



HAL
open science

Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques

François Muanda Nsemi

► To cite this version:

François Muanda Nsemi. Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Biologie végétale. Université Paul Verlaine - Metz, 2010. Français. NNT : 2010METZ011S . tel-01752680

HAL Id: tel-01752680

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752680v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

THESE

**Présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université Paul Verlaine-Metz**

SPÉCIALITÉ: Chimie organique

Par

François Nsemi MUANDA

**IDENTIFICATION DE POLYPHENOLS,
EVALUATION DE LEUR ACTIVITE ANTIOXYDANTE
ET ETUDE DE LEURS PROPRIETES BIOLOGIQUES**

Soutenance publique prévue : le 25 novembre 2010

Jury

M. HMAMOUCI	Professeur	Université Fès (Maroc)	Rapporteur
M. LARROQUE	Professeur	Université Montpellier 1 (France)	Rapporteur
S. MUNIER	Docteur	Université Montpellier 1 (France)	Examineur
R. SOULIMANI	Professeur	Université P. Verlaine-Metz (France)	Examineur
A. DICKO	Professeur	Université P. Verlaine-Metz (France)	Directeur de thèse

**IDENTIFICATION DE POLYPHENOLS EVALUATION DE LEUR
ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET ETUDE DE LEURS PROPRIETES
BIOLOGIQUES**

Remerciements

Ma thèse a été réalisée au sein du laboratoire de Chimie et de Méthodologies pour l'Environnement de l'Université P-Verlaine de Metz, sous la direction du Professeur **Amadou Dicko** que je tiens à remercier pour la disponibilité, la confiance, les conseils, l'amitié, l'encadrement et le soutien moral qu'il a su m'apporter tout au long de ces années de coopération. Je tiens également à le remercier de toute la patience dont il a su faire preuve au cours de la rédaction de mon mémoire.

Je remercie également le Professeur **Philippe Burg**, directeur du LCME. Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma gratitude pour m'avoir accueilli au sein de cette équipe. Soyez assuré de mon profond respect et de ma vive reconnaissance.

Aussi, je voudrai exprimer cette reconnaissance à tous les Professeurs et Maître de conférences de ce laboratoire qui m'ont toujours aidé chaque fois que je désirais avancer dans la recherche de différentes solutions.

Que le Professeur **Chafique Younos** trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour sa contribution dans la réalisation de cette thèse. Par ailleurs, je tiens à remercier ici le profsseur **Rachid Soulimani** du Laboratoire de Neurotoxicologie Alimentaire de l'Université P. Verlaine-Metz pour l'aide qu'il m'a apportée durant ces années de recherches et pour avoir accepté de bien vouloir examiner ce travail.

Au Docteur Sylvie Munier, au Professeur **Michel LARROQUE** ainsi qu'au Professeur **Mohammed Hmamouchi**, j'exprime mes sincères remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.

Au Professeur **Jairo Falla**, à Monsieur **Laval Gilly**, Maître de conférences du laboratoire de Microbiologie de l'IUT de Thionville / Metz, à Monsieur **Patrick Chaimbault** Professeur au LSMCL, je voulais vous s'exprimer toute ma reconnaissance pour votre contribution à la réussite de ce travail et, soyez assurés de mon profond respect et de ma vive reconnaissance pour m'avoir fait bénéficier de votre expérience, de votre rigueur scientifique et professionnelle.

A **Agnès Crepet, Christel Gilquin, Pierre Magri, Frédéric Déssort et Catherine Perria**, je dis merci pour votre disponibilité, votre serviabilité et votre marque de sympathie qui restera à jamais dans ma mémoire.

Je n'oublie pas mes parents qui ont toujours cru en moi et qui ont su me redonner confiance lorsque la motivation n'était plus au rendez-vous. Merci pour tout.

A Mère **Joana Panzo**, Mère **LyLy Mandangu**, Mamie **Makaya Albertine**, Mère **Adolo Miguel**; pour vos sacrifices, votre soutien moral, je vous en suis reconnaissant.

A mes amis **Félix Sinsu, Augustin Diakiese, Gédeon Ekulu**, vous les amis que l'éternel m'a donné, pour votre soutien tant moral que matériel, je vous dis merci.

A Maman **Fatuma Sala, Stéphanie Muanda** et **Famuda Mupote Muanda**, pour vos sacrifices, votre soutien moral, je vous en suis reconnaissant.

A mes collègues **Chun Yan Yao Claire, Sandrine Rup, Perrine Doyen, Enrico Perspice**, qui m'ont souvent soutenu moralement dans la réalisation de ce travail, qu'ils trouvent ici l'expression de mon profond remerciement.

A mon frère **Rollain Muanda Nsemi** pour ton soutien sous toutes les formes je dis merci.

A mon oncle **Benoit Puati Mantumbu** pour qui je ne suis que l'ombre, là où tu es, j'aurai souhaité que tu me lises. Cette thèse, t'est dédiée à titre posthume.

Enfin, mes remerciements s'adressent également au gouvernement de la République Démocratique du Congo pour m'avoir accordé une bourse d'étude, sans laquelle je n'aurais pas réussi à mener à bien cette étude.

A tous ceux qui ne se sentent pas nommés dans la liste est longue, je dis merci.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	0
INTRODUCTION	1
PARTIE I: ETUDE ETHNOBOTANIQUE DES ESPECES ETUDIEES	5
I.1. <i>Daniella oliveri</i>	5
I.1.1. Etude ethnobotanique	5
I.1.2. Description botanique	5
I.1.2.1. Caractères morphologiques	5
I.1.2.2. Taxonomies et systématiques	7
I.1.2.3. Habitat et répartition géographique	8
I.1.2.4. Noms vernaculaire	8
I.1.2.5. Utilisations en médecine traditionnelle	8
I.1.2.6. Données phytochimiques	9
I.1.2.7. Données pharmacologiques	9
I.1.2.8. Données toxicologiques	9
I.2. <i>Desmodium adscendens</i>	9
I.2.1. Etude ethnobotanique	10
I.2.2 Description botanique	10
I.2.2.1. Caractères morphologiques	10
I.2.2.2. Taxonomies et systématiques	12
I.2.2.3. Habitat et répartition géographique	13
I.2.2.4. Noms vernaculaires	13
I.2.2.5. Utilisations en médecine traditionnelle	13
I.2.2.6. Données phytochimiques	14
I.2.2.7. Données pharmacologiques	14
I.2.2.8. Données toxicologiques	15
I.3. <i>Ficus capensis</i>	16
I.3.1. Etude ethnobotanique	16
I.3.2. Description botanique	17
I.3.2.1. Caractères morphologiques	17
I.3.2.2. Taxonomies et systématiques	19
I.3.2.3. Habitat et répartition géographique	20
I.3.2.4. Noms vernaculaires	20
I.3.2.5. Utilisations en médecine traditionnelle	20

I.3.2.6. Données phytochimiques	20
I.3.2.7. Données pharmacologiques	21
I.3.2.8. Données toxicologiques	21
I.4. <i>Securidaca longepedunculata</i>	21
I.4.1. Etude ethnobotanique	22
I.4.2. Description botanique	22
I.4.2.1. Caractères morphologiques	22
I.4.2.2. Taxonomies et systématiques	24
I.4.2.3. Habitat et répartition géographique	25
I.4.2.4. Noms vernaculaires	25
I.4.2.5. Utilisations en médecine traditionnelle	25
I.4.2.6. Données phytochimiques de la plante	26
I.4.2.7. Données pharmacologiques	26
I.4.2.8. Données toxicologiques	26
I.5. <i>Stevia rebaudiana</i>	27
I.5.1. Etude ethnobotanique	28
I.5.2. Description botanique	29
I.5.2.1. Caractères morphologiques	29
I.5.2.2. Taxonomies et systématiques	30
I.5.2.3. Habitat et répartition géographique	31
I.5.2.4. Noms vernaculaires	31
I.5.2.5. Utilisations en médecine traditionnelle	31
I.5.2.6. Données phytochimiques	32
I.5.2.7. Données pharmacologiques	32
I.5.2.8. Données toxicologiques	32
I.6. <i>Vitex doniana</i>	33
I.6.1. Etude ethnobotanique	33
I.6.2. Description botanique	33
I.6.2.1. Caractères morphologiques	33
I.6.2.2. Taxonomies et systématiques	34
I.6.2.3. Habitat et répartition géographique	35
I.6.2.4. Noms vernaculaires	35
I.6.2.5. Utilisations en médecine traditionnelle	35
I.6.2.6. Données phytochimiques	36

I.6.2.7. Données pharmacologiques	36
I.6.2.8. Données toxicologiques	36
I.7. <i>Miscanthus X giganteus</i>	37
I.7.1. Etude ethnobotanique	37
I.7.2. Description botanique	39
I.7.2.1. Caractères morphologiques	39
I.7.2.2. Taxonomies et systématiques	40
I.7.2.3. Habitat et répartition géographique	40
I.7.2.4. Noms vernaculaires	41
I.7.2.5. Utilisations en médecine traditionnelle	42
I.7.2.6. Données phytochimiques	42
I.7.2.7. Données pharmacologiques et toxicologiques	42
II. PARTIE:ETUDES PHYTOCHIMIQUES DES METABOLITES SECONDAIRES	47
II.1.Introduction	47
II.2. Classification des métabolites secondaires	49
II.2.1. Les alcaloïdes	49
II.2.2. Les terpènes	50
II.2.3. Les stérols	51
II.2.4. Stéroïdes	52
II.2.5. Les saponines	54
II.2.6. Composés phénoliques	56
II.2.6.1. Les non flavonoïdes	57
II.2.6.2. Les flavonoïdes	61
II.2.6.2.1. Les flavonoïdes au sens strict	62
II.2.6.2.2. Les isoflavonoïdes	69
II.2.6.3. Les anthocyanes	71
II.2.6.4. Les tanins	71
II.2.6.4.1. Les tanins hydrolysables	72
II.2.6.4.2. Les tanins condensés	73
II.3. Biosynthèse de quelques composés polyphénoliques de flavonoïdes	74
II.3.1. Biosynthèse des flavonoïdes au sens strict	74
II.3.2. Biosynthèse de grandes classes des iso flavonoïdes et leurs inters conversions	76
II.4. Rôles et intérêts des composés phénoliques	77
II.4.1. Chez les végétaux	77

II.4.2. Chez les humains	77
II.4.3. Dans la régénération des sols pollués	78
II.5. Les antioxydants	79
II.5.1. Généralités sur les antioxydants	79
II.5.2. Mécanismes d'action des radicaux libres	79
II.5.3. Les principales sources d'antioxydants	83
II.5.4. Rôles des complexes antioxydants	85
II.6. Intérêts économiques des composés phénoliques	86
III. PARTIE: TRAVAUX PERSONNELLES	87
III.1. Matériels et méthodes	87
III.1.1. Réactifs chimiques et appareillages	87
III. 1.2. Matériels végétaux	87
III.2. Méthodologie	88
III.2.1. Préparation des échantillons	88
III.2.1.1. Extraction des composés phénoliques	88
III. 2.1.2. Extraction des huiles essentielles	90
III.2.1.3. Extraction des exsudats des racinaires de <i>Miscanthus X giganteus</i>	90
III. 2.1.4. Résultats et discussions	91
III.2.1.4.1. Rendement des extractions des composés phénoliques	91
III.2.1.4.2. Extraction des huiles essentielles	93
III.3. Méthodes d'analyses	93
III.3.1. Analyses chimiques	93
III.3.1.1. Screening phytochimique	93
III.3.1.2. Résultats	97
III.3.1.3. Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible)	103
III.3.1.3.1. Spectrophotométrie	103
III.3.1.3.2. Analyses quantitatives	104
III.3.1.3.3. Résultats	108
III.3.1.3.3.1. Courbes d'étalonnages des dosages des PPT, FVT, ATT et TC	108
III.3.1.3.3.2. Analyses des extraits	111
III.3.1.4. Techniques chromatographiques	115
III.3.1.4.1. La chromatographie sur CCM	115
III.3.1.4.2. Chromatographie liquide de haute performance (HPLC)	116
III.3.1.4.3. Résultats	120

III.3.1.4.3.1. Chromatogrammes des étalons	120
III.3.1.4.3.2. Analyses HPLC des extraits	121
III.3.1.4.3.3. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	145
III.3.1.4.3.4. Résultats (GC-MS)	146
III. 3. 1.5. Isolement et caractérisation des composés issus des extraits de <i>D. adscendens</i>	154
III. 3.1. 5. 1. Identification des composés isolés	155
III. 3. 1.5. 2. Caractérisations des composés identifiés	156
III.3.1.5.3. Résultats	156
III. 3.1.5.3.1. Identifications des composés	156
III.3.1.5.3.2. Caractérisation des composés identifiés:	160
III.3.1.5.3.3. Résultats des analyses RMN et SM	163
III.3.1.6. Détermination de l'activité antioxydante des extraits	185
III.3.1.6.1. Rappel sur les processus d'oxydation	185
III.3.1.6.2. Résultats d'analyses <i>in vitro</i> des activités antioxydantes des extraits	191
III.3.1.7. Relation entre composés phénoliques et AAO	195
III.3.2. Analyses biologiques des extraits	196
III.3.2.1. Détermination de l'activité antimicrobienne des extraits des plantes et des huiles essentielles	196
III.3.2.2. Résultats des analyses antimicrobiennes	202
III.3.2.3. Analyse <i>in vitro</i> de propriétés anti-inflammatoires de quelques extraits	209
III.3.2.3.1. Rappel sur la notion d'activité anti-inflammatoire	209
III.3.2.3.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire par le test de nitrite	210
III.3.2.3.3. Résultats de l'évaluation des propriétés anti-inflammatoires des extraits	211
III.3.2.4. Relation entre composés phénoliques et propriétés biologiques	213
III.3.2.5. Evaluation de l'influence des composés phénoliques sur la biorémédiation des sols pollués	214
III.4. CONCLUSION GENERALE	215
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	217
LISTE DES TABLEAUX	232
LISTE DES FIGURES	234
LISTE DES SCHEMAS	238
ANNEXES	239
PUBLICATIONS	

LISTE DES ABREVIATIONS

AAO: Activité antioxydante;

Abs: absorbance

ACN: Acétonitrile

AFNOR: Association Française de Normalisation

ALAT: Alanine Amino Transférase

ALP: Phosphatase Alcaline

ASAT: Aspartate Amino Transférase

ATB: Antibiotique

CCM: Chromatographie sur Couche Mince

CD₃OD: Méthanol deutérié

CFT: Composés Flavonoïdes Totaux

CMI: Concentration moyenne inhibitrice

COSY: homonuclear COrelated SpectroscopY

CPG: Chromatographie en phase gazeuse

CPT: Composés Phénoliques Totaux

DCM: dichlorométhane

DEPT: Transfert de polarisation (DEPT)

DL: dose létale

DMP: Diméthylpyrane

DMT: Département de Médecine traditionnelle du Mali

E Ga/g Ms: Equivalent Acide Gallique par gramme de Matière Sèche

EC/g Ms: Equivalent Catéchine/ gr de Matière Sèche

ECt/g: Equivalent Catéchine/ gr de matière sèche

Ee: Extrait Eaux

Er: Ecorce racine

Et: Ecorce tronc

F: Feuille

FAB: Fast Atom Bombardment (Rapide spectrométrie atome bombardement de masse)

FVT: Flavonoïdes Totaux

GC- MS: Chromatographie en phase gazeuse couplée à un Spectrogramme de Masse

He: Extrait Huile

HMBC: ¹H-detected chemical shift correlation via Multiple Band Coherence

HMQC: ¹H-detected chemical shift correlation via Multiple Quantum Coherence

INRSP: Institut National pour la Recherche sur la Santé Public

INSERM: Institut National de la santé et de la recherche médicale

Ip: intra péritonéale

J(Hz): Constante de couplage exprimé en Hertz

Jmod: J-modulated spin-echo

M. H: Mueller Hinton

m/z: masse/ charge

Ma: absorptivité Moléculaire

ME: Méthanol-Eau

MEe: Extrait Méthanol-Eaux

MI: masse du lyophilisat

Mp: masse de la plante

NADH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide

nm: nanomètre

NOESY: Nuclear Over hauser Effect spectroscopy

OCDE: Organisation de Copération et de Développement Economique

P/ V: Poids/ Volume

Pdv: poudre végétal

PPT: Composés Polyphénoliques Totaux

PTTF: PolyTéTraFluoroEthylene

PTZ: Pentylène-Tétrazole

R.L: Radicaux libres

RMN: Resonance Mangétique Nuclear

RP-HPLC: Chromatographie liquide haute performance à phase reverse.

TMS: Triméthylsilane

TOCSY: TOtal Correlation SpectroscopY

UE: Union Européenne

UV- Spectro: Spectrophotomètre UV

δ (ppm): déplacement chimique exprimé en ppm

INTRODUCTION

Depuis l'antiquité, les produits naturels, notamment ceux d'origine végétale ont toujours été une source importante d'agents thérapeutiques. Actuellement, environ 25-30% de tous les médicaments disponibles pour le traitement des maladies sont dérivés des produits naturels (des plantes, des animaux, des bactéries et des champignons) ou sont des dérivés de produits naturels. En dépit de cela, dans les dernières décennies, principalement en raison de l'avancée de la chimie de synthèse, la recherche sur les produits naturels dans l'industrie pharmaceutique a connu un lent déclin. Toutefois, des données récentes de l'industrie pharmaceutique montrent que, pour certaines maladies complexes, les produits naturels représentent toujours une source extrêmement précieuse pour la production de nouvelles entités chimiques, car ils représentent des structures privilégiées choisies par les mécanismes d'évolution sur une période de millions d'années [1-4].

Les plantes médicinales ont toujours eu une place importante dans l'arsenal thérapeutique de l'humanité. Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), environ 65-80% de la population mondiale dans les pays en développement, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne, dépendent essentiellement des plantes médicinales traditionnelles pour leurs soins de santé primaire. Et malgré les remarquables progrès en chimie organique de synthèse du vingtième siècle, plus de 25% des médicaments prescrits dans les pays industrialisés tirent directement ou indirectement leurs origines des plantes [5,6]. Ce pourcentage peut atteindre 50% lorsque l'ensemble des produits du marché parallèle est pris en considération. Dans ce contexte, et compte tenu de la disparition rapide des forêts tropicales et d'autres domaines importants de la végétation, il y a lieu de poursuivre la recherche dans le domaine des plantes. Une attention urgente doit être portée au plus grand nombre possible des espèces environ 350.000 plantes sur terre, qui n'ont pas encore été étudiées pour déterminer scientifiquement non seulement leurs propriétés phytochimiques et

pharmacologiques potentielles mais aussi évaluer leurs qualités, leurs innocuités et leurs efficacités. Cet héritage vert représente donc un énorme réservoir de composés qui attendent d'être découverts [7]. Depuis 150 ans, les plantes médicinales ont fourni à la médecine des médicaments très efficaces. Aujourd'hui, de nombreux travaux menés dans le domaine de l'ethnopharmacologie, nous montrent que les plantes utilisées en médecine traditionnelle et qui ont été testées sont souvent d'une part, des plantes efficaces dans les modèles pharmacologiques et d'autre part seraient quasiment dépourvues de toxicité [8]. L'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie mettent en relation les savoirs ancestraux des médecins traditionnels et les connaissances scientifiques actuelles. Ce sont avant tout des domaines de recherches interdisciplinaires à l'interface des sciences de l'homme, comme l'ethnologie, l'histoire, la linguistique, et les sciences de la nature, comme la botanique, la pharmacologie, la pharmacognosie, la médecine. Les informations recueillies au près des populations (les véritables tradipraticiens ne subsistent plus que dans des zones reculées) sont le reflet d'une approche culturelle de la maladie.

La médecine traditionnelle est fondée sur la symptomatologie. Le mélange de plantes est indiqué pour soulager une douleur ou un symptôme donné et non pour soigner une maladie. La traduction de ces données symptomatiques brutes en termes de médecine étiologique est délicate et le recours d'un médecin est souvent indispensable à la caractérisation de la maladie. Le traitement varie selon le comportement du malade, ses dires, le rang social avec la prise en compte de son histoire familiale. De plus, le tryptique aliment-médicament-poison rend difficile la catégorisation entre actifs et toxiques qui peuvent être employés, à dessein, simultanément. Il est également nécessaire d'avoir à l'esprit que dans certaines médecines traditionnelles, l'utilisation médicinale des plantes est souvent associée à des concepts irrationnels qui font appel au mystique. La difficulté vient ainsi de la nécessité de déceler, dans les mélanges traditionnellement employés, les plantes dont la présence fréquente fait penser qu'elles sont susceptibles de traiter un aspect donné de la maladie.

L'ethnopharmacologie et l'ethnobotanique ont donc pour mission d'élucider la compréhension des pratiques et des représentations relatives à la santé, à la maladie, à la description et l'évaluation thérapeutique des plantes utilisées dans les pharmacopées traditionnelles. L'usage empirique des différentes préparations traditionnelles des plantes est donc extrêmement important pour une sélection efficace de plantes puisque la plupart des métabolites secondaires de plantes employées en médecine moderne ont été découverts par l'intermédiaire d'investigations ethnobotaniques [8].

Aujourd'hui, la recherche de nouvelles molécules médicamenteuses d'origine naturelle est basée sur la répartition des plantes médicinales et sur les études ethnobotaniques qui permettent de réaliser des inventaires de plantes d'une zone ou d'un pays, puis par des études phytochimiques et pharmacologiques. De ce fait, la valorisation des ressources naturelles est une préoccupation qui devient de plus en plus importante dans de nombreux pays.

La conception et la réalisation de notre travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de ressources végétales par des recherches scientifiques, aussi bien pour une contribution à l'étude de la biomasse végétale (plante) médicinale que pour la bio - régénération de sols pollués. La démarche poursuivie dans la réalisation de cette thèse consiste à faire une étude ethnobotanique des plantes étudiées, suivie par une extraction et une analyse qualitative et quantitative de différents composés chimiques susceptibles d'avoir une activité pharmacologique. Parmi ces composés, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ceux doués d'une activité antioxydante.

En effet, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) libérées par l'organisme humain, au cours des diverses attaques sont éliminées ou piégées par des molécules douées de propriétés antioxydantes. Leurs rôles dépassent de loin celui de simples piègeurs ou de suppresseurs de radicaux libres, ils sont efficaces dans la prévention et/ ou dans le traitement des affections parasitaires et non parasitaires.

On retrouve des antioxydants dans toutes les plantes, ils sont qualifiés de métabolites secondaires. Ces composés présentent plusieurs propriétés pharmacologiques, parmi lesquelles, nous citerons les propriétés antibactériennes, anti-inflammatoires, vasodilatatrices, anti-cancérigènes, anti-thrombiques, anti-athérogéniques, anti-pyrétiques, analgésiques, etc [9,10].

Notre recherche est axée vers l'identification de composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes, anthocyanines, tanins), l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de diverses plantes ou parties de plantes.

Ce mémoire est consacré à l'étude de sept plantes ou parties de plantes, le *Daniella oliveri*, le *Desmodium asdcendens*, le *Ficus capensis*, le *Vitex doniana*, le *Securidaca longepedunculata*, et *Miscanthus X giganteus*. Ce dernier est retenu pour son action sur la décontamination des friches industrielles. Parmi les critères ayant conduit au choix des autres plantes il y a l'origine géographique et l'utilisation traditionnelle.

Dans la première partie de ce mémoire nous proposerons une étude ethnobotanique de chaque plante. Cette étude permet de positionner chaque espèce dans la systématique des familles.

Dans la seconde partie, nous décrirons quelques métabolites secondaires, leurs importances dans l'organisme et la biosynthèse de certains d'entre eux.

Dans la troisième partie, nous aborderons les analyses qualitatives et quantitatives des polyphénols, flavonoïdes, anthocyanines et tannins contenus dans nos plantes d'intérêt.

Nous développerons également l'utilisation de la spectrophotométrie UV, de l'HPLC, de la GC-MS, de la RMN et de la SM comme outils d'analyses.

I. ETUDE ETHNOBOTANIQUE DES PLANTES SELECTIONNEES

I.I. *Daniella oliveri* (Rolfe Hutch et Dalz)

Le *Daniella oliveri* est une plante de la famille des Fabacées des zones tropicales et subtropicales riche en glucosides, flavonoïdes, alcaloïdes et tanins. Cette espèce a été décrite par Rolfe, Hutch et Dalz. La famille des Fabacées (de faba, la fève) doit son unité à son fruit, appelé gousse ou légume, d'où le nom de légumineuse 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. Les Fabacées représentent une grande famille constituée des plantes ligneuses (zones tropicales) et herbacées (zones tempérées) avec quelques arbustes qui regroupe environ 12000 espèces réparties en 400 à 500 genres. Cette famille se divise en plusieurs tribus dans lesquelles les genres sont groupés selon le port de la plante, la forme des feuilles et le degré de fusion des étamines.

Les plantes de la famille de Fabacée possèdent plusieurs caractères botaniques en commun, notamment les feuilles sont généralement alternées, pennées ou trifoliolées et stipulées, les racines sont généralement pivotantes et laissent apparaître des nodosités à rhizobium qui se forment si le sol est pauvre en azote. Au niveau de l'appareil de reproduction, toutes les Fabacées possèdent un seul carpelle et un unique ovaire. Celui-ci est surmonté d'un style et d'un stigmate [11].

I.1.1. Etude Botanique

Daniella oliveri (Rolfe, Hutch et Dalz), selon ces auteurs, possède différents synonymes comme, *Daniellia thurifera* A. Chev; *Daniellia thurifera* Benn Var. Chevaleri J. Léonard et *Paradaniellia* Rolfe [12, 13].

I.1.2. Description botanique

I.1.2.1. Caractères morphologiques

Le *Daniella oliveri* est un grand arbre à cime conique dont la forme est généralement en fuseau; le tronc est droit à écorce gris clair et les feuillages sont paripennés. Les folioles à nervures secondaires se raccordent avant la marge avec une présence fréquente d'un long bourgeon-fourreau contenant la jeune feuille enroulée, de couleur brun-rouge de même que le jeune feuillage. Les fleurs sont blanchâtres ou vertes en panicules aplaties (jusqu'à 25 cm de long).

Etude ethnobotanique

Ses gousses coriaces et aplaties portent une graine qui reste attachée à l'aile de la gousse par un petit filament tortillé. Le nombre des étamines se réduit en général à 10 avec une possible variation. La fleur acquiert une corolle zygomorphe. Comme toutes les plantes de la famille, l'étendard est assez discret puis recouvert par les pétales latéraux qui sont eux-mêmes recouverts par les pétales de la carène. La figure 1 montre les différentes caractéristiques de la plante (figure 1).

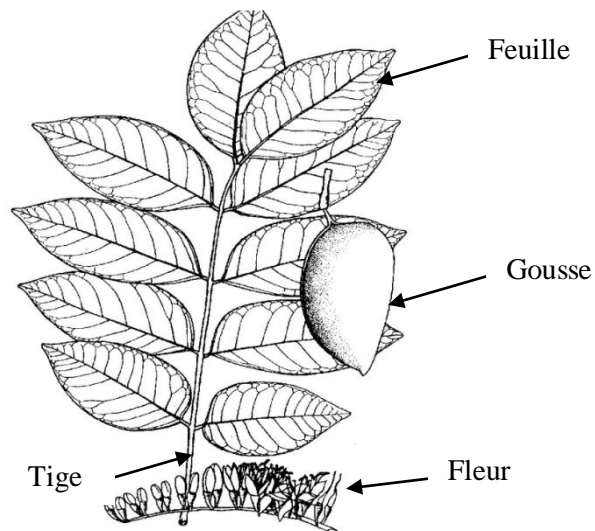


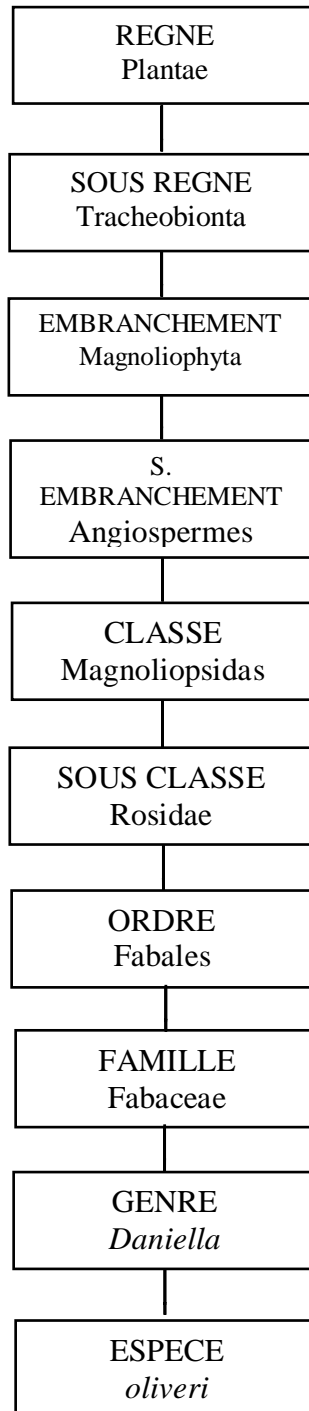
Figure 1: Caractéristiques des feuilles et des fleurs du *Daniella oliveri* Rolfe Hutch & Dalz

(metrafro.be)

I.1.2.2. Taxonomies et systématiques

Le schéma 1 donne une classification botanique de cette plante sous forme d'arbre phylogénique.

Schéma 1: Classification de l'espèce *Daniella oliveri*



I.1.2.3. Habitat et répartition géographique

La distribution des Fabacées est très cosmopolite. On les trouve partout dans le monde. Quant au *Daniella oliveri*, (figure 1) au niveau de l'Afrique, il est plus répandu dans les savanes boisées, mais en zone soudano-guinéenne il est dominant dans les forêts sèches.

I.1.2.4. Noms vernaculaires

Selon Malgras, en fonction de la population ou du dialecte du pays, l'espèce *Daniella oliveri* porte différents noms, d'où la difficulté de pouvoir très souvent l'identifier. Par exemple en Afrique dans la région soudano-guinéenne l'espèce est appelée sanan, sandan (Bamanan), sanan (Malinké), surungo (Minyanka), surgo (Sénoufo), 'o'onu (Bwa), kolè, kulè (Bozo), kèzè (Dogon) et karlahi (Peul) [14].

I.1.2.5. Utilisations en médecine traditionnelle

Daniella oliveri, est une plante qui serait indiquée dans le traitement d'un certain nombre de maladies telle la tuberculose pour les écorces (en décoction). En application locale, les jeunes feuilles séchées et pilées sont utilisées pour les soins des brûlures. En décoction (bain, potion, boisson (per os), elles servent à soigner la trichine et les céphalées. Par ailleurs, les bourgeons-fourreaux des feuilles (en décoction): sont utilisés contre le glaucome (quelques gouttes dans les yeux) et les maux de dents (barbotage).

Les rameaux feuillus bouillis sont utilisés contre l'angine, en décoction, ils sont utilisés contre les insuffisances hépatiques (per os) et les maux de dents des enfants. La résine obtenue par entaille est utilisée contre la bronchite et les cure-dents sont utilisés contre la toux [14]. Les feuilles infusées sont utilisées contre la blennorragie ou urérite [15].

Les feuilles de *Daniella oliveri* sont généralement prescrites traditionnellement pour des variétés de troubles gastro-intestinaux [16]. Les doses journalières de tous ces mélanges ne sont pas déterminées avec exactitude.

La dose est évaluée en termes de nombres de verres ou de gobelets. Pour une infection hépatique ou gastro-entérique par exemple, on fait une décoction aqueuse d'une poignée des feuilles de *D. oliveri*. Prendre *per os* 200 ml 3 fois par jour jusqu'à la guérison [16].

I.1.2.6. Données phytochimiques de la plante

Les travaux d'Onwukaemen [17]; Iwueke et Nwodo [18]; El-Mahmood; Doughari, Chanji [9], ont montré que les extraits des feuilles, des racines et des écorces de troncs étudiées contiennent plusieurs composés chimiques notamment; dérivées alcaloïdiques, tanniques, sucres réducteurs, flavonoïques, composées carboxyles, glucosides cyanogéniques, saponines, stéroïdes et terpénoïdes.

I.1.2.7. Données pharmacologiques

Des extraits réalisés avec différentes parties de *Daniella oliveri* ont montré des propriétés pharmacologiques significatives (antidiabétique, antispasmodique, antihistaminique, analgésique, antipyrétique, relaxant, antimicrobienne et antidiarrhéique). Par exemple, les expériences faites sur les muscles de rat ont prouvé que l'extrait méthanolique des feuilles bloque les neuromuscles du rat [19], les extraits n-butyliques, éthyliques et aqueux des feuilles, des racines et des écorces de tronc ont manifesté une activité antibactérienne sur les *Staphylococcus aureus*, le *Escherichia coli* (*E.coli*), le *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), le *Shigella dysenteriae* (*S. dysenteriae*) et le *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Tricophyton rubrum*, antihyperglycémique et antispasmodique [16, 18, 20].

I.1.2.8. Toxicité de la plante

Les études de la toxicité des extraits aqueux des feuilles, des racines et des écorces de tronc de *Daniella oliveri* réalisés respectivement par Ahmadu et al. [16]; Iwueke et Nwodo [18] et Fane [21], sur les souris, ont montré une toxicité relativement faible. Les essais de toxicité de l'extrait aqueux de racine ont été fait jusqu'à des doses de LD50 > 1g / kg mais les animaux n'ont montré aucune modification importante générale dans leur comportement; jusque 72 heures il n'y a pas eu de mort pour cette forte dose (1g/ kg) de l'extrait administré [16, 18, 21].

I.2. *Desmodium adscendens*

Desmodium adscendens Sw est une plante herbacée de la famille des Fabacées, parfois appelée tiques lotiers, trèfles tiques ou les poux mendiants. Il existe plusieurs dizaines d'espèces dont la délimitation du genre a beaucoup évolué au fil du temps. Ces espèces sont des Fabacées discrètes, peu lumineuses et à grandes fleurs.

Bien que certaines plantes puissent atteindre une taille importante, la plupart sont des herbes ou de petits arbustes. Leurs fruits sont loments, ce qui signifie que les graines sont dispersées individuellement et enfermées dans son segment. Cela fait d'eux des plantes tenaces et certaines espèces sont considérées comme des mauvaises herbes des lieux.

Malgré leurs modestes apparences, le *Desmodium adscendens* est très varié en fonction de la région ou zone géographique et de la population. Le *Desmodium adscendens* est une plante riche en flavonoïdes, en alcaloïdes et en d'autres composés chimiques tels les soyaaponines et les dehydrosoyaaponines.

I.2.1. Etude ethnobotanique

Le nom scientifique donné à l'espèce est le *Desmodium adscendens* Sw, il est parfois nommé *Desmodium procumbens* (Mill.) A.S. Hitchc., les deux vocables faisant allusion à ses longues tiges rampantes qui peuvent s'enrouler sur la base des troncs d'arbres ou autres supports rigides. D'autres synonymes connus sont: *Desmodium coeruleum* (G. Don), *D. caespitosum* Bojer, *D. glaucescens* Miq., *D. heterophyllum* sensu auct. *D. oxalidifolium* G. Don, *D. triflorum* ((L.) DC), *Hedysarum adscendens* Vahl, *H. caespitosum* Poir et *Meibomia adscendens* (Sw.) Kuntze [22, 23].

I.2.2. Description botanique

I.2.2.1. Caractères morphologiques

-Caractères macroscopiques

C'est une plante herbacée plus ou moins vivace rampante se trouvant dans des lieux humides, ou se dressant contre la base des palmiers à huile. Ces feuilles sont trifoliolées alternes. Ses folioles obovales sont longues de 15 à 50 mm, larges de 10 à 30 mm et la foliole médiane est nettement plus développée que les latérales; la base en coin est arrondie, et le sommet arrondi est composé de 5 à 7 nervures latérales. Le dessus est glabre, ou à poils appliqués clairsemés; tandis que le dessous plus densément pubescent, ce qui leurs donnent une coloration plus claire à la face inférieure. Les pétioles sont long de 15 à 20 mm et les pétiolules terminaux de 5-7 mm, les latéraux longs de 1 mm. Les stipules lancéolées sont longues de 5 à 8 mm; et les stipelles sont filiformes. Les tiges et les pétioles sont peu pubescents et à poils appliqués.

Les fleurs sont lachement disposées sur un racème axillaire ou terminal long de 10 à 15 cm. Les pédicelles capillaires sont longs de 10 à 15 mm et la corolle est petite, mais de coloration blanchâtre ou violacée.

Fruit : La gousse articulée est longue de 10 à 25 mm, elle est large de 3 mm, festonnée du côté inférieur composée de 2 à 5 articles longs de 4 à 6 mm. La figure 2, nous montre quelques caractéristiques du *Desmodium adscendens*.

- Caractères microscopiques

Les coupes et les photos réalisées sur les échantillons de *Desmodium adscendens* présentent les éléments caractéristiques de l'espèce :

La tige : il y a une subérification au niveau de l'écorce dans les tiges plus âgées, une lignification au niveau du cylindre central et toujours la présence de fibres nacrées cellulosiques translucides, parfois un peu subérifiées, en îlots dans l'écorce.

Les feuilles : on peut déceler au niveau de la nervure principale les deux arcs libéro-ligneux inversés typiques de l'espèce et une lignification typique au niveau des tissus du centre de la nervure.

Les racines : présence de rayons ligneux avec le phloème en cônes

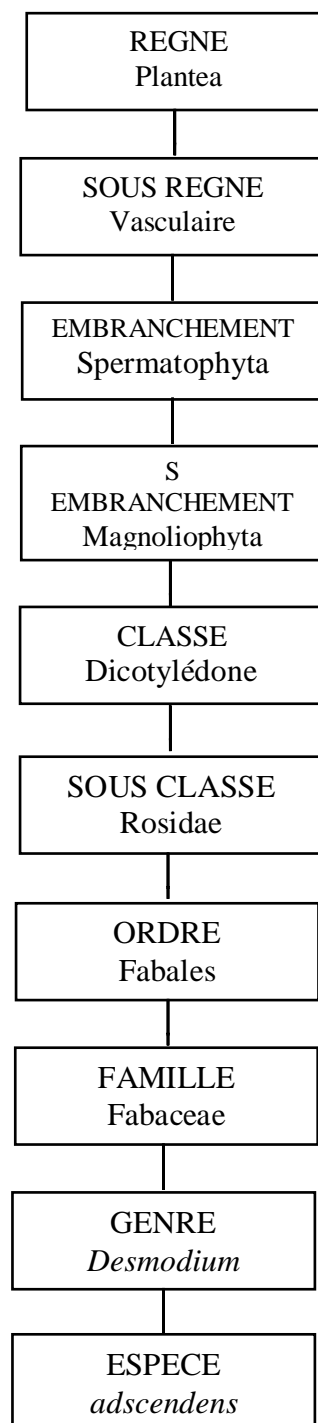


Figure 2: Caractéristiques de feuilles et fleurs du *Desmodium adscendens* SW

I.2.2.2. Taxonomies et systématiques

La taxonomie et la systématique de plusieurs dizaines d'espèces de *Desmodium* sont extrêmement confuses. Les genres voisins tels que *Codariocalyx*, *Hylodesmum*, *Lespedeza*, *Ohwia* et *Phyllodium* ont été et sont parfois encore inclus dans *Desmodium*. Beaucoup de ces plantes étant nettement plus petites, invisibles et indéfinissables; les même taxons ont été appliqués à ce qui plus tard s'est avéré être des espèces très différentes. La classification botanique du *Desmodium adscendens* SW, peut être résumée sous forme d'arbre phylogénique.

Schéma 2: Classification de l'espèce *Desmodium adscendens*



I.2.2.3. Habitat et répartition géographique

Originnaire des zones équatoriales d'Afrique et d'Amérique Latine, elle est très répandue dans la zone équatoriale Africaine où elle pousse à l'état sauvage contre les troncs des palmiers à huile ou des cacaoyers ou dans les jardins potagers. Le *Desmodium adscendens* est une plante grimpante, sauvage qui pousse dans la forêt amazonienne du Pérou et d'autres pays d'Amérique du Sud et sur la côte ouest de l'Afrique. Le genre *Desmodium* est un grand groupe, il est constitué d'environ 400 espèces de plantes herbacées vivaces et aussi annuelles de culture dans les régions tempérées et tropicales de l'hémisphère occidental, d'Australie et d'Afrique du Sud.

Dans de nombreux pays à climat tropicaux, il pousse dans les forêts ouvertes, les pâturages, le long des routes et comme de nombreuses mauvaises herbes; un peu partout il perturbe le sol. Il s'agit d'une plante vivace et/ ou d'une herbacée qui pousse surtout sur les troncs des arbres.

I.2.2.4. Noms vernaculaires

Plusieurs noms ont été donnés à l'espèce en fonction de la population et du lieu où on le trouve notamment en Amérique latine (Brésil, Pérou, Venezuela...) : « amor seco, amor-do-campo, strong back, pega pega, margarita, beggar-lice, burbur, manayupa, hard man, hard stick, tick-clover, tick-trefoil (Anglais), mundubirana, barba de boi, mundurana, owono-bocon, dipinda dimukuyi, dusa karnira ». Par exemple en Amérique latine, au Pérou, il est connu sous l'appellation « de manayupa ou pega pega », au Brésil, il est connu comme « strong back herbe est appelé seco amor amor-do-campo » [23].

I.2.2.5. Utilisations en médecine traditionnelle

En médecine traditionnelle, le *Desmodium adscendens* est utilisé (infusion (4-6) cuillerées par jour ou décoction (1-3 gobelets/ jour)) ou en application locale, pour soigner plusieurs affections; en Amérique du sud par exemple, Brésil, Venezuela et Colombie, les feuilles séchées sont utilisées pour le traitement de l'asthme, des écoulements vaginaux, des courbatures, des douleurs, de l'inflammation de l'ovaire, de la miction excessive, de mucus excessif et de la diarrhée.

Au Venezuela, ces feuilles broyées, sont utilisées contre l'épilepsie par les tradipraticiens amérindiens.

En Afrique, à l'exemple du Ghana, le *Desmodium adscendens* est utilisé par les tradipraticiens pour soigner ou soulager plusieurs maladies: une décoction des feuilles est un remède populaire pour l'asthme bronchique, la constipation, la dysenterie et la colique.

Les feuilles sont également utilisées pour panser les plaies, soulager les maux de dos, les douleurs musculaires, les affections rénales, l'impuissance et diverses affections hépatiques dont l'hépatite virale. Les différents modes de préparations sont broyées, infusées ou décoctées.

D'une manière générale, le *Desmodium adscendens* est utilisé traditionnellement pour soigner plusieurs affections, parmi lesquelles figurent l'asthme, les allergies; les problèmes respiratoires (bronchite, bronchite pulmonaire obstructive chronique (maladie BPCO), emphysème et flegme excessif). Il est souvent utilisé comme antispasmodique, relaxant musculaire, analgésique aussi pour soigner les douleurs d'estomac, les coliques, les crampes intestinales, l'arthrite, les douleurs musculaires et les douleurs articulaires, les blessures, les spasmes, les convulsions, l'épilepsie et les troubles du cycle menstruel [23-26]. Une poignée de feuilles est infusée et le breuvage est pris régulièrement comme thé pour traiter la jaunisse et les intoxications chez les indiens en Amérique latine [26].

En Afrique, la posologie utilisée pour soigner l'ictère est la suivante: faire bouillir pendant 15 minutes dans 1 à 1,5 litres d'eau les parties aériennes de la plante (tige, feuille, fleur ou fruit) ce qui correspond environs à 8-10 grammes de la plante sèche (ou partie de la plante), boire la décoction dans la journée (200 à 250 ml) en 3 fois jusqu'à la guérison [26].

I.2.2.6. Données phytochimiques de la plante

Les composés phytochimiques thérapeutiques trouvés dans les feuilles du *Desmodium adscendens* comprennent les alcaloïdes, les flavonoïdes de la famille indoliques dont l'isovitexine. L'analyse des principes actifs révèle une concentration de saponines, d'anthocyanes et de flavonoïdes. La plante est aussi riche en polyphénols, en tanins et en terpenoïdes. Les acides gras sont présents dans une concentration maximale de 3%, ce qui est relativement riche en acides insaturés [27].

I.2.2.7. Données pharmacologiques

Les études pharmacologiques montrent un effet hépato-protecteur, en particulier par son action positive sur l'évolution du taux de transaminases. Ses indications principales sont les hépatites virales et toxiques (1 cuillerée à café, 3 fois par jour, dans 1/2 verre d'eau des feuilles décoctées).

Plus l'on traite rapidement l'hépatite par le *Desmodium adscendens*, plus les résultats sont de qualités et permanents. Selon les spécialistes, un traitement précoce lors de la phase d'invasion permet d'éviter le passage à la chronicité. Même au stade chronique, l'utilisation du *Desmodium adscendens* donne encore des résultats très intéressants.

L'hépatite C est un cas particulier. Les résultats sont plus inconstants (d'autant que la phase aiguë est le plus souvent silencieuse). On obtient des résultats très positifs mais aussi des échecs complets.

Une autre indication préférentielle du *Desmodium adscendens* est la prévention des effets secondaires hépatiques des chimiothérapies. Aussi, son usage est-il particulièrement recommandé lors d'une chimiothérapie anticancéreuse mais aussi d'une façon plus générale à chaque fois que l'on peut anticiper un risque potentiel de détérioration hépatique. En 1994, Heard [28] de la faculté de pharmacie de Tours, a réussi à expliquer le fonctionnement du *Desmodium adscendens* agissant comme protecteur des cellules hépatiques, par ailleurs d'autres études pharmacologiques des extraits aqueux et éthyliques des feuilles de *Desmodium adscendens* réalisées par Addy et al. [25, 29] ont montré un effet antiallergique et immunomodulateur. En effet, ils ont constaté que, ces extraits administrés *per os*, réduisent les contractions anaphylactiques, s'opposent aux contractions induites par l'histamine et réduisent la quantité de substance stimulant le muscle lisse des tissus pulmonaires du cobaye. Une autre étude montre que le *Desmodium adscendens* inhibe la contraction des muscles lisses d'un iléon isolé de cobaye.

L'usage traditionnel du *Desmodium adscendens* contre l'épilepsie (mentionné chez les amérindiens du Venezuela et chez les Congolais) a suscité une recherche sur l'action neuroprotectrice du *Desmodium adscendens*. Elle a montré que sur des souris intoxiquées au pentylène-tétrazole (PTZ), le *Desmodium adscendens* supprime la phase tonique de convulsion ainsi que la mortalité induite par le PTZ [30].

I.2.2.8. Données toxicologiques

Les études menées par le Laboratoire d' Ethnobotanique et pharmacologie de l'université de Metz n'ont montré aucune toxicité du *Desmodium adscendens* ensuite les tests effectués au C.I.T. (Centre International de Toxicologie, Evreux, France) sur les souris ont montré: une négativité du test du micronoyau et une négativité du test d'Ames.

Ces deux derniers tests éliminent la possibilité de cancérogénicité des feuilles du *Desmodium adscendens* [31-35].

Les extraits éthyliques lyophilisés ont été injectés dans le péritoine des souris jusqu'à une dose de 1000 mg par kg, ce qui correspond à 81 gr de plante / kg. Ces doses énormes n'ont occasionné aucun décès. Le *Desmodium adscendens* est fréquemment utilisé en médecine traditionnelle africaine, aucune toxicité ni effet mutagène n'a été relevé [31-35].

I.3. *Ficus capensis* Thumb & Forssk

Ficus capensis communément appelé figuier est une plante des zones tropicales et subtropicales. Il est présent principalement le long des rivières [36]. Le *Ficus capensis* est une plante de la famille des Moracées. Dans les pays d'origine, on consomme les fruits et les jeunes feuilles aériennes. Il produit des faux fruits (la tige et le réceptacle floral de la plante se trouvent à l'intérieur du fruit) toute l'année et les feuilles sont larges et vertes [37]. Les feuilles et les racines, sont broutées par les vaches pour augmenter la production laitière. Elles sont très riches en alcaloïdes, en flavonoïdes, en tanins, en terpènes, en stéroïdes, en saponines, en résines, en baumes et en glucides. La famille des Moracées comprend près de 1400 espèces réparties en une quarantaine de genres. Ce sont pour la plupart des arbres ou des arbustes, produisant le plus souvent du latex. On peut aussi rencontrer des lianes ou plus rarement des plantes herbacées dans cette famille. On peut citer les genres suivants : *Morus*, *Ficus*, *Artocarpus*, *Maclura* et le *Broussonetia*. La classification phylogénétique place cette famille dans l'ordre des Rosales.

I.3.1. Etude botanique

Le *Ficus capensis* (Thunb et Forssk) (1786), est parfois nommé *Ficus sur Forssk*. D'autres synonymes connus sont *Ficus riparia* (Miq.) A. Rich. (1850), *Ficus mallotocarpa* Warb (1894), *Ficus beniensis* de Wild, *Ficus brassii* R.Br. ex Sabine, *Ficus erubescens* Warb, *Ficus gongoensis* de Wild, *Ficus guineensis* (Miq.) Stapf, *Ficus ituriensis* de Wild, *Ficus kondeensis* Warb, *Ficus lichtensteinii* Link, *Ficus mallotocarpa* Warb, *Ficus munsae* Warb, *Ficus ostiolata* de Wild, *Ficus panifica* Delile, *Ficus platerocarpa* Warb, *Ficus riparia* (Miq.) A.Rich, *Ficus sycomorus* L, *Ficus thonningiana* (Miq.) Miq and *Ficus villosipes* Warb [14, 45].

I.3.2. Description botanique

I.3.2.1. Caractères morphologiques

L'arbre peut atteindre une taille moyenne de 30-35 m de haut et 150 cm de diamètre. Il produit du latex blanc dans toutes les parties aériennes et parfois à contreforts; la coloration de l'écorce externe varie de brunâtre à grise ou blanchâtre, tandis que l'écorce interne est souvent verdâtre à rose; sa cime est massive et étalée.

Les feuilles sont disposées en spirale, simples, elles sont rouges brillantes lorsque l'arbre est jeune; les stipules ont une longueur de 1-3,5 cm; les pétioles ont une longueur variant entre 1-9 cm; les limbes sont elliptiques, ovales ou oblongs, quelquefois presque orbiculaires ou lancéolés, souvent de 4-32 cm ou 2-16 cm. De base arrondie, tronquée ou presque cordée, l'apex est acuminé ou aigu et les bords sont dentés, ondulés, entiers, papyracés, coriaces, lisses sur la face supérieure et poilues à glabres sur la face inférieure, penta-innervé à 9 paires de nervures latérales. Les inflorescences des figues sont des fleurs qui sont enfermées dedans; ces figues sont disposées sur de petites branches ramifiées dépourvues des feuilles, pouvant atteindre 50, 70 voir 150 cm de long, disposées sur le tronc ou sur des branches âgées. Quelquefois elles sont 1 ou 3 groupées à l'aisselle des feuilles, ils peuvent être obovoïdes ou globuleuses, de 1-4 cm de diamètre, souvent stipitées, glabres à densément poilues, rouges à orange foncé à maturité et pouvant avoir un pédoncule de 0,5-2 cm de long.

Les fleurs sont unisexuées et sessiles, elles se trouvent à l'intérieur de la figue. Les fleurs mâles ont un périanthe à 3 lobes et 2 à 3 étamines; les femelles ont 2-4 tépales, les ovaires sont mono loculaire et à style court ou long.

Les faux fruits sont des drupes, ellipsoïdes, oblongues ou ovoïdes de 1,5-2 mm de long, contenant une graine se développant à l'intérieur de la figue.

Les jeunes plantes poussent rapidement, et peuvent atteindre 1 m de haut voire plus au cours de la deuxième année. La figue n'est pas un fruit mais une infrutescence (sycone) qui se développe à partir d'un pédoncule élargi en urne renfermant de nombreuses fleurs (figure 3). Le sycone est une structure fermée disposant d'une seule petite ouverture (ostiole) à l'apex par laquelle pénètrent de petites guêpes femelles; celles-ci pondent alors leurs œufs dans des "fleurs à galles" spéciales, non fertiles, tout en pollinisant les fleurs femelles fertiles.

La pollinisation de *Ficus* est assurée par plusieurs espèces de guêpes: *Ceratosolen silvestrianus* (Afrique de l'Ouest), *Ceratosolen flabellatus* (Afrique de l'Ouest et de l'Est) et *Ceratosolen capensis* (Afrique orientale et australe).

Les fleurs des figuiers (qu'elles soient mâles ou femelles) sont très petites et sont situées à l'intérieur d'un réceptacle creux, plus ou moins fermé que l'on appelle figue ou sycone.

L'ovaire monocarpique (qui ne contient qu'une seule graine) produit un akène qui est incorporé dans le réceptacle.

Le genre *Ficus* comprend environ 750 espèces, dont près d'une centaine se trouve en Afrique, 500 en Asie tropicale et en Australie, et 150 en Amérique tropicale. La variabilité morphologique des *Ficus* est impressionnante. Toutes ces espèces produisent des faux fruits appelés figes (figure 3). Ces plantes produisent toutes du latex, et certains *Ficus* sont utilisés pour la production de caoutchouc, ce fut le cas de *Ficus elastica* qui est aujourd'hui un arbre cultivé dans plusieurs régions du monde notamment comme plante ornementale, sans évaluer cependant le rendement de l'hévéa (*Hevea brasiliensis*), qui est de la famille des Euphorbiacées [38].

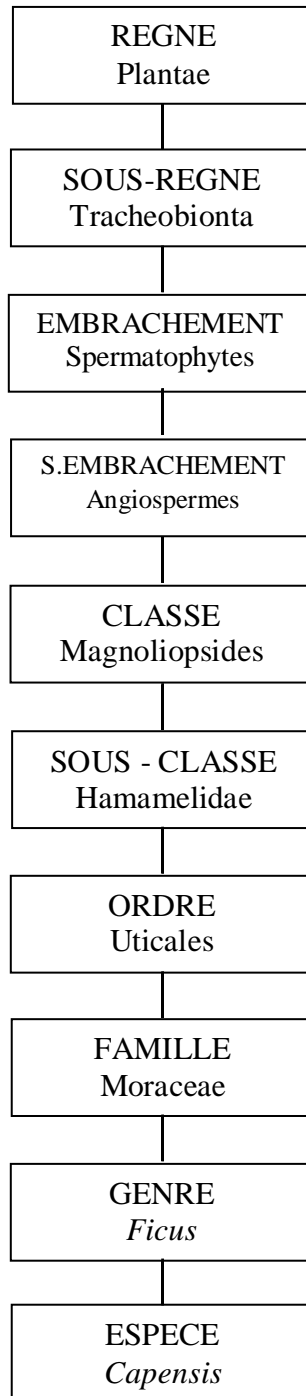


Figure 3: Caractéristiques des feuilles et des fruits du *Ficus capensis* Thunb & Forssk

I.3.2.2. Taxonomies et systématiques

Le schéma 3 donne une classification botanique du *Ficus capensis* Thunb, cette classification est présentée sous forme d'arbre phylogénique.

Schéma 3: Classification de l'espèce *Ficus capensis* Thunb



I.3.2.3. Habitat et répartition géographique

Le *Ficus capensis* (Thunb) ou *Ficus sur* (Forssk), est une espèce commune disséminée en zones soudanienne et soudano-guinéenne, sur des sols humides, bien drainés et des dépressions inondables [14].

Cette espèce est largement répartie dans toute l'Afrique tropicale, depuis le Cap-Vert jusqu'en Somalie et vers le sud jusqu'en Angola et en Afrique du Sud. Elle est également présente au Yémen [39].

I.3.2.4. Noms vernaculaires

Différents noms ont été donnés à l'espèce en fonction de la population et du lieu où on le trouve notamment: petit sycomore (Français); wild fig, cape fig, broom cluster fig, bush fig (Anglais); mkuyu, mkuju, mwangajo (Shwahili), seretoro, toroba, torongènyè (Bamanan); nzeretoro (Malinké); nintorogo (Sénoufo); woro, wuro (Bwa); kajija, koo kajija (Bozo); gaaguyo (Dogon); nigiri bele (Peul) [14].

I.3.2.5. Utilisations en médecine traditionnelle

Les différentes parties de la plante seraient indiquées dans le traitement d'un certain nombre de maladies; les racines par exemple, braisées et pilées avec des épis de maïs grillés, puis tamisées sont utilisées comme remède contre la stérilité féminine [14, 40]. Le breuvage obtenu par décoction en mélangeant les racines et les rameaux feuillus est utilisé pour soigner l'eczéma [14].

Les écorces de tronc décoctées sont utilisées contre l'aménorrhée et la dysenterie, quant aux fruits; pilés et macérés dans l'eau; ils servent aux soins des femmes en accouchement et après accouchement (favorisent la lactation) [14].

D'une manière générale l'ensemble de la plante est utilisé traditionnellement pour soigner, l'eczéma, l'ulcère de la gorge, l'œdème, la dysenterie, la gonorrhée, les maux de ventre, le rachitisme et la stérilité féminine [14, 40].

I.3.2.6. Données phytochimiques de la plante

Les composés phytochimiques thérapeutiques trouvés dans les feuilles et les racines du *Ficus capensis* sont les flavonols, les coumarines, les stéroïdes et les triterpènes. L'analyse des principes actifs révèle une concentration des alcaloïdes, des glucides, des tanins, des résines, des polyphénols, des baumes et des flavonoïdes [41,42].

I.3.2.7. Données pharmacologiques

Les feuilles et les racines sont utilisées comme tonifiant, antirhumatismale, analgésique et aussi pour le traitement de la tuberculose, de la lèpre et des eczémas. L'extrait de feuilles brut inhibe la croissance d'*Escherichia coli* et du *Shigella sp* (un nouveau sérotype en cours d'identification), mais aucune activité contre le *Salmonella typhi*, n'a été observée. Les extraits d'écorces ont également une activité contre l'*Escherichia coli* et *Shigella sp*, mais aucune activité contre *Salmonella typhus* [41-43].

I.3.2.8. Données toxicologiques

Les études de toxicité aiguë réalisées sur des souris en *intra péritonéale* (ip) des extraits aqueux et méthanoliques des feuilles de *Ficus capensis* aussi bien par infusion que par macération ont montré une toxicité positive aux doses > 1200 mg / kg [43,44].

Comme l'un des plus anciens aliments connus de l'homme, la figue comme fruit (faux fruit) a un profil de sécurité élevé. Toutefois, l'évaluation toxicologique d'autres produits de la figue est à un stade précoce. Par exemple, le latex provoque des réactions allergiques (asthme, anaphylaxie) et le contact avec la peau entraîne une dermatite [45]. Par ailleurs, l'administration par voie orale peut conduire à des hallucinations [46, 47]. Mais certains de ces arguments sont mieux évalués dans un contexte clinique [45, 48].

I.4. *Securidaca longependunculata*

Securidaca longependunculata Fresen est une plante dicotylédone de la famille des Polygalacées. Selon Watson et Dallwitz [49], elle comprend 800 espèces réparties en 17 genres: *Atroxima*, *Balgoya*, *Barnhartia*, *Bredemeyera*, *Carpolnobia*, *Comesperma*, *Diclidanthera*, *Epirixanthes*, *Eriandra*, *Monnina*, *Monrosia*, *Moutabea*, *Muraltia*, *Nylandtia*, *Polygala*, *Salomonina*, *Securidaca*.

Ce sont des arbres, des arbustes, des plantes herbacées et quelques rares lianes des régions tempérées et tropicales. En France, elle est représentée par des plantes herbacées du genre *Polygala*. La classification phylogénétique d'APG (1998) et APG II (2003) étend cette famille, en incluant les Xanthophyllacées et la situe dans l'ordre des *Fabales* [49].

I.4.1. Etude botanique

Le *Securidaca longependunculata* Fresen est une plante qui a plusieurs synonymes notamment: *Lophostylis angustifolia* Hochst, *Lophostylis oblongifolia* Hochst et *Lophostylis pallida* Klotzsch.

I.4.2. Description botanique

I.4.2.1. Caractères morphologiques

Le *Securidaca longependunculata* est un arbuste dressé ou petit arbre, de 3-10 m de haut, à cime ouverte avec des branches grêles retombantes. Cet arbre est reconnaissable lorsqu'il est en floraison, ses fleurs varient de la couleur rose à pourpre. L'écorce est lisse, jaune clair à beige, à tranche verte et très mince en surface et jaunâtre devenant brune dessous. Les rameaux gris, finement pubescent, deviennent glabre.

Les feuilles sont alternées, disposées en spirale et parfois très peu espacées entre elles, oblongues linéaires, à sommet arrondi, à base en coin, finement pubescentes sur les deux faces, devenant glabres. Le pétiole est légèrement pubescent, de 4-8 mm de longueur, les nervures sont pennées, composées de 5-8 paires de nervures secondaires peu visibles. Ils s'influent sur le racème terminal de 5-20 fleurs, de 5-8 cm de long. Les feuilles sont fourragères et comestibles [50].

Les fleurs sont asymétriques, à 5 sépales dont deux ailes paraissent être des pétales, à 3 pétales (dont 1 grand et 2 latéraux, plus petits). La fleur, odorante, se distingue des fleurs des fabacées par 8 étamines, qui sont nettement apparentes.

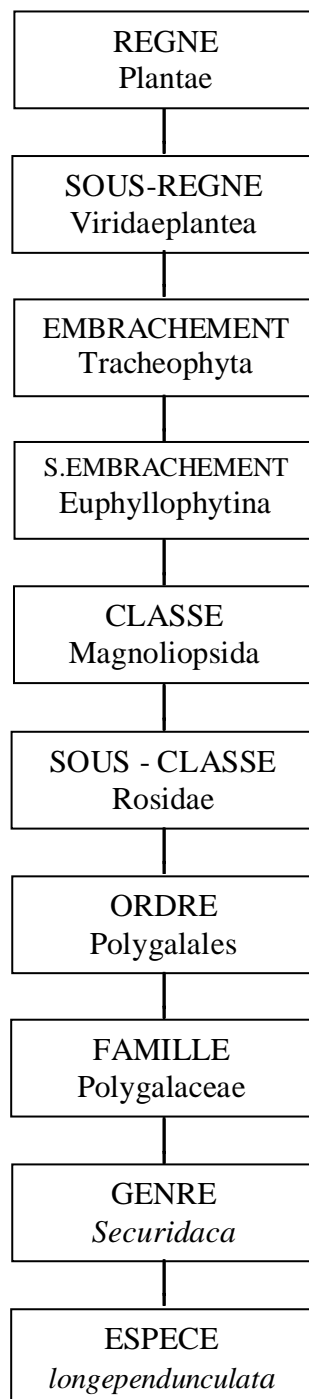
Le fruit est une samare à une aile, de 4-5 cm de long. L'aile, à sommet arrondi, à base en coin, finement veinée transversalement, rouge devenant jaunâtre à maturité. Les graines sont irrégulièrement ridées, assez plates, portant parfois l'amorce d'une seconde aile sur sa partie dorsale. La floraison se fait en seconde partie de la saison sèche, elle intervient souvent simultanément en fleur et en fruit.



Figure 4: Caractéristiques des feuilles et fleurs de *Securidaca longepedunculata* Fresen

I.4.2.2. Taxonomies et systématiques

Schéma 4: Classification de l'espèce *Securidaca longependunculata* Fresen



I.4.2.3. Habitat et répartition géographique

Le *Securidaca longependunculata* Fresen est une plante tropicale et subtropicale. L'espèce panafricaine est disséminée dans les savanes soudaniennes ou soudano - guinéennes. On le trouve toujours isolé sur les latérites et les rochers en zones humides ou au bord des rivières en zone beaucoup plus sèche [14].

I.4.2.4. Noms vernaculaires

Différents noms sont donnés à l'espèce en fonction de la population et du lieu où on le trouve quelques uns sont repris ci-après; violettier, securidaca, arbre au serpent, pelga en moré (Français), tree-violet (Anglais); joro, jori, diro (Bamanan), kièfrèke, mankana (Malinké), juri, dugupya, jege (Minyanka) ,fyeme, fyire (Sénoufo), so onu, so hwinu (Bwa), alale (Peul), Palet (Sara), Uwar magnum guna [14, 51, 52].

I.4.2.5. Utilisations en médecine traditionnelle

L'espèce est très décorative, avec ses fleurs mauves et ses fruits munis d'une aile, la plante est non seulement réputée être antivenimeuse mais aussi a la réputation d'éloigner les reptiles. Les racines sentent une odeur de salicylate de méthyle, elles ont la réputation d'exercer une action répulsive sur les serpents. Le traitement des morsures de serpents interne et externe est réalisé avec le décocté ou le macéré des racines. L'extrait aqueux de la poudre de racine est utilisé comme analgésique, antihelminthique, vermifuge, contre les morsures de serpent, les démangeaisons, la lèpre, le rhumatisme, les courbatures, les maux de ventre pour femmes enceinte, la céphalée, la carie dentaire, la toux, la bronchite, la tuberculose, l'ictère, la constipation, l'occlusion intestinale, les amibiases, les vers intestinaux, la malaria, les hépatiques, etc. Son action répulsive contre les animaux à sang froid (serpents, scorpions, ...) est également rapportée [14, 53].

Les écorces de tronc sont utilisées pour soigner la filariose ensuite le mélange des extraits des ramettes et des feuilles est utilisé contre la morsure de serpent, la conjonctivite, la cataracte et le trachome.

Quant aux racines, elles sont utilisées comme antiseptique pour le déparasitage interne et externe du bétail et en application locale sur les plaies et les blessures. Les extraits aqueux des écorces de tronc sont utilisés contre l'épilepsie. La poudre de l'écorce des racines est utilisée contre les céphalées et la migraine en prise nasale, elle est fortement sternutatoire (provoque l'éternuement).

