre la lèpre (Adjanooun *et al.*, 1985).

Selon les résultats des travaux de Spreepriya *et al.* (2001) sur les rats, l'extrait de *Indigofera tinctoria* (prétraitement à la dose 500 mg/kg de poids corporel) entraîne une augmentation de fuite de LDH, la diminution des niveaux d'urée dans le foie après une perfusion avec D-Galactosamine (5 mM) ou du tétrachlorure de carbone (0,5 mM). Les résultats indiquent l'effet hépatoprotecteur de *I. tinctoria* chez les rats contre la toxicité de D-galactosamine (D-GalN) et le tétrachlorure de carbone (CCl₄).

Dans la même optique Singh et collaborateurs (2001) ont montré que l'indigotine (Figure 2) (FA), obtenue par fractionnement d'un extrait étheré de la tige feuillée de *Indigofera tinctoria*, a présenté une forte activité hépatoprotectrice contre la CCl₄ induite chez les rats et les souris. Cela a montré l'effet préventif et réparateur de la FA dans le processus des dommages induit au foie des animaux. La fraction possède un haut coefficient thérapeutique, car ces mêmes auteurs n'ont pas observé de mortalité à la dose de 2 g/kg chez la souris.

Han (1994) a isolé l'indirubine des extraits de *Indigofera tinctoria*, ce composé est de nos jours d'une grande utilité dans le traitement de la leucémie chronique.



Indigotine

Indican

Figure 2: Structure de l'indigotine (colorant bleu) et de l'indican

CHAPITRE II. GRANDS GROUPES CHIMIQUES DES ESPECES DU GENRE *Indigofera*

I. LES ALCALOÏDES

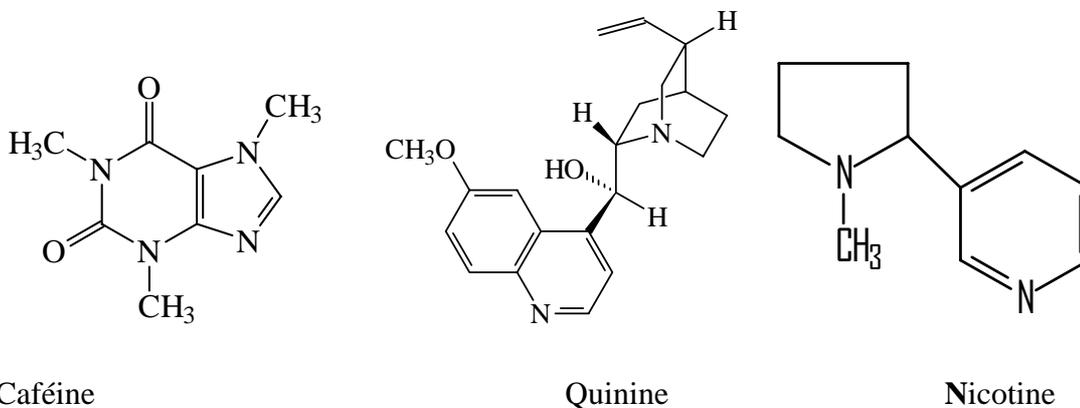
I.1. Classification et biosynthèse

Les alcaloïdes sont des substances azotées, basiques, d'origine naturelle à structures complexes. Certains alcaloïdes dérivent soit des acides aminés (alcaloïdes vrais), soit des terpènes (alcaloïdes terpéniques ou proto-alcaloïdes).

D'autres sont des amines simples où l'atome d'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique (cas des pseudo-alcaloïdes) (Bruneton, 1993). La figure 3 donne quelques structures des alcaloïdes quinolizidiques et pyridiniques.

I.2. Activité biologique

Les alcaloïdes agissent sur le système nerveux central comme dépresseurs (morphine), comme stimulants (caféine) ou sur le système nerveux autonome comme sympathomimétique (éphédrine), parasympathomimétique (ésérine), anti-cholinergique (atropine). Ils sont aussi curarisants, anesthésiques locaux (cocaïne), antifibrillants (quinidine), anti-tumoraux (ellipticine), antipaludiques (quinine) et amoebicides (émétine) (Bruneton, 1993; Christina *et al.*, 2003; Nacoulma, 1996).



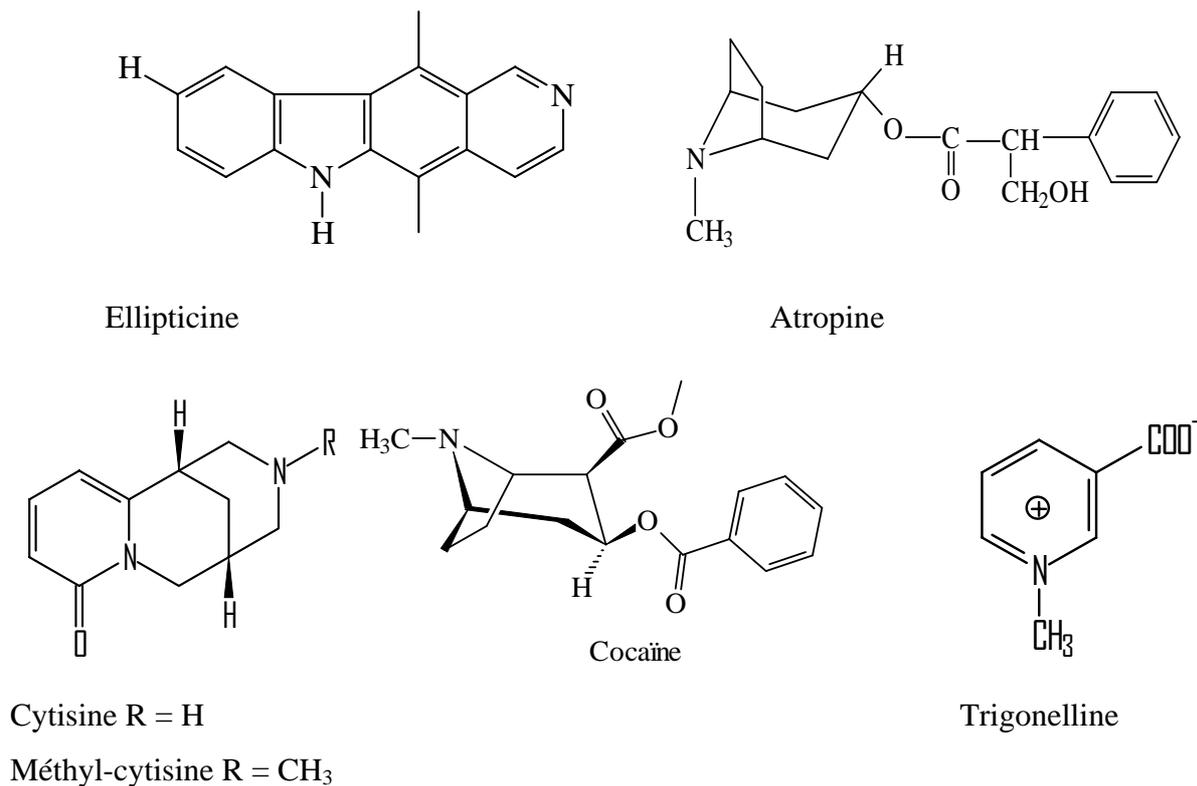


Figure 3 : Structures chimiques de quelques alcaloïdes (Bruneton, 1993; Nacoulma, 1996)

II. LES COMPOSES PHENOLIQUES

II.1. Les Acides phénols et les phénols simples

II.1.1. Classification et biosynthèse

Les phénols simples

Ce sont des composés à noyaux benzéniques liés à des groupements hydroxyles libres ou engagés dans des liaisons hétérosidiques, éther ou ester. La figure 4 représente quelques phénols simples.

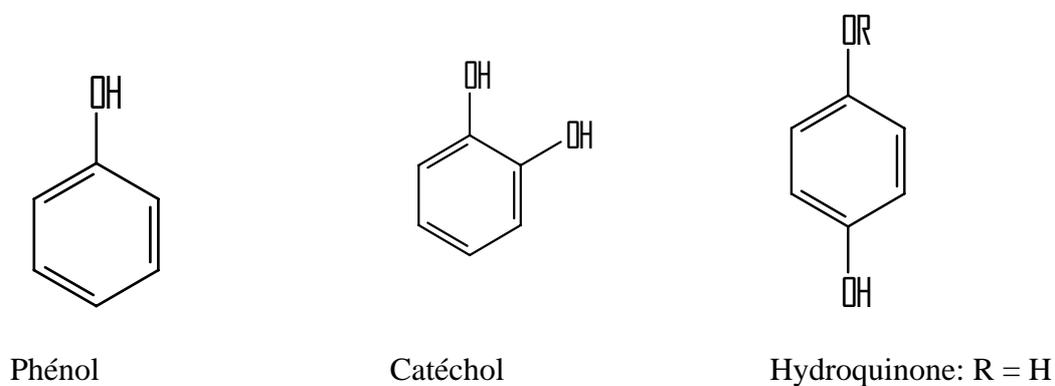


Figure 4: Structures chimiques de quelques phénols simples (Bruneton, 1993).

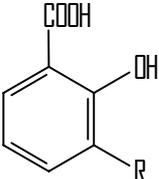
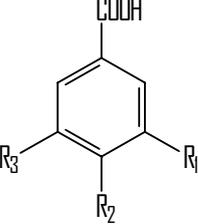
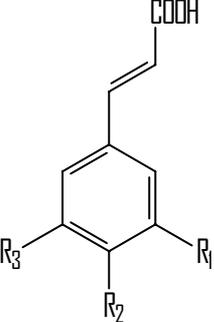
Acides phénols

Ce sont des composés formés d'un ou de plusieurs noyaux benzéniques présentant une ou plusieurs fonctions carboxyliques. Ils dérivent des acides benzoïque et cinnamique parmi lesquels on peut citer les acides férulique, cinnamique, caféique et p-coumarique (Bruneton, 1993; Velazquez *et al.*, 2003). Le tableau 3 montre la structure de quelques acides phénols et phénols simples.

II.1.2. Activité biologique

Les phénols simples et acides phénols sont anti-inflammatoires, antiseptiques urinaires (cas des arbutosides). Les propriétés anti-inflammatoires sont surtout attribuées aux dérivés salicyliques. Ils sont aussi utilisés pour leurs propriétés anti-oxydante (Vélasquez *et al.*, 2003), anti-tumorale, antifongique et antibactérienne. Certains esters hétérosidiques phényl-propanoïques peuvent inhiber les enzymes de la phosphodiesterase de l'AMPc (Bruneton, 1993).

Tableau 3 : Structure de quelques acides phénols et phénols simples

Structures	Substitutions	Références
	Acide salicylique: R = H	Bruneton, 1993
	Dérivés de l'acide salicylique Acide vanillique: R ₁ = OCH ₃ , R ₂ = OH, R ₃ = H Acide protocatéchique: R ₁ = R ₂ = OH, R ₃ = H Acide gallique: R ₁ = R ₂ = R ₃ = OH	Bruneton, 1993; Ciulei, 1982; Wagner et Blatt, 1996
	Dérivés des acides phényl-propaniques Acide cinnamique: R ₁ = R ₂ = R ₃ = H Acide p-coumarique: R ₁ = R ₃ = H, R ₂ = OH Acide férulique: R ₁ = OCH ₃ , R ₂ = OH, R ₃ = H Acide caféique: R ₁ = R ₂ = OH, R ₃ = H	Bruneton, 1993; Ciulei, 1982; Wagner et Blatt, 1996

II.2. Les Flavonoïdes

II.2.1. Classification et biosynthèse

Le terme flavonoïde désigne le nom commun de pigments végétaux largement distribués dans le règne végétal et sont couramment consommés quotidiennement sous forme de fruits, légumes et boissons telles que le vin et le thé. Ils sont responsables de colorations des fruits, des fleurs et souvent des feuilles.

L'origine biosynthétique des flavonoïdes est l'enchaînement 2-phényl chromane qui est aussi l'élément structural de base de tous les flavonoïdes (Bruneton, 1993; Nacoulma, 1996). Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux cycles en C₆ (A et B) reliés par une chaîne en C₃ (Figure 5).

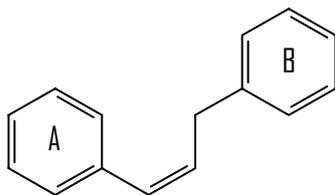


Figure 5: squelette de base des flavonoïdes

Leur biosynthèse se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone (Bruneton, 1993). Par l'action d'enzymes, cette chalcone de couleur jaune, est métabolisée en différentes classes de flavonoïdes: chalcones, flavanones, aurones (jaune), 2,3-dihydroflavonol ou flavanonols, flavones (ivoire), anthocyanidine (rouge-bleu), flavonols (jaune) et catéchines. Des étapes ultérieures, surtout de glycosylation et d'acylation, amènent les flavonoïdes à la forme définitive dans laquelle ils se trouvent "*in vivo*".

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C₃ intermédiaire. A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylées. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone.

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois. Certains flavonoïdes sont plus spécifiques de certains tissus.

Par exemple, les anthocyanes sont plutôt localisés dans les parties externes des fruits, fleurs et feuilles. Les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs.

II.2.2. Activité biologique des flavonoïdes

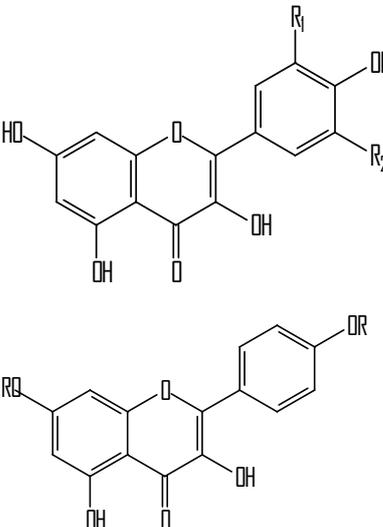
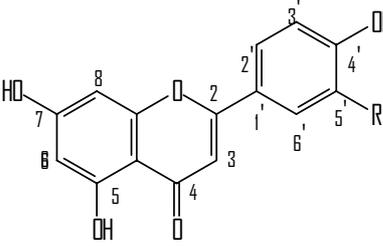
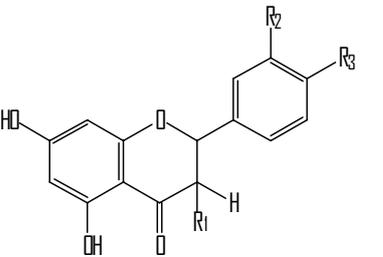
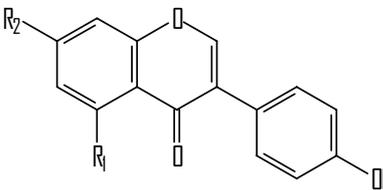
Leur fonction principale est la pigmentation des plantes (aspect esthétique indéniable, culminant dans les fleurs des végétaux supérieurs). Les flavonoïdes, en particulier les anthocyanes, sont les seules molécules du règne végétal capables de produire une vaste gamme de couleurs, susceptibles de donner des teintes allant du jaune-orangé au bleu, en passant par le pourpre et le rouge. Les flavones, auronnes et chalcones donnent plutôt des couleurs jaune, voire blanche. Si tous les flavonoïdes n'absorbent pas dans le domaine visible, ils présentent tous une bande dans l'ultra-violet proche du visible. Certains insectes, telle que l'abeille, distinguent les fréquences de radiation dans le domaine ultra-violet et visible et montrent des préférences pour certaines teintes. Cela contribue à assurer la survie de l'espèce lors de la pollinisation. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent également jouer un rôle dans la protection de ces plantes. Ils protègent les plantes vis-à-vis des rayonnements nocifs solaires.

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical. Ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes, vasculoprotectrices (oedèmes, antihémorroïdaires), antihépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et même anti-tumorales significatives (Elliott *et al.*, 2000; Fenglin *et al.*, 2004; Nacoulma, 1996; Raj Narayana *et al.*, 2001; Ueda *et al.*, 2002; Yenjai *et al.*, 2004). Ils sont capables de chélater les ions métalliques, largués à partir de leur protéine de fixation ou de transport. Ces ions métalliques renforcent les effets délétères du stress oxydatif en stimulant la production des radicaux hydroxyles (OH⁻) (Nijveldt *et al.*, 2001; Sahnoun *et al.*, 1998). Ce sont des inhibiteurs enzymatiques à l'égard de l'aldose réductase, de la protéine kinase C et des enzymes de l'inflammation: la cycloxygénase, la phospholipase A₂ et la lipoxygénase (Bruneton, 1993; Derbel *et al.*, 2005; Middleton *et al.*, 2000; Nijveldt *et al.*, 2001). Certains d'entre eux réduisent l'activation du complément, diminuant de façon générale la réponse inflammatoire (Bruneton, 1993, Nijveldt *et al.*, 2001).

Par exemple, les proanthocyanidols présents dans le vin rouge, peu dans le vin blanc, ont une activité protectrice contre l'infarctus du myocarde, et s'opposeraient aux processus de formation des plaques athéromateuses dans les artères (Bruneton, 1993).

Une activité anti-HIV leur a également été attribuée grâce à leur potentiel inhibiteur anti-VIH (vis-à-vis de la transcriptase inverse et l'ADN-polymérase de ce virus). Les flavonoïdes atténuent le pouvoir infectieux ou affectent la réplication intracellulaire d'autres virus comme le virus respiratoire syncytial, l'herpès simplex virus et les adénovirus (Nijveldt *et al.*, 2001). Ils sont également doués de propriétés hépatoprotectrices, diurétiques, antibactériennes, hypocholestérolémiantes et antithrombotiques (Bruneton, 1993; Nijveldt *et al.*, 2001). Puisque ces composés sont d'une part synthétisés par les plantes en réponse à une infection microbienne, on leur attribue aisément des propriétés antimicrobiennes. Leur activité serait probablement liée à leur capacité à se complexer avec les protéines. Leurs propriétés anti-microbienne et anticancéreuse ont aussi été montrées (Hernandez *et al.*, 2002; Raj Narayana *et al.*, 2001; Yenjai *et al.*, 2004). Le tableau 4 résume quelques classes de flavonoïdes.

Tableau 4: Structures de quelques flavonoïdes

Structures	Substitutions	Références
	<p>Flavonols Quercétine: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, Kaempferol: $R_1 = R_2 = \text{H}$, Myricétine: $R_1 = R_2 = \text{OH}$</p> <p>Structure d'un flavonol glycoside isolé d'<i>Indigofera tinctoria</i> L. $R = \text{rhamnose}$</p>	<p>Bruneton, 1993 Raj Narayana <i>et al.</i>, 2001</p>
	<p>Flavones Génines Apigénine: $R = \text{H}$ Lutéoline: $R = \text{OH}$ Hétérosides Apigénine-8-C-glucoside (Vitexine) Lutéoline-5-O-glucoside (Galutéoline)</p>	<p>Bruneton, 1993; Raj Narayana <i>et al.</i>, 2001 Wagner et Blatt, 1996.</p>
	<p>Flavanones et flavanols Naringénine: $R_1 = R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$ Eriodyctiol: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = R_3 = \text{OH}$ Taxifoline: $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$</p>	<p>Bruneton, 1993; Raj Narayana <i>et al.</i>, 2001 Wagner et Blatt, 1996</p>
	<p>Isoflavones Génisteine: $R_1 = R_2 = \text{OH}$ Daidzine: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{O-glu}$</p>	<p>Bruneton, 1987; Bruneton, 1993; Raj Narayana <i>et al.</i>, 2001 Wagner et Blatt, 1996</p>

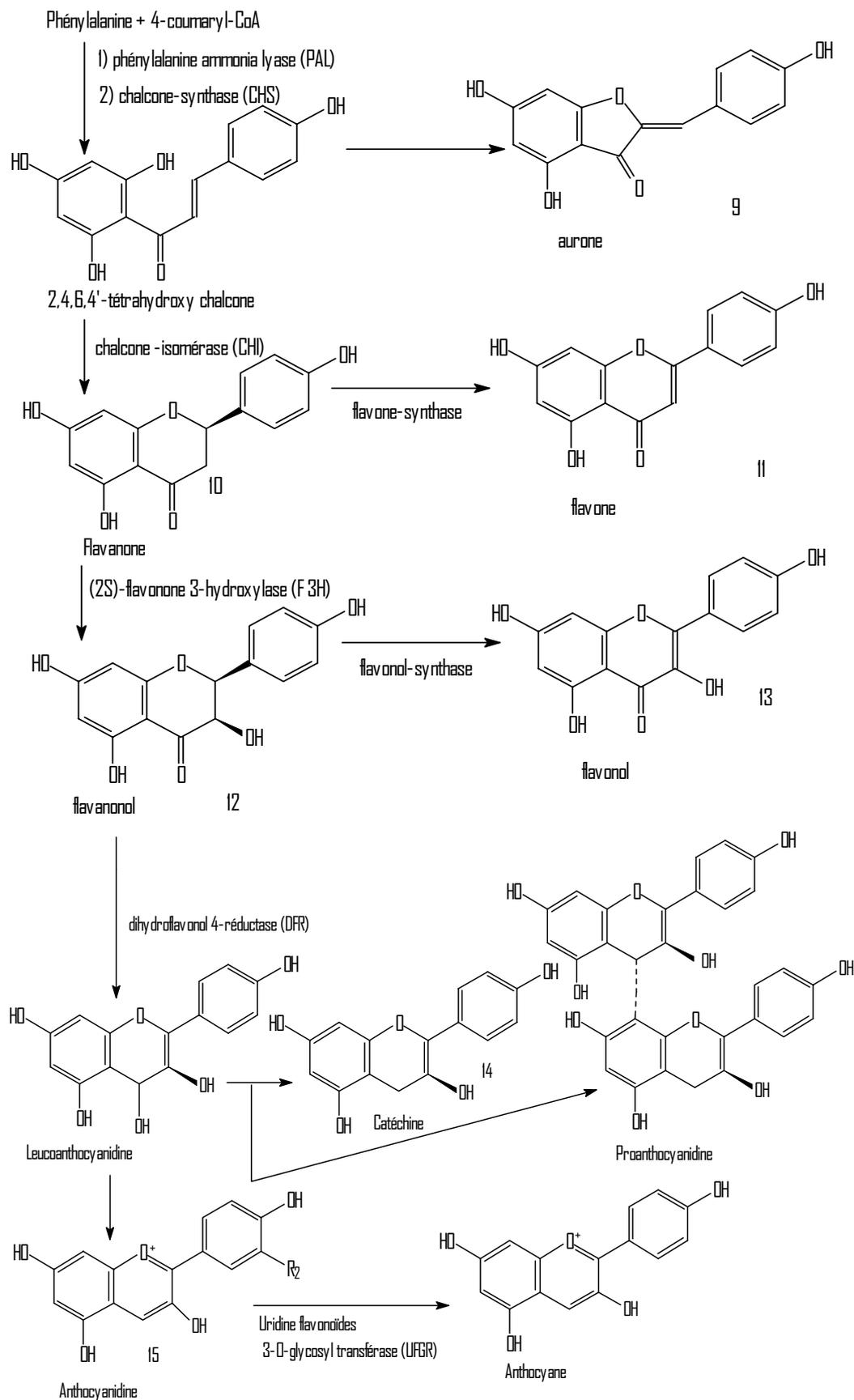


Figure 6: Réactions enzymatiques conduisant aux principales familles des flavonoïdes

II.3. Roténoïdes

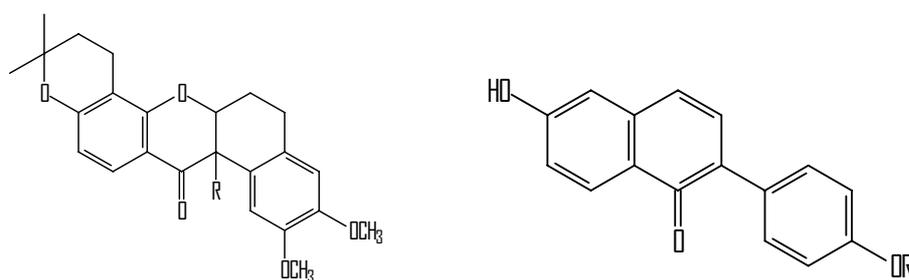
II.3.1. Classification et biosynthèse

Les roténoïdes dérivent des isoflavonoïdes, ils ont en commun un système à quatre cycles, dont le principal représentant est la roténone (Figure 7).

II.3.2. Activité biologique des roténoïdes

L'activité la plus reconnue des roténoïdes est celle insecticide (Bruneton, 1993; Kamal et Mangla, 1993). La roténone est surtout responsable de ces propriétés; elle est active aussi bien par contact que par ingestion, en inhibant la chaîne respiratoire mitochondriale dès les premières étapes, elle inhibe par exemple la NADH déshydrogénase (enzyme à Fe^{2+}) (Bruneton, 1993). Kamal et Mangla (1993) ont montré que les roténoïdes isolés d'*Indigofera tinctoria* ont une activité larvicide sur les larves des moustiques.

Les roténoïdes sont promis à être des agents anti-tumoraux. En effet, Konoshima et al. (1993) ont démontré que ces composés ont une bonne activité contre la tumeur de la peau. D'autres études sur ces mêmes composés, par exemple ceux extraits de *Clitoria fairchildiana* (Fabaceae) ont montré une faible toxicité et une activité anti-inflammatoire intéressante.



Degueline R = H

Tephrosine R = OH

Formononétine R = CH₃

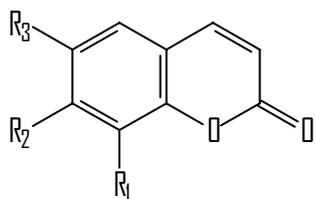
R = H, Daidzéine

Figure 7: Quelques structures des roténoïdes

II.4. Coumarines

II.4.1. Classification et biosynthèse

Ce sont des dérivés du phénol propane, qui tirent leur nom de "Coumarou", nom de la fève Tonka (*Dipteryx odorata* Willd), d'où fut isolée la première coumarine (Bruneton, 1993). La figure 8 illustre quelques structures des coumarines.



Coumarine: $R_1 = R_2 = R_3 = H$

Fraxétol: $R_1 = R_2 = OH, R_3 = OCH_3$

Ombelliférone: $R_1 = R_3 = H, R_2 = OH$

Esculétol: $R_1 = H, R_2 = R_3 = OH$

Herniarine: $R_1 = R_3 = H, R_2 = OCH_3$

Figure 8: Structures de quelques coumarines (Bruneton, 1993; Wagner et Bladt., 1996).

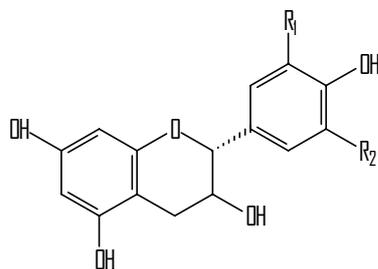
II.4.2. Activité biologique des coumarines

Les propriétés pharmacologiques des coumarines sont plus ou moins limitées, néanmoins on leur attribue des propriétés symptomatiques. Certaines furanocoumarines, tels bergéptène, psoralène, sont photosensibilisantes. Les pyranocoumarines (vismidine) luttent souvent contre les troubles de la sénescence cérébrale. On peut aussi leur attribuer les propriétés anti-inflammatoires (traitement symptomatique des manifestations articulaires) (Bruneton, 1993; Nacoulma, 1996).

II.5. Tanins

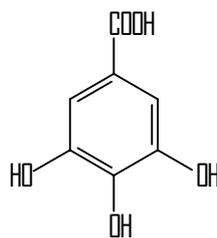
II.5.1. Classification et biosynthèse

Les tanins sont des composés phénoliques hydrosolubles. Il existe deux groupes principaux de tanins, les tanins non hydrolysables ou condensés (proanthocyanidols car conduisant aux anthocyanidols en milieu acide à chaud) et les tanins hydrolysables (Bruneton, 1993) (Figure 9).



Galocatéchol: $R_1 = R_2 = OH,$

Catéchol: $R_1 = OH, R_2 = H$



Acide gallique (Tanin hydrolysable)

Figure 9: Structures des tanins non hydrolysables et hydrolysables (Ciulei, 1982).

II.5.2. Propriétés biologiques des tanins

Les tanins sont antidiarrhéiques et protègent la peau et la muqueuse. Ils sont anti-septiques, vasoconstricteurs des petits vaisseaux superficiels et favorisent la régénération des tissus (en cas des blessures superficielles ou brûlures). Ils précipitent les métaux lourds, la gélatine, les alcaloïdes et d'autres protéines. Ils inhibent par ailleurs la peroxydation des lipides, de la réplication des virus en inhibant la transcriptase inverse (Bruneton, 1993; Fenglin *et al.*, 2004; Nacoulma, 1996).

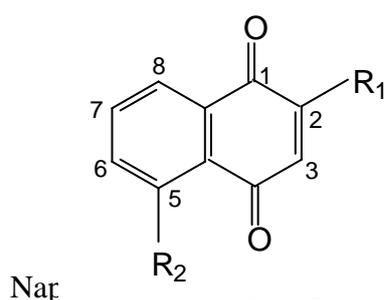
II.6. Quinones

II.6.1. Classification et biosynthèse

Les quinones sont des composés oxygénés correspondant à l'oxydation des dérivés aromatiques substitués avec deux fonctions cétones, phénoliques ou d'autres métabolites secondaires comme les terpènes, les flavonoïdes (Bruneton, 1993; Nacoulma, 1996).

On distingue:

- les benzoquinones qui sont des pigments rouges trouvés dans les Meliaceae et les Capparidaceae.
- les naphtoquinones qui sont des pigments jaunes ou orangés retrouvés chez les Lythraceae, les Ebenaceae, les Verbenaceae et les Bignoniaceae,
- les anthraquinones, pigments rouge-orangés retrouvés couramment chez les Fabaceae, les Rubiaceae et les Liliaceae (Figure 10).

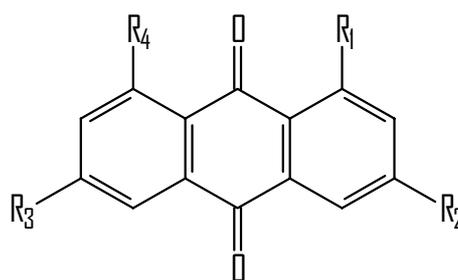


Juglone: $R_1 = H, R_2 = OH,$

Lawson: $R_1 = R_2 = OH,$

Plumbagone: $R_1 = CH_3, R_2 = OH$

Naphtoquinones



Emodol: $R_1 = R_3 = R_4 = OH, R_2 = CH_3;$

Rheine: $R_1 = R_4 = OH, R_2 = COOH; R_3 = H$

Anthraquinones

Figure 10 : Structures chimiques des anthracénosides (Bruneton, 1993).

II.6.2. Activité biologique des quinones

Les anthraquinones sont responsables du brunissement de certains fruits et organes de plantes. Ce sont aussi des intermédiaires dans la synthèse de la mélanine chez l'homme (Schmidt, 1988). Ils peuvent inhiber l'activité $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ / ATPasique des entérocytes par blocage de la résorption de l'eau, du sodium et du chlorure en augmentant la sécrétion du potassium au niveau de la muqueuse intestinale (Bruneton, 1993; Nacoulma, 1996).

Les quinones sont caractérisées par leur très grande réactivité. Elles se complexent de façon irréversible avec les acides aminés nucléophiles rendant ainsi les protéines inactives. Elles sont à cet effet, des potentiels antimicrobiens et les principales cibles seraient les adhésines et les protéines des surfaces cellulaires des microorganismes.

Les quinones sont aussi laxatives, anti-fongiques, anti-protozoaires, anti-virales, anti-spasmodiques. D'autres quinones ont révélé des propriétés purgatives, c'est le cas des dérivés anthracéniques (Bruneton, 1993; Nacoulma, 1996).

Enfin les naphtoquinones des Lythraceae (*Lawsonia inermis* L.), henné sont utiles pour leur pouvoir colorant des phanères (peau, cheveux, ongles).

II.7. Anthocyanosides

II.7.1. Classification et biosynthèse

Les anthocyanosides sont des composés phénoliques qui se caractérisent par une génine comportant un noyau flavylum ou cation 2-phénylbenzopyrylium.

Ce sont des pigments hydrosolubles responsables de la coloration rouge, rose, pourpre, bleue ou violette de la plupart des feuilles ou des fleurs des plantes.

Les anthocyanosides sont instables en milieu aqueux donnant lieu à des variations de couleur en fonction du pH. Ils sont sensibles à la chaleur, à la lumière, aux métaux lourds et insolubles dans les lipides. Les anthocyanidols, génines des anthocyanosides, dérivent du cation 2-phényl-benzopyrylium ou cation flavylum (Figure 11).

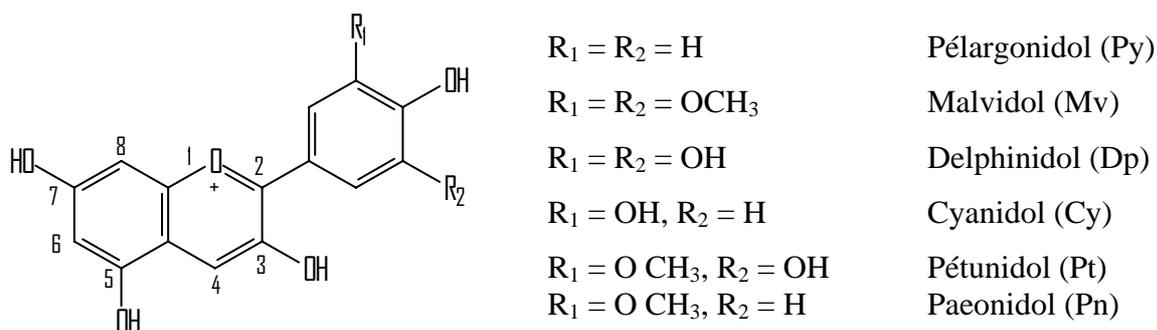


Figure 11: Structures des principaux anthocyanidols (Bruneton, 1993 ; Wagner et Bladt, 1996).

II.7.2. Propriétés biologiques des anthocyanosides

Les anthocyanosides agissent sur les capillaires en diminuant leur perméabilité et en augmentant leur résistance. Ils ont par ailleurs une action anti-oedémateuse et augmentent la régénération du pourpre rétinien (Bruneton, 1993; Nacoulma, 1996).

Les anthocyanes sont des colorants naturels hydrosolubles et solubles dans l'alcool, utilisés dans les industries (cosmétique, textile et alimentaire).

En milieu acide fort ($pH < 3$), les anthocyanes sont sous forme cationique et donne une coloration rouge stable.

En milieu acide faible, $4 < pH < 6$, le cation donne des quinonoïdescolorées en bleu.

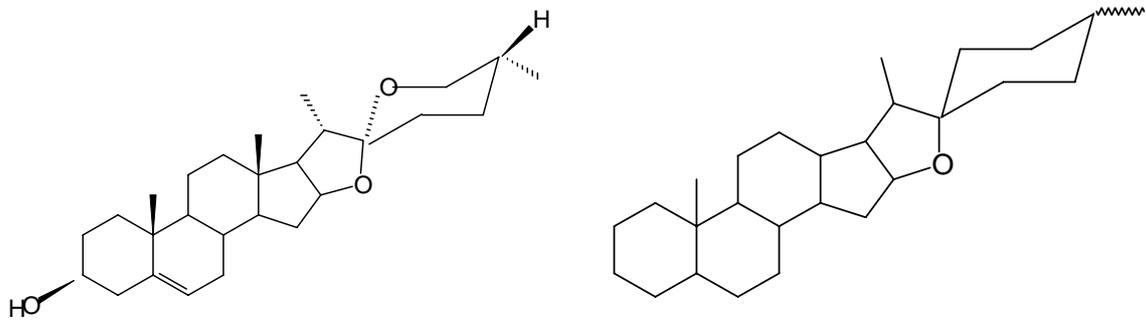
III. COMPOSES TERPENIQUES

III.1. Classification et biosynthèse

Les composés terpéniques sont issus de la condensation «tête à queue» d'unités isopréniques. Selon la structure du squelette on distingue des monoterpènes, des triterpènes et/ou stéroïdes (saponosides, hétérosides cardiotoniques) et des caroténoïdes.

III.2. Saponines

Ce sont des hétérosides très répandus dans le règne végétal (saponaires), caractérisés par leur propriété tensio-active. Ils sont généralement à génine triterpénique (triterpénoïdes) ou stéroïdique (stéroïdes) (Figure 12).



Diosgénine (sapogénine)

Spirostane (saponoside stéroïdique)

Figure 12 : Structures chimiques de quelques saponosides

Les stéroïdes présentent une similarité avec des hormones naturelles de l'homme ce qui explique leur activité hormonale (Baykal *et al.*, 1998; Bruneton, 1993).

Les saponosides sont hémolytiques et toxiques (surtout à l'égard des animaux à sang froid). Ils sont aussi fongicides, mollusquicides, anti-inflammatoires, anti-oedémateuses, analgésiques, spermicides, anti-tussives et expectorants mais peuvent également faciliter l'absorption des éléments nutritifs (Bruneton, 1993; Nacoulma, 1996).

III.3. Caroténoïdes

Ils sont formés par l'enchaînement de huit (8) unités isopréniques caractérisés par la présence d'au moins dix (10) doubles liaisons conjuguées (Figure 13). Dans ce groupe on peut distinguer des carotènes (molécules hydrocarbures) et les xanthophylles (molécules à fonctions hydroxyles). Ils sont utilisés pour leur photosensibilité médicamenteuse, comme anti-urticaire solaire, en pharmacie en tant que colorant naturel. Ils ont une action préventive à l'égard des affections dégénératives (Bruneton, 1993; Nacoulma, 1996).

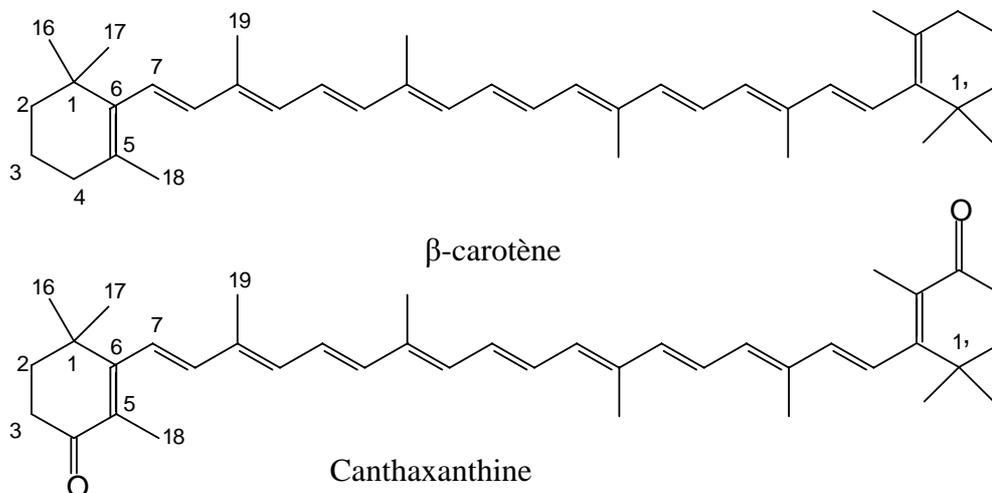
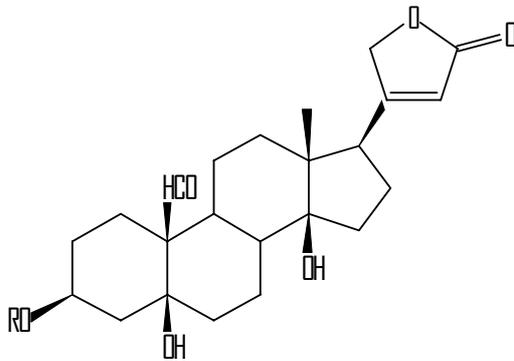


Figure 13: Structures chimiques de quelques caroténoïdes (Wagner et Bladt, 1996).

III.4. Hétérosides cardiotoniques

Ce sont des hétérosides à génines stéroïdiques de type cardénolide dont la partie osidique est généralement oligosidique (β -D-digitoxose ou α -L-Rhamnose) (Figure 14).



Convallaside: R = β -D-glc-(1 \rightarrow 4)- α -L-rha-(1 \rightarrow)

Convallatoxine: R = α -L-rha-(1 \rightarrow)

Figure 14: Structures des hétérosides cardiotoniques (Bruneton, 1993; Wagner et Blatt, 1996).

Les hétérosides cardiotoniques agissent sur le coeur en modifiant la force et la vitesse des contractions du muscle cardiaque et sur la fréquence et la conductibilité du myocarde (Bruneton, 1993; Nacoulma, 1996).

CHAPITRE III: GENERALITES SUR QUELQUES ACTIVITES BIOLOGIQUES

I. ACTIVITE ANTIOXYDANTE

I.1. Définition

Dans les systèmes biologiques, un antioxydant est une substance qui, en faible concentration comparativement à la quantité des substances oxydables telles les espèces oxygénées réactives (ROS), retarde significativement ou prévient l'oxydation des substrats comme les lipides, les protéines, les DNA et les carbohydrates. Son rôle est d'intercepter les radicaux libres avant qu'ils ne réagissent avec le substrat (Tiwari, 2004).

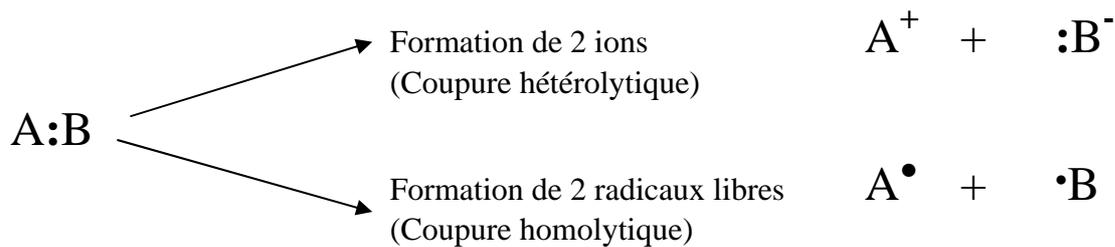
Les antioxydants biologiques sont repartis en deux classes selon Ziyatdinova *et al.* (2005):

- les composés à faible poids moléculaire (tocophérols, acide ascorbique, β -carotène, glutathion, acide urique, bilirubine, ...).
- les protéines (albumine, transferrine, le superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase, caeruloplasmine, ferritine).

Les antioxydants incluent le système de réparation, les enzymes antioxydants, les facteurs affectant l'homéostasie vasculaire, le signal de la transduction et l'expression des gènes (Tiwari, 2004). Les antioxydants empêchent globalement l'apparition du stress oxydatif.

I.2. Radicaux libres et formes réactives dérivées de l'oxygène

Un radical libre est une espèce chimique (un atome ou une molécule) possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe lui procurant une très grande réactivité. Comme l'indique la réaction ci-dessous, il peut résulter d'un échange mono-électronique ou d'une rupture homolytique de liaisons covalentes. Le radical libre est beaucoup plus réactif que l'atome ou la molécule dont il est issu. Il est soit oxydant ou réducteur. Il a par conséquent une durée de vie très courte.



Réaction 1 : Réaction simplifiée montrant les coupures donnant lieu aux EOR

Les agressions extérieures comme les UV peuvent donner naissance à des radicaux libres qui ont la capacité d'induire des réactions en chaîne dans la plupart des tissus vivants. Mais l'essentiel des radicaux libres est issu du métabolisme de l'oxygène. L'oxygène, indispensable à la vie, n'est donc pas absolument inoffensif. Ils contribuent ainsi au vieillissement cellulaire (Govindarajan *et al.*, 2005) et aux cancers. Selon les travaux de Govindarajan *et al.* (2005) et ceux de Heim et collaborateurs (2002), ils sont capables d'induire les athéroscléroses, les attaques cellulaires, le diabète, les maladies neurodégénératives et les maladies auto-immunes.

I.3. Origine des espèces oxygénées réactives (ROS)

Les espèces oxygénées réactives (EOR) sont définies comme étant toute espèce très réactive compte tenu de l'existence d'au moins un électron libre sur son orbitale électronique externe (Govindarajan *et al.*, 2005).

Ces espèces regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène comme RS^\bullet (thiyl); $O_2^{\bullet-}$ (anion superoxyde); RO^\bullet (radical alkoyle); ROO^\bullet (radical peroxyde avec R = substrat organique); mais également d'autres composés non radicalaires très réactifs (chimiquement instables) comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'hydroperoxyde (ROOH) ou l'oxygène singulet (1O_2).

Ces espèces chimiques ont une réactivité et une toxicité très variables suivant par exemple l'ordre: $OH^\bullet > RO^\bullet > HOO^\bullet > ROO^\bullet > NO^\bullet$

La formation des EOR requiert la présence de métaux de transition comme le fer ou le cuivre qui agissent comme catalyseurs incontournables dans toute la chimie des radicaux libres. Par réduction monoélectronique, l'oxygène donnera naissance à des espèces oxygénées activées (EOR) parmi lesquelles figurent des radicaux libres comme l'anion superoxyde ou le radical hydroxyle (OH).

Notre organisme produit donc en permanence ces EOR. Il existe trois voies de génération endogène des EOR.

- la chaîne de transport des électrons située au niveau des mitochondries.
- la flambée respiratoire des cellules phagocytaires (indispensable à la défense immunitaire)
- l'activité des enzymes.

I.4. Stress oxydatif

Le stress oxydatif se définit comme un déséquilibre entre les anti-oxydants et les oxydants en faveur des derniers. Les origines du stress oxydant sont multiples et résultent d'une formation des espèces oxygénées réactives (EOR).

Si les EOR sont produites en quantité très importante, elles auront des effets néfastes en induisant un phénomène d'apoptose dans des cellules saines ou en activant divers gènes codant pour l'expression de cytokines pro-inflammatoires ou des protéines d'adhésion. Par ailleurs, les EOR, de par leur nature instable, sont particulièrement réactionnelles et seront capables de provoquer des dégâts cellulaires importants. En effet, elles peuvent :

- inactiver des protéines et des enzymes,
- oxyder les sucres (glucose),
- provoquer des cassures et des mutations au sein de l'ADN,
- induire des processus de peroxydation lipidique au sein des acides gras poly-insaturés des lipoprotéines ou de la membrane cellulaire (Heim *et al.*, 2002).

Les EOR peuvent donc potentiellement réagir avec chaque composant cellulaire et provoquer son oxydation. Les cibles préférentielles des EOR sont les lipides, les protéines et les bases constitutives du matériel génétique. Un déséquilibre entre oligo-éléments peut également favoriser l'apparition d'un stress oxydatif (excès du cuivre par rapport au zinc par exemple).

I.5. Mécanisme de défense contre les radicaux libres

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 (Govindarajan *et al.*, 2005; Pincemail *et al.*, 2004).

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) (Se) et certaines catalases (EC 1.11.1.6). Dans les défenses secondaires interviennent la glutathion transférase et la glutathion réductase qui constituent une source endogène.

D'autres protéines comme la ferritine, la transferrine, la céruléoplasmine et l'albumine interviennent dans l'activité antioxydante (Pincemail *et al.*, 2004).

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 (Heim *et al.*, 2002; 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 intenses.

I.6. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées dans les différents laboratoires pour la détermination de l'activité antioxydante. Les principales méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant d'un composé sont regroupées selon leur principe :

- Evaluation de produits résultant de l'oxydation

Comme exemples nous avons l'évaluation des peroxydes et le dosage d'hydroperoxydes.

- Evaluation de l'aptitude du composé à piéger des radicaux libres:

La capacité du produit à piéger les radicaux libres implique la création de radicaux.

On peut citer les méthodes DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (Koleva *et al.*, 2002), ABTS (2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonate)) (Villano *et al.*, 2004).

Des méthodes électrochimiques ont été développées pour la mesure de l'activité antioxydante des fluides biologiques (Ziyatdenova *et al.*, 2005). Comme exemples nous avons la méthode voltamétrique cyclique qui est utilisée pour quantifier les antioxydants de faible poids moléculaire dans le plasma et la mesure de la capacité antioxydante totale du plasma, la

détermination de l'activité de la catalase. Elle est basée sur la mesure du complexe stable du radical peroxyde avec le molybdène d'ammonium (Ziyatdenova *et al.*, 2005).

Il existe d'autres méthodes qui permettent par exemple d'évaluer la capacité réductrice des composés c'es le cas de la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power) (Thaipong *et al.*, 2006).

III. ACTIVITES ENZYMATIQUES

II.1. Définition de l'homéostasie et de l'enzyme

L'homéostasie est un processus par lequel un organisme maintient constantes les conditions internes nécessaires à la vie. Cet équilibre fait intervenir le système de surveillance (vérification), le système nerveux central, le système neuroendocrinien, les mécanismes d'ajustement et les valeurs normales physiologiques. L'homéostasie est nécessaire parce que les organismes sont le siège de nombreuses réactions chimiques (métabolisme) qui produisent des déchets toxiques et épuisent les réserves de réactifs indispensables.

Les enzymes sont des biocatalyseurs protéiques qui activent chacune, une réaction biochimique spécifique contribuant ainsi à l'homéostasie dans le système biologique (Granner *et al.*, 1989).

II.2. Rôle des enzymes dans l'organisme vivant

Les enzymes jouent un rôle très important dans le maintien de l'équilibre de l'organisme. Leur importance biomédicale est indiscutable car elles régulent le métabolisme et l'homéostasie, contrôlent les vitesses de synthèses et, interviennent dans le processus de défense de l'organisme. En effet, l'organisme dispose de systèmes de défense, contre les radicaux libres, constitués d'un dispositif endogène de nature enzymatique représenté par les superoxydes dismutases (SOD), les catalases à cofacteur fer et les glutathions peroxydases à cofacteur sélénium (GPx). De nombreux autres systèmes enzymatiques existent comme les glutathions transférases; les thioredoxines réductases ou la thyroïde peroxydase.

Cependant, si certaines enzymes interviennent dans la défense de l'organisme ou dans d'autres activités contribuant à l'homéostasie, plusieurs autres enzymes sont responsables de plusieurs pathologies (Enzymo-pathologies) telles que les inflammations, la goutte et la

maladie d'Alzheimer. C'est le cas de la xanthine oxydase (XO), des lipoxygénases (LOX), des cyclo-oxygénases (COX), de l'acétylcholinestérase (AChE).

Ces enzymes peuvent être des marqueurs dans les traitements des maladies dans lesquelles elles sont impliquées. On peut donc à défaut de tester les drogues sur modèle animal ("*in vivo*"), évaluer leurs activités "*in vitro*", en ciblant les enzymes (sur modèle enzymatique) connaissant leur responsabilité dans l'étiologie des différentes maladies.

C'est ainsi qu'on peut inhiber la LOX et la COX quand pour traiter ou soulager les inflammations (Editorial, 2005; Li *et al.*, 2003; Poubelle *et al.*, 2000), l'AChE pour traiter la maladie d'Alzheimer ou lutter contre la résistance des insectes aux insecticides (Lopez *et al.*, 2002) et la XO pour traiter ou soulager la goutte (Kong *et al.*, 2000).

II.3. Quelques inhibiteurs enzymatiques connus

La plupart des inhibiteurs des enzymes sont synthétiques et souvent non spécifiques. Toutes ces caractéristiques font d'eux des composés souvent à effets secondaires. Le tableau 5 donne quelques exemples d'inhibiteurs enzymatiques utilisés dans le traitement de certaines maladies.

Tableau 5: Quelques inhibiteurs d'enzymes et maladies ciblées.

Inhibiteurs	Maladie traitée	Enzyme ciblée	Limites/Effets secondaires
Allopurinol	goutte	Xanthine oxydase	Diarrhées, crampes d'estomac, nausées, éruptions cutanées, urticaire, démangeaisons
Naproxène, Ibuprofène et Piroxican	inflammations	Lipoxygénase (LOX), Cyclo-oxygénases (COX)	Douleur gastro-intestinale, ulcères, insuffisance rénale, hypertension

II.4. Quelques enzymes impliquées dans les maladies métaboliques

II.4.1. Les lipoxygénases

Les lipoxygénases ou dioxygénases sont des enzymes qui insèrent l'oxygène aux positions 5, 12 et 15 de l'acide arachidonique, donnant ainsi naissance à des hydroperoxydes d'où trois LOX différents. Elles sont retrouvées dans les plaquettes et les leucocytes.

Elles catalysent la peroxydation "*in vivo*" jouant ainsi un important rôle biologique. Les leucotriènes, produits issus de la transformation de l'acide arachidonique par la voie de la lipoxygénase, sont des importants régulateurs dans plusieurs maladies impliquant des réactions d'hypersensibilités inflammatoires ou immédiates tel l'asthme. Les leucotriènes surtout les LTB₄, de même que leur récepteur et les enzymes nécessaires à leur biosynthèse, représentent des cibles pharmacologiques prometteuses (Ling *et al.*, 2003).

II.4.2. Les cycloxygénases

Les protéines COX sont présentes sous deux formes: COX -1 et COX -2.

La COX -1 intervient dans de nombreux processus physiologiques, comme la formation de prostaglandines qui protège les tissus internes de l'estomac et la fonction rénale. elle est aussi responsable de la production de thromboxane A₂ qui favorise une coagulation sanguine anormale dans les artères (thrombose) qui a pour résultats des infarctus ou des accidents cérébro-vasculaires. (Li *et al.*, 2003).

La COX-2 est directement impliquée dans la propagation des cellules cancéreuses et l'inflammation chronique. La cyclooxygénase-2 (COX-2) est une enzyme clé qui aide l'organisme à produire les prostaglandines et cytokines. La Cox-2 est indispensable car sans elle nous ne serions pas capables de combattre les infections ni de guérir des blessures. Mais lorsque l'organisme produit trop de COX-2, cela a pour résultats une inflammation et des douleurs chroniques. La COX-2 est directement impliquée dans la propagation des cellules cancéreuses et l'inflammation chronique. L'utilisation d'inhibiteurs de la COX-2 permet de diminuer la production de PGE-2 et, de réduire l'inflammation.

Les prostaglandines sont produites par tous les tissus et les cellules inflammatoires en réponse à un stress ou aux stimuli inflammatoires. Physiologiquement les prostaglandines agissent surtout comme modulateurs de l'activité de l'adénylcyclase en contrôlant l'agrégation plaquettaire et en inhibant l'effet de l'hormone antidiurétique dans les reins.

II.4.3. La xanthine oxydase

La xanthine oxydase a 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 excrétion 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 utilisée dans le traitement de la goutte; cependant il présente des effets secondaires

II.4.4. 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 le phénomène neurotransmetteur aide les insectes à résister aux insecticides (Yi *et al.*, 2006).

III. ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE

III.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.

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.

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.2. Réactions inflammatoires

La réaction inflammatoire est une réponse normale de l'organisme à des agressions d'origine immunitaire ou non. C'est aussi une réaction du tissu conjonctif et des vaisseaux (Touitou, 1997). Le déclenchement et le déroulement de l'inflammation sont gouvernés par des réflexes nerveux et surtout par des médiateurs chimiques endogènes (histamine, sérotonine). Des études récentes ont mis en lumière une interaction entre les enzymes pro inflammatoires lipoxygénases (LOX), et des maladies comme des cancers, des maladies de cœur ou l'asthme. Les enzymes cycloxygénases sont également lourdement impliquées dans un certain nombre de maladies.

III.2.1. Les différentes réactions inflammatoires

Il existe deux types d'inflammations:

L'inflammation primaire, de cause immédiate et localisée, et la secondaire est celle qui se développe à distance sous l'influence d'un agent pathogène

III.2.2. Phases de l'inflammation

La réaction inflammatoire comporte une suite coordonnée d'événements:

- la phase précoce ou phase vasculaire, caractérisée par une vasodilatation artériolaire qui conduit à un érythème, une chaleur locale, une hyperesthésie, et un oedème.

- la phase secondaire ou phase cellulaire, caractérisée par la migration extra vasculaire (diapédèse) et la libération de cytokine qui sont à l'origine de l'activation cellulaire. Il se forme alors des tissus de granulation (granulome).

- la phase terminale ou phase de régénérescence qui correspond à la sclérose du tissu par élimination des débris cellulaires et tissulaires par un mécanisme de phagocytose et de pinocytose.

III.3. Les anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont des médicaments capables d'atténuer ou de supprimer le processus inflammatoire.

On distingue deux grands groupes d'anti-inflammatoires.

- Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (Editorial, 2005).

C'est une classe pharmaceutique qui possède des propriétés antalgiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires. On y trouve l'aspirine, l'ibuprofène, l'indométacine.

Ils constituent le traitement le plus prescrit contre la douleur et l'inflammation dues à l'arthrite dans le monde. Toutefois, les AINS peuvent causer de sérieux effets secondaires tels que des ulcères et des saignements gastro-intestinaux. Dans certains cas, leur utilisation cause la mort. Il a été démontré que les AINS exercent leurs actions anti-inflammatoires en partie par l'inhibition de la COX.

- Les anti-inflammatoires stéroïdiens ou gluco-corticoïdes (AIS).

Les gluco-corticoïdes constituent une classe thérapeutique qui a des propriétés anti-inflammatoires, anti-allergiques et immunosuppressives.

Ils sont représentés par la cortisone et l'hydrocortisone qui sont des produits naturels sécrétés par la corticosurrénale et les produits synthétiques.

En plus des anti-inflammatoires connus, l'utilisation d'inhibiteurs naturels de ces enzymes, comme des extraits de plantes, peut aider à réduire le risque de développement de ces pathologies.

III.4. Mécanisme d'action des anti-inflammatoires

Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les AINS ont une similitude dans leurs effets thérapeutiques liés à l'inhibition de la synthèse des prostaglandines en bloquant la synthèse de la cyclo-oxygénase (COX) qui catalyse la formation des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Ils entraînent une diminution de la migration cellulaire et des actions des tissus conjonctifs (glycoprotéine, collagène).

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.

III.5. Méthode d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire

III.5.1. Inflammation locale de l'oreille

Ce principe consiste à provoquer une inflammation au niveau de l'oreille du rat, par application locale d'huile de croton. Cette inflammation peut être réduite par application locale de substance anti-inflammatoire (Colot, 1972).

III.5.2. Arthrite à l'adjuvant de Freund

Elle consiste à réduire l'arthrite chronique provoquée au niveau de la patte du rat, par injection de *Mycobacterium butyricum* par certaines substances anti-inflammatoires.

III.5.3. Oedème de la patte à la carrhagénine

Cette méthode consiste à vérifier l'action inhibitrice des médicaments anti-inflammatoires préventifs sur l'oedème provoqué par injection de carrhagénine sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure d'une souris (Ozbek *et al.*, 2005).

III.5.4. Méthodes enzymatiques

Ce sont des méthodes généralement "*In vitro*", elles sont basées sur l'inhibition des certaines enzymes liées à l'inflammation. C'est l'exemple de la 12-lipoxygénase (12-LOX), la cyclooxygénase-1 (COX-1) et la cyclooxygénase-2 (COX-2) (Wangensteen *et al.*, 2006; Ziakas *et al.*, 2006).

IV. ACTIVITE ANTI-BACTERIENNE

IV.1. Bactéries pathogènes

Ce sont des bactéries qui sont responsables de maladies. Elles sont classées en bactéries Gram-négatifs, Gram-positifs et bactéries alcool-résistantes (BAAR).

Le tableau 6 donne la liste de quelques bactéries et les maladies dont elles sont responsables.

Tableau 6: Quelques bactéries et maladies

Groupe de bactéries	Maladies causées
Bactéries Gram-positifs	
<i>Bacillus cereus</i>	toxi-infections; infections oculaires et respiratoires
<i>Staphylococcus aureus</i>	Furoncles, pneumonie
<i>Streptococcus hémolitique</i>	Angine, infection cutanées, rhumatisme
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pneumonie communautaire
Bactérie Gram négatifs	
<i>Vibrio cholerae</i>	Choléra, gastroentr
<i>Escherichia coli</i>	Infections urinaires, diarrhées infectueuses
<i>Haemophilus influenzae type b</i>	Meningite, pneumonie
<i>Neisserias aerugionosa</i>	Blennorragie
<i>Salmonella typhimurium</i>	Fièvre typhoïde
<i>Pseudomonas aerugionosa</i>	Infections urinaires
<i>Proteus mirabilis</i>	Dirrhées infectueuses (gastro-entérites)
Bactéries acido-alcool-résistantes	
<i>Mycobacterium leprae</i>	Lèpre
<i>Mycobacterium arium</i>	pneumonie
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	tuberculose

IV.2. Mode d'action des composés sur les bactéries

Il existe plusieurs types d'agents anti-microbiens. 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.

- 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.

- 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 peptidyltransferases dans la bactérie.

- 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.

- 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)

IV.3. Résistances bactériennes

Le spectre d'activité d'un antibiotique (ATB) ou d'un extrait de plante recense les espèces bactériennes sensibles à cet ATB, mais lorsqu'une expérience est dite "non sensible", il n'entre pas dans ce spectre et par conséquent possède une résistance dite naturelle liée aux

caractères génétiques propres à l'espèce. Le mécanisme est variable en fonction de l'espèce bactérienne. L'utilisation des ATB depuis de nombreuses années a contribué à sélectionner des souches résistantes au sein d'espèce normalement sensibles: c'est la résistance acquise. Au laboratoire, on définit une bactérie résistante à un ATB lorsque cette bactérie supporte des concentrations inhibitrices de cet ATB (supérieures aux concentrations que l'on peut obtenir dans l'organisme) sans être affectée.

La résistance est toujours exprimée par rapport à une valeur de référence qui est la CMI (concentration minimale inhibitrice):

- Résistance naturelle.

La résistance naturelle est programmée sur le génome bactérien. Elle est fixée et constante à l'intérieur de taxon; elle est transmissible à la descendance naturelle et constitue un critère d'identification. Par ailleurs elle détermine les "phénotypes sauvages".

- La résistance acquise

Une souche bactérienne devient résistante lorsqu'elle peut croître en présence d'une concentration d'ATB plus élevée que la concentration qui inhibe les souches normalement sensibles.

- Mécanisme de la résistance acquise

Les mécanismes de résistance sont nombreux et ont un support génétique, chromosomique ou plasmidique. Ce sont respectivement :

- l'absence de pénétration de l'ATB ou de l'extrait par diminution ou suppression de la perméabilité pariétale ou membranaire.
- l'altération de la cible moléculaire par modification ou dégradation enzymatique de la cible.
- la sortie excessive de l'ATB ou de l'extrait hors de la bactérie ce qui entraîne une diminution de la concentration.
- l'inactivation enzymatique de l'ATB (l'hydrolyse par les pénicillinases comme les β -lactamases que produisent certaines bactéries ou par modification même de la structure chimique de l'ATB (cas des acétylases et les amilosides) (Li *et al.*, 2007)

IV.4. Support génétique de la résistance

La résistance peut être acquise par mutation chromosomique ou par acquisition d'information de résistance par transfert de gènes (plasmides) d'une bactérie résistante à une bactérie sensible.

Il faut noter qu'une large utilisation de l'antibiothérapie favorise considérablement la résistance des bactéries. C'est essentiellement l'antibiothérapie qui sélectionne des souches résistantes (les contrefaçons de médicaments, surtout dans les services de réanimation, de soins intensifs ou d'urologie).

DEUXIEME PARTIE: MATERIEL ET METHODES

A. / MATERIEL

I. CADRE DE L'ETUDE

Nos travaux sur le criblage phytochimique des extraits de plantes, l'isolement par chromatographie analytique des composés et la mise en évidence des activités biologiques ont été réalisés au LABIOCA (Laboratoire de Biochimie et de Chimie Appliquées), UFR/SVT,UO.

II. MATERIELS

II.1. Appareillages

Les appareils suivants ont été utilisés pour les différentes activités: Pompe à vide Welch vacuum (Thomas Industries, USA), Balance, Ph-mètre (Crison, Spain), Ultra-sons, Rotavapor Buchi 124, Evaporateur rotatif (Rotavapor Buchii, Switzerland), Lyophilisateur Cryodos 50 (Telstar Cryodos, Spain), Lampe UV (254 nm, 365 nm), Microscope inversé (Leitz Wetzlar, Germany), Sart Hotte à flux laminaire vertical (FluFrance, France), Autoclave de stérilisation (Mettler, Germany), Hotte à flux laminaire horizontale Cytair (FluFrance, France), Centrifugeuse de paillasse (Jouan, USA), Spectrophotomètre Cecil CE (Cecil Instruments, England), Agitateur magnétique, Agitateur mécanique.

II.2. Matériel de laboratoire

Plaque CCM (Merck, USA), Appareil photo numérique Système de photo documentation, Extracteur de type Soxhlet, Colonne chromatographique en verre, Gel de silice ICN 60-103 A, Plaques pour CCM Kiesel gel 60F254. Ampoule à décanter, Filtre millipore pour seringue 0.22 µm, Filtre millipore pour seringue 0.45 µm, Micropipettes 1 ml, 100 µL, 10 µL, 1 µL. Embouts cotonnés pour micropipette, Pipettes cotonnées stériles, Etuve, Burette.

II.3. Solvants et Réactifs

Solvants

Eau, éthanol,
Méthanol, acétate d'éthyle,
Chloroforme, éther de pétrole,
Dichlorométhane, Butanol, Acétone
Ether éthylique, Ethanol, n-Hexane.

Réactifs

Acide chlorhydrique concentré HCl,
Acide formique, Acide acétique, Acide
acétique glacial, Anhydride acétique, Acide
gallique, acide caféique, acide
phosphotungstique, acide trichloroacétique,
H₂SO₄, Acétylcholinestérase, acide
linoléique, Ammoniaque (NH₄OH), Iode
bisublimé, Bleu de méthyle, Carbonate de
sodium, Diméthylsulfoxyde (DMSO), 2,2
diphényl-1-picryl hydrazyl (DPPH),
Potassium hexacyanoferrate [K₃Fe(CN)₆],
persulfate potassium, Lipoxygenase type I-
B, ABTS (2,2'-azinobis(3-
ethylbenzothiazoline-6-sulphonate),
Inhibiteurs de référence: quercétine, Acide
ascorbique, allopurinol
Tournure de magnésium,
Réactif de Mayer, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄,
Phénolphtaléine, lugol, Carmino-vert,
Eau de Javel, Formaldéhyde
Tampon Borate, Tampon phosphate
Trichlorure d'aluminium (AlCl₃),
Trichlorure d'antimoine (SbCl₃)
Trichlorure de fer (FeCl₃),

Réactifs de Folin Ciocalteu et Dragendorff

Diphénylboryloxyéthylamine

Polyéthylène glycol 4000.