La plante serait le plus célèbre poison intra-vaginal de l'Afrique du sud où les suicides féminins par introduction dans le vagin de diverses préparations de racines seraient fréquents. De nombreux autres usages médico-magiques (folie, empoisonnement) et magico-religieux (protection contre les serpents et mauvais esprits) lui sont reconnus [14, 51, 54]. Quant à la posologie, pour soigner une infection, on réalise une macération dans un litre d'eau de plus ou moins 60 g d'écorces sectionnées de *S. longependunculata*, ensuite prendre ce breuvage par voie orale, environ 100 ml matin et soir jusqu'à la guérison [51].

I.4.2.6. Données phytochimiques de la plante

Les composés phytochimiques thérapeutiques trouvés dans les feuilles et les racines du *Securidaca longependunculata* comprennent les glucides, les sucres réducteurs, les glucosides, les flavonoïdes, les terpènes, les stérols, les saponines, les acides organiques, les résines, les silicates et ses dérivés [42, 55, 56]. Comme toutes les plantes de la famille des polygalacées, les écorces de *Securidaca longependunculata* contiennent beaucoup de salicylate de méthyle [51].

I.4.2.7. Données pharmacologiques

Plusieurs propriétés pharmacologiques ont été évaluées sur le *Securidaca longependunculata* certaines d'entre elles sont reprises ci-dessous. Par exemple, l'activité anti-inflammatoire a été évaluée chez les souris par Okoli et al. [56] auxquelles on a administré une dose (5 mg) des extraits des racines aussi bien méthylrique qu'à l'éther de pétrole [56] et les solutions aqueuses d'éthanol, du méthanol des extraits de racines et de feuilles ont montré une activité antimicrobienne spécifique contre les *Escherichia coli*, les *Shigella sp.* et les *Salmonella typhus*, ils ont aussi manifesté une activité anti-diarrhéique [57]. Une activité antispasmodique a été évaluée pour les extraits au dichlorométhane des écorces, des racines et les feuilles de *S. longependunculata* [58], les extraits aqueux ont manifesté un effet antinociceptifs et dépressifs [52]. Selon une étude réalisée par Mahmood et al. [59], l'extrait aqueux des racines a montré une activité anti HIV.

I.4.2.8. Données toxicologiques

La toxicité aiguë des extraits aqueux de racines a été évaluée par Adebisi et al. [52]. Pour une dose de 2000 mg/ kg dose limite selon l'OCDE, aucune mortalité ou aucun signe de toxicité aiguë n'a été constaté chez les souris testées. La DL50 de l'extrait est donc plus importante que la dose limite testée [52].

Par ailleurs, la toxicité aigüe évaluée chez les souris pour les extraits méthanoliques administrés en *ip* et *per os* ont donné une DL50 de 11 et 282 mg / kg respectivement [56]. Dans une autre étude réalisée par Dapar et al. [60], ils ont constaté qu'après l'administration des extraits aqueux des racines de *S longepeduncula* à des rats, la toxicité est fonction du type d'organe et de la dose administrée. Dans les reins, le foie et les poumons l'estimation de la DL50 a donné une valeur de 36,74 mg/ kg. Ensuite ils remarquent que ces animaux devenaient calmes après l'administration de l'extrait. Et, juste avant la mort, ils ont montré des signes de détresse respiratoire (haletante) et une paralysie musculaire avec un étirement des membres postérieurs, ces signes sont, en toxicologie, indicateurs d'une intoxication [60].

I.5. *Stevia rebaudiana* Bertoni

Stevia rebaudiana Bertoni appelé aussi «chanvre d'eau» ou simplement «Stévia» est une plante de la famille des Astéracées. La famille des Astéracées ou Composées est une importante famille de plantes dicotylédones qui comprend près de 13000 espèces réparties en 1500 genres. Ce sont essentiellement des plantes herbacées même s'il peut exister des arbres, des arbustes ou des lianes dans cette famille.

Les Astéracées ont la caractéristique commune d'avoir des fleurs réunies en capitules, c'est-à-dire serrées les unes à côté des autres, sans pédoncules, placées sur l'extrémité d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des bractées florales. Cette structure en forme de coupe ou de collerette est appelé un involucre. Ainsi, contrairement à l'opinion populaire, ce qu'on appelle une «fleur» de tournesol, de chardon, ou des pissenlits n'est en réalité pas «une» fleur mais un capitule de fleurs. La fleur des Astéracées est très particulière: les étamines sont soudées par leurs anthères déhiscentes vers l'intérieur. Sous les stigmates sont situées des "brosses à pollen". La croissance rapide du style permet un brossage du pollen et sa récupération. Une fois que le stigmate a traversé le tube formé par les anthères, les stigmates se déplient et exposent leur face gluante au pollen. Il faut penser qu'à ce moment - là, du nectar est sécrété. On peut diviser les fleurs des Astéracées, appelées aussi fleurons, en 3 groupes selon l'aspect des capitules:

- *Les liguliflores* (chicorée, pissenlit, laitue etc.) composées uniquement de fleurons ligulés. Elles présentent des languettes, ou ligules, dans lesquelles les équivalents des pétales sont soudés, généralement par cinq, parfois par trois, reconnaissables seulement aux dents de la languette, et où un pétale prédomine;
- *Les tubuliflores* (chardon, cirse, centaurée etc.) dont le capitule n'est composé que de fleurons tubulés (ou fleurs tubulaires). Elles présentent des tubes terminés par des lèvres imperceptibles ou s'ouvrant plus ou moins largement en cinq lobes;

- *Les radiées aux fleurons périphériques ligulés* entourant un disque de fleurons tubulés (marguerite, aster, séneçon etc.) [22].

Les Astéracées constituent l'une des grandes familles qui contient environ un dixième du nombre total des plantes à fleurs, comprenant environ 950 genres et plus de 20000 espèces et se caractérisent par de petites fleurs disposées dans une tête ressemblant à une fleur unique [61]. Le genre *Stévia* est l'un des 950 genres de la famille des Astéracées qui a plus de 200 espèces. Il est non seulement constitué principalement des herbacées, mais aussi des arbustes et des arbres. L'espèce *Stevia rebaudiana* Bertoni contient des édulcorants intenses naturels. Il convient de distinguer la plante, dont les feuilles peuvent être séchées et réduites en poudre grossière (généralement de couleur brune) et les édulcorants issus de la plante (stéviols, stévioides et rébaudiosides principalement), qui sont extraits par macération dans des solutions hydro - alcooliques, puis éventuellement purifiés, séchés et présentés en poudre fine (généralement de couleur blanche).

Les édulcorants intenses laissent une sensation sucrée qui dure plus longtemps que celle du saccharose. Certains peuvent laisser un léger goût amer ressemblant à la réglisse surtout à forte concentration. Leur fort pouvoir sucrant (jusqu'à 300 fois celui du saccharose) suscite l'intérêt comme alternative au sucre. Il aurait aussi des effets positifs contre l'obésité et l'hypertension. Les édulcorants intenses (d'origine naturelle ou de synthèse) modifient très peu le taux de glucose dans le sang, ils sont donc intéressants pour les diabétiques ou les régimes faibles en glucides [22, 62].

I.5.1. Etude ethnobotanique

Stevia rebaudiana Bertoni est une plante sauvage est utilisée pour ses effets sucrants depuis plus de 2000 ans par les indiens Guarani d'Amérique du Sud. C'est à Peter James Esteve, botaniste espagnol du XVI^e siècle, que cette plante doit son nom. Les conquistadors ont montré peu d'intérêt pour cette plante et des siècles plus tard la *stévia* est redécouverte par le Dr Moisés Santiago Bertoni qui baptisa la plante en 1887 en hommage à un chimiste paraguayen Ovidio Rebaudi qui réussit à isoler pour la première fois la substance active de la *Stévia*: d'où le nom "*Stévia rebaudiana* Bertoni". Depuis plus d'un siècle, cette plante fait l'objet de recherches scientifiques. Il existe bien d'autres variétés de *Stévia*, mais la *Stévia rebaudiana* Bertoni a un pouvoir édulcorant tout à fait exceptionnel. Pour protéger la plante à l'état sauvage, et répondre à la demande, la *Stévia* est actuellement cultivée à grande échelle, au Brésil mais aussi en Chine et en Inde. Cette plante est aussi appelé *Eupatorium rebaudianum* Bertoni [63].

I.5.2. Description botanique

I.5.2.1. Caractères morphologiques

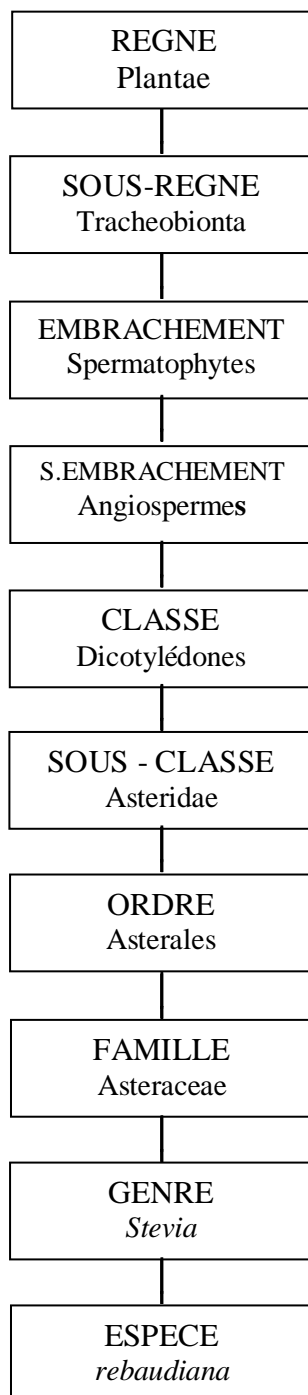
La *Stévia rebaudiana* Bertoni est un arbrisseau d'environ 60 à 120 cm de hauteur à l'âge adulte, elle a une durée de vie de 3-5 ans. La feuille est large d'environ 1 à 2 cm et longue de 3 à 5 cm. Ses tiges faibles semi - ligneuses portent des feuilles opposées, les petites fleurs blanches apparaissent sur des têtes indéfinies. Elle est auto-stérile et son pollen peut être allergène, les graines sont petites et sont dispersées par le vent grâce à leur pappe duveteux. Elle prospère en plein soleil, dans des sols relativement pauvres, mais craint la sécheresse, les racines poussant près de la surface. Pratiquer un arrosage léger tous les 2 ou 3 jours et un paillis autour des plants. La germination des graines étant faible (environ 25%), il est plus efficace de replanter des boutures achetées chez un pépiniériste en demandant des plants à fortes concentrations en stévoïdes. Elle se bouture facilement en toute saison et se transplante en même temps que les tomates, étant sensibles aux températures inférieures à 10°C. Elle pousse aussi bien en terre qu'en pot. Les feuilles sont plutôt à récolter en automne car la concentration en stéviolide (agent sucrant) est plus forte. On fait sécher ses feuilles puis on les réduit en poudre (en prenant soin de retirer avec un tamis les nervures, qui ont un goût un peu amer). On peut ainsi sucrer ses boissons en faisant infuser des feuilles fraîches (une feuille correspond à un sucre) ou séchées. Les feuilles sèches sont entre 30 à 45 fois plus sucrées que le saccharose.



Figure 5: Caractéristiques des feuilles et des fleurs de *Stevia rebaudiana* Bertoni

I.5.2.2. Taxonomies et systématiques

Le schéma 5: Classification botanique du *Stevia rebaudiana* Bertoni



I.5.2.3. Habitat et répartition géographique

Originnaire des régions tropicales d'Amérique du Sud et d'Amérique Centrale (nord du Mexique), où cette plante pousse à l'état sauvage dans des prairies ou des massifs montagneux, sous un climat semi-aride; on le retrouve maintenant sur un large éventail de domaines 500-3500 m d'altitude 1,5-1,8 mm de pluie tombent et -6 °C à + 43 °C des températures. Elle pousse mieux dans un sol qui est bien drainé mais avec une capacité d'eau raisonnable et de préférence avec un pH de 5-7; le sol alcalin doit être évité [64-66]. Bien que plusieurs pays se soient lancés dans la production du *Stévia* (Argentine, Brésil, Uruguay, Amérique Centrale, États-Unis, Canada, Chine, Corée, Japon, Thaïlande, Israël, Angleterre, Tanzanie...), la majeure partie provient cependant de la Chine et du Japon [67].

I.5.2.4. Noms vernaculaires

Couramment appelée «Stévia», «Chanvre d'eau » ou « Plante à sucre » elle a aussi pour nom vernaculaire: Au Paraguay: Caà-éhê, Kaa-hée ou Kaa-héo, (Indien); Yerba dulce (Espagnol); Herbe Sucrée du Paraguay (France); Stevia, honey grass, sweet plant, sweet herb, sugar leaf (Anglais) [63,65].

I.5.2.5. Utilisations en médecine traditionnelle

Les Indiens du Paraguay utilisent les feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni pour sucrer leur thé. Le très fort pouvoir sucrant de certains de ses composés, les diterpènes glycosylés, confèrent à cette plante un grand intérêt économique. En effet la médecine traditionnelle l'utilise aussi dans les cas de diabète, d'hypertension et comme contraceptif. Plusieurs propriétés médicinales ont été décrites. Si certaines de ces propriétés sont anecdotiques, elles ont cependant traversé de nombreuses générations depuis les indiens Guarani. Il faut citer : l'aide à la digestion, la stimulation intellectuelle, l'hygiène bucco-dentaire (tonique, prévention de la carie, élimination de la plaque dentaire), la régulation de l'hypertension, l'effet antimicrobien, le traitement de la peau (anti séborrhéique) et un anti fongique (*Candida albicans*). A ce jour, des extraits de *Stevia rebaudiana* sont commercialisés dans de nombreux pays pour: l'alimentation (industrielle et grand public) en tant qu'édulcorant et/ ou complément diététique, la phytopharmacie et l'herboristerie, la cosmétique, l'hydratation de la peau, l'acné, l'hygiène dentaire (bain de bouche, dentifrices...), l'hygiène corporelle (gels de douches...), la pharmacie (enrobage de pilules, sirops, traitement de la toux...).

D'autres parts, il existe également un effet répulsif vis-à-vis des insectes et bien que non toxique, une utilisation comme «insecticide» naturel d'extraits de *Stevia rebaudiana* par des jardiniers bio a également été décrite. Les études scientifiques sont parfois contradictoires quant aux propriétés de cette plante [64, 67].

I.5.2.6. Données phytochimiques de la plante

Les études préliminaires réalisées sur les feuilles et les tiges ont révélé la présence des composés polyphénoliques, des flavonoïdes, des saponines, des tanins, des stéroïdes et des alcaloïdes dans les feuilles de *S. rebaudiana*. Les extraits des feuilles et des tiges ne contiennent pas d'antraquinones [68, 69].

En 1931, deux chimistes français, du nom de Bridel et Lavieille, ont isolé pour la première fois les glycosides de *S. rebaudiana* qui donnent son goût sucré. Ces glycosides ont été nommés stevioside et rebaudioside. Les glycosides sont des composés organiques, qui comportent une composante du sucre (glycone) et une composante non sucrée (aglycone). Les feuilles de *S. rebaudiana* contiennent des glucosides diterpène, à savoir le stéviolside, steviolbioside, rebaudioside A-F et ducloside A, qui sont responsables de la saveur sucrée typique [70]. Des diterpènes, des triterpènes, des stérols et des flavonoïdes sont quelques métabolites secondaires non-sucrés identifiés dans les feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni [68, 71].

I.5.2.7. Données pharmacologiques

Les extraits de *S. rebaudiana* ont manifesté des effets bénéfiques sur la santé humaine, notamment comme antihypertenseur, antibiotique, anti-obésité et antioxydante. On pense aussi qu'il influence le métabolisme du glucose et des fonctions rénales [72, 73]. Le *S. rebaudiana* ne fait pas baisser la glycémie chez les sujets normaux [74].

I.5.2.8. Données toxicologiques

Les études de toxicité aiguë effectuées sur des souris ont révélé que l'administration des doses graduées des extraits aqueux et éthyliques à 70 % de *S. rebaudiana* ne produisait pas de changements notables dans les comportements tels que la vigilance, l'activité motrice, la respiration, l'agitation, la diarrhée, les convulsions, le coma et l'apparence des animaux jusqu'à une dose de 5 g / kg. Aucun décès n'a été observé jusqu'à cette dose. Ces expériences ont été menées sur une période de 72 heures. Ces résultats ont montrés que les extraits des plantes n'avaient pas d'effet négatif, indiquant que la dose létale moyenne (DL₅₀) pourrait être supérieur à 5 g / kg de poids corporel chez la souris [75].

1.6. *Vitex doniana* Sweet

Vitex doniana est une plante de la famille des Verbénacées; une famille qui est très proche des Lamiacées. La famille des Verbénacées est une famille des plantes dicotylédones qui comprend environ 3000 espèces des plantes essentiellement tropicales réparties en 90 genres mais les dernières recherches phylogénétiques réduisent les contours de cette famille au profit des Lamiacées, avec entre autres *Avicennia* incluse dans les Acanthacées [76].

Le *Vitex* est un genre d'environ 250 espèces d'arbustes et d'arbres incluant le *Vitex agnus-castus* var. *agnus - castus* L., *Vitex cuneata* Thonn., *Vitex lucens* Puriri, *Vitex Keniensis* Turrill, *Vitex negundo* Linné et *Vitex trifolia* L., dans le passé, ce genre était inclus dans la famille des Verbénacées, il a récemment été transféré dans la famille des Lamiacées (Lamiacée, famille de la menthe) [77].

1.6.1. Etude botanique

Vitex doniana Sweet est également appelée *Vitex cuneata* Thonn. Plusieurs autres synonymes lui ont été donnés notamment: *Vitex milnei* W. Piep., *Vitex divaricata* Baker, *Vitex paludosa* Vatke, *Vitex cienkowskii* Kotschy & Peyr, *Vitex umbrosa* G. Don exsabine [77].

1.6.2. Description botanique

1.6.2.1. Caractères morphologiques

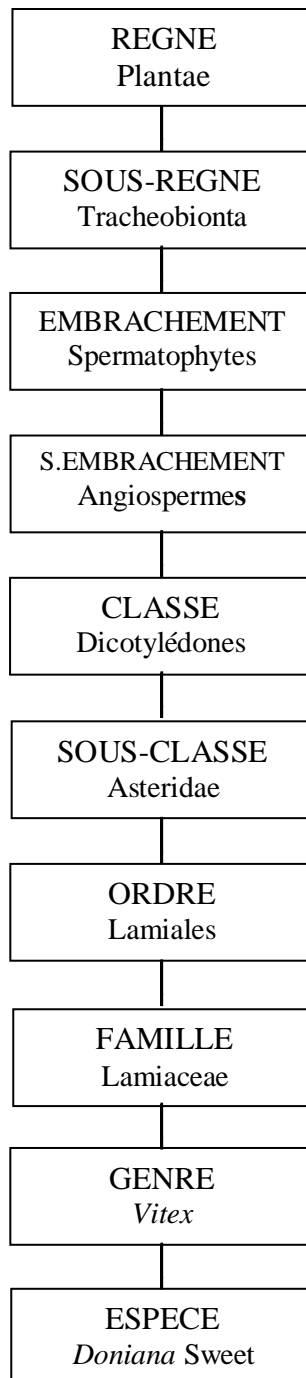
Ces sont des arbres (ou arbustes) à cime arrondi dont la taille moyenne se situe entre 1 - 35 m de haut. Ils possèdent un tronc de couleur brun clair dont les écorces sont crevassées, écailleuses et épluchages. Leurs feuilles sont opposées, digitées, palmées, ou en tri-feuillages et pétiolées. Les folioles sont elliptiques et mesurent 10 cm de long à 6 cm de large tandis que les pétioles peuvent mesurer jusque 9 cm de long. Ils forment des petites fleurs roses, violettes ou blanches axillaires qui sont à l'origine de fruits de formes ovoïdes. Les fruits sont verts tachetés de blanc et noirâtres à maturité [13, 76].



Figure 6: Caractéristiques des feuilles, des fleurs et des fruits de *Vitex doniana* Sweet

I.6.2.2. Taxonomies et systématiques

Le schéma 6: Classification botanique du *Vitex doniana* Sweet



I.6.2.3. Habitat et répartition géographique

Ces sont des arbres, des arbustes, des plantes herbacées et des lianes, producteurs d'huiles essentielles, largement répandus dans le monde et plus particulièrement dans les zones tropicales et tempérées.

Ils supportent les milieux arides mais sont absents du nord et du centre de l'Europe et d'Asie. En Afrique, l'espèce est présente dans la savane boisée en zone soudano-guinéenne et soudanienne [14,76].

I.6.2.4. Noms vernaculaires

Couramment appelée *Vitex doniana* Sweet ou *Vitex cuneata* Thonn, ci-dessous sont énumérés quelques noms vernaculaires données en fonction de la situation géographique de l'espèce: yakerekou (Bariba), kpenouwan (Peulh), plem (Amargna), Silanri (Ari), Black Plum, Ori-nla (Anglais), Koroba, korofin (Bamanan), kutundimon (Malinké), koriyerefo, koro shige (Minyanka), koro ciwe (Sénoufo) et orhabilu (Bwa), Mfuru, Mgwobe (Tanzania), Munyamazi, Muhomozi (Uganda) [14, 76, 77].

I.6.2.5. Utilisations en médecine traditionnelle

Traditionnellement, les racines en décoction sont utilisées pour soigner les maux de dents, la dysménorrhée, la jaunisse, le gastrique, l'amibiase (vermifuge), le colique, la lèpre, le vomissement et la stérilité.

Les écorces du tronc et les feuilles sont utilisées en décoction pour traiter l'ictère, les douleurs abdominales, les maux de ventre, la lèpre, les diarrhées infantiles, les faiblesses, les courbatures, les affections de voies respiratoires et les maux de tête.

Les feuilles mâchées sont utilisées en application locale pour soigner les blessures, tandis que macérées (instillation) elles sont utilisés pour les soins de la conjonctivite purulente, le soin intime des femmes après et avant l'accouchement.

Les fruits, sont non seulement une source de vitamines (A, C) mais ils seraient recommandés pour le traitement de l'amibiase. D'autres utilisations telles que le traitement de l'épilepsie, de la fièvre, des morsures de serpents sont associées aux feuilles, aux écorces de troncs et de racines. Utilisation alimentaire : les jeunes feuilles et les fruits sont comestibles [14, 76].

La posologie du traitement proposé contre l'amibiase est le suivant: faire une décoction aqueuse d'environ 3 fruits (faux fruits) sectionnés de *Vitex doniana*. Prendre *per os* 100 ml matin et soir jusqu'à guérison [76].

I.6.2.6. Données phytochimiques de la plante

Les études préliminaires réalisées sur les feuilles, les écorces de tronc et les fruits ont révélé la présence de la phytine, des tanins, des vitamines (A, B, E), des terpènes, des stéroïdes, des sucres (carbohydratés), des saponosides de composés polyphénoliques, des flavonoïdes et des anthraquinones [78-82].

L'huile issue du *Vitex doniana* (noix) a un indice d'iode élevé et un faible indice de saponification, elle peut donc être utilisée pour la fabrication de produits cosmétiques (crème de la peau) et de résines pour la production de peinture [83].

I.6.2.7. Données pharmacologiques

Les extraits aqueux, cétoniques, éthérés, butyliques et méthyliques des écorces de troncs, des feuilles et des racines présentent une activité antibactérienne, anti-malaria, anti-inflammatoire, anti-helminthique, anti-diarrhéique, analgésique, une augmentation des hormones de gestations et des effets positifs sur la libido [81-87].

I.6.2.8. Données toxicologiques

La toxicité des extraits aqueux des écorces de racines de *Vitex doniana* a été évaluée sur des rats par Abdulrahman et al. [88]. La dose létale de ces extraits a été évalué à 1000 mg/kg tandis que celle entraînant directement la mort était de 1600 mg / kg. Les symptômes de toxicités observés étaient celle d'une dose-dépendante. Dix à quinze minutes après l'administration de l'extrait tous les rats dans les différents groupes ont été très affaiblis. Ceux qui ont reçu la dose de 1600 mg/ kg ou plus ont été profondément sous sédation et se sont endormis. Les signes observés avant le décès étaient: la perte d'appétit, la léthargie, la paralysie des membres postérieurs, qui ont progressé vers les membres antérieurs, les difficultés de respiration et le coma. La mortalité a été enregistrée 5 heures après l'administration de la dose de 1600 mg / kg [88]. Ladeji et Okoye [89] ont évalué les propriétés anti-hepatotoxicité protectrice des extraits aqueux des écorces de *Vitex doniana* chez le rats; ainsi la capacité d'un extrait aqueux des écorces de *Vitex doniana* utilisé pour protéger le foie de rats albinos chez qui on a administré du tétrachlorure de carbone qui a induit des dommages au foie a été évaluée en mesurant les taux sériques d'alanine amino transférase (ALAT), aspartate amino transférase (ASAT), phosphatase alcaline (ALP), la bilirubine et de protéines totales.

Le traitement avec un extrait aqueux d'écorce (200-1000 mg / kg de poids corporel) de *V. doniana* après administration du CCl₄ ont diminué de manière significative les taux sériques d'ASAT, ALAT, ALP et de la bilirubine ($P < 0,01$), tandis que le niveau de protéine totale est resté le même pour les deux tests et les rats témoins. L'effet anti-hépatotoxique semble dépendre de la dose administrée et de la durée du traitement. L'administration des mêmes concentrations de l'extrait aqueux avant le CCl₄ n'offre aucune protection. Les résultats suggèrent que l'extrait aqueux des écorces de tronc du *V. doniana* peut être hépato-protecteur et que la toxicité de celle-ci est fonction de la quantité administrée [89].

La toxicité de l'extrait aqueux des feuilles a été évaluée par Iwueke et al. [86], les valeurs trouvées correspondant à LD50 > 3 000 mg/ kg (valeurs largement supérieures à celles établies par U.E.) donc les feuilles peuvent être considérées non toxiques [86].

I.7. *Miscanthus x giganteus*

Miscanthus géant (*Miscanthus X giganteus*) est une espèce hybride des plantes herbacées de la famille des Poacées. Elle résulte du croisement de *Miscanthus sinensis* (figure 7a) et *Miscanthus sacchariflorus* (figure 7b). Les Poacées (autrefois appelées Graminées) forment une importante famille végétale. Elles tirent leur nom actuel du genre *Poa* (les pâturins). On regroupe près de 12 000 espèces dans cette famille réparties en plus de 700 genres. La plupart de ces espèces sont des herbes et des bambous. C'est une famille cosmopolite qui présente un intérêt économique majeur, assurant une grande partie de la nourriture de l'humanité [90 - 92].

I.7.1. Etude botanique

Le *Miscanthus géant* fut créée dans un but de production énergétique : certaines espèces du genre *Miscanthus* (des «herbes à éléphant») rencontrent un intérêt croissant de la part de l'industrie et d'une partie du monde agricole en raison de sa productivité et de sa teneur en ligno-cellulose. Pour en faire des cultures dites *énergétiques*, des chercheurs ont créé, en Asie, cette nouvelle espèce. Cet hybride, stérile. Néanmoins, comme d'autres espèces de grandes graminées s'étant localement montrées invasives [notamment l'un de ses parents, *Miscanthus sinensis*], certains craignent que le *Miscanthus géant*, même s'il est stérile, puisse devenir une nouvelle espèce invasive, en diffusant via ses rhizomes. La durée de vie de cette graminée rhizomateuse pérenne est estimée à plus de 20 ans. Cette plante a un cycle de photosynthèse C₄, ce qui en fait une plante à efficacité supérieure en termes de fixation du carbone.

Un avantage important de cette C₄ est qu'elle peut contribuer à photosynthétiser à des températures allant jusqu'à 5°C. En comparaison, le maïs cesse l'activité de photosynthèse à 14°C. La culture du *Miscanthus* nécessite peu d'intrants, car le feuillage retombe au sol durant la période hivernale et les minéraux sont recyclés lors de sa décomposition. La durée de vie prolongée entraîne des économies en lien avec les opérations mécaniques d'implantations, de travail du sol et du contrôle des adventices [93].

Certains groupes industriels ou structures de recherche s'y intéressent en vue d'éventuelle production de l'électricité, des agrocarburants, de la biomasse, ou pour répondre aux appels des projets de productions d'électricité «propre».

Les cultures sont testées sur des parcelles expérimentales en tant que culture à potentiel énergétique et de production de biomasse, dans divers pays depuis la fin des années 1990, avec l'espoir qu'il puisse contribuer à améliorer l'indépendance énergétique, maintenir des emplois agricoles et limiter les émissions de gaz à effet de serre à partir des combustibles fossiles. On a envisagé qu'il puisse enrichir des pâtes à papier [90, 94].

En ce qui concerne la bio-régénération de sols pollués, plusieurs études ont établies une relation entre l'interface sol/ plantes/ et polluants puis entre plantes et les polluants organiques. En effet, les molécules organiques sont relativement bien éliminées par des processus naturels impliquant tous les éléments de la rhizosphère tels que les bactéries, les racines (exsudats racinaires). Selon Edwards [95], il existe 5 facteurs qui influencent le transfert des composés organiques dans les plantes :

- La taille de la molécule organique : les parties racinaires ne peuvent pas empêcher le transfert de toutes les molécules
- La polarisation des molécules : le prélèvement des composés polaires est plus facile que celui des composés non polaires
- Les substances lipophiles sont très faiblement incorporées dans les parois cellulaires végétales. Elles peuvent en revanche être adsorbées par les surfaces des racines et des tiges au contact du sol
- Les caractéristiques physiques et chimiques du sol
- Les caractéristiques des plantes réceptrices (famille, espèces et variétés).

La tolérance des végétaux aux polluants est déterminée par leur toxicité ainsi que par les concentrations accumulées. On peut caractériser 3 réactions principales de tolérance aux composés organiques, il y a *la mortalité de la plante*, *les réactions sublétales* ((elles se manifestent par des modifications physiologiques de la plante (croissance, reproduction,

photosynthèse)), ces réactions ne provoquent pas la mort de la plante mais uniquement des nécroses localisées et non fatales), et *la tolérance totale aux polluants présents* [96,97].

Sur les sites et les sols pollués, des tests ont été faits au Japon et en France (en Île-de-France et dans le Nord). Dès 1992, deux chercheurs japonais avaient montré que le *Miscanthus* tolère des sols très pollués par certains métaux, et qu'il accumule mal le cadmium dans ses feuilles (1,75 mg/ kg). L'INRA fait en France des tests sur des sols pollués par d'anciens champs d'épandage d'eaux usées.

I.7.2. Description botanique

I.7.2.1. Caractères morphologiques

Haut de près de 4 m sur sol humide et riche s'il a bénéficié d'une température clémente, il évoque à la fois le maïs pour sa productivité, le bambou pour la finesse de ses feuilles et la canne à sucre pour sa hauteur. On peut le cloner, mais au risque de favoriser le développement de maladies dans les cultures. Son rendement serait d'un peu plus de 12 t/ ha pour la France. Ses promoteurs lui attribuent un faible risque d'invasivité au motif qu'il est stérile, mais il peut se reproduire végétativement, ou être reproduit via ses rhizomes, ou par clonage. Ceci reste un risque très faible puisque le rhizome ne s'étend que sur 1 m². *M. spp giganteus* est constitué d'une gaine ligneuse cylindrique creuse sur laquelle des feuilles alternes coupantes et étroites sont insérées. Le *Miscanthus* produit un rhizome sur lequel se développent des bourgeons constitués de feuilles rugueuses en forme d'écaille. Chaque bourgeon donne une tige. Le rhizome de *M. giganteus* est un organe de réserve qui stocke de l'énergie et des nutriments.

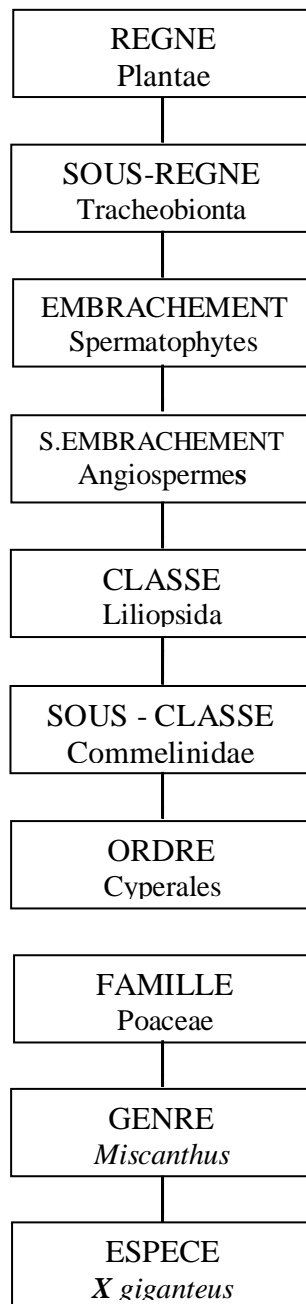
Le système racinaire de la plante est constitué de racines fasciculées partant du rhizome et pouvant atteindre 2,5 mètres de profondeur [96-98].



Figure 7a : Caractéristiques du *Miscanthus sinensis* Figure 7b: Caractéristiques du *Miscanthus géant*

I.7.2.2. Taxonomies et systématiques

Schéma 7: Classification du *Miscanthus X géant*



I.7.2.3. Habitat et répartition géographique

Le *Miscanthus* est une graminée ligneuse et pérenne, originaire d'Asie du Sud Est. En Europe continentale et au Royaume-Uni, la majorité des recherches s'est focalisée sur l'espèce *Miscanthus spp giganteus*1. A ce jour en Europe, seules une dizaine d'entreprises basées en Grande-Bretagne, en Allemagne, en Suisse, aux Pays-Bas, en Pologne et en Autriche vendent des rhizomes de *Miscanthus*.

Le seul fournisseur à envergure internationale et déjà bien installé en France est la filiale Française de Bical (Biomass Industrial Crops Ltd) : Bical Biomasse France [99]. ARGE Austrian Miscanthus [100] pourrait être un interlocuteur de taille intermédiaire. Enfin, quelques interlocuteurs plus locaux en Allemagne, Suisse, Autriche et Pays-Bas sont répertoriés sur le site suivant : <http://www.miscanthus.de/pflanzgut.htm>.

Le *Miscanthus* s'adapte à tout type de sol mais préfère les sols riches en humus. Il faut éviter les sols présentant un risque d'hydromorphie car il supporte mal l'eau stagnante et il est sensible au stress hydrique. La disponibilité en eau est un paramètre important pour avoir un rendement élevé et uniforme. Avec une température peu exigeante dont la moyenne annuelle se situerait aux environs de 8°C, sa culture exige une nette attention au démarrage car elle est sensible aux basses températures qui peuvent toucher les rhizomes. Il faudrait souligner qu'un des problèmes majeurs du *Miscanthus giganteus* est qu'à la première année, il ne résiste pas bien au froid si la température du sol passe en dessous de -3,5°C, les rhizomes meurent. Mais une fois installée, elle résiste moyennement au froid hivernal. Pour le sol, son pH doit se situer entre 5,5 à 7,5 [101, 102].

I.7.2.4. Noms vernaculaires

Sur le plan scientifique, la première description du *Miscanthus* a été réalisée par Andersson en 1885. Depuis, plus de 80 synonymes différents ont été utilisés pour parler des différentes espèces alors qu'il a été estimé que ce genre en comprenait une vingtaine.

De plus, de nombreux hybrides inter-spécifiques ont été créés. C'est le cas de *Miscanthus X giganteus* [103]. Pour illustrer la complexité des noms au sein de ce genre, cet hybride semble posséder différentes appellations selon les auteurs : *M. sinensis* var 'Giganteus', *M. X ogiformis* Honda 'Giganteus', *Miscanthus* 'Giganteus' ou bien encore *Miscanthus floridulus* par certains pépiniéristes. On retrouve également cette espèce sous d'autres noms: *Miscanthus X giganteus*, *Miscanthus sinensis giganteus* ou simplement *Miscanthus giganteus*

Des croisements ont également été réalisés par l'industrie ornementale afin de créer de nouveaux cultivars. Ainsi, la taxonomie du genre *Miscanthus*, confuse en 1992, l'est encore aujourd'hui [103].

Quant aux noms communs ou vernaculaires, il en existe également une multitude et certaines confusions peuvent être faites au vu de cette complexité taxonomique. Le *Miscanthus* est communément nommé Eulalie par les pépiniéristes, cette plante ayant été en premier lieu utilisée à de fins ornementales.

I.7.2.5. Utilisation traditionnelle

La plante a été en premier lieu utilisée à de fins ornementales. Le *Miscanthus* peut être utilisé comme combustible solide (par exemple sous forme de pellets), il peut également être utilisé pour ces fibres et dans la bio-remédiassions de sols pollués. Dans l'avenir, il pourrait également être utilisé pour la production de biocarburants de 2ème génération (éthanol) et comme matière première pour la pâte papier [101, 103, 104].

I.7.2.6. Données phytochimiques de la plante

En tant que combustible, les analyses élémentaires réalisées par Schmidt [105] montrent qu'elle est principalement composée du carbone. Les résultats de ses analyses sont repris dans les tableaux 1 et 2.

Tableau 1: Analyses élémentaires (% de M.s) [105]

	C	H	S	N	Cl	Cendres	Autres éléments
Miscanthus	48,67	5,45	0,04	0,45	0,23	2,76	42,5

Ms: Matières sèches

Tableau 2: Analyses des cendres (% M.s) [105]

CO ₃	SO ₃	Cl	P ₂ O ₅	SiO ₂	Fe ₂ O ₃	Al ₂ O ₃	CaO	MgO	Na ₂ O	K ₂ O	Autres
4,53	3,42	3,39	3	49,17	0,2	0,2	4,57	3,25	0,21	23,74	4,32

I.7.2.7. Données pharmacologiques et toxicologiques

Aucune donnée pharmacologique ni toxicologique à notre connaissance n'est disponible au niveau de la recherche actuelle sur l'utilisation du *Miscanthus*. Par contre, en fonction de sa qualité comme biocombustible, selon W. Hartley et coll. [96] ses rhizomes sont utilisés dans le cadre de la bio-remédiation de sols pollués.

Conclusion

Les tableaux 3 et 4 résument les données pharmacologiques, phytochimiques, les utilisations traditionnelles et les classifications systématiques des plantes étudiées. Dans la seconde partie, nous parlerons de certains métabolites secondaires telles que les polyphénols, les flavonoïdes, les anthocyanines, les tanins et de leurs importances dans certains aspects de la vie. Aussi nous exposeront quelques mécanismes de la biosynthèse de certains d'entre eux.

Etude ethnobotanique

Tableau 3: Récapitulatifs des usages traditionnels, données pharmacologique et phytochimiques de parties des plantes étudiés selon la littérature

Plantes	Parts	Origines	Utilisations traditionnelles	Données pharmacologiques	Composés phytochimiques	Toxicités
<i>D. oliveri</i> Hutch et Dalz.	F, E _r , E _t	Partout dans le monde (Afrique, zone soudano-guinéenne) [14]	Traitement diarrhée, insuffisance hépatique, maux de dents (F), bactéricide, antidiabétique, antispasmodique, anti hémorroïde, relaxant (F, E _r , E _t) [10,14]	Extrait de racine au n-hexane (analgésique), méthanoïque (antihistaminic, anti-inflammatoire) éthylique (anti hyperglycémie) Extrait d'aqueux, n- butylique, éthylique des feuilles (antispasmodique, microbienne et diarrhéique, antipyretique) [10, 16-18, 59]	Composés phénoliques (poly phénols, flavonoïdes, tanins, saponines, terpènes, alcaloïdes) [17, 18, 59,107]	Aucune toxicité aigue [18, 16,108]
<i>D. adscendens</i> Sw.	F	Zones équatoriales d'Afrique et d'Amérique Latine, régions tempérées et tropicales de l'hémisphère occidental, Australie [23, 28]	Antiviral, antibactérien, antidiurétique, antihémorragie (réduit le saignement), nettoyant le sang (détoxique), le système nerveux central (SNC), tonic (tonalités, les soldes, renforce), la contraception, antitussif, stimulant digestif, galactogène (favorise l'écoulement de lait), laxatif, nervin (équilibre / calmer les nerfs), vermifuge (expulse les vers), plaie guérisseur, augment la miction, anti malaria [25, 28, 109]	Antihistaminique, bactéricide, antiviral (hépatite), analgésique, anti-anaphylactiques (réactions allergiques arrêts), anti-antihistaminiques, asthmatique, anti convulsivant, antispasmodique, bronchodilatateur, relaxant musculaire, inhibiteur du K (Principaux actions sont: antiasthmatique, broncho-dilatateur antispasmodiques, relaxant musculaire, antihistaminique) [28,110-120].	Tanins, alcaloïdes, saponines, terpènes, flavonoïdes glucosides, poly phénols (Astragaline, bêta-phényl-éthylamine, cyanidine-3-O-sophoroside, dehydrosoyasaponins, hordenine, pélargonidine-3-O-rhamnoside, salsoline, soyasaponins, tectorigenine, tetrahydroisoquinolines, tyramine) [26-28, 30]	Aucune toxicité aigue ni mutagène [26, 31-35, 119,120]
<i>F. capensis</i> Thunb & Forssk	F, E _r , E _t	Zones tropicales et subtropicales [14]	Bactéricide, anti diabétique, anti inflammatoire, diurétique, aphrodisiaque, traitement de la lèpre et des ulcères [10,42-44, 85, 86]	Anti diarrhéique, relaxant, anti microbien (extrait n- butanol, acétate d'éthyle, aqueux hexane, méthanol), [10, 42-44, 48]	Poly phénols flavonoïdes, résines, baumes, alcaloïdes, stéroïdes/terpènes, tanins, glucides/ sucres réducteurs, Vitamine C [10, 41-43]	Toxicité à évalué cliniquement [43,45-47]

Etude ethnobotanique

<i>V. doniana</i> Sweet	F,E _r ,E _t	Zones tropicales et tempérées (14)	Bactéricides, spasmodique, traitement de la lèpre, anti septique, relaxant, antiviral aphrodisiaque, antidiurétique, anti-inflammatoire, antidiabétique, affections respiratoires, caries dentaires, asthénie, courbatures, affections de voies respiratoires et les maux de tête [10, 14, 48, 76]	Analgésique, anesthésiant, anti malaria, relaxant, anti inflammatoire anti microbien, antihelminthique, (Extrait aqueux étherés, butyliques, méthyliques des feuilles, écorces racines & troncs) [10, 76, 77,81, 84-87, 120]	Saponines, stéroïdes, terpènes, flavonoïdes, poly phénols, Vitamine (A, C, E) phytine, des tanins, et des anthraquinones [10, 48, 79-84, 121]	Toxicité de l'extrait aqueux évalué [77, 88,89]
<i>S. longepedunculata</i> Fresen	E _r	Zones tropicales et subtropicales [14]	Bactéricide, anti malaria, anti inflammatoire, analgésique antihelminthiques, antiviral (hépatite) démangeaison, lèpre rhumatisme, contre morsures des serpents et autres animaux à sang froid courbatures [14, 51, 53, 54].	Activité anti inflammatoire, anti bactériens, anti diarrhéiques (extraits feuilles, écorces (racines, troncs), aqueux, méthanoïques, éther de pétrole, dichloro méthane), extrait aqueux des feuilles (anti nociceptive et dépressive) [52, 56-59]	Glucides, sucres réducteurs, glucosides, flavonoïdes, terpènes, stérols, saponines, acides organiques, résines, silicates et ses dérivées [42, 51, 55]	Toxicité de l'extrait aqueux de racine jusqu'à 2g/kg (aucune) [52] Cette toxicité dépend d'un organe à un autre rein, foie et poumons [60]

Etude ethnobotanique

<i>S. rebaudiana</i> Bertoni	F	Zones tropicales et subtropicales (pousse dans des prairies ou des massifs montagneux, sous un climat semi-aride) [64-66]	Sucrer leur thé, antimicrobien, antidiabétique, hypertension, contraceptif, stimulation intellectuelle, hygiène bucco-dentaire [64, 67]	Hypoglycémiant, antihypertenseurs, antibiotiques, anti-obésité et anti oxydantes [72,74, 122]	Feuilles et tiges (composés poly phénoliques, terpènes, flavonoïdes, saponines, tanins, stéroïdes, glycosides (stevioside et rebaudi oside) et alcaloïdes) [68-70]	Aucune toxicité aigue évalué au niveau des feuilles [75]
<i>M. x giganteus</i>	F	Originaire d'Asie du Sud Est mais s'adapte à tout type de sol, préfère les sols riches en humus [123]	Fins ornementales mais peut être utilisé combustible solide, pour ces fibres, dans la bio-remédiations de sols pollués, production de biocarburants de 2ème génération, pâte papier [106, 123, 124]	Aucune	Comme combustible est principalement composée du carbone [106]	Aucune

Tableau 4: Récapitulatif de la classification des différentes plantes (ou parties) étudiées

Rf.	Règne Végétal	Sous règne	Embranchement	S/embranchement	Classe	S/classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
1	Plantea	Tracheobionta	Magnoliophyta	Angiospermes	Magnoliopsidas	Rosidée	Fabales	Fabacée	<i>Daniella</i>	<i>Oliveri</i>
2	Plantea	Plante vasculaire	Spermatophyta	Magnoliophyta	Dicotylédone	Rosidée	Fabales	Fabacée	<i>Desmodium</i>	<i>Adscendens</i>
3	Plantea	Tracheobionta	Spermatophytes	Angiospermes	Magnoliopsides	Hamamélidée	Uticals	Moracée	<i>Ficus</i>	<i>Capensis</i>
4	Plantea	Tracheobionta	Spermatophytes	Angiospermes	Angiospermes	Commelinidée	Cyperales	Poacée	<i>Miscanthus</i>	<i>X giganteus</i>
5	Plantea	Tracheobionta	Spermatophytes	Angiospermes	Dicotylédones	Asteridée	Lamiales	Verbénacée	<i>Vitex</i>	<i>Doniana</i>
6	Plantea	Viridaeplantea	Tracheophyta	Euphyllophytina	Magnoliopsidas	Rosidée	Polygalales	Polygalacée	<i>Securidaca</i>	<i>longepedunculata</i>
7	Plantea	Tracheobionta	Spermatophytes	Angiospermes	Dicotylédones	Asteridée	Asterales	Astéracée	<i>Stevia</i>	<i>rebaudia</i>

II. ETUDES PHYTOCHIMIQUES DES EXTRAITS DES PLANTES

II.1. Introduction

Les plantes ont une importance capitale pour la survie de l'homme et des différents écosystèmes. Elles renferment une part importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme. On distingue ainsi deux groupes de métabolites: les métabolites primaires et les métabolites secondaires [125].

- Les métabolites primaires sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ces composés sont classés en quatre principaux groupes, les glucides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques.

- Les métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures. Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante. Les produits du métabolisme secondaire qui sont émis en très faible quantité, sont d'une grande variété structurale (plus de 200000 structures définies). Ces composés marquent de manière originale, un genre, une famille ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique.

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, ils ont un intérêt multiple, ils sont mis à profit aussi bien dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique. Ils sont largement utilisés en thérapie comme vasculo-protecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti-radicalaires.

La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles ou des matières premières pour la hémisynthèse de composés actifs. On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. L'isolement de principes actifs au XIX^{ème} siècle, a contribué à l'amélioration des connaissances des structures, ce qui a permis de passer progressivement d'une phytothérapie traditionnelle souvent empirique, acceptée parfois avec une certaine méfiance à une thérapie moderne, acceptée scientifiquement.

Au début du XX^{ème} siècle, des synthèses de composés analogues (métabolites secondaires) ont commencé à naître; et afin d'augmenter leurs efficacités pharmacologiques, des études des structures et des activités biologiques issues des dérivés prénylés de ces métabolites ont été réalisées. La prénylation consistait à la fixation d'une chaîne latérale (pentényle, géranyle et farnésyle) sur une molécule acceptante.

Les métabolites secondaires constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour leurs propriétés antioxydantes, anti microbiennes, anti-inflammatoires et anti carcinogènes ou mutagènes [126].

Ce sont des composés très hétérogènes tant par leur composition que par leur structure. Pendant longtemps, ces composés ont été considérés comme secondaires et métaboliquement inactifs, ils ne suscitaient donc que peu d'intérêt. A l'heure actuelle, cette opinion a changé, du fait de nombreuses recherches qui ont largement montrées que ces composés ne sont pas inertes et contribuent efficacement dans la biosynthèse de divers métabolites de l'organisme.

Chez les végétaux, ils sont soumis à d'importantes variations quantitatives et qualitatives, ce qui témoigne d'une dynamique biochimique incontestable [127]. Ils interviennent dans des processus vitaux les plus divers. D'où l'importance croissante des études consacrés à ces composés.

Leurs mode d'action et leurs signification physiologique ne sont pas encore suffisamment claires, d'où la place de plus en plus large qui revient aux études de ces composés et de leurs fonctions.

On trouve des métabolites secondaires dans toutes les parties de plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à l'autre. Parmi les principales familles de métabolites secondaires trouvées chez les plantes on distingue :

- Les composés phénoliques qui interviennent dans les interactions plante-plante (allélopathie, inhibition de la germination et de la croissance). Parmi ces composés, on citera les polyphénols, les lignines, les stilbènes, les flavonoïdes, les phénylpropanoïdes, les anthocyanes et les tannins.
- Les alcaloïdes, renferme un atome d'azote dans la structure. Parmi ces derniers, certains relarguent de l'acide cyanhydrique quand les plantes sont abîmées. Ils sont synthétisés à partir d'acides aminés. On citera la nicotine, l'atropine, la codéine, la lupinine.
- Les mucilages: Ces sont des polymères complexes de fructose, d'acide glucorinique et d'acide manuronique. Les mucilages sont des mélanges colloïdaux qui gonflent avec l'eau (agar agar).

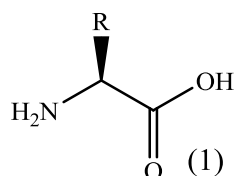
- Les gommés et les résines: Ces sont des substances produites par la plante à la suite d'une blessure.
- Les huiles essentielles: Ces sont des liquides concentrés et hydrophobes des composés aromatiques (odoriférants) volatils d'une plante, ces essences sont très volatiles et non miscibles à l'eau.
- Les latex: Ces sont des substances sécrétées ou fabriquées par des cellules laticifères (vraies ou anastomosées) et qui ont la particularité de se solidifier au contact de l'air.

Dans cette étude, nous nous intéresserons plus particulièrement aux composés phénoliques dont nous présenterons quelques exemples ainsi que leur biosynthèse.

II.2. Classification des métabolites secondaires

II.2.1. Les alcaloïdes

Les composés azotés se divisent en deux groupes: les acides aminés et les alcaloïdes. Les acides aminés (qui n'appartiennent pas aux métabolites secondaires), sont à la base de la constitution des protéines et des autres peptides, même s'ils n'en sont pas toujours les mêmes uniques constituants, c'est le cas de l'hème, qui est un groupement prosthétique de l'hémoglobine. La structure générale des acides aminés (1) et de quelques acides aminés porteurs du groupement fonctionnel guanidinium sont représentés ci-dessous (2-4). La plupart des composés de ces deux groupes sont très hydrosolubles.



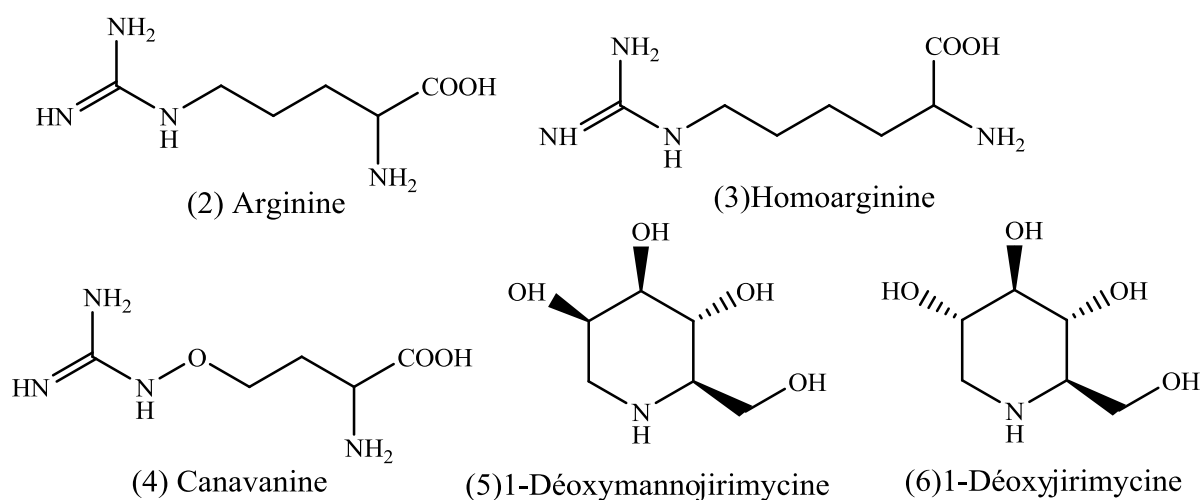
Les alcaloïdes sont des substances organiques d'origine végétale, azotée et à caractère alcalin. Bien que beaucoup d'entre eux soient toxiques (comme la strychnine ou l'aconitine), certains sont employés dans la médecine pour leurs propriétés analgésiques (comme la morphine, la codéine), dans le cadre de protocoles de sédation (anesthésie, atropine) souvent accompagnés des hypnotiques, ou comme agents antipaludéens (quinine, chloroquinine) ou agents anticancéreux (taxol, vinblastine, vincristine). La morphine a été le premier alcaloïde isolé dans l'opium (vers 1805). Puis on découvrit la strychnine (1818).

Les autres alcaloïdes plus connus sont : la colchicine, l'atropine, le tubocurarine, la théine, la cocaïne, la mescaline, l'acide lysergique et l'aconitine.

Les pyrazoles forment un groupe d'alcaloïdes contenant deux atomes d'azote dans le noyau aromatique, ceux-ci ne sont pas d'origine naturelle.

Les alcaloïdes sont des composés organiques naturels hétérocycliques avec un atome d'azote comme hétéroatome.

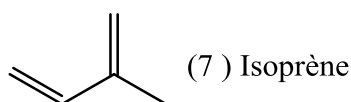
Leurs structures moléculaires sont complexes, plus ou moins basiques et douées des propriétés physiologiques prononcées même à faible dose [22, 128]. Ils constituent un des groupes de métabolites secondaires contenant plus de 10000 à 12000 différentes structures [129]. Les structures de deux imino-sucres ayant des propriétés antibiotiques appartenant à la famille des alcaloïdes sont représentées ci-dessous (5-6).



II.2.2. Les terpènes

Les terpènes forment une classe d'hydrocarbures, produits par de nombreuses plantes, en particulier les conifères. Ce sont des composants majeurs de la résine et de l'essence de térébenthine produite à partir de résine.

Les terpènes sont des dérivés de l'isoprène C_5H_8 (7) et ont pour formule de base des multiples de celle-ci $(C_5H_8)_n$. On peut considérer l'isoprène comme l'un des éléments de construction préférés de la nature.



Leur squelette de carbone est constitué d'unités isopréniques reliées entre eux. C'est ce que l'on appelle la règle de l'isoprène. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des cycles.

En fonction du nombre n (entier) d'unités, on peut distinguer pour; $n = 2$: les monoterpènes (C_{10}), $n = 3$: les sesquiterpènes (C_{15}), $n = 4$: les diterpènes (C_{20}), $n = 5$: les sesterpènes (C_{25}), $n = 6$: les triterpènes (C_{30}).

Le carotène est un tétraterpène ($C_{40}H_{64}$). Il joue le rôle de pigment en photosynthèse végétale. Des matières aussi diverses que le caoutchouc, la vitamine A1 ou le cholestérol sont construites essentiellement des «briques» d'isoprènes.

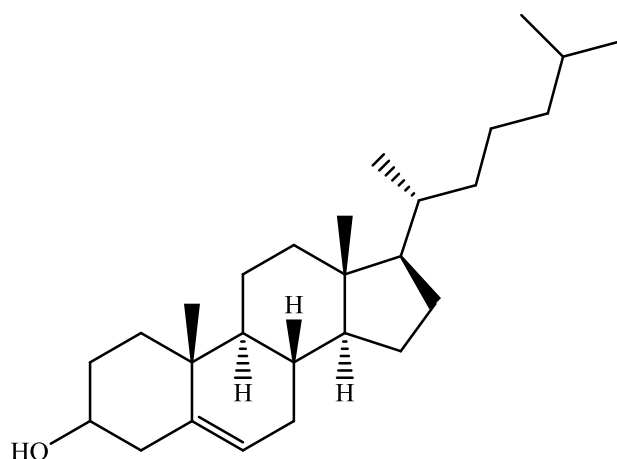
Parmi les terpènes les plus importants on trouve: l' α -pinène, le β -pinène, le δ -3-carène, le limonène, le carotène...

En revanche, les caroténoïdes qui contiennent des atomes d'oxygènes, ne sont pas à proprement parler des terpènes, mais des terpénoïdes (luteine).

Deux de propriétés fondamentales de terpènes sont leurs caractères odoriférants (géranium) et leurs sensibilités à la lumière.

II. 2.3. Les stérols

Ce sont des dérivés des phytostérols. Ces composés sont naturellement présents dans la fraction lipidique des plantes. Ils ne sont pas synthétisés par l'homme et l'animal, ils ne peuvent être apportés que par l'alimentation. Plusieurs études ont démontré que les phytostérols et les phytostanols réduisent l'absorption du cholestérol dans l'intestin grêle. L'exemple le plus courant de stérol est le : cholestérol (8). Leur structure générale est composée de 4 cycles dont les trois premiers 6 chaînons et le dernier à 5.

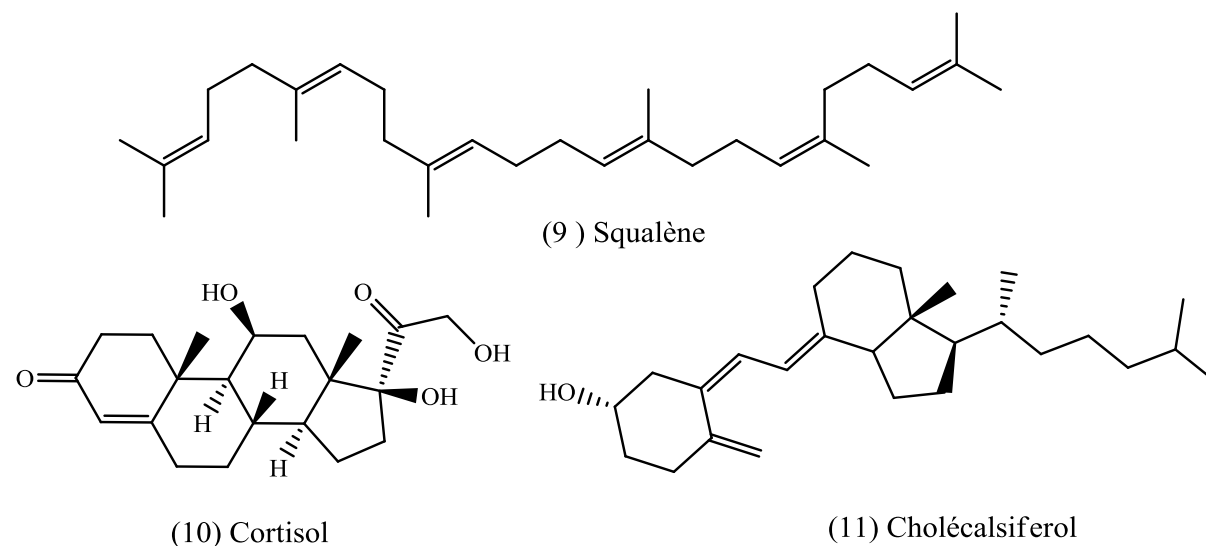


(8) Cholestérol

II.2.4. Stéroïdes

Les stéroïdes constituent un groupe de lipides dérivant de triterpénoïdes (lipides à 30 atomes de carbones), majoritairement le squalène (9). Ils se caractérisent par un noyau cyclopentanophénanthrénique hydrophobe (cortisol (10)) partiellement ou totalement hydrogéné. Habituellement, les carbones C10, C13 sont liés à un groupe méthyle - CH₃ et le carbone C17 à un groupe alkyle.

Par extension, les stéroïdes incluent également les lipides dont le noyau cyclopentanophénanthrénique a été modifié par scission d'une liaison et l'ajout ou la déletion d'un carbone. En médecine le terme «stéroïde» fait référence aux hormones stéroïdiennes. Dans un contexte sportif, «stéroïde» est habituellement employé pour désigner les stéroïdes anabolisants.



Classification

Les différentes instances scientifiques ne s'accordent pas sur leur classification. Dans la classification de l'IUPAC, les stéroïdes constituent une catégorie incluant les stérols. Dans la classification classique les stérols forment une catégorie qui inclut les stéroïdes.

Selon l'IUPAC, les stéroïdes incluent tous les lipides possédant un noyau cyclopentanophénanthrénique (10) ou dérivant de celui-ci. Toutefois, l'IUPAC précise que les «stérols sont des stéroïdes» se caractérisant par la présence d'un groupe hydroxyle OH sur le carbone C3 (par exemple, le cholestérol représenté ci-dessus (8). En revanche, pour plusieurs biochimistes, les «stérols constituent une catégorie à part entière incluant les «stéroïdes», cholécalsiférol (11); les acides biliaires; les stéroïdes conjugués; les hopanoïdes. Le schéma de synthèse des stéroïdes proposés par Manach et coll. [130] est représenté ci-dessous (schéma 8).

Etudes phytochimiques

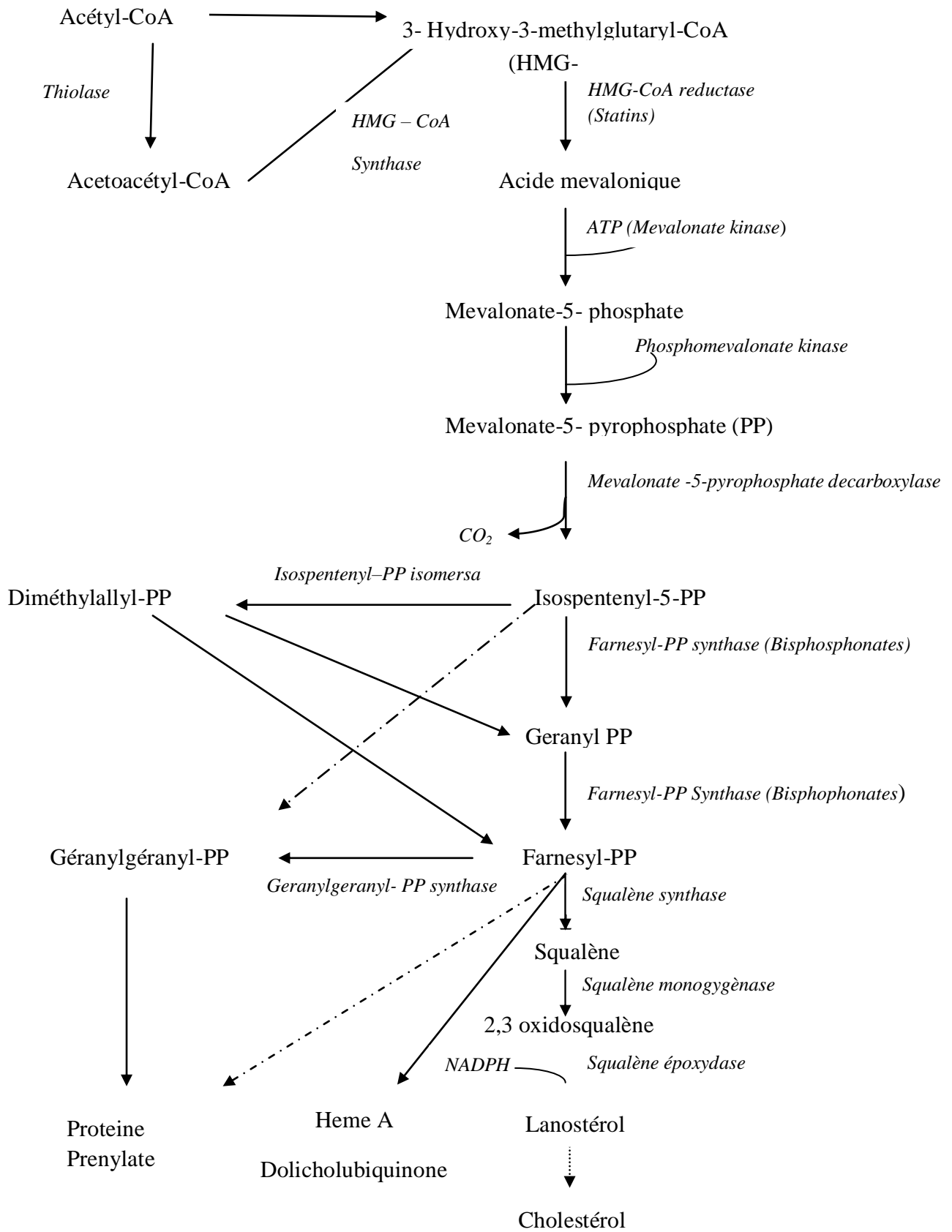
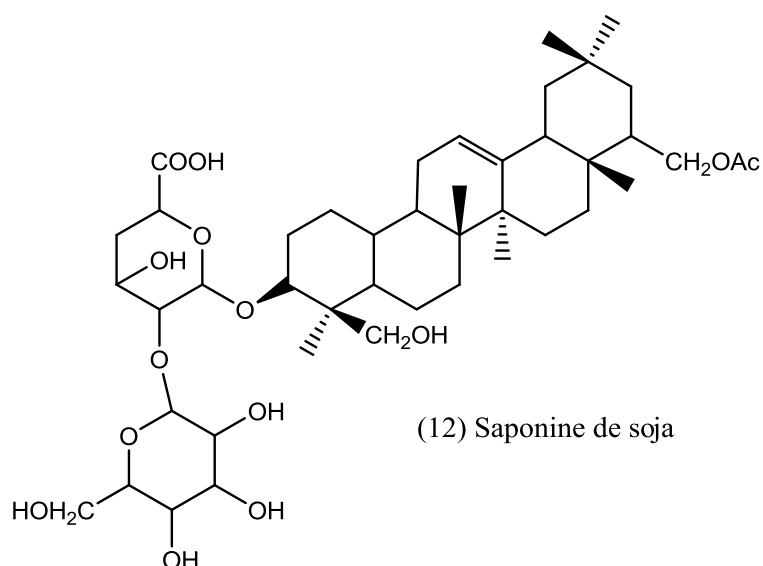


Schéma 8: Synthèse des stéroïdes à partir de l'acétyl-CoA

II.2.5. Les saponines

Le nom saponine dérive du mot latin «sapo», qui signifie savon, parce que ces composés moussent une fois agités avec de l'eau. Ils se composent d'aglycones non polaires liés à un ou plusieurs sucres. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires explique leur comportement moussant en solution aqueuse. Comme définition, on dirait qu'une saponine est un glycoside de stéroïde ou de triterpène. Fondamentalement, on distingue les saponines stéroïques et les saponines triterpéniques dérivant tous deux biosynthétiquement de l'oxyde de squalène [130]. La saponine de soja (12) en est un exemple.