II.4. Matériel biologique

II.4. 1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de tiges feuillées de *Indigofera colutea* (Burm.) Murril., *I. macrocalyx* Guill. et Perr., *I. nigritana* Hook f., *I. pulchra* Willd. and *I. tinctoria* L., Ces plantes ont été récoltées à Taab-Tenga province de Kadiogo (à l'Est de Ouagadougou) en Août et Septembre 2005. Les échantillons ont été reparties comme suit :

- une partie a été utilisée pour l'étude histochimique
- la deuxième partie a été séchée à la température du laboratoire (25-30 °C) et pulvérisée pour les différentes extractions.

En outre des spécimens d'herbier 01, 02, 03, 04 et 05 (respectivement pour *I. colutea*, *I. macrocalyx*, *I. nigritana*, *I. pulchra* et *I. tinctoria* ont été déposés à l'herbier OUA du laboratoire de Biologie et d'Ecologie végétales UFR/SVT de l'Université de Ouagadougou sous le nom de Sahabi BAKASSO.

II.4. 2. Souches microbiennes

Cinq (5) souches bactériennes de référence ont été utilisées pour notre étude, ce sont des souches recommandées par le "National Committee for Clinical Laboratory Standards" il s'agit de: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 13061, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.. Les bactéries ont été cultivées soit sur gélose Mueller-Hinton, soit en bouillon Mueller-Hinton, à 37 ° C.

B. / METHODES

CHAPITRE I: ETUDE PHYTHOCHIMIQUE

I. ETUDES HISTOCHIMIQUES

Les tiges feuillées fraîchement récoltées de *I. colutea*, *I. macrocalyx*, *I. nigritana*, *I. pulchra*, *I. tinctoria* ont été utilisées pour la détection des tissus de sécrétion et les métabolites secondaires à savoir les flavonoïdes et les tanins, mais aussi les alcaloïdes. Les coupes ont été réalisées à l'aide des lames rasoirs.

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.

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.

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.

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 du tanin si on observe un précipité noirâtre dans les vacuoles des cellules.

Détection des flavonoïdes

Les coupes ont été montées 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. EXTRACTIONS ET FRACTIONNEMENTS

II.1. Extraction hydroacétonique

Cinquante grammes (50 g) de poudre de chaque espèce sont soumis à une extraction sous agitation mécanique pendant 48 heures avec 500 ml d'un mélange acétone-eau (80:20) à la température ambiante de laboratoire (environ 35 °C). Après filtration et élimination de l'acétone sous pression réduite, la solution aqueuse est lyophilisée.

II.2. Fractionnement des extraits

Pour le fractionnement, la solution aqueuse du lyophilisat acétonique (80 %) est soumise à une série de partage liquide-liquide avec des solvants organiques non miscibles de polarité croissante.

a) 25 ml de la solution sont extraits avec 2 x 25 ml de chloroforme (EC). Les solutions EC sont rassemblées puis concentrées sous pression réduite. Les concentrés obtenus sont séchés. Le résidu ainsi obtenu constitue la fraction chloroformique (Fraction EC).

b) La phase aqueuse épuisée au chloroforme, est de nouveau extraite comme ci-dessus indiqué mais avec l'acétate d'éthyle comme solvant. Les solutions sont rassemblées, concentrées et séchées pour donner la fraction acétate d'éthyle (Fraction EtOAc).

c) La phase aqueuse issue des traitements en a) et b) est à nouveau lyophilisée. Les fractions obtenues seront utilisées pour isoler les composés antioxydants majoritaires par la méthode bio-autographique.

II.3. Extraction en continu

Un extracteur Soxhlet de 250 ml adapté à un ballon de 500 ml contenant 350 ml de

solvant est utilisé pour extraire 25 g de poudre de chaque espèce avec une série de 3 solvants de polarité croissante. Il est d'abord extrait avec de l'hexane pendant 6 heures suivi de du méthanol pendant 7 heures. Le marc résiduel obtenu est extrait à l'eau à 100°C (RA). Chacune des solutions extractives est concentrée à l'évaporateur rotatif puis séchée à la température ambiante. Les résidus hexanique (EH), méthanolique (MeOH) et aqueux (RA) sont respectivement obtenus.

III. TESTS GENERAUX DE CARACTERISATION

Le criblage phytochimique a pour objet la caractérisation des principaux composés chimiques présents dans les différents extraits de la plante. Quatre types d'extrait ont ainsi été utilisés à cet effet. 0,1 g de chaque résidu (hexanique, méthanolique, aqueux ou hydroacétonique selon le cas) a été dissout dans 10 ml de solvant afin de servir au criblage phytochimique. Tous les extraits, ci-dessus cités, ont été soumis aux tests suivants, selon la procédure décrite par Ciulei (1982) (Voir annexe 1):

- test de Dragendorff pour les alcaloïdes,
- test du FeCl_3 pour les tanins et/ou polyphénols,
- test de Shibata pour les flavonoïdes,
- test de mousse pour les saponosides,
- test de Liebermann-Büchard pour les stéroïdes et triterpènes,
- test de Bornträger pour les anthraquinones
- test de Carr-Price pour les caroténoïdes
- test des coumarines basé sur l'observation sous lampe UV des extraits alcalinisés.

Les résultats des tests précédents seront confirmés par les analyses CCM.

IV. ANALYSE CCM DES COMPOSES PHENOLIQUES

La technique décrite par Ciulei (1982) et par Wagner et Bladt (1996) pour le criblage phytochimique d'extraits de composition inconnue a été adoptée pour confirmer les résultats des tests en tube. Cette analyse a consisté à déterminer le nombre de composés d'une famille donnée de molécules dans l'extrait choisi pour l'étude, en utilisant des réactifs spécifiques aux différents groupes chimiques. L'analyse est effectuée par CCM avec des plaques fluorescentes en UV254 nm. Dans certains cas les plaques sont d'abord visualisées en UV254, avant d'être pulvérisées par les réactifs spécifiques aux différents groupes chimiques recherchés.

IV 1. Analyse CCM des Alcaloïdes

Dans la recherche des alcaloïdes, les éluants et révélateurs suivants ont été utilisés:

- Un gradient d'éluant constitué d'acétate d'éthyle- méthanol – eau (100 :13.5 :10) (Wagner et Bladt, 1996).
- Un gradient d'éluant constitué d'acétate d'éthyle- méthanol – NH₄OH 50% (9:1:1)
- Un gradient d'éluant constitué de chloroforme-méthanol (11.5:1)
- L'observation sous UV 254 nm et 365 nm

Après migration, les plaques CCM sont pulvérisées avec le réactif de Dragendorff (tétraiodobismuthate de potassium)(Wagner et Bladt, 1996).

L'apparition en lumière visible de taches orange témoigne de la présence d'alcaloïdes.

IV.2. Analyse CCM des coumarines

Le système d'éluant est constitué du mélange toluène – acétate d'éthyle (93:10). La visualisation du chromatogramme, après migration, se fait à 365 nm en absence et en présence de NH₃. La visualisation sous UV, des fluorescences jaunâtre et violette sont en faveur de la présence de coumarines.

IV.3. Analyse CCM des flavonoïdes et acides phénols

Les plaques ont été développées dans les systèmes de solvant S₁ ou S₂,

S₁: Acétate d'éthyle:acide formique:acide acétique glacial:eau (100:11:11:26),

S₂: n-hexane: Acétate d'éthyle:acide acétique: (62:24:10).

S₃: n-hexane:acétate d'éthyle:acide acétique:eau (50:40:8:2).

Un gradient d'éluants constitué d'acétate d'éthyle- méthanol – NH₄OH 50% (9:1:1)

Le dépôt a été effectué tel que décrit par Wagner et Bladt. (1993). Les plaques ont été révélées à l'UV254 nm et à l'UV-365 nm à près pulvérisation avec le réactif de NEU (NP/PEG: polyéthylène glycol réactif naturel).

Les flavonoïdes s'identifient par les colorations jaune, jaune orange, orange et verdâtre tandis que les acides phénols par le bleu, le bleu violet, le bleu verdâtre.

La rutine, la quercétine, la quercitrine, le kaempférol, l'apigénine, la génistéine, la chrysin, la catéchine, l'acacétine, la myricétine, la rhamnétine et l'épigallocatechine gallate ont été utilisés comme références pour l'identification des flavonoïdes des extraits tandis que

les acides gallique, caféique, cinnamique, hydroxycinnamique, férulique et ellagique ont servi pour la recherche des acides phénols.

V. DOSAGES DES PHENOLIQUES TOTAUX

Le réactif de Folin Ciocalteu (FCR 0,2 N) est un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus du tungstène et de molybdène, la coloration produite est proportionnelle aux taux de composés phénoliques totaux.

100 mg d'extrait sec ont été dissout dans 10 ml de méthanol pour obtenir une concentration de 10mg/mL et dilué 100 fois avec l'eau. Une courbe étalon a d'abord été réalisée en utilisant l'acide gallique (200 mg/IL, solution mère), comme substance de référence, après une série de dilutions à l'eau distillée (voir annexe 2). Ainsi dans chaque tube à essai ont été ajoutés, selon les solutions obtenues après dilution, 0,5 mL de l'échantillon à doser (acide gallique ou extrait à doser) et 2,5 mL de la solution de FCR (0,2 N). Après 5 mn d'attente on y ajoute 2 ml d'une solution de carbonate de sodium (75g/L).

Après agitation, les différentes solutions ont été incubées, à l'abri de la lumière pendant 2 heures. La lecture a été faite à 760 nm, au spectrophotomètre (CECIL CE 2041, CECIL Instruments, Angleterre), contre un blanc constitué d'un mélange de 0,5 ml de FCR et 0,5 mL de carbonate de sodium (Singleton *et al.*, 1999). Trois lectures ont été faites pour chaque concentration et les résultats ont été exprimés en mg équivalents acide gallique (mg GAE/100 mg d'extrait). La formule suivante a été utilisée pour le calcul de la teneur en composés phénoliques totaux de chaque extrait.

$$C = \frac{ci \times D \times 10}{m} \times 100$$

C = mg équivalent acide gallique dans 100 mg d'extrait,

ci = concentration de l'échantillon lue (mg/L),

D = dilution, m = masse de l'échantillon (mg).

VI. DOSAGE DES TANINS

Ce dosage est réalisé selon la méthode proposée par la communauté Européenne pour le dosage des tanins (1984).

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.

VII. DOSAGE DES FLAVONOÏDES TOTAUX

Le contenu total de flavonoïdes est déterminé par la méthode Dowd adaptée par Arvouet-Grand *et al.* (1994). Brièvement 2 mL de l'extrait de chaque plante ont été mélangé avec 2 mL de tri chlorure d'aluminium (AlCl₃) dans du méthanol (2%). L'absorbance a été lue à 415 nm après 10 mn d'incubation contre un blanc (2 mL de méthanol et 2 mL d'extrait de la plante). Ainsi l'obtention d'une coloration jaune stable permet d'évaluer par spectrophotométrie UV la teneur en flavonoïdes de l'échantillon par rapport à une solution de référence de quercétine. La teneur en flavonoïdes totaux de l'extrait a été estimée globalement par formation d'un complexe flavonosides-(Al³⁺; 3Cl⁻) en milieu tampon. Les résultats ont été exprimés en mg équivalents quercétine (mg QE)/100 mg d'extrait sec.

La formule suivante a été utilisée pour le calcul de la concentration en flavonoïdes en Equivalent Quercétine (Miliauskas *et al.*, 2004).

$$C = \frac{ci \times D \times 10}{m} \times 100$$

C = mg équivalent quercétine dans 100 mg,
 ci = concentration de l'échantillon lue (mg/L),
 D = dilution, m = masse de l'échantillon (mg).

VIII. DOSAGE DES FLAVONOLS

Les flavonols de différents extraits sont estimés par la méthode décrite par Almaraz-Abarca *et al.* (2004). L'absorbance a été lue à 425 nm contre une courbe d'étalonnage établie à partir de la quercétine utilisée comme standard. Les valeurs sont exprimées en mg Quercétine Equivalents (QE)/100 mg d'extraits de plante.

CHAPITRE II: ACTIVITES BIOLOGIQUES

I. DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

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 (20 mg/mL diluée au 100 pour obtenir 0,2 mg/mL), d'acide ascorbique, 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 [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$]. 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 3000 tr/min pendant 10 mn. 2,5 mL du surnageant ont ensuite été mélangé au même volume d'eau et 0,5 mL 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 (0-200 mg/L).

Le pouvoir réducteur a été exprimé en équivalents acide ascorbique (EAA) (mmol acide ascorbique /g d'extrait sec) en considérant 1 mM égale FRAP de 1 mL de l'extrait sec selon la formule suivante:

$$C = \frac{c \times D}{M \times Ci}$$

C = concentration en composés réducteurs en mol EAA/g d'extrait sec;

c = concentration de l'échantillon lue; D = facteur de dilution de la solution mère;

Ci = concentration de la solution mère; M = masse molaire de l'acide ascorbique (176,1g)

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

La méthode décrite par Re *et al.* (1999) est utilisée. Elle est basée sur la décoloration d'un cation radicalaire stable, ABTS^{•+} (2,2'-azinobis-[acide 3-éthylenthiazoline-6-sulfonique]) en ABTS en présence de composés antioxydants à 734 nm. Le radical cation ABTS^{•+} a été régénéré en réagissant une solution aqueuse d'ABTS (7 mM) avec 2,5 mM de persulfate de potassium (concentration finale), le mélange est gardé à l'obscurité à la température ambiante pendant 12 heures avant usage. Le mélange a été dilué avec l'éthanol pour donner une absorbance de $0,70 \pm 0,02$ à 734 nm par utilisation du spectrophotomètre.

Pour chaque extrait, une solution méthanolique (10 mg/mL) est diluée au 100^{ème} dans l'éthanol. Ainsi 10 µL d'échantillon (solution diluée), de la substance référence (acide ascorbique) ont été mélangés avec 990 µL de la solution fraîche de ABTS^{•+}. L'ensemble est mis à l'abri de la lumière pendant 15 minutes et les absorbances ont été lues à 734 nm au spectrophotomètre contre une courbe étalon d'acide ascorbique (264,15 mg/L) 6 min exactement après le mélange initial. La concentration de composés ayant un effet réducteur sur le cation radicalaire ABTS^{•+} est exprimée en µmol Equivalent Acide Ascorbique (EAA)/g d'extrait sec selon la formule suivante :

$$C = \frac{c \times D}{M \cdot C_i}$$

c = concentration de l'échantillon lue

D = facteur de dilution

C_i = concentration de la solution mère

C = concentration en composés antioxydants en µmol EAA/g d'extrait sec,

M = masse molaire de l'acide ascorbique (176,1g).

La capacité antioxydant en équivalent Acide Ascorbique (EAA) correspond à la concentration (mmol/L ou mg/L) d'acide ascorbique ayant la même activité qu'une même concentration unitaire de substance à tester.

I.3. Activité anti-radicalaire par inhibition du DPPH

La capacité de l'extrait à inhiber le radical DPPH (2, 2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) a été déterminée par la méthode spectrophotométrique décrite par Vélasquez (2003) avec quelques modifications. Dès que le radical DPPH réagit avec un composé antioxydant (antiradicalaire), celui-ci libère un hydrogène après réduction conduisant ainsi à un changement de couleur (violet foncé au jaune claire). Cette méthode est basée sur la réduction

II. ISOLEMENT DES COMPOSES PAR LA METHODE BIO-AUTOGRAPHIQUE

Les fractions chloroformique et d'acétate d'éthyle ont été soumis à une CCM préparative afin d'isoler des composés antioxydants majoritaires. Parmi les systèmes utilisés, S₁: Acétate d'éthyle:acide formique:acide acétique glacial:eau (100:11:11:26) et S₂: n-hexane: Acétate d'éthyle:acide acétique: (62:24:10).ont été retenus.

Les différentes fractions ont été déposées sous forme de bande continue sur des plaques de silice préparative de 10 × 20 cm. Après migration, les bandes ont été d'abord révélées à l'UV365 nm puis avec une solution méthanolique de DPPH (2mg/mL) sur une partie de la plaque pour isoler les composés antioxydants.

Les fractions de gels récoltées sont lavées au méthanol puis filtrées (filtre millipore 0,2µm) pour donner les composés purs.

Les composés isolés sont ensuite soumis à une CCM sur couche mince analytique de silice puis révélées avec les réactifs de NEU et de KOH éthanolique 5% afin de préciser leur nature phénolique (Wagner et Bladt, 1996). La CCM analytique ainsi que l'UV/visible et l'IR ont aussi été utilisés afin d'avoir des indications sur la nature du squelette de base des composés isolés. Leurs IC₅₀ vis à vis du DPPH ont également été déterminés.

En outre l'activité anti-radicalaire par la méthode d'inhibition du radical cation ABTS a été déterminée, leurs pouvoirs réducteurs, ainsi que leurs inhibitions enzymatiques afin de comparer leurs activités avec celles des composés de référence.

II.1. Etudes spectrales des composés isolés

Les spectres UV/visible et IR ont été réalisés afin de formuler des hypothèses quant à leur appartenance aux divers groupes de métabolites secondaires des plantes.

II.1.1. UV visible

Les composés isolés ont été d'abord solubilisés dans du méthanol analytique de façon à obtenir des concentrations de 10 mg/mL. Les spectres ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre. Une ligne de base a été faite à cet effet avec du méthanol et les fréquences choisies sont comprises entre 200 et 700 nm.

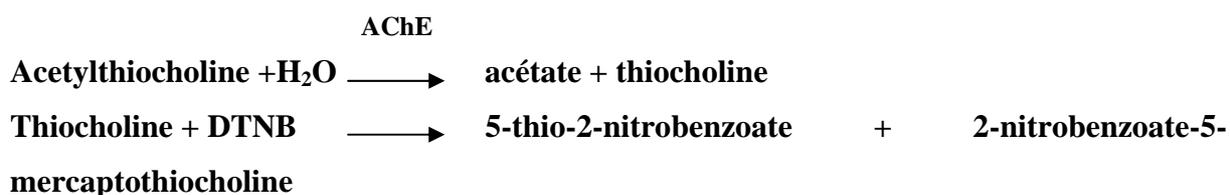
II.1.2. Infrarouge (IR)

200 μL à 400 μL de solution méthanolique de chaque composé sont introduits dans une cellule fenêtre (KBr) bien sèche. Le spectre IR est enregistré. On écrase modérément 100 mg de bromure de potassium (KBr) dans un petit mortier en y ajoutant quelques gouttes de solution d'échantillon solubilisé dans du méthanol. Le mélange est ensuite comprimé sous une pression de 10 tonnes avec une presse manuelle (Specac). La pastille (de 13 mm de diamètre) qui en résulte, d'aspect translucide, correspond à une dispersion de l'échantillon dans une matrice solide. Les spectres des composés sont enregistrés à l'aide d'un spectromètre infrarouge contre un blanc constitué d'un mélange de KBr et de méthanol.

III. INHIBITION DE L'ACETYLCHOLINESTERASE (AChE)

Principe

L'acétylcholinestérase hydrolyse le substrat ATCI (Iodure d'acetylthiocholine) en thiocholine et 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. Les réactions ci-dessous indiquent l'hydrolyse de l'ATCI et la transformation de la thiocholine en produit coloré.



Enzyme et réactifs

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

A: Tampons A, B et C (Annexe II).

B: 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.

C: Solution d'enzyme 0,22 U/ml.

L'acétylcholinestérase commerciale (0,95 mg soit 1ku) a été dissoute 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.

D: Inhibiteurs

A partir de chacune des solutions mères (10 mg/ml dans méthanol) des macérés hydroacétonique, de substance de référence ou de composés isolés, quatre dilutions ont été faites dans du tampon A contenant 10% de méthanol analytique pour obtenir des concentrations de 0,5; 1; 2,5 et 5 mg/ml.

E: Réactif d'Ellman ou DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïc acide) 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.

Les inhibiteurs (échantillon) sont constitués des solutions des macérés acétoniques (80%). Dans une cuve spectrophotométrique, il a été successivement mis pour chaque concentration 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) calculée suivant la formule:

$$V_{hyd} = \Delta DO / \Delta T$$

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 100µl de tampon B.

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

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

Pour chaque solution une série de dilutions ont été réalisées dans du tampon A, méthanol 10 % pour obtenir des concentrations de 0,5; 1; 2,5 et 5 mg/mL, afin de tracer la courbe donnant les pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait. La concentration qui inhibe 50% d'activité de chaque essai est déterminée graphiquement.

IV. INHIBITION DE LA CARBOXYLESTERASE (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

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

B: 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.

C: 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 (5mg d'enzyme dans 5ml de tampon Tris). La solution obtenue est diluée 1000 (10µl de la solution mère dans 9990µl de tampon Tris) pour obtenir une solution test de l'enzyme égale à 0,027 U/ml.

D: 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 1mg/mL.

Evaluation de l'activité enzymatique

La méthode de Djeridane *et al.* (2007) a été utilisée avec quelques modifications. La quercétine est utilisée comme substance de référence. Le protocole est résumé dans le tableau 7

Tableau 7: Protocole d'inhibition de la carboxylestérase

	Blanc enzyme	Contrôle négatif	Tests
Tampon Tris-HCl	500µl	400µl	400µl
Extrait ou tampon- Méthanol 1%	100µl	100µl de tampon- Méthanol 1%	100µl d'extrait
Enzyme	-	100µl	100µl
Incubation 5 minutes			
Substrat	400µl	400µl	400µl
Lecture à 414 nm pendant 3 min			

V. L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE PAR INHIBITION DE LA LIPOXYGENASE (LOX)

Principe

La méthode consiste, en se basant sur la figure 15, à inhiber le cycle de la LOX donc à empêcher la production de leucotriène (LT) et la lipoxine (LX). Les leucotriènes générés par la LOX sont inflammatoires et sont connus pour être de puissants médiateurs jouant un rôle important dans les réactions allergiques. Ils peuvent aussi intervenir dans l'ischémie et l'athérosclérose. L'accident cérébro-vasculaire, les lésions cérébrales traumatiques et la maladie d'Alzheimer ont également été reliés à l'activité des LOX surtout à la LOX-5 et des leucotriènes. Il a été montré que la lipoxigénase produite dans l'organisme joue un rôle important dans les désordres tels que l'asthme des bronches, l'inflammation (Steinhilber *et al.*, 1999). Inhiber de la LOX est donc une voie de blocage des désordres ou de traitement de ces maladies.

Réactifs

A: Tampon borate (Voir annexe II)

B: Solution de substrat

D'abord l'acide linoléique (substrat) a été pré oxydé afin de favoriser l'activité de l'enzyme, ainsi il été laissé à l'air libre pendant toute une nuit à la température du laboratoire, il a en suite été conservé au congélateur. 10 μL d'acide linoléique (250 μM), 30 μL d'éthanol et 120 mL de tampon borate ont été mélangés pour une concentration finale de 134 μM dans le milieu réactionnel. La solution est utilisée dans un intervalle de 24 h.

C: Solution d'Enzyme

La solution d'enzyme est obtenue par préparation du lipoxygénase (*EC 1.13.11.12*) de type *I-B* (extraite du *soja*) (200 U/mL) dans du Tampon borate pour une concentration finale de 167 U/mL dans le milieu réactionnel.

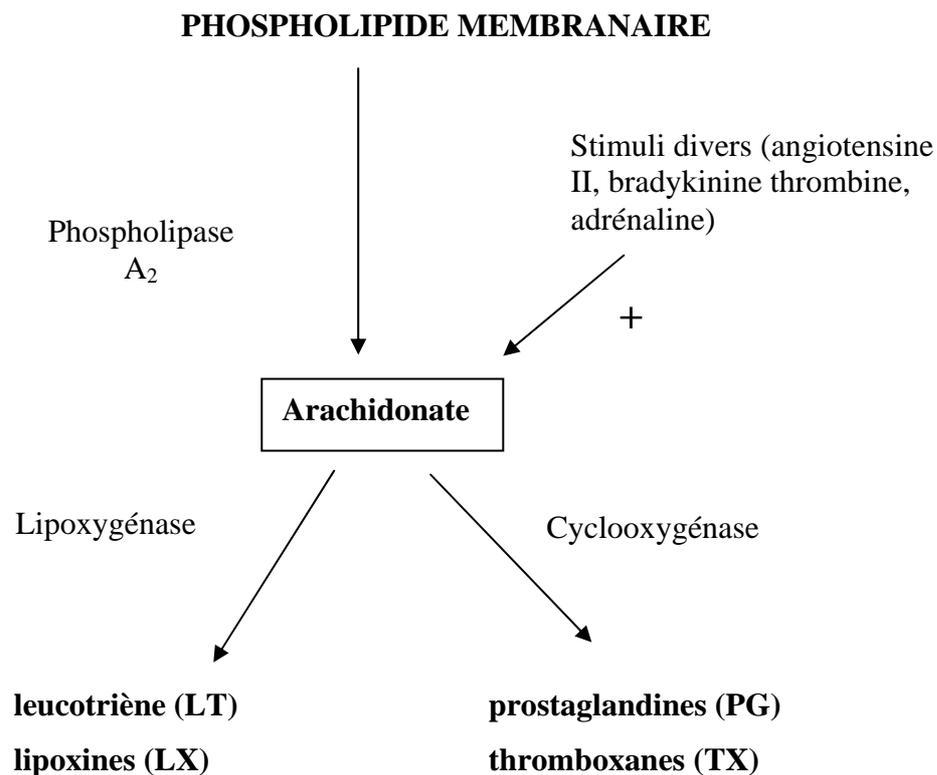


Figure 16: Métabolisme de l'acide arachidonique via les cycles de la cyclooxygénase et de la Lipoxygénase.

D: Inhibiteurs

Les inhibiteurs sont constitués de la quercétine 50 mM et d'extraits à tester (1 mg/mL), pour une concentration finale de 100 µg/mL dans le milieu réactionnel, ils sont d'abord préparés dans du tween-20 (0.1 %)

Evaluation de l'activité enzymatique

L'activité inhibitrice des extraits sur la lipoxygénase a été déterminée par la méthode spectrophotométrique développée par Malterud et Rydland (2000) avec quelques modifications. Ainsi l'activité des extraits, des composés isolés et de substance de référence a été déterminée suivant le protocole décrit dans le tableau 8.

Le pourcentage de l'inhibition a été calculé suivant la méthode:

$$I \% = (E - S)/E \times 100$$

où E est l'activité de l'enzyme sans inhibiteur et S son activité en présence de l'extrait à tester. Les valeurs des IC₅₀ ont été déterminées graphiquement.

Tableau 8: Protocole d'inhibition de la Lipoxygénase

Mélange dans la cuve	Activité de l'enzyme	Enzyme + inhibiteur
Tween-20 (0.1 %) µL	100	---
Tampon µL	---	---
Enzyme µL	400	400
Inhibiteur µL	---	100
Incubation 5 mn à 25 ° C		
Substrat µL	500	500
Lecture de la cinétique à 234 nm pendant 3 mn toutes les 30 secondes		

VI. 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 car l'accumulation de l'acide urique cause de nombreux maux dont la goutte.

La xanthine oxydase (XO) ou la xanthine déshydrogénase, est une enzyme (n° EC 1.1.3.32) qui catalyse l'oxydation de l'hypo xanthine en xanthine et qui de plus catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique (Figure 17).

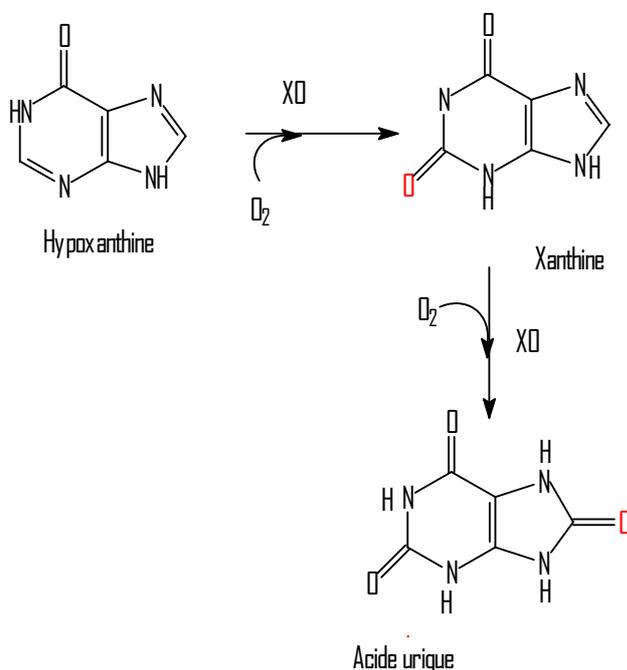


Figure 17: Oxydation de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique par la xanthine oxydase

Enzyme et réactifs

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

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

C: 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.

D: Inhibiteur

Les extraits sont d'abord solubilisés dans le DMSO puis dilués dans l'eau MeOH 1%. La même procédure a été appliquée sur l'allopurinol (inhibiteur de référence de la XO).

Evaluation de l'activité enzymatique

La méthode de Ferraz Filha *et al.* (2006) a été utilisée avec quelques modifications. Le protocole d'évaluation de l'activité inhibitrice de la xanthine oxydase est indiqué dans le tableau 9.

Tableau 9: Protocole d'inhibition de la xanthine oxydase

Blanc sans enzyme	Contrôle négatif	Tests
400µL Tampon	300µL tampon	300µL tampon
100µL échantillon ou Eau-MeOH 1%	100µl Eau-MeOH 1%	100µL Eau-MeOH 1%
-	100µL enzyme	100µL enzyme
Incuber 3 min	Incuber 3 min	Incuber 3 min
500µL Substrat	Vérifier la stabilité de la DO 2 min	Vérifier la stabilité de la DO 2 min
-	500 µL substrat	500µL substrat
Faire le Zéro	Cinétique à 295 nm pendant 2 min	Cinétique à 295 nm pendant 2 min

V. DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTI-BACTERIENNE

VI.1. 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 15 min.

VI.2. Préparations des solutions

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

Les lyophilisats des macérés hydroacétoniques sont dissous dans du DMSO 10% pour une concentration finale de 150 mg/mL, tandis que les antibiotiques de référence sont dissous dans l'eau distillée à la concentration 150 mg/mL.

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.

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 Mac Farland. Lorsque les deux solutions sont identiques alors notre inoculum final contient 5×10^5 UFC/mL.

NB: Les solutions d'extraits ou d'antibiotiques pharmaceutiques sont stérilisées en les prélevant avec une seringue stérile de 2 mL, puis filtrées avec des filtres millipore 0,2 µm.

VI.3. Méthode de disques pour le test de sensibilité (Cos *et al.*, 2006; NCCLS, 2000)

La gélose Muller Hinton (MH) a été coulée dans des boîtes de Pétri (54 mm), les boîtes ont été ensuite séchées sous la hotte à flux laminaire.

0,2 mL de l'inoculum bactérien a été prélevé à l'aide d'une seringue puis coulé dans chaque boîte de Pétri. L'inoculum estensemencé par étalement à l'aide d'une pipette pasteur. Des disques de papier Whatman n°1 de 6 mm de diamètre, préalablement imprégnés avec 10 µL de chaque extrait ou d'antibiotiques sont déposés stérilement sur la gélose inoculée. Le même volume de DMSO 10% a été utilisé afin de vérifier l'effet du DMSO sur les souches utilisées. Les boîtes de Pétri ont été incubées à l'étuve pendant 48 h à la température de 37°C.

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant, à l'aide d'une règle transparente, le diamètre de la zone d'inhibition induit par les extraits ou les antibiotiques. Les extraits ou les antibiotiques ayant induit une zone d'inhibition ≥ 3 mm autour du disque sont considérés comme ayant une activité antibactérienne. Chaque test est réalisé 3 fois.

NB: Pour les antibiotiques, on utilise des disques standards contenant n µg d'antibiotiques.

VI.4. Méthode des micro-dilutions (Cos *et al.*, 2006; NCCLS, 2000)

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et les Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) ont été déterminées en utilisant la technique de micro dilution avec le bouillon Muller Hinton (NCCLS, 2000).

- Détermination de 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 stériles contenant une gamme de concentrations d'extraits. Pour ce faire chaque puits reçoit 100 µL de bouillon MH; 100 µL d'extrait ou d'antibiotique au 1^{er} puit suivi d'une dilution en cascade auxquels sont ajoutés 10 µL de l'inoculum bactérien. Les colonnes "test" reçoivent l'inoculum (témoins de la fertilité du milieu de culture), tandis que celui de la colonne témoins est sans inoculum pour tester la stérilité du milieu (témoins négatif). Les derniers puits des 2 colonnes ne reçoivent pas d'extraits. L'expérience est répétée 3 fois pour chaque souche.

La CMI, déterminée après 18 h d'incubation à 37°C, correspond à la plus petite concentration de la solution du puits de la colonne test qui ressemble en aspect à celle du puits homologue de la colonne témoins.

- Détermination de la CMB

La CMB est définie comme étant la concentration minimale qui tue 99,99 % de l'inoculum de départ. La CMB a été déterminée en prélevant 10 µl de suspension dans les puits sans croissance visible et en ensemençant de la gélose nutritive. L'incubation s'est faite à 37 °C pendant 48 heures au bout desquelles on a procédé au comptage des colonies. Elle s'effectue après celle de la CMI et avec les puits de concentrations supérieure ou égale à celle de la CMI dans la colonne test.

On prélève 10µL dans d'inoculum que l'on ensemence sur du milieu MH dans une boîte de Pétri (CMB de référence) après une série de dilution en cascade. On note que l'inoculum contient 5×10^5 UFC/mL. On compare 18 h après incubation à 37°C les boîtes de Pétri provenant des puits avec la référence de CMB. Celle qui a le même aspect que la référence CMB révèle alors que la concentration du puits d'où elle provient est la CMB.

Le nombre de bactéries/mL = nombre de UFC/ (facteur de dilution x volume d'aliquote).

A propos de la CMB, 99,9% de microorganismes sont détruits et il ne reste que 0,01% de microorganisme c'est-à-dire 50 UFC/mL

- **Détermination du pouvoir bactéricide ou bactériostatique** Gaillard *et al.*(1991)

L'activité anti-biotique des extraits peut être appréciée en tenant compte du rapport CMB/CMI. Ainsi l'effet est dit:

- bactéricide quand le rapport est compris entre 1 à 2.
- bactériostatique quand le rapport est compris entre 4 à 16.

V. Analyses statistiques

Pour l'analyse statistique, le logiciel MS Excellent (fonction statistique de CORREL) a été utilisé pour calculer les équivalents en acides gallique, tannique et ascorbique, en quercétine, pour déterminer le pourcentage d'inhibition et pour établir les équations de régression linéaires. La fonction "Pearson Product Moment" et " One way ANOVA (Tukey test)" de SigmaStat 2.0 (Jandel Scientific software) ont été utilisés pour déterminer les coefficients de corrélation et le niveau d'importance statistique respectivement.

TROISIEME PARTIE: RESULTATS ET DISCUSSIONS

CHAPITRE I. ETUDES PHYTOCHIMIQUES

I. RESULTATS

I.1. Résultats sur la revue bibliographique

A travers cette étude, la revue bibliographique nous a permis de répertorier toutes les informations sur:

- la botanique des espèces retenues à savoir la description et la répartition géographique.
- leurs utilisations en médecine traditionnelle,
- la phytochimie disponible et,
- la pharmacologie sur les espèces retenues.

Le genre *Indigofera* comprend 700 espèces réparties géographiquement dans les régions tropicales. Les résultats sur les différentes utilisations des espèces étudiées sont résumés dans le tableau 10. Comme indiqué dans le tableau 10, *I. colutea*, *I. macrocalyx*, *I. nigritana*, *I. pulchra* et *I. tinctoria* sont utilisées traditionnellement, au Burkina Faso, au Nigeria et en Inde, dans le traitement du paludisme, des dermatoses, de la fatigue, des constipations, des maux de ventre, des morsures du serpent, des douleurs et de la goutte. Au Niger, la poudre des tiges feuillées de *I. tinctoria* est appliquée sur les plaies des enfants après circoncisions.

L'étude pharmacologique réalisée sur ces espèces révèle que les roténoïdes isolés de *Indigofera tinctoria* ont montré des propriétés toxiques sur les larves d'anophèles et sur *Callosobruchus chinensis* adultes (Kamal et Mangla, 1993). La même plante a montré des propriétés hépatoprotectrices (Singh *et al.*, 2006). Les extraits de *Indigofera pulchra* éliminent les effets toxiques des venins frais de *Naja nigricollis* (Abubacar *et al.*, 2006).

Il ressort aussi que les espèces étudiées ne sont pas simplement médicinales, elles sont également utilisées en teinture. Compte tenu de la place qu'occupent ces plantes dans la teinture; elles jouent un rôle important dans l'industrie textile. C'est le cas de *I. tinctoria* reconnu pour être riche en indigo.

Tableau 10: Utilisation en médecine traditionnelle de cinq espèces d'*Indigofera*.

Plantes	Parties utilisées	Utilisations (médecine traditionnelle)	Refférences bibliographiques
<i>I. colutea</i>	Plante entière	douleurs de l'estomac	Perumal Samy et al., 1998
<i>I. macrocalyx</i>	Inflorescence Tige feuillée, plante entière	Purge, fatigue, retard locomoteur des enfants, paludisme, impuissance, constipation, stimulant, goutte	Berhaut, 1974; Kerharo et Adams, 1974 Nacoulma, 1996
<i>I. nigritana</i>	Tiges feuillée	Paludisme, dermatoses, fatigue, antifongique, antiseptique, stimulant	Nacoulma, 1996
<i>I. pulchra</i>	Plante entière	Paludisme, dysenterie, anti-venimeux	Adamu <i>et al.</i> , 2005
<i>I. tinctoria</i>	Plante entière	Fébrifuge, détergeant des plaies, anti-septique, diurétique, fatigue, impuissance, IST, constipation, douleurs, lèpre, stimulant, anti-protzoaie, hepatoprotecteur, anti-tumoral, anti-venimeux.	Berhaut, 1974; Nacoulma, 1996 Singh <i>et al.</i> , 2006. Han, 1994; Abubakar <i>et al.</i> , 2006

Les criblages phytochimiques ont été précédés d'une étude histochimique qui a permis de localiser les différents tissus de sécrétion ou de stockage des métabolites secondaires que sont les tanins, les flavonoïdes, les anthraquinones et les alcaloïdes.

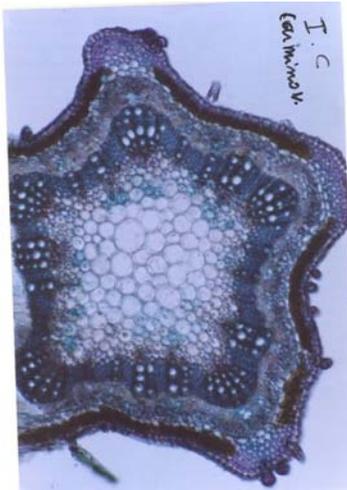
I.2. Etude histochimique

A travers cette étude nous avons d'abord pu localiser les tissus constitutifs de la tige de chaque espèce grâce à la coloration au carmino vert [Photo 9 (1)]. Cette double coloration a permis de caractériser des cellules colorées en rose (cellules ayant gardé leur paroi pecto-cellulaire), en rose pâle (parenchyme), rose vif (phloème), rose violacée (collenchyme), en vert (xylème), en vert-bleu (sclérenchyme) et en vert-jaunâtre (suber).

Après la localisation des différents tissus, l'utilisation des réactifs spécifiques a permis de caractériser certaines classes de composés polyphénoliques.

Ainsi la présence des précipités noirâtres avec le FeCl₃ 1%, sur toutes les coupes, à intensités variables, indique la présence des polyphénols et/ou tanins dans le parenchyme médullaire [Photo 6(2)]. La coloration jaune en présence du NaOH 5 % dans le parenchyme cortical indique la présence des flavonoïdes [Photo 6(4)]. Les alcaloïdes n'ont pas pu être identifiés [Photo 6(3)].

Les résultats obtenus sur l'étude histochimique seront confirmés par les tests de caractérisation sur les différents extraits.



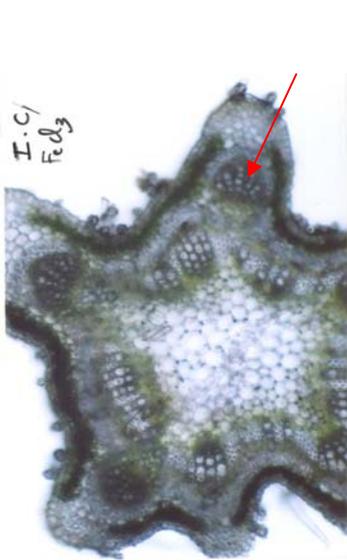
(1) (a) *I. colutea*



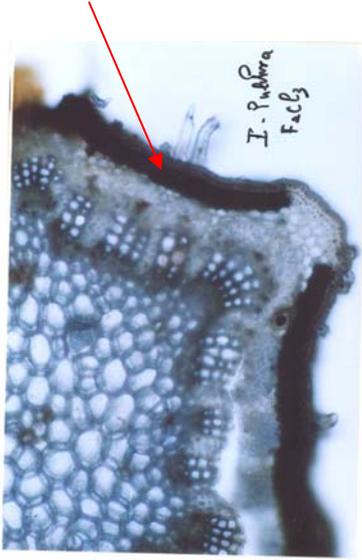
(d) *I. pulchra*



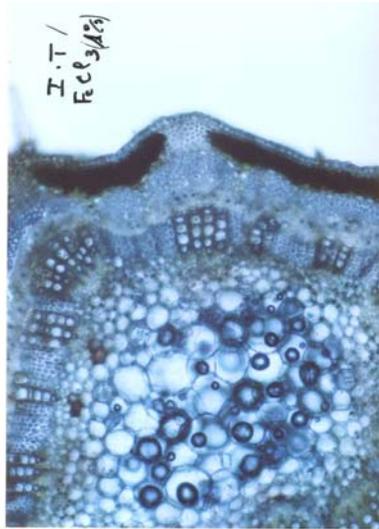
(e) *I. tinctoria*



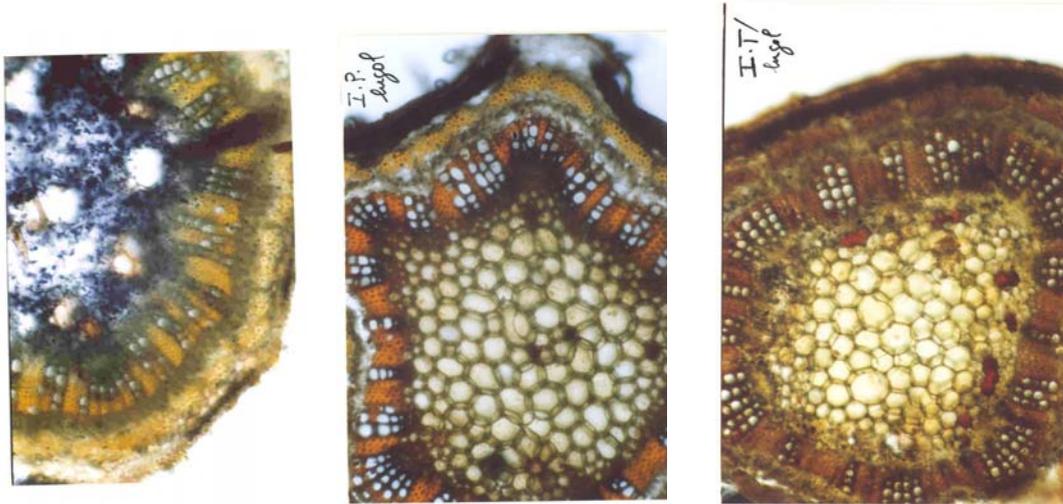
(2): (a) *I. colutea*



(b) *I. pulchra*



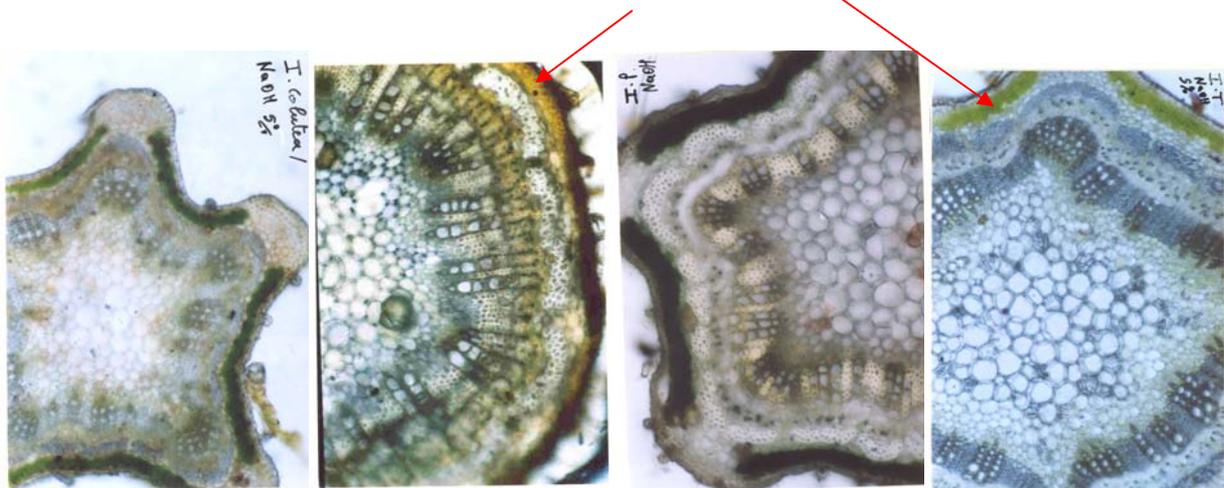
(d) *I. tinctoria*



(3): (a) *I. nigriflora*

(c) *I. pulchra*

(d) *I. tinctoria*



(4): (a) *I. colutea*

(b) *I. nigriflora*

(c) *I. pulchra*

(d) *I. tinctoria*

(1) : Localisation des différents tissus des tiges

(2) : Identification des Tanins et/ou polyphénols

(3) : Identification des alcaloïdes

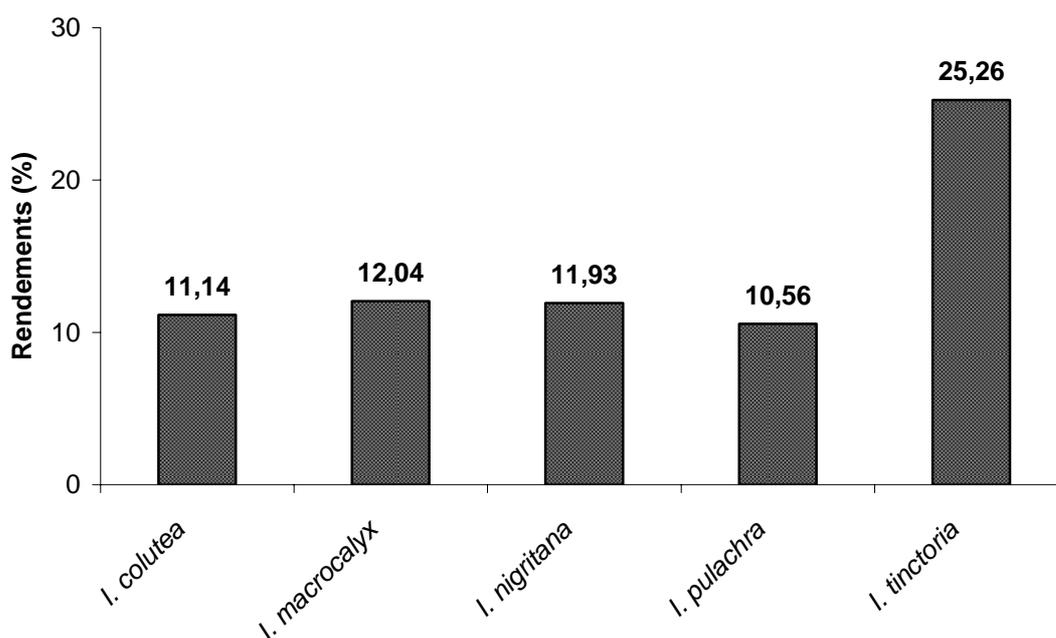
(4) : Identification des Flavonoïdes

Photo 6: Coupes histochimiques des tiges de cinq (5) espèces du genre *Indigofera*

I.3. Criblages phytochimiques

I.3.1. Rendement des extractions

Les rendements des extractions par macération à l'acétone 80% varient entre 10,56 et 25,26 %, *Indigofera tinctoria* a présenté le meilleur rendement (25,26 %) soit le double de celui obtenu avec chacune des autres espèces étudiées (10,56 à 12,04 %) (Figure 18).



*

Figure 18: Rendement des extractions à l'acétone 80 %.

I.3.2. Tests généraux de caractérisation

Les tests de caractérisation sur les extraits à l'acétone 80% % des espèces d'*Indigofera* étudiées ont permis d'obtenir les résultats consignés dans le tableau 11 (les mêmes quantités d'extraits et de réactifs ont été utilisées).

Comme mentionné dans l'étude histochimique où des tanins, des flavonoïdes ont été identifiés, les tests de caractérisation confirment la présence de ces groupes chimiques, mieux encore d'autres groupes chimiques ont été caractérisés à savoir les saponines, les quinones et les stérols/triterpènes. Il ressort que tous les extraits contiennent des flavonoïdes, des quinones, des tanins, des stérols et triterpènes et des saponines à l'exception de l'extrait de *Indigofera pulchra* qui a donné un résultat négatif au test des quinones. Cet extrait a donné

cependant un résultat positif avec le test des coumarines. Les alcaloïdes n'ont été pas caractérisés dans aucun des extraits.

Tableau 11: Groupe chimiques des extraits hydro-acétoniques de cinq espèces d'*Indigofera*.

Groupes des composés	Extraits				
	<i>I. colutea</i>	<i>I. macrocalyx</i>	<i>I. nigritana</i>	<i>I. pulchra</i>	<i>I. tinctoria</i>
Alcaloïdes	-	-	-	-	-
Coumarines	-	-	-	+	-
Flavonoïdes	++	+++	+++	+	+
Antraquinones	+	+++	+	-	+++
Saponines	+	++	++	+	++
Caroténoïdes	nd	nd	nd	nd	nd
Stérols et Triterpenes	+	+	+	+	+
Tanins et/ou polyphénols	+++	++	+++	+	+++

- = non détectés; + = présence; ++ = Composé en concentration élevée ; +++ = Composé en concentration très élevée. Nd = non déterminé.

Toutes les cinq espèces étudiées synthétisent essentiellement les mêmes groupes chimiques. Cependant, à l'exception des autres espèces, *Indigofera pulchra* n'a pas présenté d'antraquinones mais la seule espèce qui a présenté de coumarines. Ces résultats sont en accord avec ceux de Nacoulma (1996) sur *I. macrocalyx*, *I. nigritana* et *I. tinctoria*.

La Chromatographie sur Couches Minces (CCM) a permis d'identifier les composés au sein de chaque groupe chimique et dont certains seront isolés.

I.4. Analyses CCM des acides phénols et des flavonoïdes

L'analyse CCM a porté sur les macérés hydro-acétoniques de cinq espèces d'*Indigofera*. Trois systèmes d'éluant ont été essentiellement utilisés à savoir :

Système 1 (S₁): n-hexane/acétate d'éthyle/acide acétique (62:18:10).

Système 2 (S₂): Acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique glacial/eau (100:11:11:27).

Système 3 (S₃): n-hexane/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (50:40:8:2)]

Une vue d'ensemble des résultats des CCM permet de constater que tous les extraits présentent des spots jaunes, jaune-orangé ou jaune-vert après révélation au réactif de NEU et visualisation sous UV365 nm. Les couleurs des spots sont caractéristiques des flavonoïdes (Wagner et Bladt 1996). Ces résultats confirment ceux obtenus avec les tests de caractérisation des flavonoïdes où le test de Shibata est positif avec tous les extraits testés (Tableau 11). Mieux encore, les extraits de *Indigofera nigriflora* et *I. macrocalyx* semblent contenir plus de flavonoïdes que les autres espèces si on se base sur les colorations des spots obtenus. Avec le même révélateur à savoir le NEU, certains extraits ont présenté des spots bleu et bleu-vert, couleurs caractéristiques des acides phénols et/ou des coumarines à l'UV365 nm, c'est le cas des extraits de *I. tinctoria* et *I. colutea*.

La photo 7 représente les Chromatogrammes obtenus avec le système S₃ avant révélation au NEU à 254 nm (A) et après révélation au NEU et visualisation à l'UV365 nm (B). Les acides phénols de référence utilisés nous ont permis d'identifier l'acide gallique et l'acide caféique dans les extraits bruts de *I. tinctoria* et *I. colutea*.

Nous avons observé des spots dont les colorations varient du jaune au jaune-vert caractéristique des flavonoïdes. Ils sont majoritaires dans les extraits de *I. nigriflora* et *I. macrocalyx*. Le système 1 n'a pas pu entraîner certains composés, ce qui nous a amené à utiliser un système plus polaire (système 2).

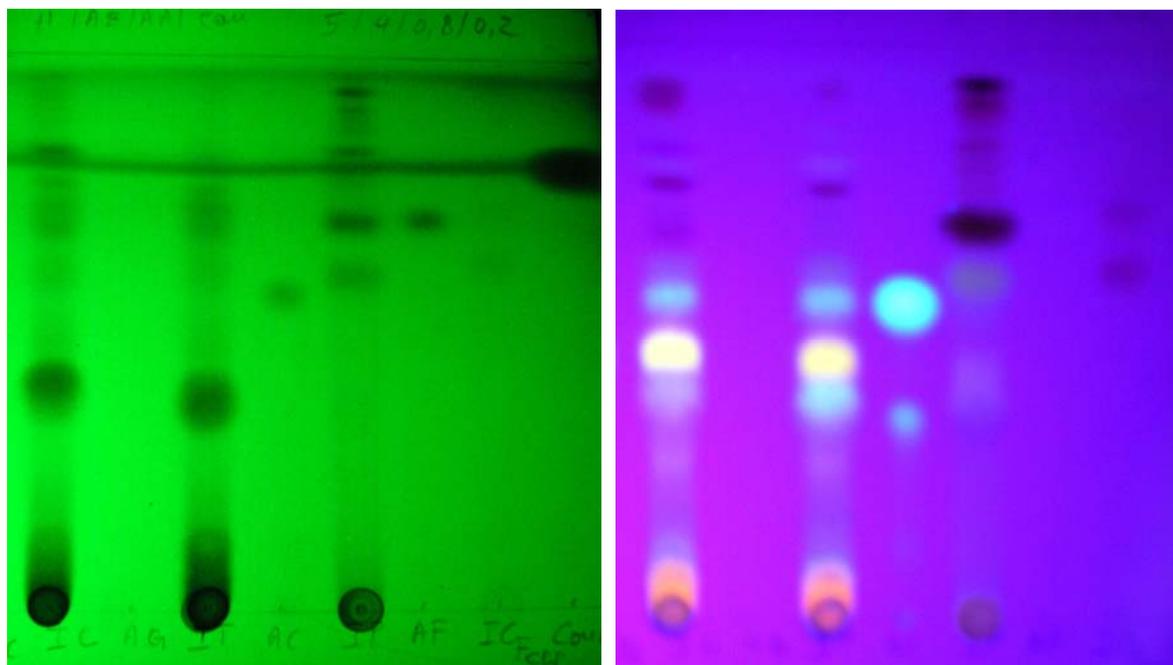


Photo 7: CCM des extraits à l'acétone 80 % de cinq espèces d'*Indigofera* à UV254 nm avant révélation au NEU (A) et à UV365 nm après révélation au NEU (B).

Système 3: n-hexane:acétate d'éthyle/acide acétique/eau (50:40:8:2).

AG: acide gallique, IC : *I. colutea*, Qr: quercétrine; AC: acide caféique, IT : *I. tinctoria*

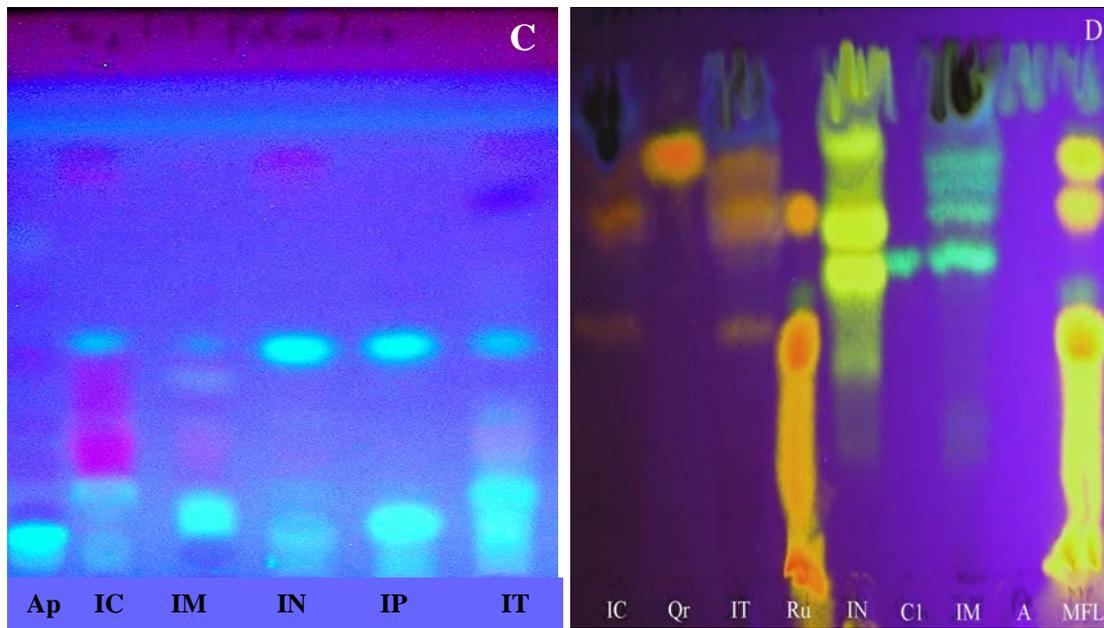


Photo 8: CCM des extraits à l'acétone 80 % hydrolysés (C) et non hydrolysés (D) de cinq espèces d'*Indigofera* à UV365 nm après révélation au NEU.

(C) système 1: n-hexane/acétate d'éthyle/acide acétique (62:18:10)

(D) système 2: Acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique glacial/eau (100:11:11:27).

Ap: acides phénols, IC: *I. colutea*; IM: *I. macrocalyx*; IN: *I. nigritana*; IP: *I. pulchra*; IT: *I. tinctoria*; Ru.: rutine ; Qr: quercitrine; C1: composé isolé de IM.

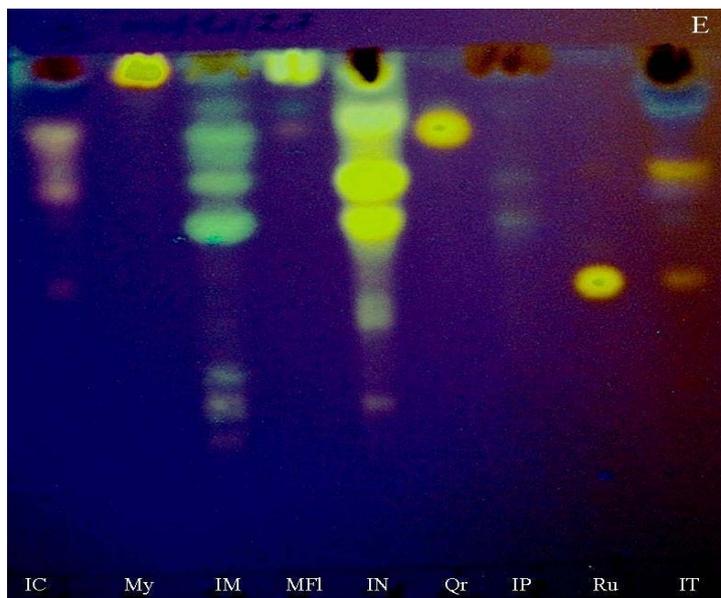


Photo 9: CCM des extraits à l'acétone 80 % de cinq espèces d'*Indigofera* après révélation au NEU puis observés à l'UV 365 nm.

Système 2 : Acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique glacial/eau (100:11:11:27).

IC: *I. colutea*; IM: *I. macrocalyx*; IN: *I. nigritana*; IP: *I. pulchra*; IT: *I. tinctoria*;
Ru.: rutine; Qr: quercitrine; My: myricétine; MFI: mélange de flavonoïdes.

Le chromatogramme C (photo 8) montre des spots bleus sur tous les extraits hydrolysés, et sur tous les hydrolysats apparaissent des composés ayant la même la référence frontale. Ces résultats montrent qu'au sein d'une même famille (ici les Fabaceae) on retrouve presque les mêmes groupes chimiques même si des variabilités existent au sein d'un même groupe chimique.

La photo 9 montre le chromatogramme obtenu avec le système 2 après révélation au NEU à 365 nm. Ainsi, la rutine a pu être identifiée dans l'extrait de *I. tinctoria* L. et celui de *I. colutea*; la quercitrine dans l'extrait de *I. colutea* puis la myricétine dans *I. tinctoria*, *I. colutea* et *I. macrocalyx*.

Avec le même système, l'extrait de *I. nigritana* a présenté 3 spots jaunes qui ne correspondent pas aux composés de référence utilisés, il en est de même avec l'extrait brut de *I. macrocalyx* où les spots obtenus sont jaune-verts. Ils sont représentés sur les chromatogrammes D (photo 8) et E (photo 9). La couleur relative des spots est caractéristique des flavonoïdes. La CCM préparatives a permis d'isoler le composé le plus majoritaire de *I. macrocalyx* (C_{1IM}) chromatogramme D (photo 8).

I.5. Dosages spectrophotométriques des polyphénols

I.5.1. Dosages des phénoliques totaux

Les phénoliques totaux ont été déterminés à partir d'une courbe de régression obtenue à partir d'une solution d'acide gallique (200 mg/L solution mère) qui a donné l'équation suivante :

$$Y = 0,0092x + 0,021 ; R^2 = 0,999 \text{ (Figure 19).}$$

Les valeurs, exprimées en équivalent acide gallique (EAG), sont consignées sur la figure 23 et varient entre 28,22 et 54,27 mg EAG/pour 100 mg d'extrait. L'extrait de *I. colutea* a donné la meilleure teneur en composés phénoliques (54,27 mg GAE/100 mg) suivi de celui de *I. nigritana* et *I. tinctoria* avec respectivement 44,20 et 42,27 mg GAE/100 mg.

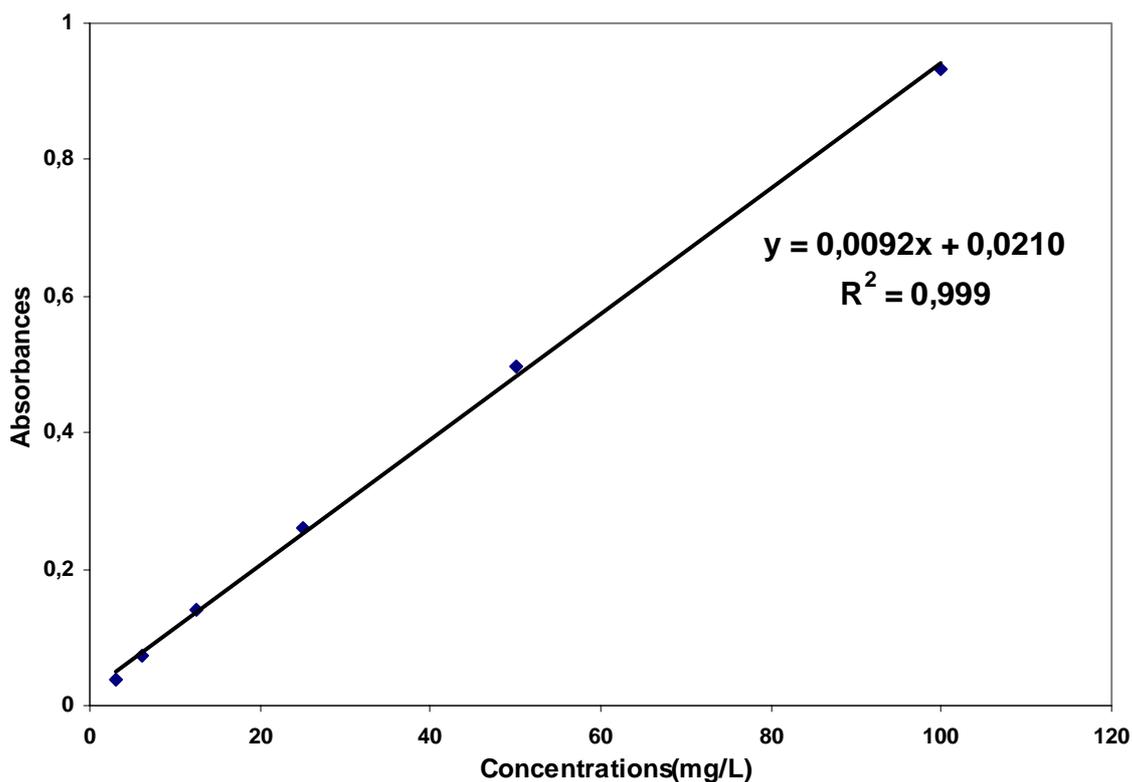


Figure 19: courbe étalon acide gallique

I.5.2. Dosages des tanins totaux

Les tanins totaux ont été déterminés à partir d'une courbe de régression obtenue à partir d'une solution d'acide tannique (400mg/L solution mère) avec une équation: $Y = 0,0011x + 0,2236$; $R^2 = 0,9995$ (Figure 20). Les résultats obtenus montrent que les taux en tanins varient entre $7,43 \pm 0,69$ et $26,63 \pm 0,12$ mg TAE/100 mg d'extrait. Le plus fort taux est obtenu avec l'extrait de *I. tinctoria* ($26,63 \pm 0,12$) suivi de *I. nigritana* ($17,30 \pm 0,66$), *I. colutea* ($16,42 \pm 1,03$) et *I. macrocalyx* ($11,88 \pm 0,67$). L'extrait de *I. pulchra* a donné un taux plus faible soit $7,43 \pm 0,69$ mg TAE/100 mg d'extrait (Figure 23).