Dans le schéma 9 nous avons établi une classification des certains métabolites secondaires et en relations avec les quelques composés phénoliques.

Etudes phytochimiques

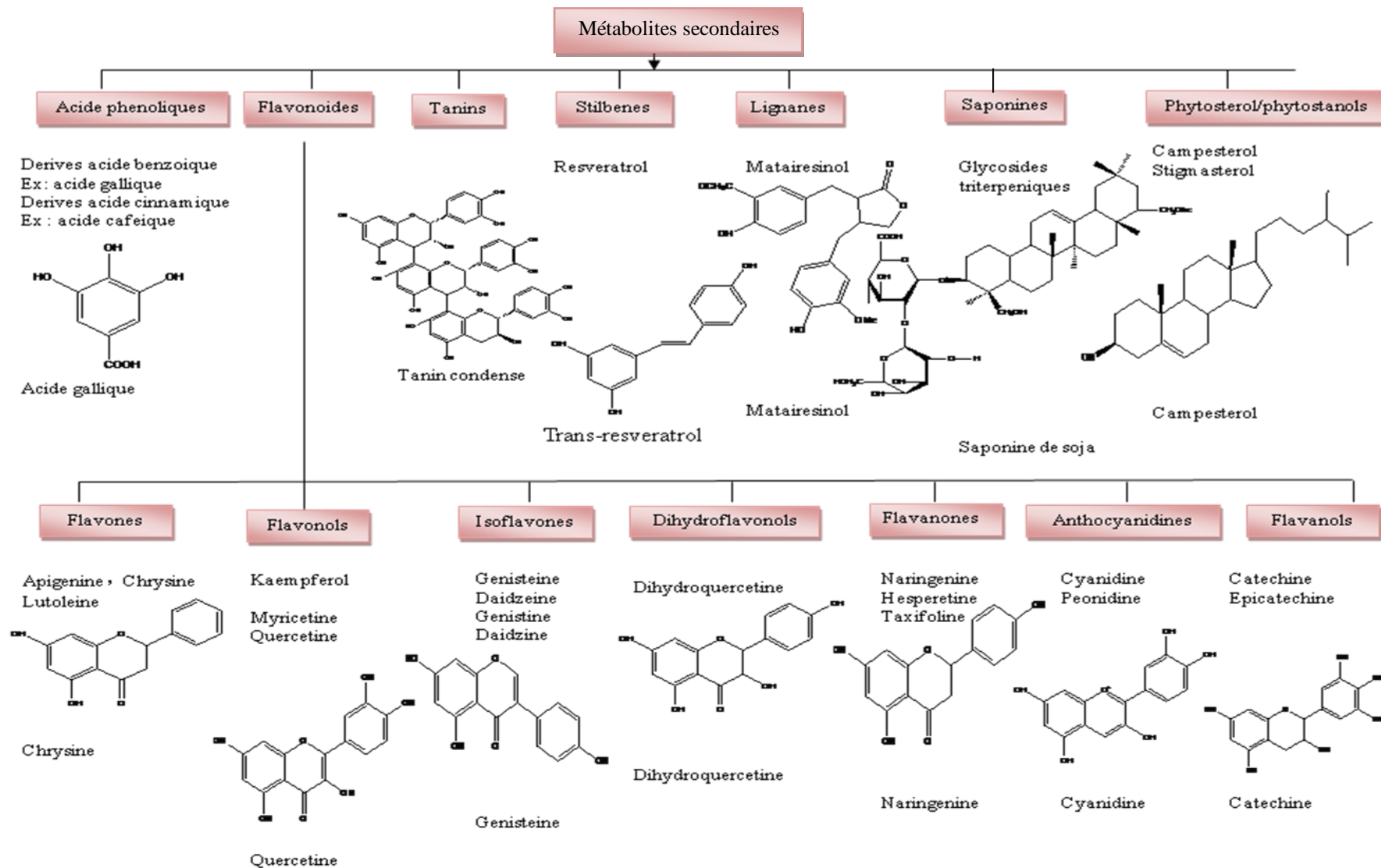


Schéma 9: Classification des quelques métabolites secondaires

II. 2.6. Composés phénoliques

Le terme « polyphénols » est fréquemment utilisé dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux. En fait, il devrait être réservé aux seules molécules présentant plusieurs fonctions phénols. Ce qui exclurait alors les monophénols, pourtant abondants et importants chez les végétaux. Donc la désignation générale « composés phénoliques » concerne à la fois les mono, les di et les polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques [131].

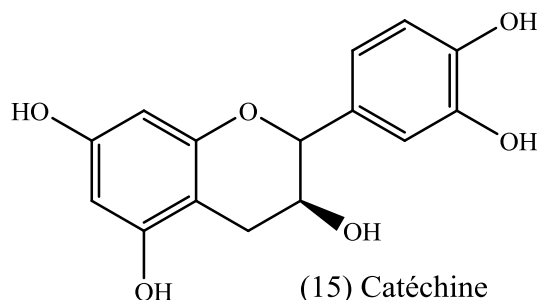
Le schéma (9) ci-dessus nous montre quelques composés constituant cette famille. Les polyphénols possèdent plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions (alcoolique (OH), carboxylique (COOH),...). Ils sont probablement les composés naturels les plus répandus dans la nature et de ce fait sont des éléments faisant partie de l'alimentation animale. Ces composés présentent une grande diversité de structures, divisées en non flavonoïdes et flavonoïdes.).

La première est représentée par les acides phénoliques, qui comprennent les acides benzoïques (acide gallique (13)).

La seconde classe est constituée d'un noyau phénolique porteur d'une chaîne latérale insaturée en C3 (acide caféique (14)).

La dernière classe est basée sur un squelette en C6-C3-C6 (catéchine (15)), elle comprend plusieurs groupes qui se distinguent par le degré d'oxydation de l'hétérocycle central en C3.

Toutes les classes de composés phénoliques comportent un grand nombre de structures différentes en fonction du nombre et de la position des groupements hydroxyles sur le squelette de base. Ces structures peuvent également être diversement substituées (glycosylées, estérifiées, acylées...).

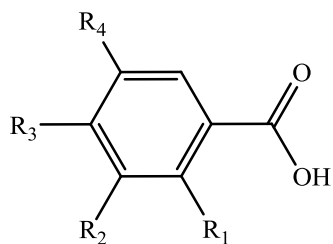


II.2.6.1. Les non flavonoïdes

Ce groupe comprend plusieurs composés parmi lesquels on distingue les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les coumarines et les xanthones

➤ **Les acides phénoliques**

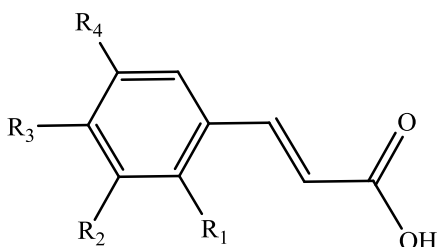
On distingue deux principales classes d'acide phénolique; les dérivés de l'acide benzoïque (13) et les dérivés de l'acide cinnamique (14). La concentration de l'acide hydroxy-benzoïque est généralement très faible chez les végétaux comestibles. Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine par contre ceux d'acides hydroxycinnamiques sont très présents [131].



(13)

Composés	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ac. benzoïque	H	H	H	H
Ac. salicylique	OH	H	H	H
Ac. p-hydroxy-benzoïque	H	H	OH	H
Ac. gallique	H	OH	OH	OH
Ac. protocatéchuïque	H	OH	OH	H

Dérivés de l'acide benzoïque formule générale (13)

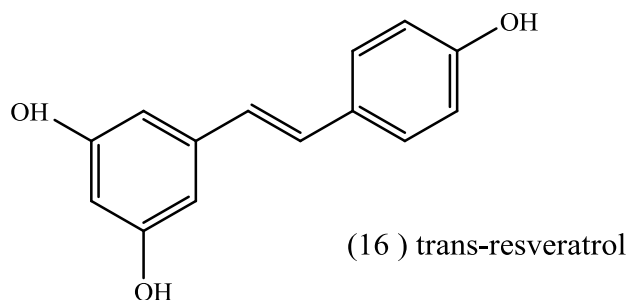


Composés	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ac. cinnamique	H	H	H	H
Ac. o-coumarique	OH	H	H	H
Ac. m-coumarique	H	OH	H	H
Ac. p-coumarique	H	H	OH	H
Ac. caféique	H	OH	OH	H

Dérivés de l'acide cinnamique formule générale (14)

➤ Les stilbènes

Les stilbènes se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine, parmi ces composés on trouve le resveratrol qui est un anticancéreux présent dans certaines plantes médicinales, l'exemple le trans-resveratrol (16) [131].

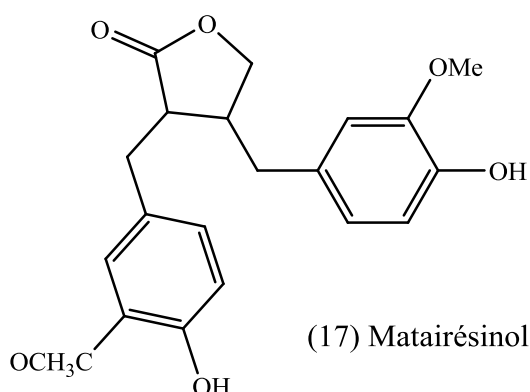


➤ Les lignanes et les lignines

Les monolignols sont les dérivés de l'acide cinnamique, ils servent de précurseurs pour les composés de types phénylpropanoïdes tels que les lignanes et les lignines.

Les lignanes répondent à une représentation structurale de type (C6-C3)₂; l'unité (C6 - C3) est considérée comme un propylbenzène.

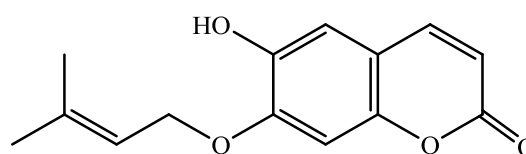
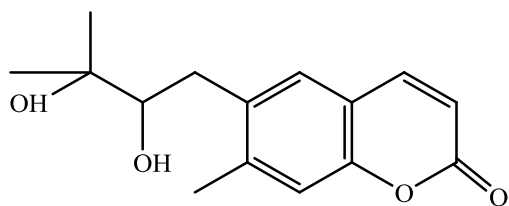
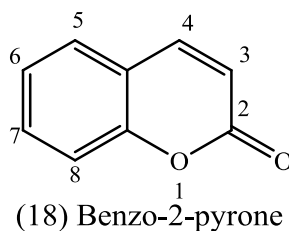
Les plantes les élaborent par dimérisation oxydante de deux unités d'alcool coniférique. Quand cette dimérisation implique une liaison oxydante par les C- 8 des chaînes latérales propényles de deux unités d'alcool coniférique liées, formant la liaison (C8-C8), les métabolites résultants portent le nom de lignane (schéma 9). Le terme néolignane est employé pour définir toutes les autres types de liaison. Lorsqu'il n'y a pas de liaison directe (C-C) entre les unités (C6-C3) mais liés par un atome d'oxygène d'éther, le composé est appelé oxynéolignane. Il existe d'autres types de lignanes tels que les sesquinéolignanes (ayant trois unités (C6-C3)) et les dinéolignanes (contenant quatre unités de (C6-C3)) [132]. Les lignanes se trouvent essentiellement dans les graines d'oléagineux [131]. Les lignanes matairesinol (17), secoisolariciresinol et d'autres auraient été détectés dans le vin rouge obtenu à partir des raisins des vignes appartenant à la famille des Vitacées [133] mais le néolignames biphényles sont isolés de *Magnolia officinalis* [134] et les oxynéolignanes, de *Bursera tonkinensis* de la famille des Burcéracées [135].

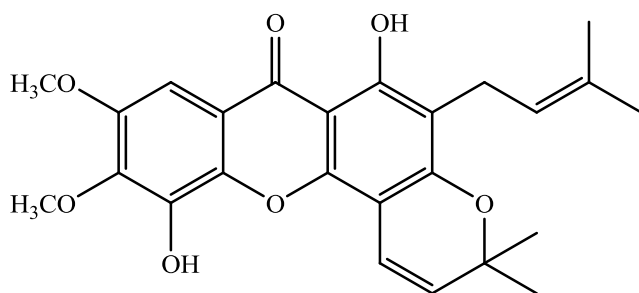


Les lignines constituent une classe importante de produits naturels dans le règne végétal et seraient formées par polymérisation oxydative de monolignols (monomères) qui sont les alcools *p*-coumarique, coniférique et sinapique [136].

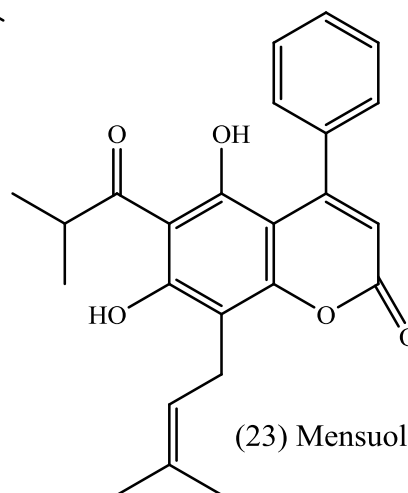
➤ Les coumarines

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone (18). Ils ont été isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarouna odorata*. Aujourd'hui, près de 1000 composés coumariniques sont isolés dans plus de 800 espèces de plantes et dans les microorganismes. Dans les plantes, on les rencontre chez les Apiacées, les Astéracées, les Fabacées, les Rosacées, les Rubiacées, les Rutacées et les Solanacées. Du point de vue structural, ils sont classés en coumarines simples (19, 20) avec des substituants sur le cycle du benzène, les furanocoumarines (21), les pyranocoumarines (19 - 23), les coumarines substitués en position 3 et/ou 4 (22, 23). Le dernier groupe serait celui des dimères [137].

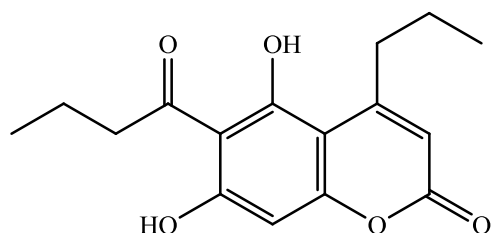




(21) Syphonine



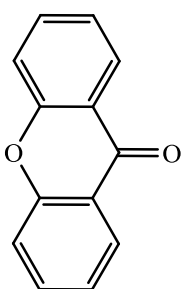
(23) Mensuol



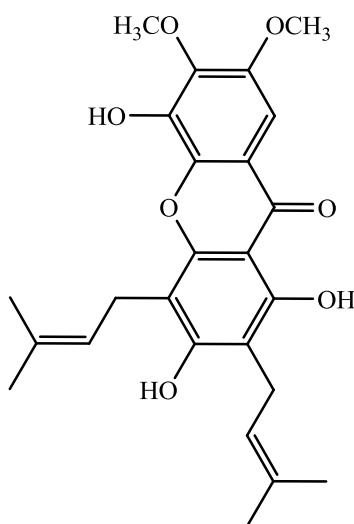
(22) Mammaea B/AC

➤ **Les xanthones**

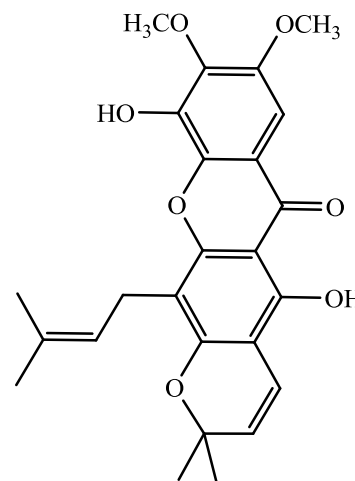
C'est une famille constituée des composés polyphénoliques généralement isolés dans les plantes supérieures et dans les microorganismes répondant à une structure de base (C6-C1-C6). Quelques exemples de ces composés sont représentés ci-dessous: le gaboxanthone (24), le xanthène-9-one (25) et le globuliférine (26).



(24) Xanthène-8-one



(25) Globuliférine



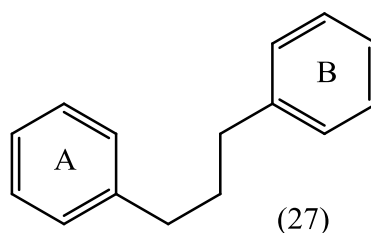
(26) Gaboxanthone

II.2.6.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastides particuliers, les chromoplastes [13]. Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. On dénombre près de 6500 flavonoïdes répartis en 12 classes [129] et leur nombre ne cesse d'accroître. Par définition, les flavonoïdes sont des composés qui ont en commun la structure du diphenylpropane (C6-C3-C6) (27); les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C [138].

Leur fonction principale semble être la coloration des plantes (au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bétalaines), même si leur présence est parfois masquée par leur présence sous forme "leuco", ce qui explique leur intérêt commercial dans l'industrie alimentaire [139]. On distingue différentes structures des flavonoïdes parmi lesquels se trouvent : les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanonols, les flavanes, les flavan-3-oles, les flavylum, les chalcones, les aurones, les isoflavones, les isoflavonols, les isoflavanes, les ptérocarpanes, les coumaronochromones, les 3-arylcoumarines, les coumestanes, les roténoïdes.

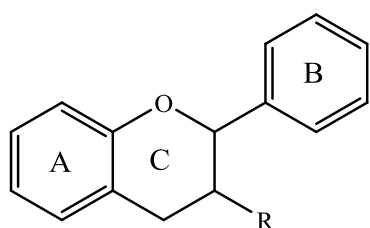
Structure générale des flavonoïdes (27)



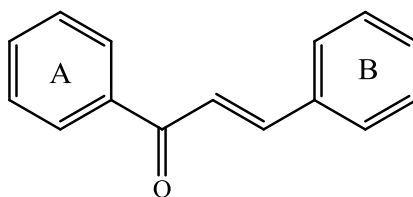
De Rijke et coll. [138] ont classé les flavonoïdes en 6 familles qui impliquent les flavonols, les flavones, les flavanes, les isoflavones, les anthocyanines et les flavanols. Au sein de ces six familles, deux types de structures ont été relevés, celui des flavonoïdes au sens strict dont la structure porte le noyau aromatique B en position 3 sur la chaîne C3 et celui des isoflavonoïdes dont le noyau aromatique B est en position 2 sur la chaîne C3.

II.2.6.2.1. Les flavonoïdes au sens strict

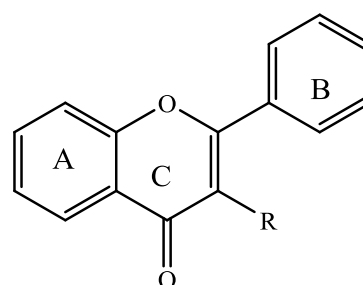
Dans ce groupe on distingue les chalcones, les aurones, les flavones, les flavanes, les flavanones, les flavanols, les flavonols et les flavanonols (28-35).



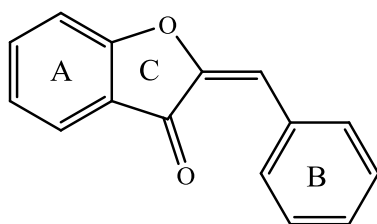
(28) R= H, flavane
(29) R= OH, flavanol



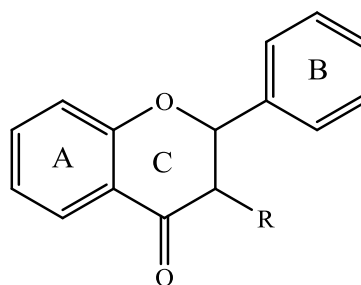
(30) chalcone



(31) R= H, flavone
(32) R= OH, flavonol



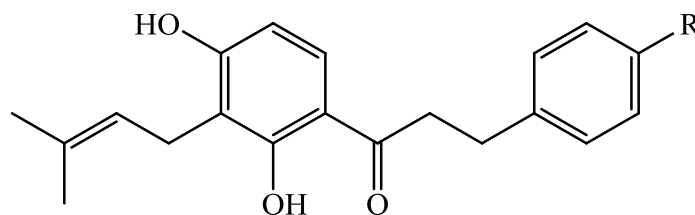
(33) aurone



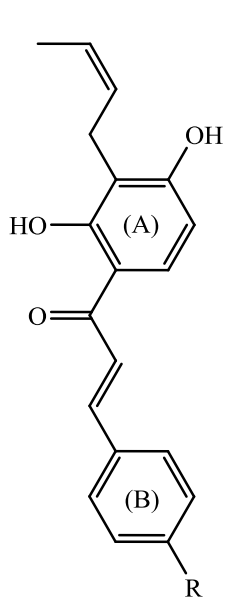
(34) R= H, flavanone
(35) R= OH, flavanonol

➤ Chalcones et dérivés

Les chalcones sont des flavanoïdes ne comportant pas d'hétérocycle C. Ils sont prénylés le plus souvent sur le noyau A tandis que le noyau B reste peu ou pas substitué (36, 37, 38, 39, 40). Cette prénylation peut-être cyclique du type pyrano (41, 42) ou furano (43, 44). Certaines d'entre-elles présentent une *O*-prénylation linéaire (45) et (46).

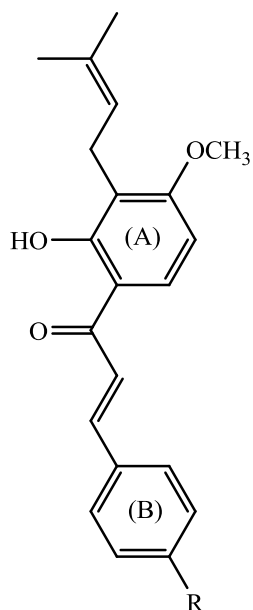


(36) R= Isocordoïne; (37) R= OH 4-isobavachalcone

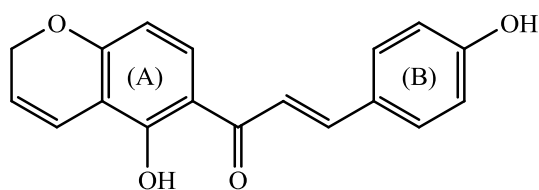
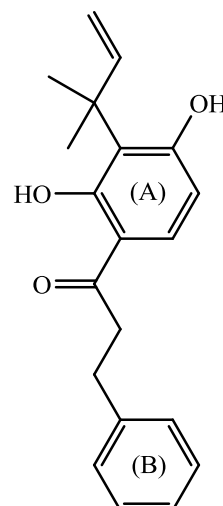


(38) R= H Derricine

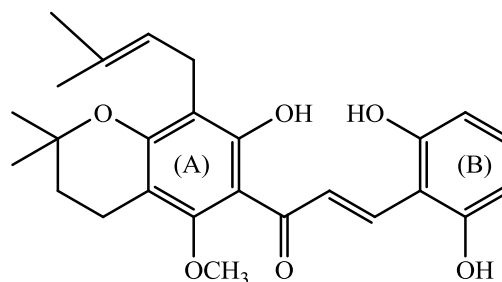
(39) R= OH 4-Hydroxyderricine



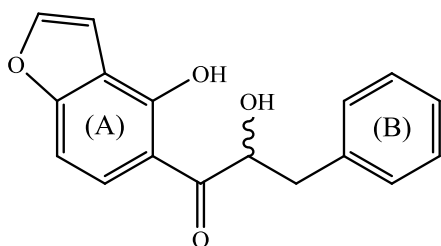
(40) Pseudo-isocordoïne



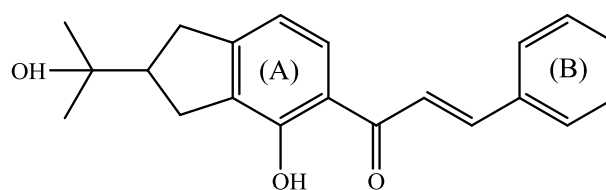
(41) Isobavachromène



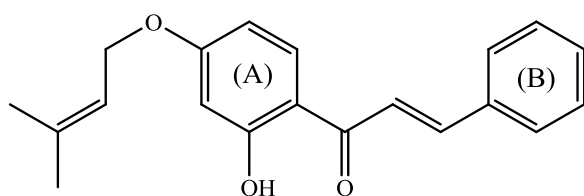
(42) Orotinichalcone



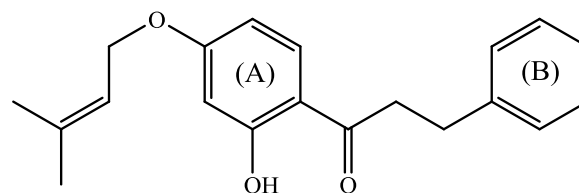
(43) Castillène E



(44) Flémitrictine B



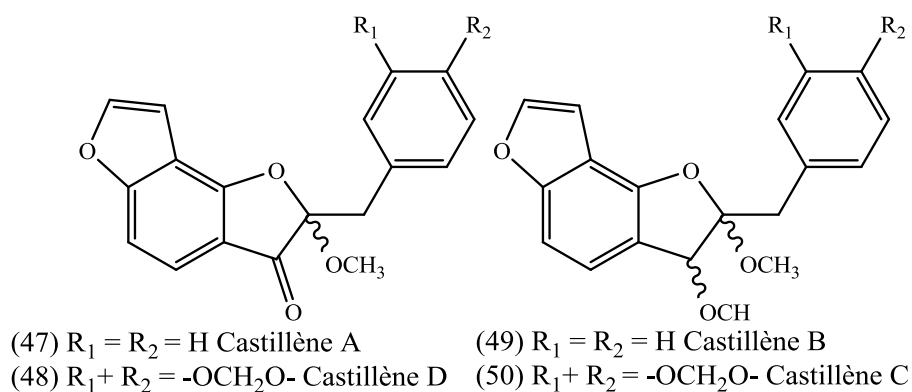
(45) Cordoïne



(46) Dihydrocordoïne

➤ **Aurones et dérivés**

Les aurones sont des isomères structuraux des flavones. Ils ont une structure proche mais différente de la plupart des autres flavonoïdes. Ces molécules dérivent de la chalcone. En effet dans les cas des aurones, la chalcone se ferme en formant un cycle à 5 atomes, alors qu'elle forme un cycle de 6 atomes pour les autres flavonoïdes. Ci-dessous sont représentés quelques composés de la famille des aurones (47-50).



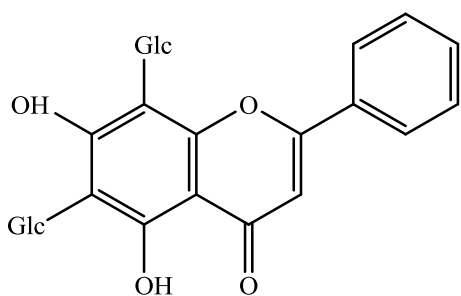
➤ **Flavones et flavanones**

Les flavones comme tous les flavonoïdes ont une structure C6-C3-C6 avec en C3 l'apparition d'un hétérocycle porteur d'un groupement carbonyle et d'une insaturation. Les flavanones ont une structure similaire à celle des flavones mais ne possèdent pas d'insaturation au niveau de l'hétérocycle.

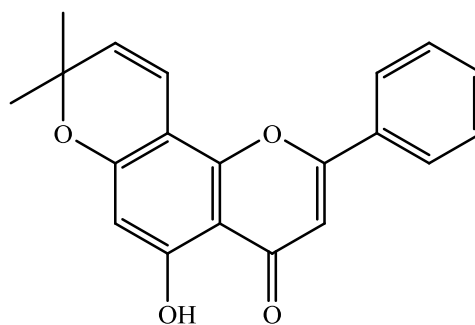
Les flavonols et les flavanonols correspondent aux dérivés hydroxylés des flavones et des flavanones.

Plusieurs composés sont répertoriés au niveau de ce groupe. Outre leur prénylation quasi fréquente, on rencontre de temps à autre les C-glycosyl flavonoïdes ou encore les O-glycosyl flavonoïdes.

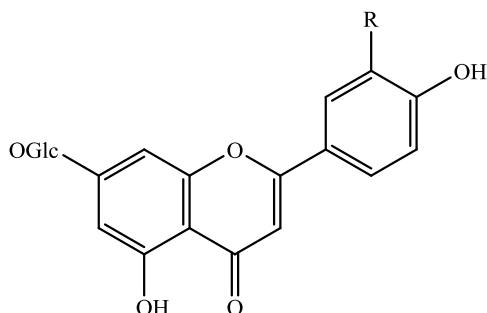
Notons que, les flavones et les flavonols se rencontrent aussi sous forme glycosylées, c'est le cas de la vicemine-2 (51), 5-hydroxy-6", 6"-diméthyl pyrano (2",3", 7", 8) flavone (52), de l'apigénine-7-O-glucoside (53), de la lutéoline-7-O-glucoside (54). La quercétine (57), la rutine (58) et l'hypéroside (59) sont presque exclusivement des flavones prénylées du type «DMP» (diméthylpyrane) (52, 55, 56) ou du type « furano » (60-63).



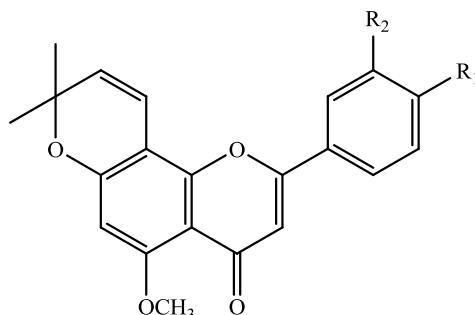
(51) Vicemine-2



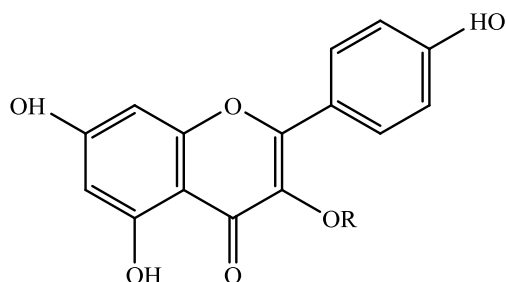
(52) 5-Hydroxy-6'',6''-diméthylpyrano (2'',3'',7,8) flavone



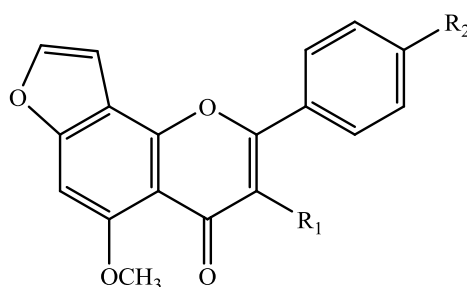
(53) R = H Apigénine-7-O-glucoside
(54) R = OH Lutéoline-7-O-glucoside



(55) R1 = R2 = H isopongaflavone
(56) R1 + R2 = -OCH2O- 5-méthoxy-3'4'-méthylènedioxy- 6'',6''-diméthylpyrano (2'', 3'':7,8) flavone



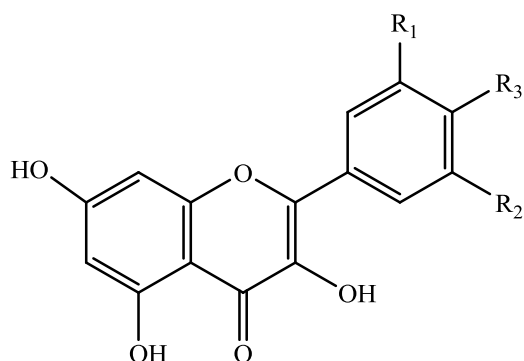
(57) R = H Quercétine
(58) R = Rha-Glc Rutine
(59) R = Gal Hypéroside



(60) R1 = R2 = H Lancéolatine B
(61) R1 = R2 = -OCH3 4'-méthoxylancéolatine B
(62) R1 = R2 = OCH3 4'-méthoxylancéolatine B
(63) R1 = OCH3; R2 = H karanjiine

La structure générale des flavonols est représenté ci- dessous (64), les flavonols (hydroxy-3 flavone) sont les plus largement répandus. Ils sont incolores, et caractérisés par la présence d'un groupement carbonyle en position 4 et d'un groupement hydroxyle en position 3. Les flavonols qui possèdent en plus des hydroxydes en 6 ou 8 colorent certaines fleurs en jaune primevère [13]. Parmi les flavonols les plus répandus, on trouve le kaempférol (65), le quercétol (66); le myricétol (67) et l'isorhamétol (68).

Les structures chimiques de quelques flavonols sont reprises ci-dessous



(64) $R_1 = R_2 = R_3 = H$: structure générale

(65) $R_1 = R_2 = H$; $R_3 = OH$: kaempferol

(66) $R_1 = OH$; $R_2 = H$; $R_3 = OH$: Quercetrine

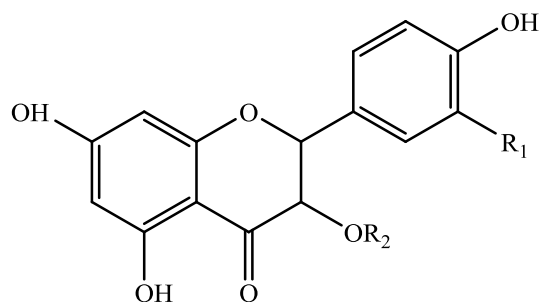
(67) $R_1 = OH$; $R_2 = OH$; $R_3 = OH$: Myricetine

(68) $R_1 = OCH_3$; $R_2 = H$; $R_3 = OH$: Isorhamnetine

Les flavanones et les flavonols dérivés sont les flavonoïdes responsables de la saveur amère de certaines pamplemousses, des citrons, des oranges: la naringine (naringénol lié à du glucose et du rhamnose), l'hésperidine [140]. On retrouve aussi les flavanols simples tel que les taxifolines (69), les glycosylés tels que les astilbines (70), les fustine-*o*- glucoside (71), Glc- fustine-3-*O*-glucide (72) et celles qui présentent une ou plusieurs prénylations. Dans ce dernier groupe, on distingue plusieurs catégories de prénylations:

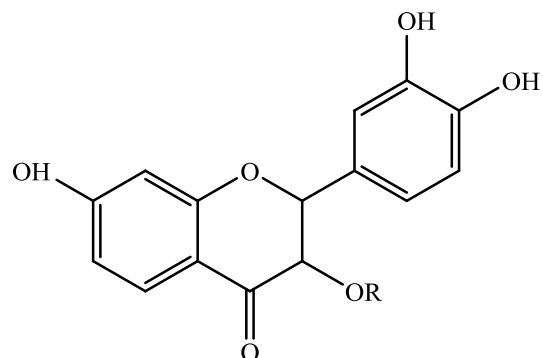
- Une *O*-prénylation linéaire c'est le cas de l'isoderricidine (73) ainsi qu'une *C*-prénylation linéaire (74-77)
- Une prénylation simple du type DMP sur le noyau A (78-80)
- Une double prénylation (*C*-et *O*-) du noyau A (81, 82)
- - une double *C*-prénylation du noyau A: c'est le cas des composés (83, 84) et (85-87)
- Une prénylation simple du type «furano» du noyau A (85, 86, 88, 81)
- Le noyau B n'est pas ou peu substitué

Les structures représentées ci-dessous (73-89) sont représentatives de quelques sous-classes des flavonoïdes au sens strict.



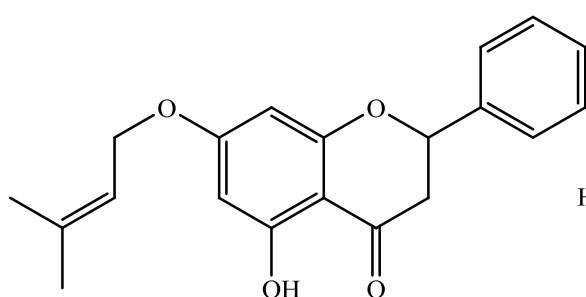
(69) R₁ = OH; R₂ = H Taxifoline

(70) R₁ = H; R₂ = Rha Astilbine

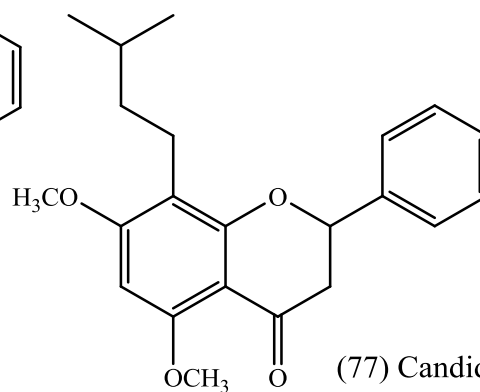


(71) R = H Fustine

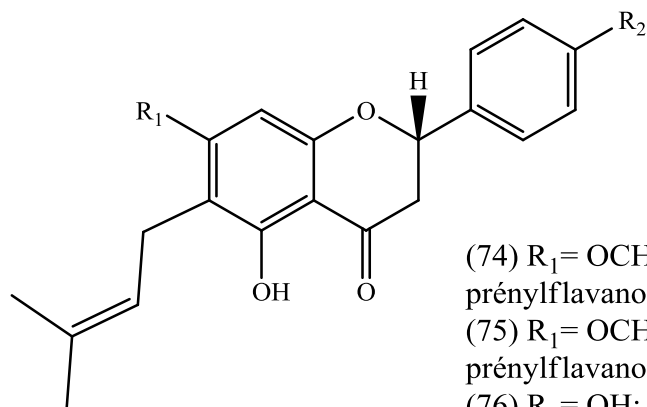
(72) R = Glc-fustine-3-O-glucide



(73) isoderricidine



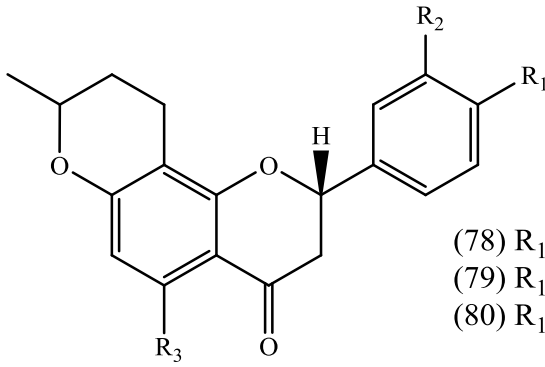
(77) Candidone



(74) R₁ = OCH₃; R₂ = OH 4'5-dihydroxy-7 méthoxy-6-prénylflavanone

(75) R₁ = OCH₃; R₂ = H 5-hydroxy-7méthoxy-6-prénylflavanone

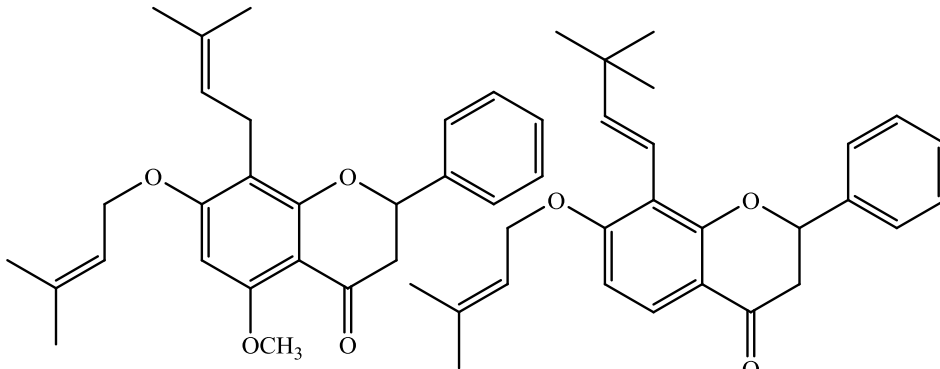
(76) R₁ = OH; R₂ = H 5,7 dihydroxy-6-prénylflavanone



(78) $R_1 + R_2 = -OCH_2O-$; $R_3 = H$ Ponganone III

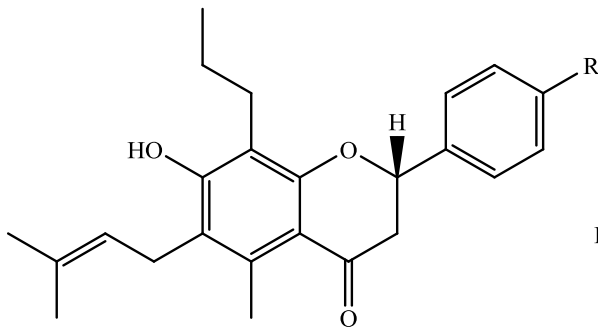
(79) $R_1 + R_2 = -OCH_2O-$; $R_3 = OCH_3$ Isoglabrachromène

(80) $R_1 = R_2 = OCH_3$; $R_3 = H$ Ovalichromène B



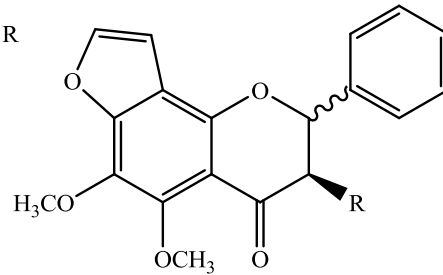
(81) 5- Méthoxy-8-prényl-7-prényloxyflavanone

(82) 8- (3-hydroxy-3-méthyl-1-butényl)-7-Prényloxyflavanone



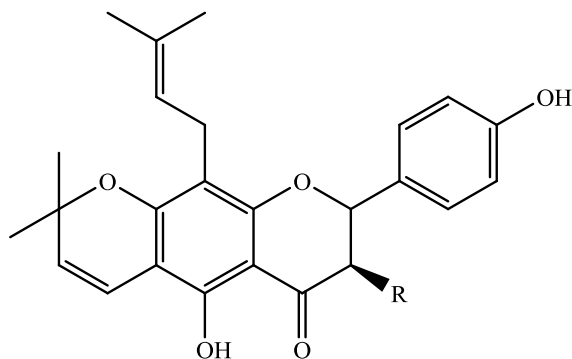
(83) $R = H$ Spiniflavanone B

(84) $R = OH$ Lonchocarpol A



(85) $R = H$ (2S) -5, 6-dimethoxy (2'', 3'':7:8) furanoflavanone

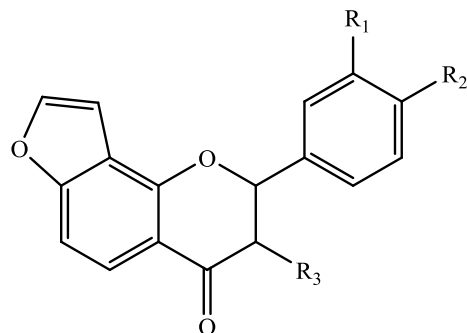
(86) $R = OCH_3$ (2R,3R) -3, 5, 6-trimethoxy (2'',3'':7,8) furano-flavanonol



(88) $R = H$ Lupinifoline

(89) $R = OH$ Lupinifolinol

(87) $R = OCH_3$ 3-O- Méthyl-lupinifolinol



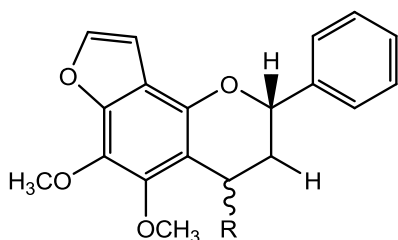
(90) $R_1 = R_2 = H$, $R_3 = OCH_3$

3-Méthoxy- (2'',3'':7, 8) furanoflavanonol

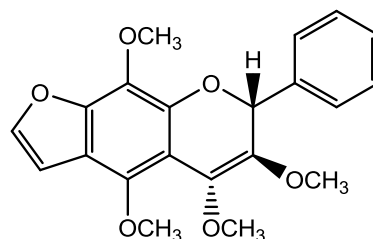
(91) $R_1 + R_2 = -OCH_2O-$, $R_3 = H$

3',4'- Méthylène-dioxy (2'',3'':7,8) furanoflavanone

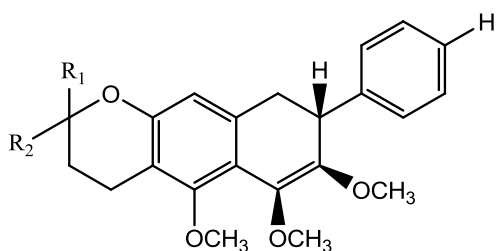
Les flavanes sont des dérivés saturés et non carbonylés des flavones, tous présentent une prélylation cyclisée du type DMP ou du type furano (92-95), ils sont caractérisés par la présence d'une double prénylation du noyau A (cyclisée et linéaire) et d'un pont époxy reliant les carbones 4 et 6' du noyau B (96, 97). Leurs structures moléculaires sont représentées ci-dessous.



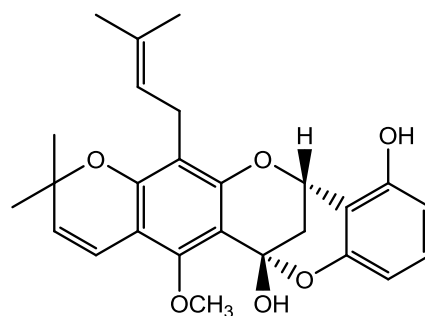
- (92) R= OCH₃ (2, 4 cis) - 4,5,6 - triméthoxy - (2'', 3':7, 8) furanoflavane
 (93) R= OH (2,4 trans) - 4-Hydroxy -5,6- diméthoxy - (2'',3'':7,8) furanoflavane
 (94) R= OH (2, 4 cis) - 4-Hydroxy -5, 6 - diméthoxy- (2'', 3'': 7, 8) furanoflavane



- (95) (2,3) - trans, 4- trans) 4,5,8 - Tétramétox (2'',3'':7,6) furanoflavane



- (96) R₁= OH; R₂ = OH 3B,4B, 5-Triméthoxy- 4'-hydroxy-6'',6''-diméthylpyrano (2'',3'':7,6) flavane



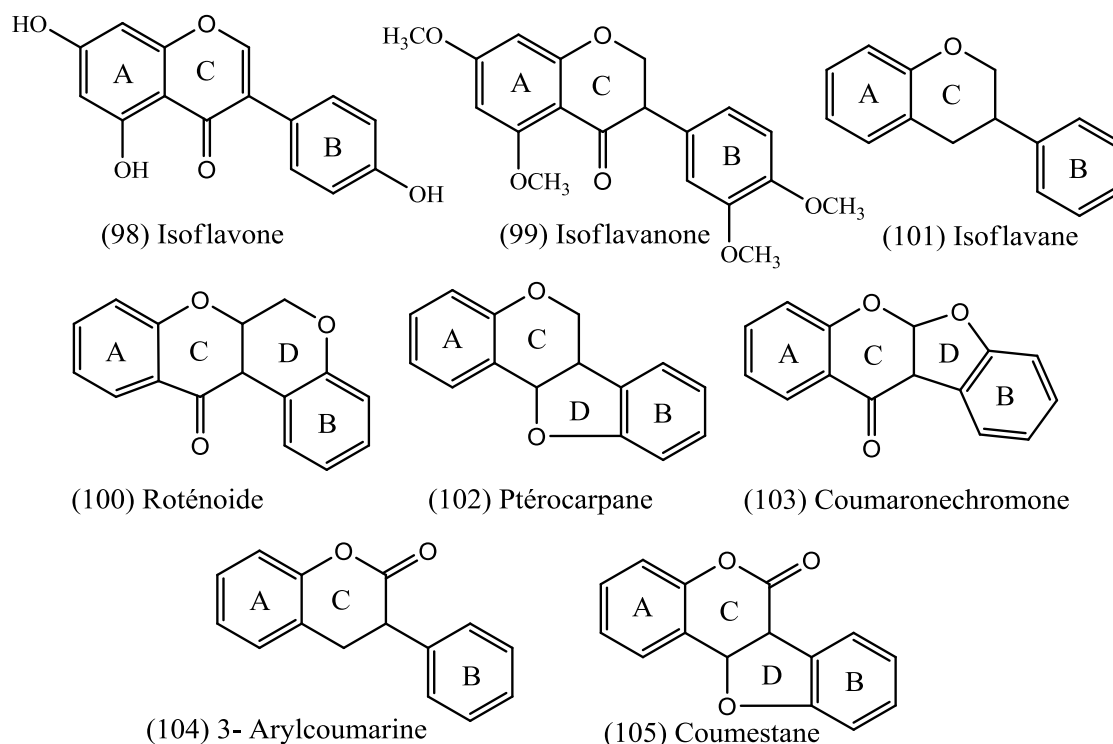
- (97) 4,6' - Epoxyrotiniflavan-ol-4

II.2.6.2.2. Les isoflavonoïdes

Les isoflavonoïdes constituent une grande et très diversifiée sous classe des flavonoïdes. Ils dérivent d'une structure 1,2-diphénylpropane (98-101). Malgré leur caractérisation sporadique dans la classe des dicotylédones, ces sont des composés presque spécifiques de la famille des Fabacées. Cette spécificité est probablement due à la présence dans cette famille de l'enzyme responsable du réarrangement du 2-phénylchromone (flavanone) au 3-phénylchromone (isoflavone) [22]. Ils peuvent être classés en une douzaine de catégories structurales: 3-arylcoumarines, coumaronochromones, coumestanes, isoflavanes, isoflavènes, isoflavones, roténoïdes, ptérocarpanes. Ces catégories diffèrent entre elles, par le degré d'oxydation et l'existence ou non, d'hétérocycles supplémentaires.

Dans chaque catégorie, on note également la présence fréquente de dérivés prénylés. Le terme « prénylé » est utilisé au sens large désignant ainsi le substituant prényle et ou isopentényle, les dérivés furano et diméthylpyrano ou encore le substituant géranyle ou autre. Parmi tous les isoflavonoïdes répertoriés dans le règne végétal, la catégorie la plus largement représentée est celle des isoflavones non glycosylées. Les isoflavones glycosylées quant à elles, existent mais sont plus rares (*O*-glycosylées et exceptionnellement *C*-glycosylées). Certains isoflavonoïdes possèdent un cycle supplémentaire résultant de la cyclisation du dérivé 2'-hydroxylé. Les ptérocarpanes et leurs dérivés ainsi que les coumaronochromones en font partie. D'autres ont une structure de type coumarinique induite par l'oxydation d'une isoflavène. C'est le cas par exemple des coumestanes et de leurs dérivés. Un dernier groupe d'isoflavonoïdes possèdent non seulement un cycle, mais en plus un carbone supplémentaire. C'est le cas des roténoïdes qui proviennent d'une cyclisation oxydative de la 2'-méthoxyisoflavone (100).

Les roténoïdes sont rencontrés principalement chez les Fabacées mais on les rencontre aussi de façon sporadique dans d'autres familles notamment les genres: *Boerhaavia* et *Mirabilis* (Nyctaginacées) [141-143]. Les roténoïdes constituent la classe la plus importante et sont exclusivement prénylés tandis que les isoflavones, les isoflavanes, les ptérocarpanes et les 3-arylcoumarines sont peu représentés. Les structures ci-dessous représentent les différentes sous classes des isoflavonoïdes (98-105).

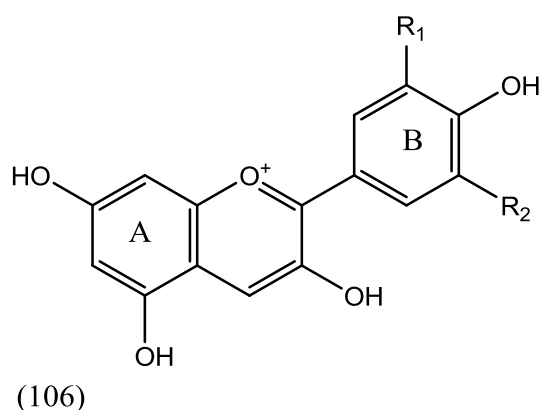


II.2.6.3. Les anthocyanes

Les anthocyanes (du grec *anthos*, fleur et *Kuanos*, bleu violet) terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés [13]. Les anthocyanines sont des flavonoïdes porteurs d'une charge sur l'oxygène de l'hétérocycles C. La structure de base des anthocyanines est caractérisée par un noyau "flavon" généralement glucosylé en position C₃ [144]. Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment (106).

Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange [145, 146]. Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'œil nu. A l'origine de la couleur des fleurs, des fruits et des baies rouges ou bleues, elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplies d'eau [147]. Si la coloration des fleurs et des fruits est leur rôle le plus connu, on trouve également les anthocyanes dans les racines, tiges, feuilles et graines.

En automne, les couleurs caractéristiques des feuilles des arbres sont dues aux anthocyanes et aux carotènes qui ne sont plus masqués par la chlorophylle.



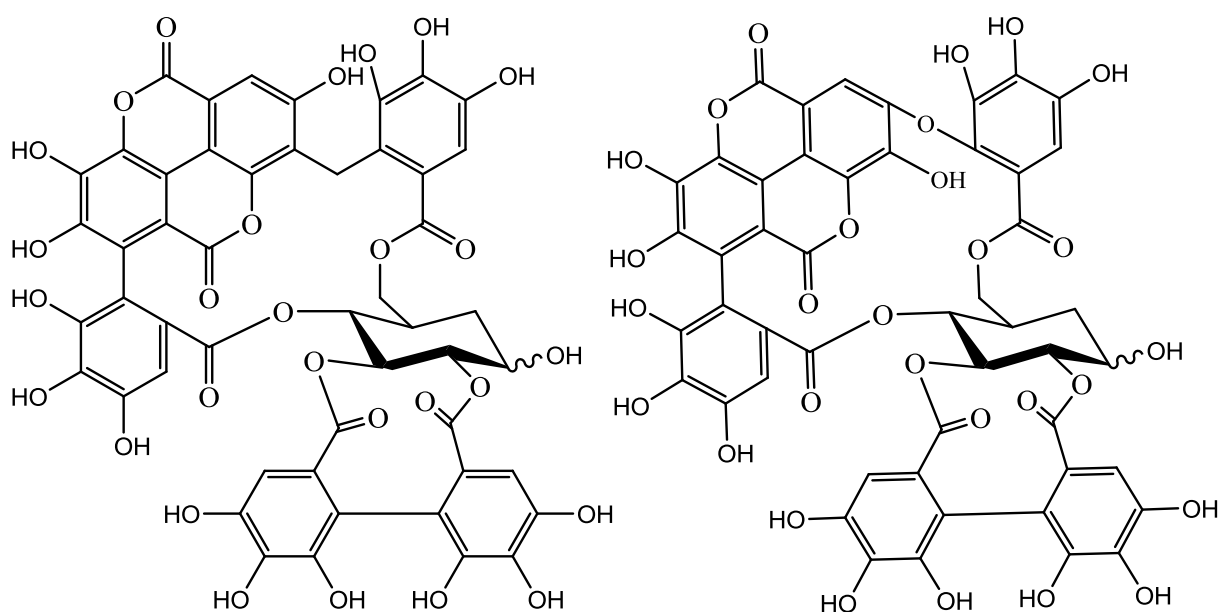
Anthocyanidine	R1	R2
Malvidine	O-CH ₃	O-CH ₃
Péonidine	O-CH ₃	H
Delphinidine	OH	OH
Pétunidine	O-CH ₃	OH
Cyanidine	OH	H

II.2.6.4. Les tanins

Le terme tanin dérive de la capacité de tannage de la peau animale en la transformant en cuir par le dit composé. Les tanins sont un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire. Les tanins sont des molécules fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux [148]. On distingue: les tanins hydrolysables et condensés.

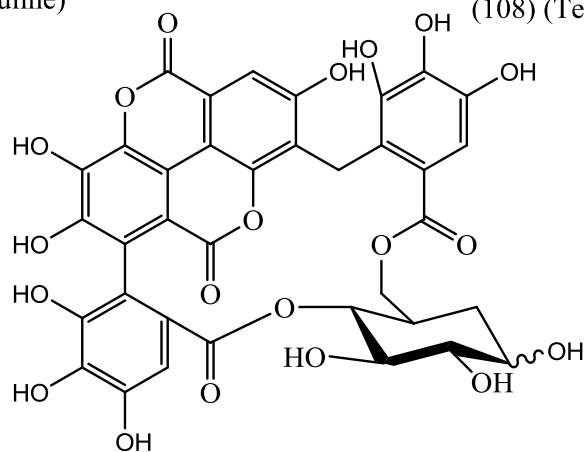
II.2.6.4.1 Les tanins hydrolysables

Ces tanins sont des dimères d'acide gallique condensés sur un dérivé glycosyle, Ils comprennent l'acide gallique et les produits de condensation de son dimère, l'acide hexahydroxydiphénique (107, 108, 109). Comme leur nom l'indique, ces tanins subissent facilement une hydrolyse acide et basique, ils s'hydrolysent sous l'action enzymatique et de l'eau chaude [149].



(107) (Isoterchebuline)

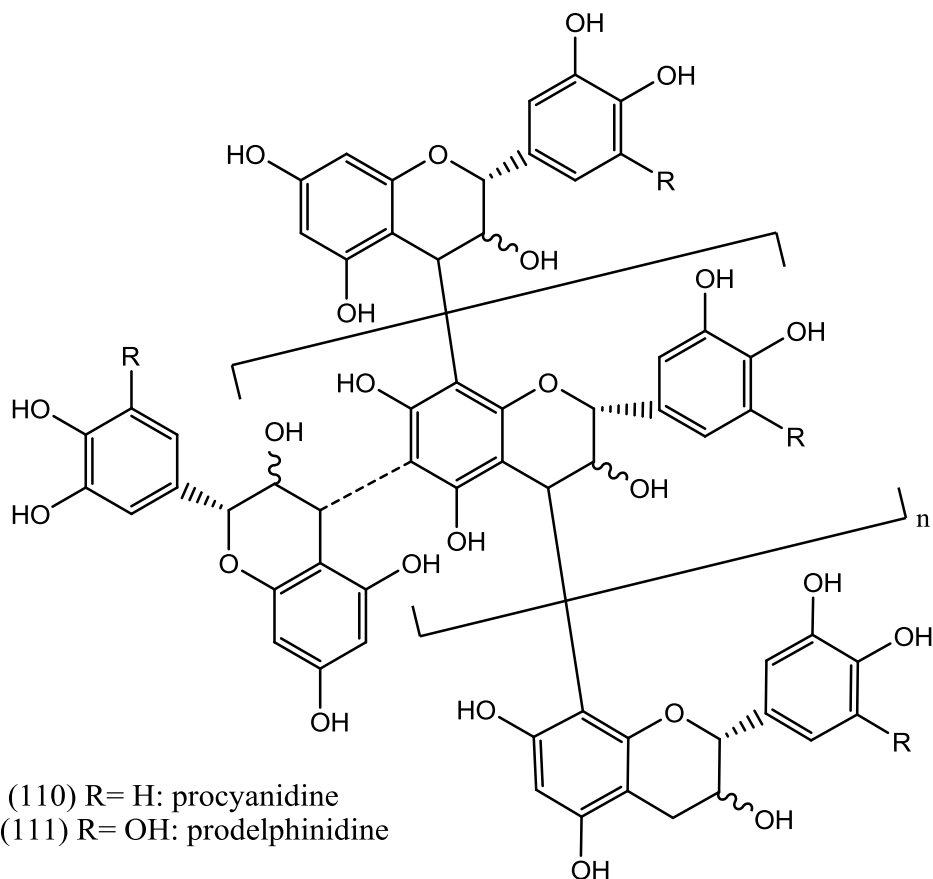
(108) (Terchebuline)



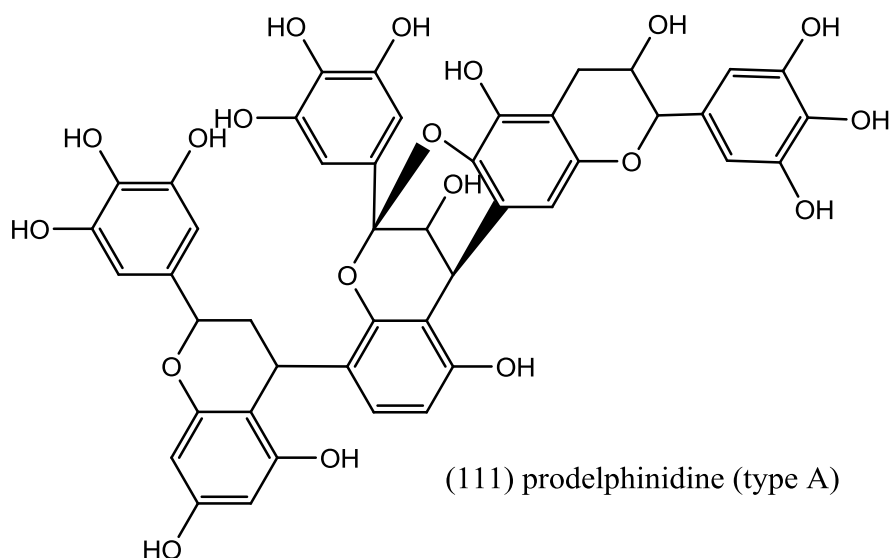
(109) 4, 6-O-isoterchebulinoyl-D-glucose

II.2.6.4.2. Les tanins condensés

Appelés aussi proanthocyanidines ou procyanidines, les tanins condensés, sont des polyphénols de masse molaire élevées. Ils résultent de la polymérisation autooxydative ou enzymatique des unités de flavan-3,4-diol liées majoritairement par les liaisons C4-C8 (parfois C4-C6) des unités adjacentes, et se nomment ainsi pro anthocyanidines de type B. Lorsque la condensation se produit entre les unités adjacentes par la liaison C4-C8 et par une liaison d'éther additionnelle entre C2 et C7, les proanthocyanidines sont dits de types A [150, 151]. Ci-dessus est représenté le modèle de structure d'un tanin de type B (110, 111).



Si R = H ou OH, la structure représente respectivement un procyanidine (110) ou un prodelphinidine (111). La liaison 4-6 en pointillés est une alternative de liaison interflavanique. On note la présence d'unité terminale dans une telle structure [152].



II.3. Biosynthèse de quelques composés polyphénoliques de flavonoïdes

II.3.1. Biosynthèse des flavonoïdes au sens strict

Les flavonoïdes ont tous une origine biosynthétique commune. Ce groupe de composés est défini par une structure générale en C₁₅, caractérisée par un enchaînement Ar-C₃-Ar.

Les flavonoïdes "*stricto sensu*" dérivent d'une structure 1,3-diphénylpropane. L'enchaînement propanique est le plus souvent sous forme d'hétérocycle pyranique, à l'exception de deux groupes : les chalcones et les aurones. Les flavonoïdes résultent de la condensation de 3 unités C₂ (sous forme de 3 (malonyl-CoA)) qui va former le noyau A et d'un acide cinnamique activé qui sera à l'origine du noyau B et de la chaîne propanyle. Cette condensation est catalysée par la chalcone synthétase, enzyme clé dans la formation des flavonoïdes qui conduit à un précurseur, la chalcone (schéma 10). Par l'action d'enzymes, la chalcone se transforme en différents types de flavanoides : aurone (112), flavanone (113), dihydroflavonol ou flavanonol (114), flavonol (115), catéchine (116). Ensuite, la glycosylation et l'acylation entraîne la modélisation finale des flavonoïdes. Les composés de chaque sous-classe se remarquent de différentes façons : par leur nombre, leur position, la nature des substituants (hydroxyles, méthoxyles ...) sur les cycles aromatiques (A, B) et la chaîne en C₃ intermédiaire. A l'état naturel, on trouve le plus souvent les flavonoïdes sous formes de glycosides.

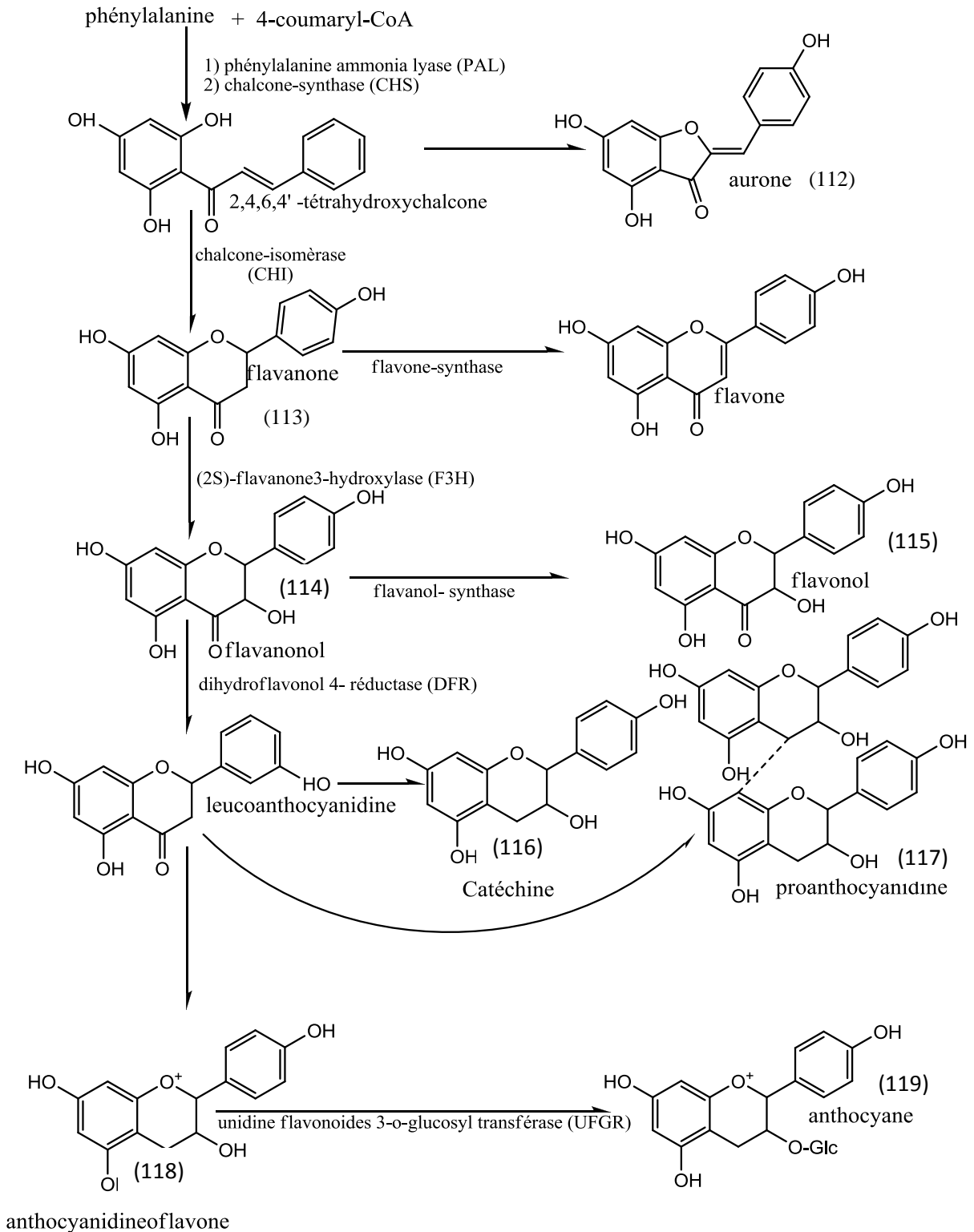


Schéma 10: Biosynthèse de grandes classes des flavonoïdes et des leurs conversions

II.3.2. Biosynthèse de grandes classes des isoflavonoïdes et leurs inter conversions

Le Schéma 11 représente la biosynthèse de grandes classes des isoflavonoïdes et des leurs conversions.

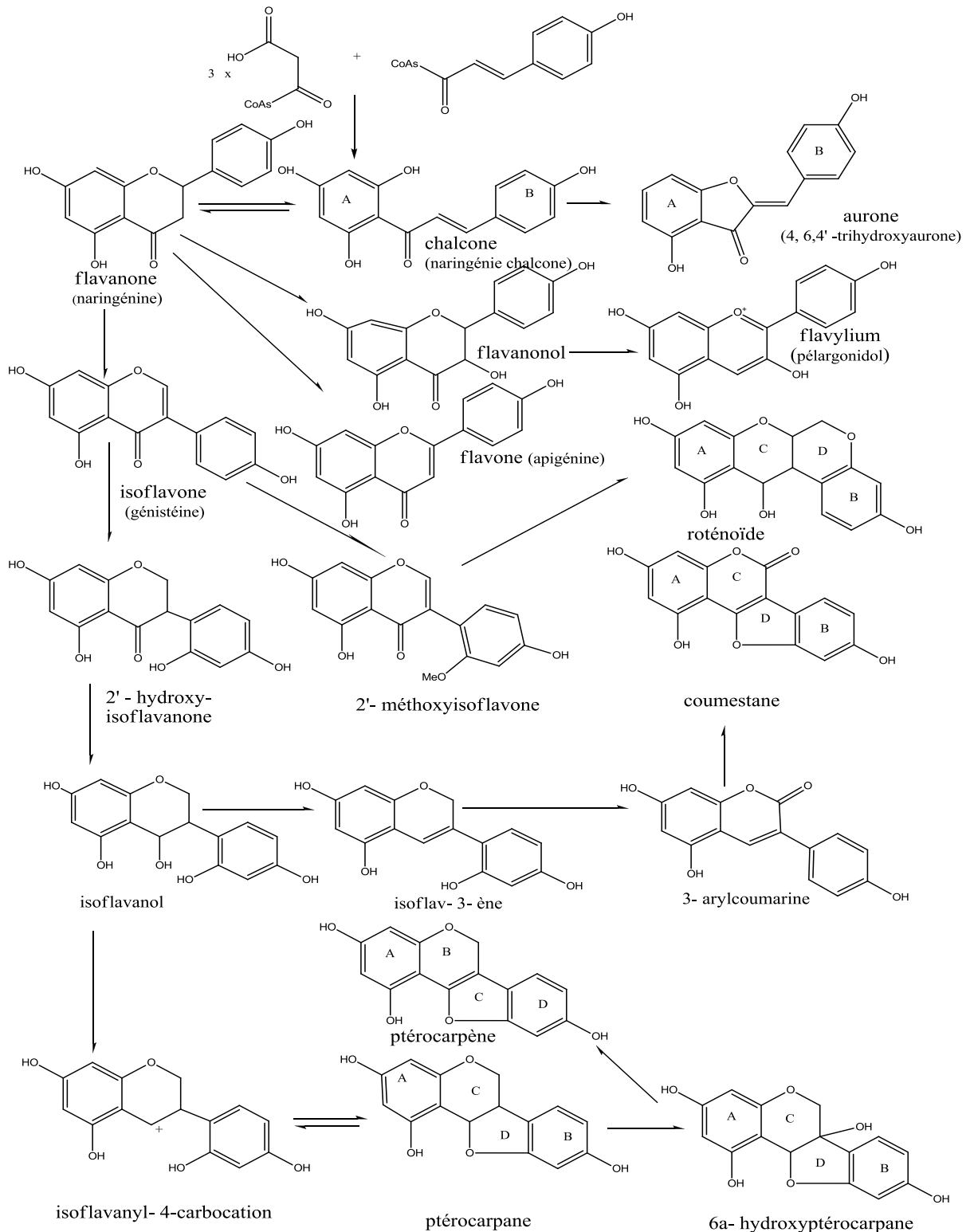


Schéma 11: Biosynthèse de grandes classes des isoflavonoïdes et leurs conversions

II. 4. Rôle et intérêt des composés phénoliques

II.4.1. Chez les végétaux

Les composés phénoliques peuvent intervenir dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...), dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV); soit directement dans la nature soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux; dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles...) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules...) et des produits qui en dérivent par la transformation; dans les variations de certaines caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons fermentées...) pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produit fini [131].

II.4.2. Chez les humains

Le rôle des composés phénoliques est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes [131]. Spécifiquement, on attribue aux flavonoïdes des propriétés variées: veinotonique, antitumorale, anti-radicalaire, anti-inflammatoire, analgésique, antiallergique, antispasmodique, antibactérienne, hépatoprotectrice, estrogénique et/ ou anti-estrogénique. Ils sont également connus pour moduler l'activité de plusieurs enzymes ou de récepteurs cellulaires. Les flavonoïdes favorisent la relaxation vasculaire et empêchent l'agglutinement des plaquettes sanguines. Par conséquent, ils réduisent la coagulation du sang et le rendent plus fluide. Ils limitent l'oxydation des lipides sanguins et contribuent à la lutte contre les plaques d'athérome. Ils sont aussi anxiolytiques et protègent nos artères contre l'athérosclérose et réduit la thrombose (caillots dans les artères). Les exemples de quelques composés phénoliques et de leurs activités biologiques sont récapitulés dans le tableau 5.

Tableau 5: Propriétés biologiques des quelques poly phénols dans l'organisme

Polyphénols	Activités biologiques	Auteurs
Acides phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes, anti-ulcéreuses, antiparasitaires antifongiques, antioxydantes	[153-155]
Coumarines	Protectrices vasculaires, anti-inflammatoires, anti parasitaires analgésiques et anti œdémateuses	[156 -161]
Flavonoïdes	Antitumorales, antiparasitaires, vaso, dilatoires, antibactériennes, anti carcinogènes, anti-inflammatoires, analgésiques, hypotenseurs, antivirales, diurétiques, ostéogène, antioxydantes, anti-atherogéniques, antithrombotique, anti-allergique	[150, 158,162-170]
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux, anti oxydant	[171]
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène, antioxydantes, antitumorales, antifongiques et anti-inflammatoires	[172]
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydantes	[173, 174]
Lignanes	Anti-inflammatoires, analgésiques	[175]
Saponines	Antitumorale, anticancérigène,...	[176]
Phytostérols	Agent de protection contre l'hormone dépendant du cancer de colons	[176]

II.4.3. Dans la régénération des sols pollués

Ce processus était ignoré jusqu'à tout récemment et il consiste en la biotransformation des matières organiques dans le sol où la lignine du type syringyl (un des millions de composés phénoliques) joue un rôle essentiel, tout comme un grand nombre d'autres composés phénoliques. Cette biotransformation n'est que le début d'un long processus lié à la transformation des sols, ce qui est la régulation de la vie des sols, par un contrôle de la mise en disponibilité des nutriments. Elle influence directement la résistance à l'érosion, stimule, protège à la fois différentes phases de la vie animale, bactérienne, fongique qui sont les principales responsables de la pédogenèse [177]. C'est ainsi que le sol demeure stable et fertile. La biotransformation des tissus organiques est responsable du maintien de la biodiversité et de la structure physique du sol. Ces caractéristiques biologiques régissent la disponibilité de l'azote et du phosphore.

II.5. Les antioxydants

II.5.1. Généralités sur les antioxydants

L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies. Mais l'oxygène peut être également une source d'agression pour ces organismes [178]. En effet des dérivés hautement réactifs de l'oxygène peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons U.V, des radiations ionisantes et de métaux de transition [178]. Les formes de l'oxygène provoquant ces troubles sont: l'oxygène singulet O_2 , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , les peroxydes alkyles ROOH, le radical superoxyde O_2 , les radicaux hydroxyles HO, peroxydes ROO et alkoxydes RO [179]. Les conséquences au niveau de l'organisme se font ressentir sur l'ADN, les lipides et les protéines [180].

II.5.2. Mécanismes d'action des radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être considérés comme des déchets du métabolisme cellulaire. Ce sont des atomes et des molécules dotés d'une forte énergie et qui, avant d'être neutralisés détruisent ce qu'ils rencontrent. Ils sont produits dans toutes les cellules de l'organisme tout à fait normalement et en faible quantité dans les mitochondries. Il s'agit des ions oxygène, hydroxyde et de l'eau oxygénée qui sont libérés lors des réactions biochimiques. Avant d'être neutralisés ils provoquent des lésions sur tous les éléments qu'ils côtoient.

L'organisme sait cependant se défendre contre eux, grâce aux enzymes antioxydantes contenues dans nos cellules. Ces enzymes sont aidées dans leur action antiradicalaire par la vitamine E, C, provitamine A, le zinc et le sélénium. Si ces systèmes de défense sont débordés ou insuffisants, les radicaux libres ont tout le loisir d'être nuisibles : ils s'attaquent alors aux membranes cellulaires dont les acides gras insaturés sont dénaturés (leur structure est modifiée); ils agressent également les protéines, les microfibrilles de collagène, l'acide hyaluronique, les acides nucléiques des chromosomes et l'ADN lui-même est transformé entraînant l'apparition d'où une série d'anomalie dont le risque de cancérisation. Lorsque les radicaux libres lèsent les acides gras insaturés on parle de lipidoperoxydation des membranes cellulaires. Cela déclenche alors une réaction en chaîne sur les divers acides gras du voisinage jusqu'à ce qu'ils soient neutralisés.

Il en résulte des lésions de la membrane cellulaire, qui peuvent aboutir à des dérèglements d'intensité variable, conduisant éventuellement à la mort cellulaire. Ils ont un effet analogue sur les mitochondries, les enzymes cellulaires, les chromosomes, le collagène et l'acide hyaluronique. Au cours de la vie nous sommes soumis à des millions de circonstances favorisant la production de ces radicaux libres, particulièrement néfastes pour la peau [181].

Dans le schéma (12), la génération de ROS est initiée pendant la respiration. Cette génération est facilitée par l'implication de divers facteurs physiologiques et environnementaux (UV, radiation, ozone, cigarette, pollution,...). Dans l'organisme la fabrication d'un assortiment de ROS à partir de l'O₂ moléculaire et de la L-arginine se réalise par l'intermédiaire de différentes enzymes tels que le MPO (myloperoxidase), la NADPH oxydase, le SOD (superoxyde dismutase) et le NOS (nitrite oxyde synthase). La présence de ces composés dans l'organisme engendre plusieurs phénomènes au niveau cellulaire, à savoir, les dommages de protéines de réparation de l'ADN, de caspases et la peroxydation lipidique. Notons que le dommage de l'ADN est suivi par une mutation et une activation de NF-kB (nuclear factor-kappa B). Tous ces phénomènes donnent naissance à une vaste gamme de maladies.

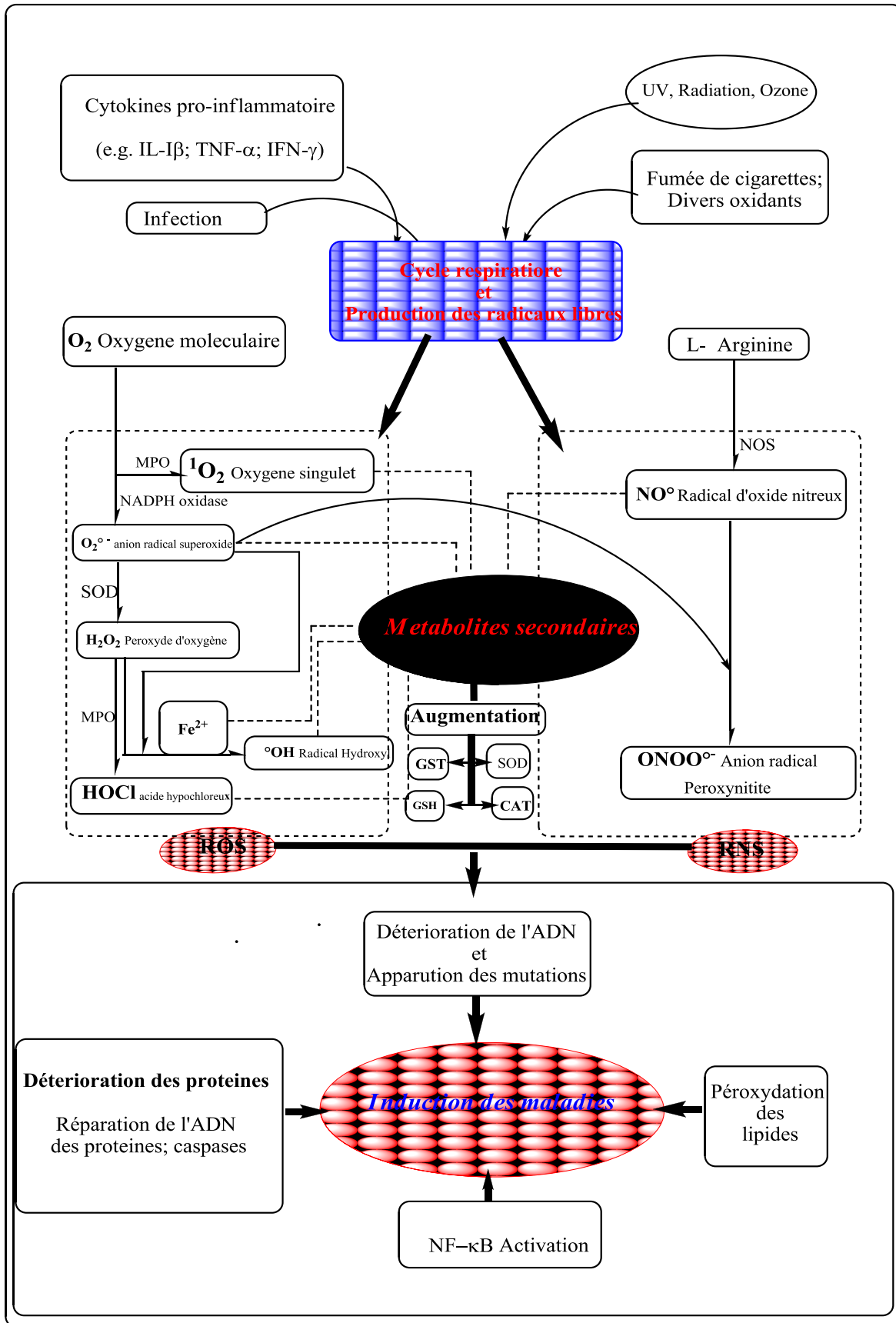


Schéma 12: Métabolites secondaires et prévention des certaines maladies

Les métabolites secondaires inhibent les générations des radicaux libres en piégeant non seulement la mère, la fille mais aussi les produits en induisant une augmentation de la SOD, CAT, la GST et la GSH, ce qui entraîne l'obstruction de la formation de diverses maladies [182]. Il est indéniable que les polyphénols présentent d'importantes propriétés sur divers systèmes biologiques. Ces effets pourraient avoir des applications en thérapeutique. Mais toutes ces potentialités ne sont pas encore concrétisées même si de nombreux travaux soutiennent l'utilisation possible de ces composés en thérapeutique. Cependant, les dérivés de la rutine sont utilisés en thérapeutique pour améliorer la résistance capillaire. Les flavonoïdes sont les constituants habituels des vasculoprotecteurs et veinotoniques utilisés en phlébologie. Par ailleurs, l'utilisation de plantes renfermant des flavonoïdes, seules ou en association, est en progression constante en raison d'une demande croissante par les consommateurs de produits d'origine naturelle et en raison de l'intérêt porté aux plantes aussi bien médicinales qu' alimentaires contenant cette classe de composés d'origine naturelle ayant des propriétés justifiant leur emploi dans la prophylaxie des maladies cardiovasculaires, alzheimer, des cancers...

Les dérivés de l'oxygène (Schéma 13)

a) L'ion peroxyde

L'ion peroxyde est formé par fixation d'un électron sur l'oxygène moléculaire.

Les ions superoxydes sont produits pendant la réoxydation des flavines.

b) Oxygène singulet

Il est produit sous l'action d'une lumière visible en présence d'un appareil photo sensibilisateur. Divers solutions de capture de parade antiradicalaire, des radicaux oxygénés mettent en œuvre des agents chimiques ou biologiques. Pour capture les intermédiaires radicalaires, ils existent plusieurs voies:

- le radical formé à partir de l'oxygène (radical anion, radical hydroxylé) se fixe sur un centre insaturé (double liaison) et libère dans sa combinaison un nouveau radical par suite de réactions homologues qui constituent une polymérisation,
- le radical peut être capturé par un atome d'H issu d'un porteur qui va neutraliser le radical,
- le radical oxygéné peut subir une combinaison avec un autre radical du milieu dans la réaction de couplage ou de terminaison,
- le radical peut attaquer un cycle et l'ouvrir en se neutralisant par addition et déplacement d'un H (exemple vit E) [183].

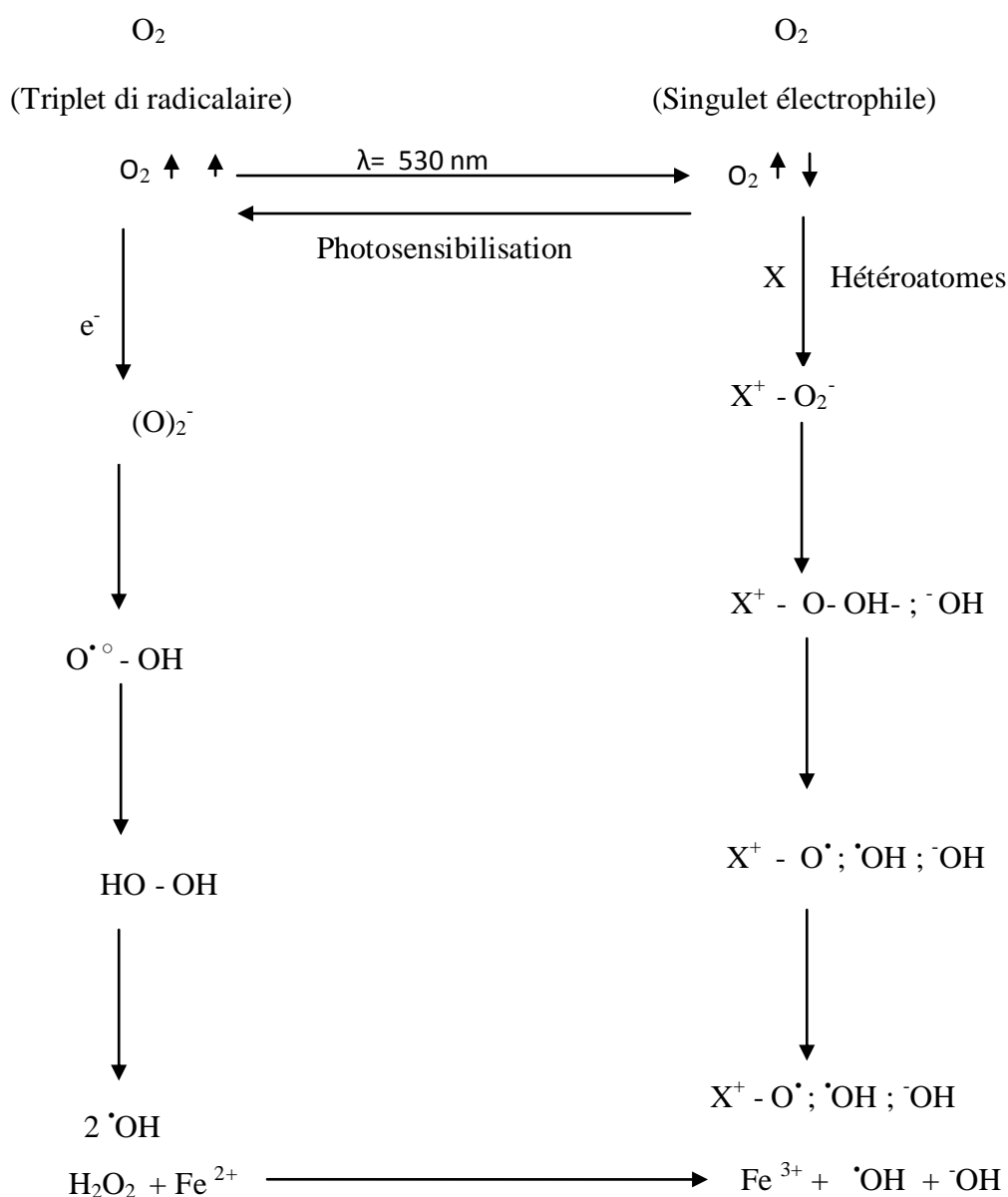


Schéma 13: Production des formes actives de l'oxygène et des intermédiaires qui en découlent

II.5.3. Les principales sources d'antioxydants

Certaines classes thérapeutiques telles que les AINS (anti-inflammatoire non stéroïdien), les antihyperlipoprotéïnémiques, les β -bloquants et antihypertenseurs sont connus pour leurs propriétés antioxydantes [180].

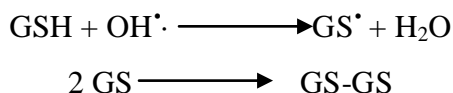
Le plus simple des capteurs des radicaux libre est l'alcool éthylique, agent de transfert d'hydrogène qui conduit à un composé biologiquement compatible, l'acétaldéhyde, bio-oxydable par la chaîne enzymatique avec production d'énergie.



a) Les médicaments

Certains médicaments (exemple du probucol (lurselle)) fait diminuer le taux du cholestérol dans le sang et, la N- acétylcystéine agit dans la régénération du glutathion en pénétrant les cellules.

Les propriétés de la glutathionne ont été reconnues lors d'études sur les phospholipides des feuilles de certains végétaux. En effet les thiols sont beaucoup plus actifs que les hydrocarbures, les alcools ou les phénols comme agents de capture radicalaire [183].



La capacité de protection de la glutathionne est jugée supérieure à celle d'un antioxydant aussi puissant que l' α -tocophérol. On observe *in vitro*, que la glutathionne introduit une période d'induction à la prise d'oxygène par l'hémoglobine et retarde l'oxydation de la fraction hydrocarbonée insaturée des lécithines (esters insaturées d'acide gras de phospholipides) et de l'aniline [184].

b) Les vitamines

- Acide ascorbique : Vitamine C

La Vit C contient une forme énediol qui produit la forme dicétonique par transferts successifs de ses deux atomes d'H. La forme énediol est régénérée par l'intervention d'enzyme superoxyde dismutase en présence d'une catalase.

On trouve la vitamine C dans les légumes, les choux, le poivron, le persil, les agrumes et le kiwi. Elle joue un rôle important dans la régénération du vit E [185].

- La vitamine E

Elle semble devoir fixer le radical hydroxyle avec formation d'une molécule d'ouverture de cycle. On la retrouve dans les huiles végétales (arachides, soja, chardon, tournesol, olive pressé à froid), les amandes, les graines, le lait, les œufs, les légumes à feuilles vertes [185].

- β -carotène

Parmi les photo-protecteurs actifs, le β -carotène apparaît comme un piègeur efficace. Sa constitution polyiénique lui confère une capacité de piégeage de l'oxygène par formation d'un dioxétane (addition d'une oléfine et d'une molécule d'oxygène) ou par production d'hydroperoxydes (insertion d'oxygène dans toutes liaisons C-H conjuguées d'une double liaison) susceptibles d'être réduits à leur tour. Il est présent dans les légumes verts, la salade, les carottes, l'abricot, le melon, les épinards, la papaye [185].

c) Les antioxydants naturels

Ils sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures. Ce sont des composés phénoliques (flavonoïdes, xanthones, coumarines, caroténoïdes, dérivés d'acide phénolique, tanins, anthocyanines,...)

II.5.4. Rôles des complexes antioxydants

La vie en aérobiose se traduit au niveau cellulaire par l'existence d'une chaîne respiratoire mitochondriale nécessaire au stockage de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). La chaîne respiratoire est une succession de phénomènes d'oxydoréduction au cours desquels il existe des transferts d'électrons. Ces électrons peuvent réagir avec une molécule avoisinante pour aboutir à la formation d'un radical libre. Un radical libre est une espèce chimique contenant un ou plusieurs électrons non appariés sur l'orbite électronique la plus externe. Les radicaux libres sont produits au cours de nombreuses réactions engagées dans les mécanismes physiologiques, (respiration mitochondriale), dans les mécanismes pathologiques (inflammation, infection, toute pathologie dégénérative et vieillissement accéléré) et au cours de la pollution (par les métaux lourds, les xénobiotiques, ozone, les rayonnements ionisants...). L'athérosclérose est un bon modèle de pathologie liée au stress oxydant car c'est à la fois une maladie dégénérative, inflammatoire et infectieuse. Dans toutes les cellules aérobies, les radicaux libres sont essentiellement des radicaux oxygénés. Leur hyperactivité les engage dans des réactions de dénaturation des constituants cellulaires de type peroxydation, avec les glucides, les lipides, les protéines et l'ADN, formant des produits très instables. Ceux-ci donnent lieu à des réactions en chaîne générant de nouveaux radicaux libres. Ce processus de peroxydation s'auto-entretient de lui-même et il faut attendre l'obtention de produits stables par réaction entre deux radicaux ou l'intervention de substances protectrices dites "*piégeurs de radicaux libres*" pour l'arrêter. La protection contre les effets délétères induits par les radicaux oxygénés s'effectue à l'aide de trois types d'agents différents :

- les protéines non enzymatiques (albumine, haptoglobine et transferrine) jouent un rôle antioxydant par chélation des ions,
- les enzymes tels que les superoxyde-dismutases et les glutathion-peroxydases transforment des radicaux très prooxydants en substances inoffensives,
- les antioxydants d'origine nutritionnelle, les caroténoïdes, les tocophérols (vitamine E) et l'acide ascorbique (vitamine C).

Le rôle des métabolites secondaires en matière de prévention des maladies causées par les radicaux libres a été clairement établi par plusieurs études [182]. Un schéma représentatif de l'impact de ROS et du rôle des divers métabolites secondaires dans l'apparition des diverses maladies et de leurs mode de suppression est établit ci- dessus (schéma 12).

Ces sont des antioxydants essentiels pour l'homme dont les apports peuvent prévenir et même aider au traitement des maladies liées au stress oxydant. Il existe de nombreux autres composés parmi lesquelles certains sont regroupées dans le grand groupe des polyphénols. Bien que non essentielles, ces substances jouent un rôle majeur dans la lutte contre le stress oxydant [186].

II.6. Intérêts économiques des composés phénoliques

L'utilisation des végétaux par l'homme se confond avec l'histoire de l'humanité, à la fois à des fins alimentaire (pour son alimentation et celle des animaux qu'il domestique progressivement), de protection (celle de ses abris et pour ses vêtements), énergétiques (feu, énergie fossile) et de lutte contre la maladie par constitution d'une médecine et d'une pharmacopée traditionnelle. Parmi tous les constituants chimiques des végétaux, les composés phénoliques n'occupent qu'une place quantitative modeste (à l'exception de la lignine). Ils ont de multiples propriétés de tout temps recherchées par l'homme, d'abord de manière empirique et ensuite selon une approche plus raisonnée qui bénéficie des progrès de la science, en particulier dans les domaines analytiques et biotechnologiques [131].

Les implications économiques des résultats obtenus se rapportant aux composés phénoliques sont considérables. Elles concernent l'utilisation directe de nombreux produits issus de l'agriculture (commercialisation directe des fruits, légumes, céréales). Elles se retrouvent également plusieurs secteurs de la biotechnologie (industries agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques).

III. Travaux personnels

III.1. Matériels et Méthodes

III.1.1. Réactifs chimiques et appareillage

Tous les produits chimiques utilisés sont de qualités analytiques. Les réactifs chimiques et solvants nous ont été fournis par les sociétés Accros organics (Geel, Belgique), Sigma et Roth (Strasbourg, France).

Les différents appareils utilisés pour nos analyses sont les suivants:

- un lyophilisateur de marque CHRIST Alpha 1-2 LD (figure 8),
- un hydrodistillateur pour l'extraction des huiles essentielles (appareil préconisé par la pharmacopée française Xème Edition, 1983,
- un spectrophotomètre UV-Vis (Varian Cary 50 scan) (figure 9),
- un chromatographe liquide haute performance HPLC (RP - HPLC) de marque Waters composé d'une pompe Waters 600E couplé à un détecteur UV-Tunable Waters 486 et équipé d'une boucle d'injection de 20 µl et d'une colonne ODS Alltech Intersil (RP C18 taille 4.6 mm x 150 mm; avec une taille de particules de 5 µm) (figure 22),
- un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectrophotomètre de masse (GC – MS) (figure 41),
- un spectrophotomètre RMN multi-noyaux AC 250 MHz Bruker (figure 54).

III.1.2. Matériels végétaux

Les matériels végétaux utilisés au cours de notre étude sont d'origines diverses: le *D. oliveri* Hutch et Dalz (Specimen herbier N° 2203), le *F. capensis* Thumb (Specimen herbier N° 0049) et *V. doniana* Sweet (Spécimen herbier N° 2009). Nous ont été fournis par le Département de Médecine traditionnelle du Mali (DMT).

Ces plantes ont été authentifiées par le professeur N'Golo de l'Institut National pour la Recherche sur la Santé Public (INRSP) de Bamako, un spécimen pour chaque plante y a été déposé. Les écorces des troncs, des racines et ainsi que les feuilles ont fait l'objet de notre investigation.

Les feuilles du *D. adscendens*, du *S. rebaudiana* et les écorces de racines de *S. longependiculata*, proviennent du Nigéria. Ces échantillons ont été authentifiés par le professeur Max Henry du Laboratoire de Botanique et de Mycologie de l'Université Henry Point carré de Nancy, (France).

Les exsudats des racines du *Miscanthus X giganteus* nous ont été fournis par le laboratoire de microbiologie de l'IUT de Thionville, Université de Metz.

Au laboratoire, les matériels végétaux ont été séchés à température ambiante avant d'être broyés à l'aide d'un mixeur, puis tamisés avec un tamis de 0,75 µm.

III.2. Méthodologie

III.2.1. Préparation des échantillons

La préparation des échantillons est d'une importance capitale pour toute analyse fiable. De nombreuses méthodes de préparation des échantillons ont été développées pour déterminer les composés phénoliques. Les procédures de préparation des échantillons pour l'analyse des composés phénoliques varient beaucoup en fonction de la nature des composés à analyser. Celles-ci doivent tenir compte de nombreux paramètres parmi lesquels: la polarité, l'acidité des molécules, le nombre de groupements hydroxyles et de noyaux aromatiques. Les méthodes de dosage les plus couramment décrites comprennent plusieurs étapes de préparation d'échantillons. Chacune d'elle a pour but d'augmenter la sensibilité et la sélectivité du dosage. Malheureusement, les différentes étapes peuvent parfois introduire des interférences qui créent des artefacts, ce qui n'est pas sans conséquence sur la reproductibilité du dosage et nécessite de faire la moyenne de plusieurs essais.

Il est donc important de contrôler toute la préparation et d'évaluer l'influence de ces effets sur l'analyse des résultats. En général, les échantillons solides sont soumis à un broyage et à un tamisage, souvent précédés par une étape de séchage à l'air libre du matériel végétal à analyser. Les échantillons liquides sont centrifugés et filtrés.

III.2.1.1. Extraction des composés phénoliques

L'extraction est une étape très importante avant l'analyse quantitative et qualitative proprement dite. Elle est influencée par la méthode d'extraction choisie en fonction des composés phytochimiques à étudier. D'autres facteurs, comme le pH, la température, le rapport quantité de matière au volume du solvant, les intervalles de temps, le nombre et les étapes d'extractions individuelles, jouent également un rôle important dans cette procédure. Des étapes supplémentaires de purification des échantillons peuvent être nécessaires en vue d'éliminer des composés tels que les cires, les graisses, les terpènes et les chlorophylles.

Dans notre étude, pour l'analyse des composés phénoliques et polyphénoliques, l'extraction liquide - liquide et/ou solide-liquide sont les procédures les plus couramment utilisées.

En effet, ces techniques sont faciles d'utilisation, très efficaces et peuvent être largement appliquées. Les solvants d'extractions les plus communément utilisés sont les alcools (méthanol, éthanol), l'acétone, l'éther éthylique et l'acétate d'éthyle. Cependant, pour les composés très polaires tel que les acides phénoliques (benzoïque, cinnamique) ne pouvant être extraits complètement avec les solvants organiques purs les mélanges d'alcool - eau ou acétone-eau sont recommandés [187]. Les solvants moins polaires (dichlorométhane (DCM), chloroforme, hexane, benzène) sont utilisés pour éliminer les composés apolaires (cires, huiles, stérols, chlorophylle...). Les extractions sont répétées deux à trois fois et les extraits sont ensuite combinés. Les techniques d'extraction liquide-solide utilisées sont: l'infusion, la macération, la décoction et la lixiviation. Le solvant n'est pas nécessairement de l'eau, cela peut être également un alcool ou une huile.

- L'infusion est une méthode d'extraction des principes actifs ou des arômes d'un végétal par dissolution dans un liquide initialement bouillant que l'on laisse refroidir. Le terme désigne aussi les boissons préparées par cette méthode, comme les tisanes, le thé par exemple.
- La macération est une méthode d'extraction liquide-solide similaire à l'infusion qui s'effectue à température ambiante. Elle est généralement utilisée pour l'extraction de composés sensibles à la chaleur.
- La décoction consiste à réaliser l'extraction à température d'ébullition du solvant. Cette opération s'oppose à la macération dans laquelle le solvant d'extraction est froid.
- Lixiviation: c'est un procédé d'extraction qui consiste à épuiser une substance par le passage de solvants qui entraînent tout ce qui est soluble à travers une poudre [188]. Les drogues pulvérisées (matériels végétaux) que nous avons utilisées ont été humectées avec de l'eau distillée avant cette opération.
- Lyophilisation: c'est une méthode de dessiccation douce, elle consiste à éliminer par sublimation sous vide toute trace de solvant contenue dans un échantillon préalablement congelé.

III. 2.1.2. Extraction des huiles essentielles

Il existe différents procédés d'extraction (distillation, solvants volatils, expression à froid et CO₂ supercritique) mais, pour l'aromathérapie, seuls quelques-uns assurent une bonne qualité finale. L'obtention des huiles essentielles se fait généralement soit par hydrodistillation, soit par expression à froid (zestes). Dans ce dernier cas, une certaine ambiguïté existe sur la dénomination d'huile essentielle. Selon l'AFNOR, il faut utiliser le terme d'essence alors que la Pharmacopée française et la Pharmacopée européenne utilisent le terme d'huile essentielle. Le terme d'huile essentielle a été retenu par les spécialistes en pharmacognosie [22].

La quantité d'huile essentielle contenue dans les plantes est toujours faible, parfois très faible, voire infime. Ceci explique le coût élevé des huiles essentielles, il est lié à la rareté et non au procédé d'extraction qui reste le même pour la plupart des plantes. Il faut parfois plusieurs tonnes de plantes pour obtenir un litre d'huile essentielle.

Dans notre cas, les huiles essentielles ont été extraites par hydrodistillation en utilisant un appareil préconisé par la X^{ème} Edition de la Pharmacopée Française, 1983. Cette méthode consiste en un entrainement à la vapeur d'eau *in situ* des constituants de la drogue au contact de l'eau distillée. Le rendement d'extraction est calculé suivant la formule ci-dessous:

$$Rdt (\%) = (V_{rec} / Mg) \times 100$$

Avec : Rdt = rendement d'extraction; V_{rec} : Volume de l'huile recueilli; Mg : masse de la plante.

III.2.1.3. Extraction des exsudats des racinaires de *Miscanthus X giganteus*

Les rhizomes ont été mis en culture dans du sable de quartz pendant une période de trois mois. L'objectif poursuivi est la stimulation de la production des métabolites secondaires, composés impliqués dans l'établissement de symbioses plantes-bactéries-champignons favorisant l'acquisition des phytonutriments. Cette situation de «stress» est susceptible d'être localement rencontrée au sein des sols de friches généralement détériorés et appauvris par l'activité industrielle passée.

Les racines des plantes (*Miscanthus X giganteus*) sont récupérées manuellement et lavées succinctement à l'eau. L'extraction des exsudats est réalisée par immersion des racines durant 24 h dans de l'eau distillée. En suite la solution est décantée puis filtrée (0,22 µm) et congelée pour lyophilisation. Le lyophilisat obtenu est directement utilisable pour les analyses.

III. 2.1.4. Résultats et discussions

III.2.1.4.1. Rendement des extractions des composés phénoliques

Les rendements d'extraction des composés phénoliques de différents matériels végétaux étudiés sont reportés dans le tableau 6. Chaque essai a été répété quatre fois ainsi, chaque valeur reportée dans ces tableaux est une moyenne. De ces résultats nous constatons que le mélange hydroalcoolique donne les meilleurs rendements d'extractions par rapport aux mélanges aqueux.

Travaux personnels

Tableau 6: Rendement d'extraction des composés phénoliques dans H₂O, CH₃OH/eau (30 % v/v) et CH₃OH/eau (70 % v/v)

	Parties	Extrait aqueux			Extrait MeOH/ H ₂ O (30%)			Extrait MeOH/ H ₂ O (70%)		
		Mp (mg)	MI (mg)	Rdt (%)	Mp (mg)	MI (mg)	Rdt (%)	Mp (mg)	MI (mg)	Rdt (%)
<i>D. Oliveri</i>	Et	30	2,0	6,8	30	3,6	12,0	30	5,4	18,0
	Er	30	1,9	6,2	30	2,5	8,4	30	3,8	12,5
	F	30	2,6	8,6	30	4,1	13,6	30	6,0	20,0
<i>D. Adscendens</i>	F	30	4,9	16,3	30	9,7	32,1	30	12,2	40,6
<i>F. Capensis</i>	Et	30	1,6	5,2	30	2,12	7,1	30	3,7	12,2
	Er	30	1,5	4,8	30	1,8	6,1	30	2,5	8,2
	F	30	2,2	7,3	30	3,9	12,9	30	5,2	17,3
<i>V. Doniana</i>	Et	30	1,5	5,1	30	2,0	6,60	30	2,8	9,2
	Er	30	1,4	4,6	30	1,6	5,3	30	4,0	13,2
	F	30	2,5	7,0	30	3,1	10,2	30	4,8	16,1
<i>S. Longependunculata</i>	Er	30	1,6	5,2	30	2,6	8,5	30	4,0	13,2
	F	30	3,9	12,8	30	4,98	16,61	30	6,8	22,8
<i>S. Rebaudiana</i>										

Mp: masse de la plante; *MI*: masse du lyophilisat; (%) *rd*: rendement d'extraction; *F*: feuille; *E_r*: écorce racine; *E_t*: écorce tronç.

III.2.1.4.2. Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été extraites des feuilles de *D. oliveri*, *D. adscendens*, *F. capensis*, *V. doniana* et *S. rebaudiana*. Les rendements d'extractions de ces huiles sont donnés dans le tableau 7.

De ces résultats, nous remarquons que les feuilles de *S. rebaudiana* (3,5 ml/ 100g Ms) sont très riches en huiles essentielles suivies de *F. capensis* (0,65 ml/ 100g Ms). Les rendements d'extractions de *S. rebaudiana* montrent que ces feuilles renferment dix fois plus d'huile essentielle que celles de *D. adscendens* (0,25 ml/100g Ms). Quant aux feuilles de *V. doniana* et de *D. oliveri*, leurs rendements sont sensiblement équivalents: 0,40 et 0,45 ml/ 100g respectivement. Afin de minimiser les risques des erreurs dues aux différentes manipulations, les extractions ont été faites trois fois pour chaque échantillon.

Tableau 7: Rendement d'extraction des huiles essentielles des feuilles des plantes étudiées

Feuilles ml/100g Ms	<i>D. oliveri</i>	<i>D. adscendens</i>	<i>F. capensis</i>	<i>V. doniana</i>	<i>S. rebaudiana</i>
% Rdt	0,40 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,65 ± 0,02	0,45 ± 0,03	3,5 ± 0,15

III.3. Méthodes d'analyses

III.3.1. Analyses chimiques

III.3.1.1. Screening phytochimique

C'est une technique qui permet de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques.

Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais on peut citer les principaux : les alcaloïdes, les polyphénols (flavonoïdes, anthocyanes, tannins), les saponosides, les stéroïdes, les coumarines, les stérols, les terpènes, les hétérosides cardiotoniques, les huiles essentielles, les sucres réducteurs (oses-holosides et mucilages).

Les échantillons sont préparés de la manière suivante; l'extraction est faite par macération dans trois solvants différents:

- A: eau distillée
- B: éthanol-eau (30 %),
- C: éthanol-eau (70 %).

30 g du matériel végétal séché ont été pesés puis mélangés avec un volume de 300 ml du solvant. Le mélange est laissé sous agitation magnétique pendant 24 heures à température ambiante. La solution obtenue est ensuite filtrée sur papier filtre (Wathman 0,16 mm) sur un dispositif Büchner sous vide. Le filtrat est ensuite récupéré et le résidu est lixivié avec le solvant d'extraction correspondant. La lixiviation a consisté à épuiser les matériels végétaux de tout ce qui est soluble par passage du solvant d'extraction.

Le volume total du filtrat est concentré sous vide sur un évaporateur rotatif (Heidolph Instrument Laborota 4000-efficient) muni d'une pompe à vide abaissant le point d'évaporation du solvant (mélange eau à 50 °C et les mélanges éthanol-eaux à 40°C).

Le ballon contenant l'extrait concentré est congelé pendant 24 heures puis placé sur un lyophilisateur (CHRIST Alpha 1-2 LD), la température au sein du ballon est - 60 °C et la pression 0,001 bar. Le mélange est sublimé.

Après 72 heures, l'extrait lyophilisé est récupéré, pesé, étiqueté et conservé à + 4 °C jusqu'à l'utilisation. Le rendement d'extraction est calculé suivant la formule ci-dessous:

$$\text{Rdt (\%)} = (\text{M}_{\text{lyoph}} / \text{M}_{\text{g}}) \times 100$$

Avec : M_{lyoph} = masse du lyophilisat ; M_{g} = masse de la plante.

Analyses phytochimiques préliminaires:

- Dosage des alcaloïdes:

Le réactif de Dragendorff et le réactif de Mayer

- Réactifs de Dragendorff composition:

Iodure de potassium (KI) 60 g, nitrate de bismuth (BiNO_3) (0,85g), acide acétique glacial (CH_3COOH) (15ml), Chlorure de mercure (Hg_2Cl_2) (13,55g), ammoniacque (NH_4OH) (20ml) et dichlorométhane (100 ml) (CH_2Cl_2).

- Réactif de Mayer composition:

Iodure de potassium (KI) 25 g, chlorure mercurique 6,8 g eau distillée qs (1000 ml). 1mg du lyophilisat est pesé puis mélangé à 5 ml d'une solution H_2SO_4 (10%). Le mélange obtenu est mis sous agitation et macéré pendant 3 heures. Ce mélange est ensuite filtré et le volume complété avec de l'eau distillée à 5 ml. 1 ml de filtrat obtenu est placé dans deux tubes

différents, puis 5 gouttes du réactif de Dragendorff sont ajoutées dans l'un et 5 gouttes de réactif de Mayer dans l'autre. L'apparition de précipités rouges orangés et blancs jaunâtres respectivement dans ces tubes, indiquent la présence des alcaloïdes.

- Dosages des polyphénols

Une infusion aqueuse (5 %) est réalisée (0,5g du lyophilisat pour 10 ml d'eau distillée) pendant 30 minutes. Le mélange est ensuite filtré et le volume ajusté à 10 ml.

o Flavonoïdes

A 1 ml de l'infusion obtenue ci-dessus nous avons ajouté 1 ml d'alcool-chlorhydrique, 1ml d'alcool isoamylique puis quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration:

- Rose orangé indique la présence de flavones;
- Rose violacé indique la présence de flavanones;
- Rouge indique la présence de flavonols, flavanonols.

o Anthocyanines (leucoanthocyanes)

A 1 ml de l'infusion ci-dessus est ajouté 1 ml d'alcool-chlorhydrique, 1ml d'alcool isoamylique puis le mélange est chauffé à reflux au bain-marie pendant 20 minutes. L'apparition d'une coloration:

- Rouge-cerise violacé indique la présence de leucoanthocyanes;
- Brun-rouge indique la présence des catéchols

o Tanins

A 1 ml de l'infusion ci-dessus est ajouté 200 µl de FeCl₃ (1%). En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu - noir.

La différenciation entre les tanins galliques et catéchiques se fait par le réactif de Stiasny (méthanal-acide chlorhydrique concentré 2 : 1 v/ v).

- Tanins catéchiques:

A 1 ml de l'infusion, nous ajoutons 0,5 ml de réactif de Stiasny; le mélange obtenu est chauffé au bain-marie à 90 °C pendant 15 minutes. L'apparition d'un précipité montre la présence des tanins catéchiques.

- Tanins galliques:

Pour révéler les tanins galliques, nous avons filtré le mélange précédemment chauffé et prélevé 0,5 ml du filtrat. Le filtrat est ensuite saturé avec de l'acétate de sodium, à ce mélange il est ajouté 100 µl d'une solution de FeCl₃ à 1 % (P/ V).

Le développement d'une teinte bleu-noire indique la présence de tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny.

- Coumarines

Réactifs chimiques utilisés

Ether diéthylique (40 ml), solution d'ammoniaque diluée (25 % v/ v: 0,5 ml), chloroforme (20 ml), anhydride acétique (1ml), acide sulfurique (2 ml).

La solution à analyser est obtenue après une macération durant 24 heures de 0,5 g du lyophilisat précédemment obtenu dans 10 ml d'éther éthylique. Le mélange est ensuite filtré et le volume est complété à 10 ml. Nous avons prélevé, 1ml du filtrat ci-dessus puis évaporé à sec le solvant et ajouté au résidu 400 µl d'eau chaude. Le mélange obtenu est ensuite partagé dans deux tubes à essais.

Au contenu de l'un, nous avons ajouté 100 µl de NH_4OH (25 %). Nous avons bien mélangé et observé la fluorescence sous UV à 366 nm. La présence des coumarines est indiquée par une fluorescence dans le tube.

- Stérols et triterpènes

1ml du filtrat ci-dessus (solution à analyser) est évaporé à sec. Le résidu obtenu est dissous dans un mélange de 100 µl d'anhydride acétique et 100 µl de chloroforme. La solution obtenue est répartie entre deux tubes à essais (l'un servira de référence). Ensuite nous avons ajouté 100 µl d' H_2SO_4 au fond du tube sans agiter. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et d'une coloration violette de la couche surnageante révèlent la présence des stérols et des triterpènes. C'est la réaction de Liebermann-Buchard.

- Dosage des saponosides

0,5 g de la poudre de l'extrait est mélangé à 10 ml d'eau distillée puis porter à l'ébullition pendant 5 minutes. Il est ensuite refroidi et agité vigoureusement pendant 2 minutes. La formation d'une mousse plus ou moins importante indique la présence de saponosides.

- Dosage des composés réducteurs, oses-holosides et mucilages

Le réactif de Fehling (1ml), l'acide sulfurique (1ml), la solution de thymol saturée dans l'éthanol (5 ml), l'éthanol absolu (5ml) sont les réactifs utilisés. La solution à analyser est une décoction à 10 % obtenue au bout de 15 minutes.

o Recherche des composés réducteurs:

1 ml de la solution à analyser est évaporé à sec. Puis, 200 µl de réactif de Fehling est ajouté au résidu. L'obtention d'un précipité rouge brique indique la présence de composés réducteurs.

○ Oses et holosides

Pour les oses et les holosides; 1ml de la solution à analyser est évaporé à sec. Ensuite 2 à 3 gouttes de l'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré sont ajoutées au résidu obtenu. Après 5 minutes, 3 gouttes d'alcool saturé de thymol y sont ajoutés. L'apparition d'une coloration rouge indique la présence d'oses et d'holosides.

○ Mucilages

A 1ml de la solution à analyser sont ajoutés 5 ml d'éthanol absolu. L'apparition d'un précipité floconneux indique la présence de mucilage.

III.3.1.2. Résultats

Screening chimique des extraits

❖ Extraits de *Daniella oliveri*

Les résultats de la composition phytochimique préliminaire de différents extraits des *D. oliveri* par screening chimique sont repris dans le tableau 8. De ce tableau, nous remarquons que les extraits de *D. oliveri* contiennent aussi bien des polyphénols, des flavonoïdes, anthocyanines, que des alcaloïdes. Les feuilles sont pauvres en tanins, les écorces des racines et des troncs, en saponines et en terpènes. L'étude préliminaire montre que la plante ne contient pas de résine. Les écorces des racines et des troncs sont très pauvres en tanins et en stéroïdes.

Tableau 8: Composition phytochimique des extraits de *D. oliveri*

NE et Cp (CH ₃ OH 70%)	F	E _r	E _t
polyphénols	++++	++++	++++
flavonoïdes	++++	++++	++++
anthocyanines	++++	++++	++++
alcaloïdes	++++	++++	++++
tanins	+	++	++
sucres réducteurs	+++	+++	+++
hydrate de carbones	+++	+++	+++
glucosides	++++	++++	++++
saponines	+++	+	+
stéroïdes	++	++	++
terpène	++++	-	+
résine	-	-	-

++++ Très abondant; +++: abondant; ++: présence modérée; + faible; - absent; F: feuille; E_r: écorce

racine; E_t: écorce tronc; NE: nature de l'extrait; Cp: composition

❖ Extraits de *Desmodium adscendens*

L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique des extraits de feuilles de *D. adscendens* donne des résultats représentés dans le tableau 9. De ce tableau, il est constaté que les extraits des feuilles de *D. adscendens* étudiés contiennent des flavonoïdes, des anthocyanines, des polyphénols et des saponines. Les sucres tels que glucosides et les hydrates de carbones sont présent mais en faible quantités. Par ailleurs ces extraits ne contiennent pas des résines.

Tableau 9: Composition phytochimique des extraits de feuilles de *D. adscendens*.

NE et Cp (CH ₃ OH 70%)	F
polyphénols	+++
flavonoïdes	++++
anthocyanines	++++
alcaloïdes	+++
tanins	++
sucres réducteurs	+++
hydrate de carbones	++
glucosides	+
saponines	++++
stéroïdes	+++
terpène	+++
résine	-

++++ Très abondant; +++: abondant; ++: présence modérée; + faible; - absent; F: feuille.

❖ Extraits de *Ficus capensis*

Les analyses élémentaires des extraits de différentes parties de *F. capensis* donnent des résultats qui sont repris dans le tableau 10. L'analyse de ces résultats montre que les extraits étudiés sont très riches en composés phénoliques tel que polyphénols, flavonoïdes et anthocyanines. Ils s'avère que les extraits des feuilles et des écorces de troncs sont aussi riches en alcaloïdes.

Seules les écorces de troncs contiennent une part importante de tanins et de glucosides. Les feuilles et les écorces de troncs sont moins riches en terpènes et en résines. Les saponines sont inexistantes dans les trois extraits.

Travaux personnels

Tableau 10: Composition phytochimique des extraits de plante de *F. capensis*

NE et Cp (CH ₃ OH 70%)	F	E _r	E _t
polyphénols	++++	+++	++++
flavonoïdes	++++	+++	++++
anthocyanines	++++	++++	++++
alcaloïdes	++++	++	++++
tanins	++	+	+++
sucres réducteurs	+++	++	+++
hydrate de carbones	+++	++	+++
glucosides	-	+	+++
saponines	-	-	-
stéroïdes	++	++	++
terpène	++	-	+
résine	++	-	++

++++ Très abondant; +++: abondant; ++: présence modérée; + faible; - absent; F: feuille; E_r: écorce racine; E_t: écorce tronc

❖ Extraits de *Securidaca longependunculata*

Les résultats de la composition phytochimique préliminaire des extraits des écorces de racines de *S. longependunculata* sont repris dans le tableau 11. Les extraits de ces écorces sont riches en anthocyanines, en polyphénols et en flavonoïdes mais pauvre en tanins et en sucres réducteurs. Les extraits ne contiennent pas des saponines et des résines.

Tableau 11: Composition phytochimique des extraits des écorces des racines de *S. longependunculata*

NE et Cp (CH ₃ OH 70%)	E _r
polyphénols	+++
flavonoïdes	+++
anthocyanines	++++
alcaloïdes	++
tanins	+
sucres réducteurs	+
hydrate de carbones	+
glucosides	++
saponines	-
stéroïdes	++
terpène	+
résine	-

++++ Très abondant; +++: abondant; ++: présence modérée; + faible; - absent; E_r: écorce racine

❖ Extraits de *Stevia rebaudiana*

Le tableau 12 nous donne la composition phytochimique préliminaire des extraits des feuilles de *S. rebaudiana*. De ces résultats, nous pouvons affirmer que ces extraits sont riches en composés phénoliques tels que les polyphénols, les flavonoïdes et les anthocyanines. Ces feuilles contiennent aussi des alcaloïdes et de tanins. Mais elles sont pauvres en saponines et en résines.

Tableau 12: Composition phytochimique des extraits de feuilles de *S. rebaudiana*

NE et Cp (CH ₃ OH 70%)	F
polyphénols	+++
flavonoïdes	+++
anthocyanines	+++
alcaloïdes	++
tanins	+
sucres réducteurs	++++
hydrate de carbones	++++
glucosides	++++
saponines	+
stéroïdes	+++
terpène	+++
résine	-

++++ Très abondant; +++: abondant; ++: présence modérée; + faible; - absent; F: feuille

❖ Extraits de *Vitex doniana*

L'évaluation de la composition phytochimique préliminaire des extraits de *V. doniana* donne des résultats représentés dans le tableau 13. Dans l'ensemble, ces résultats nous indiquent que ces extraits sont très riches en polyphénols et anthocyanines mais pauvres en alcaloïdes et en résines.

Tableau 13: Composition phytochimique des extraits de *V. doniana*

NE et Cp (CH ₃ OH 70%)	F	E _r	E _t
polyphénols	+++	++	+++
flavonoïdes	++	++	+++
anthocyanines	+++	+++	+++
alcaloïdes	-	-	-
Tanins	+	+	+++
sucres réducteurs	++	+	+
hydrate de carbones	+	++	++
glucosides	++	+	+++
saponines	++	+	+
stéroïdes	-	++	++
terpène	++	-	+
résine	-	-	-

++++ Très abondant; +++: abondant; ++: présence modérée; + faible; - absent; F: feuille; E_r: écorce racine; E_t: écorce tronc.

CCM sur papier des extraits

Les analyses par chromatographie bidimensionnelles sur papier (Whatman No:1113125) ont été réalisées sur certains extraits des feuilles; des écores de troncs et de racines, les résultats sont repris ci-dessous (tableau 14). Les polyphénols détectés appartiennent à plusieurs groupes notamment: flavane (catéchine) et flavonols (quercétine, rutine), dérivés de l'acide cinnamique (acide caféique) et dérivés de l'acide benzoïque (acide gallique).

Travaux personnels

Tableau 14: Analyse par CCM sur papier des quelques composés phénoliques

Composé phénolique (F, E _r , E _t)	Rf × 100 dans les solvants				Réactions colorées		Fluorescence UV	Produits
	BE	BA	BAM	AA2	Réactifs	Couleur	254 nm	
C ₀₁	85	91	80	46	-	jaune	rouge	acide gallique
C ₀₂	80	92	84	42	-	jaune verdâtre	brun verdâtre	acide caféique
C ₀₃	76	83	86	44	I	jaune	rouge	catéchine
C ₀₄	73	53	78	57	II	jaune	brun	quercitrine
C ₀₅	81	96	90	21	II	jaune	brun	rutine
Da(F)	38/82*	95*	90*	21	II	jaune	brun	*rutine
Da(E _t)	-	-	-	-	-	-	-	-
Da(E _r)	40/78*	93*	78*	49	-	jaune	brun verdâtre	*acide caféique
Ds(F)	42/73/86*	90/91*	86/80*/75	46/47*	-	jaune	brun / *rouge	*acide gallique/ quercetin
Fc(F)	73	89	87	47	II	jaune	brun verdâtre	quercétine
Fc(E _r)	-	-	-	-	-	-	-	-
Fc(E _t)	42/71*	90*	84*	46*	II	jaune	brun	*quercétine
Ds(F)	44/		75/		-	jaune		
Sc(F)	76*	71/84*	74/85*	51	I	jaune	rouge	*catéchine
Vt(F)	89	35/85	78/92	-	-	-	-	-
Vt(E _r)	35/77*	83*	85*	55	-	jaune	rouge	*catéchine
Vt(E _t)	81	95	88	-	-	jaune	brun	rutine
St(F)	44/71*/80	91*/73	87*	-	II	jaune	brun verdâtre	*quercétine

- : non réalisé, témoins (Co (1, 2, 3, 4,5): composés 1, 2, 3, 4,5); Da: *Daniella oliveri*, Ds: *Desmodium adscendens*; Fc: *Ficus capensis*, Vt: *Vtix doniania*; Sc: *Securidaca longependunculata*; St: *Stevia rebaudiana*, F: feuille; E_r: écorce racine; E_t: écorce tronc.

III.3.1.3. Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible)

III.3.1.3.1. Spectrophotométrie

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert.

La densité optique des solutions est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique à étudier. Lorsqu'une lumière d'intensité I_0 passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le(s) soluté(s). L'intensité I de la lumière transmise est donc inférieure à I_0 . L'absorbance de la solution est définie comme suit :

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right)$$
$$A = -\log T$$

Avec T (transmittance) =

$$T = \frac{I}{I_0}$$

L'absorbance est une valeur positive, sans unité. Elle est d'autant plus grande que l'intensité transmise est faible.

Domaine UV-visible de la spectrophotométrie

Un soluté coloré ou chromophore absorbe la lumière visible (longueurs d'onde comprises entre 400 et 800 nm). On parle de spectrophotocolorimétrie ou plus simplement de colorimétrie. Certaines solutions absorbent dans l'ultraviolet (longueurs d'onde inférieures à 380 nm), on parle alors de spectrophotométrie UV.

Le principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre UV est illustré dans le schéma 14.

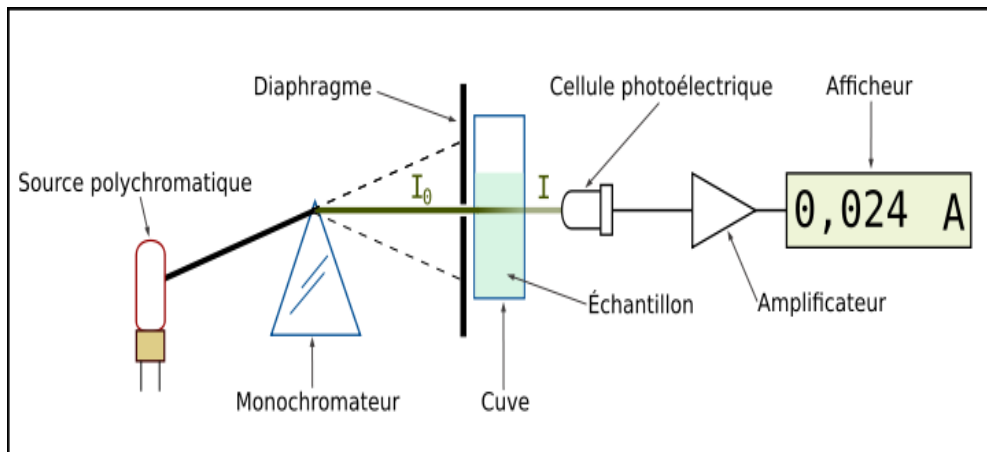


Schéma14: Principe du spectrophotomètre UV-visible monofaisceau

Un spectrophotomètre mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée. Un dispositif monochromateur permet de générer, à partir d'une source de lumière visible ou ultraviolette, une lumière monochromatique, dont la longueur d'onde est choisie par l'utilisateur. La lumière monochromatique incidente d'intensité I_0 traverse alors une cuve contenant la solution étudiée, et l'appareil mesure l'intensité I de la lumière transmise. La valeur affichée par le spectrophotomètre est l'absorbance à la longueur d'onde étudiée.

Le spectrophotomètre peut être utilisé pour mesurer de manière instantanée une absorbance à une longueur d'onde donnée ou pour produire un spectre d'absorbance (spectrophotomètre à balayage). Dans ce dernier cas, le dispositif monochromateur décrit en un temps court l'ensemble des longueurs d'onde comprises entre deux valeurs choisies.

III.3.1.3.2. Analyses quantitatives

Les méthodes colorimétriques basées sur l'utilisation du spectrophotomètre UV-visible, ont été utilisées pour évaluer la quantité des composés phénoliques dans la matière végétale. La méthodologie générale utilisée au cours de ces analyses est décrite dans le schéma (15) ci dessous.

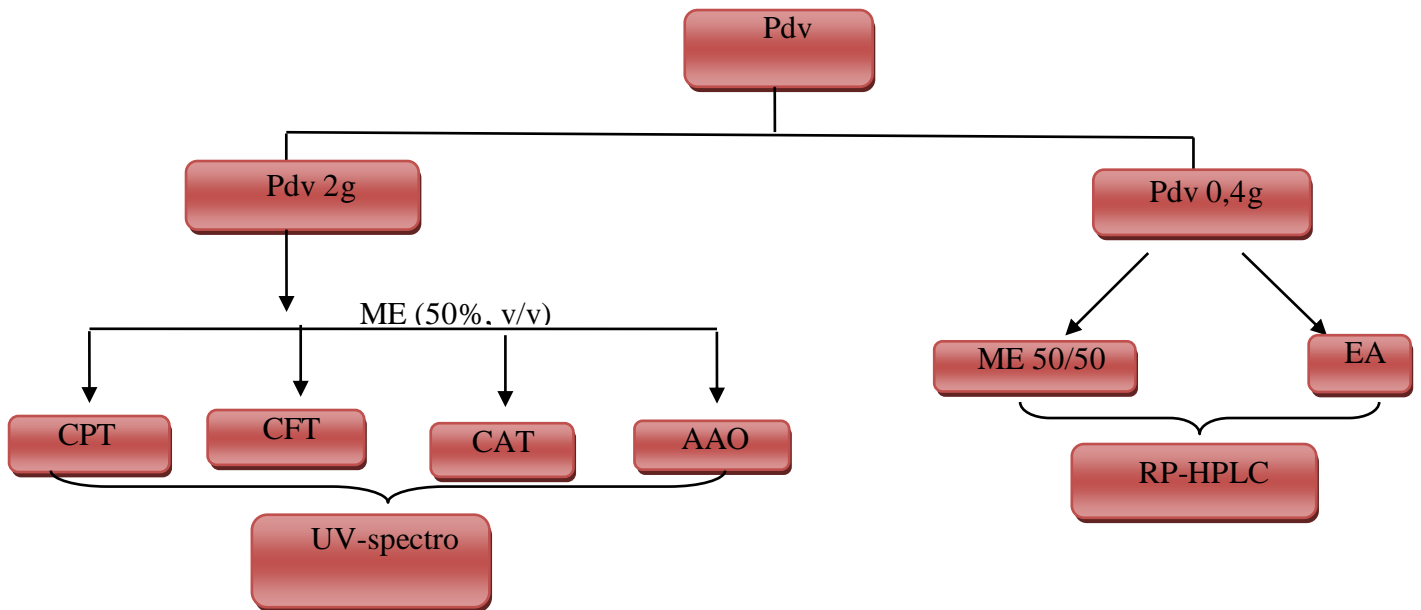


Schéma 15: Le processus général d'analyse quantitative et qualitative des extraits des plantes étudiés

Pdv: poudre végétal; *ME*: méthanol-eau; *CPT*: composés phénoliques totaux; *CFT*: composés flavonoïdes totaux; *CAT*: composés anthocyanines totaux; *AAO*: activité antioxydant; *EA*: extrait aqueux; *UV-spectro*: spectrophotomètre UV, *RP-HPLC*: chromatographie liquide haute performance à phase reverse.