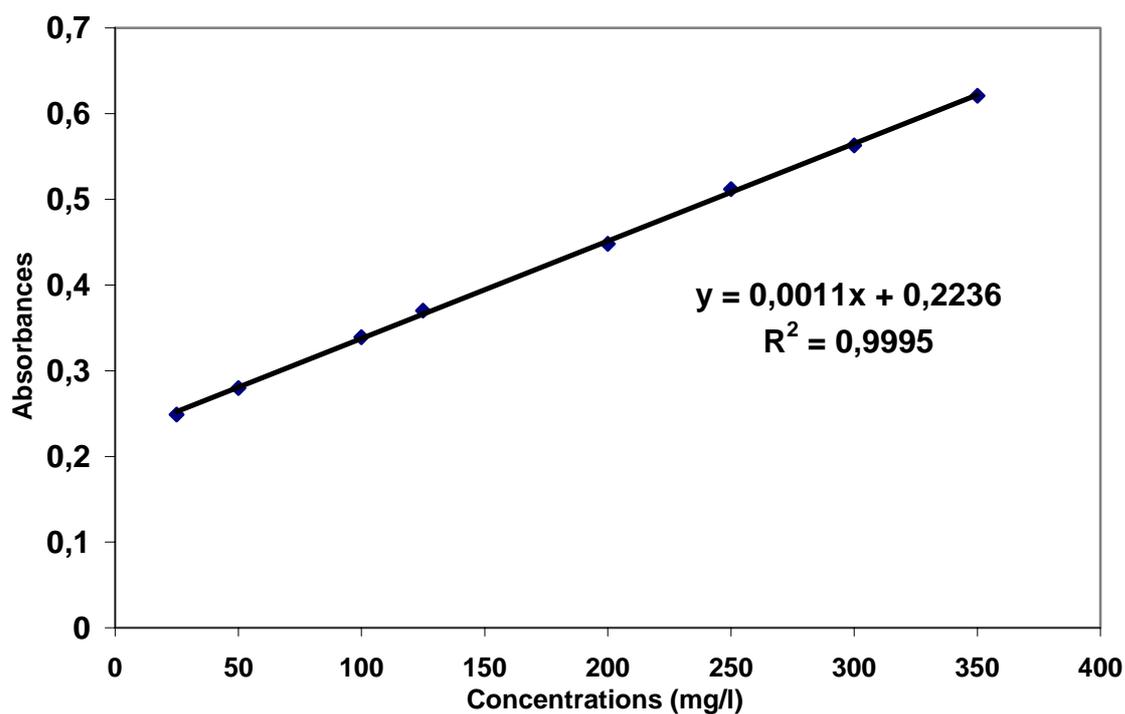


Figure 20: Courbe étalon acide tannique

I.5.3. Dosages des flavonoïdes totaux

La quantité en flavonoïdes, exprimée en équivalents quercétine (EQ), a été déterminée à partir de la courbe de régression (obtenue par la solution de quercétine, 200 mg/L) dont l'équation de régression vaut: $Y = 0,0289x - 0,0036$; $R^2 = 0,9998$ (Figure 21). Les valeurs varient entre 2,38 et 9,63 mg EQ/ 100 mg d'extrait (Figure 23). Les extraits de *I. macrocalyx* et *I. nigriflora* ont présenté les plus fortes teneurs en flavonoïdes avec respectivement 9,23 et 9,63 mg EQ/100 mg d'extrait.

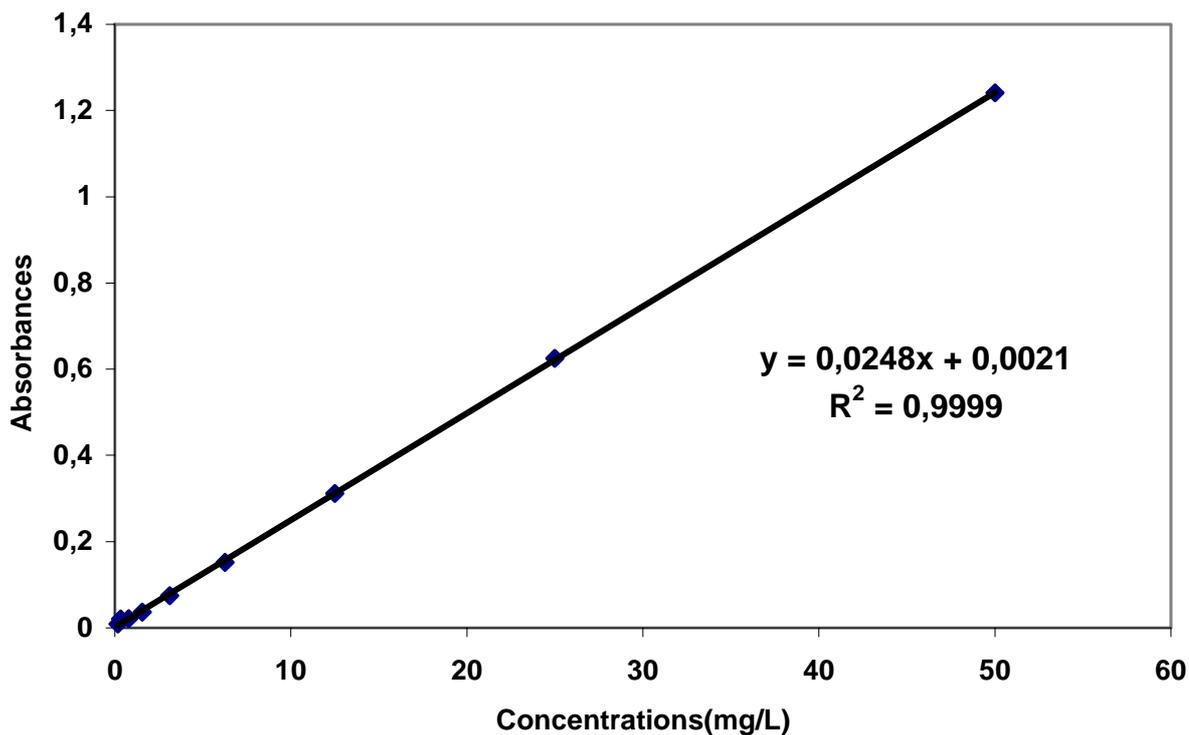


Figure 21 : Courbe étalon quercétine dosage flavonoïdes totaux

I. 5.4. Dosages des flavonols totaux

L'équation de régression ($Y = 0,0353x + 0,0016$; $R^2 = 0,9988$), obtenue à partir de la courbe étalon quercétine (Figure 22), nous a permis de doser les flavonols. La teneur en flavonol des différents extraits (Figure 23) varie de $0,46 \pm 0,02$ mg EQ/ pour 100 mg d'extrait à $2,93 \pm 0,07$ mg EQ/ 100 mg d'extrait. L'extrait de *I. macrocalyx* a présenté la plus forte teneur ($2,93 \pm 0,07$) suivi de *I. nigritana* ($1,00 \pm 0,06$), *I. pulchra*. ($0,9 \pm 0,12$), *I. tinctoria* ($0,81 \pm 0,04$) et *I. colutea* ($0,46 \pm 0,02$).

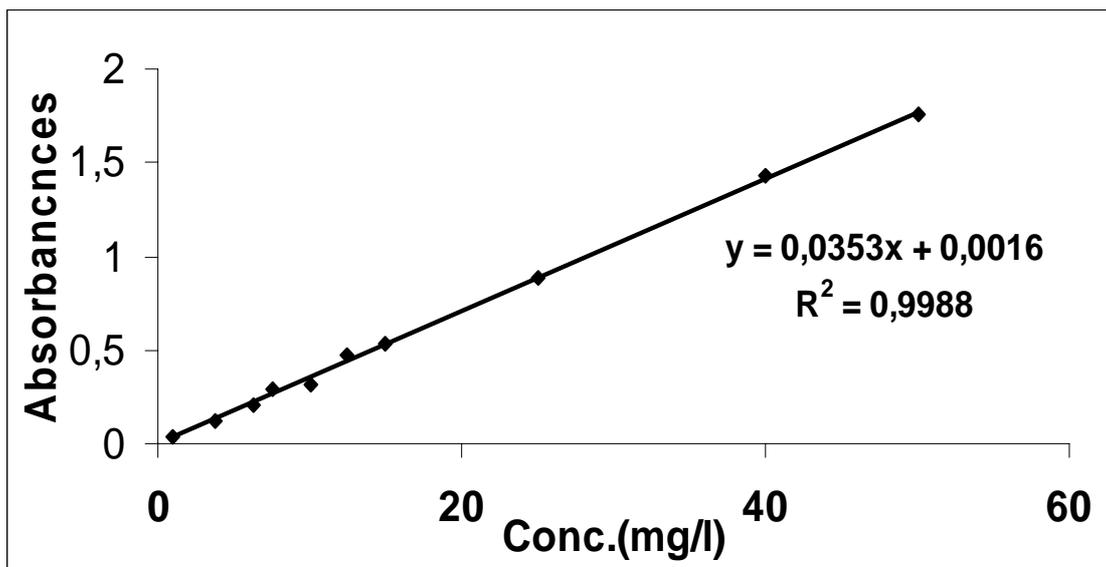


Figure 22 : Courbe étalon quercétine pour le dosage des flavonols

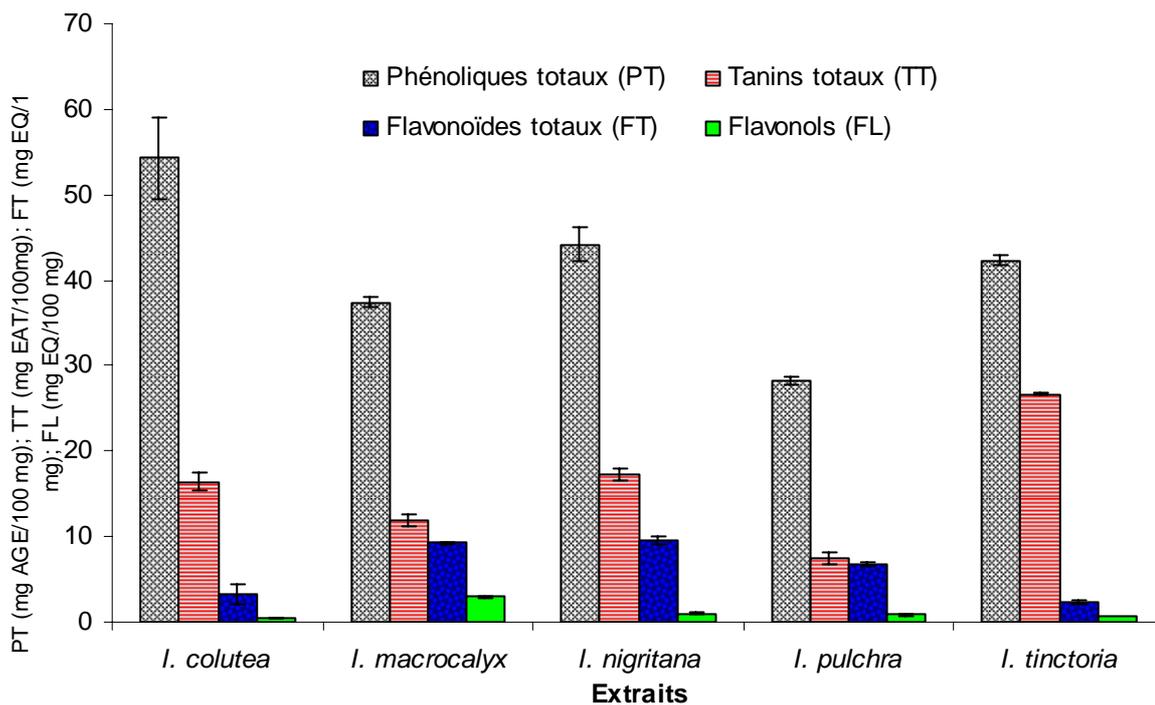


Figure 23: Teneurs en polyphénols des macérés hydro-acétoniques de cinq *Indigofera*

I.C: *Indigofera colutea*; *I. M:* *Indigofera macrocalyx*; *I. N:* *Indigofera nigritana*; *I. P:* *Indigofera pulchra*; *IT:* *Indigofera tinctoria*, AGE: acide gallique équivalent; ATE: Acide tannique équivalent; QE: quercétine équivalent

I.5.5. Corrélation entre les polyphénols dosés

Le coefficient de corrélation obtenu entre les phénoliques totaux et les teneurs en tanins, en flavonoïdes et en flavonols varient entre -0,41 et 0,54. Une bonne corrélation est obtenue entre les phénoliques totaux et les tanins totaux (0,54). Il en est de même entre les flavonoïdes et le flavonol ($r = 0,61$). Par contre les corrélations sont négatives entre les phénoliques totaux et les flavonoïdes totaux, et les flavonols d'une part et entre les tanins totaux et les flavonoïdes totaux, et les flavonols d'autres parts.

Tableau 12: Corrélation (r) entre les teneurs en polyphénols dosés

	Flavonoïdes totaux	Flavonols totaux	Phénoliques totaux
Phénoliques totaux	- 0,41	- 0,36	---
Tanins totaux	- 0,58	- 0,33	0,54
Flavonoïdes totaux	---	0,61	---

II. DISCUSSION

Le criblage phytochimique effectué sur les cinq espèces du genre *Indigofera*, pour certains pour la première fois, met en évidence la présence de divers métabolites secondaires dont les flavonoïdes, les acides phénols, les tanins, les saponosides, les anthracénosides et les triterpènes et stérols. Ces métabolites ont des rôles très importants pour la vie de chaque espèce surtout dans la pigmentation des fleurs et des fruits, la protection contre les herbivores, contre les radiations U.V. La présence de certains de ces composés dans les organes aériens, révélés en amont (par l'étude histochimique et par les tests de caractérisation), est en faveur de ces rôles.

De plus des propriétés biologiques à savoir les propriétés anti-hépatotoxiques, anti-allergiques, antioxydantes, anti-inflammatoires, antivirales, anti-tumorales, anticancéreuses et anti-microbienne leurs sont attribuées (Di Carlo *et al.*, 1999; Raj Narayana *et al.*, 2001; Raj Kapoor *et al.*, 2004).

Les composés identifiés par CCM parmi lesquels des flavonoïdes (rutine, quercitrine, galangine, myricétine) et les acides phénols (acide gallique, acide caféique) sont connus pour leurs diverses activités.

Fenglin *et al.* (2004) ont démontré que les propriétés anti-inflammatoires de plusieurs composés phénoliques sont essentiellement dues à leurs activités anti-radicalaires. Comme cela a été démontré par certains auteurs, les composés phytochimiques à savoir les acides phénols et les flavonoïdes de par leurs structures et particulièrement la position du groupement hydroxyle sur la molécule, présentent des propriétés antioxydantes intéressantes (Miliauskas *et al.*, 2004). De plus ces composés sont connus pour leurs propriétés anti-tumorales (Christina *et al.*, 2003; Raj Kapoor *et al.*, 2004; Raj Narayana *et al.*, 2001).

Les flavonoïdes sont aussi anti-allergiques, cytostatiques, diurétiques, veinotoniques, hypocholestérolémiantes et antiviraux (Bruneton, 1993; Middleton *et al.*, 2000; Nacoulma, 1996). Il a été montré que les flavonoïdes sont anti-inflammatoires, spasmolytiques, sédatifs propriétés attribuées surtout aux dérivés de l'apigénine. Leurs propriétés anti-microbienne et anticancéreuse ont aussi été montrées (Hernandez *et al.*, 2000; Raj Narayana *et al.*, 2001; Yenjai *et al.*, 2004). Ils peuvent stimuler l'activité enzymatique en favorisant la solidité et la stabilité des fibres du collagène, en s'opposant à leur dénaturation. C'est le cas de la proline hydroxylase. Ce sont aussi des piègeurs des radicaux libres, ce qui leur confère des propriétés antioxydantes (Elliott *et al.*, 2000; Fenglin *et al.*, 2004; Yenjai *et al.*, 2004).

En effet, en tant qu'antioxydants, les flavonoïdes sont capables d'inhiber le processus de la carcinogenèse mis en oeuvre par des mutations engendrées par l'altération de l'ADN par les radicaux libres. Ces mutations sont d'autant plus graves lorsqu'elles touchent des gènes critiques comme les oncogènes et les gènes suppresseurs des tumeurs. En outre, les flavonoïdes inhibent l'angiogenèse, la prolifération cellulaire et affectent le potentiel invasif et métastatique des cellules tumorales (Nijveldt *et al.*, 2001).

Les flavonones et flavonols sont des antioxydants au niveau rétinien et cérébral; ils diminuent les troubles liés à la sénescence. Ces sont des véritables traitements du vieillissement cérébral. Ils améliorent la mémoire, la vigilance, la capacité de concentration et l'humeur par stimulation de la synthèse de la Dopamine, de la Séroïne.

En agissant sur la neurotransmission sensorielle ils traitent les troubles de l'équilibre (Patichis *et al.*, 1993).

Des études ont également montré que l'ingestion des flavonoïdes peut entraîner une réduction considérable de la mortalité liée aux maladies cardio-vasculaires (Pérez-Vizcaíno *et al.*, 2002).

Comme plusieurs auteurs l'ont montré, les flavonoïdes à savoir la galangine, la quercitrine myricétine et la rutine sont connus pour leurs propriétés antibactérienne (contre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*), antivirale (contre Rabies

virus, Para influenza virus), anti-ulcéreuse, hépatoprotectrice, antioxydante, anti-hypertensive et anti-inflammatoire (Bruneton, 1993; Carnat *et al.*, 2004; Elliot *et al.*, 2000; Raj Narayana *et al.*, 2001; Ueda *et al.*, 2002). La quercétine exerce des effets antioxydants, anti-plaquettaires et vasodilatateurs pouvant expliquer ses effets cardioprotecteurs (Nijveldt *et al.*, 2001; Pérez-Vizcaíno *et al.* 2002).

L'acide gallique, l'acide caféique et bien d'autres acides phénols sont aussi connus pour leurs activités anti-inflammatoire, anti-bactérienne et antivirale (Gülçin, 2006; Lee *et al.*, 2003). Les acides phénols sont doués d'un pouvoir antioxydant. C'est ainsi que les tanins hydrolysables (acide gallique et acide ellagique) inhibent la peroxydation des lipides et que les tanins condensés (cathéchiques) sont inhibiteurs des superoxydes dismutases.

D'autres analyses phytochimiques ont montré la présence des coumarines et des alcaloïdes dans l'extrait méthanolique de *Indigofera suffruticosa* (Leite *et al.*, 2006). D'autres études ont aussi montré la présence des saponosides, des flavonoïdes et tanins dans plusieurs *Indigofera* à savoir *I. arrecta* (Nacoulma, 1996), *I. aspalathoides* (Christina *et al.*, 2003), *I. dendroïdes* (Esimone *et al.*, 1996) et précisément certains flavonoïdes comme les roténoïdes dans *I. tinctoria* (Kamal et Mangla, 1993).

Les propriétés pharmacologiques des composés phytochimiques identifiés pourraient justifier la plupart des utilisations médicinales des espèces d'*Indigofera* au Burkina Faso.

III. CONCLUSION PARTIELLE

L'étude phytochimique de ces 5 espèces du genre *Indigofera* a permis de localiser les tanins et les flavones au niveau du parenchyme cortical des tiges. Le criblage phytochimique a permis de caractériser certains groupes chimiques d'abord par l'étude histochimique puis par les tests de caractérisation. La chromatographie sur couches minces particulièrement, a permis d'identifier certains composés dont les familles ont été caractérisées par les méthodes précédentes. C'est ainsi que dans la famille des flavonoïdes la rutine, la quercitrine, la galangine et la myricétine ont été identifiés, les acides phénols tels que l'acide gallique, l'acide caféique ont aussi été identifiés. Les autres groupes chimiques à savoir les saponines, les stérols et triterpènes, les anthraquinones y ont aussi été retrouvées. *I. pulchra* a un profil chimique différent des autres *Indigofera*. Les dosages spectrophotométriques nous ont permis d'avoir les meilleures teneurs phénoliques totaux dans *I. colutea*, *I. nigritana* et *I. tinctoria*, en flavonoïdes (Flavonols) totaux dans *I. macrocalyx* et *I. nigritana* et en tanins totaux dans *I. tinctoria*, *I. nigritana* et *I. colutea*.

Il ressort que certaines propriétés pharmacologiques attribuées aux plantes étudiées peuvent être justifiées surtout du fait de leur composition en flavonoïdes, en acides phénols, en anthraquinones et en composés terpéniques.

CHAPITRE II. CRIBLAGE DES PROPRIETES BIOLOGIQUES

I. ACTIVITES ANTIOXYDANTES

I.1. Résultats

I.1.1. La méthode FRAP

Le pouvoir réducteur des extraits de la plante résulte de la capacité de leurs composés à donner des électrons et par conséquent à participer aux réactions de réduction. Dans cette étude, la réduction des ions Fe^{3+} en ions Fe^{2+} est exprimée en mmol équivalents acides ascorbiques/g d'extrait (EAA). Les concentrations ont été déterminées contre une courbe de référence obtenue avec l'acide ascorbique (200 mg/L solution mère) avec une courbe de régression: $Y = 0,0082x + 0,0002$, $R^2 = 1$ (Figure 24). Les valeurs obtenues avec les extraits de 5 *Indigofera* sont consignées dans le tableau 13. Les meilleures activités sont obtenues avec les extraits de *I. colutea* ($2,54 \pm 0,14$ mmol g⁻¹ EAA) et *I. tinctoria* L. ($2,04$ mmol g⁻¹ EAA), suivies par ceux de *I. nigritana* ($1,57 \pm 0,06$ mmol g⁻¹ EAA) et *I. macrocalyx* ($1,41 \pm 0,02$ mmol g⁻¹ EAA).

Pour chacune de ces quatre espèces, le pouvoir réducteur est considérablement plus élevé que celui obtenu avec l'extrait de *I. pulchra* ($0,81 \pm 0,01$ mmol g⁻¹ EAA).

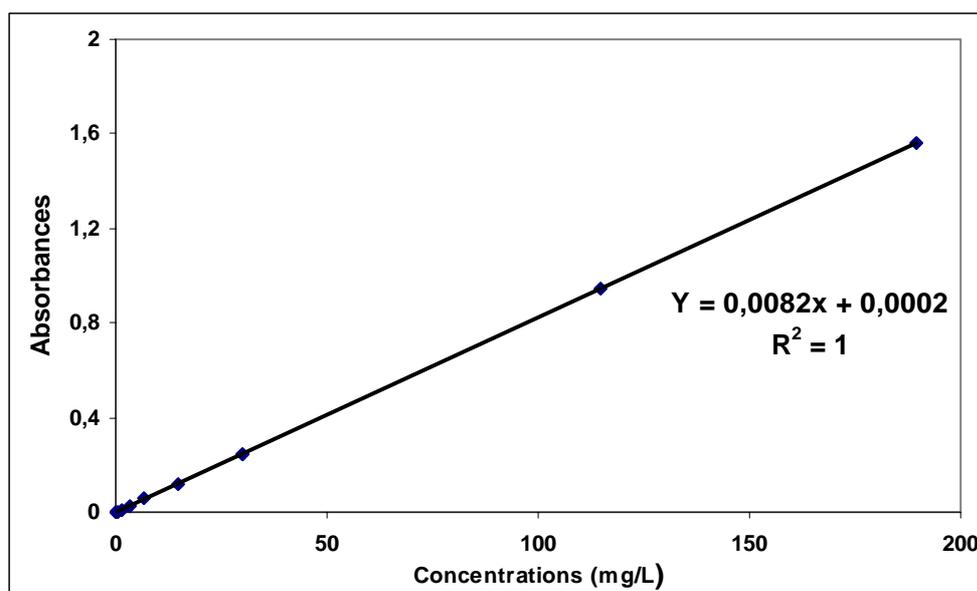


Figure 24: Courbe étalon acide ascorbique pour la détermination du pouvoir réducteur (FRAP)

I.1.2. Activité anti-radicalaire des extraits par inhibition du DPPH

La méthode DPPH est une des méthodes qui permettent d'évaluer l'activité anti-radicalaire des extraits, elle est basée sur la mesure de l'inhibition des radicaux. Cette méthode convient aussi aux modèles cellulaires utilisés dans l'étude des stress oxydatifs au niveau des cellules (Tiwari, 2004). 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).

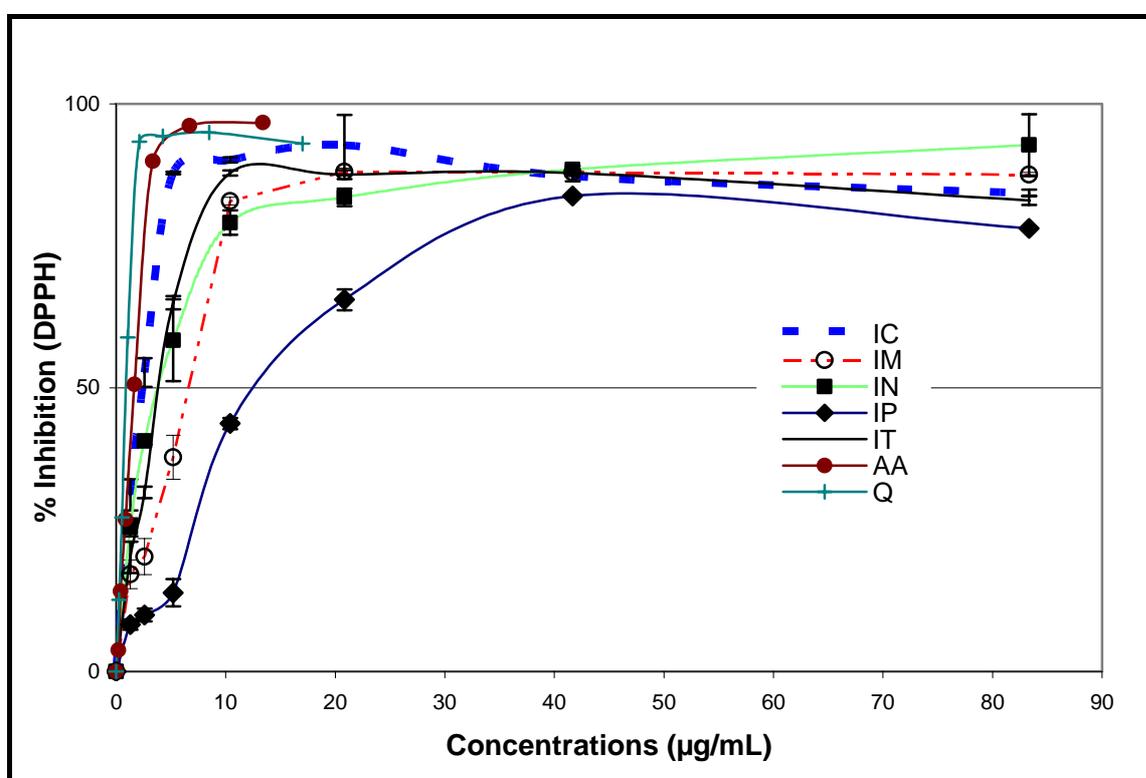


Figure 25: Inhibitions du DPPH par les extraits acétoniques (80 %) des 5 *Indigofera* et les substances de références.

I.C: *Indigofera colutea*; **I.M.:** *Indigofera macrocalyx*; **I.N:** *Indigofera nigriflora*; **I.P:** *Indigofera pulchra*; **IT:** *Indigofera tinctoria*; **AA:** acide ascorbique; **Q:** quercétine

Chaque résultat constitue la moyenne des trois valeurs obtenues (n = 3).

Les résultats de cette étude sont indiqués dans le tableau 13. Les IC_{50} obtenues graphiquement varient de $2,45 \pm 0,15$ à $12,37 \pm 0,32$ $\mu\text{g/mL}$. et une IC_{50} relativement très faible indique une activité antioxydante très élevée. Partant de ce principe, la meilleure activité

antioxydante est obtenue avec l'extrait de *I. colutea* ($2,45 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$) suivie par celui de *I. tinctoria* ($3,79 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$) et celui de *I. nigritana* ($3,68 \pm 0,87 \mu\text{g/mL}$). Les mêmes espèces ont aussi présenté des teneurs en phénoliques plus élevées. *I. pulchra*, avec une composition faible en phénoliques a présenté relativement une faible activité anti-radicalaire ($12,37 \pm 0,32 \mu\text{g/mL}$) par rapport aux autres espèces. Les substances de référence utilisées à savoir l'acide gallique, la quercétine et l'acide ascorbique donnent des IC_{50} respectives $0,61 \pm 0,14$; $0,88 \pm 0,11$ et $1,8 \pm 0,43 \mu\text{g/mL}$. Ces résultats montrent que les extraits des plantes étudiées présentent des potentiels anti-radicalaires élevés.

I.1.3. Capacité anti-radicalaire des extraits par la méthode ABTS

La capacité anti-radicalaire libre des espèces du genre *Indigofera* a aussi été déterminée en utilisant le radical cation ABTS. Elle est utilisée pour mesurer la capacité des composés purs, les extraits des plantes ou des échantillons de nourriture. Dans la présente étude, l'acide ascorbique a été utilisé comme substance de référence pour tracer la courbe étalon (Figure 26) (équation de régression obtenue $Y = -46,289x + 26,321$; $R = 0,9407$) à la place du Trolox parce que les deux substances ont sensiblement le même pourcentage d'inhibition sur le radical cation ABTS à 734 nm (Katanilic *et al.*, 2006). D'autres auteurs ont aussi utilisé l'acide ascorbique comme standard avec la même méthode (Lee *et al.*, 2003; Soong *et al.*, 2004).

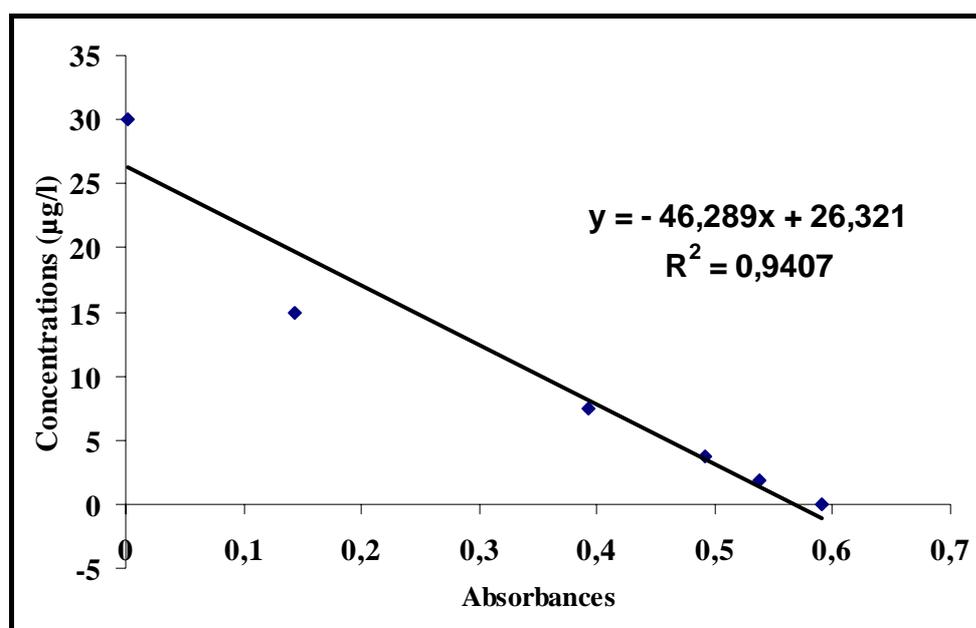


Figure 26 : Courbe étalon acide ascorbique pour la méthode ABTS

Le tableau 13 montre les capacités en antioxydant des espèces étudiées. Les valeurs varient de $1,36 \pm 0,45$ à $3,74 \pm 0,14$ mmol/g d'extrait sec. Les plus fortes capacités en antioxydants ont été obtenues avec *I. colutea* ($3,74$ mmol/g $\pm 0,14$) et *I. tinctoria* ($3,00 \pm 0,372$ mmol/g) lesquelles ont présenté les plus forts taux en composés phénoliques. Une fois de plus l'extrait de *I. pulchra* qui a présenté un total phénolique bas a présenté une faible activité anti-radicalaire ($1,36 \pm 0,245$ mmol/g) par rapport aux autres espèces.

I.1.4. Coefficients de corrélation entre les phénoliques totaux et les activités antioxydantes: ABTS; DPPH et FRAP

Les équations de régression et les coefficients de corrélations entre les phénoliques totaux et les activités antioxydantes par les méthodes ABTS; DPPH et FRAP sont représentés sur la figure 27. Les coefficients de corrélations varient suivant l'ordre: $0,98$ (DPPH, $y = 0,0129x - 0,2966$) > $0,8959$ (FRAP, $y = 0,0649x - 1,0047$) > $0,8383$ (ABTS, $y = 0,0093x - 1,4295$).