Préparation des extraits:

2 g de la matière végétale sont dissous dans 2×20 ml d'une solution de méthanol 50% (v/v). Le mélange est mis en agitation pendant 6 heures, puis filtré. L'extrait recueilli est centrifugé ($1536 \times g$) pendant 20 minutes, le filtrat obtenu est gardé au frais ($+4$ °C) en attente d'être analysé.

Pour les exsudats, en moyenne 60 mg des extraits sont dissous dans 2 ml d'une solution hydro-méthanolique (50/50 v/v ml), le mélange est secoué d'une manière intermittente pendant 30 minutes puis filtré. Le filtrat obtenu est utilisé pour les dosages quantitatifs (Spectroscopie UV-visble) et les analyses quantitatives et qualitatives par HPLC.

- *Dosage des composés polyphénoliques totaux (PPT)*

Le réactif utilisé est le réactif de «Folin-Ciocalteu»; c'est un mélange de complexes des acides phosphotungstène ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdène ($H_3PMO_{12}O_{40}$) de couleur jaune.

Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif, elle entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu qui absorbe à 725 nm, le dosage de PPT est effectué par la comparaison de la D.O observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue.

Les composés phénoliques totaux sont dosés de la manière suivante, 0,1 ml de l'extrait de plante est introduit dans un tube Eppendorff de 2 ml, l'extrait est ensuite dilué avec 0,9 ml d'eau distillée ensuite 0,9 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (1N) est ajouté puis immédiatement après il est ajouté 0,2 ml d'une solution de Na_2CO_3 (20%). Le mélange obtenu est incubé à la température ambiante pendant environ 40 minutes à l'abri de la lumière. L'absorbance est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 725 nm contre une solution de méthanol utilisé comme blanc. Notons qu'une droite d'étalonnage est préalablement réalisée avant l'analyse avec de l'acide gallique dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (E GA/g Ms).

- *Dosage des flavonoïdes totaux (FVT)*

Les réactifs utilisés sont: les solutions incolores de nitrite de sodium ($NaNO_2$, 5%) et de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$, 10%). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par ces réactifs, elle entraîne la formation d'un complexe brunâtre qui absorbe à 510 nm. La comparaison de la D.O observée à celle obtenue par un étalon de catéchine de concentration connue permet d'évaluer la teneur totale en flavonoïdes.

Les flavonoïdes totaux sont évalués par colorimétrie, dans un ballon de 10 ml sont introduits successivement 250 μ l de l'extrait et 1 ml d'eau distillée. Au temps initial (0 minute) sont ajoutés 75 μ l d'une solution de $NaNO_2$ (5%), après 5 minutes 75 μ l de $AlCl_3$ (10 %) sont ajoutés. Et à 6 minutes, 500 μ l de $NaOH$ (1N) sont ajoutés et 2,5 ml d'eau distillée sont ajoutés successivement au mélange.

Une courbe d'étalonnage est élaborée avec des solutions standards de catéchine préparées à de concentrations différentes. L'absorbance du mélange obtenue est directement mesurée au spectrophotomètre UV-visible à 510 nm et les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine/ gr de matière sèche (EC/g Ms).

- Dosage des anthocyanines totaux (ATT)

Les composés anthocyaniques totaux ont été évalués par colorimétrie en utilisant un spectrophotomètre UV-visible. La méthode utilisée est basée sur une différentiation des absorbances en utilisant deux tampons; KCl à pH 1,0 (0,025M) (1) et CH₃COONa à pH 4,5 (0,4M) (2).

Pour cela 400 µl de l'extrait sont mélangés à 3,6 ml du tampon (1) ensuite 400 µl autre, au tampon (2). Les solutions sont incubées pendant 30 minutes à l'abri de la lumière et les absorbances sont ensuite successivement mesurées à 510 et 700 nm. La variation des absorbance est calculée par la formule suivante:

$$\Delta A = (A_{510} - A_{700})_{pH1,0} - (A_{510} - A_{700})_{pH4,0}$$

La concentration de pigment d'anthocyanine dans l'extrait est exprimée en mg d'équivalent cyanidine glucosyl-3 par litre de solution ou en mg d'équivalent cyanidine glucosyl-3/ g de matière sèche (Cg/ g dM).

$$D'où Cg (mg/ l) = \Delta A \times Mm \times Df \times 1000 / (Ma)$$

Avec ΔA : variation des absorbances, Mm: masse moléculaire (449,2); Df: facteur de dilution; Ma: absorptivité moléculaire (26900).

- Dosage des tanins condensés

Principe : En milieu acide, les tanins condensés réagissent avec la vanilline et entraînent une coloration verte de la solution.

Réactifs :

- solution (A) : échantillon + MeOH-HCl (1%)
- solution (B) : «réactif de vanilline»: [0,5 g vanilline + 200 ml (MeOH-HCl (4%))]
- solution de référence (C) : MeOH-HCl (4%).

Dosage : Elle est basé sur la comparaison de la DO (500 nm) du mélange (échantillon + réactif de vanilline) [(A) + (B)] /comparée à celle de (échantillon + solution référence) [(A) +(C)], contre une courbe d'étalonnage de catéchine (DO/concentration catéchine).

Pour évaluer ces tanins condensés, 2 g de la poudre de la matière végétale ont été lixiviées au n-hexane. Le résidu obtenu est séché à température ambiante. Ensuite 0,5 g de ce résidu obtenu est placée dans un tube à essai dans le quel sont ajoutés 15 ml d'une solution MeOH-HCl (1%).

Le tube est vortexé puis placé dans un bain marie à 35 °C pendant 20 minutes sous agitation intermittente toute les 5 minutes. Après incubation, le tube est centrifugé à 1532 x g puis filtrer. 100 µl du filtrat sont prélevés et placés dans 2 tubes à essai. Dans le premier, on ajoute 5 ml du réactif à la vanilline (0,5 g vanilline + 200 ml (MeOH-HCl 4%). Et dans le second on ajoute 5 ml de la solution MeOH-HCl 4% uniquement.

Les tubes sont de nouveau incubés à 35 °C pendant 20 minutes avant de lire l'absorbance sous UV-visible à 500 nm. Une courbe d'étalonnage établit à partir des solutions des différentes concentrations des catéchines permet d'exprimer la concentration des tanins condensés en mg équivalent catéchine/ g de matière sèche (ECT/ g).

III.3.1.3.3. Résultats

III.3.1.3.3.1. Courbes d'étalonnages des dosages des PPT, FVT, ATT et TC

- *Courbe d'étalonnage pour le dosage de polyphénols totaux (PPT)*

Cette courbe est établie en utilisant l'acide gallique comme référence et les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mgEGa/ gMs). La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,98$ (figure 8).

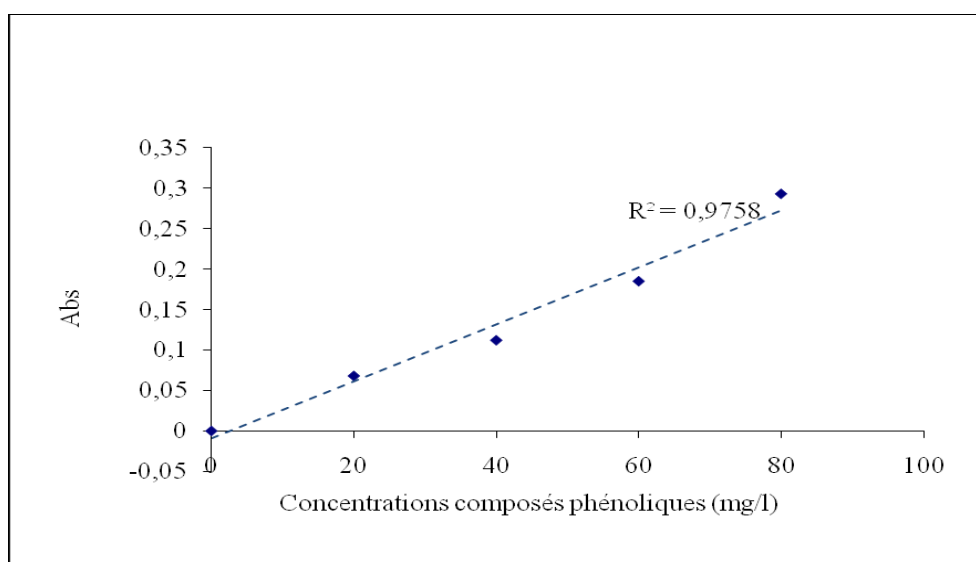


Figure 8: Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux

- Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux (FVT)

Le composé de référence utilisé pour l'établissement de cette courbe est la catéchine. La courbe est établie avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,99$ (figure 9). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mgECT/g Ms).

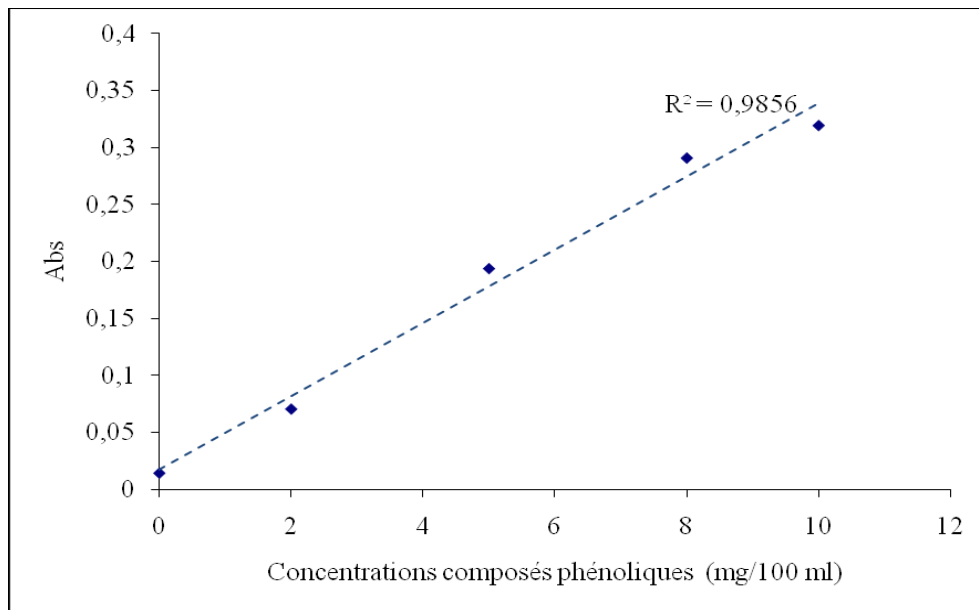


Figure 9: Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux

- Courbe d'étalonnage pour le dosage des anthocyanines totaux (ATT)

Le composé de référence utilisé pour l'établissement de cette courbe est le cyanidine 3-glucosé. Les courbes sont établies à 510 et 700 nm avec $R^2 = 0,88$ et 1 respectivement (figures 12 et 13). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent cyanidine-3 glucosé par gramme de matière sèche (mg ECg/ gMs).

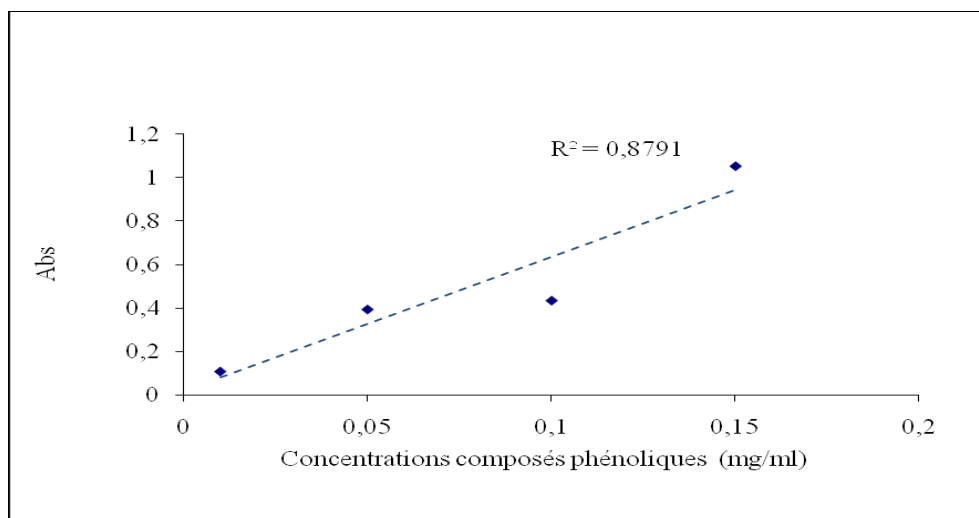


Figure 10: Courbe d'étalonnage pour le dosage des anthocyanines totaux (510 nm)

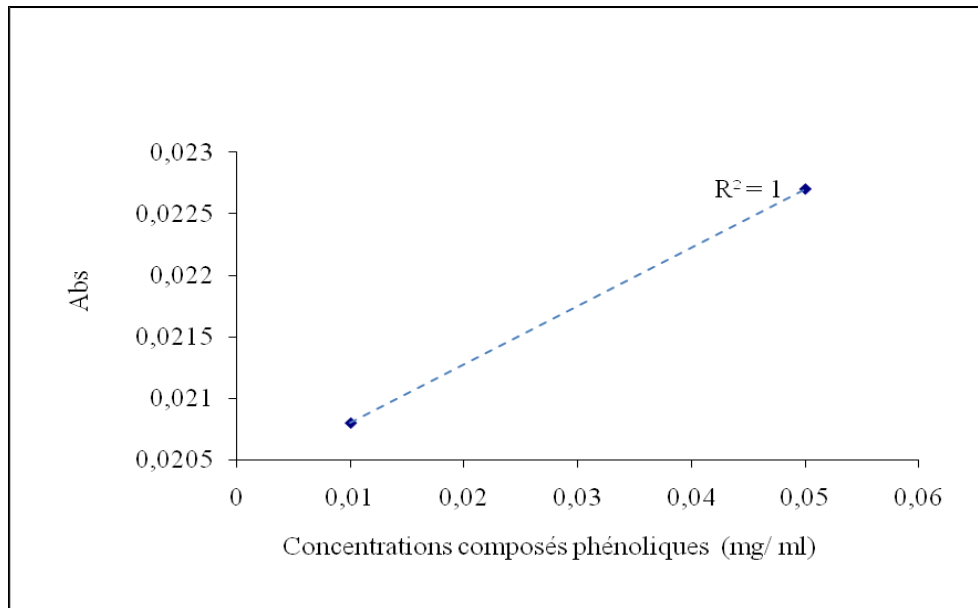


Figure 11: Courbe d'étalonnage pour le dosage des anthocyanines totaux (700 nm)

- Courbe d'étalonnage pour le dosage de tanins condensés (CT)

La courbe est établie en utilisant la catéchine référence et les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mgEGa/ gMs). La courbe d'étalonnage établie avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,88$ (figure 14).

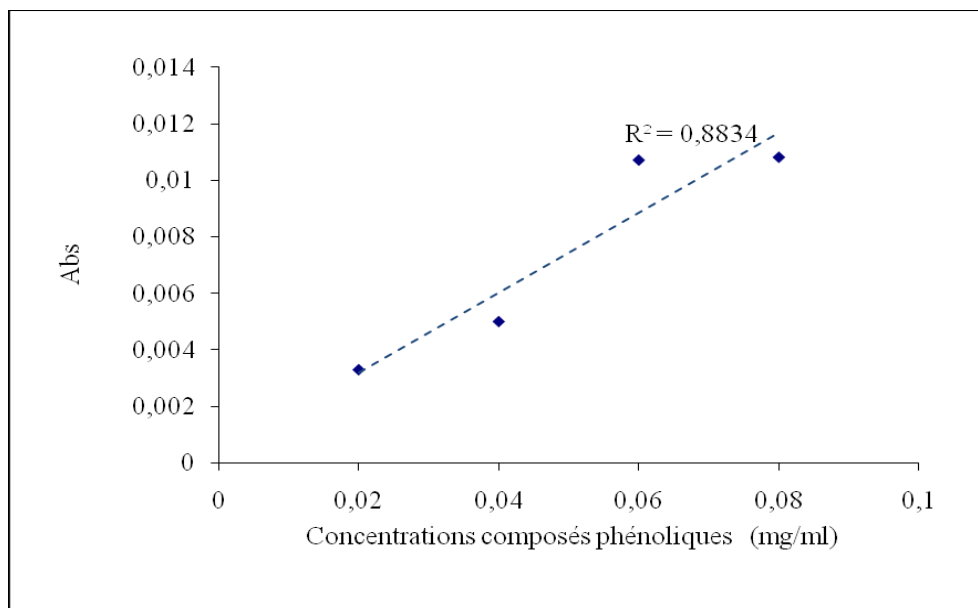


Figure 12: Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins condensés

III.3.1.3.3.2. Analyses des extraits

- Extraits de *D. oliveri*

Les résultats des analyses quantitatives par spectrophotomètre UV-visible des extraits de parties *D. oliveri* étudiées sont représentés ci-dessous (figure 13). Dans cette composition nous constatons que les écorces des troncs et les feuilles sont quantitativement plus riches en composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes et anthocyanines totaux) que les écorces de racines.

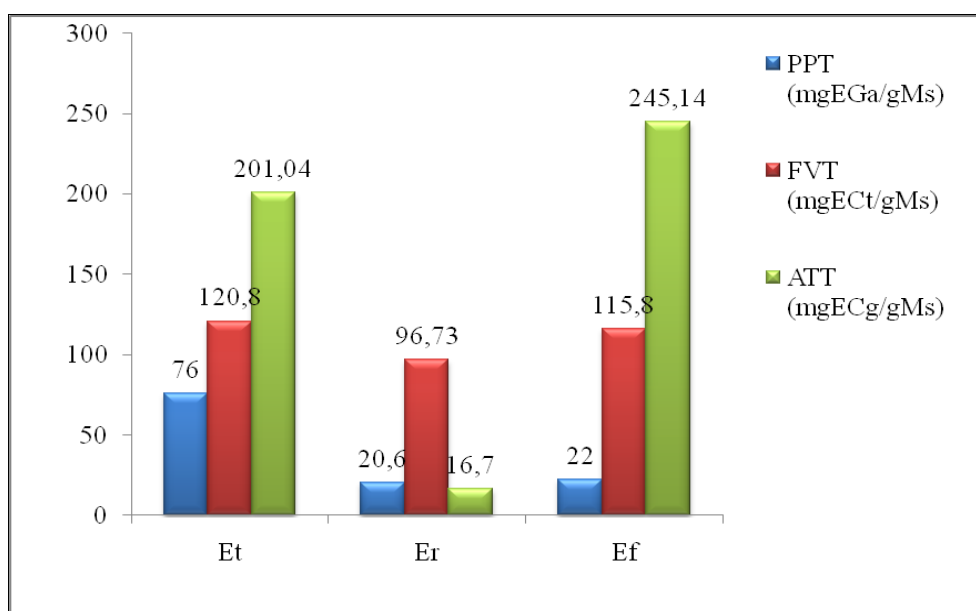


Figure 13: Composition phénolique des extraits de *D. oliveri*

E_t: Extrait écorces de troncs; *E_r*: extrait écorces de racines; *E_f*: Extrait des feuilles; PPT: polyphénols totaux; FVT: flavonoïdes totaux; ATT: anthocyanines totaux

- Extraits des feuilles de *D. adscendens*

Les résultats des analyses quantitatives en composés phénoliques des extraits des feuilles de *D. adscendens* sont reportés dans la figure 14. Ces résultats nous indiquent que les extraits des feuilles de *D. adscendens* étudiés sont majoritairement constitués des flavonoïdes et des polyphénols totaux. Sa composition en tanins condensés et en anthocyanines est très faible (FVT > PPT > TC > ATT).

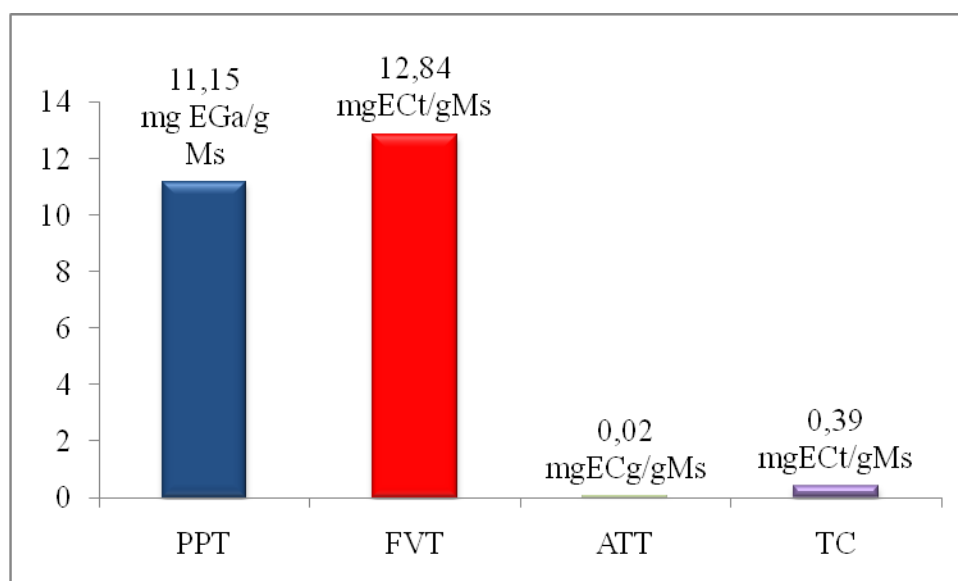


Figure 14: Composition quantitative en composés phénoliques des extraits des feuilles de *D. adscendens*

- **Extraits des *F. capensis***

La figure 15 montre la composition quantitative des composés phénoliques des extraits de *Ficus capensis* analysés. L'analyse de ces résultats montre que les extraits des écorces de troncs sont les plus riches en composés phénoliques (anthocyanines, flavonoïdes et polyphénols). Les extraits d'écorces de racines et les extraits de feuilles sont relativement pauvres en composés phénoliques.

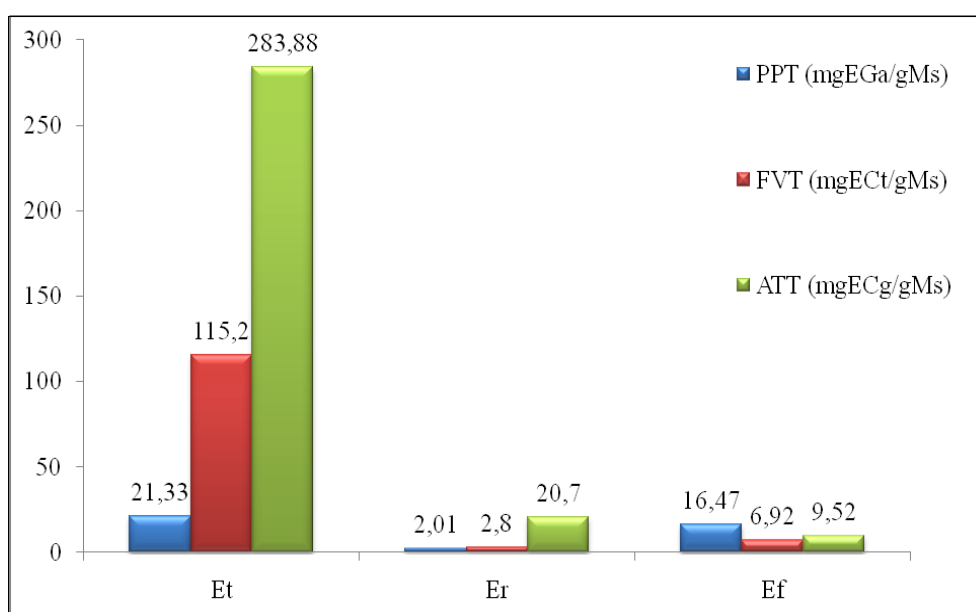


Figure 15: Composition quantitative en composés phénoliques des extraits de *F. capensis*

- Extraits des écorces des racines du *S. longependiculata*

Dans la figure 16, nous avons repris la composition quantitative des composés phénoliques contenus dans les extraits de racines de *S. longependiculata* analysées. De cette composition, nous constatons que les extraits de racines de *S. longependiculata* sont plus riches en composés polyphénols totaux tandis que son contenu en anthocyanines et tannins condensés est très faible. La quantité de polyphénols totaux est deux fois plus grande que celle de flavonoïdes.

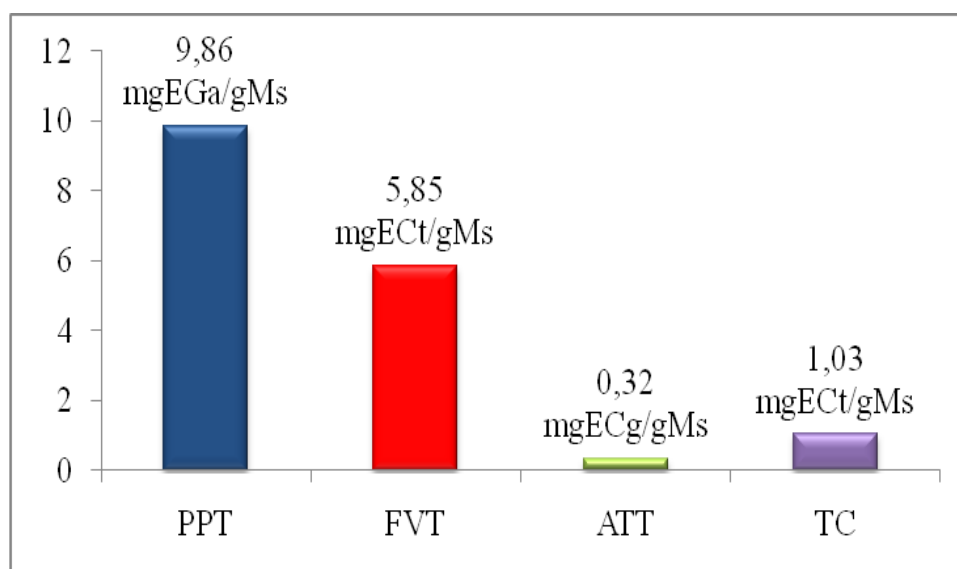


Figure 16: Composition en composés phénoliques des extraits des écorces des racines de *S. longependiculata*.

- Extraits des feuilles du *S. rebaudiana*

Dans la figure 17 est reprise la composition quantitative des composés phénoliques contenus dans les extraits des feuilles de *S. rebaudiana* extraits aqueux (Ee), méthanol-eau (MEe) et les huiles essentielles (He) analysées.

Dans cette composition nous constatons que les extraits MEE sont les plus riches en composés phénoliques surtout en polyphénols totaux et que les He n'en contiennent presque pas.

Les extraits MEE sont plus riches en polyphénols et flavonoïdes totaux que les extraits aqueux (Ee).

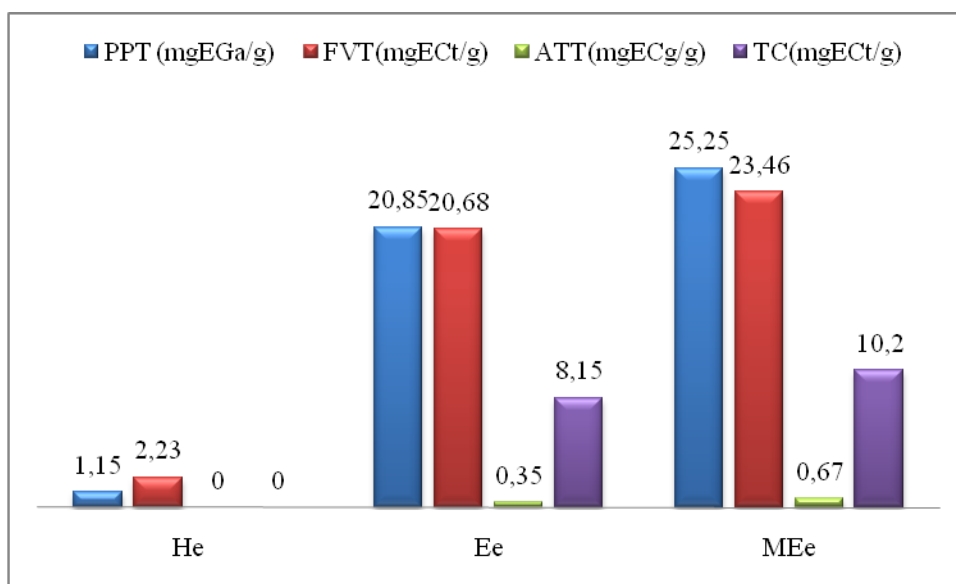


Figure 17: Composition en composés phénoliques des extraits des feuilles de *S. rebaudiana*
He: huile essentielle; *Ee*: extrait eau; *MEe*: Extrait méthanol- eau; *PPT*: polyphénols totaux; *FVT*: flavonoïdes totaux; *ATT*: anthocyanines totaux; *TC*: tanins condensés

- **Extraits de *V. doniana***

La figure 18 montre les résultats de la composition en composés phénoliques totaux des extraits de *V. doniana* analysés par spectroscopie UV-visible. En analysant ces résultats, nous remarquons que l'ensemble des extraits est riche en anthocyanines totaux, pour 100 g de matières sèches la quantité de composés phénoliques varie d'une manière décroissante des extraits de feuilles aux extraits des écorces de troncs (extraits de feuilles > extraits des écorces de racines > extraits des écorces de troncs).

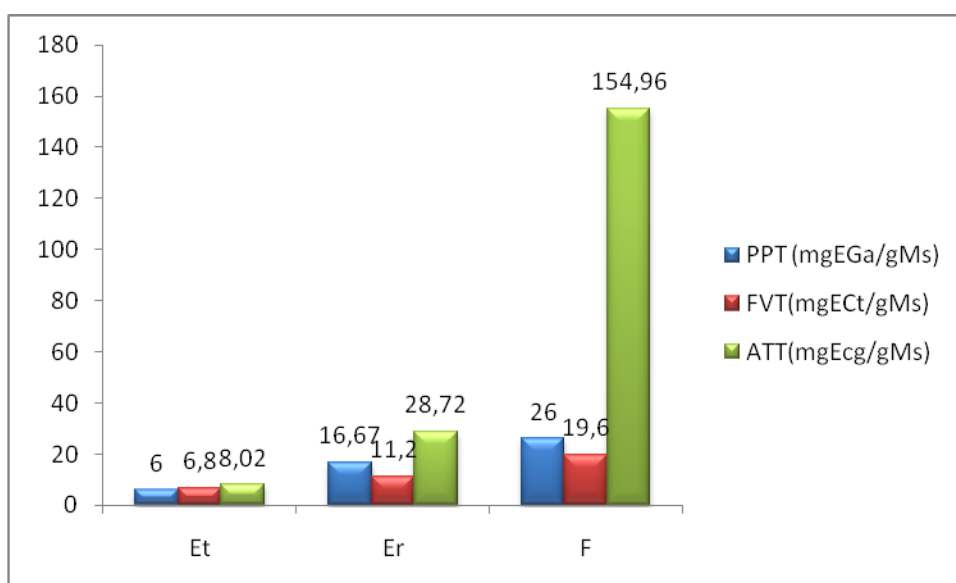


Figure 18: Composition en composés phénoliques des extraits des feuilles de *V. doniana*

- Extraits des exsudats de *Miscanthus X giganteus*

Deux extraits ont été recueilli E1 (20 mg), E2 (60 mg). Compte tenu de la disponibilité des échantillons, les analyses quantitatives ont été réalisés sur l'extrait E2, seuls les PPT et les FVT ont été évalués (figure 19).

A travers ces résultats nous constatons que ces extraits sont majoritairement composés de polyphénols totaux et ne contiennent presque pas de flavonoïdes.

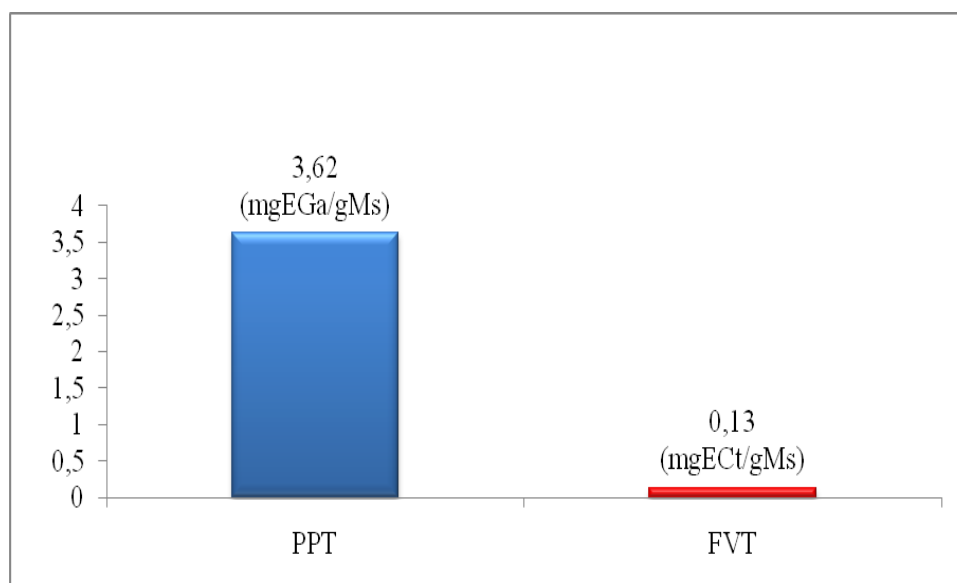


Figure 19: Compositions phénoliques des extraits des exsudats des racines de *Miscanthus X giganteus*

III.3.1.4. Techniques chromatographiques

La chromatographie est une technique d'analyse qualitative et quantitative de la chimie analytique dans laquelle l'échantillon contenant un ou plusieurs composés est adsorbé sur une phase stationnaire (papier, gélatine, silice, polymère, silice greffée), puis est désorbé par une phase mobile (liquide, gaz ou fluide supercritique). Les différents composés de l'échantillon sont séparés en fonction de leurs vitesses d'adsorption-désorption.

III.3.1.4.1. La chromatographie CCM

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique de chromatographie en phase liquide. Pour effectuer la séparation, une petite quantité de la solution à analyser est déposée sur le bord d'une plaque CCM.

La plaque est ensuite trempée dans un éluant contenu dans une cuve fermée. L'éluant migre par capillarité, il rencontre l'échantillon et l'entraîne.

Les différentes substances constituant l'échantillon migrent à différentes vitesses selon qu'elles interagissent plus ou moins fortement.

Pour séparer des mélanges complexes de substances similaires, il peut être utile d'employer la chromatographie à deux dimensions. Celle-ci s'effectue en deux étapes entre lesquelles on change de solvant et on tourne la plaque de 90°.

Les substances peuvent être identifiées en calculant la valeur R_f qui peut être comparée à celle de la littérature ou à celles des étalons.

Cette valeur correspond à: $R_f = (\text{distance parcourue par l'échantillon}) / (\text{distance parcourue par le front solvant})$.

Les composés phénoliques ont été extraits de la manière suivante : 4 g d'organes végétaux (feuilles, écorces de racines et de troncs), ont été extraits au méthanol (20 ml) jusqu'à épuisement, les pigments ont été préalablement éliminés par de l'éther de pétrole. L'extrait final a été évaporé à sec sous vide et repris avec (5ml) d'une solution aqueuse du méthanol-eau (50/50).

Les substances ont été séparées et identifiées dans les différents systèmes d'élutions suivant en fonction de la polarité des composés à séparer:

Système (1) B E (butanol, éthanol) la proportion du mélange est de 4/ 2 (V/V)

Système (2) B A (butanol, acide acétique) la proportion est de 4/ 1(V/V)

Système (3) A A (acide acétique à 2%).

La CCM a été conduite sur de plaques de silice en verre 60 F-254 (Merck, Darmstadt, Allemagne). Les réactifs I (vanilline + HCl concentré) et II (Chlorure d'aluminium (AlCl_3) (5%)), ont été utilisés pour la révélation et l'identification des différents composés.

III.3.1.4.2. Chromatographie liquide de haute performance (HPLC)

La HPLC est un moyen très flexible et simple d'isoler et d'identifier les différents composés d'un mélange.

La HPLC et la CPG peuvent être assez largement décrites par des théories communes. Dans les deux cas, un fluide appelé phase mobile traverse une colonne qui contient une phase solide (silices, silices fondues, silice greffées).

A l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il est entraîné par la phase mobile. Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange ayant des temps de rétentions différents sont séparés par élution. Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme.

Appareillage

Les différentes parties constituant l'HPLC sont décrites ci-dessous:

a) Pompe : une pompe est alimentée à partir des plusieurs flacons contenant des solvants de polarités différentes permet d'effectuer une programmation des solvants pour assurer un système de gradient.

- En mode isocratique: 100% d'un mélange du même éluant tout au long de l'analyse,

- En mode gradient, la concentration des constituants du mélange d'éluant varie en fonction du temps.

b) Injecteur : c'est une vanne d'injection qui porte une boucle d'échantillonnage (schéma16).

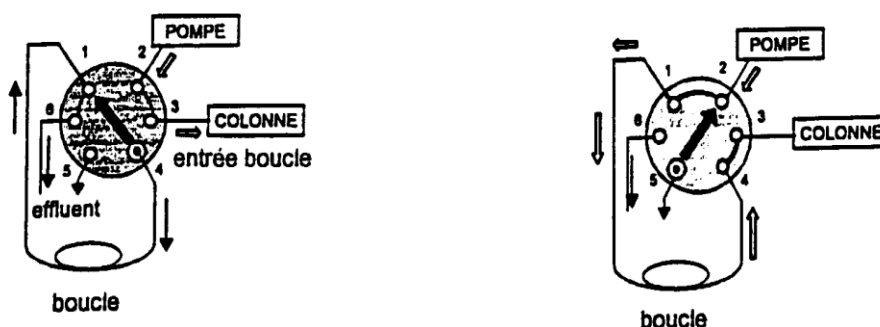


Schéma 16: Les deux phases de l'injection avec une boucle

c) Colonne : elle contient la phase stationnaire qui définit le type de chromatographie, soit en phase normale soit en phase inverse.

❖ La phase normale :

Dans le cas d'une chromatographie en phase normale, la silice est greffée par des groupements polaires et l'éluant utilisé est apolaire.

❖ La phase inverse :

Dans le cas de la phase inverse, la silice est greffée par des chaînes carbonées linaires (C8, C18 et l'éluant utilisé est polaire (ACN (acétonitrile), MeOH, H₂O).

d) Détecteur : un détecteur UV-visible à longueur d'onde variable (190-400 nm) qui permet de détecter les différents composés contenu dans l'échantillon à analyser. Notons qu'il est important que les produits à détecter portent un chromophore qui absorbe dans cette plage de longueur d'onde. Le principe de fonctionnement de l'HPLC est schématisé ci-dessous (schéma 17).

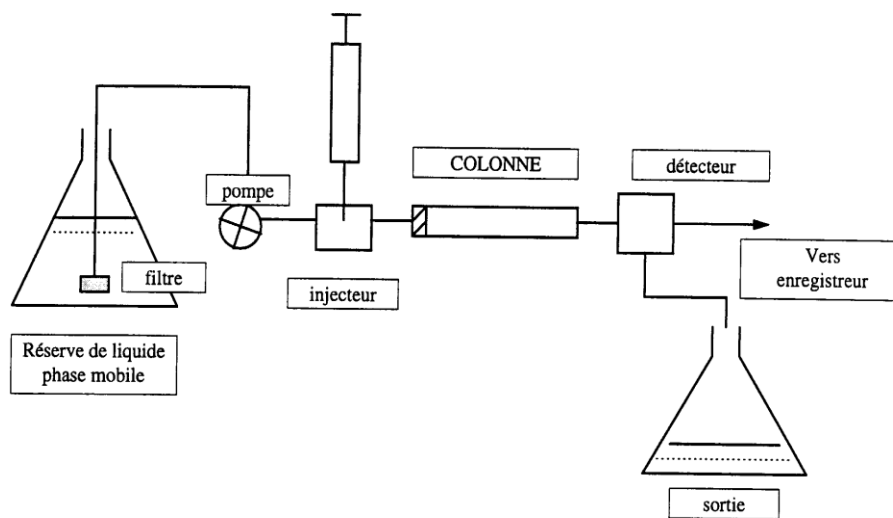


Schéma 17 : Principe de fonctionnement de l'HPLC

Dans notre étude HPLC en mode phase inverse, nous avons réussi à réaliser une analyse qualitative et quantitative des composés polyphénoliques se trouvant dans nos différents extraits.

a) Extraction des composés phénoliques (HPLC)

Pour l'extraction des composés phénoliques : deux différentes méthodes ont été utilisées.

- 1^{ère} méthode :

A 5 g de la matière végétale (écorce de racines, de troncs ou feuilles) sont ajoutés 2 × 20 ml de l'acétate d'éthyle. Après 3 heures d'agitation permanente l'extrait est filtré, puis mélangé au sulfate de sodum anhydre (Na₂SO₄).

Travaux personnels

Le solvant d'extraction est évaporé sous vide à 40 °C. Ensuite le résidu obtenu est dissout dans 2 ml d'une solution aqueuse du méthanol (50%). Les étalons sont préparés par dissolution de 1 mg/ ml (m/v) (du méthanol 50%).

- 2^{ème} méthode :

A 2 g de la matière végétale (feuilles, écorce de racines ou de troncs) sont ajoutés 2 × 10 ml d'une solution aqueuse de méthanol 50%, le mélange est mis en agitation pendant 6 heures puis centrifugé (1536 x g) et filtré. Le filtrat obtenu est mis au frais (+ 4°C) jusqu'à l'utilisation. Avant l'analyse, le mélange obtenu est filtré à travers un filtre (PTFE) de 0,45 µm.

b) Gradient d'élution

Le gradient utilisé est constitué de 3 phases mobiles:

- Solvant A: composition (50 mM phosphate d'ammonium ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) à pH 2,6 ajusté avec l'acide orthophosphorique);
- Solvant B: composition 80: 20 (v/v) acétonitrile / solvant A;
- Solvant C: composition (200 mM d'acide ortho phosphorique (H_3PO_4) à pH 1,5 ajusté avec NaOH).

Les solvants sont filtrés sur papier Whatman N°3 puis mis dans un appareil à l'ultrason pendant 25 minutes. Le profil du gradient utilisé est donné dans le tableau 15.

Tableau 15: Profil du gradient d'analyse HPLC de composés phénoliques utilisés

Temps (minutes)	Nature des solvants et composition en %		
	A	B	C
0	100	0	0
4	92	8	0
10	0	14	86
22,5	0	16	84
27,5	0	25	75
50	0	80	20
55	100	0	0
60	100	0	0

Le débit d'élution est de 1 ml/ minute et la capacité de la boucle d'injection est de 20 µl. La détection a été réalisée à 280 et à 320 nm. Après chaque cycle, le système est reconditionné pendant 10 minutes avant une nouvelle analyse.

III.3.1.4.3. Résultats

III.3.1.4.3.1. Chromatogrammes des étalons

Les figures 20 et 21 nous donnent les chromatogrammes des mélanges des étalons utilisés (1 mg/ ml), les analyses sont faites à deux longueurs d'ondes différentes, 280 et 320 nm. L'identification et la quantification de composés phénoliques contenu dans les extraits se fait par comparaison du temps de rétention, des surfaces des étalons utilisés rapport à ceux obtenus en analysant les extraits. Les analyses ont été répétées 4 fois.

A. analyse à 280 nm

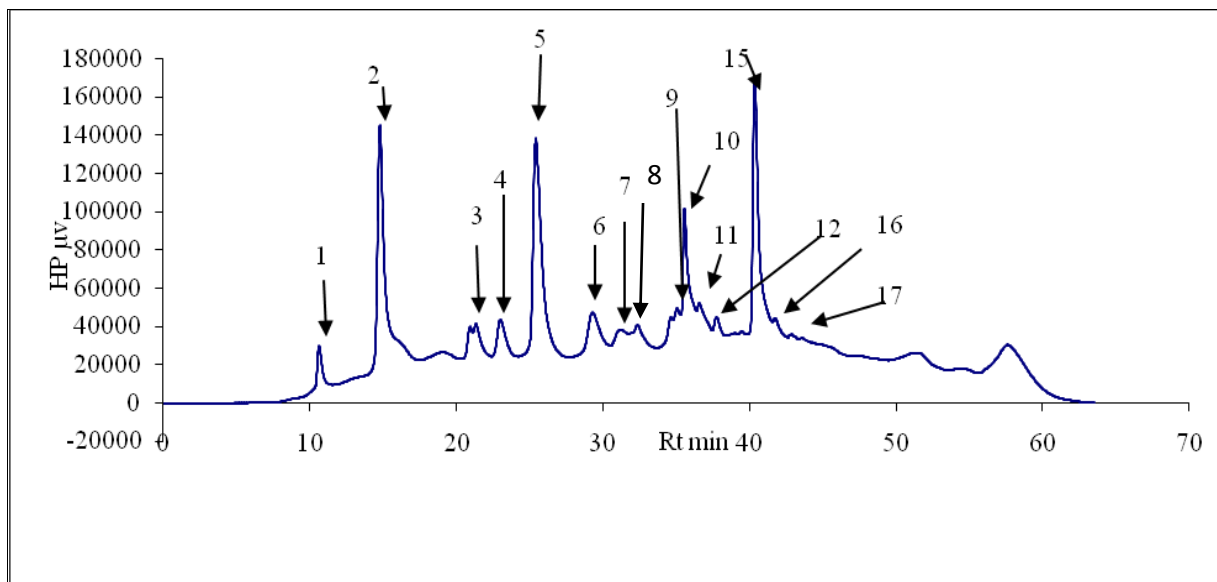


Figure 20: Profil du chromatogramme du mélange des étalons

1: Acide gallique; 2: acide protocatéchuique; 3: catéchine, 4: acide chlorogenique; 5: acide caféique; 6: épicatechine; 7: vitexine; 8: orientine; 9: acide p-coumarique; 10: homoorientine; 11: isovitexine; 12: rutine; 13: quercétine glucosé; 14: malvidine; 15: quercétine dihydraté; 16: acide cinnamique; 17: quercétine

B. Analyse à 320 nm.

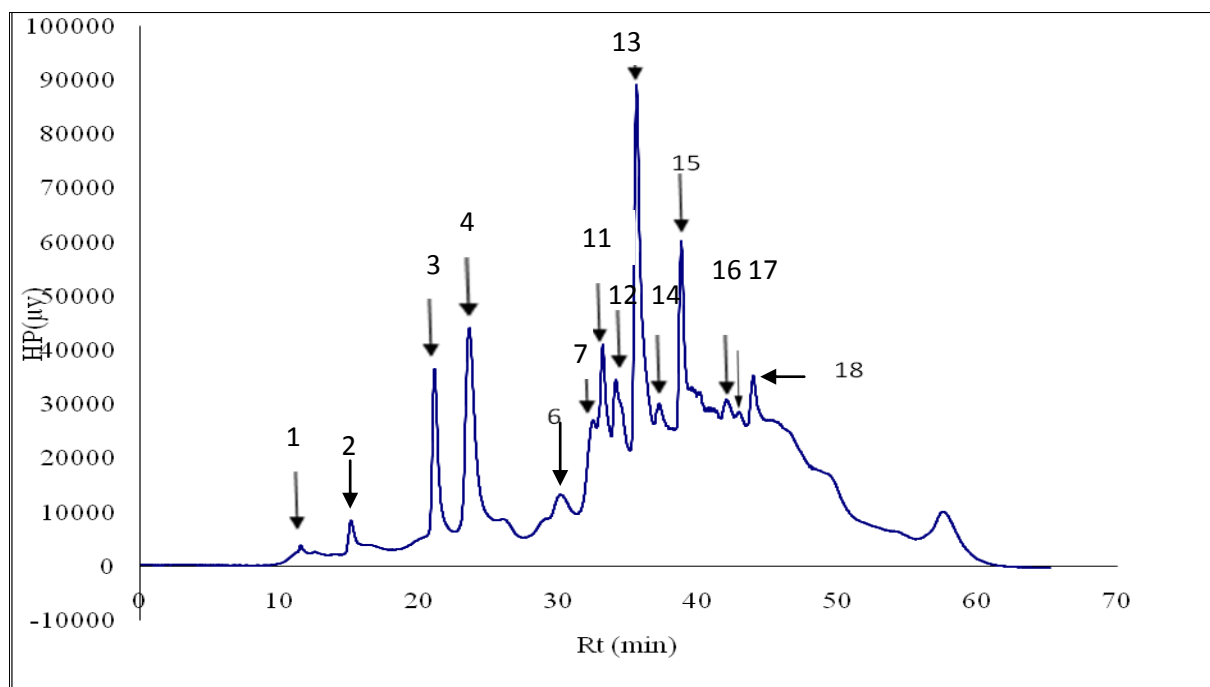


Figure 21: Profil du chromatogramme du mélange des étalons

1: Acide gallique; 2: acide protocatéchique; 3: catéchine, 4: acide chlorogénique; 6: épicatechine; 7: vitexine; 11: isovitexine; 12: rutine; 13: quercétine glucosé; 14: malvidine; 15: quercétine dihydraté; 16: acide cinnamique; 17: quercétine; 18: apigénine

III.3.1.4.3.2. Analyses HPLC des extraits

- **Extraits de *D. oliveri* (HPLC)**

Les profils chromatographiques de différents extraits de *D. oliveri* analysés sont représentés au niveau des figures 22, 23 et 24 tandis que les résultats des analyses qualitatives et quantitatives sont donnés dans le tableau 16. L'analyse de ces résultats montre que dans les extraits des troncs, l'acide caféique (2410 µg/ ml), l'homoorientine (784 µg/ ml) et l'acide chlorogénique (505 µg/ ml) sont majoritaires; dans les extraits des racines c'est l'acide *p*-coumarique (127,6 µg/ ml) et le quercétine glucosé (115,6 µg/ ml), tandis que l'homoorientine (894,9 µg/ ml) et l'acide gallique (29,25 µg/ ml) sont majoritaires dans les extraits des feuilles. Notons qu'au cours de nos analyses tous les composés n'ont pas été identifiés par manque des étalons adéquats.

❖ **Analyses des extraits des écorces de troncs de *D. oliveri***
1a. Analyse à λ 280 nm

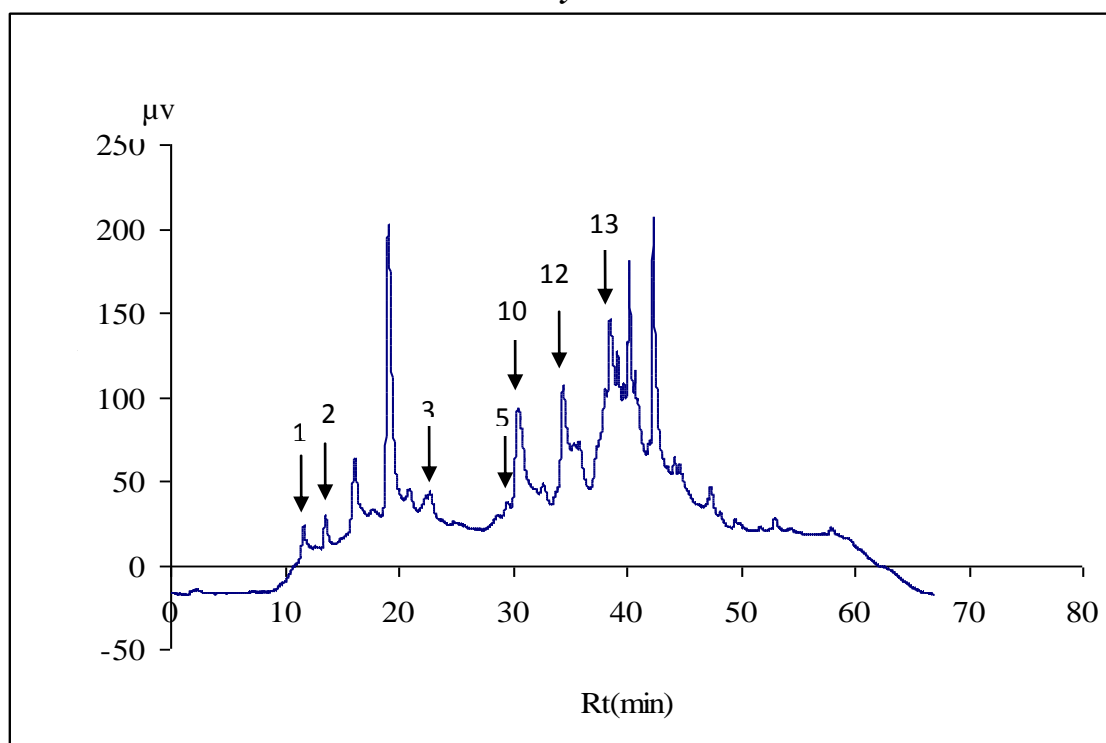


Figure 22a: Profil chromatographique de l'extrait des écorces des troncs de *D. oliveri*
 1: Acide gallique; 2: acide protocatéchuique; 3: catéchine; 5: acide caféique; 10: homoorientine; 12: rutine;
 13: quercétine glucosé

1b. Analyse à 320 nm

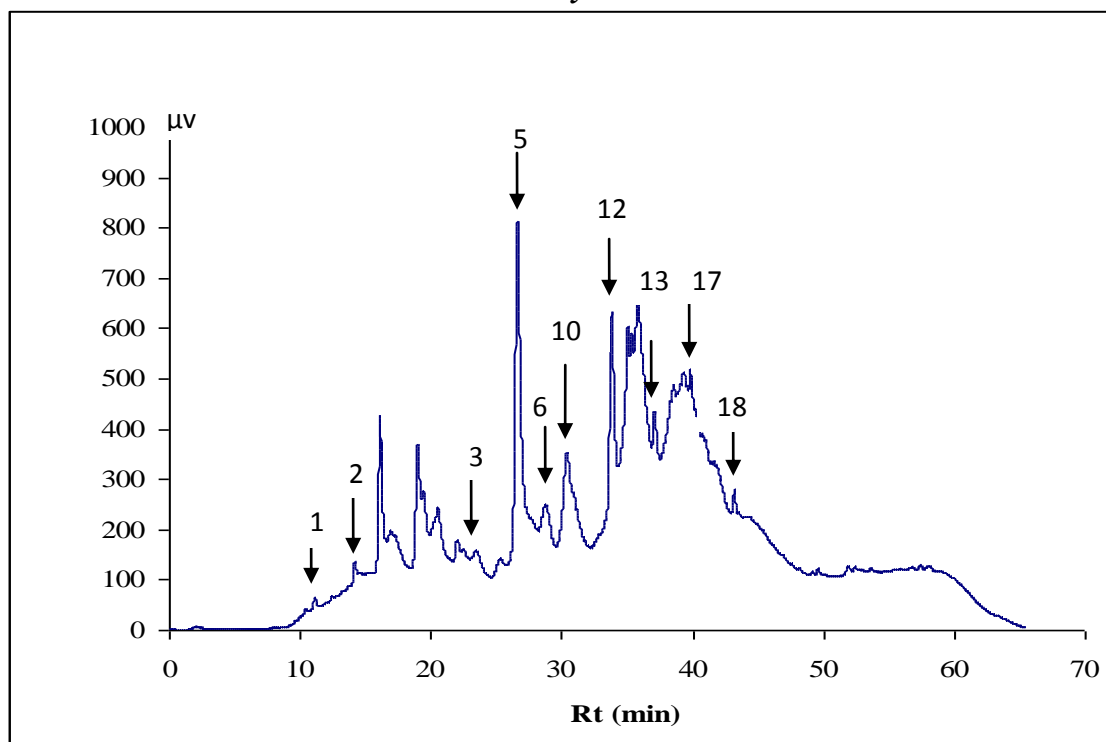


Figure 22b: Profil chromatographique de l'extrait des écorces des troncs de *D. oliveri*
 1: Acide gallique; 2: acide protocatéchuique; 3: catéchine; 5: acide caféique; 6: épicatechine; 10:
 homoorientine; 12: rutine; 13: quercétine glucosé; 17: quercétine; 18: apigénine

❖ Analyses des extraits des écorces des racines de *D. oliveri*

2a. Analyse à 280 nm

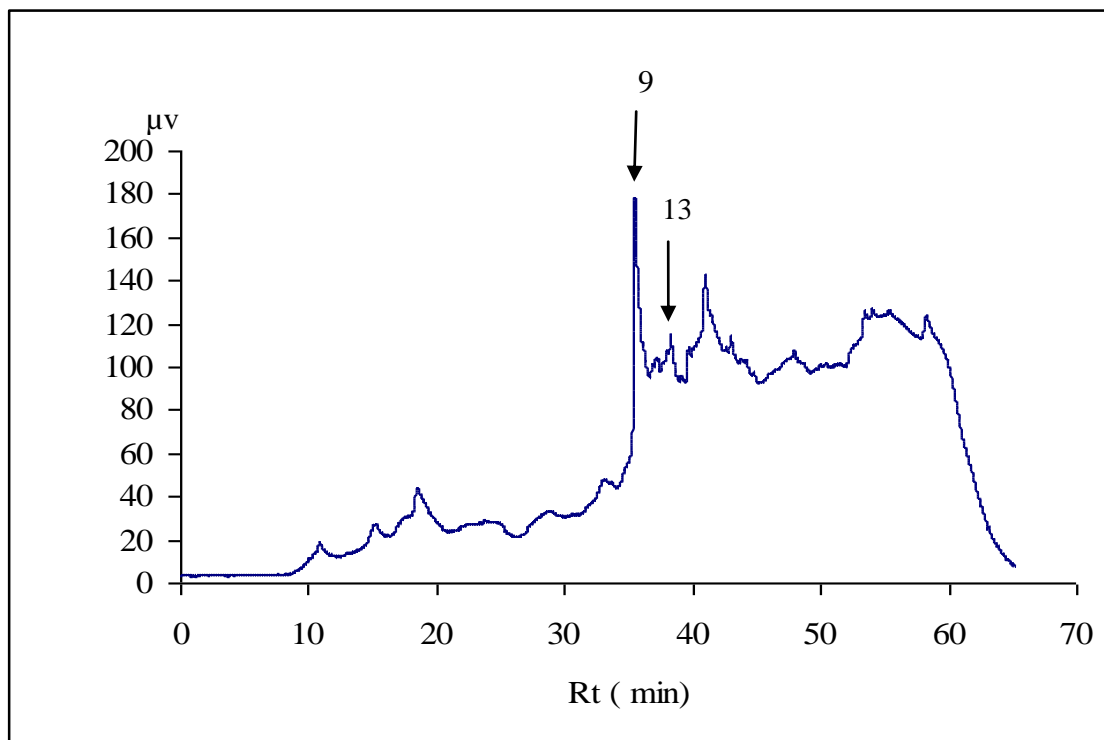


Figure 23a: Profil chromatographique de l'extrait des écorces des racines de *D. oliveri*
9: acide *p*-coumarique; 13: quercétine glucosé

2b. Analyse à 320 nm

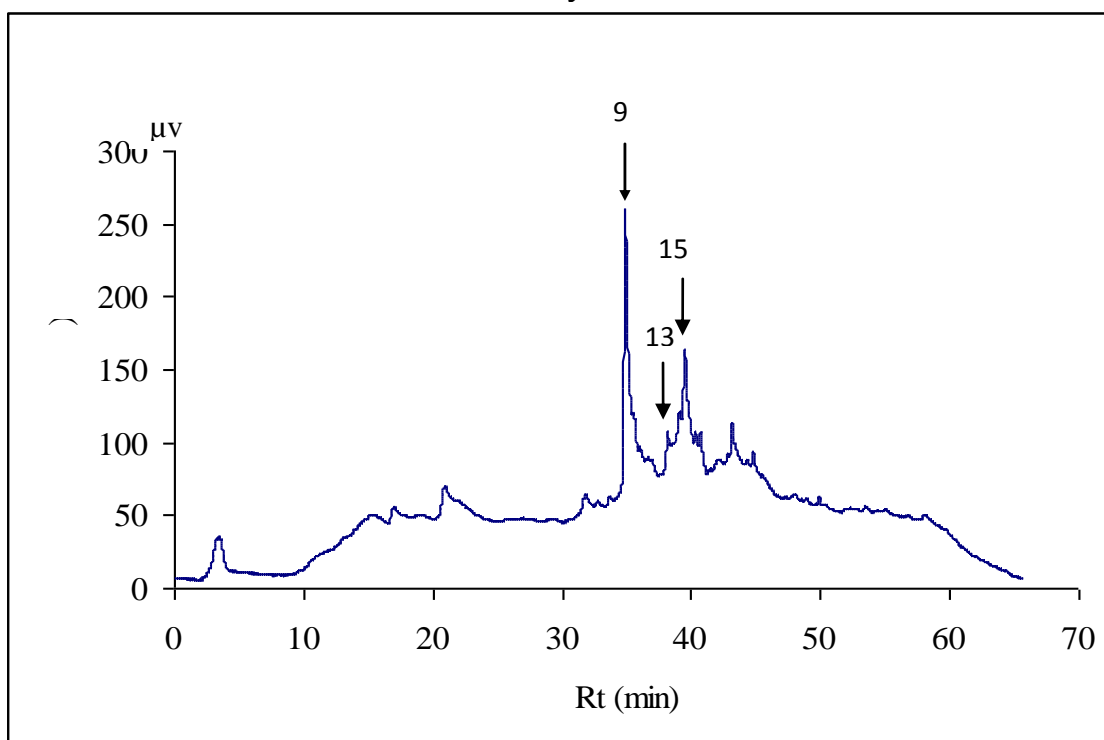


Figure 23b: Profil chromatographique de l'extrait des écorces des racines de *D. oliveri*
9: acide *p*-coumarique; 13: quercétine glucosé; 15: quercétine dihydrate.