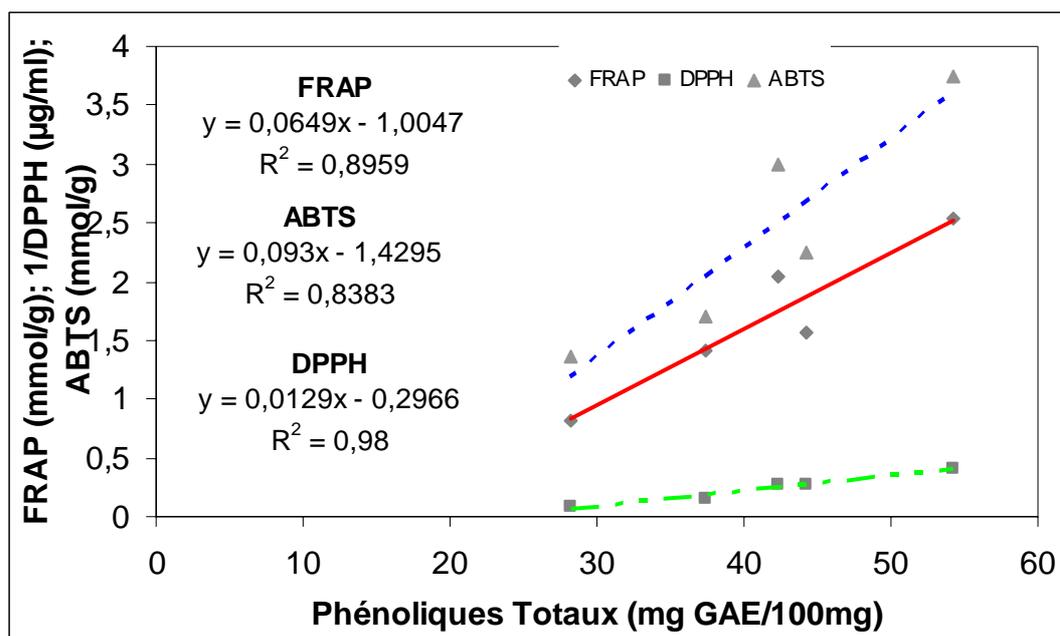


Figure 27 : Coefficients de corrélation entre les phénoliques totaux et ABTS; 1/DPPH et FRAP

Tableau 13: Polyphénols totaux et activités antioxydantes des extraits de cinq d'*Indigofera*

Extraits et substances de références	Dosages des polyphénols totaux				Activité antioxydante		
	Phénoliques totaux (mg GAE/100 mg)	Tanins totaux (mg TAE/100mg)	Flavonoïdes totaux (mg QE/100 mg)	Flavonols totaux (mg QE/100 mg)	FRAP (mmol AscAE g ⁻¹)	ABTS (mmol AscAE.g ⁻¹)	DPPH (IC ₅₀ : µg/mL)
<i>I. colutea</i>	54,27 ± 4,87 ^a	16,42 ± 1,03 ^b	3,27 ± 1,27 ^c	0,46 ± 0,02 ^d	2,54 ± 0,14 ^a	3,74 ± 0,14 ^a	02,45 ± 0,15 ^a
<i>I. macrocalyx</i>	37,40 ± 0,63 ^c	11,88 ± 0,67 ^c	9,23 ± 0,08 ^a	2,93 ± 0,07 ^a	1,41 ± 0,02 ^c	1,70 ± 0,23 ^{c,d}	06,35 ± 0,30 ^c
<i>I. nigritana</i>	44,20 ± 2,00 ^b	17,30 ± 0,66 ^b	9,63 ± 0,45 ^a	1,00 ± 0,06 ^b	1,57 ± 0,06 ^c	2,24 ± 0,57 ^c	03,68 ± 0,87 ^b
<i>I. pulchra</i>	28,22 ± 0,50 ^d	07,43 ± 0,69 ^d	6,83 ± 0,27 ^b	0,90 ± 0,12 ^{b,c}	0,81 ± 0,01 ^d	1,36 ± 0,25 ^d	12,37 ± 0,32 ^d
<i>I. tinctoria</i>	42,27 ± 0,55 ^{b,c}	26,63 ± 0,12 ^a	2,38 ± 0,30 ^c	0,81 ± 0,04 ^c	2,09 ± 0,09 ^b	3,00 ± 0,37 ^b	03,79 ± 0,08 ^b
Quercétine					nd	nd	0,61 ± 0,14
Acide gallique					nd	nd	0,88 ± 0,11
Acide ascorbique					5,86± 0,51	1,78 ± 0,58	01,8 ± 0,43

AGE: acide gallique équivalent; ATE: Acide tannique équivalent; QE: quercétine équivalent.

Chaque résultat contitue la moyenne des trois valeurs obtenues (n = 3).

Les lettres différentes dans la même colonne indique des differnces significatives (p<0,05)

I.2. Discussion

Les résultats sur la réduction des ions ferriques (FRAP) montrent que les extraits des espèces étudiées sont plus réducteurs que certains extraits étudiés par la même méthode. C'est le cas de l'extrait de *Moldavia dracocephalum* L. qui a donné $0,51 \pm 0,06$ mmol g⁻¹ EAA (Dastmalchi *et al.*, 2006) et des extraits des plantes étudiées par Hinnerburg *et al.* (2006) qui ont donné des valeurs comprises entre 0,06 et 0,54 mmol EAA/g d'échantillon.

La corrélation obtenue ($r = 0,96$) entre le pouvoir réducteur des extraits et leur composition en phénoliques totaux indique que les composés phénoliques contribuent pour environ 96 % à l'activité antioxydante des extraits. Des résultats similaires ont été obtenus sur les extraits de certaines plantes (Katalinic *et al.*, 2006), cependant une corrélation négative ($R = - 0,65$) a été obtenue entre le pouvoir réducteur et la composition en flavonoïdes totaux des extraits. Cette corrélation montre que l'activité antioxydante de nos extraits n'est pas attribuable aux flavonoïdes.

Les valeurs des IC₅₀ des substances de référence à savoir l'acide gallique ($0,61 \pm 0,14$ µg/mL), la quercétine ($0,88 \pm 0,11$ µg/mL) et l'acide ascorbique ($1,8 \pm 0,43$ µg/mL), montrent que tous les extraits ont une capacité anti-oxydante significative car chaque extrait a présenté une IC₅₀ < 15 µg/mL, bien que les substances de références sont plus anti-radicalaires que nos extraits. La valeur du coefficient de corrélation ($r = 0,99$) entre la composition en phénoliques et DPPH suggère en plus que la forte capacité en antioxydants des extraits résulte essentiellement de la contribution des composés polyphénols ces extraits.

Des études antérieures, qui ont porté sur certains fruits et extraits de plantes, ont montré une corrélation positive et élevée entre phénoliques totaux et activité antiradicalaire (Cai *et al.*, 2005; Ivanova *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2003; Meda *et al.*, 2005; Miliuskas *et al.*, 2004; Rice-Evans *et al.*, 1996; Sawadogo *et al.*, 2006).

Dans la présente étude, les plus fortes activités anti-oxydantes obtenues avec les extraits de *I. colutea* et de *I. tinctoria* peuvent être attribuées en partie à l'acide gallique, la rutine, la myricétine qui sont des composés reconnus pour leur forte activité anti-oxydante.

Les résultats sur l'inhibition des radicaux cations ABTS traduisent, une fois de plus, la forte capacité de l'extrait de *I. colutea* à inhiber le radical cation ABTS plus que les extraits des autres espèces étudiées. Les activités antioxydantes des différentes espèces du genre *Indigofera* peuvent être attribuées en partie à leur composition en acide gallique, rutine et myricétine, composés reconnus pour leur forte activité antioxydante.

La forte teneur en composés phénoliques des extraits des espèces étudiées contribue en grande partie à leur activité antioxydante. Ces résultats sont confirmés par les coefficients de corrélation obtenus entre les phénoliques totaux et les activités anti-oxydantes, ABTS ($r = 0,92$; $P < 0,005$); DPPH ($r = 0,99$; $P < 0,001$); FRAP ($r = 0,95$; $P < 0,005$). De ces résultats nous pouvons déduire que les phénoliques totaux contribuent pour au moins 91% dans l'activité antioxydante des extraits de plantes étudiées. Le reste d'activité antioxydante (9 %) est attribuable à d'autres composés. D'autres études sur les extraits des plantes avaient abouti à la même conclusion (Zheng and Wang, 2001).

Des études antérieures ont démontré l'implication du stress oxydatif dans l'étiologie de certaines maladies dont le cancer et les maladies inflammatoires et neuro-dégénératives (Bonnefoy *et al.*, 2002). Certains auteurs ont suggéré l'utilisation des antioxydants dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (Huang *et al.*, 2005). Partant de ces observations, combattre le stress oxydatif peut aussi contribuer à combattre le cancer, les inflammations et les maladies neuro-dégénératives; or dans la présente étude certains extraits se sont montrés très antioxydants. C'est le cas de l'extrait de *I. colutea*, *I. tinctoria* et de *I. nigritana*. Ces extraits ont montré des activités intéressantes avec les trois méthodes utilisées (FRAP, DPPH et ABTS), les trois espèces peuvent donc être des sources des composés antioxydants. *I. tinctoria* qui a fait l'objet des études approfondies est bien un exemple car de cette plante, a été isolée l'indirubine, un composé qui a montré des résultats dans la lutte contre les leucémies (Han, 1994). Les roténoïdes ont aussi été isolés dans cette espèce (Kamal et Mangla, 1993). L'activité antioxydante et inhibitrice de la lipoxigénase des roténoïdes a été démontrée (Wangensteen *et al.*, 2006).

I.3. Conclusion partielle

La présente étude a montré que les espèces du genre *Indigofera*, grâce aux polyphénols qu'elles contiennent, ont chacune montré des activités anti-oxydantes intéressantes. Ainsi, que ce soit par la méthode de DPPH ou ABTS, les extraits de *I. colutea*, *I. tinctoria* et *I. nigritana* ont présenté les plus fortes capacités anti-radicalaires. Les extraits de ces plantes ont montré le plus fort pouvoir réducteur vis à vis du Fe^{3+} .

La composition en phénoliques totaux a montré une très bonne corrélation avec le pouvoir réducteur, l'inhibition du DPPH et la réduction de ABTS. Ces corrélations suggèrent que les composés phénoliques contribuent ainsi à la capacité antioxydante des *Indigofera*.

Il ressort que les *Indigofera* étudiés, d'après leurs activités anti-oxydantes liées à leur composition en phénoliques représentent une bonne source de drogue à activité anti-oxydante.

Dans l'hypothèse de vérifier le rôle des composés antioxydants, en particulier les composés polyphénoliques, dans la prévention et le traitement de l'inflammation et d'autres maladies liées aux stress oxydatifs parmi lesquelles la maladie d'Alzheimer et la goutte, des études portant sur l'inhibition des enzymes dont l'étiologie est liée à ces maladies sont réalisées "in vitro". En plus l'activité antibactérienne de ces extraits a été vérifiée.

II. ACTIVITES ENZYMATIQUES

II.1. Résultats

Les résultats sur l'inhibition des enzymes sont consignés dans le tableau 14.

Tableau 14: Activités inhibitrices d'enzymes des extraits de cinq *Indigofera* (100 µg/mL) et des substances de références

Extraits (100 µg/mL)	AChE	CE	LOX	XO
<i>I. colutea</i>	32,24 ± 2,10 ^a	11,11 ± 3,51 ^c	56,61 ± 2,83 ^a	15,19 ± 5,25 ^d
<i>I. macrocalyx</i>	14,77 ± 0,87 ^b	25,73 ± 4,42 ^a	51,18 ± 9,53 ^{a,b}	77,33 ± 7,57 ^a
<i>I. nigritana</i>	36,06 ± 3,67 ^a	22,22 ± 05,36 ^a	41,11 ± 1,03 ^{b,c}	37,45 ± 1,43 ^{b,c}
<i>I. pulchra</i>	7,56 ± 1,08 ^c	16,23 ± 4,64 ^b	39,25 ± 3,22 ^c	33,33 ± 4,58 ^c
<i>I. tinctoria</i>	7,29 ± 1,020 ^c	2,34 ± 4,05 ^d	40,09 ± 0,67 ^c	42,42 ± 1,05 ^b
<i>Galanthamine</i> (0,20 µg/mL)	50 ± 1,21			
<i>Quercétine</i> (50 µg/mL)			32,55 ± 2	
<i>Allopurinol</i> (10 µg/mL)				36,54 ± 3,85

AChE: acétylcholinestérase; CE: Carboxylestérase; LOX: lipoxigénase; XO: xanthine oxydase; nd: non déterminé;

Chaque résultat contitue la moyenne des trois valeurs obtenues (n = 3).

Les lettres différentes dans la même colonne indique des differnces significatives (p<0,05)

La meilleure activité inhibitrice de l'AChE à 100 µg/mL est obtenue avec l'extrait de *I. nigritana* (36.06 ± 3.67 %) suivi par celui de *I. colutea* (32.24 ± 2.10%). A la même concentration, les extraits de *I. macrocalyx*, de *I. pulchra* et de *I. tinctoria* ont présenté des

faibles pourcentages d'inhibition avec respectivement $14.71 \pm 0.87 \%$; $7.56 \pm 1.08 \%$ et $7.29 \pm 1.02 \%$. Par contre, la galanthamine à $0,20 \mu\text{g/mL}$ donne 50% d'inhibition.

L'inhibition de la carboxylestérase par les extraits révèle que les meilleurs pourcentages d'inhibition sont obtenus respectivement par les extraits de *I. macrocalyx* ($27,39 \pm 2,03$) et de *I. nigritana* ($22,22 \pm 2,03$). *I. pulchra*, *I. colutea* et *I. tinctoria* ont donné des inhibitions faibles avec respectivement $15,35 \pm 1,75$; $11,11 \pm 1,01$ et $2,34 \pm 1,01 \%$.

Sur la lipoxycgénase, les extraits de quatre espèces sur les cinq ont donné des pourcentages d'inhibition supérieurs à 30% . *I. macrocalyx* avec $77,33 \pm 7,57 \%$ a donné la meilleure inhibition suivi de *I. tinctoria* ($42,42 \pm 1,05 \%$), *I. nigritana* ($37,45 \pm 1,43 \%$) et *I. pulchra* ($33,33 \pm 4,58 \%$). *I. colutea* a donné la plus faible inhibition ($15,19 \pm 5,25 \%$). A $50 \mu\text{g/mL}$, la quercétine donne $32,55 \%$ d'inhibition.

Les résultats de l'inhibition de la xanthine oxydase, par les différents extraits, sont consignés dans le tableau 14. Parmi les cinq extraits qui ont été testés, quatre ont donné des pourcentages d'inhibition supérieurs à 30% pour une concentration finale de $100 \mu\text{g/mL}$. Il ressort que les pourcentages d'inhibition varient de $15,19 \pm 5,25$ (*I. colutea*) à $77,33 \pm 7,57$ (*I. macrocalyx*). *I. tinctoria*, *I. nigritana* et *I. pulchra* ont donné respectivement $42,42 \pm 1,05$; $37,45 \pm 1,43$ et $33,33 \pm 4,58 \%$. A $10 \mu\text{g/mL}$, l'Allopurinol donne $36,54 \%$ d'inhibition.

II.2. Relation entre activité enzymatique, composés polyphénolique et activité antioxydante

Notre hypothèse doit prouver le rôle des composés d'antioxydants, en particulier des composés phénoliques, des flavonoïdes et des flavonols dans la prévention ou le traitement de l'inflammation, de la goutte et d'autres maladies liées aux stress oxydatifs tel que la maladie d'Alzheimer par leur inhibition des enzymes impliquées à savoir la xanthine oxydase (XO), la lipoxycgénase (LOX) et l'acétylcholinestérase (AChE).

Les coefficients de corrélations (R^2) obtenus entre ces différents paramètres sont représentés sur les figures 28, 29, 30 et 31.

La figure 28 représente les corrélations (R^2) obtenues entre les phénoliques totaux et le pourcentage d'inhibition des enzymes testées. Les valeurs de R^2 varient entre $0,5134$ et $0,1978$. Le coefficient de corrélation est négatif avec la XO et positif avec la LOX et l'AChE

avec respectivement $R^2 = 0,1978$ avec la XO $R^2 = 0,3781$ avec LOX et $R^2 = 0,5134$ avec AChE.

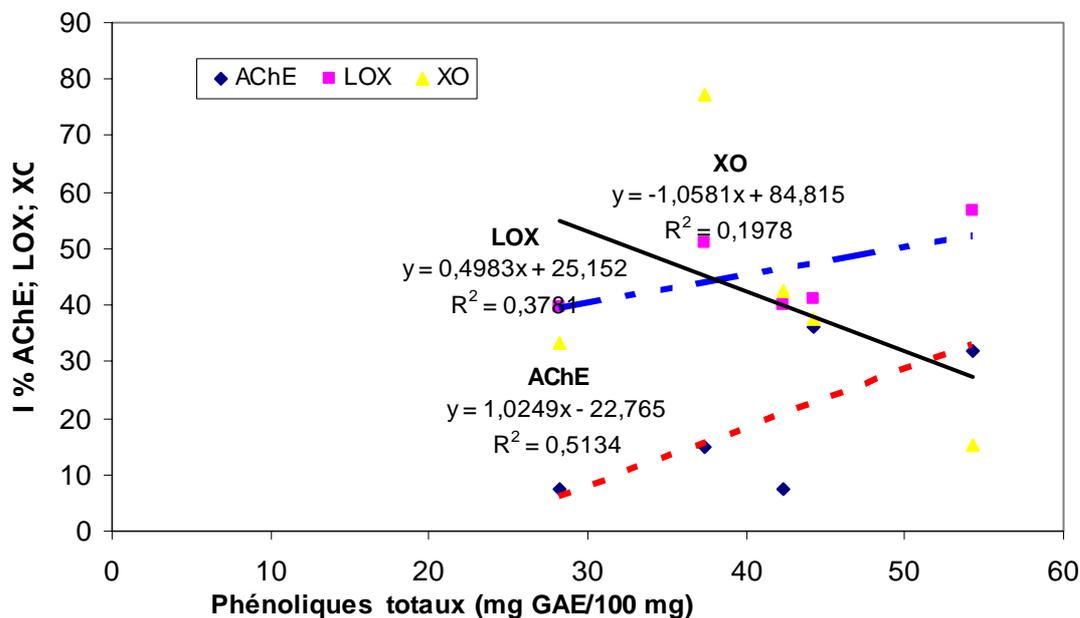


Figure 28: Corrélations entre phénoliques totaux et le pourcentage d'inhibition.

AChE: acétylcholinestérase; LOX: lipoxigénase; XO: xanthine oxydase; I%: pourcentage d'inhibition.

La figure 29 représente les corrélations (R^2) obtenues entre les flavonoïdes totaux et le pourcentage d'inhibition des enzymes testées. Les valeurs de R^2 varient entre 0,2907 et 0,0172. Le coefficient de corrélation est négatif avec LOX et positif avec la l'AChE et la XO avec respectivement $R^2 = 0,0172$ avec LOX, $R^2 = 0,061$ avec l'AChE et $R^2 = 0,5134$ avec la XO.

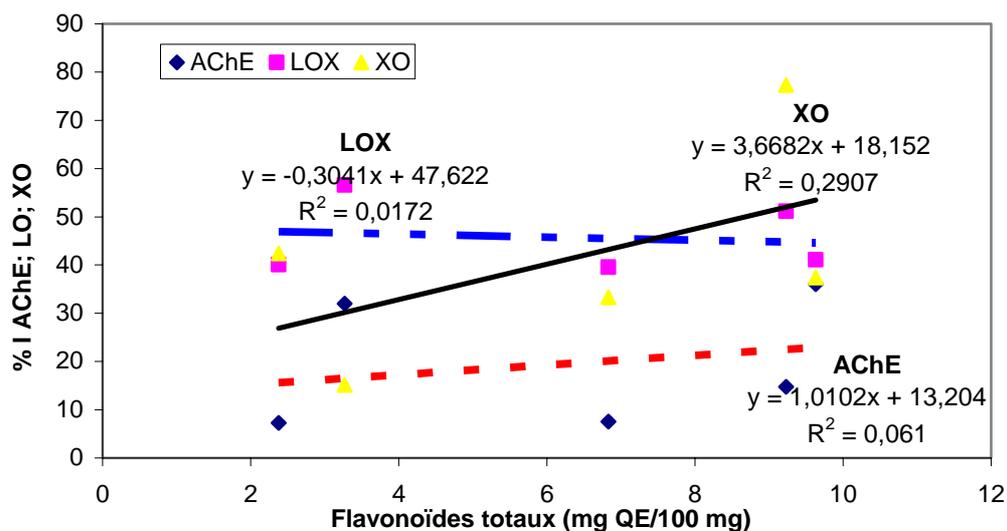


Figure 29: Corrélations entre flavonoïdes totaux et pourcentage d'inhibition.

AChE: acétylcholinestérase; LOX: lipoxygénase; XO: xanthine oxydase; %: pourcentage d'inhibition;

La figure 30 représente les corrélations (R^2) obtenues entre les flavonols et le pourcentage d'inhibition des enzymes testées. Les valeurs de R^2 varient entre 0,0441 et 0,9052. Le coefficient de corrélation est négatif avec la l'AChE et positifs avec la LOX et XO avec respectivement $R^2 = 0,0541$ avec l'AChE; $R^2 = 0,0441$ avec LOX et $R^2 = 0,9052$ avec la XO.

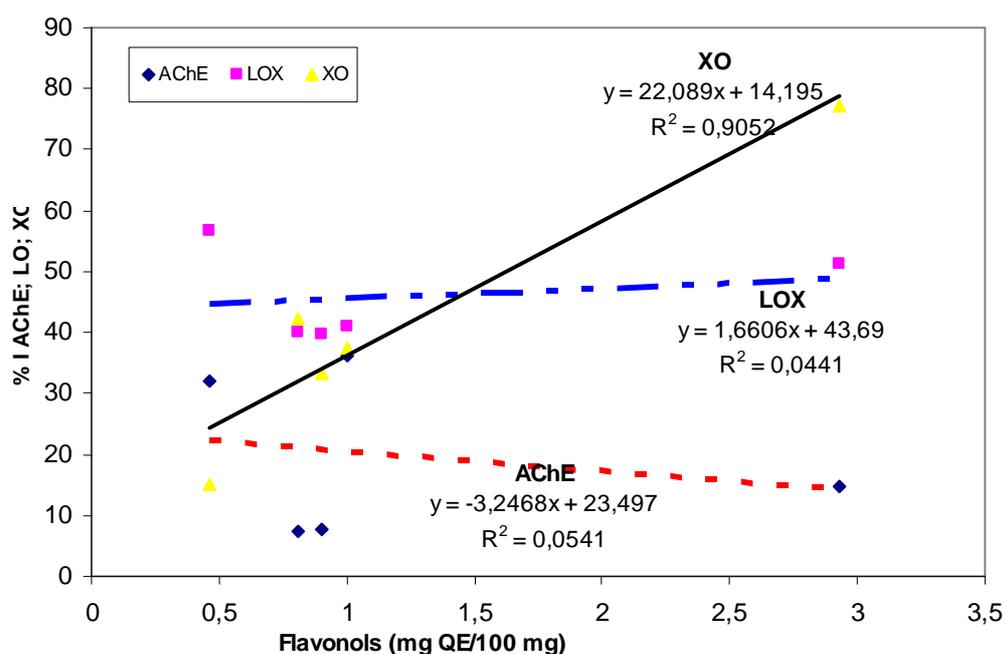


Figure 30: Corrélations entre flavonols et pourcentage d'inhibition

AChE: acétylcholinestérase; LOX: lypoxigénase; XO: xanthine oxydase; I%: pourcentage d'inhibition.

La figure 31 représente les corrélations (R^2) obtenues entre les corrélations entre la capacité antioxydante des extraits et le pourcentage d'inhibition des enzymes testées. Les valeurs de R^2 varient entre 0,2347 et 0,1812. Le coefficient de corrélation est négatif avec la XO et positif avec la LOX et l'AChE avec respectivement $R^2 = 0,3317$ avec la XO $R^2 = 0,2347$ avec LOX et $R^2 = 0,1812$ avec AChE.

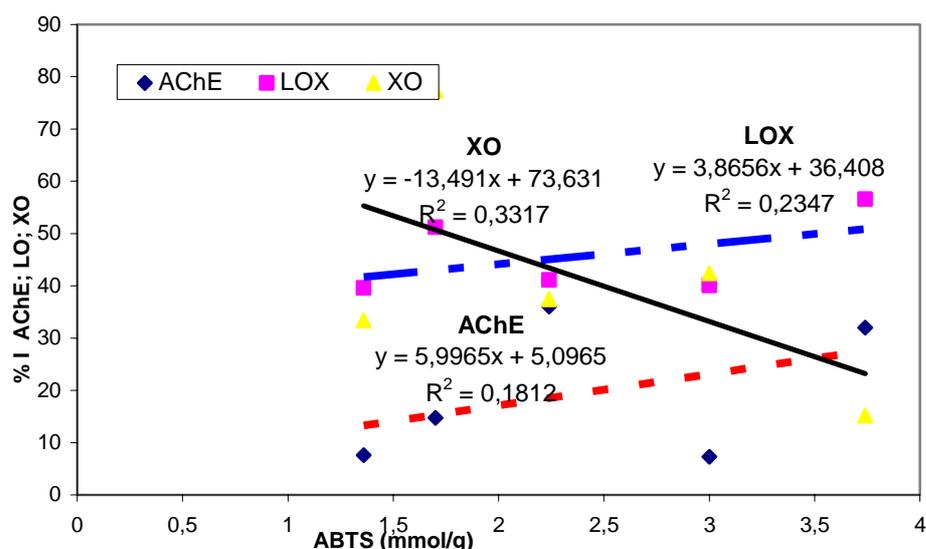


Figure 31: Corrélations entre capacité antioxydante des extraits et pourcentage d'inhibition.

AChE: acétylcholinestérase; LOX: lypoxigénase; XO: xanthine oxydase; I: inhibition

D'autres part, des corrélations négatives ont été obtenues entre les phénoliques totaux, et les pourcentages d'inhibition de la CE ($R^2 = 0,4624$), tandis que celles obtenues avec les flavonoïdes et les flavonols totaux sont positifs (0,4624 et 0,9025).

II.3. Discussion

Des études récentes ont lié la maladie d'Alzheimer à un processus inflammatoire induit par des substances oxygénées réactives (Vina *et al*, 2004).

Le stress oxydatif intervient, pour une part, dans la physiopathologie de la dégénération neuronale. Ces arguments sont en faveur de la présence d'un stress oxydant en liaison avec la maladie d'Alzheimer. S'agissant de cette maladie, on note une croissance de peroxydation lipidique, de l'oxydation des protéines et de l'oxydation de l'ADN nucléaire et mitochondrial

dans le cerveau du patient. Plusieurs raisons peuvent l'expliquer, la particulière sensibilité du cerveau au stress oxydant. Aussi le métabolisme de l'oxygène est intense dans le cerveau conduisant à une production importante des EOR alors que la concentration en antioxidant (G-SH, SOD, GPx et catalase) y est faible sans oublier que les cellules nerveuses ne se répliquent pas, d'où l'accumulation des dommages sur l'ADN. Or l'hydrolyse de l'acétylthiocholine, substrat de l'acétylcholinestérase, est un facteur qui est en faveur de cette dégénérescence neurale. Donc les extraits qui inhibent cette enzyme aideraient à lutter contre la maladie d'Alzheimer.

Ainsi parmi les extraits soumis à cette étude, *I. nigritana* et *I. colutea* ont donné les meilleures inhibitions. Or les dosages des phénoliques totaux des extraits de ces plantes ont montré que ces plantes sont riches en phénoliques que les autres espèces étudiées. Ces résultats laissent présager que les phénoliques sont de bons inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. Ces résultats sont en accord avec ceux des travaux de Lopez *et al.*, (2002). Les coefficients de corrélations positives obtenues entre les pourcentages d'inhibition de l'acétylcholinestérase et les teneurs des extraits en phénoliques totaux, flavonoïdes (respectivement $R^2 = 0,5134$; $R^2 = 0,061$) confirment cette hypothèse. Les extraits, en particulier ceux de *I. colutea* et *I. nigritana*, peuvent donc être sources de drogues pour traiter la maladie d'Alzheimer et même contre les insectes quand on sait que cette enzyme, à travers son rôle neurotransmetteur, intervient aussi dans la résistance des insectes. En effet l'AChE est une des cibles des insecticides organophosphates et carbamates. La toxicité des insecticides est due à une inhibition progressive de l'AChE dans les tissus nerveux conduisant à l'accumulation de l'acétylcholine d'où la neurotoxicité (Yi *et al.*, 2006).

Les carboxylestérases (CE) représentent la famille des estérases qui hydrolysent une large variété de substrats comprenant les drogues thérapeutiques et les xenobiotiques. Ces enzymes (EC 3.1.1) constituent un groupe hétérogène d'isozymes qui catalysent l'hydrolyse d'une large variété des esters xenobiotiques, des amides et des thioesters. Ces composés sont dominants dans le foie et jouent un rôle important dans le métabolisme et la détoxification des xenobiotiques ainsi que les composés endogènes. Il est aussi reconnu qu'ils ont un rôle protecteur contre la toxicité des organophosphorés (OPs).

A travers ces observations, si la carboxylestérase joue un rôle important dans la détoxification des insecticides organophosphorés comme l'ont confirmé plusieurs auteurs (Djeridane *et al.*, 2008), les drogues qui inhibent cette enzyme renforceraient l'activité des insecticides du fait que l'enzyme s'oppose à la toxicité des insecticides chez les insectes. Parmi nos extraits *I.*

macrocalyx et *I. nigritana* sont respectivement de bons inhibiteurs. Or ce sont ces mêmes extraits qui ont présenté les meilleures teneurs en flavonoïdes et flavonols. C'est dire que parmi les polyphénols, les flavonoïdes et mieux encore les flavonols sont les meilleurs inhibiteurs de la carboxylestérase (CE). Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres types d'extraits (Djeridane *et al.*, 2007). En plus les coefficients de corrélation positifs obtenus avec les flavonoïdes ($R = 0,98$) où les flavonols représentent à eux seuls 68 % des flavonoïdes confirment ces résultats.

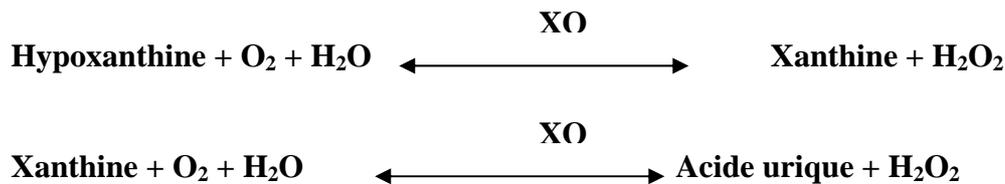
L'activité anti-inflammatoire des différents extraits testés, est évaluée en mesurant le pourcentage d'inhibition de la lipoxigénase. La lipoxigénase est une enzyme qui intervient dans les phénomènes de l'inflammation dont le substrat dans l'organisme est l'acide arachidonique. En effet la libération de l'acide arachidonique par les membranes cellulaires catalysée par la phospholipase A₂ ainsi que son futur métabolisme catalysé par la cyclo-oxygénase et la lipoxigénase engendre une large série du processus inflammatoire.

La lipoxigénase synthétise les leucotriènes et les lipoxines à partir de l'acide arachidonique en induisant le processus anti-inflammatoire. Les leucotriènes et les lipoxines sont de puissants régulateurs de plusieurs dysfonctionnements dans l'organisme. Un mélange de leucotriènes est 100 à 1000 fois plus puissant que l'histamine et les prostaglandines comme constricteur de la musculature de l'oropharynx. Les leucotriènes (avec le leucotriène B₄) augmentent la perméabilité vasculaire. L'attraction et l'activation des leucocytes semblent être des régulateurs importants dans le cas de nombreuses maladies impliquant des réactions d'hypersensibilité inflammatoire ou immédiate comme l'asthme. Les leucotriènes sont vaso-actifs. La prostaglandine fait partie des médiateurs qui produisent les douleurs de l'inflammation, l'inhibition de la biosynthèse des médiateurs de l'inflammation bloquant les activités de ces enzymes, peut être un important traitement de beaucoup des maladies inflammatoires débutantes. Le substrat utilisé pour l'inhibition dans la présente étude "*in vitro*" est l'acide linoléique.

Il ressort que les extraits de *I. colutea* et *I. macrocalyx* qui ont donné des pourcentages d'inhibition supérieurs à 50 %, inhibent mieux la lipoxigénase que les autres extraits. Il faut noter que *I. colutea* plus riche en polyphénols encore plus antioxydant, a présenté la meilleure inhibition, inhibition qui peut être attribuée à l'acide gallique et l'acide caféique identifiés dans l'extrait de cette plante et reconnu comme composé anti-inflammatoire (Bakasso *et al.*, 2008; Raj Narayana *et al.*, 2001). *I. macrocalyx* riche en flavonoïdes mais plus riches en flavonols, montre que les flavonoïdes sont aussi des bons inhibiteurs de la lipoxigénase. Cette inhibition

peut surtout être due à la présence de la myricétine (flavonol), révélée dans l'extrait de cette plante (Bakasso *et al.*, 2008; Raj Narayana *et al.*, 2001).

La xanthine oxydase (XO) 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 en produisant des espèces oxygénées réactives (radicaux superoxydes et peroxyde d'hydrogène) :



La xanthine oxydase est impliquée dans l'étiologie de la goutte qui se caractérise par le dépôt de l'acide urique au niveau des articulations ce qui conduit ainsi aux inflammations. On peut donc bloquer la production de l'acide urique en inhibant la xanthine oxydase et par voie de conséquence remédier au problème de la goutte (Kong *et al.*, 2000; Owen *et al.*, 1999).

La xanthine oxydase 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 la vieillesse, le cancer, les inflammations et l'athérosclérose.

Chez l'homme, la xanthine oxydase est normalement retrouvée dans le foie et est absente dans le sang. Pendant les dommages sévères du foie, la xanthine oxydase est libérée dans le sang, ainsi rechercher la XO dans le sang est une voie de confirmation ou non de l'existence des dommages du foie.

Les résultats sur l'inhibition de la XO, révèlent que l'extrait de *I. macrocalyx*, avec une inhibition supérieure à 70 %, est le meilleur inhibiteur parmi les cinq extraits testés. Cette activité peut être liée à la présence des flavonoïdes qui se sont montrés des meilleurs inhibiteurs de la xanthine oxydase (Cos *et al.*, 1998). La plante constitue donc une source de drogues anti-XO. L'allopurinol est un inhibiteur de référence de la XO, il est utilisé dans le traitement de la goutte cependant il présente des effets secondaires.

Les composés retrouvés chez les espèces étudiées, inhibiteurs de la XO peuvent être des véritables potentiels biologiques dans le traitement de la goutte ou d'autres maladies induites par la XO (Sweeney *et al.*, 2001).

Il est aussi reconnu que les inhibiteurs de la xanthine oxydase peuvent être utilisés dans le traitement des hépatites et des tumeurs du cerveau.

Les coefficients de corrélation obtenus entre les teneurs en composés polyphénoliques des extraits et les pourcentages d'inhibition montre que les phénoliques totaux sont des bons inhibiteurs de la LOX et de l'AChE ($R^2 = 0,3781$ et $R^2 = 0,5134$ respectivement). La XO est inhibée par les flavonoïdes ($R^2 = 0,2907$) et en particulier par les flavonols ($R^2 = 0,9052$).

Les coefficients des corrélations obtenues entre les teneurs en composés polyphénoliques des extraits et les pourcentages d'inhibition montrent que les phénoliques totaux sont des bons inhibiteurs de la LOX et de l'AChE. Les corrélations entre les capacités antioxydantes et les pourcentages d'inhibition de ces enzymes montrent de façon spécifique que la LOX et l'AChE ($R^2 = 0,2347$ avec LOX, et $R^2 = 0,1812$ avec AChE) sont mieux inhibées par les composés antioxydants contrairement à la XO et la CE qui sont mieux inhibées par les flavonoïdes mieux encore par les flavonols ($R^2 = 0,9052$ avec la XO et $R^2 = 0,9052$).

II.4. Conclusion partielle

La présente étude nous a permis de vérifier le rôle des composés antioxydants dans l'inhibition des enzymes testées. Les pourcentages d'inhibition sont variables d'une espèce à une autre. Sur la LOX, tous les extraits ont un pourcentage d'inhibition supérieur à 35 %, il en est de même avec la XO où c'est seulement *I. colutea* qui a donné une inhibition faible (15 %). *I. macrocalyx* et *I. nigriflora* se sont montrés meilleurs inhibiteurs de CE, tandis que *I. colutea* et *I. nigriflora* le sont avec AChE.

A travers les coefficients de corrélations obtenues entre les polyphénols totaux et les inhibitions enzymatiques, il ressort que l'activité enzymatique est fonction de la richesse des extraits en composés phénoliques, mieux encore avec les composés antioxydants.

Ainsi, en se basant sur les deux premières valeurs de pourcentage d'inhibition on peut retenir respectivement *I. macrocalyx* et *I. tinctoria* pour l'inhibition de la XO; *I. colutea* et *I. macrocalyx* pour l'inhibition la LOX; *I. macrocalyx* et *I. nigriflora* pour l'inhibition de la CE et *I. nigriflora* et *I. colutea* pour l'inhibition de l'AChE.

En tenant compte de ces inhibitions, les extraits de *I. macrocalyx* et *I. colutea* présentent des potentialités dans le traitement des inflammations car bons inhibiteurs de la LOX et l'extrait de *I. macrocalyx* présente en plus une bonne potentialité pour le traitement de la goutte car meilleur inhibiteur de la XO.

III. ACTIVITES ANTI-BACTERIENNES

III.1. Résultats

Dans la présente étude, trois des cinq bactéries utilisées (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*) sont des Gram négatifs et deux sont des Gram-positifs (*Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*). Les tests de sensibilités des nos extraits de plantes vis-à-vis de ces microorganismes nous ont permis d'abord de déterminer les diamètres d'inhibition de chaque extrait. Les résultats sur les zones d'inhibition sont consignés dans le tableau 15. Aucune zone d'inhibition n'a été constatée autour des disques imprégnés de DMSO 10 %. Ces résultats indiquent que les zones d'inhibitions sont variables d'une espèce bactérienne à une autre et d'un extrait à un autre.

Si on considère les bactéries Gram négatifs, nous obtenons des diamètres d'inhibition qui varient entre 10 ± 00 et 16 ± 1 mm. Les meilleurs diamètres sont obtenus avec l'extrait de *I. colutea* qui a donné 16 ± 1 et $15,67 \pm 1,15$ mm respectivement pour *Salmonella typhimurium* et *Proteus mirabilis*, il est suivi, pour les mêmes espèces bactériennes, par *I. tinctoria* et *I. macrocalyx* avec respectivement 14 ± 1 et $14,3 \pm 0,58$; et 15 ± 2 et $12,67 \pm 0,58$ mm. Avec *Escherichia coli*, le meilleur diamètre est obtenu avec *I. macrocalyx* ($12,67 \pm 0,58$) suivi de *I. nigrimana* ($12,00 \pm 1$) et *I. pulchra* ($11,33 \pm 1,53$).

Le test sur les bactéries Gram-positifs montre que les diamètres d'inhibition varient entre $10,33 \pm 0,58$ (*I. nigrimana*) et $15,67 \pm 1,53$ (*I. macrocalyx*). Il ressort que les deux espèces sont plus sensibles avec *I. macrocalyx*, *I. tinctoria* et *I. colutea*. Par exemple avec *Bacillus cereus* *I. macrocalyx*, *I. tinctoria* et *I. colutea* donnent respectivement $15,33 \pm 1,15$; $14,33 \pm 0,58$ et 14 ± 1 . Les diamètres d'inhibition sur *Staphylococcus aureus* sont de l'ordre de $15,67$; $14,67$ et $13,67$ respectivement pour *I. macrocalyx*, *I. colutea* et *I. tinctoria*. Les plus faibles diamètres sont obtenus avec *I. pulchra* et *I. nigrimana* sur les deux bactéries Gram positifs.

Les moyennes des diamètres d'inhibition de chaque extrait sur l'ensemble des souches sont indiquées dans le tableau 16, elles varient entre 11,67 mm et 14,35 mm, et sont classées suivant l'ordre d'inhibition décroissant: *I. macrocalyx* > *I. tinctoria* > *I. colutea* > *I. nigrimana* > *I. pulchra*. D'autre part, les diamètres d'inhibition des extraits sur chaque souche bactérienne

varient entre 11,27 mm et 14,73 mm. Ces résultats montrent que les diamètres d'inhibition sont plus élevés sur les gram positifs que sur les gram négatifs.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) consignées dans le tableau 17, varient entre 9,37 et 18,75 mg/mL. Ces résultats démontrent une activité antibactérienne de tous les extraits à la fois sur les bactéries à Gram positifs et à gram négatifs. L'activité de *I. colutea* est comparable à celle de l'extrait de *I. macrocalyx* et de *I. tinctoria*. Ainsi, pour ces extraits, nous avons obtenu des valeurs de CMI de 9,37 mg/mL pour *E. coli*, pour *S. typhimurium* et *P. mirabilis*. Il est de 9,37 mg/mL pour *B. cereus* avec *I. tinctoria* alors que la même souche se montre moins sensible avec *I. macrocalyx* et *I. colutea* (18,75 mg/mL), de 9,37 mg/mL pour *S. aureus* avec *I. colutea* et *I. macrocalyx* et de 18,75 mg/mL pour *S. aureus* avec *I. tinctoria*.

Les concentrations minimales bactéricides (CMB), elles varient entre 18,75 et 75 mg/mL (Tableau 15). Les rapports CMB/MIC, pour tous nos extraits varient entre 1 et 8. De façon spécifique ces rapports sont entre 1 et 4 sur les quatre souches à savoir *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus* et *B. cereus*. Il est compris entre 4 et 8 avec *E. Coli*.

Tableau 15: Diamètre d'inhibition (mm) de cinq espèces d'*Indigofera* , CMI, CMB et CMB/CMI (n = 3).

Activités	Extraits	Gram négatifs			Grams positifs		Moy./ extrait
		<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	
Diamètre (mm)	<i>I. colutea</i>	10	16	12	14	14,67	13,33
	<i>I. macrocalyx</i>	12,67	15	13	15,33	15,67	14,35
	<i>I. nigritana</i>	12,00	14	13,33	12,67	10,33	12,47
	<i>I. pulchra</i>	11,33	13	10	11,67	12,33	11,67
	<i>I. tinctoria</i>	10,33	15,67	14	14,33	13,67	13,60
	Moy./ bactérie	11,27	14,73	12,47	13,42	13,33	
	Ampi	>53	>53	>53	R	R	
	Péni	>53	>53	>53	R	R	
CMI (mg/mL)	<i>I. colutea</i>	9,37	9,37	9,37	18,75	9,37	
	<i>I. macrocalyx</i>	9,37	9,37	9,37	18,75	9,37	
	<i>I. nigritana</i>	9,37	18,75	9,37	9,37	9,37	
	<i>I. pulchra</i>	9,37	18,75	9,37	9,37	9,37	
	<i>I. tinctoria</i>	9,37	9,37	9,37	9,37	18,75	
	Ampi	<1,171	<1,171	<1,171	-	-	
	Péni	<1,171	<1,171	<1,171	-	-	
CMB (mg/mL)	<i>I. colutea</i>	37,5	18,75	37,5	18,75	18,75	
	<i>I. macrocalyx</i>	75	37,5	18,75	37,5	37,5	
	<i>I. nigritana</i>	75	75	75	37,5	37,5	
	<i>I. pulchra</i>	75	37,5	75	37,5	37,5	
	<i>I. tinctoria</i>	37,5	37,5	18,75	18,75	18,75	
	Ampi	<1,171	<1,171	<1,171	-	-	
	Péni	<1,171	<1,171	<1,171	-	-	
CMB/CMI	<i>I. colutea</i>	4	2	4	1	2	
	<i>I. macrocalyx</i>	8	4	2	2	4	
	<i>I. nigritana</i>	8	4	4	4	4	
	<i>I. pulchra</i>	8	4	4	4	4	
	<i>I. tinctoria</i>	4	4	1	2	1	
	Ampi	1	1	1	-	-	
	Pénicilline	1	1	1	-	-	

CMI: concentration minimale inhibitrice; CMB: concentration minimale bactéricide

Le tableau 16 montre les corrélations obtenues entre les polyphénols et les souches bactériennes testées.

Tableau 16: Coefficient de corrélation (r) entre les polyphénols et les souches bactériennes

	Phénoliques totaux	Tanins totaux	Flavonoïdes Totaux	Flavonols totaux
<i>E. coli</i>	- 0,49	- 0,51	0,95	0,80
<i>P. mirabilis</i>	0,81	0,55	- 0,70	-0,18
<i>S. typhimurium</i>	0,78	0,66	- 0,61	-0,04
<i>S. aureus</i>	0,16	- 0,01	- 0,33	-0,47
<i>B. cereus</i>	0,40	0,39	- 0,16	-0,16

III. 2. Relation entre activité anti-batérienne, composés polyphénolique et activité antioxydante

La figure 32 représente les corrélations (R^2) obtenues entre les phénoliques totaux et activité antibactérienne sur les Gram négatifs. Les valeurs de R^2 varient entre 0,6120 et 0,2245. Le coefficient de corrélation est négatif avec *E. coli* et positif avec *S. typhi* et *P. mirabilis* avec respectivement $R^2 = 0,2547$ avec *E. coli* $R^2 = 0,6120$ avec *S. typhimurium* et $R^2= 0,2245$ avec *P. mirabilis*.

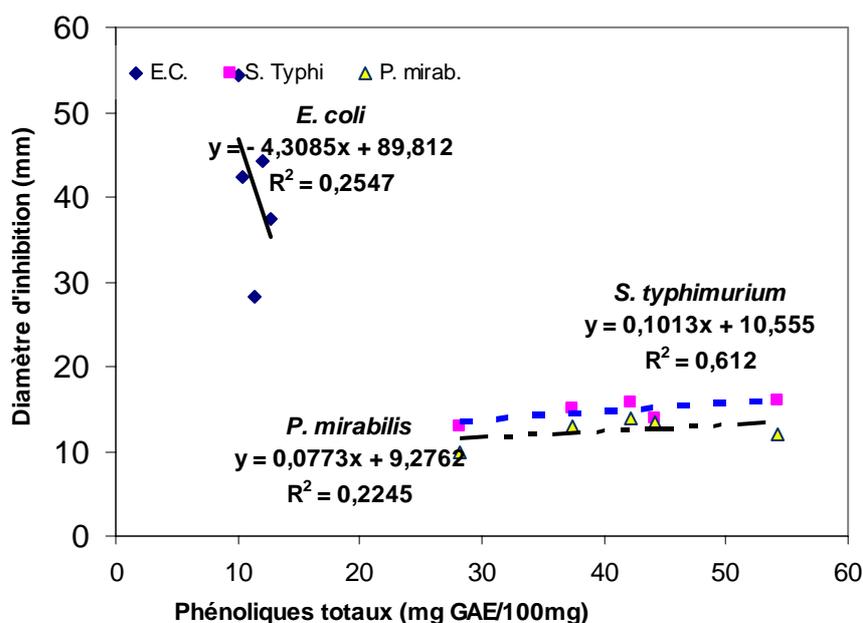


Figure 32: Corrélations entre phénoliques totaux et diamètre d'inhibition sur Gram négatifs

La figure 33 représente les corrélations (R^2) obtenues entre les phénoliques totaux et activité antibactérienne sur les Gram positifs. Les valeurs de R^2 varient entre 0,1563 et 0,0266. Tous les coefficients de corrélation sont positifs.

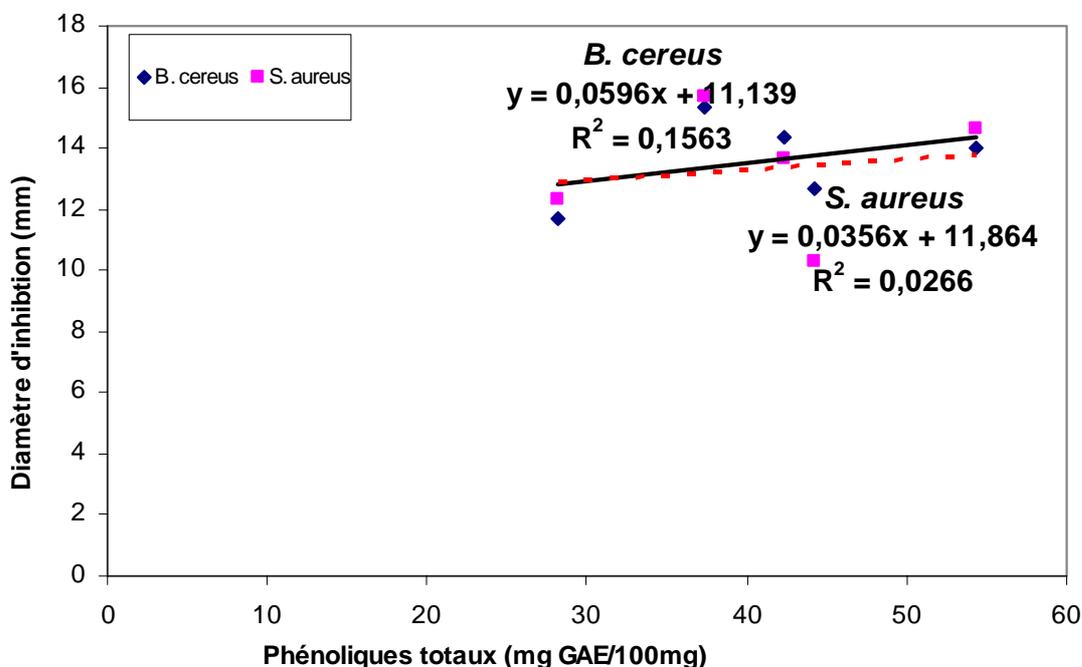


Figure 33: Corrélations entre phénoliques totaux et diamètre d'inhibition sur Gram positifs

Les figures 34 et 35 représentent les corrélations (R^2) obtenues entre les capacités antioxydantes (ABTS) et activité antibactérienne sur les Gram positifs et négatifs. Les valeurs de R^2 varient entre 0,6970 et 0,0543. Le coefficient de corrélation est négatif avec *E. coli* ($R^2 = 0,6260$), il est positif avec les autres espèces ($R^2 = 0,6970$ pour *S. typhimurium*; $R^2 = 0,1518$ pour *P. mirabilis*; $R^2 = 0,1186$ pour *B. cereus* et $R^2 = 0,0543$ pour *S. aureus*).

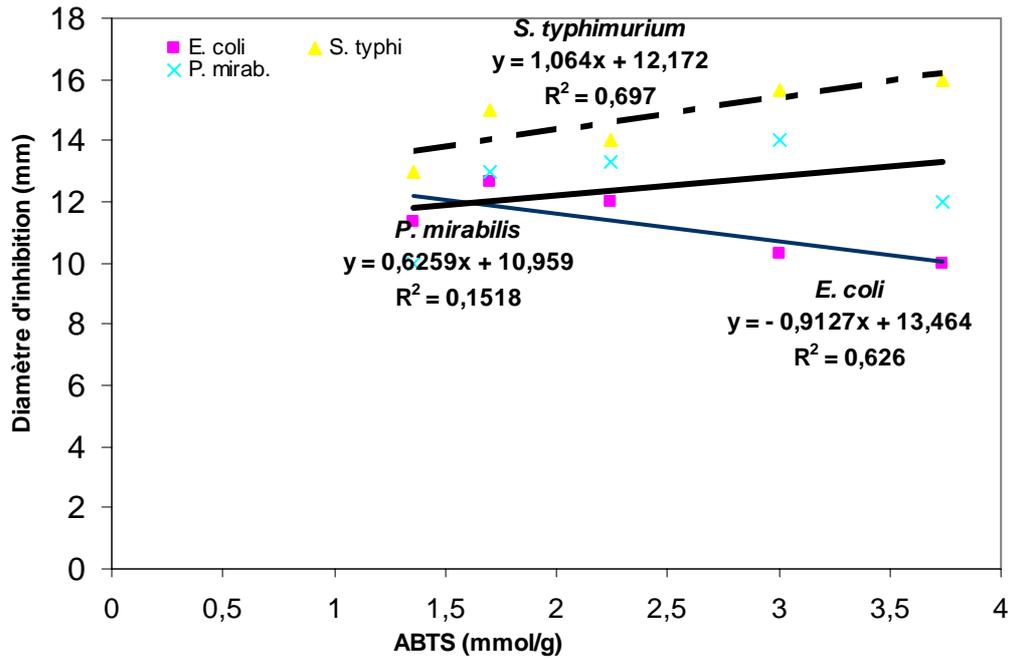


Figure 34: Corrélations entre capacité antioxydante et diamètre d'inhibition sur Gram négatifs

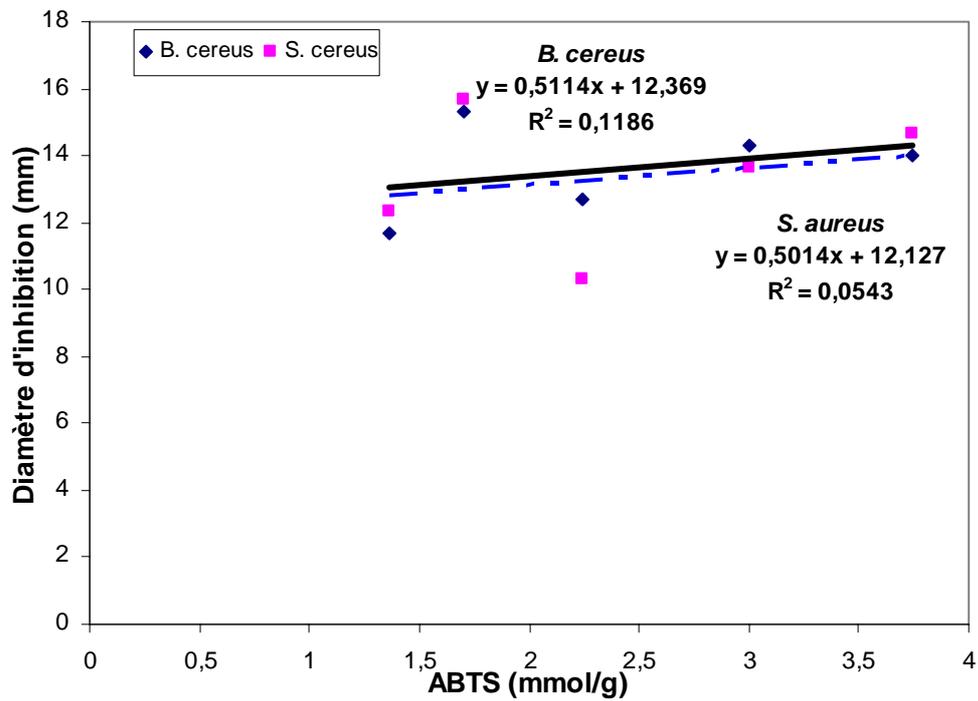


Figure 35: Corrélations entre capacité antioxydante et diamètre d'inhibition sur Gram positifs

III.3. Discussion

Les résultats de cette étude ont montré que les extraits acétoniques de *I macrocalyx*, *I. tinctoria* et *I. colutea* ont produit des zones d'inhibition plus grandes que les autres extraits sur les souches bactériennes gram-positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) ainsi que sur les bactéries Gram négatifs (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*). Nos extraits présentent, à cet effet, un large spectre d'activité antibactérienne.

Mieux encore la moyenne des diamètres d'inhibition de tous les extraits pour chaque souche bactérienne montre que les souches bactériennes Gram-positif sont plus sensibles que les Grams négatifs. De plus, le solvant utilisé pour dissoudre les résidus secs de ces extraits acétoniques n'a donné aucune zone d'inhibition.

Selon Gaillard *et al.*, (1991), quand le rapport CMB/CMI = 1 ou 2, on a un effet bactéricide et quand le rapport CMB/CMI ≥ 4 on a un effet bactériostatique. On peut dire qu'au vu de nos résultats, *I. colutea* a un effet bactéricide sur *B. cereus*, *S. typhimurium* et *S. aureus*, de même pour *I. macrocalyx* sur *B. cereus* et *P. mirabilis* et de *I. tinctoria* sur *B. cereus*, *P. mirabilis* et *S. aureus*. Cependant *I. colutea* et *I. tinctoria* ont présenté des effets bactériostatiques sur *E. coli* et *S. typhimurium*. Les mêmes effets ont été observés sur toutes les souches bactériennes en dehors de *E. coli* qui semble présenter une certaine résistance car c'est seulement *I. colutea* et *I. tinctoria* qui ont présenté seulement des effets bactériostatiques. A l'image de *E. coli*, les bactéries Gram négatif ont une enveloppe cellulaire (la double couche lipidique ou la couche de mureine) en comparaison avec les bactéries Gram positif, cela pourrait expliquer l'efficacité des extraits sur les Gram-positifs.

On peut expliquer ces résultats par la différence des polyphénols contenus dans extraits: le macéré hydroacétonique de *I. colutea* a une teneur plus élevée en composés phénoliques que les autres extraits et les polyphénols sont reconnus pour avoir une activité microbicide contre un très grand nombre de bactéries pathogènes.

Les composés phénoliques notamment les tanins sont susceptibles de polymérisation dans l'espace pendant les réactions d'oxydation, et cela pourrait être aussi un facteur de toxicité vis à vis des microorganismes. Cela peut s'expliquer par les bonnes corrélations obtenues entre les diamètres d'inhibition des extraits et les différentes souches surtout les Gram négatifs à l'exception de *E. coli*. ($r = -0,49$). On note cependant une bonne contribution des flavonoïdes et en particulier des flavonols dans l'inhibition de *E. coli*, avec respectivement

0,95 et 0,82 comme coefficients de corrélation. Si *I. macrocalyx* et *I. nigritana* sont inhibiteurs de *E. coli* c'est parce que les extraits de ces plantes sont plus riches en flavonoïdes.

Les corrélations sont négatives avec presque toutes les autres souches bactériennes que ce soit avec les flavonoïdes totaux ou avec les flavonols. En effet, en dehors de *E. coli* (0,82), seule *S. aureus* est inhibée en grande partie par les flavonols ($r = 0,47$).

Le mécanisme de toxicité des polyphénols contre les microbes pourrait être dû à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (protéases et carbohydrases) 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. Ces mécanismes d'inhibition peuvent se situer 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

L'activité antimicrobienne mise en évidence confirmerait l'utilisation thérapeutique de certaines *Indigofera* en médecine traditionnelle dans les cas de dermatoses et autres infections bactériennes (Nacoulma, 1996).

Nos résultats montrent aussi que tous les antibiotiques pharmaceutiques ont pratiquement un effet bactéricide vis-à-vis des souches bactériennes testées sauf sur *Bacillus cereus* et *S. aureus* qui sont résistantes; cela pourrait s'expliquer par l'élaboration d'enzymes tels que les β -lactamases par ces bactéries pouvant neutraliser l'effet de ces antibiotiques.

Enfin, retenons qu'au vu de ces résultats, qu'il existe une corrélation entre phénoliques totaux et activité anti-bactérienne, résultats en accord avec ceux obtenus par Shan *et al.* (2007). Les mêmes résultats sont obtenus entre capacité antioxydante et activité antibactérienne.

III.4. Conclusion partielle

La présente étude montre un large spectre d'activité antibactérienne des extraits des espèces étudiées car actifs sur les Gram-négatifs et les Gram-positifs. Il ressort que les bactéries Gram-positifs à savoir *Bacillus cereus* et *S. aureus* sont résistantes aux antibiotiques de références utilisés (pénicillines). Ces bactéries produisent des enzymes (β -lactamases) qui hydrolysent les pénicillines.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était d'étudier la phytochimie des extraits de cinq *Indigofera* et d'évaluer leurs activités biologiques en rapport avec leur utilisation en médecine traditionnelle.

L'étude histochimique a permis d'identifier des flavones et tanins dans le parenchyme cortical des tiges des *Indigofera*

Les études phytochimiques, ont permis de caractériser les principaux groupes chimiques à savoir les flavonoïdes, les acides phénols, les anthraquinones, les coumarines, les saponines, les tanins et les stérols et triterpènes. Cela permet de différencier par chimiotaxonomie *I. pulchra* des autres *Indigofera*

De façon spécifique, la CCM nous a permis d'identifier certains flavonoïdes à savoir la galangine, la rutine; la quercitrine et la myricétine. Comme acides phénols, l'acide gallique et l'acide caféique ont été identifiés.

Le deuxième volet de notre travail a porté sur la quantification des composés phénoliques des extraits. Ainsi les phénoliques, les tanins, les flavonoïdes et les flavonols ont été dosés. Il ressort que nos extraits sont très riches en composés polyphénoliques. Cette richesse en composés polyphénoliques s'est traduite par les importantes activités anti-oxydantes des extraits. En effet les bonnes corrélations obtenues entre les activités antioxydantes et les phénoliques totaux ont montré que, plus l'extrait est riche en composés phénoliques, plus il est antioxydant. *I. colutea*, *I. nigritana* et *I. tinctoria* qui sont particulièrement riches en polyphénols se sont révélés plus antioxydants avec toutes les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante utilisées (FRAP, DPPH et ABTS).

Le troisième volet de notre travail a porté sur l'évaluation des activités biologiques des extraits. En plus de l'évaluation des activités antioxydantes, les extraits de nos plantes ont été soumis à l'évaluation des activités enzymatique et anti-bactérienne.

En effet, les inhibitions sur l'acétylcholinestérase (AChE), la carboxylestérase (CE), la lipoxygénase (LOX) et la xanthine oxydase (XO) révèlent que *I. macrocalyx* et *I. nigritana*

qui sont particulièrement riches en flavonoïdes donnent des bonnes inhibitions sur AChE et CE. Les extraits les plus inhibiteurs de LOX et XO sont respectivement dans l'ordre:

I. colutea > *I. macrocalyx* > *I. nigritana* pour l'inhibition de LOX,

I. macrocalyx > *I. tinctoria* > *I. nigritana* pour l'inhibition de XO.

Ces résultats sont confirmés par les bonnes corrélations obtenues entre l'inhibition de ces enzymes et les flavonoïdes d'une part et les flavonols d'autre part. Il ressort que *I. macrocalyx* est l'espèce dont l'extrait a donné le meilleur pourcentage d'inhibition sur la XO. *I. macrocalyx* présente donc des bonnes potentialités pour le traitement de la goutte. Il est suivi de qui. Nous retiendrons aussi que *I. nigritana*, *I. colutea* et *I. tinctoria* qui ont présenté les meilleures activités antioxydantes ont présenté les meilleures inhibitions vis à vis de la LOX et de la AChE. Les corrélations obtenues entre les capacités antioxydantes et les pourcentages d'inhibition de ces enzymes traduisent bien ces résultats car de façon spécifique la LOX et l'AChE sont mieux inhibées par les composés antioxydant contrairement à la XO et la CE. Nous pouvons donc classer les enzymes étudiées en deux groupes: celles qui sont plus inhibées par les composés antioxydants la LOX et l'AChE et celles qui sont inhibées par les flavonoïdes surtout par les flavonols la XO et la CE.

Le test antibactérien a montré que tous les extraits sont actifs sur chacune des souches testées. L'extrait de *I. macrocalyx* s'est, une fois de plus, montré le plus actif par rapport aux extraits des autres espèces; il est suivi de *I. tinctoria*, *I. colutea* et de *I. nigritana*. De façon spécifique *I. macrocalyx* et *I. nigritana* sont plus actifs sur les souches gram-négatives que sur les souches gram-positives. Extraits actifs sur les souches résistantes aux pénicillines à savoir *B. cereus* et *S. aureus*

La conclusion de cette étude nous permet de dégager quelques perspectives.

L'étude s'est limitée uniquement sur cinq *Indigofera* cela s'avère insuffisant quand on sait qu'il existe très peu de données phytochimiques sur de nombreuses espèces du genre *Indigofera*. Il y a donc nécessité de mener des criblages phytochimiques afin d'avoir un répertoire sur les espèces du genre *Indigofera* du Burkina Faso mais aussi des autres pays de la sous région.

Bien que les résultats présentés dans ce document montrent une contribution de différentes molécules des extraits à l'activité antioxydante, l'isolement des molécules pures responsables de l'activité antioxydante de l'extrait hydroacétonique reste à réaliser. Cela peut se réaliser en s'orientant vers les composés qui ont présenté des activités antioxydantes à la fois par les méthodes DPPH, ABTS et FRAP. Ces molécules antioxydantes peuvent être

testées sur les enzymes liées à l'étiologie de l'inflammation (LOX) et de la maladie d'Alzheimer (AChE).

Au vu des résultats intéressants de l'inhibition enzymatique par les extraits riches en flavonoïdes il serait intéressant:

- d'isoler les composés inhibiteurs de ces enzymes
- de tester l'extrait de *I. macrocalyx* sur modèle animal ainsi que les extraits de *I. nigritana* et *I. colutea*,
- isoler les composés qui sont à la fois antioxydants et inhibiteurs de la xanthine oxydase et de la lipoxygénase,
- d'approfondir les études sur *I. macrocalyx* et *I. colutea* pour leurs potentialités dans le traitement de la goutte et de l'inflammation,

Au vu des résultats portant sur l'activité antibactérienne, les fortes activités des extraits de *I. macrocalyx*, *I. colutea* et *I. tinctoria* sur toutes les souches testées mérite que des tests d'activités sur les souches d'espèces sauvages soient menées.

Rechercher les composés anti-bactériens sur les souches productrices de β -lactamase.