❖ Analyses des extraits des feuilles de *D. oliveri*
3a. Analyse à 280 nm

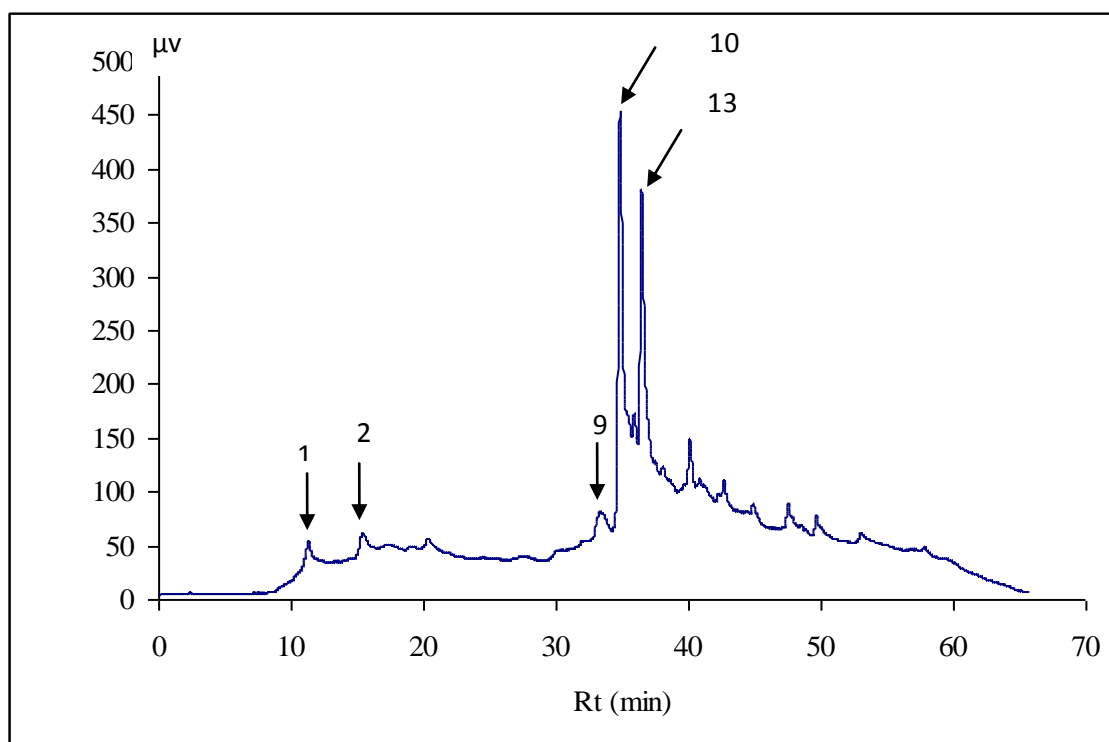


Figure 24a: Profil chromatographique de l'extrait des écorces des feuilles de *D. oliveri*
1: Acide gallique; 2: acide protocatéchuique; 9: acide p-coumarique; 10:homoorientine; 13: quercétine glucosé

3b. Analyse à 320 nm

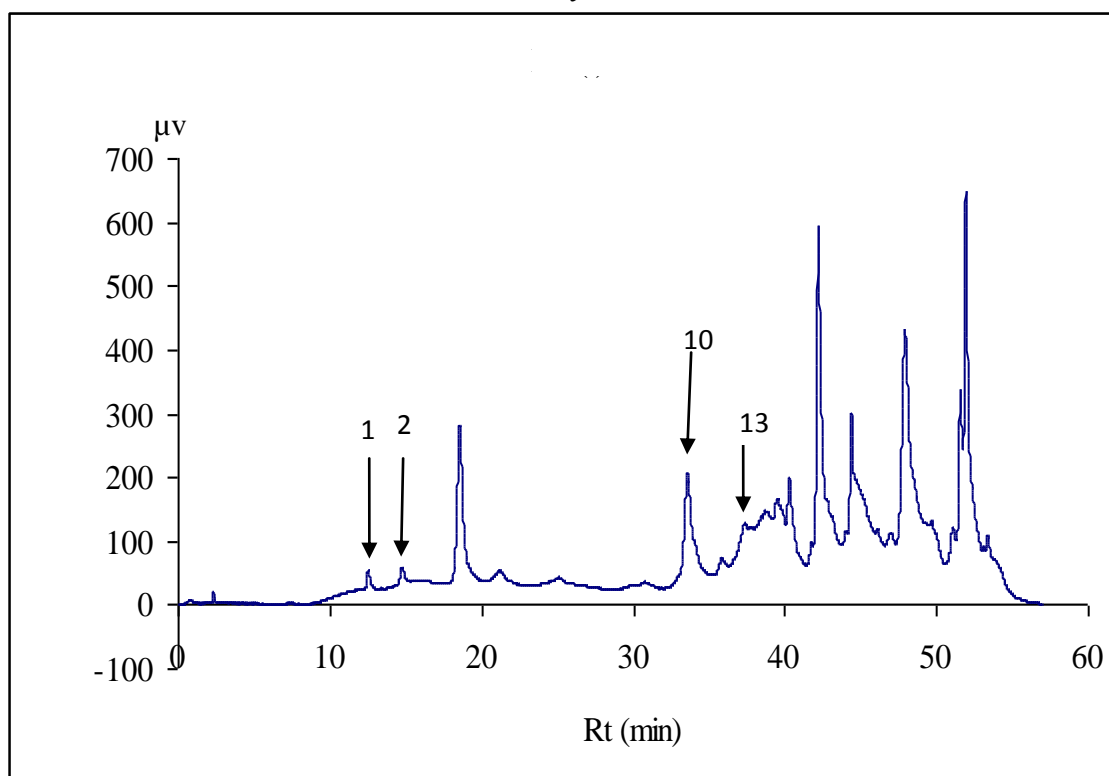


Figure 24b: Profil chromatographique de l'extrait des feuilles de *D. oliveri*
1: Acide gallique; 2: acide protocatéchuique; 10: homoorientine; 13: quercétine glucosé

Tableau 16: Composés phénoliques identifiés dans les extraits de *D. oliveri*

Nom du Composé	Rt (min)	Et (µg/ml)	Er (µg/ml)	F (µg/ml)
acide gallique	11,2	21,0 ± 1,5	12,0 ± 2	29,3 ± 0,3
acide protocatéchiuque	17,0	19,8 ± 0,2	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1
catéchine	25,0	28,1 ± 0,3	nd	4,1 ± 0,1
acide chlorogénique	26,5	505,2 ± 0,4	nd	1,1 ± 0,1
acide caféique	28,7	2410,4 ± 12	0,9 ± 0,1	13,6 ± 0,2
acide <i>p</i> -coumarique	33,5	322,4 ± 3,7	127,6 ± 2,1	18,9 ± 0,2
homoorientine	35,4	784,4 ± 4,9	6,2 ± 0,2	894,9 ± 4,5
orientine	36,4	nd	1,0 ± 0,1	nd
rutine	37,1	144,2 ± 2,4	1,0 ± 0,1	nd
quercétine-G	38,0	224,1 ± 0,7	115,6 ± 0,4	12,3 ± 0,2
quercétine-dH	39,3	5,0 ± 0,2	22,4 ± 0,1	nd
coumarine	40,4	1,9 ± 0,1	4,9 ± 0,1	29,2 ± 0,4
malvidine	42,0	nd	nd	nd
delphinidine	42,5	1,1 ± 0,1	nd	nd
quercétine	44,0	1,0 ± 0,1	5,0 ± 0,1	nd
acide ascorbique	56,5	2,5 ± 0,1	4,0 ± 0,1	nd

dH: dihydraté; *G*: glucosé, *nd*: non déterminé

- Extraits de feuilles du *D. adscendens* (HPLC)

Les profils chromatographiques des extraits (Ee et MEe) des feuilles de *D. adscendens* analysés sont représentés au niveau des figures 25 et 26. Les résultats des analyses qualitatives et quantitatives des composés phénoliques identifiés sont représentés dans le tableau 17. L'analyse de ces résultats montre que dans l'extrait MEe, le quercétine dihydrate (2,11 mg/ ml), l'acide cinnamique (0,76 mg/ ml) et la catéchine (0,69 mg/ ml) sont majoritaires tandis que dans l'extrait (Ee) c'est le quercétine glucosé (0,46 mg/ ml), la rutine (0,24 mg/ ml) et le quercétine dihydrate (0,17 mg/ ml) qui sont les plus représentatifs. D'autre part nous remarquons que l'acide gallique et l'acide protocatéchiuque sont mieux extraits dans l'extrait Ee que dans l'extrait MEe. Mais du point de vu quantitatif, l'extrait MEe est meilleur que l'extrait Ee.

❖ Extraits des aqueux des feuilles de *D. adscendens*

1a. Analyse à 280 nm

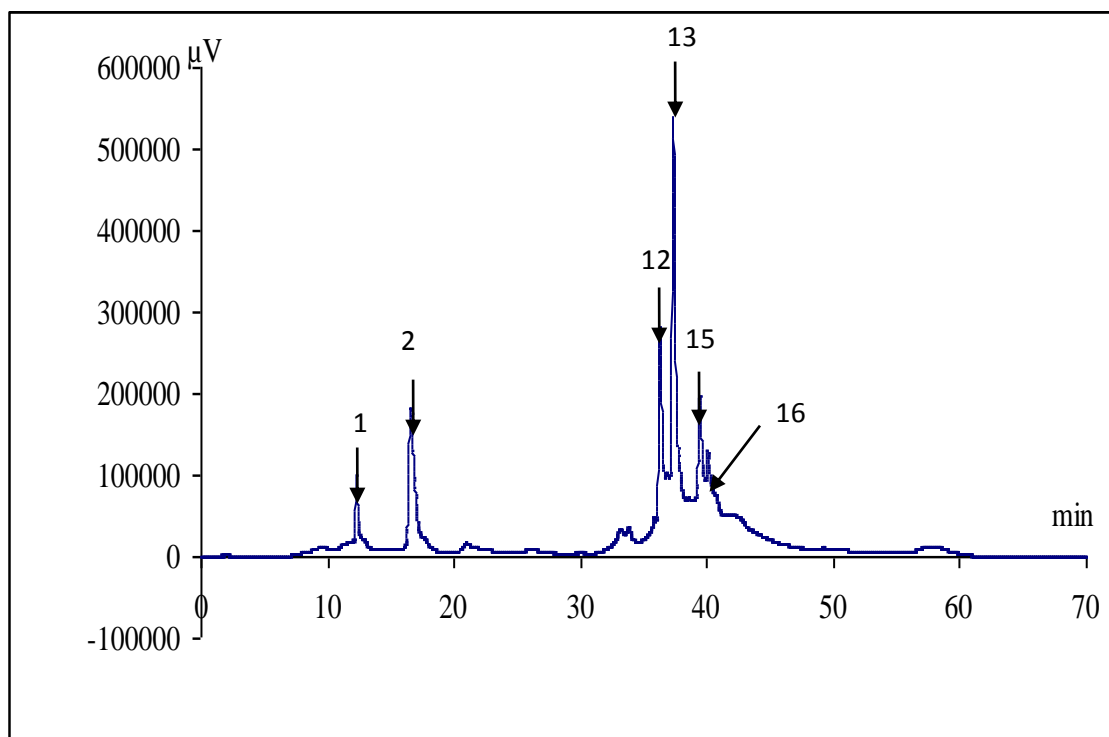


Figure 25a: Profil chromatographique de l'extrait des feuilles du *D. adscendens* (Ee)
1: Acide gallique; 2: acide protocatéchuique; 12: rutine; 13: quercétine glucosé; 15: quercétine dihydraté;
16: acide cinnamique; Ee: extrait-eau

1b. Analyse à 320 nm

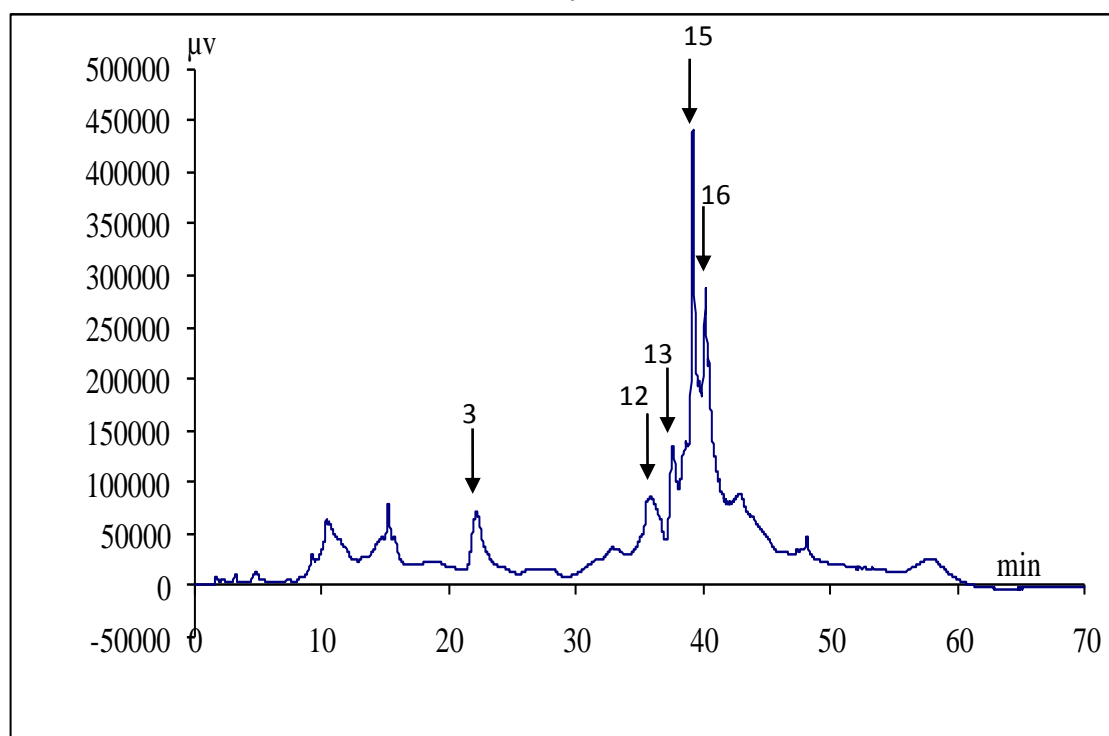


Figure 25b: Profil chromatographique de l'extrait des feuilles du *D. adscendens* (Ee)
3: catéchine; 12: rutine; 13: quercétine glucosé, 15: quercétine dihydraté; 16: acide cinnamique

❖ Extraits des hydrométhanoliques (MEe) des feuilles de *D. adscendens*

2a. Analyser à 280 nm

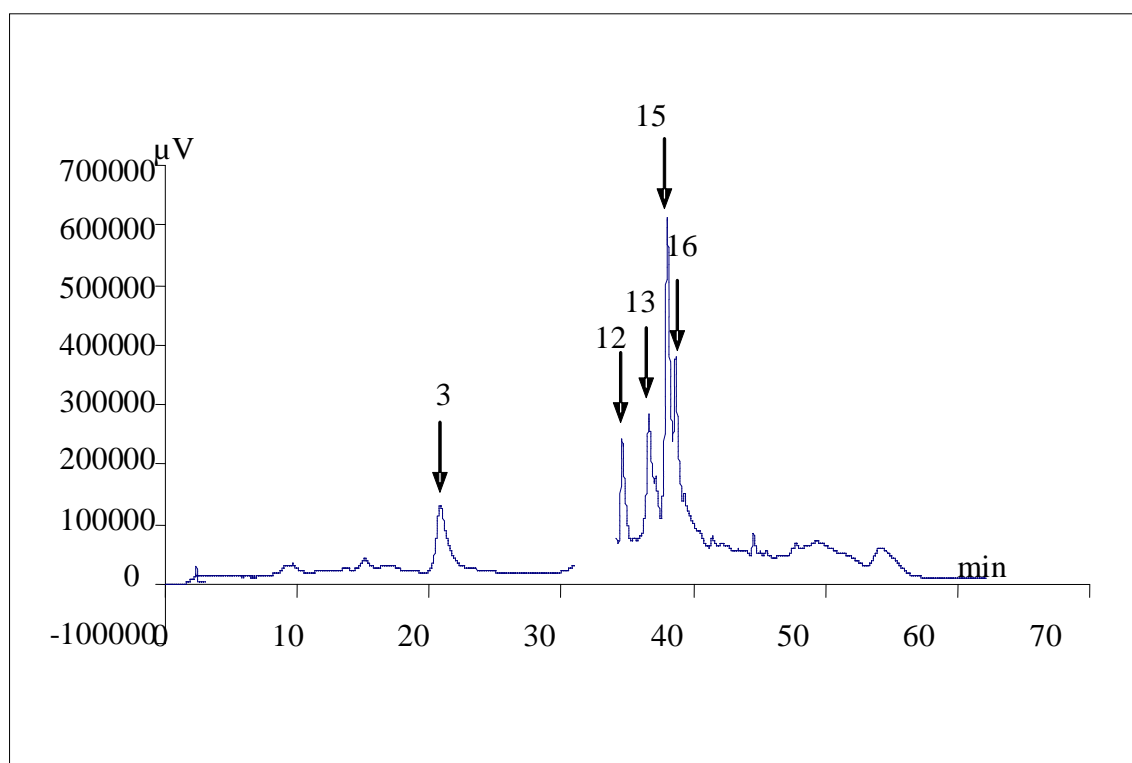


Figure 26a: Profil chromatographique de l'extrait MEe des feuilles du *D adscendens*
3: Catéchine; 12: rutine; 13: quercétine glucosé, 15: quercétine dihydraté, 16: acide cinnamique

2b. Analyse à 320 nm

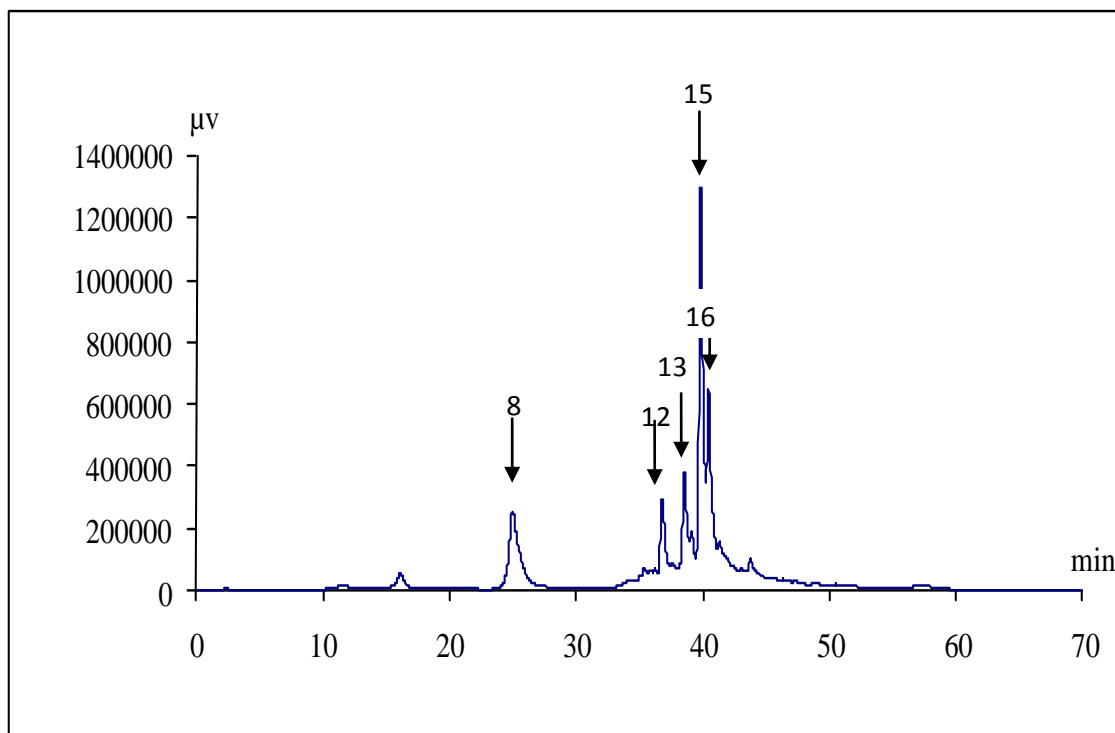


Figure 26b: Profil chromatographique de l'extrait MEe des feuilles du *D adscendens*
4: Acide chlorogénique; 12: rutine; 15: quercétine dihydraté; 16: acide cinnamique

Tableau 17: Concentration des composés phénoliques contenus dans les extraits d'eau (Ee) et du méthanol- eau (MEe)

Rt (min)	Ref.	Nom du composé	Ee (mg/ ml)	MEe (mg/ ml)
11,98 ± 0,22	1	acide gallique	0,12 ± 0,01	nd
14,78 ± 0,92	2	acide protocatéchiuque	0,11 ± 0,02	nd
23,96 ± 0,23	3	Catéchine	0,06 ± 0,04	0,69 ± 0,04
25,80 ± 0,23	4	acide chlorogénique	nd	0,23 ± 0,06
37,02 ± 0,36	12	Rutine	0,24 ± 0,01	0,28 ± 0,04
37,71 ± 0,18	13	quercétine glucosé	0,46 ± 0,03	0,17 ± 0,01
39,47 ± 0,19	15	quercétine dihydraté	0,17 ± 0,02	2,11 ± 0,16
41,68 ± 0,65	16	acide cinnamique	0,14 ± 0,01	0,76 ± 0,07

Ee: extrait eau; MEe: Extrait Méthanol-eau; Ref: référence; Rt: temps de rétention; n.d: non détecté

- Extraits de *Ficus capensis* (HPLC)

Les chromatogrammes correspondant au profil des analyses qualitatives et quantitatives des extraits des *F.capensis* sont repris dans les figures 27, 28 et 29. Tandis que les données correspondant à leurs évaluations quantitatives sont reprises dans le tableau 21. De ces résultats nous remarquons que l'ensemble des extraits contiennent suffisamment de l'acide *p*-coumarique (827,7 µg/ ml, 827,2 µg/ ml, 850 µg/ ml) respectivement pour les extraits Et, Er, et F.

L'acide gallique est beaucoup plus présent dans les écorces de troncs (1180 µg/ ml) tandis que dans les extraits des écorces des racines ce l'homoorientine qui est le composé majoritaire. Au niveau des extraits des feuilles nous avons relevé que la rutine (1680 µg/ ml), le quercétine glucosé (980 µg/ ml), sont les composés majoritaires identifiés et quantifiés.

❖ Analyses des extraits des écorces des troncs *F. capensis*
 1a. Analyse à 280 nm

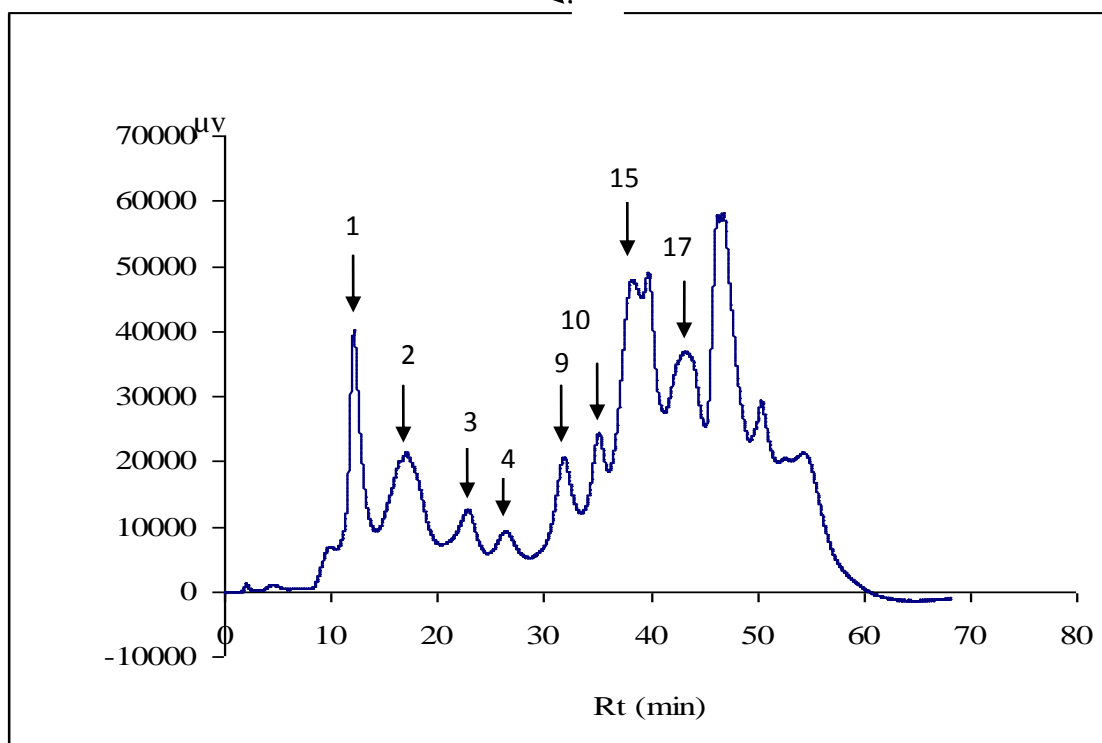


Figure 27a: Profil chromatographique de l'extrait des écorces des troncs *F. capensis*
 1: acide gallique; 2: acide protocatéchiique; 3: catéchine; 4: acide chlorogénique; 9: acide p-coumarique;
 10: homoorientine; 15: quercétine dihydraté; 17: quercétine

1b. Analyse à 320 nm

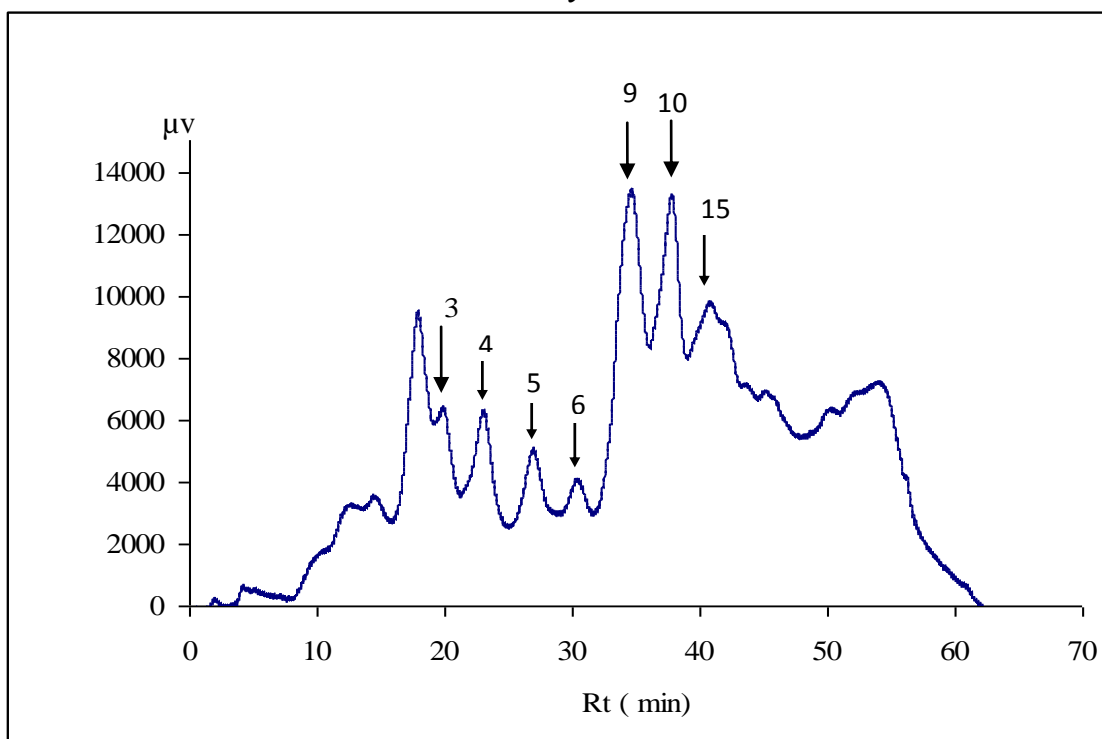


Figure 27b: Profil chromatographique de l'extrait des écorces des troncs *F. capensis*
 3: catéchine; 4: acide chlorogénique; 5: acide caféique; 6: épicatechine; 9: acide p-coumarique; 10:
 homoorientine; 15: quercétine dihydraté

❖ Extraits des écorces des racines de *F. capensis*

2a. Analyse à 280 nm

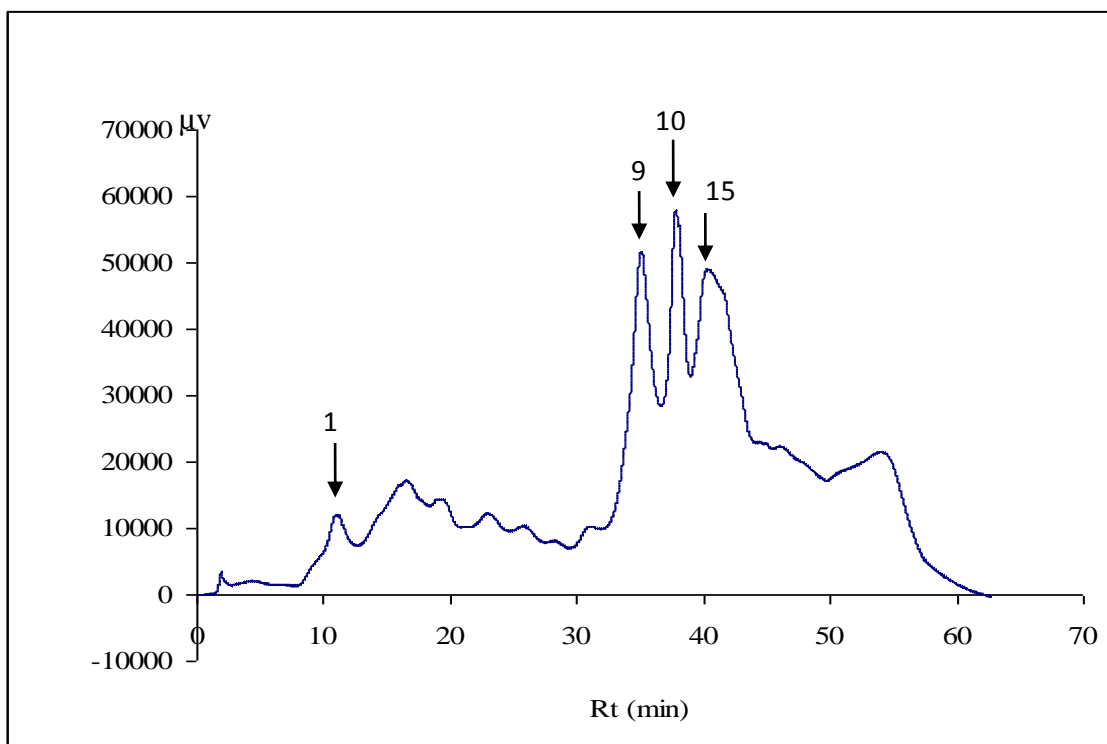


Figure 28a: Profil chromatographique de l'extrait des écorces des racines *F. capensis*

1: acide gallique; 9: acide *p*-coumarique; 10: homoorientine; 15: quercétine dihydraté

2b. Analyse à 320 nm

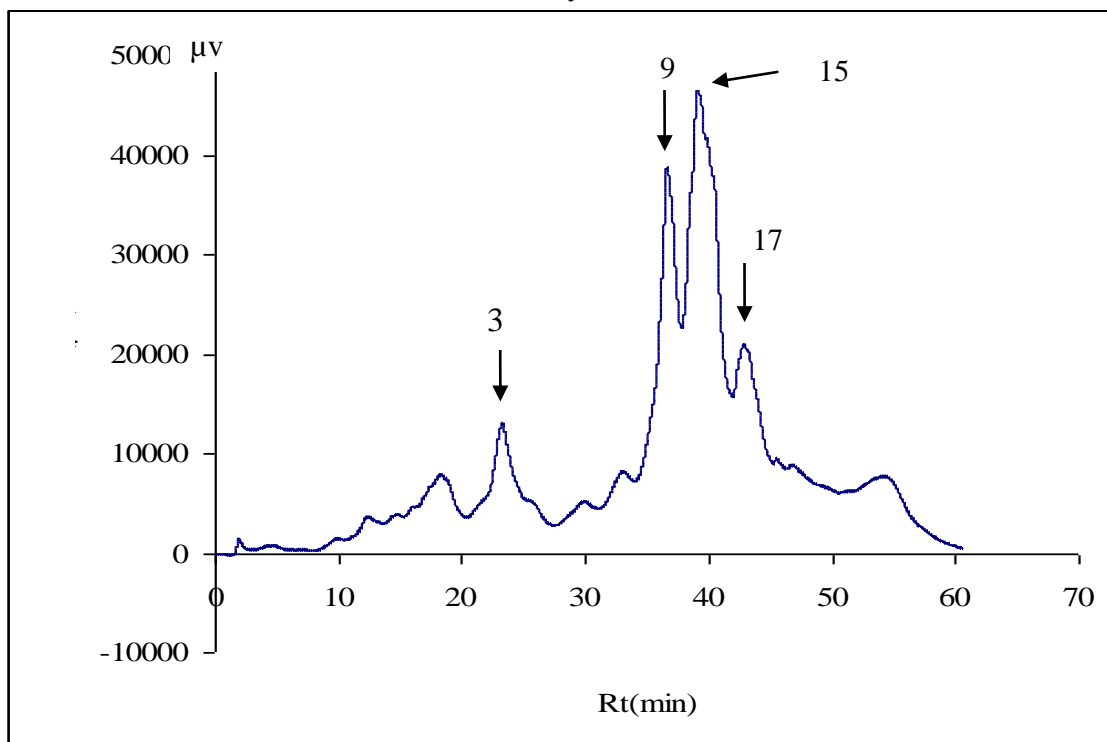


Figure 28b: Profil chromatographique de l'extrait des écorces des racines *F. capensis*

3: catéchine; 9: acide *p*-coumarique; 15: quercétine dihydraté; 17: quercétine

❖ Extraits des feuilles de *F. capensis*

3a. Analyse à 280 nm

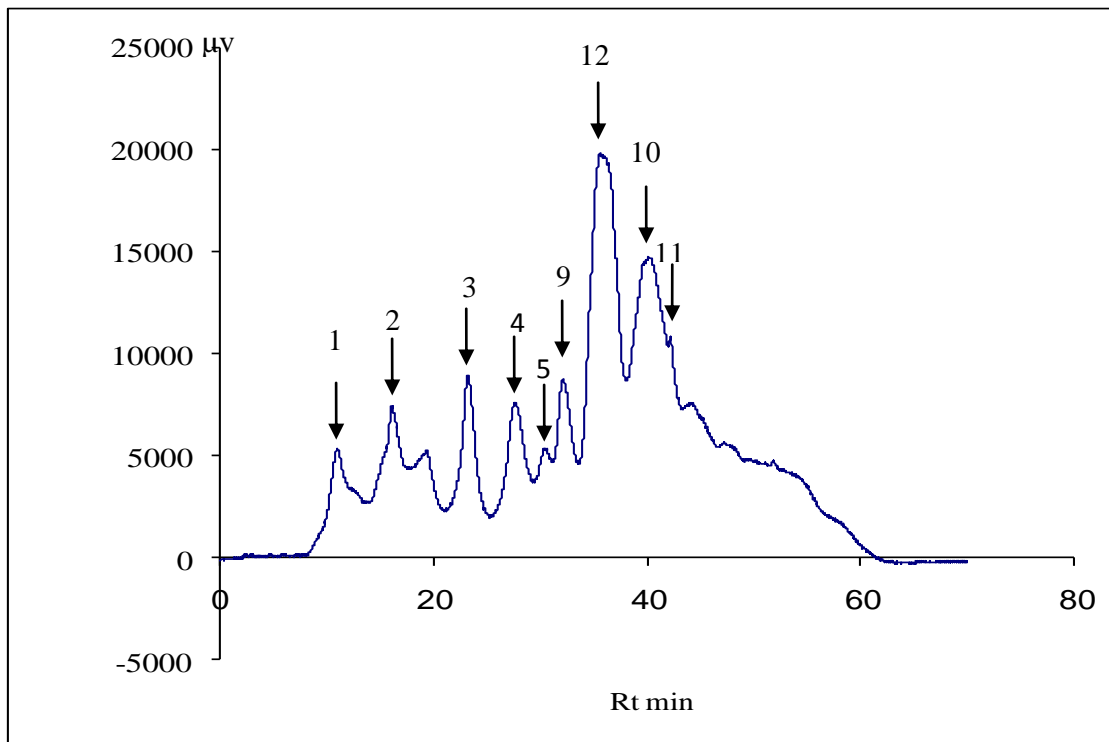


Figure 29a: Chromatogramme des extraits des feuilles de *Ficus capensis* MEE

1: acid gallique, 2: acid protocatechuique, 3: catéchine, 4: acide caféique, 6: épicatechine, 9: acide p-coumarique, 12: rutine, 16: acide cinnamique, 17: quercétine

3b. Analyse à 320 nm

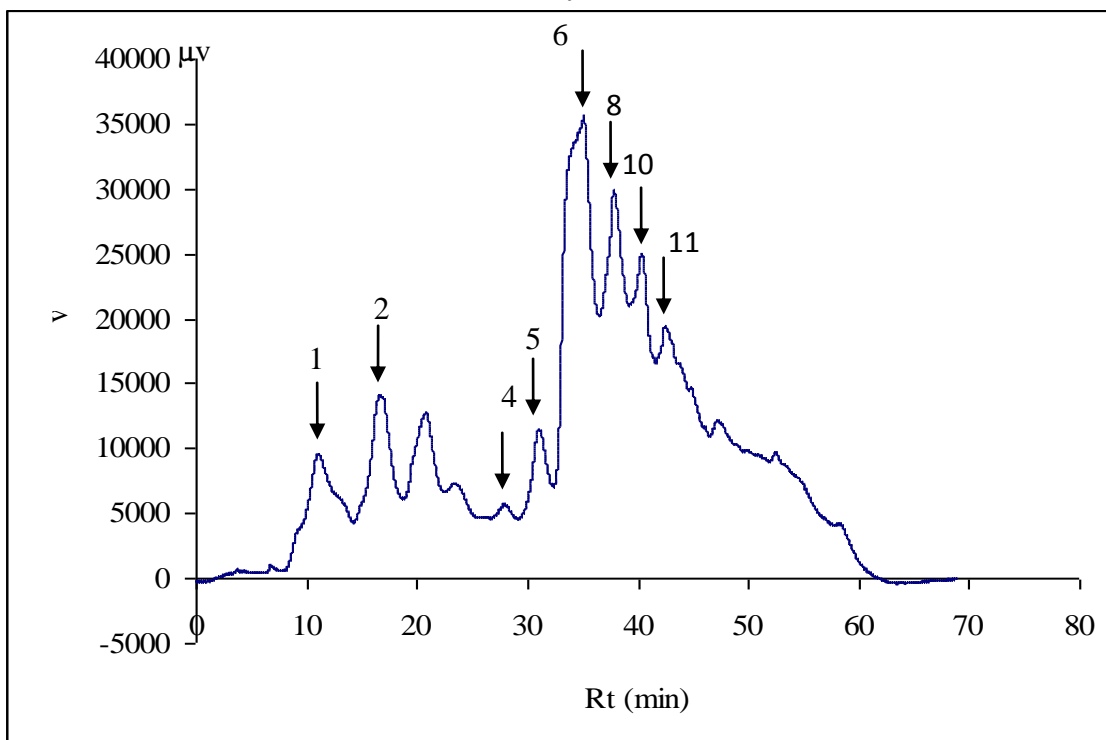


Figure 29b: Chromatogramme des extraits MEE des feuilles de *F. capensis*

1: acide gallique, 2: acide protocatechuique, 4: acide caféique, 6: épicatechine, 6: acide p-coumarique, 8: quercétine glucosé, 16: acide cinnamique, 11: quercétine

Tableau 18: Composés phénoliques contenus dans les extraits du *F.capensis* (MEe)

Nom du Composé	Rt (min)	Et (µg/ml)	Er (µg/ml)	E _F (µg/ml)
acide gallique	11,2	1180 ± 4	1,6 ± 0,1	280 ± 50
acide protocatéchiue	17,0	71,6 ± 0,3	1,6 ± 0,1	370 ± 60
catéchine	25,0	3,0 ± 0,1	0,8 ± 0,1	630 ± 20
acide chlorogénique	26,5	12,3 ± 0,1	0,6 ± 0,1	nd
acide caféique	28,7	12,7 ± 0,1	5,2 ± 0,1	820 ± 90
épicatéchine	31,45	nd	nd	240 ± 30
acide p-coumarique	33,5	827,2 ± 3,5	827,2 ± 0,8	850 ± 110
homoorientine	35,4	36,6 ± 0,1	194,9 ± 0,3	nd
orientine	36,4	9,0 ± 0,1	9,0 ± 0,1	nd
rutine	37,1	22,7 ± 0,2	6,1 ± 0,1	1680 ± 130
quercétine-G	38,0	nd	nd	980 ± 80
quercétine-dH	39,3	1,8 ± 0,1	83,2 ± 0,5	nd
coumarine	40,4	13,8 ± 0,1	2,9 ± 0,1	nd
acide cinnamique	41,36	nd	nd	830 ± 60
delphinidine	42,5	34,4 ± 0,1	7,6 ± 0,1	nd
quercétine	44,0	109,5 ± 1,0	63,3 ± 0,2	190 ± 40
acide ascorbique	56,5	14,5 ± 0,4	1,3 ± 0,1	nd

- **Extraits de *S. longependunculata* (HPLC)**

Les profils chromatographiques des analyses qualitatives et quantitatives des extraits (Ee et MEe) des écorces des racines de *S. longependunculata* sont représentés ci-dessous (figures 30 et 31). Les données correspondant à leurs évaluations quantitatives sont reprises dans le tableau 19. Partant de ces résultats, nous constatons que l'apigénine (0,98 mg/ml), le quercétine (0,68 mg/ml) et l'acide cinnamique (0,21 mg/ml) sont les composés majoritaires identifiés dans les extraits MEe tandis que dans les extraits Ee, c'est le quercétine (0,61 mg/ml), l'apigénine et le quercétine glucosé (0,17 mg/ml) qui sont majoritaires.

❖ Extraits aqueux (Ee) des écorces des racines de *S. longependiculata*

1a. Analyse à 280 nm.

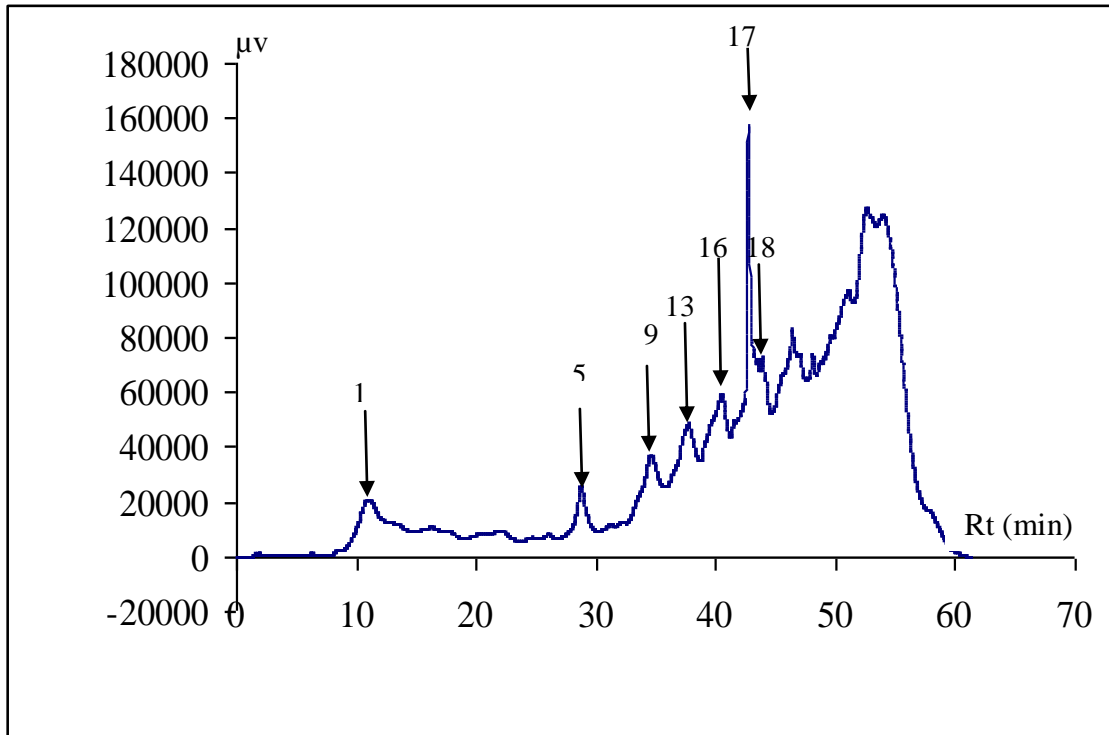


Figure 30a: Chromatogramme des extraits Ee des écorces des racines de *S. longependiculata*
 1: acide gallique; 5: acide caféïque; 9: acide p-coumarique; 13: quercétine glucosé; 6: acide cinnamique; 17: quercétine; 18: apigénine

1b. Analyse à 320 nm

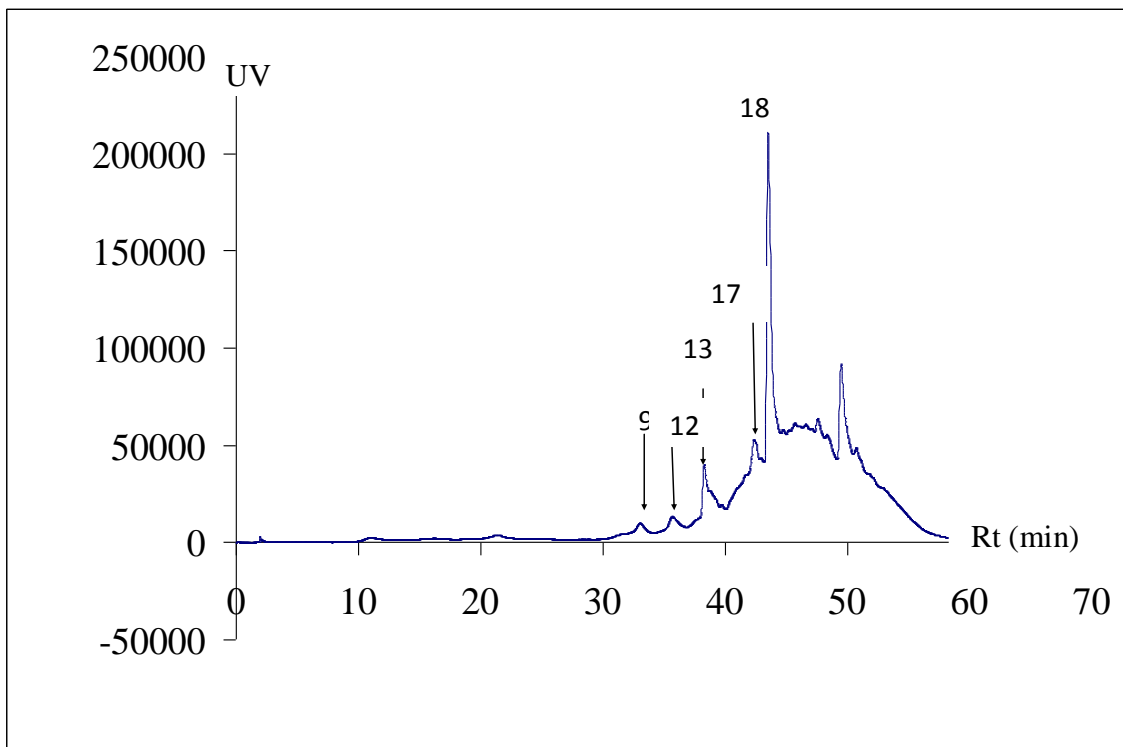


Figure 30b: Chromatogramme des extraits Ee des écorces des racines de *S. longependiculata*
 9: acide p-coumarique; 12: rutine; 13: quercétine glucosé; 17: acide cinnamique; 18: apigénine

❖ Extraits (MEe) des écorces des racines de *S. longependunculata*

2a. Analyse à 280 nm

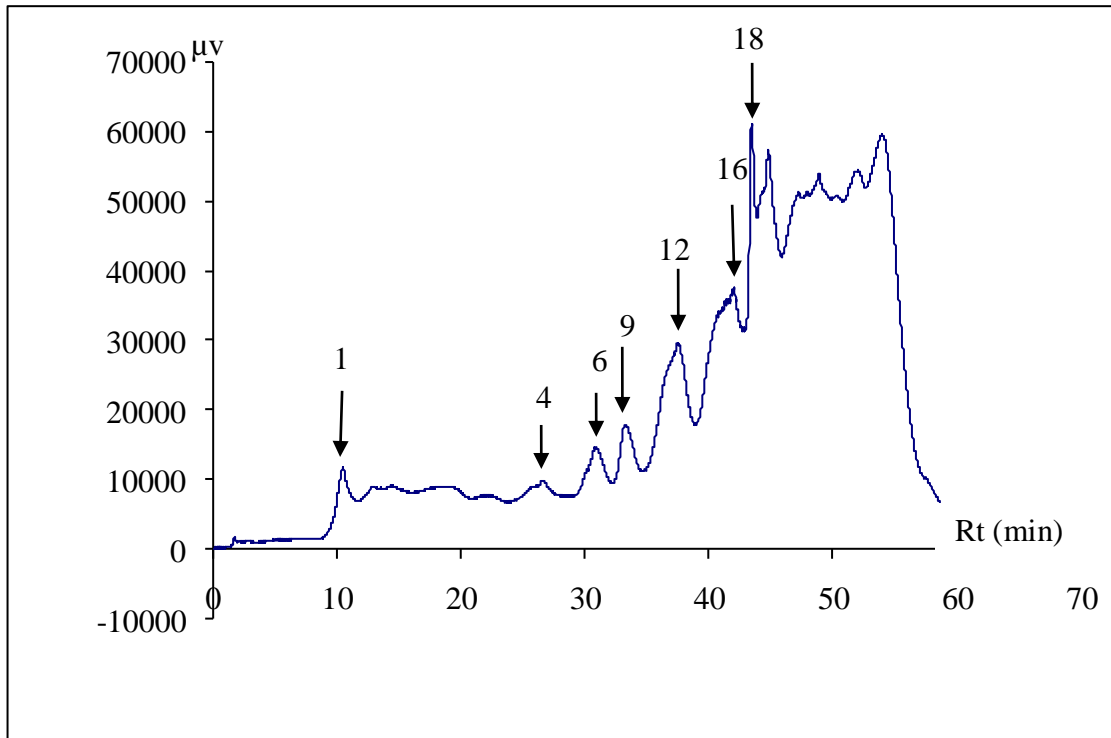


Figure 31a: Chromatogramme des extraits MEE des écorces des racines de *S. longependunculata* 1: acide gallique; 4: acide chlorogénique; 6: épicatechine; 9: acide p-coumarique; 12: rutine; 16: acide cinnamique; 18: apigénine

2b. Analyse à 320 nm

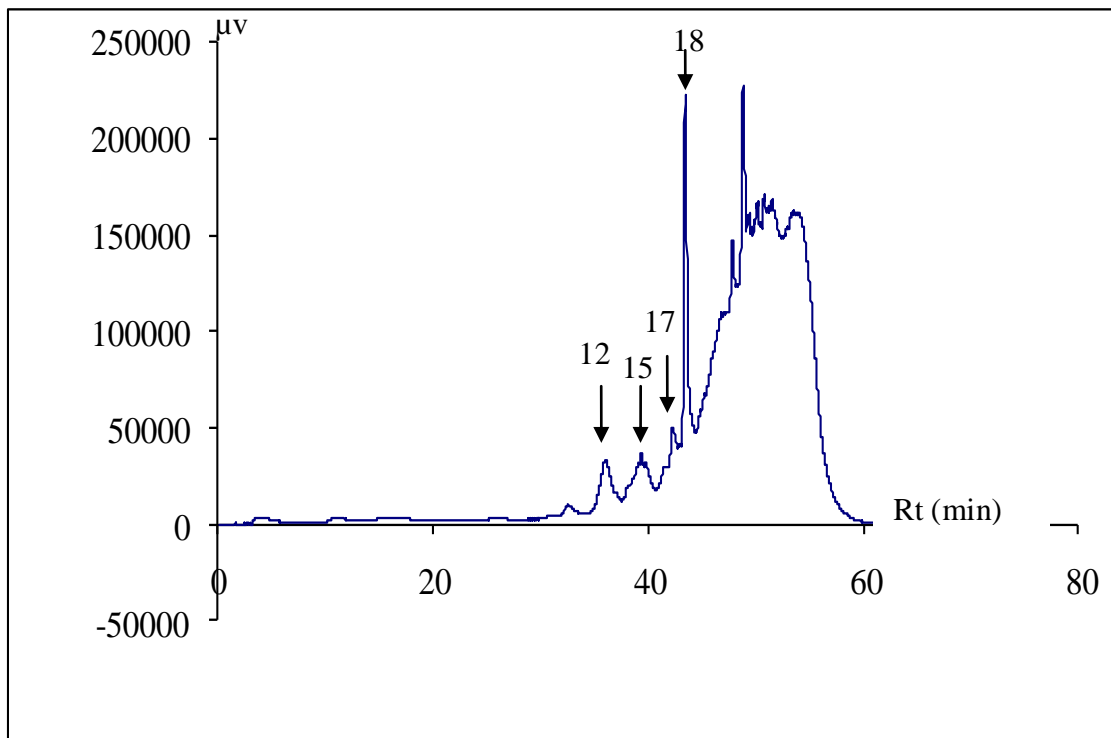


Figure 31b: Chromatogramme des extraits MEE des écorces de racines de *S. longependunculata* 12: Rutine; 15: quercétine dihydrate; 16: acide cinnamique; 17: quercétine; 18: apigénine

Tableau 19: Concentration de composés phénoliques contenus dans les extraits (Ee et MEe) du *S. longependunculata*

Rt (min)	Ref	Nom du composé	Ee (mg/ml)	MEe (mg/ml)
11,98 ± 0,22	1	acide gallique	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01
26,51 ± 0,48	4	acide chlorogénique	nd	0,04 ± 0,01
28,92 ± 0,29	5	acide caféique	0,05 ± 0,02	nd
31,45 ± 0,55	6	épicatéchine	nd	0,06 ± 0,01
33,25 ± 0,36	9	acide <i>p</i> -coumarique	0,15 ± 0,03	0,05 ± 0,02
37,02 ± 0,36	12	Rutine	0,08 ± 0,01	0,12 ± 0,03
37,71 ± 0,18	13	quercétine glucosé	0,17 ± 0,05	nd
39,35 ± 0,58	15	quercétine dihydraté	nd	0,05 ± 0,01
41,68 ± 0,65	16	acide cinnamique	0,06 ± 0,01	0,21 ± 0,07
42,43 ± 0,30	17	quercétine	0,61 ± 0,05	0,68 ± 0,01
43,80 ± 0,29	18	apigénine	0,23 ± 0,02	0,98 ± 0,06

- **Extraits des feuilles de *S. rebaudiana* (HPLC)**

Les profils chromatographiques des analyses qualitatives et quantitatives des extraits (MEe et Ee) de *S. rebaudiana* sont représentés dans les figures 32 et 33. Les données correspondant à l'évaluation quantitative des composés identifiés sont reprises dans le tableau 20.

De ces résultats, nous constatons que le quercétine dihydrate (4,48 mg/ ml), la rutine et l'acide chlorogénique (1,99 mg/ ml) sont majoritairement dans l'extrait MEe tandis que l'acide protocatéchiue (1,46 mg/ ml), la catéchine (1,44 mg/ ml), les quercétines glucosé (1,19 mg/ ml) et dihydrate (1,04 mg/ ml) les sont dans l'extrait Ee.

❖ **Extraits (MEe) des feuilles de *S. rebaudiana***
1a. Analyse à 280 nm

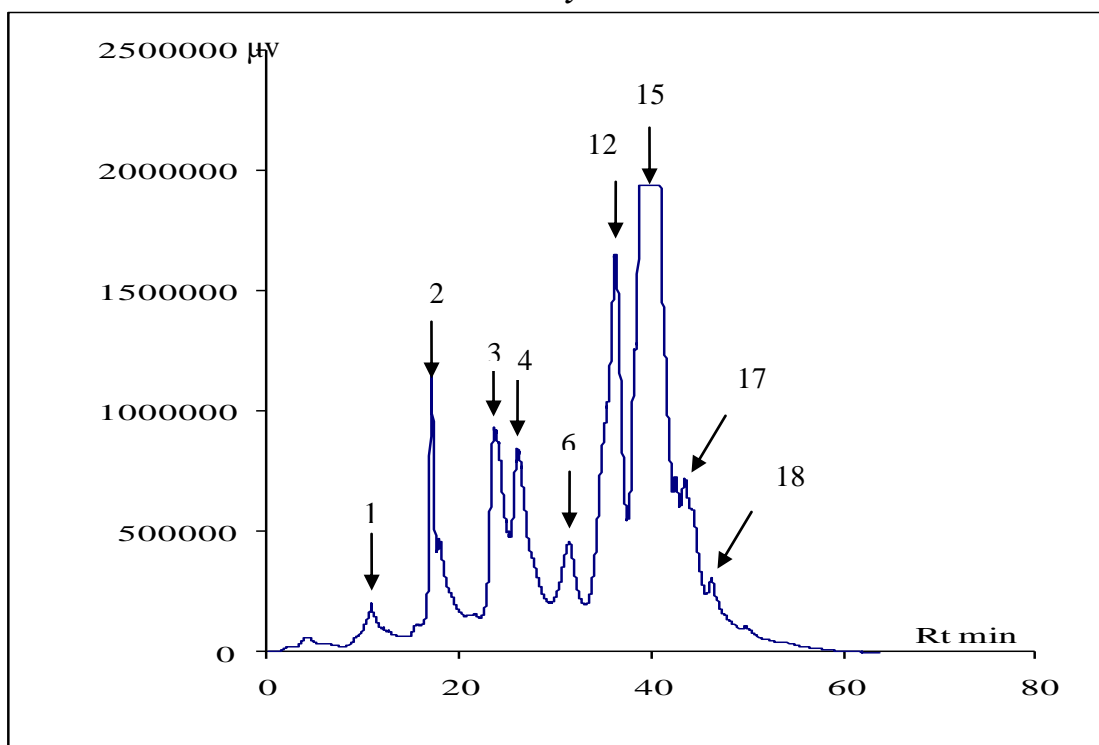


Figure 32a : Profil chromatographique de l'extract MEE des feuilles de *S. rebaudiana*
 1: acide gallique, 2: acide protocatéchuïque; 3: catéchine, 4: acide chlorogénique; 6: épicatechine, 12: rutine,
 15: quercétine dihydrate, 17: quercétine, 13: apigénine.

1b. Analyse à 320 nm

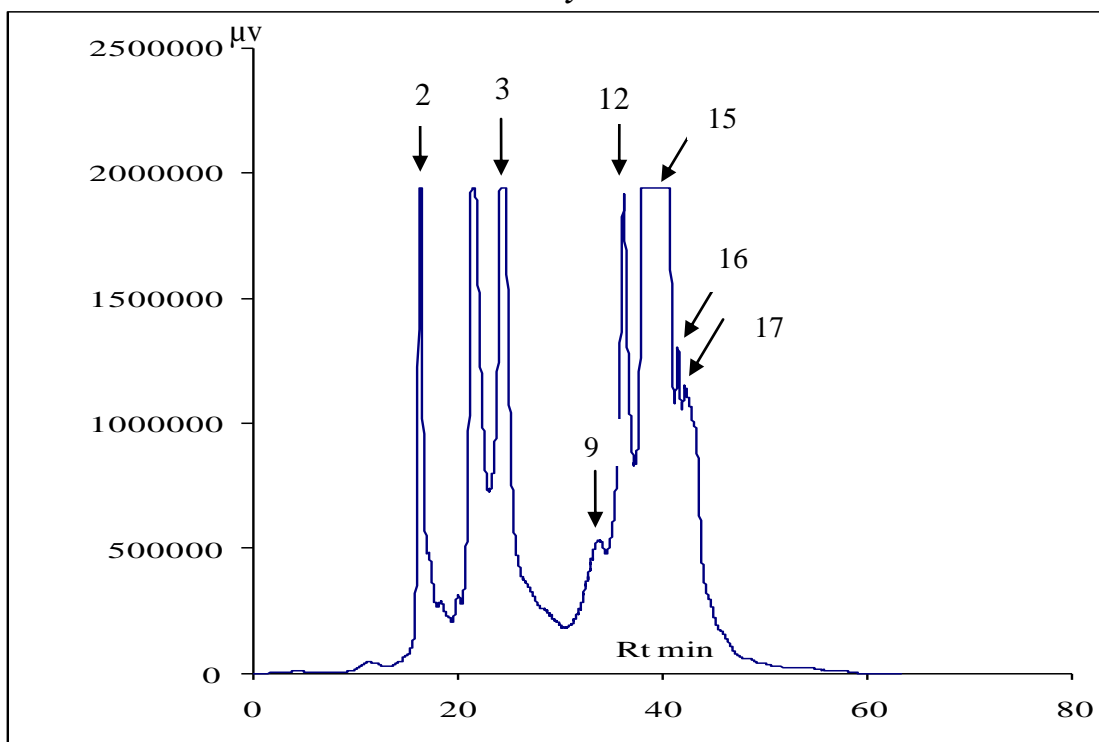


Figure 32b : Profil chromatographique de l'extract MEE des feuilles de *S. rebaudiana*
 2: acide protocatéchuïque, 3: catéchine, 9: acide p-coumarique, 12: rutine, 15: quercétine dihydrate, 16: acide
 cinnamique, 17: quercétine.

❖ **Extraits (Ee) des feuilles de *S. rebaudiana***
2a. Analyse à 280 nm

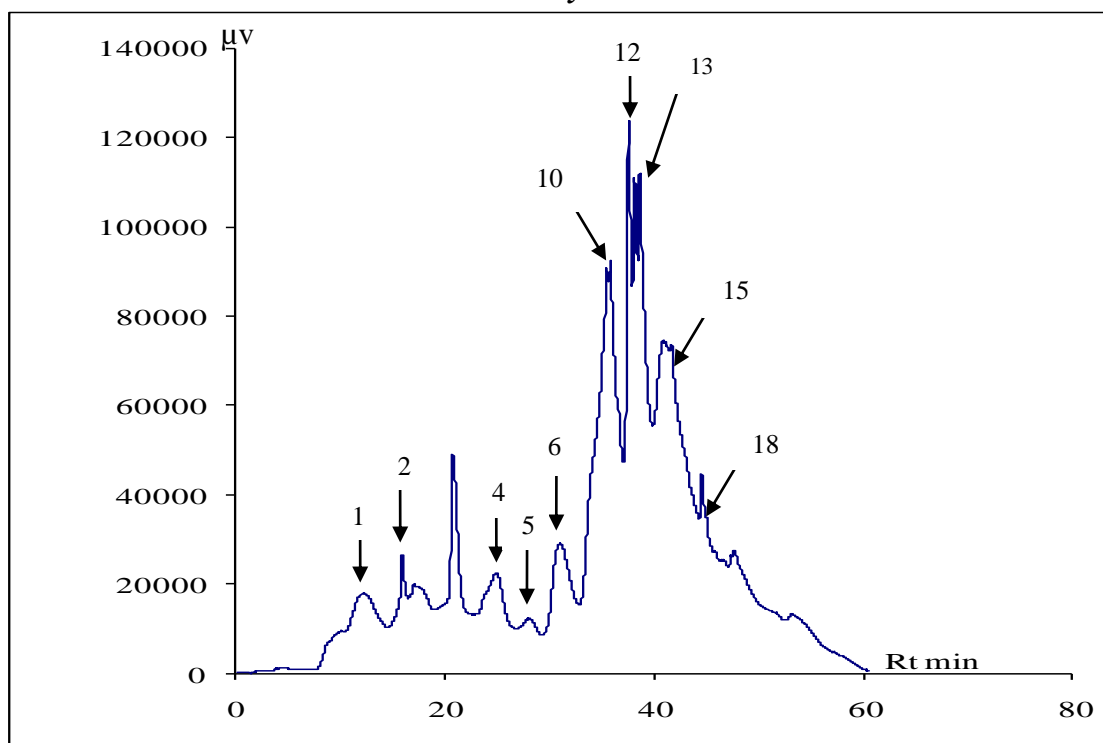


Figure 33a : Profil chromatographique de l'extract Ee des feuilles de *S. rebaudiana*
 1: acide gallique; 2:acide protocatechuique; 4: acide chlorogénique; 5: acide caféique; 6: épicatechine; 10: homoorientine; 12: rutine; 13: quereitine glucosé; 15: quercétine dihydraté; 18: apigénine.

2b. Aanalyse à 320 nm

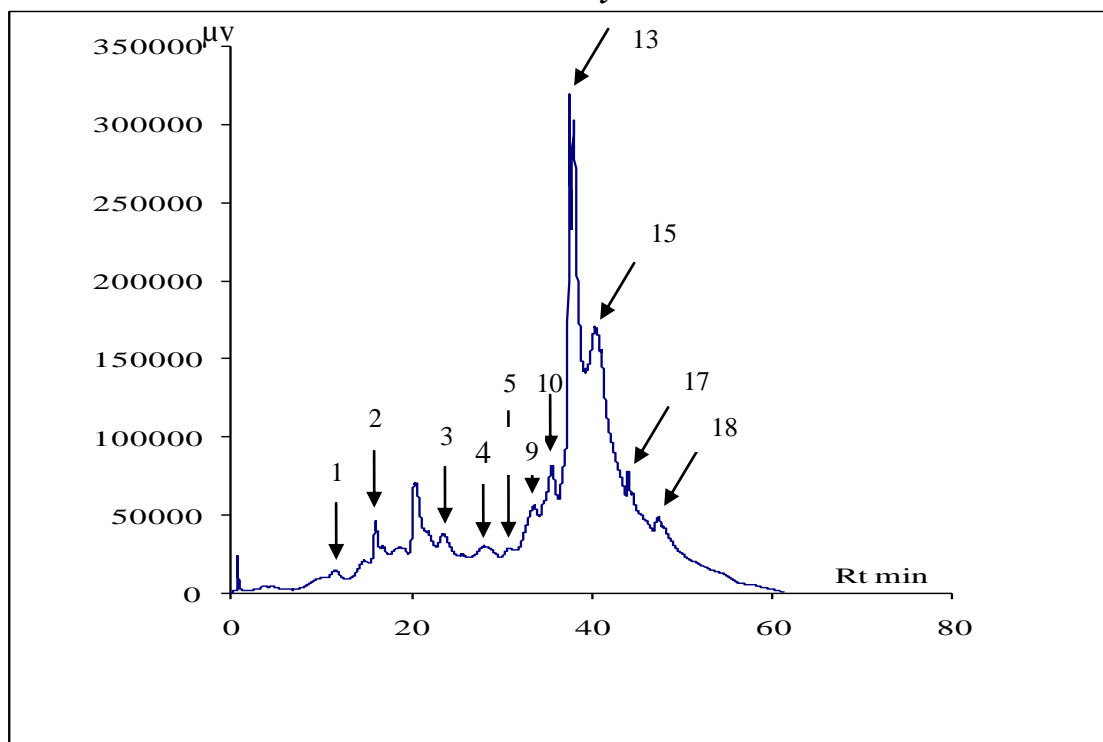


Figure 33b : Profil chromatographique de l'extract Ee des feuilles de *S. rebaudiana*
 1:acide gallique; 2:acide protocatechuique; 3: catéchine, 4: acide chlorogénique; 5: acide caféique; 9: acide p-coumarique; 10: homoorientine; 13: quercétine glucosé; 15: quercétine dihydraté; 17: quercétine 18: apigénine.

Tableau 20: Concentration de composés phénoliques contenus dans les extraits (ME_e et E_e) du *S. rebaudiana* (280 et 320 nm)

Ref.	Nom du composé	Rt (min)	ME _e (mg ml ⁻¹)	E _e (mg ml ⁻¹)
1	acide gallique	11,98 ± 0,22	0,04 ± 0,01	0,17 ± 0,02
2	acide protocatéchiuque	14,78 ± 0,92	0,49 ± 0,16	1,46 ± 0,14
3	Catéchine	23,96 ± 0,23	0,97 ± 0,13	1,44 ± 0,12
4	acide chlorogénique	25,65 ± 0,21	1,03 ± 0,09	0,32 ± 0,10
5	acide caféique	28,78 ± 0,38	ni	0,08 ± 0,02
6	Epicatéchine	31,17 ± 0,65	0,52 ± 0,08	0,53 ± 0,03
9	acide <i>p</i> -coumarique	33,25 ± 0,36	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,01
12	Rutine	37,02 ± 0,36	1,99 ± 0,23	0,88 ± 0,21
13	quercétine glucosé	37,71 ± 0,18	ni	1,19 ± 0,27
15	quercétine dihydraté	39,47 ± 0,19	4,48 ± 0,38	1,04 ± 0,23
16	acide cinnamique	41,08 ± 0,65	0,63 ± 0,12	0,58 ± 0,14
17	Quercétine	42,87 ± 0,16	0,27 ± 0,08	0,45 ± 0,11
18	Apigénine	44,89 ± 0,59	0,19 ± 0,04	0,10 ± 0,02

- Extraits de *V. doniana* (HPLC)

Les profils chromatographiques des analyses qualitatives et quantitatives de composés phénoliques des extraits (ME_e) de *V. doniana* sont représentés ci-dessous (figures 34, 35 et 36). Et l'évaluation quantitative individuelle des composés identifiés est reprise dans le tableau 21. A travers ce tableau, nous remarquons que les composés majoritaires identifiés dans les extraits des écorces des troncs sont l'homoorientine (453,6 µg/ml) et l'acide gallique, dans les extraits des écorces des racines ces la rutine (6363 µg/ ml) et l'homorientine (2804 µg/ ml) tandis que dans les extraits des feuilles ce la rutine (11943 µg/ ml) et la quercétine (1831 µg/ ml).

❖ Extraits des écorces des troncs de *V. doniana*

1a. Analyse à 280 nm

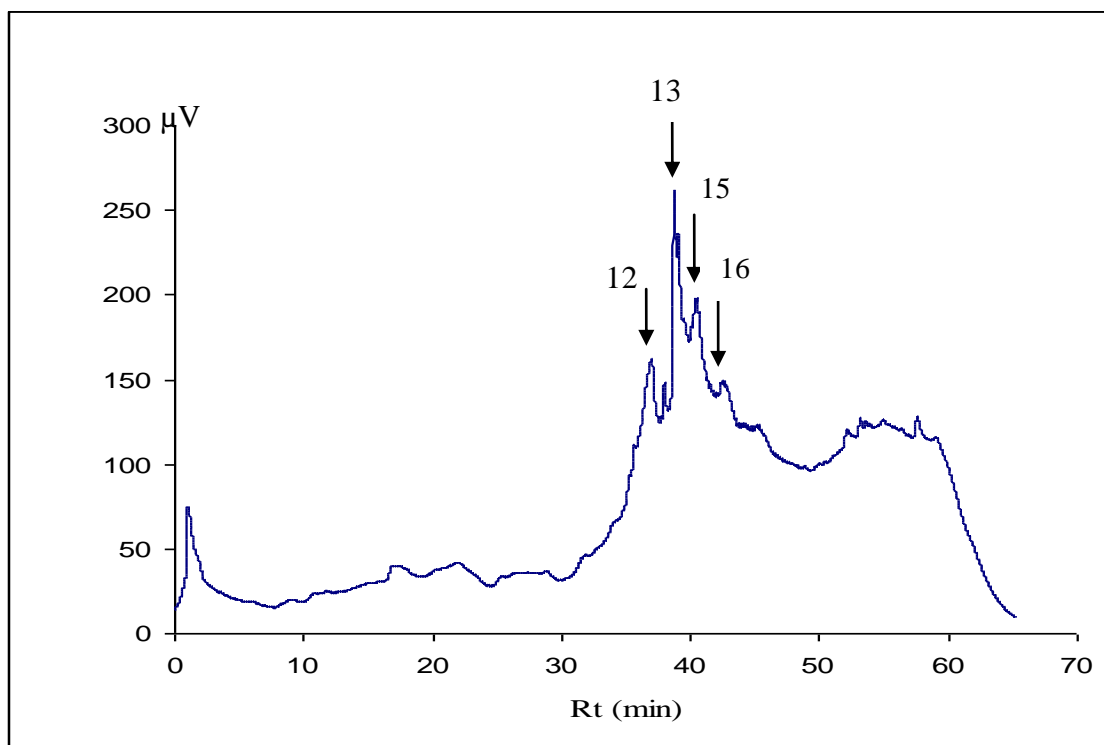


Figure 34a: Profil chromatographique des extraits des écorces des troncs de *Vitex doniana*
12: rutine, 13: quercétine glucosé, 15: quercétine dihydrate, 16:acide cinnamique

1b. Analyse à 320 nm

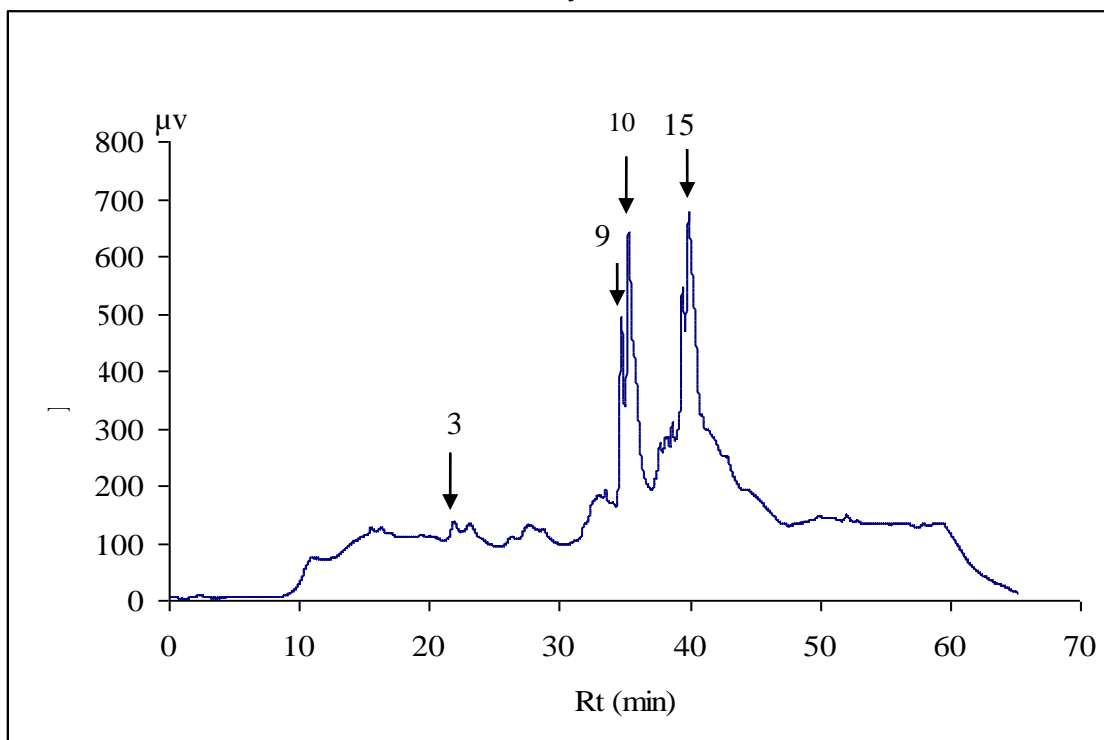


Figure 34b: Profil chromatographique des extraits des écorces des troncs de *Vitex doniana*
3: catéchine, 9: acide p- coumarique, 10: homoorientine, 15: quercétine dihydrate

❖ Extraits des écorces des racines de *V. doniana*

1a. Analyse à 280 nm

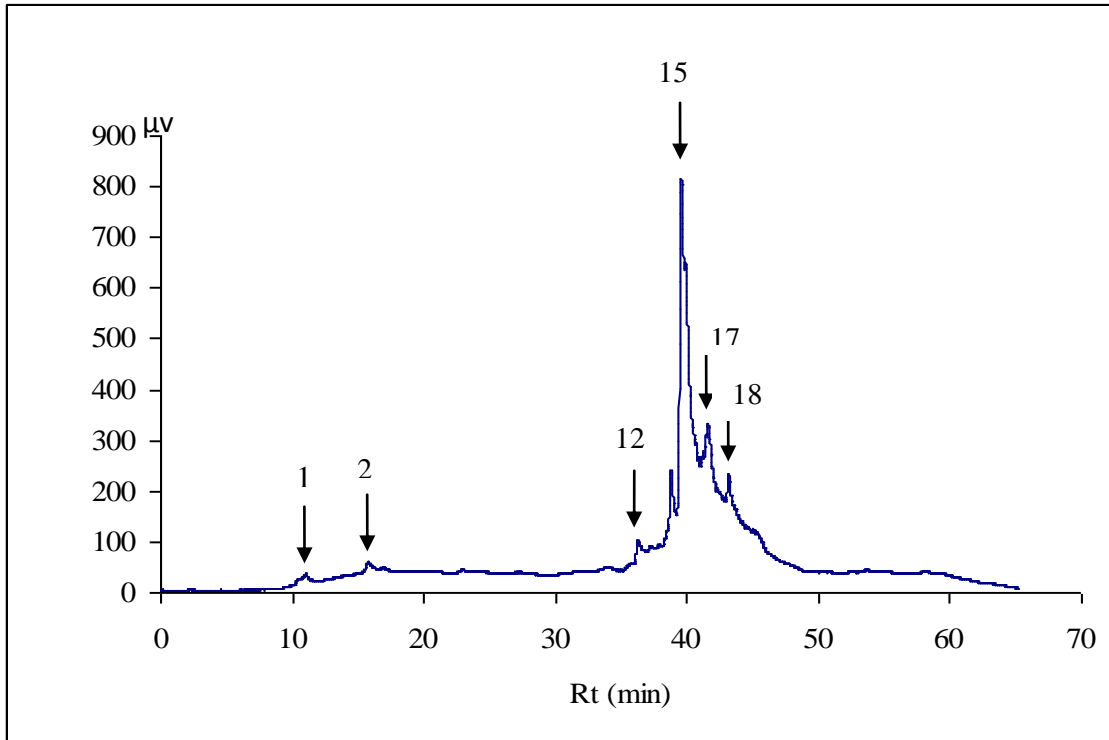


Figure 35a: Profil chromatographique des extraits des écorces des racines de *V. doniana*
1: acide gallique, 2: acide protocatéchuïque, 12: rutine, 15: quercétine dihydrate, 17: quercétine, 18: apigénine

2b. Analyse à 320 nm

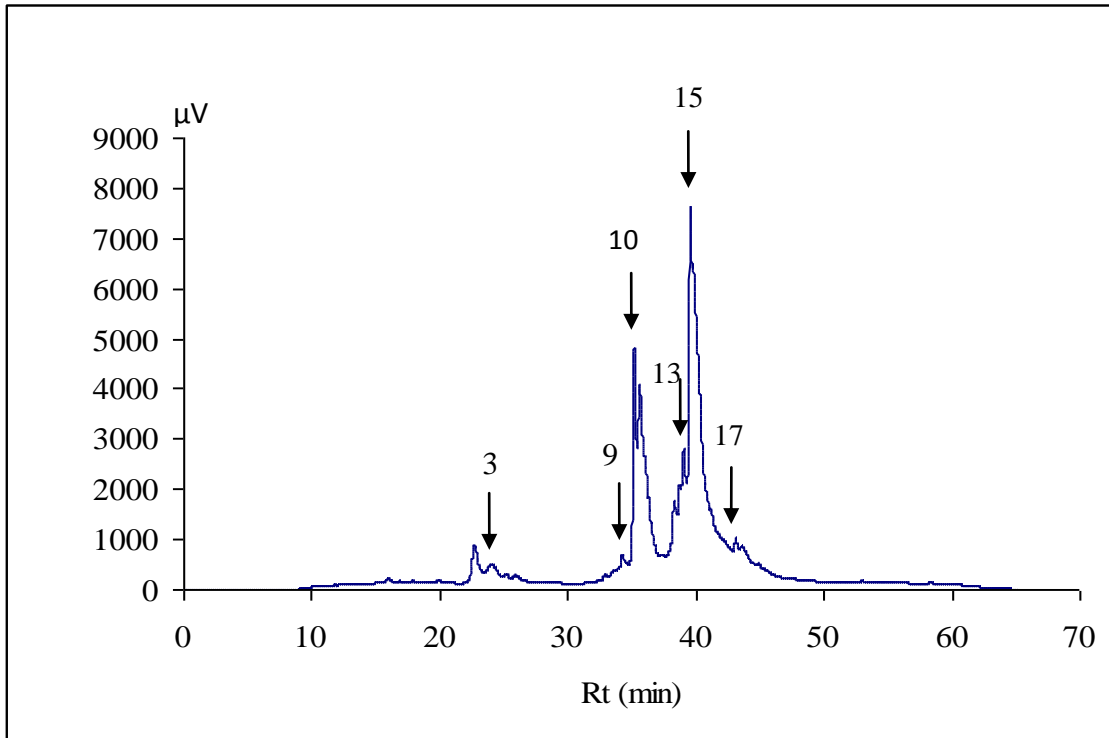


Figure 35b: Profil chromatographique des extraits des écorces des racines de *Vitex doniana*
3: catéchine, 9: acide *p*-coumarique, 10: homoorientine, 13: quercétine glucosé, 15: quercétine dihydrate, 17: quercétine

❖ Extraits des feuilles de *V. doniana*

3a. Analyse à 280 nm

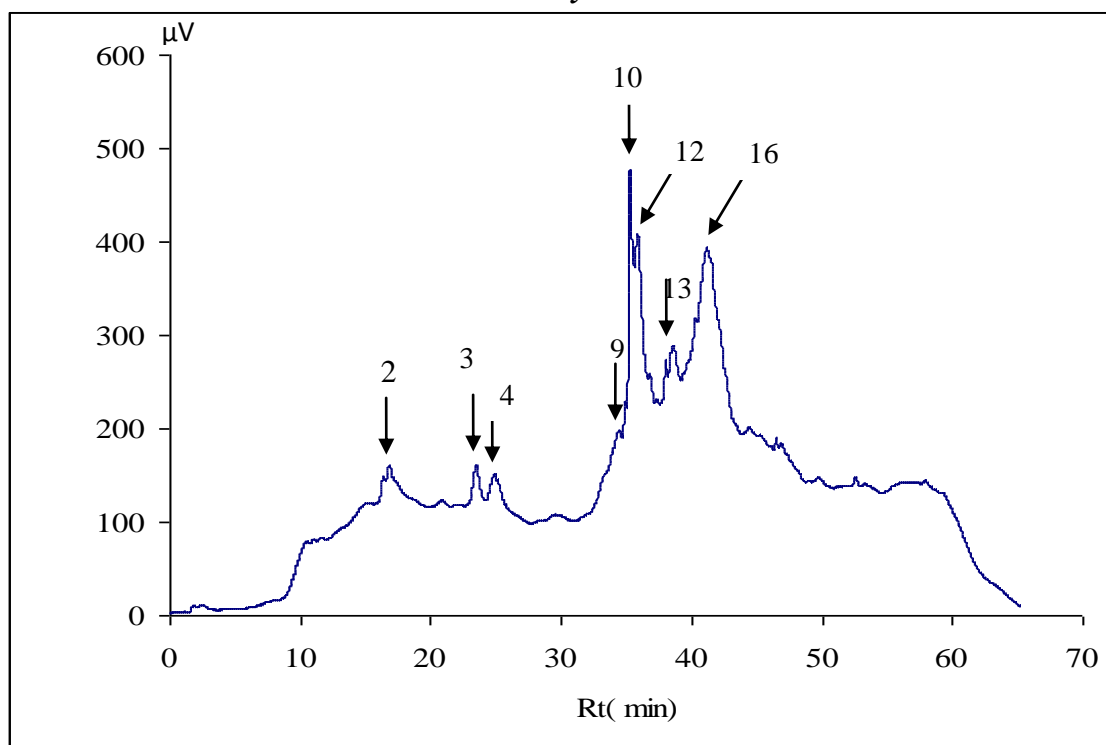


Figure 36a: Profil chromatographique des extraits des feuilles de *Vitex doniana*
 2: acide protocatéchuique; 3: acide catéchine; 4: acide chlorogénique; 9: acide p-coumarique; 10: homoorientine, 12: rutine; 13: quercétine glucosé; 16: acide cinnamique

3b. Analyse à 320

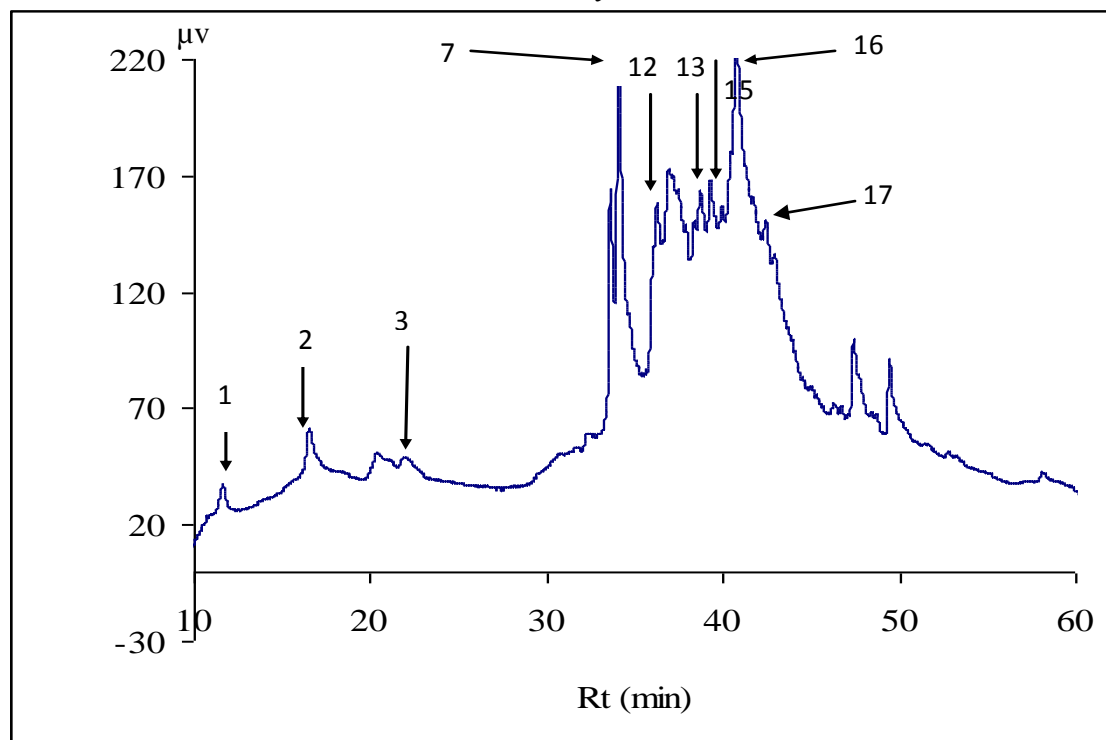


Figure 36b: Profil chromatographique des extraits des feuilles de *Vitex doniana*
 1: acide gallique; 2: acide protocatechuique; 3: catechine; 7: acide p- coumarique; 12: rutine; 13: quercétine glucosé; 15: quercétine dihydraté; 16: cinnamique; 17: quercétine

Tableau 21: Composition en composés phénoliques des extraits de *Vitex doniana*

Nom du Composé	Rt (min)	Et (µg/ml)	Er (µg/ml)	E _F (µg/ml)
acide gallique	11,2	190,9 ± 0,2	168,6 ± 0,4	471,4 ± 0,2
acide protocatechique	17,0	63,5 ± 1,4	22,7 ± 0,1	34,8 ± 0,8
catéchine	25,0	10,4 ± 0,1	51,5 ± 0,2	1,4 ± 0,1
acide chlorogénique	26,5	4,2 ± 0,1	nd	1,7 ± 0,1
acide caféique	28,7	8,2 ± 0,1	nd	nd
acide <i>p</i> -coumarique	33,45	9,2 ± 0,1	nd	18,8 ± 0,3
homoorientine	35,25	453,6 ± 0,4	2804 ± 4	384,1 ± 2
rutine	37,1	34,9 ± 0,2	6363 ± 2	11943 ± 5
quercétine-G	38,0	96,3 ± 0,3	18,1 ± 0,1	12,6 ± 1
quercétine-dH	39,3	78,7 ± 0,2	1346 ± 1	1,7 ± 0,1
acide cinnamique	41,35	nd	nd	nd
quercétine	42,65	nd	332,2 ± 0,1	1831 ± 18

- **Exsudats des racines de *Miscanthus X giganteus***

Les profils chromatographiques des analyses sont représentés dans la figure 37. Les résultats des analyses quantitatives sont repris dans le tableau 22. Nous remarquons que l'acide *p*-coumarique et le quercétine dihydrate sont les composés majoritaires.

a. Analyse EI à 280 nm

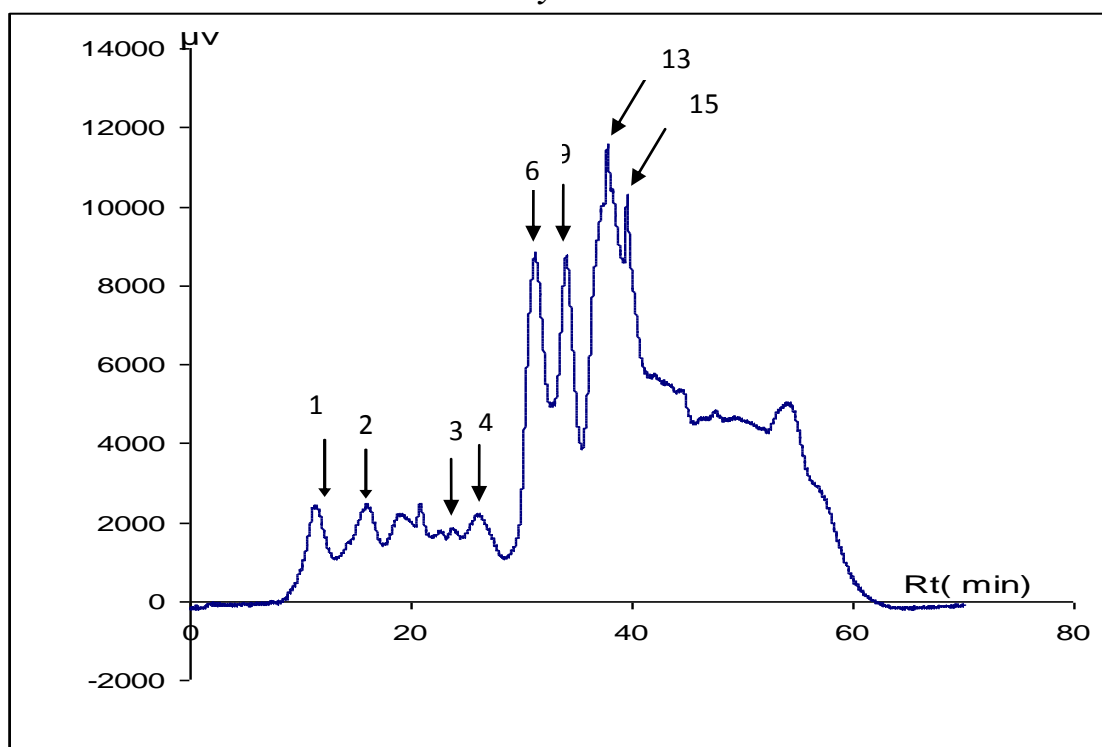


Figure 37a: Profil chromatographique de l'extrait de l'exsudat E1 à 280 nm
 1: Acide gallique, 2: acide protocatéchique, 3: catéchique, 4: acide chlorogénique, 6: épicatechine, 9: acide *p*-coumarique, 13: quercétine glucosé, 15: quercétine dihydrate

b. analyse E2 à 280 nm

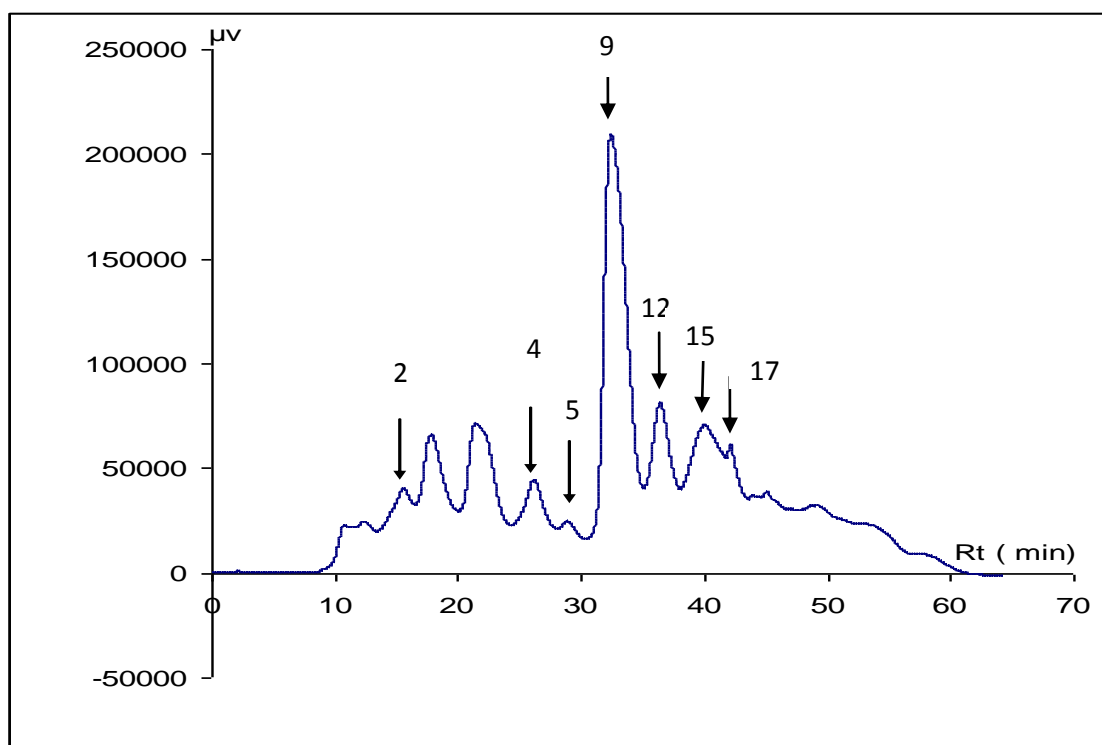


Figure 37b: Profil chromatographique de l'extrait de l'exsudat E2 à 280 nm
 2: acide protocatéchuique, 4: acide chlorogénique, 5: acide caféique, 9: acide *p*-coumarique, 12: rutine, 15: quercétine dihydrate, 17: quercétine

Tableau 22: Composition chimique des extraits des exsudats des racines de *Miscanthus X giganteus*

Ref	Nom du composé	Rt (min)	E1 (µg/ml) x10	E2 (µg/ml) x10
1	acide gallique	11,2	110 ± 6	nd
2	acide protocatéchuique	17,0	180 ± 10	32 ± 5
3	catéchine	25,0	88 ± 3	nd
4	acide chlorogénique	26,5	14 ± 2	190 ± 9
5	acide caféique	28,7	nd	130 ± 7
6	épicatéchuique	31,60	297 ± 20	nd
9	acide <i>p</i> -coumarique	33,45	307 ± 9	2740 ± 25
12	rutine	37,1	nd	349 ± 12
13	quercétine-G	38,0	396 ± 12	nd
15	quercétine-dH	39,3	73 ± 5	760 ± 16
17	quercétine	42,65	380 ± 15	110 ± 7

Un tableau récapitulatif de l'ensemble des résultats des analyses qualitatives et quantitatives est repris ci-dessous (tableau 23).

Travaux personnels

Tableau 23: Analyses qualitatives et quantitatives des extraits des plantes étudiées / (µg/ml) (tableau récapitulatif)

Cpi	Tr (min)	<i>D. Oliveri</i>			<i>D. adscendens</i>		<i>F. Capensis</i>			<i>S. longependuculata</i>		<i>S. rebaudiana</i>		<i>V. doniana</i>			<i>M. × giganteus</i>	
		Et	Er	F	Ee	MEe	Et	Er	F	Ee	MEe	Ee	MEe	Et	Er	F	E1 x10	E2 x10
Ac.gal.	11	210	12	30	120	nd	118	2	280	30	20	170	40	191	169	471	110	nd
Ac.pcat	14	20	1	1	110	nd	72	2	370	nd	nd	590	1460	64	23	35	180	32
Cat.	23	nd	nd	4	60	690	3	1	630	nd	nd	440	1170	10	52	1	88	nd
Ac. Chr.	26	505	nd	1	Nd	230	12	1	Nd	nd	40	320	1030	4	nd	2	14	190
Ac.caf.	28	2410	1	14	Nd	nd	13	5	820	50	nd	80	nd	8	nd	nd	nd	130
Epicat.	31	nd	nd	nd	Nd	nd	Nd	nd	240	nd	60	530	520	nd	nd	nd	297	nd
Ac. P-cou.	34	322	128	827	Nd	nd	827	827	850	150	50	50	70	9	nd	19	307	2740
Hor	35	784	6	195	Nd	nd	37	195	Nd	nd	nd	nd	nd	454	2804	895	nd	nd
Rt	36	144	1	6	240	280	23	6	1680		120	880	1990	35	6363	nd	nd	349
Qgl.	38	224	116	12	460	170	Nd	nd	980	170	nd	1190	nd	nd	18	12	396	nd
Qdh.	40	5	22	nd	170	2110	2	83	Nd	nd	50	1040	4480	96	1346	nd	73	760
Ac.cin.	41	nd	nd	nd	140	760	Nd	nd	830	60	210	540	630	79	nd	nd	nd	nd
Qrc.	42	1	5	nd	Nd	nd	110	63	190	610	680	270	450	nd	323	nd	380	110
Apg	43	nd	nd	nd	Nd	nd	Nd	nd	Nd	230	980	190	100	nd	nd	nd	Nd	nd

CPI: composés identifiés; TR: temps de rétention en minutes

III.3.1.4.3.3. Chromatographie en phase gazeuse

Pour l'analyse de composés contenus dans nos huiles essentielles nous avons utilisé une chromatographie en phase gazeuse.

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) s'applique principalement aux composés volatiles ou susceptibles d'être facilement vaporisés par chauffage sans décomposition. Le mélange à analyser est vaporisé dans une chambre d'injection en tête de colonne. La colonne est placée dans un four dont la programmation de la température influe sur le temps de rétention, il permet d'affiner la séparation des composés du mélange.

A la sortie de la colonne, les composés sont signalés par un détecteur à impact électronique, couplé à un spectrophotomètre de masse (SM). Pour cette étude le modèle du chromatographe (GC-MS) utilisé est représenté ci-dessous.

Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles utilisées sont obtenues par hydrodistillation des feuilles (cfr. III.2). 400 g de feuilles de la plante (partie de la plante) sont introduits dans un ballon de 4 litres ensuite 1,5 litres d'eau déminéralisée y sont ajoutés. Le mélange est porté à l'ébullition pendant 4 heures et l'huile essentielle obtenue est extraite au moyen d'une seringue.

La solution recueillie est séchée sur un sel de Na_2SO_4 anhydre. L'huile essentielle est filtrée, puis gardée au frais (+4°C) jusqu'à l'analyse par GC-MS.

Appareillage

Les analyses GC-MS sont réalisées avec un appareil Perkin Elmer- MS Clarus 500. La colonne utilisée est une Elite (phase stationnaire 5 % diphényle/ 95 % diméthyle polysiloxane) de 30 m long, d'un diamètre intérieur de 0,25 mm et d'une épaisseur de film de la phase stationnaire de 0,25 μm . Le gradient de température du four varie de 50 °C à 350 °C à raison de 5°C/ min. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est de 0,75 ml/ min.

L'acquisition du spectre de masse est effectuée sur un spectrophotomètre de masse quadripôle avec une gamme m/z compris entre 20 et 400 avec 0,1 scan/s et une énergie d'ionisation d'électrons de 70 eV.

La température de la source, de la ligne de transfert et du détecteur est de 350 °C. L'échantillon à analyser est solubilisé dans du dichlorométhane (1 μl de l'extrait d'huile est dissous dans 5 ml de DCM). L'analyse de chaque échantillon a été répétée trois fois.

III.3.1.4.3.4. Résultats (GC-MS)

- Extraits des huiles essentielles de *D. oliveri*

Le spectre d'analyse GC-MS des huiles essentielles dérivées des feuilles de *D. oliveri* est représenté dans la figure 38. Plusieurs composés ont été identifiés dont les plus importants sont rapportés dans le tableau 24.

Au vu de ces résultats, nous constatons que ces huiles sont riches de humulène époxyde II (29,30 %); de l'oxyde de caryophyllène (23,13%); de l'acide palmitique (19,27%); de 3, 4, 4a, 5, 6, 8a-hexahydro-2,5,5, de 8a-2H-1-benzopyrane (8,65%); de l'anhydride méthacrylique (6,79%); de l'linalool (5,33%); de phytone (4,78%); de géraniol (2,24%); de méthyle-6 heptène-5, de l'one-2 (1,63%); de l' α -cadinole (1,74 %) et de limonène (1,40 %).

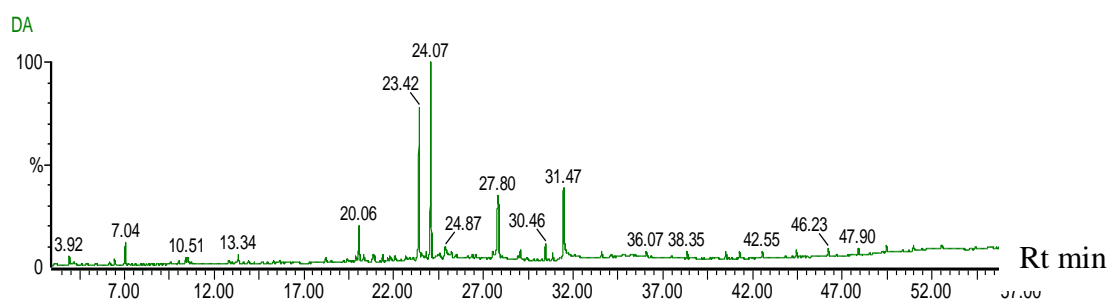


Figure 38: Chromatogramme d'analyse GC-MS des huiles essentielles de *D. oliveri*

Tableau 24: Analyse quantitative et qualitative des huiles essentielles de *D. oliveri*

Ref	Rt (min)	Nom du composé	% (v/v ml)
1	3,92	(hexene-3), ol-1	0,56
2	6,43	benzaldéhyde	0,42
3	7,04	méthyl-6 heptène-5, one-2	1,63
4	10,40	géraniol	2,24
5	10,52	perlagonaldehyde	0,61
6	12,81	limonène	1,40
7	13,14	méthyl benzoate	0,51
8	13,34	périllaldehyde	0,56
9	19,89	isobutylidène acétone	0,55
10	20,07	Linalool	5,33
11	20,32	méthylène-7, bicyclo [4, 1,0] heptane,	0,60
12	20,88	β-ionone	0,56
13	23,41	oxyde de caryophyllène	23,13
14	24,06	humulène époxyde II	29,30
15	24,85	α-cadinole	1,74
16	27,81	anhydride methacrylique	6,79
17	27,84	3, 4,4a, 5, 6,8a-hexahydro -2, 5, 5,8a-2H-1-benzopyrane	8,65
18	29,06	phytone	4,78
19	30,86	acide éthanedioïque	0,64
20	31,47	acide palmitique	19,27
21	41,28	acide phthalique	0,63
22	42,54	octadecaméthyl-cyclononasiloxane	1,63

- **Extraits des huiles essentielles de *D. adscendens***

Le profil chromatographique des analyses quantitatives et qualitatives (GC-MS) des huiles essentielles des feuilles de *D. adscendens* est représenté par la figure 39. Au cours de ces analyses, au moins 200 composés ont été identifiés.

Les composés majoritaires sont rapportés dans le tableau 25. De ces résultats, nous remarquons que les huiles essentielles du *D. adscendens* sont majoritairement constituées de phytone (14,72 %), de l'oxyde de caryophyllène (11,32%), de l'esdesma (7,41%), du géraniol (5,42 %), de linalool (5,33%), de l'acide palmitique (5,06 %), de l'α-caryophyllène (4,76 %), du scytalone (3,83%), du β-ionone (3,47%), du diméthyl-2,2 hexanale (3,37 %), du pérargonaldehyde (3,26 %), d'hyperforine (3,27%), du pentyl-2 furane (2,71), de l'acide oléique (2,68 %), de l'azido-4 heptane (2,02 %), du méthyl-1 silabenzène (1,97 %), de l'hexen-3-ol-1 (1,92 %), de l'α-terpinolène (1,82%), de l'acide margarique (1,71 %), de l'humulène époxyde II (1,68%), de l'α-isométhyl ionone (1,67 %), de l'acide mandelique (1,48%), de l'acide linoléique (1,42 %), de l'α-terpinène (1,29%) et du cétanole (1,22 %).

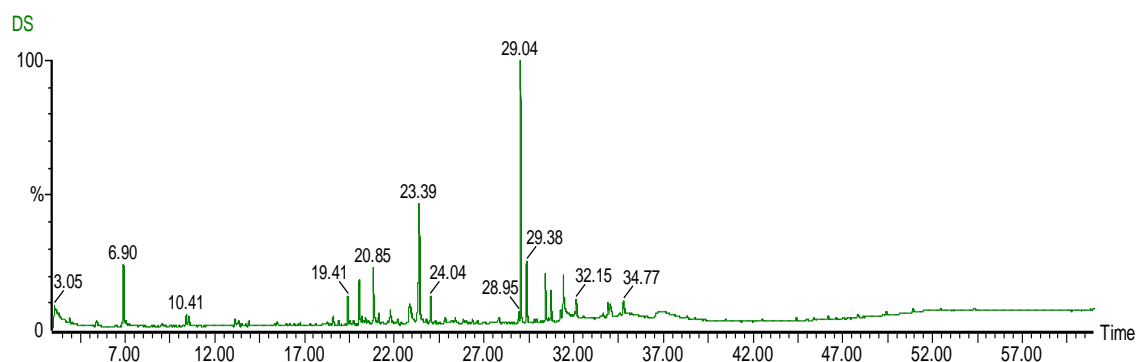


Figure 39: Chromatogramme d'analyse GC-MS des huiles essentielles de *D. adscendens*

Tableau 25: Analyses qualitatives et quantitatives des huiles essentielles du *D. adscendens*

Ref	Rt (min)	Nom du composé	% (v/v ml)
1	3,08	pentyl-2 furane	2,71
2	3,16	méthyl-1 silabenzène	1,97
3	3,32	azido-4 heptane	2,02
4	3,65	N-méthyl pyrrolidine-2 méthanamine	0,57
5	3,92	hexène-3, ol-1	1,92
6	6,90	diméthyl-2,2 hexanale	3,37
7	6,97	octènol-3	0,55
8	10,40	géraniol	5,42
9	10,54	pélargonaldehyde	3,26
10	13,14	méthyl benzoate	0,51
11	13,34	périllardéhyde	0,57
12	19,40	α -terpinolène	1,82
13	20,04	Linalool	2,64
14	20,24	α -caryophyllène	4,67
15	20,45	acide mandelique	1,48
16	20,84	β -ionone	3,47
17	20,92	cedrène-8, ol-13	0,62
18	21,15	eudesma	7,41
19	21,78	α -terpinène	1,29
20	21,81	(pentyl-2)- 3-cyclopentanetrione-1, 2,4	0,58
21	22,85	acide oléique	2,68
22	23,38	oxyde de caryophyllène	11,32
23	24,04	humulène époxyde II	1,68
24	29,05	phytone	14,72
25	29,37	scytalone	3,83
26	30,44	hyperforine	3,07
27	31,47	acide palmitique	5,06
28	31,68	acide margarique	1,71
29	32,15	α -isométhyl ionone	1,67
30	33,91	linoléique	1,42
31	34,02	nonadecatriène- 4, 6,9	0,83
32	34,78	cétanole	1,22

- **Extrait des huiles essentielles de *F. capensis***

La figure 40 montre le profil chromatographique des analyses Gs-Ms des huiles essentielles des feuilles de *F. capensis*. Les résultats de ces analyses sont inscrits dans le tableau 26. De ces résultats nous remarquons que les composants majoritaires de ces huiles sont le carvacrol (65,78%), l' α -caryophyllène (29,81%), l'oxyde de caryophyllène (5,21%), l'hexahydrofarnesylacétone (5,21%), le méthyle-1 silabenzène (3,97%), le β -ionone (2,90 %), le linalool (1,53 %), le pentyl-2 furane (1,40 %) et l'acide palmitique (1,16%).

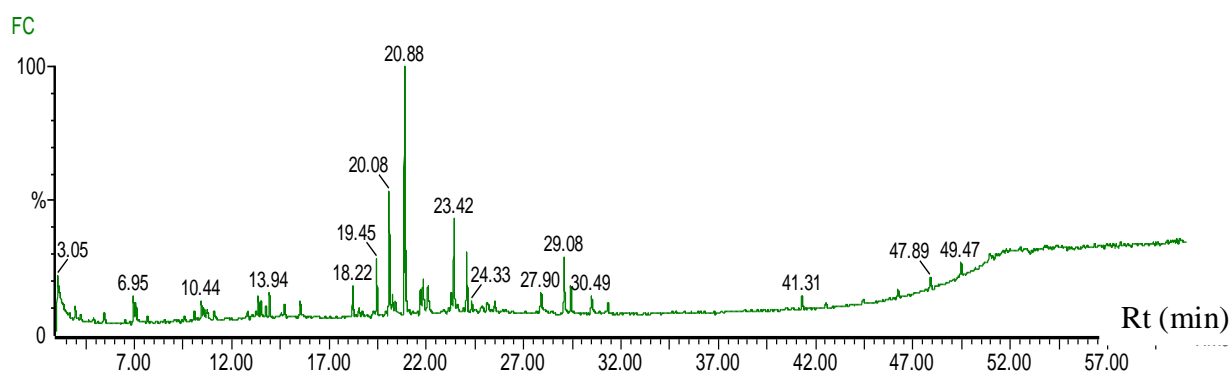


Figure 40: Profil d'analyse chromatographique des huiles essentielles des feuilles de *F. capensi*

Tableau 26: Composition phytochimique des huiles essentielles du *F. capensis*

Ref.	Rt (min)	Nom du composé	(% v/v ml)
1	3,09	pentyl- 2 furane	1,40
2	3,15	méthyle-1 silabenzène	3,97
3	3,92	hexène-3-ol-1	0,67
4	6,95	octénol-3	0,34
5	7,04	méthyle-6 heptène-5 one-2	0,18
6	10,52	pelargonaldehyde	0,47
7	13,94	hexahydrofarnesylacetone	5,21
8	18,29	damascenone (rose cétone)	0,38
9	19,40	α -terpinolène	0,25
10	20,09	linalool	1,53
11	20,26	α -caryophyllène	29,81
12	20,88	β -ionone	2,90
13	20,96	methyl-2 hexyne-3	0,69
14	21,70	dimetyl-3,3 heptane	0,23
15	22,85	acide oléique	0,46
16	23,43	oxyde de caryophyllène	5,21
17	27,93	carvacrol	65,78
18	29,06	phytone	0,65
19	29,37	scytalone	0,69
20	31,47	acide palmitique	1,16

- **Extraits des huiles essentielles des feuilles de *S. rebaudiana* par GC-MS**

A l'aide de cette méthodologie, nous avons réussi, pour la première fois, à établir le profil chromatographique des analyses huiles essentielles de *S. rebaudiana* par GC-MS (figure 41). Les résultats de ces analyses sont repris dans le tableau 27. Ces résultats nous indiquent que majoritairement elles sont constituées de carvacrol (67,89 %), de l'oxyde de caryophyllène (23,50 %), de spathulenole (15,41 %), de l'eudesma (5,59 %), de cardinole (5,59 %), de l'acide oléique (4,63 %), de l' α -isométhyl ionone (4,01%), de l' α -pinène (3,75%), de diméthyl-7,11 méthylène-3 dodecatriène-1, 6, 10 (3,61%), de phytone (3,43 %), de l'acide palmitique (2,45 %), de géraniol (1,94%), de pentadécène-10,yn-5, ol-1 (1,31%), de l'éthényl-1-méthyl-1 bis (méthyléthényl-1)- 2,4 cyclohexane (1,31%), de l'isopinocarveole (1,26 %), de triméthyl-3,7,11 dodécatriène-1, 3, 6, 10 (1,25 %) et de l' α -caryophyllène (1,15 %).

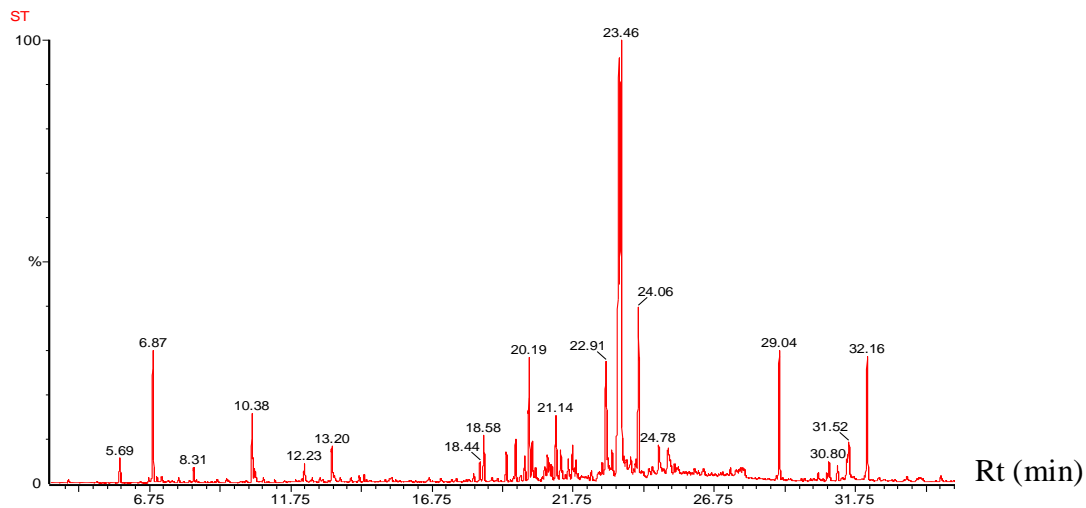


Figure 41: Profil chromatographique d'analyses GC-MS des huiles essentielles de *S. rebaudiana*

Travaux personnels

Tableau 27: Composition phytochimique des huiles essentielles de feuille *S. rebaudiana*

Ref	Rt (min)	Nom du composé	% v/v (ml)
1	5,70	diméthyl-3,7 octatriène-1, 3,6	0,67
2	6,87	α -pinène	3,75
3	10,38	Géranol	1,94
4	10,47	pentadecadien-2, 5 ol-1 (Z, Z)	0,50
5	12,22	pinène-2(10) one-3	0,48
6	12,81	limonène	0,46
7	13,20	isopinocarveole	1,26
8	18,43	β -bourbonène	0,55
9	18,58	pentadecène-10,yn-5,ol-1	1,31
10	19,38	α -terpinolène	0,98
11	19,71	triméthyl-3, 7,11 dodécatriène-1, 3, 6, 10	1,25
12	20,03	linalool	0,71
13	20,19	diméthyl-7,11 méthylène-3dodecatriene-1, 6,10	3,61
14	20,29	α - caryophyllène	1,15
15	20,73	éthyl-5 méthyl-3 nonadiène-3,4 yne-6	0,60
16	20,84	β -ionone	0,59
17	20,90	cedrène-8 ol-13	0,53
18	21,14	eudesma	5,59
19	21,30	azulène	0,94
20	21,57	α -farnésène	0,56
21	22,85	acide oléique	4,63
22	23,12	ledole	0,64
23	23,36	spathulenole	15,41
24	23,46	oxyde de caryophyllène	23,50
25	23,97	humulène époxyde II	0,55
26	24,85	α -cadinole	5,59
27	27,67	acide propénoïque 2, méthyl-2, éthenyl ester	0,51
28	27,74	N-benzène sulfonyloxy bis(trifluoromethyl) -2,2-aziridine	0,76
29	27,93	carvacrol	67,89
30	29,04	phytone	3,43
31	30,80	acide éthanedioïque	0,65
32	31,11	dispers jaune 1	0,47
33	31,52	acide palmitique	2,45
34	32,16	α -isométhyl ionone	4,01

- Extrait des huiles essentielles des feuilles de *Vitex doniana* par GC-MS

Le profil chromatographique des analyses GC-MS est représenté dans la figure 42 et les résultats de ces analyses sont repris dans le tableau 28. De ces résultats, nous pouvons dire que les composés majoritaires sont l'acide margarique (23,88%), l'alcool myristique (17,42%), l'asarone (7,20%), le scytalone (3,18%), l'acide myristique (3,05%), l'hyperforine (2,55%), le diméthyl-2,4 furane (2,37 %), le α -terpinolène (2,34 %), le méthyl-1 silabenzène (2,22%), le linalool (2,22%), le pelargonaldehyde (2,14 %), l'acide oléique (2,11%), le nonadecatriène-4,6,9 (1,59%), l'hexène-3, ol-1 (1,55%), le butenyl-3 propyl ether (1,25%) et le theaspirane (1,23 %).

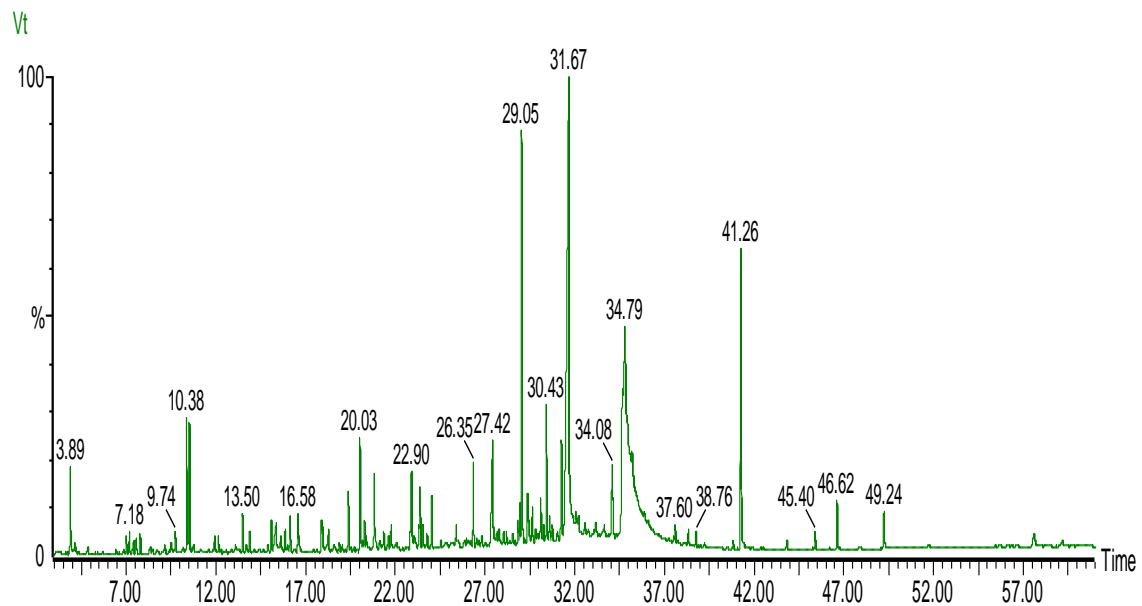


Figure 42: Profil chromatographique des analyses GC-MS des huiles essentielles de *V. doniana*

Travaux personnels

Tableau 28: Composition phytochimique des huiles essentielles de *V. doniana*

Ref	Rt (min)	Nom du composé	(% v/v (ml))
1	3,08	pentyl -2 furane	0,41
2	3,89	hexène-3, ol-1	1,55
3	7,06	méthyl- 6, hepten-5, one- 2	0,70
4	7,55	octanal	0,75
5	7,79	heptadiènal-2,4	0,53
6	9,75	méthyle-1(methylcyclopropy-1') -3 cyclopentène	0,40
7	10,38	géraniol	2,22
8	10,52	pelargonaldehyde	2,14
9	11,94	nonadiènale-2,6	0,49
10	12,15	nonenal-2	0,57
11	13,50	décanale	0,66
12	13,88	triméthyl -2, 6,6 cyclohexene-1 carboxaldehyde	0,52
13	15,09	heptyl-3-acroleine	0,64
14	15,37	acide pelargonique	0,66
15	15,62	triméthyl-1, 5,5 methylene-6 cyclohexene	0,70
16	15,86	α -tocotriènole	0,41
17	16,14	theaspirane	1,23
18	17,88	undécenal-2	0,62
19	17,96	acide caprique	0,41
20	18,22	dehydroisophytol	0,37
21	18,29	damascenone (rose cétone)	0,47
22	19,39	α -terpinolène	2,34
23	20,03	linalool	1,80
24	20,29	α -caryophyllene	0,53
25	21,35	δ -cadinène	0,45
26	21,77	α -terpinène	0,40
27	22,90	acide oleique	2,11
28	23,38	oxyde de caryophyllène	0,53
29	23,53	tétradecanone-3	0,74
30	26,35	tétradecanal	0,65
31	27,43	acide myristique	3,05
32	27,77	asarone	7,20
33	28,84	pentadecadienol-5,10	0,47
34	28,95	phytol	0,65
35	29,37	scytalone	3,18
36	30,43	hyperforine	2,55
37	30,61	heptadecenal-2	0,45
38	31,47	acide palmitique	3,05
39	31,68	acide margarique	23,88
40	34,08	nonadecatriène-4, 6,9	1,59
41	34,13	méthyl-3 butène-2 one-2	0,65
42	34,67	alcool myristique	17,42

III. 3. 1.5. Isolement et caractérisation des composés issus des extraits de *D. adscendens*

Le processus de fractionnement exige la combinaison de plusieurs techniques parmi lesquelles: la chromatographie sur colonne et sur couche mince. Le fractionnement se fait à partir d'une colonne sur gel de silice, la composition de chacune des fractions est déterminée par CCM (plaque: silice 60 F254 support en verre (Merk, Darmstadt, Allemagne)) et est révélée sous UV à 254 nm. Le fractionnement, l'isolement et la purification des composés phénoliques ont été réalisées sur les extraits méthanol-eau des feuilles de *D. adscendens*. Le protocole de fractionnement utilisé est repris ci-dessous (schéma 18).

Protocole:

3 g du résidu de l'extrait méthanol-eau sont chromatographiés sur une colonne de 3 cm de diamètre et de 50 cm de long contenant 100 g de silice (60-200 μ). Un gradient d'élution (DCM / MeOH) a été mis en place, (n-Hexane, DCM, mélange MeOH / DCM qui varie de 1% à 50% en volume), afin de séparer les différents polyphénols en fonction de leur polarité.

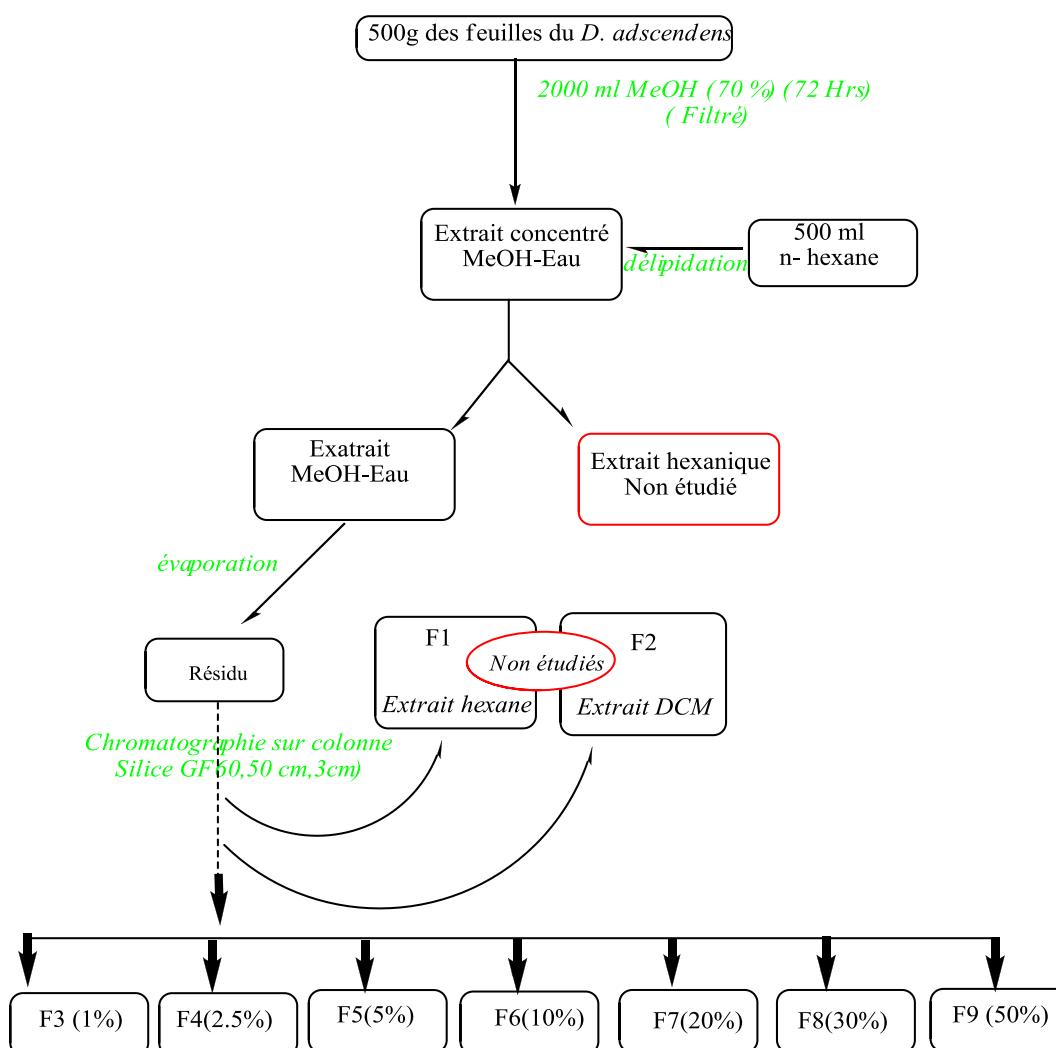


Schéma18: Protocole de séparation des composés polyphénoliques contenus dans les feuilles du *D. adscendens*

Les différentes fractions recueillies (F1 à F9) sont analysées par CCM et les résultats obtenus indiquent que les fractions F1 et F2 ne contiennent aucun composé polyphénolique. Les analyses par CCM des fractions F3 à F8 montrent un nombre très élevés des spots, ce qui indique une mauvaise séparation de ces composés. Cependant, l'analyse de la fraction F9 révèle la présence de 3 spots dont les R_f sont suffisamment distincts.

Cette fraction F9 est traitée par chromatographie sur colonne permettant ainsi d'isoler les composés X_1 à X_{13} . L'isolement de ces différents composés a été effectué en deux étapes. Dans la 1^{ère} un fractionnement par colonne a conduit à la récupération de plusieurs fractions dont l'analyse par HPLC indique la présence d'un composé majoritaire. Dans la 2^{ème} étape, chacune de ces fractions est purifiée par une CCM préparative permettant ainsi d'isoler ce composé majoritaire. Par la suite, le composé est caractérisé par analyses RMN (^1H et ^{13}C) puis par Spectroscopie de Masse (SM).

III.3.1.5.1. Identification des composés isolés

Au départ de la fraction F9, une vingtaine des composés ont été isolés parmi lesquels 8 ont été identifiés par HPLC suivant le principe précédemment indiqué consistant à comparer le temps de rétention des composés isolés à ceux des étalons correspondant (tableau 29). Certains composés isolés n'ont pas été identifiés par manque des étalons équivalents.

Tableau 29: Composés isolés et identifiés

Ref.	Rt (min)	Composé isolé	Composé identifié
1	22,65 ± 0,05	X1	Ni
2	29,32 ± 0,06	X2	acide caféique
3	31,95 ± 0,04	X3	épicatéchine
4	32,79 ± 0,5	X4	Ni
5	34,47 ± 0,03	X5	acide <i>p</i> -coumarique
6	35,35 ± 0,02	X6	Ni
7	35,85 ± 0,07	X7	Ni
8	36,72 ± 0,08	X8	Rutine
9	37,57 ± 0,09	X9	Ni
10	37,98 ± 0,05	X10	quercétine glucosé
11	40,05 ± 0,07	X11	quercétine dihydrate
12	41,63 ± 0,05	X12	acide cinnamique
13	42,65 ± 0,09	X13	quercétine

ni: non identifié

III.3.1.5.2. Caractérisations des composés identifiés

Les solvants contenus dans les mélanges des composés isolés et identifiés sont évaporés sous vide. Une partie du résidu obtenu est immédiatement dissous dans le méthanol deutéré (CD_3OD) pour les analyses structurales par RMN et SM. Notons que, la RMN et la SM nous ont fournis des informations utiles pour la détermination de la structure de base des composés isolés.

III.3.1.5.3. Résultats

III. 3.1.5.3.1. Identifications des composés

Les fractions obtenues après le refractionnement de F9 sur une colonne de silice élué par un mélange Méthanol/ DCM (50/ 50) sont collectés à l'aide d'un collecteur de fractions. Les profils chromatographiques des composés identifiés par HPLC sont représentés par les figures 43 à 49.