Il y a nécessité de déterminer la toxicité des extraits.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abarca A. N., Compos M.G.N., Avila-Reyes J.A., Naranjo-Jiménez N., Herrera Corral J., Gonzalez-Valdez L.S. (2004). Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin. *Interciencia*, 29, 574-578.
2. Abubakar M.S, Balogun E., Abdurahman E.M., Niok A.J., Shok M., Mohammad A., Garba M. (2006). Ethnomedical treatment of Poisonous Snakebites: Plant extracts Neutralized *Naja nigricollis* Venom. *Pharmaceutical Biology*, 44(5). 343-348.
3. Acuna U. M., Atha D. E., MA Jun, Nee M. H. and Kennelly E. J. (2002). Antioxidant Capacities for ten Edible North American plants. *Phytother. Res.*, 16, pp.63-67.
4. Adamu M. H., Abayeh J. O., Agho O. M., Abdullahi L. A., Uba A., Dukku U. H., Wufem M. B., (2005). An ethnobotanical Survey of Bauchi State herbal plants and their antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 1-4.
5. Adjanohoun E.-J., Ahyi A.-M.R., Ake Assi L., Dan Dicko L., Daouda H., Delmas M., De Souza S., Garba M., Guinko S., Koyonga A., N'Gol D., Rayanal J.-L. et Saadou M. (1985). *Médecine traditionnelle et pharmacopée. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Niger*. Edition A.C.C.T. Paris.
6. Amala Bhaskar E., Ganga N., Arivudainambi R., Santhanam G., (1982). Anti-inflammatory activity of *Indigofera aspalathoides* Vahl. *Indian J Med Res.*; 76, 115-8.
7. Ali N.A. A., Jülich W.-D., Kusnick C., Lindequist U. (2001). Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 74, 173-179.

8. Andreotti A., Bonaduce I., Colombini M.P., Ribechini E. (2004). Characterisation of natural indigo and shellfish purple by mass spectrometric techniques. *Rapid Commun Mass Spectrom.*; 18(11), 1213-20.

9. Anthon G. E., and Barret D. M. (2001). Colorimetric Method for the determinatuio of Lipoxygenase Activity. *Journal of Agric. Food Chem.*, 49, 32-37.

10. Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., & Legret, P., (1994). Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. *Journal de pharmacie de Belgique*, 49, 462-468.

11. Azhar-Ul-Haq, Malik A., Anis I., Khan S. B., Ahmed E., Ahmed Z., Nawaz S. A., and Choudhary M.I. (2004). Enzyme inhibiting Lignans from *Vitex negundo*. *Chem. Pharm. Bull.* 52(11), 1269-1272.

12. Aziz-Ur-Rehan, Malik A., Riaz N., Ahmad H., Ahmad Nawaz, and Choudhary M. I., (2005). Lipoxygenase inhibiting constituents from *Indigofera hetrantha*. *Chem. Pharrm .bull.*, 53 (3), 263-266.

13. Aylwarrd J. N., Court R. D., Haydock K. P., Strickland W. R. and Hegarty P. M. (1987). *Indigofera* species with agronomic potential in the tropics. Rat toxicity studies, *Aust. J. Agric. Res.*, 38, 177-186.

14. Bakasso S., Lamien-Meda A., Lamien C.E., Kiendrebeogo M., Millogo J., Ouedraogo A.G., Nacoulma O.G. (2008). Polyphenol contents and antioxidant activities of five *Indigofera* species (Fabaceae) from Burkina Faso. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(11), 1429-1435.

15. Bakasso Sahabi (2004). Contribution à la connaissance de la biochimie et de la biologie de *Indigofera nigriflora* Hook F. (Fabaceae). Mémoire de DEA. UFR/SVT, Université de Ouagadougou. P. 50.

16. Baykal T., Panayir T., Tasdemir D., Sticher O. and Çalis I. (1998). Triterpéne saponins from *Scabiosa Rotata*. *Phytochem.*, 48 (5) 867-873.
17. Basile A., Ferrara L., Del Pezzo M., Mele G., Sorbo S., Bassi P., Montesano D. (2005). Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. *Journal of Ethnopharmacology*, 102, 32-36.
18. Berhaut J. (1974). *Flore illustrée du Sénégal: dicotylédones*. Thome 5. Ministère du développement rural. Directions des eaux et forêts-Dakar. 658 p.
19. Bindanda M. et Hans M. H., (1992). *La médecine naturelle en Afrique*, 1^{ère} éd., 100p.
20. Bisignano G., Sanogo R, Marino A., Aquino R., D'Angelo V., Germano M. P., De Pasquale R., Pizza C. (2000). Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents. *Letters in applied Microbiology*, 30, 105-108.
21. Bonnefoy M., Draï J., Kostka T., (2002). Les antioxydants pour retarder les effets du vieillissement, faits et perspectives: Peut-on prévenir le vieillissement? *Presse Méd.* 31(24), 1174-1184.
22. Brathe A., Andressen G., Gundersen L.-L., Malterud K. E., Rise F. (2002). Antioxidant activity of Synthetic Cytokinin Analogues: 6-Alkynyl- and 6-Alkenylpurines as Novel 15-Lipoxygenase Inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 10, 1581-1586.
23. Bruneton (1987). *Eléments de phytochimie et pharmacognosie*. Tec. et Doc. Lavoisier, 584 p.
24. Bruneton J. (1993). *Pharmacognosie: phytochimie-plantes médicinales*, 2^o.éd. tec. et doc. lavoisier, Paris, 915 p.
25. Bruni R., Muzzoli M., Ballero M., Loi M.C., Fantin G., Poli F., Sacchetti G., (2004). Tocopherols, fatty acids and sterols in seeds of four Sardinian wild *Euphorbia* species. *Fitoterapia*, vol.75, pp.50-61.

26. Cai Y.-Z., Sun M., Xing J., Luo Q., Corke H. (2005). Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78, 2872-2888.
27. 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.
28. Chakrabarti, R., Damarla R.K.V. and Mullangi R. (2006). Insulin sensitizing property of *Indigofera mysorensis* extract. *J. Ethnopharmacol.*, 105, 102-106.
29. Chang C., Yang M., Wen H. and Chein J.C. (2002). Estimation of total flavonoids content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. food and Drug*.
30. Christina, A.J.M., M.A. Jose, S.J.H. Robert, R. Kothai, N. Chidambaranathan and P. Muthuman, (2003). Effet of *Indigofera aspalathoides* against Dalton's ascitic lymphoma. *Fitoterapia*, 74(3): 280-283.
31. Ciulei Ioan. (1982). *Practical manuals on the industrial utilization of chemical and aromatic plants. Methodology for analysis of vegetable drugs* Ed. ministry of chemical industry, Bucharest. 67 p.
32. Clarkson P. M., S Thompson H. (2000) Antioxidants: what role do they play in physical activity and health. *Am J Clin Nutr* 72 (2): 637S-46S.
33. Cole G.M., G.P. Lim, F.Yang, B.Teter, A. Begum, Q. Ma, M.E Harris-White and A Frautschy. (2005). Prevention of Alzheimer's disease: Omega-3 fatty acid and phenolic anti-oxidant interventions. *Neurobiology of Aging*, 26, S133–S136.
34. Colot M. (1972). *Notions techniques de pharmacologie générale*. Masson et Cie Paris-VI, 137 p.
35. 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.

36. Cos P., Ying L., Calomme M. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Product*, 61, 71-76.
37. Courtois J.E., Perles R. (1964) *Précis de chimie biologique* T1 et T2, 2 éd. Masson, Editeurs, 459 et 711 p.
38. Cragg G.M., Newman D.J. et Snader K.M. (1997). Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, 60: 52-60.
39. Cronquist, A. (1988). *The evolution and classification of flowering plants*. Second edition NYBG, 555p.
40. Dahot M. U. (1999). Antibacterial and antifungal activity of small protein of *Indigofera oblongifolia* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 64, 277-282.
41. Dastmalchi, K., Dorman, H.J.D., Kosar, M., Hiltunen, R. (2006). Chemical composition and vitro antioxidant evaluation of a water-soluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldaviaca* L.) extract. *J. LWT*, 40 (2), 239-248.
42. Derbel S., Ghedira K. (2005). Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*, 1, 28-34.
43. Di carlo G., Mascolo N., Izzo A. A., Capasso F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, 65(4) 337-353.
44. 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.
45. Duchene-Marullaz Pierre. (1989). *Thérapeutique par les plantes: les médicaments à base de plantes*. *Bull.Acad., Méd.*, 173(9), 1131-1135.

46. Editorial (2005). Le blocage simultané des cyclo-oxygénases et de la 5-lipoxygénase: une nouvelle voie pour traiter l'inflammation? *Revue du Rhumatisme* 72, 379–382
47. Einbond L. S., Reynertson K. A., Xiao-Dong L., Basile M. J., Kennelly E. J. (2004). Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chem.*, 84, pp. 23-28.
48. Elliott M. J., Chithan K., Theorides T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on Mammalian cells: implications for inflammation, Heart disease, and Cancer. *Pharmacol. Rev.* 52(4), 673-751.
49. Ellman G.L., Courtney D., Andres V., Featherston R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88-95.
50. Esimone C. O., Adikwu M. u., Muko K. N. (1999). Antimicrobial properties of *Indigofera dendroides* leaves. *Fitoterapia*, 70(5), 517-520.
51. Fang and Casida (1998). Anticancer action of cube insecticide: correlation for rotenoid constituents between inhibition of NADH: ubiquinone oxidoreductase and induced ornithine decarboxylase activities, 95, 3380-3384.
52. Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D., AND Guo Z.(1986). Place des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bull.O.M.S.*, 64(2), 159-175.
53. Fenglin H., Ruilin L., Bao H., Liang M.; (2004) Free Radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants. *Fitoterapia* Vol.75.pp 14-23.
54. Ferraz Filha Z.S, Vitolo I.F., Fietto L.G., Lombardi J.A., Saude-Guimaraes D.A., (2006). Xanthine oxidase inhibitory activity of *Lychnophora* species from Brazil ("Arnica"). *Journal Ethnopharmacology*, 107,79-82.
55. 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.

56. Leite S.P., Vieira J.R.C., Lys de Medeiros P., Leite R.M.P., Lima V.L.M, Xavier H.S and Lima E.O., (2006). Antimicrobial activity of *Indigofera suffruticosa*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 1-5.
57. Garcia-Alonso M., De Pascal-Teresa S., Santos-Buelga C., Risas-Gonzalo J. C. (2004). Evaluation of the antioxydant properties of fruit. *Food Chem.*, (84), 13-18.
58. Govindarajan R., Vijayakumar M. and Pushpangadan P. (2005). Antioxidant approach to disease management and the role of 'Rasayana' herbs of Ayurveda. *Journal Ethnopharmacology*, 92(2), 165-178.
59. Granner D.K., Mayes P.A., Murray R.K., Rodwell V.W. (1989). *Précis de Biochimie*. 7^e édition, Québec/Paris.
60. Gülçin I. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217, 213-220.
61. Gyamfi MA, Yonamine M, Aniya Y. (1999). Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. *Gen. Pharmacol.*, 32(6), 661-7.
62. Halliwell B. and Guteride J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metals ions in humain disease: an overview. *Methods in enzymology*, 186, 1-85.
63. Han, (1994). Highlight on the studies of anticancer drugs derived from plants in China, *Stem Cells* 12(1) 53-63.
64. Hasan A., Ahmad I., Ajab K. M. and Chudhary I. (1996). Two flavonol triglycosides from flowers of *Indigofera hebeptala*, *Phytochem.*, 43(5), 1115-1118.
65. Hassen A., Rethman N. F. G., Vna Niekerk, W.A., Tjelele, T.J. (2006). Influence of season/ year and species on chemical composition and *in vitro* digestibility of five *Indigofera* accessions. *Animal Feed Science and Technology*, (in press)

66. Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D., (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
67. Hernandez N. E., Tereschuk M. L. and Abdala L. R. (2000). Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi del valle (Tucuman, Argentina), *Journal Ethnopharmacology*, 73, 317-322.
68. Hillhouse B. J., Ming D. S., French C. J., Towers G. H. N. (2004). Acetylcholine Esterase inhibitors in *Rhodiola rosea*. *Pharmaceutical Biology*, 42(1), 68-72.
69. Hinneburg I. Dorman H. J. D., Hiltunen R., (2006). Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food chemistry* 97, 122-129.
70. Hostettmann K. (2001). *Tout savoir sur les plantes médicinales des montagnes S A*, Ed. Fabre. Lausanne, Suisse, 121 p.
71. Huang D., Ou B., Prior B. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1841-1856.
72. Ingkaninan K., Temkitthawon P., Chuenchom K., Yuyaem T., Thongnoi W. (2003). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotoric remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 261-264.
73. Ivanova D., Gerova D., Chervenkov T., Yankova T. (2005). Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal Ethnopharmacology* 96, 145-150.
74. Janaszewska A. and Bartosz G., (2002). Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest*, 62, 231-236.
75. Javanmardi J., Stushnoff C., Locke E., Vivanco J.M. (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum accessions*. *Food chem.*, 83, 547-550.

76. Kamal, R. and M. Mangla, (1993). *In vivo* and *in vitro* investigations on rotenoids from *Indigofera tinctoria* and their bioefficacy against the larvae of *Anopheles stephensi* and adults of *Collosobruchus chinensis*. *J. Bioscience*, 18(1): 93-101.
77. Katalinic, V., M. Milos, T. Kulisic and M. Jukic, (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and phenols. *Food Chem.*, 94(4), 550-557.
78. Koleva, I.I., van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., de Groot, A. & Evstatieva, L.N. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study of three testing methods. *Phytochemical Analysis* 13, 8-17.
79. Kong L.D., Cai Y., Huang W.W., Cheng C.H.K., Tan RX., (2000). Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout. *Journal of Ethnopharmacology* 73, 199–207.
80. Leite, S.P., Vieira J.R.C., P. Y.S. de Medeiros, Leite R.M.P., Lima V.L.M, Xavier H.S. and Lima E.O., (2006). Antimicrobial activity of *Indigofera suffruticosa*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 3 (2): 1-5.
81. 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.
82. Li X.Z., Mehrotra M., Ghimire S., Adewoye L. (2007). β -Lactam resistance and β -Lactamases in bacteria of animal origin. *Veterinary microbiology*, 121, 197-214.
83. Ling S-K, Tanaka T. and Kouno I. (2003). Effects of iridoids on Lipoxygenase and Hyaluronidase activities and their activation by β -glucosidase in the presence of amino acids. *Bio. Pharm. Bull.* 26(3). 352-356.
84. Liu R.H., (2003) Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nut.*, 78, 517S–520S.
85. Lopez S., Batisda J., Viladomat F., Codina C., (2002). Acetylcholine inhibitory activity of some Amaranthaceae alkaloids and anarcissus extracts. *Life Sciences*. 71: 251-2529.

86. Malterud K.E., Rydland K.M. (2000). Inhibitors of 15-lipoxygenase from orange peel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 5576–5580.
87. Maregesi S.M., Pieters L., Ngassapa O. D., Apers S., Vingerhoets R., Cos P., Vanden Berghe D.A. and. Vlietinck A.J., 2008. Screening of some Tanzanian medicinal plants from Bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(1), 58-66.
88. Mathabe M. C., Nikolova R. V., Lall N., Nyazema N. Z. (2006). Antibacterial activities of medicinal plants used for treatment of diarrhoea in Limpopo Province, South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 105, 286-293.
89. Mata A. T., Proença C., Ferreira A. R., Serralheiro M. L. M., Nogueira J. M., F., Araujo M. E. M. (2007). Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, 103, 778-786.
90. Meda A., Lamien C.E., Romito M., Millogo J, Nacoulma O. G., (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food chemistry*, 91. pp 571-577.
91. Medié-Sarié M., I. Jasprica, A. Smolcié-Bubalo and A. Mornar, (2004). Optimization of chromatographic conditions in Thin Layer chromatography of flavonoids and phenolic Acids. *Croatica chemica Acta*, 77: 361-366.
92. Méthode de reference pour le dosage des tannins (1984). *Journal officiel des Communautés Européennes*, L197, 18-20.
93. Meyers F H., Ejawet Z. AND Golfin A. (1980). Medicinal pharmacology. *Rev. of medicinal pharmaco.* 7° Ed. 747 p.
94. Middleton E, Dagger J., Kandaswami C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications or inflammation, heart disease and cancer. *Am J Clin Nutr* 52 (4), 673-751.

95. Miliauskas G., Venskutonis P. R., Van Beek T.A., (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts, *Food chem.*, 85, 231-237.
96. Montoro P., Braca A., Pizza C., De Tommasi N. (2005). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chemistry*, 92, 349-355.
97. Mosaddik M. A., Banbury L., Booth P., Markham J., Leach D., Waterman P. G. (2004). Screening of some Australian Flacourtiaceae species for in vitro antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. *Phytomedicine*, 11, 461-466.
98. Nacoulma O. G. (1996). *Plantes médicinales et Pratiques médicales Traditionnelles au Burkina Faso: cas du plateau central T1&T2*. Thèse Doct. d'Etat ès Sciences Nat. Université de Ouagadougou, 242 et 285.
99. Nacoulma O. G et Millogo-Rasolodimdy J. (2002) Les frotte-dents comme produits cosmétiques et médicinaux au Burkina Faso. *Etudes flor. Veg. Burkina*, Vol. 7, pp. 49-54.
100. Narender T., Khaliq T., Puri A. and Chander R. (2006). Antidyslipidemic activity of furano-flavonoids isolated from *Indigofera tinctoria*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 16, 3411-3414.
101. National Committee for Clinical Laboratory Standards, (2000). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 5th ed. Vol. 17. Approved standards-M7-A4. NCCLS document M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standard Wayen Pa.
102. Newman D.J., Cragg G.M. et Snader K.M., (2000). *Natural Prod. Rep.* 17, 175-285.
103. Nijveldt R.J, Nood EV, Van Hoorn DEC, (2000). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74 (4), 418-25.

104. Nino J., Hernandez J. A., Correa Y. M., Mosquera O. M. (2006). *In vitro* inhibition of acetylcholinesterase by crude plant extracts from Colombian flora. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 101(7), 783-785.
105. Nuttall S. L., Kendall M. J. and Martin U. (1999). Antioxidant therapy for the prevention of cardiovascular diseases. *Q J Med*, 92, 239-244.
106. Organisation Mondiale de la Santé (OMS). (2003). Médecine traditionnelle.
107. 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.
108. Owen P. L. & Johns T. (1999). Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies use for gout. *Journal of Ethnopharmacology*, 64; 149-160.
109. Ozbek H. (2005). The inflammatory activity of *Foeniculum vulgare* L. Essential oil and investigation of its median lethal dose in rats and mice. *Int. J. Pharmacol.*, 1(4):329-231.
110. Pelt Jean-Marie (1982). *La médecine par les plantes*. Ed. Fayard, 278 p.
111. Perez C., Pauli M. et Bazerque P., 1990. An antibiotic assay by the agar-well diffusion method. *Acta Biologiae et Medecine Experimentalis*, 15, 113-115.
112. Pérez-Vizcaíno F, Ibarra M, Cogolludo A, et al. (2002). Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. 302 (1), 66-72.
113. Perumal Samy, R., Ignacimutha, S., Sen, A., 1998. Screening of 34 indian medicinal plants for antibacterial properties. *Journal of Ethnopharmacology* 62, 173-182.
114. Pierre G., Christian M., Henri J. (1985). *Pharmacopées Traditionnelles en Guyane* .Ed de l'ORSTOM. 178 p.

115. Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J. O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme* 16, pp 233 – 339.
116. Poubelle P. E., Borgeat P. (2000). Perspectives thérapeutiques. *Médecine/ Sciences*, 16, 917-923.
117. Rajeshwar Y., Kumar G. P. S., Gupta M., Mazumder, U. K. (2005). Studies on in vitro antioxidant activities of methanol extract of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) seeds. *European Bulletin of Drug Research*, 13 (1), 31-39.
118. Raj Kapoor B., Jayakar B., Muruges N., Chodon D., and Sakthuissekaran D. (2005). Chemoprevention of N-Nitrosodiethylamine induce phenobarbitol promoted Liver Tumors in Rat by extract of *Indigofera aspalathoides*. *Biol. Pharm. Bull.*, 28(2) 364-366.
119. Raj Kapoor B., Jayakar B., Muruges N. (2004). Antitumor activity of *Indigofera aspalathoides* on Ehrlich ascites carcinoma in mice. *Indian J. of pharmaco.*, 36 (1), 38-40.
120. Raj Narayana K., Reddy M. S., Chaluvadi M. R., Krishina D.R., (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian. J. of pharmaco.*, 33, 2-16.
121. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. and Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicinal*, 26 (9/10), 1231-1237.
122. Rhee I. K., Van Rijin R. M., Verpoorte R. (2003). Qualitative determination of false-positive effects in the Acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography. *Phytochemical Analysis*, 14, 127-131.
123. Rhee I. K., Van Rijin R. M., Ingkaninan K., Verpoorte R. (2001). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel Thin-layer chromatography in combinaison with bioactivity staining. *Journal of chromatography A*, 915, 217-223.

124. Riaz N., Malik A., Rehman A. U., Ahmed Z., Muhammad P., Nawaz A. S., Siddiqui J., Choudhary M. I., (2004). Lipoxygenase inhibiting and antioxidant oligostilbene and monoterpene galactoside from *Paeonia emodi*. *Phytochemistry*, 65, 1129-1135.
125. Riboli E. and T. Norat, 2003. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am J Clin Nutr.*, 78: 559S–569S.
126. Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G., (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoid and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicinal*, 20, 933-956.
127. Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G., (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant sciences*, 2, 152-159.
128. Rolland Y. (2004). *Antioxydants naturels végétaux*. *OCL*, 11 (6), 419-424.
129. Sadik C. D., Sies H., Schewe T., (2003). Inhibition of 15-Lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochemical Pharmacology* 65, 773-781.
130. Sahnoun Z., Jamoussi K., Zeghal K.M. (1998). Radicaux libres et antioxydants: *physiologie, pathologie et aspects thérapeutiques* (Ile partie) *Thérapie* 53, 315-39.
131. Salah S.M., Jäger A. K. (2005). Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 145-149.
132. Sanchez-Moreno C. (2002). Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging activity in Foods and Biological Systems. *Food Sci. Tech. Int.*, 8(3), 121-137.
133. Sawadogo W. R., Meda A., Lamien C. E., Kiendrebeogo M., Guissou I.P. and Nacoulma O. G., (2006). Phenolic content and antioxidant activity of six acanthaceae from Burkina Faso. *J. Biol. Sci.*, 6 (2), 249-252.

134. Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30, 3875-3883.
135. Scalbert A, Williamson G (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130, 2073S-85S
136. Schubert S.Y., Lansky E.P., Neeman I. (1999). Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*, 66, 11-17.
137. Schuldt E. Z., Farias M. R., Ribeiro-do-valle R. M., Ckless K. (2004). Comparative study of radical scavenger activities of crude extract and fractions from *cuphea Carthagenensis* leaves. *Phytomedicine*, 11, 523-529.
138. Sekar T. and Francis K. (1999). A preliminary investigation of some maruthamalai forest plants for phytochemical compounds. *Bioresourse Technology*, 70, 303-304.
139. Shahjahan M., Vani G., Devi C.S. (2005). Protective effect of *Indigofera oblongifolia* in CCl₄-induced hepatotoxicity. *J Med Food. Summer*, 8(2):261-5.
140. Shan B., Cai Y-Z., Brooks J.D. and Corke H. (2007). The in viro antibacterial activity spice and medicinal herb extracts. *International J. of Food Microbiology*, 117, 112-119.
141. Sharif A., Ahmed E., Malik A., Riaz N., Afza N., Nawaz S. A., Arshad M., Shah M. R., and Choudhary M. I. (2005). Lipxygenase Inhibitory Constituents from *Indigofera oblongifolia*. *Arch Pharm Res.*, 28(7), 761-764.
142. Sharma O. P., Bhat T. K., Singh B. (1998). Thin-layer chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, p-coumaric acid, ferulic acid and tannic acid , *J. of Chromato. A*, 822, 167-171.
143. Singh B., Chandan B. K., Sharma N., Bhardawaj V., Satti N. K., Gupta V. N., Gupta B. D., Suri, K. A. and Suri O. P. (2006). Isolation, Structure Elucidation and In Vivo

Hepatoprotective potential of *trans*-Tetracos-15-enoic acid from *Indigofera tinctoria* Linn. *Phytotherapy research*, 20, 831-839.

144. Singh B, Saxena A. K., Chandan B. K., Bhardwaj V, Gupta V. N, Suri O. P, Handa S.S. (2001). Hepatoprotective activity of indigotine-a bioactive fraction from *Indigofera tinctoria* Linn. *Phytother Res.* 15(4), 294-7.
145. Singleton V. L., Orthofer R., lamuela-Raventos R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymo.*, 299, 152-178.
146. Soong, Y.-Y., and Barlow, P.J. (2006). Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan Lour.*) seed and mango (*Mangifera indica L.*) kernel and their effects on antioxidant activity. *Food Chemistry*, 97, 524-530.
147. Soong Y.-Y., and Barlow P. J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food chemistry*, 88, 411-417.
148. Sreepriya M., Devaki T., Balakrishna K., Apparathanam T. (2001). Effect of *Indigofera tinctoria* L. on liver antioxidant defense system during D-galactosamine/endotoxin-induced acute hepatitis in rodents. *Indian J. Exp. Biol.* 39(2):181-4.
149. Sreepriya M., Devaki T., Nayeem M., (2001). Protective effects of *Indigofera tinctoria* L. against D-galactosamine and carbon tetrachloride challenge on "in situ" perfused rat liver. *Indian J. Physiol Pharmacol.* 45(4), 428-34.
150. Steinhilber D. A.; (1999). *Curr. Med. Chem.*, 6, 71-8.
151. Sweeney A.P., Wyllie S.G., Shalliker R.A., Markhan J.L., (2001). Xanthine oxidase inhibitory activity of selected Australian native plants. *Journal of Ethnopharmacology* 75, 273-277.

152. Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L. and Byrne H. D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food composition and analysis* 19, 669-675.
153. Thangadurai D., Ramesh N., Viswanathan M.B., Prasad D.X. (2001). A novel xanthene from *Indigofera longiracemosa* stem. *Fitoterapia*, 72(1):92-4.
154. Thangadurai D., Viswanathan M.B., Ramesh N. (2002). Indigoferabietone, a novel abietane diterpenoid from *Indigofera longiracemosa* with potential antituberculous and antibacterial activity. *Pharmazie*, 57(10), 714-5.
155. Tiwari A. K. (2004). Antioxidants: New-generation therapeutic base for polygenic disorders. *Curr. Sci.*, 86(8), 1092-1102.
156. Touitou Yvan. (1993). *Pharmacologie*. 7^e édit. Masson, Paris, 94-p.
157. Trager W., et Jensen J.B., 1976. Human malaria parasites in continue culture. *Sciences* 193, 673-6.
158. Ueda H., Yamazaki C., and Yamazaki M. (2002). Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*. *Biol.Pharm. Bull.*vol. 25, 9 pp.1197-1202.
159. Ulusu N.N., Ercil D., Sakar M.K., Tezcan E.F. (2002). Abietic Acid inhibits Lipoxygenase Activity. *Phytotherapy Research*, 16, 88-90.
160. Velazquez E., Tournier H. A., Mordujovichole B. P., Saavedra G., Scinella G.R. (2003). Antioxydant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*, 74, 91-97.
161. Vieira J.R.C., De Souza A.I., Carneiro do Nascimento S., Leite S.P. (2006). *Indigofera suffruticosa*: An alternative anticancer therapy. *eCAM*, 4(3) 355-359.

162. Villano D., Fernández-Pachón M. S., Troncoso A. M. & García-Parrilla. (2004). The antioxidant activity of wines determined by the ABTS method: influence of sample dilution and time, *Talanta*, 64, 501-509.
163. Vina J. J., Lloret A., Ort R., Alonso D. (2004). Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress. *Molecular aspects of medicine* 25, 117-123.
164. Vinutha B., Prashanth D., Salma K., Sreeja S. L., Pratiti D., Padmaja R., Radhika S., Amit A., Venkateshwarhu K., Deepak M. (2007). Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 359-363.
165. Wagner H. and Bladt S. (1996). *Plant drug analysis: a thin layer chromatography. Atlas*, Second edit. Springer, 384 p.
166. 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.
167. Wangensteen H., Miron A., Alamgir M., Rajia S., Samuelsen A.B. and Malterud K. E. (2006). Antioxidant and 15-lipoxygenase inhibitory activity of rotenoids, isoflavones and phenolic glycosides from *Sarcobolus globosus*. *Fitoterapia*, 77, 290-295.
168. Wangensteen H., Samuelsen A.B., Malterud K. E. (2004). Antioxidant activity in extracts from coriander. *Food Chemistry*, 88, 293-297.
169. Wattel A., Kamel S., Mentaverri R., Lorget F., Prouillet C., Petit Jean-Pierre, Fardelonne P., Brazier M. (2003). Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on *in vitro* osteoclastic bone resorption, *Biochem. Pharmacol.*, 65, pp.35-42.
170. Wolfeuder J.-L., Rodriguez S. and Hostettmann K. (1998). Liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy of plant *J. of chromatogr. A*, 794, 299-316.

171. Yang B., Kotani A., Arai K. And Kusu F. (2001). Estimation of the Antioxidant Activities of Flavonoids from their oxidation potentials. *Analytical Sciences*, 17, 599-604.
172. Yenjai C., Prasanphen K., Daodee S., Wongpanich V., Kittakoop P. (2004). Bioactive Flavonoids from *Kaempferia Parviflora*. *Fitoterapia*, 75, 89-92.
173. 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.
174. Zheng W., Wang S. Y., (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5165-5170.
175. Ziakas G.N., Rekkas E.A., Gavalas A.M., Eleftheriou P.T. and Kourounakis P.N. (2006). New analogues of butylated hydroxytoluene as anti-inflammatory and antioxidant agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14, 5616–5624.
176. Ziyatdinova G.; Gilâmetdinova D.; Budnikov G. (2005). Reactions of superoxide anion radical with antioxidants and their use in voltammetry. *Journal of Analytical Chemistry*, 60(1), 49-52.
177. Zupko I., Hohmann J., Redei D. (2001). Antioxidant activity of leaves of *Salvia* species in enzyme-dependent and enzyme-independent systems of liquid peroxidation and their phenolic constituents. *Planta Medica.*, 67, 366-368.

ANNEXES

ANNEXE I: Criblages phytochimiques

Caractérisation des stérols et triterpènes par le test de Libermann-Burchard

Il permet la mise en évidence de stéroïdes et triterpènes (Ciulei, 1982). Chaque résidu est dissout dans un mélange anhydride acétique-chloroforme (1:1 v/v) dans un tube à essai. Deux millilitres de H₂SO₄ concentrés ont été ajoutés délicatement sur le haut du tube. A la zone de séparation des 2 solvants un anneau rouge-brun se forme, indiquant la présence de stérols et de triterpènes.

Caractérisation par le test de Shibata

C'est la mise en évidence des flavonoïdes (Chang *et al.*, 2002; Ciulei, 1982). Chaque résidu est dissout dans 2 ml de méthanol 50°. Des fragments de tournure de magnésium et 4 gouttes de HCl (concentré) ont été ajoutés dans chaque tube. L'apparition d'une coloration rouge ou orange indique la présence d'aglycones de flavonoïdes.

Caractérisation des tanins et/ou polyphénols par le test au FeCl₃

Il caractérise les tanins et polyphénols. Le résidu sec a été dissout dans 2 ml d'eau distillée, 3 gouttes de FeCl₃ 1% (dilué au 10^{ème}) ont été ajoutées. L'apparition d'une coloration bleu-noir ou vert-noirâtre indique la présence de tanins galliques ou de tanins catechiques respectivement (Ciulei, 1982).

Test de mousses

Chaque résidu est dissout dans 2-3 ml d'eau distillée dans un tube à essai. Le tube est secoué vigoureusement. L'apparition d'une colonne de mousses d'au moins 1 cm de hauteur, persistant pendant 15 minutes au moins indique la présence de saponosides (Ciulei, 1982).

Caractérisation par le test de Bornträger

C'est la mise en évidence des quinones. Trois millilitres de l'extrait à tester ont été mélangés dans un tube à essai avec 1 ml de NH₄OH 25% et agiter. Une couleur rouge cérique montre la présence d'émodols (Wagner & Bladt, 1996; Ciulei, 1982).

Caractérisation par le test de Dragendorff

Il indique la présence des alcaloïdes. Il a consisté à évaporer à sec 10 ml de l'extrait à tester, qu'il faut dissoudre, à nouveau, dans 1,5 ml d'acide chlorhydrique 2% en agitant avec une tige de verre au bain-marie à chaud. Lorsque le résidu est suffisamment dissout, la solution obtenue est filtrée puis divisée à volume égal dans 2 tubes à essai. Le premier tube sert de témoin et dans le second tube on ajoute le réactif de Dragendorff. L'apparition d'un précipité blanc-jaunâtre montre la présence des alcaloïdes (Wagner & Bladt, 1996; Ciulei, 1982).

Test des coumarines

Les résidus secs sont dissous dans l'eau distillée par chauffage. Après refroidissement, la solution obtenue a été répartie dans 2 tubes à essai. Le premier sert de témoin et on ajoute 0,5 ml de NH_4OH 10% dans le 2^{ème} tube. L'apparition d'une fluorescence bleue ou verte à la lampe UV 365 nm indique la présence des coumarines (Wagner & Bladt, 1996; Ciulei, 1982).

ANNEXE II: Protocoles de préparation des tampons

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 (S_1) 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 $S_2 = 12,4\text{g/L}$

Le tampon borate buffer 0.2 M, est obtenu en ajoutant S_2 à S_1 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 hydrogenophosphate 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 dihydrogenophosphate 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 $\text{pH}_{8,008}$ (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 $\text{pH}_{8,008}$, 0,1% BSA (Tampon B) : 1,003 g de BSA est dissout dans 1L de tampon A.

Tampon Tris-HCl 50 mM $\text{pH}_{8,008}$, 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.