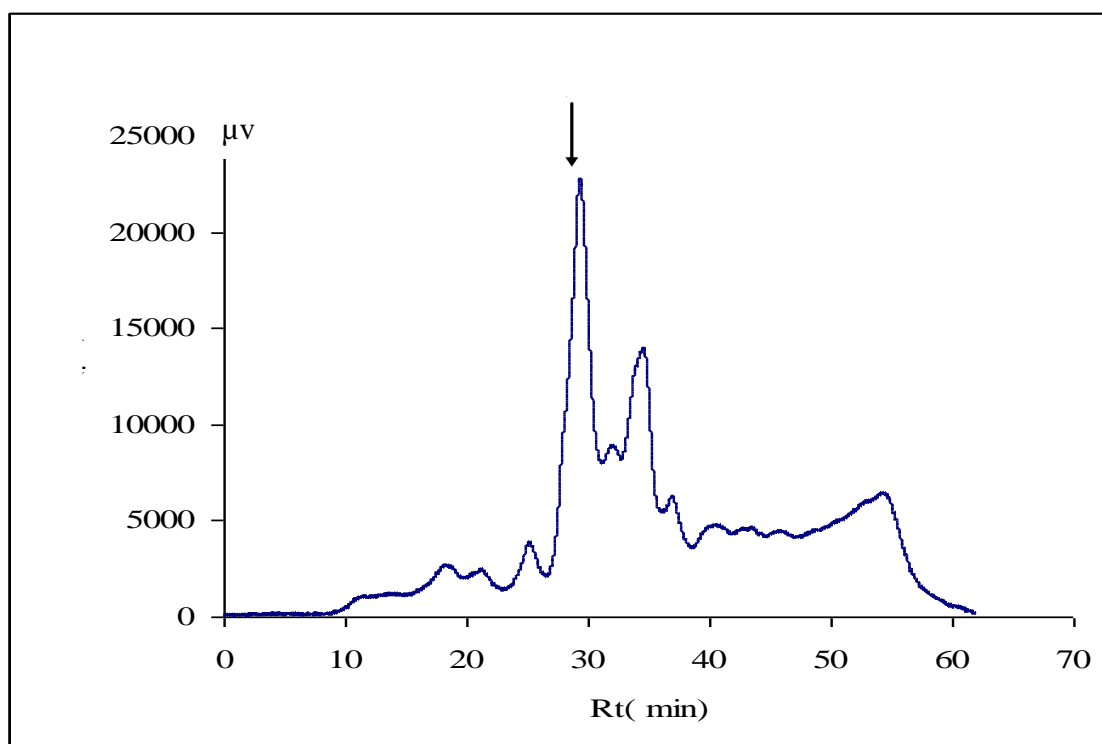


Figure 43: Composé X₂ (acide caféique)

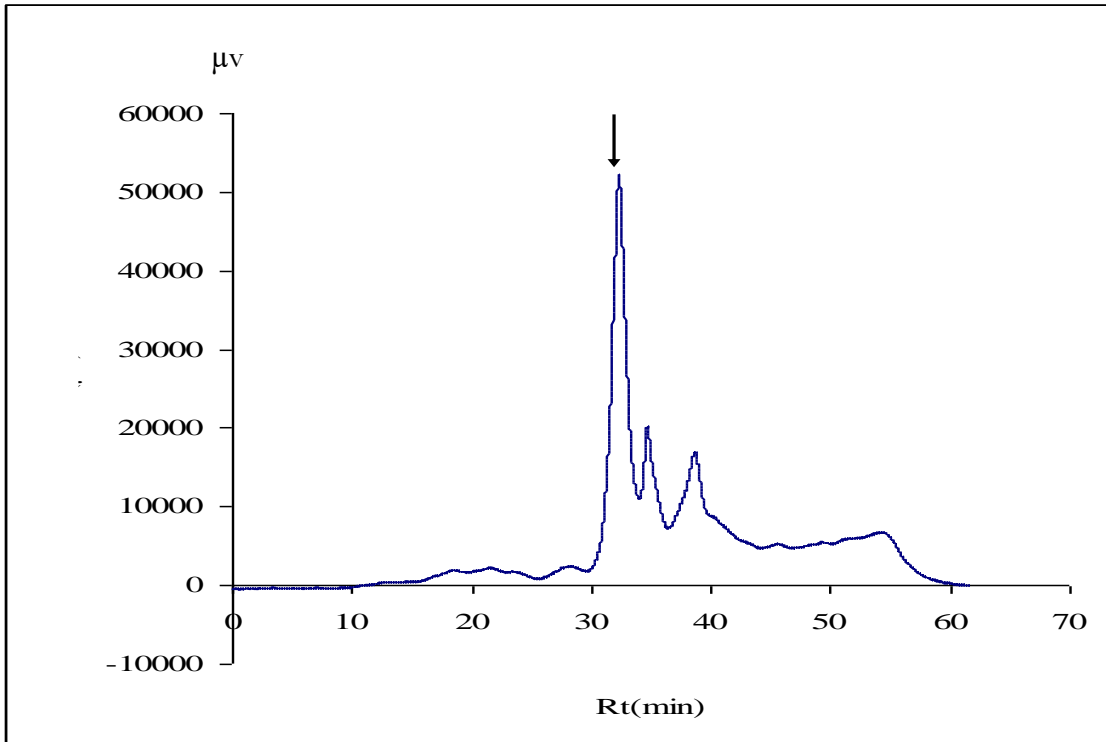


Figure 44 : Composé X₃ (épicatéchine)

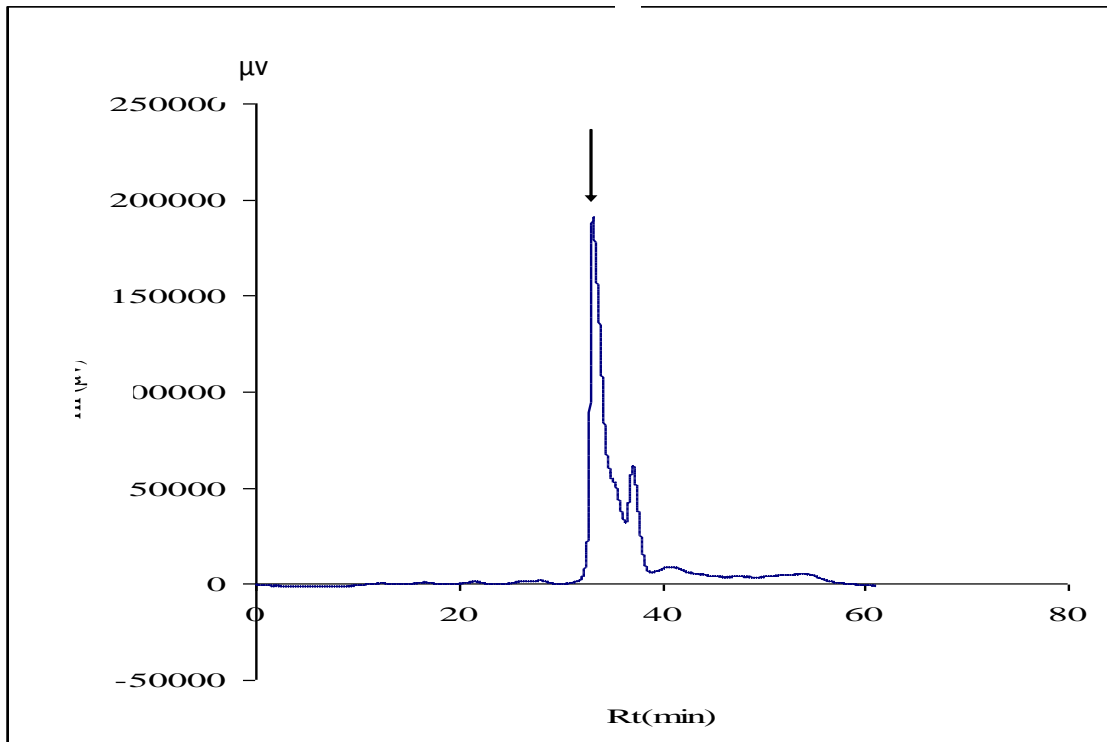


Figure 45 : Composé X₅ (acide *p*-coumarique)

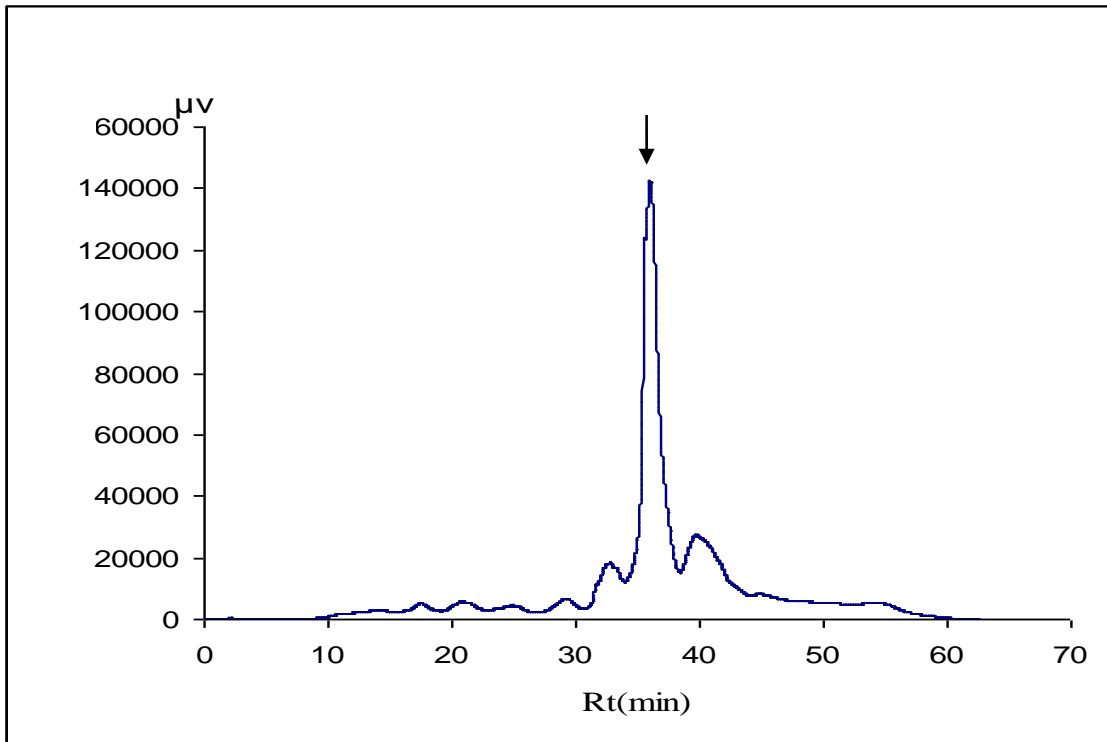


Figure 46: Composé X₈ (rutine)

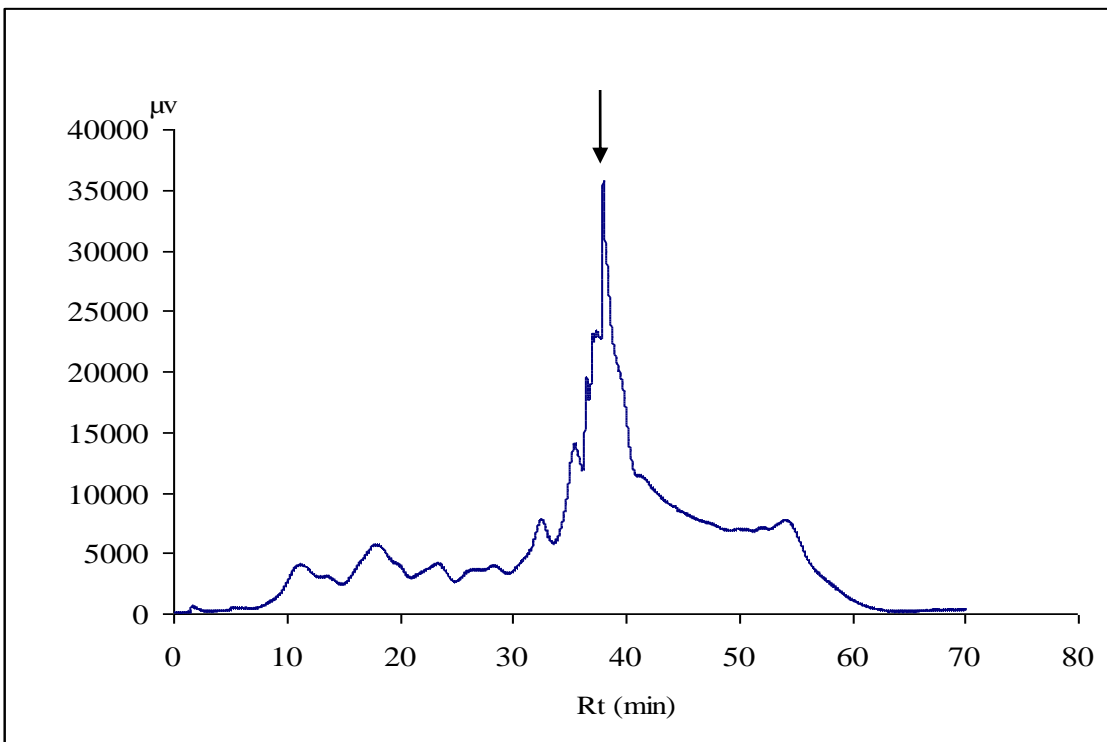


Figure 47 : Composé X₉ (quercétine glucosé)

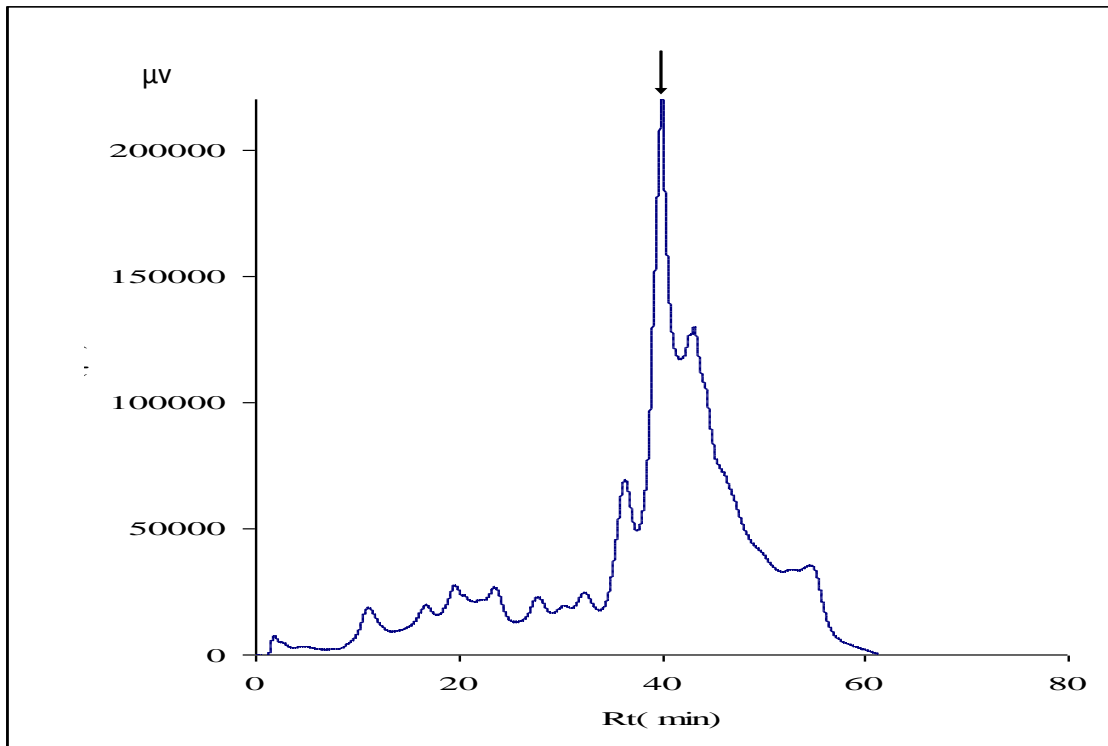


Figure 48 : Composé X₁₁ (acide cinnamique)

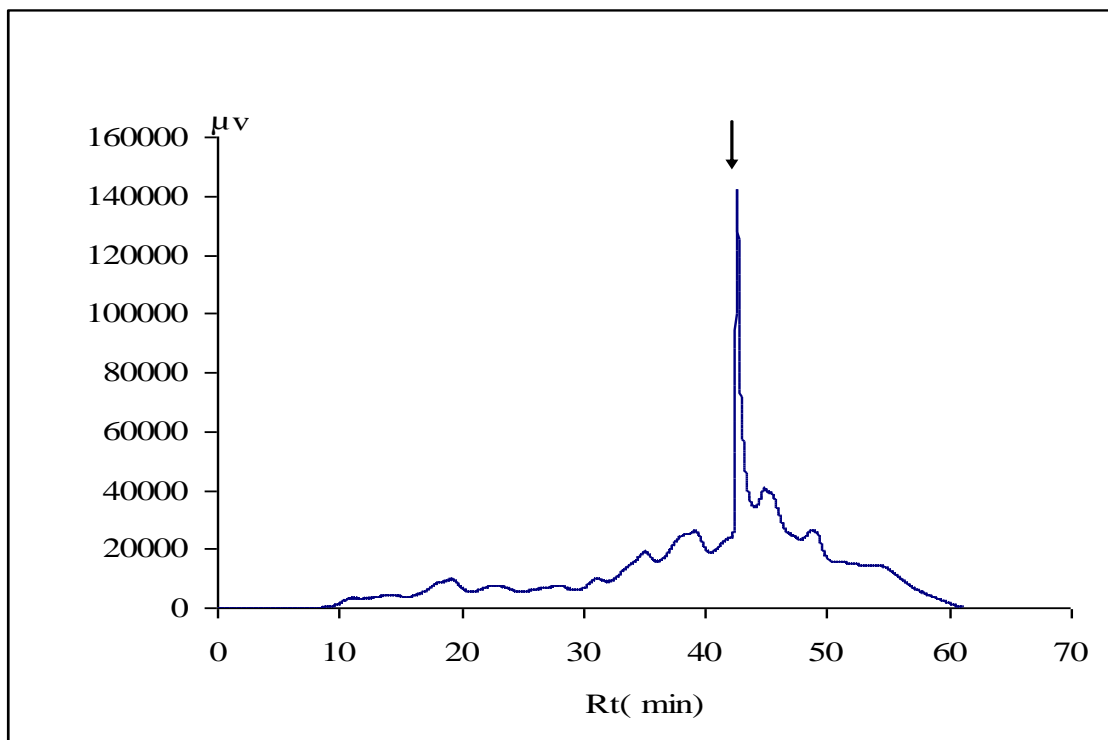


Figure 49 : Composé X₁₃ (quercétine)

CCM préparative

Les systèmes d'élution suivants ont été utilisés pour réaliser la séparation sur CCM préparative.

La CCM a été conduite sur des plaques de silice en verre 60 F-254 (Merck, Darmstadt, Allemagne), les phases mobiles utilisées, les systèmes d'élutions ainsi que les révélateurs utilisés sont reprises ci-dessous:

Système I: CH₂Cl₂ / MeOH (9:1; 8: 2 et 7: 3); Système II: CH₃COONa / MeOH (9:1; 8: 2 et 7: 3). Les valeurs de R_f de certains composés tels que la rutine, la quercétine, l'acide caféique et l'acide *p*-coumarique calculées dans les systèmes I et II sont rapportés dans le tableau 30.

Tableau 30: Composés isolés et leurs R_fs

Composés		R _f	Observation à 254 nm	
			Système d'élution I	Système d'élution II
Etalons	Identifiés		+	-
	rutine	X ₈	0,47 ± 1	+
	quercétine	X ₁₃	0,55 ± 1	+
	acide caféique	X ₂	0,61 ± 1	-
		X ₃	0,65 ± 1	-
acide <i>p</i> -coumarique		X ₅	0,68 ± 1	+
		X ₁	0,70 ± 1	+
		X ₄	0,72 ± 1	-
acide cinnamique		X ₁₂	0,75 ± 1	+
		X ₆	0,78 ± 1	+
		X ₇	0,81 ± 1	+
		X ₉	0,84 ± 1	+
		X ₁₀	0,88 ± 1	+
	X ₁₁	0,92 ± 1	+	-

+: détecté; - non: non détecté

III.3.1.5.3.2. Caractérisation des composés identifiés

- Caractérisation des composés par RMN

La RMN est un outil d'analyse destiné à élucider les structures des composés organiques. Les noyaux les plus souvent étudiés sont le ¹H et le ¹³C. La RMN du ¹H peut être relativement rapide. Grâce aux déplacements chimiques des différents signaux et à leur mode de couplage, il est possible de déterminer la structure de petites molécules organiques par application d'un raisonnement logique simple.

La RMN du ^{13}C permet de retrouver tous les carbones de la molécule et de déterminer leur déplacement chimique en fonction de leur environnement. Les appareils récents permettent d'obtenir rapidement les spectres RMN ^1H et ^{13}C , ceux-ci avec ou sans découplage du proton.

Cependant, dans le cas de molécules complexes cette analyse s'avère insuffisante pour caractériser la structure de la molécule. C'est dans ce cadre que les expériences de RMN à 2 dimensions (RMN 2D) offrent des améliorations considérables dans la résolution des spectres et permettent la caractérisation des structures de molécules complexes.

Nous exposerons ici les types d'expériences homonucléaire et/ou hétéronucléaire menées en RMN 2D pour la détermination de structures.

❖ homonucléaire

L'une des techniques les plus importantes est l'expérience COSY (homonuclear COrelated SpectroscopY), dont les spectres montrent les déplacements chimiques du proton dans 2 dimensions F1 et F2. Les pics de la diagonale (F1=F2) représentent le spectre original obtenu dans l'expérience 1D, les taches hors de la diagonale montrent l'existence d'un couplage scalaire (J_{HH}) entre deux noyaux.

Ces taches apparaissent de façon symétrique par rapport à la diagonale et sont centrées aux coordonnées correspondant aux déplacements chimiques des deux noyaux couplés. La corrélation s'arrête quand il ya un carbone quaternaire.

L'expérience NOESY (Nuclear Over hauser Effect spectroscopY) a l'avantage par rapport à la technique COSY de montrer des interactions de longue distance entre deux protons, traduisant ainsi leur proximité spatiale.

❖ hétéronucléaire

Dans le cas de molécules complexes dont les signaux en RMN du proton sont superposés, l'attribution des résonances est impossible à l'aide des seules expériences homonucléaires, on a recours à la RMN 2D hétéronucléaire ^{13}C , ^1H .

Cependant, étant donné que le rapport signal sur bruit d'une expérience RMN est directement proportionnel aux rapports gyrométriques des noyaux excités et détectés, il en résulte qu'une expérience dans laquelle on détecte les noyaux ^{13}C à une sensibilité beaucoup plus faible qu'une expérience réalisée sur les protons. Pour résoudre cette difficulté, la RMN hétéronucléaire exploite l'existence d'un couplage scalaire ($J_{\text{C-H}}$) hétéronucléaire qui transfère la polarisation du noyau le plus sensible (^1H) vers le noyau le moins sensible (^{13}C).

Ce qui permet soit de corrélérer les signaux d'un proton à celui du noyau ^{13}C auquel il est lié dans le cas des expériences HMQC (^1H -detected chemical shift correlation via Multiple Quantum Coherence), ou de déterminer des couplages lointains ^1H - ^{13}C à travers 2, 3 ou 4 liaisons, dans le cas des expériences HMBC (^1H -detected chemical shift correlation via Multiple Band Coherence).

Pour l'ensemble de nos expériences RMN (1D et 2D), nos composés ont été dissous dans du CD_3OD et les analyses ^1H et ^{13}C ont été effectuées sous un champ de 250 MHz.

- Caractérisation des composés par SM

Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse d'ions moléculaires en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Sa structure comporte une source d'ionisation suivie d'un ou plusieurs analyseurs qui séparent les ions produits selon leur rapport m/z , d'un détecteur qui compte les ions et amplifie le signal et enfin d'un système informatique pour traiter le signal.

Le résultat obtenu est un spectre de masse représentant les rapports m/z de l'ion moléculaire et des ions fragments caractéristiques détectés selon l'axe des abscisses et l'abondance relative de ces ions selon l'axe d'ordonnées. Le schéma 19 nous montre la structure générale d'un spectromètre de masse.

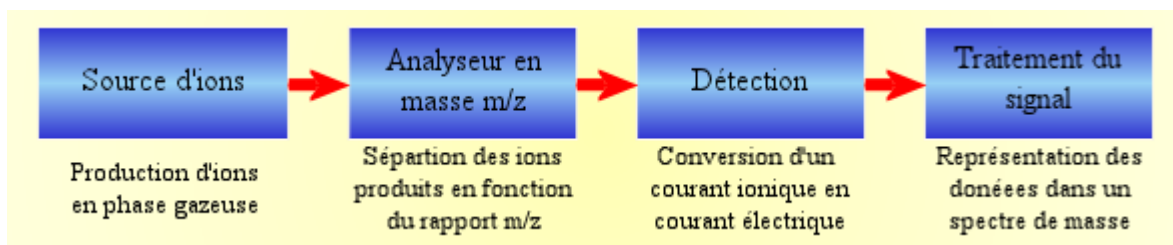


Schéma 19: Structure d'un spectromètre de masse

- *Le système d'introduction de l'échantillon* : l'échantillon peut être introduit directement dans la source, sous forme liquide ou solide ou encore par l'association à une méthode séparative (chromatographie en phase liquide, chromatographie en phase gazeuse, électrophorèse capillaire, ...).

- *La source d'ionisation* : elle consiste à vaporiser et ioniser les molécules. Une source d'ionisation peut être utilisée soit en mode positif ou en mode négatif. Plusieurs type de sources d'ionisation existent parmi lesquelles nous pouvons citer l'ionisation électronique (IE), l'ionisation chimique (IC), le bombardement par atomes rapides (FAB), l'électrospray et l'ionisation-désorption laser.

- *L'analyseur* : il est composé d'un dipôle ou d'un quadripôle magnétique qui dévie la trajectoire des différents ions en fonction de leur rapport m/z . Les analyseurs se différencient par leur principe de mesure de ce rapport m/z en fonction de la dispersion des ions, à partir de leur moment magnétique ou de leur énergie cinétique (instruments à secteur magnétique ou électrique).

- *Le détecteur et le système de traitement* : le détecteur dénombre les ions piégés et converti leur nombre en signal électrique. Plus les ions sont nombreux, plus le courant est important. De plus, le détecteur amplifie le signal obtenu pour qu'il puisse être traité informatiquement.

La spectrométrie de masse sert donc à caractériser les structures moléculaires à partir de leur ion moléculaire et des ions fragments qui en découlent. Un spectre de masse est donc caractéristique d'une molécule donnée.

Ainsi il est possible d'identifier la molécule soit en interprétant son mode de fragmentation, soit en comparant son spectre avec une banque de données (banques des spectres).

Dans nos travaux, les spectres SM ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre à quadripôle sous électrospray et en mode ions négatives.

III.3.1.5.3.3. Résultats des analyses RMN et SM

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C de nos composés sont reportés sur les figures 50, 51, 53, 54, 56, 57, 59, 60, 62, 63 et les profils des spectres SM correspondants sont illustrés par les figures 52, 55, 58, 61, 64. Les attributions des différents signaux par RMN et des pics moléculaires par SM permettent de préciser la structure des différents composés que nous avons réussi à isoler par chromatographie.

Composé X₅

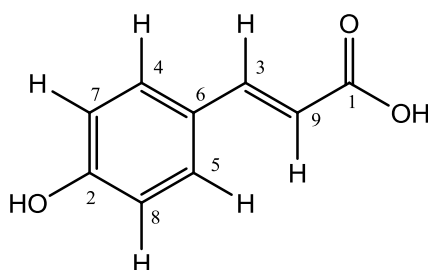
❖ RMN: Les résultats RMN 1D (^1H et ^{13}C) sont rassemblés dans le tableau 31. Les expériences HMQC en RMN 2D ont permis d'établir les corrélations suivantes: (H-4/ C-4, H-5/ C-5, H-7/ C-7, H-8/ C-8). Les signaux caractéristiques δ 7,46-7,43 ppm (2H, m) et 6,82-6,81 ppm (2H, m) indiquent la présence d'un noyau aromatique substitué en para. Les signaux situés à δ 7,63-7,57 ppm (1H, d, J=15Hz) et δ 6,31-6,25 ppm (1H, d, J=15Hz) révèlent qu'il s'agit d'un composé éthylénique de configuration trans.

❖ SM: Le spectromètre de masse du composé révèle un pic moléculaire de masse $[M-H]^-$, $m/z = [164,04 - 1]$ correspondant à la masse molaire de l'acide *p*-coumarique.

Les analyses spectrales par RMN 1H et ^{13}C figures (55,56) et par SM figure (53) montrent que le composé X_5 est de l'acide *p*-coumarique (120). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Gerothanassis et al. [189].

Tableau 31: Caractéristiques structurales RMN du composé X_5

Atome (X_5)	$^1H\delta$ (ppm)	J(Hz)	$^{13}C, \delta$ (ppm)
1			171,03
2			162,16
3	7,63-7,57 (d)	15	146,66
4,5	7,46-7,43 (m)		131,09
6			127,23
7,8	6,82-6,81 (m)		116,80
9	6,31-6,25 (d)	15	115,59



(120) (X_5) acide *p*-coumarique

Composé X_2

❖ RMN : Les résultats RMN 1D (1H et ^{13}C) sont rassemblés dans le tableau 32. Les expériences HMQC en RMN 2D ont permis d'établir les corrélations suivantes: (H-4/ C-4, H-6/ C-6, H-7/ C-7, H-8/ C-8 et H-9/ C-9).

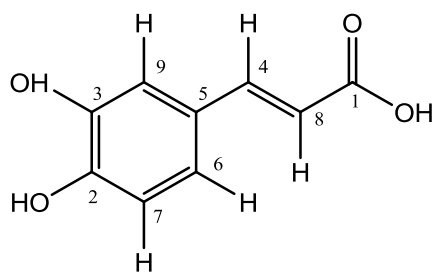
Les signaux caractéristiques δ 7,04-6,75 ppm (3H, m) indiquent bien la présence d'un noyau aromatique semblable à ceux de l'acide *p*-coumarique mais porteur de 3H. Aussi, les signaux éthyléniques (δ 7,53-7,50) ppm (2H, m) de configuration trans sont ressemblé à celui de l'acide *p*-coumarique.

❖ SM: Le spectre de masse (SM) révèle un pic moléculaire de masse $[M-H]^-$, $m/z = [180,12 - 1]$ correspond à la masse molaire de l'acide caféique.

Les analyses spectrales par RMN ^1H et ^{13}C figures (58, 59) et par SM figure (55) indiquent donc que le composé X_2 est de l'acide caféique (121). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Gerothanassis et al. [189].

Tableau 32: Caractéristiques structurales RMN du composé X_2

Atome (X_2)	^1H δ (ppm)	J(Hz)	^{13}C δ (ppm)	HMQC
1			171,03	
2			149,47	
3			147,03	
4	7,53-7,50 (d)	17	146,81	H-4/ C-4
5			127,78	
6	6,79-6,75 (m)		122,84	H-6/ C-6
7	6,95-6,91 (m)		116,47	H-7/ C-7
8	6,24-6,18 (d)	17	115,51	H-8/ C-8
9	7,04-7,03 (m)		115,05	H-9/C-9



(121) (X_2) acide caféique

Composé (X_8)

❖ RMN: Les résultats RMN 1D (^1H et ^{13}C) et les expériences HMQC en RMN 2D sont rassemblés dans le tableau 33. Comme le montre ces résultats, le composé X_8 est un flavonoïde diglycosylé dont le spectre ^1H présente des signaux caractéristiques des protons des 2 cycles aromatiques A et B. En effet, les protons à δ 6,21 ppm (1H, d, $J = 1,3$ Hz) et 6,20 ppm (1H, d, $J = 1,3$ Hz) couplant en AX et les protons 7,67-6,85 ppm (3H, m) sont respectivement des signaux caractéristiques des noyaux aromatiques A et B des flavonoïdes. Les signaux ^1H et ^{13}C suggèrent qu'il s'agit d'un dérivé diglycosylé comme le rapporte les travaux de Niassy et al. [197]. En effet, la valeur élevée de la constante de couplage observée pour le signal du proton anomérique d'un des sucres centré à δ 5,12 ppm (1H, d, $J = 7,5$ Hz) indique que ce sucre est sous la forme β -D-glucopyranose, l'autre proton anomérique à δ 3,83 ppm (1H, d, $J = 10$ Hz) et le méthyle à δ 1,28 ppm (3H, d, $J = 7$ Hz) dont le carbone résonne à δ 17,88 ppm, montrent que ce sucre est correspond à l' α -L-rhamnose.

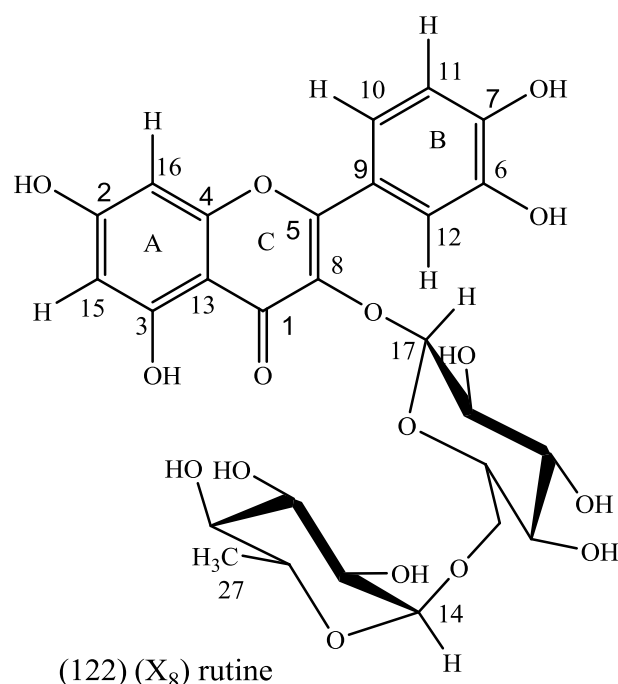
Travaux personnels

❖ SM : Le spectre de masse du composé X₈ révèle un pic moléculaire de masse [M-H]⁻ m/z = [610,52 - 1], correspondant à la masse molaire de la rutine.

Les analyses spectrales par RMN ¹H et ¹³C (figures 61, 62) et par SM figure (58) indiquent que le composé X₈ correspond à la rutine (122). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Niassy et al. [190].

Tableau 33: Caractéristiques structurales RMN du composé X₈

Atome (X ₈)	¹ H δ (ppm)	J(Hz)	¹³ C δ (ppm)	HMQC
1			179,37	
2			170,53	
3			166,38	
4			162,94	
5			159,31	
6			158,35	
7			149,95	
8			145,94	
9			135,62	
10	7,67-7,62 (m)		123,59	H-10/ C-10
11	7,67-7,62 (m)		123,11	H-11/ C-11
12	6,89-6,85 (d)	10	117,67	H-12/ C-12
13			115,95	
14	3,83-3,79 (d)	10	105,44	H-14/ C-14
15	6,40 (s)		104,68	H-15/ C-15
16	6,21-6,20 (d)	1,3	102,39	H-16/ C-16
17	5,12-5,09 (d)	7,5	100,09	H-17/ C-17
18	3,83-3,79 (m)		94,94	H-18/ C-18
19	3,63-3,06 (m)		78,13	H-19/ C-19
20	3,63-3,06 (m)		77,17	H-20/ C-20
21	3,63-3,06 (m)		75,64	H-21/ C-21
22	3,63-3,06 (m)		73,92	H-22/ C-22
23	3,63-3,06 (m)		72,20	H-23/ C-23
24	3,63-3,06 (m)		72,09	H-24/ C-24
25	3,63-3,06 (m)		69,70	H-25/C-25
26	3,63-3,06 (m)		68,38	2H-26/ C-26
27	1,28-1,25 (d)	7	17,88	3H-27/C-27



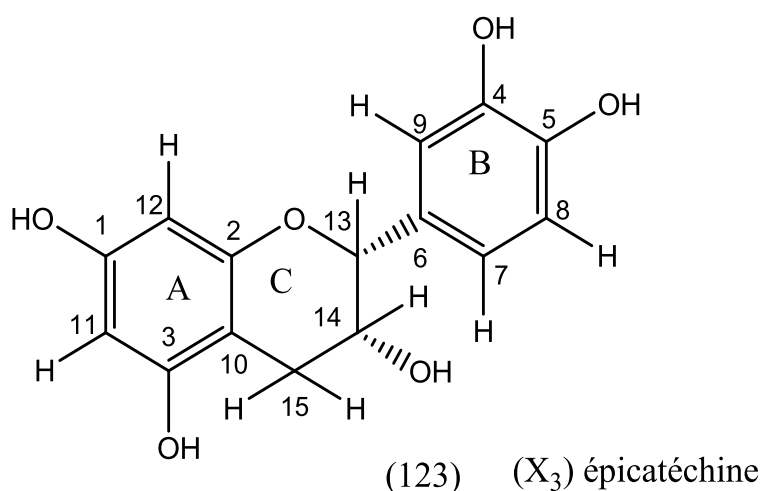
Composé (X_3)

❖ RMN: Les résultats RMN 1D (^1H et ^{13}C) et les expériences HMQC en RMN 2D rassemblés dans le tableau 34 indiquent que ce composé est également un flavonoïde. Les caractéristiques de son spectre ^1H dans le CD_3OD présente bien des signaux caractéristiques des protons aromatiques notamment les protons à δ 5,94 ppm (1H, m) et 5,90 ppm (1H, m) caractéristique du cycle A des flavonoïdes. Et les protons qui se signalent à δ 6,98-6,97 ppm (1H, d, $J= 2,5$ Hz) et δ 6,82-6,74 ppm (m) sont caractéristiques du noyau B.

❖ SM: Le spectre de masse du composé X_3 révèle un pic moléculaire de masse $[\text{M}-\text{H}]^-$, $m/z = [290,27-1]$ correspondant à la masse molaire soit de l'épicatéchine soit de la catéchine. Les analyses spectrales par RMN ^1H et ^{13}C (figures 64, 65), par SM figure (61) et HPLC indiquent que le composé X_3 correspond à l'épicatéchine (123). Ces résultats sont en accord avec les travaux réalisés par Saucier et al. [191].

Tableau 34: Caractéristiques structurales RMN du composé X₃

Atome (X ₃)	¹ H δ (ppm)	J(Hz)	¹³ C δ (ppm)	HMQC
1			158,01	
2			157,67	
3			157,37	
4			145,94	
5			145,78	
6			132,29	
7	6,82-6,74(m)		119,38	H-7/C-7
8	6,82-6,74(m)		115,87	H-8/C-8
9	6,98-6,97(d)	2,5	115,31	H-9/C-9
10			100,05	
11	5,94-5,90(m)		96,36	H-11/C-11
12	5,94-5,90(m)		95,87	H-12/C-12
13	5,94-5,90(s)		79,88	H-13/C-13
14	4,81-4,16(m)		67,49	H-14/C-14
15	2,92-2,69(m)		29,27	2H-15/C-15



Composé (X₁₃)

❖ RMN: Les données des spectres ¹H et ¹³C dans le tableau 35 indiquent que ce composé est un flavonoïde. Les caractéristiques de son spectre ¹H dans le CD₃OD présente bien des signaux caractéristiques des protons aromatiques. Les protons à δ 6,39 ppm (1H, d, J= 2,5 Hz) et à δ 6,38 ppm (1H, d, J= 2,5Hz) couplent en AX, caractéristique du cycle A des flavonoïdes. Les analyses spectrales ¹H avec δ 6,98-6,97 (d) ppm (1H, d, J= 2,5 Hz) et δ 6,82-6,74 ppm (2H, m) correspondent au noyau B.

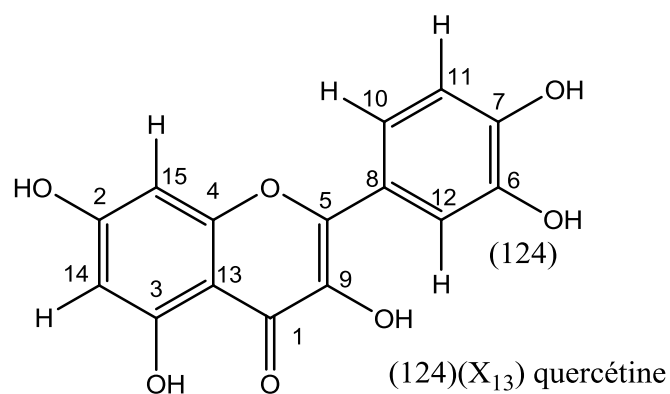
Travaux personnels

❖ SM: Le spectre de masse du composé X_{13} révèle un pic moléculaire de masse $[M-H]^-$, $m/z = 201,02$ correspondant à la masse molaire du quercétine.

Les analyses spectrales par RMN 1H et 13C (figures 67, 68) et par SM figure (64) indiquent que le composé X_{13} correspond à de la quercétine (124).

Tableau 35: Caractéristiques structurales RMN du composé X_{13}

Atome (X_{13})	^1H δ (ppm)	J(Hz)	^{13}C δ (ppm)	HMQC
1			177,32	
2			165,56	
3			162,51	
4			158,21	
5			148,76	
6			147,97	
7			146,21	
8			136,00	
9			124,13	
10	7,74-7,73 (m)		121,65	H-10/C-10
11	7,65-7,64 (m)		116,20	H-11/C-11
12	6,89-6,86 (m)		115,97	H-12/C-12
13			104,00	
14	6,39-6,38 (d)	2,5	99,21	H-14/C-14
15	6,18-6,17 (d)	2,5	94,38	H-15/C-15



LCME Francois A dans MeOD NS=8

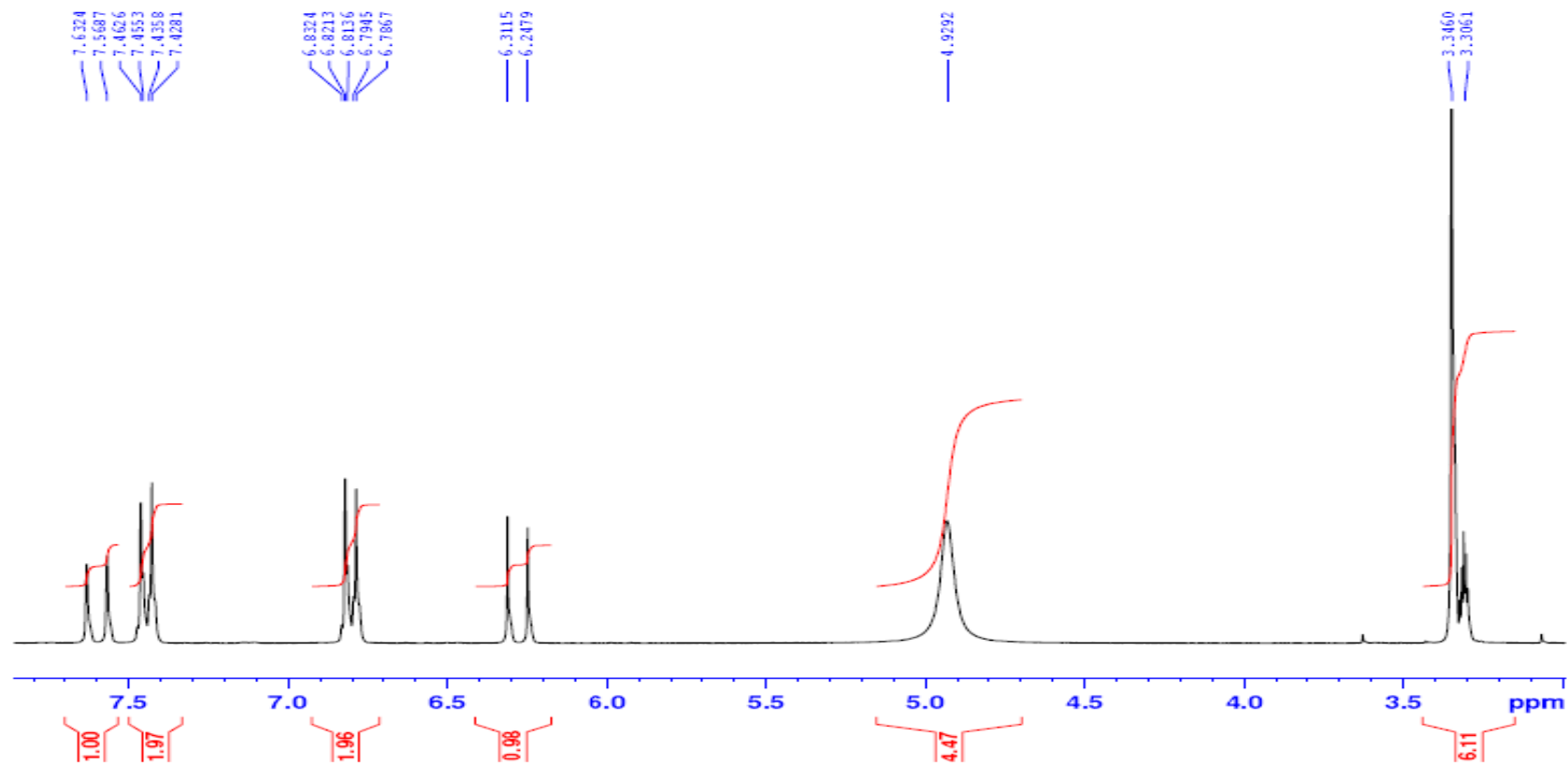


Figure 50: Spectre RMN (^1H) du composé (X_5): (acide *p*-coumarique) (120)

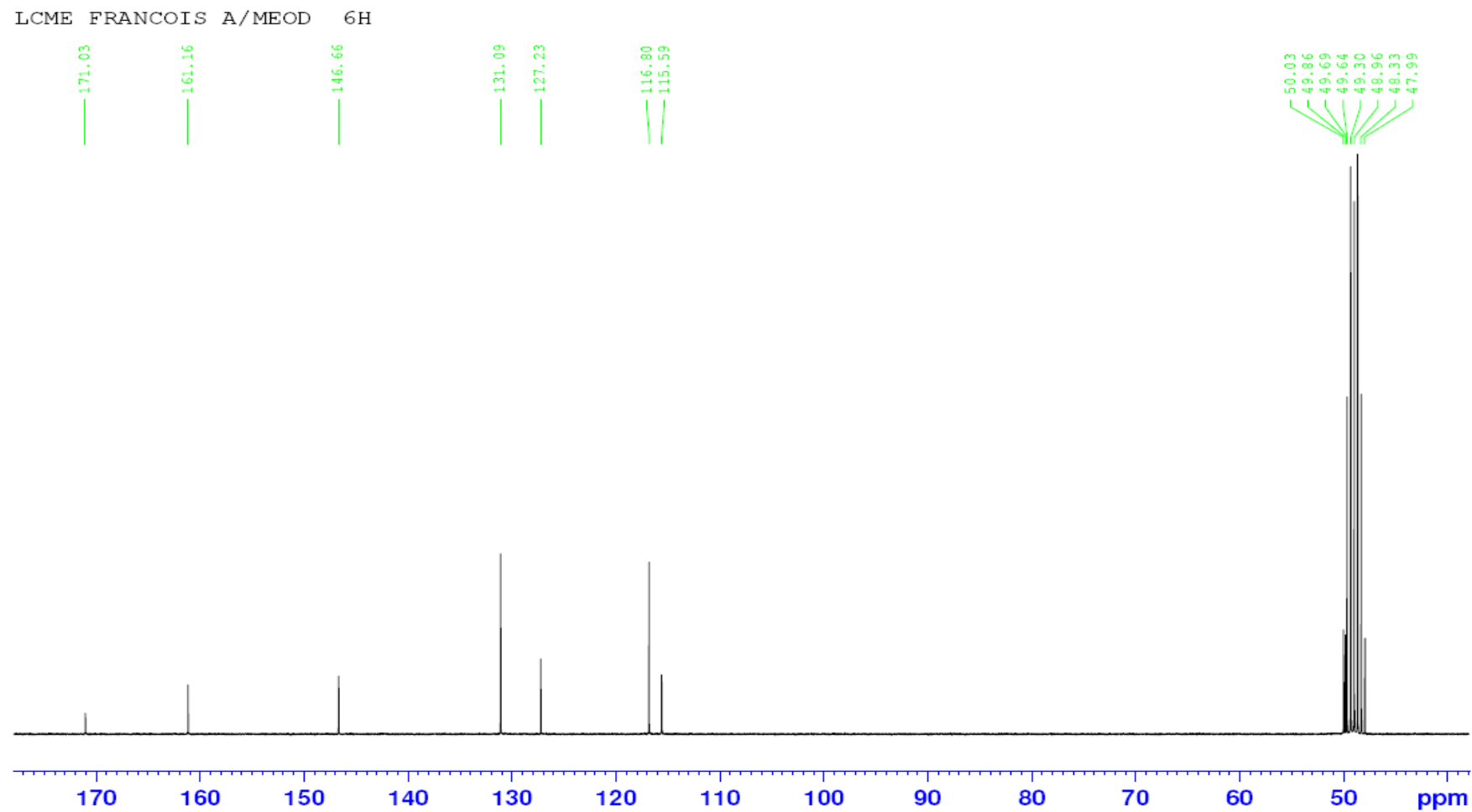


Figure 51: Spectre RMN (^{13}C) du composé (X₅): (acide *p*-coumarique) (120)

Varian MS

File: C:\Users\Loic\Documents\Stage M2 LSMCL\FTICRMS\LCME\cESI_ech21_neg.trans

Base-Peak Amplitude: 46.5442 Total Intensity: 198.195 Scans: 1 Negative Ions External Calibration

07-MAY-2010 15:01:19

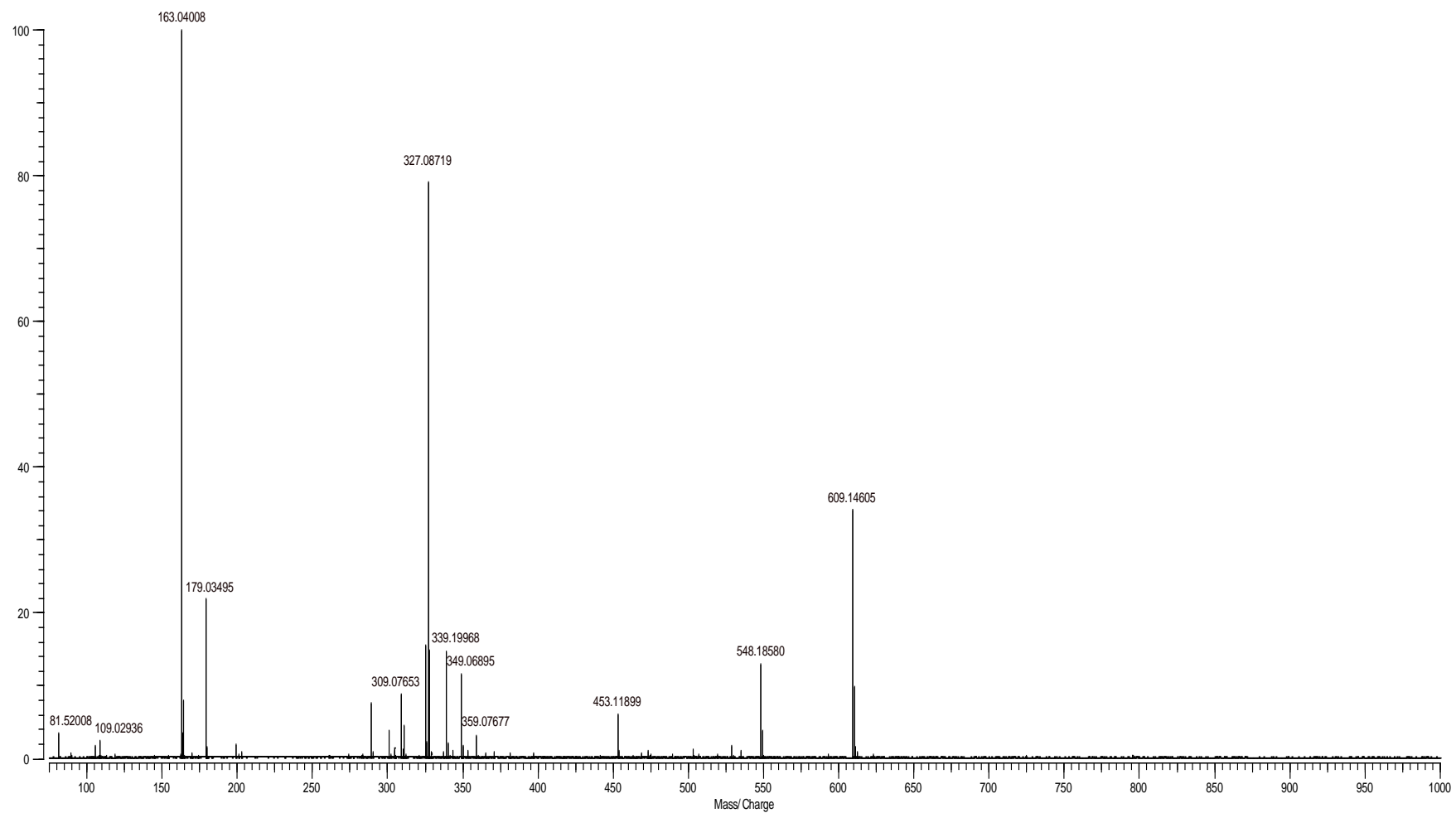


Figure 52: Spectre (SM) (X5): *p*- coumarique (120)

LCME FRANCOIS B

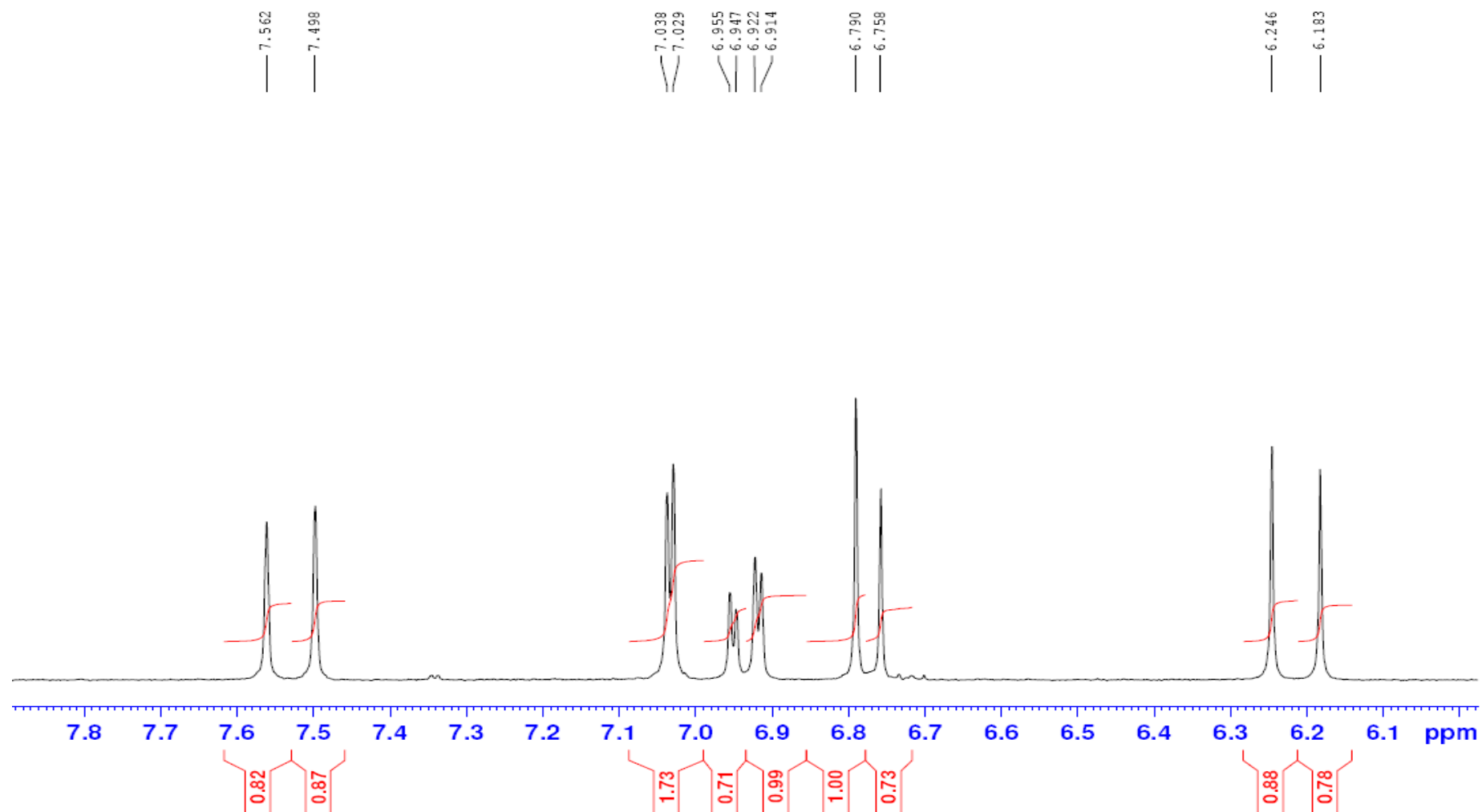


Figure 53: Spectre RMN (^1H) du composé (X_2): (acide caféique) (121)

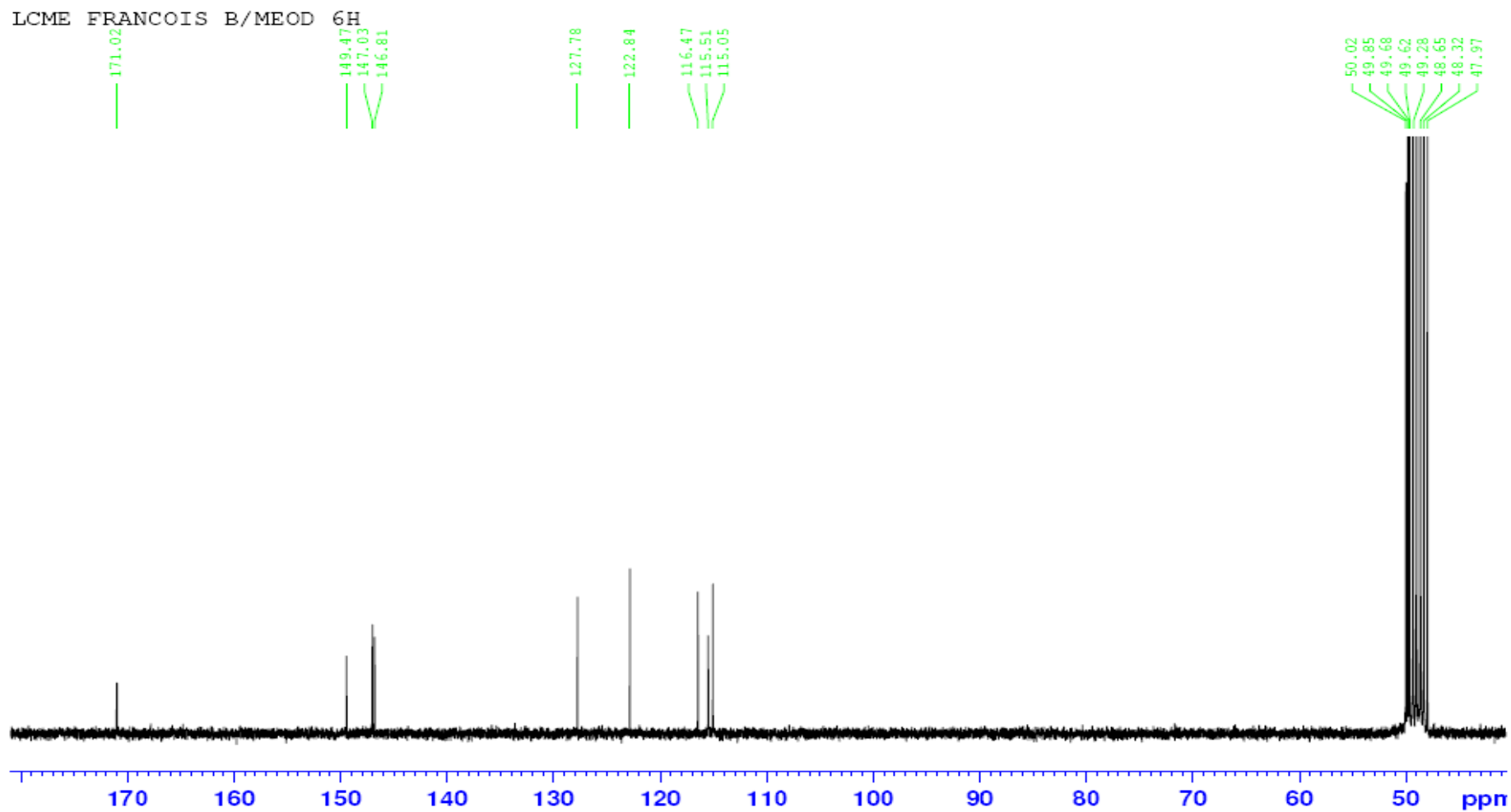


Figure 54: Spectre RMN (^{13}C) du composé (X_2): (acide caféique) (121)

Varian MS

File: C:\Users\Loïc\Documents\Stage M2 LSMCL\FTICRMS\LCME\cESI_ech20_neg.trans
Base-Peak Amplitude: 182.1559 Total Intensity: 442.279 Scans: 1 Negative Ions External Calibration

07-MAY-2010 14:59:20

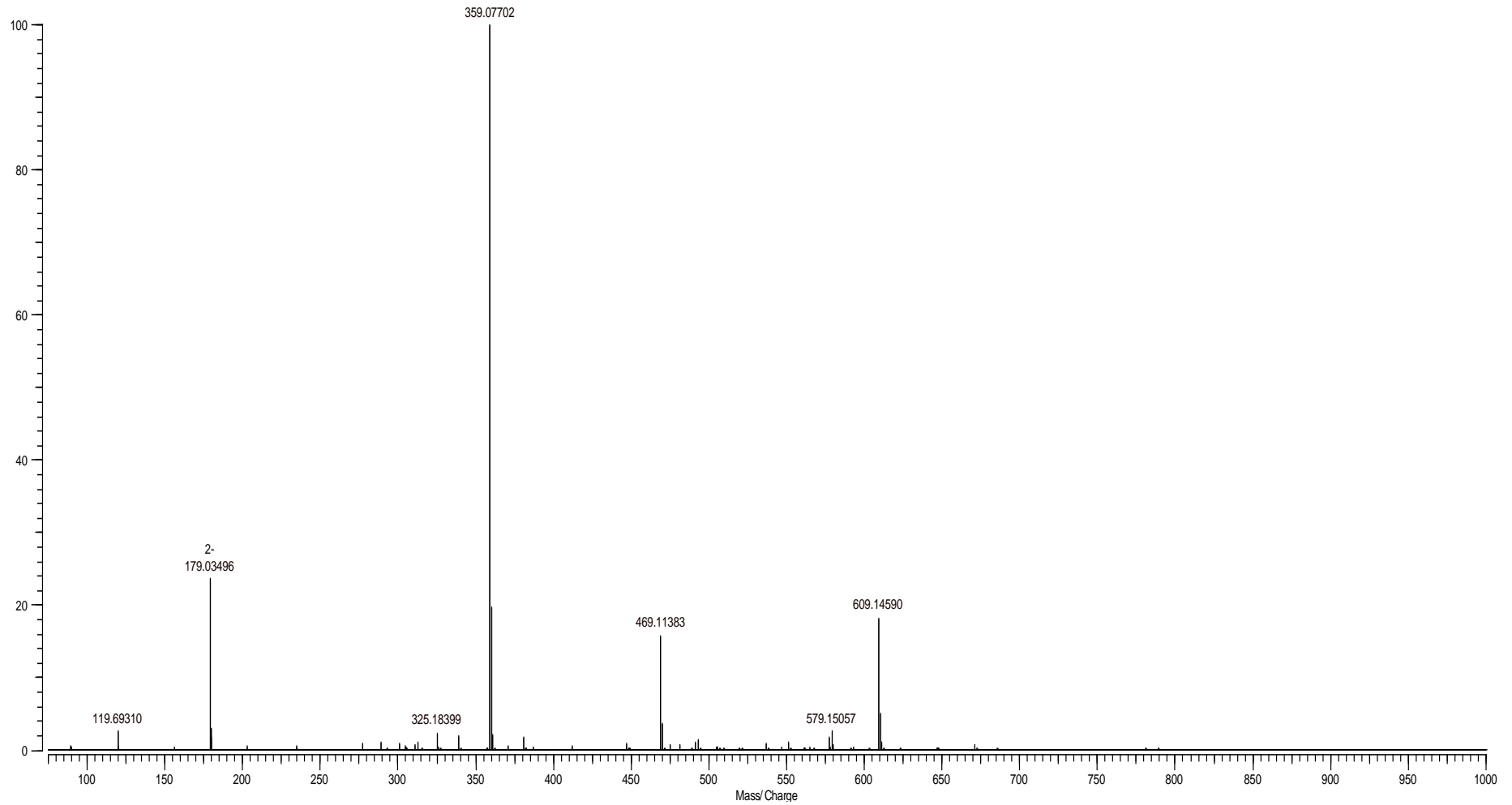


Figure 55: Spectre (SM) (X_2): acide caféique (121)

LCME Francois C dans MeOD NS=8

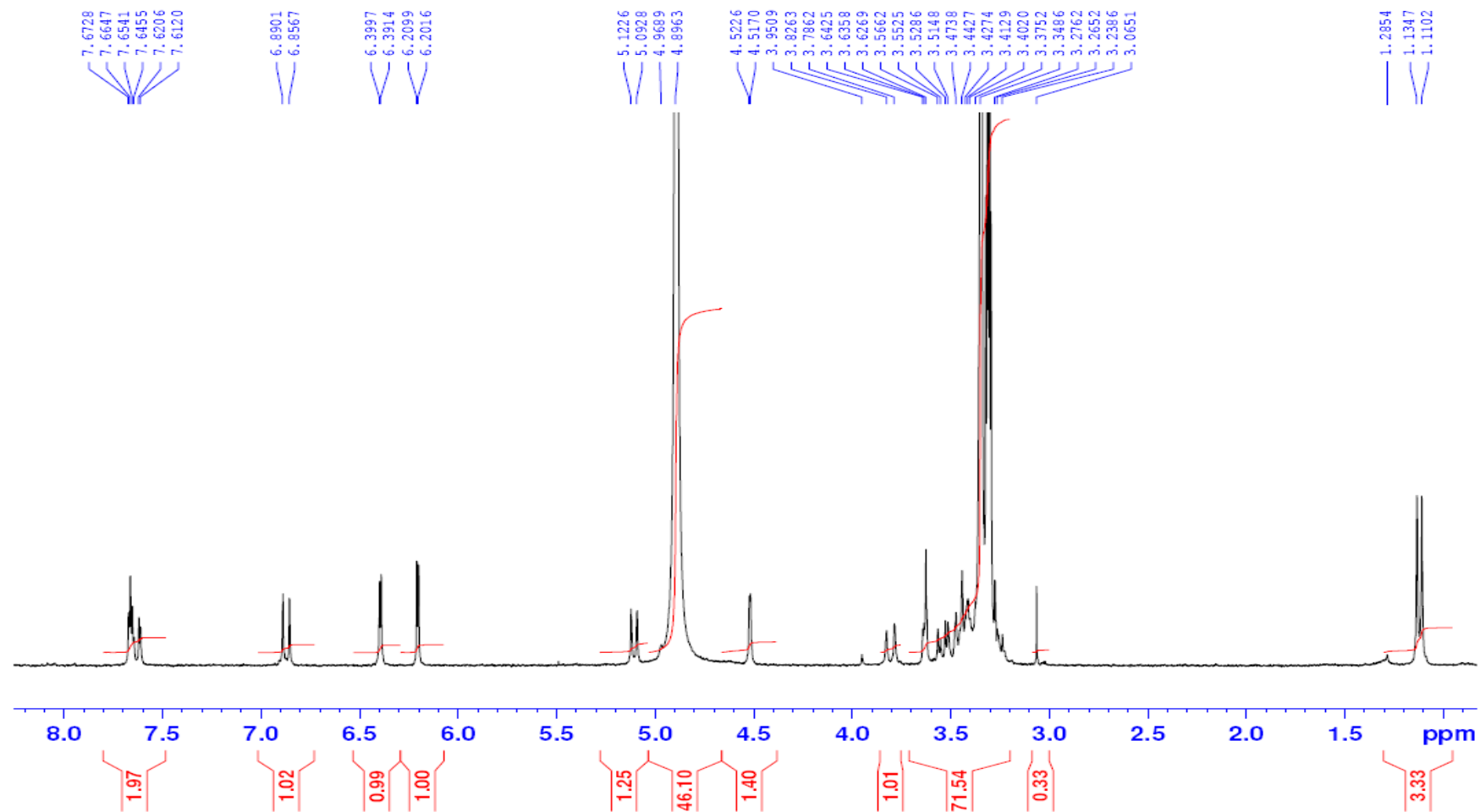


Figure 56: Spectre RMN (^1H) du composé (X_8): (rutine) (122)

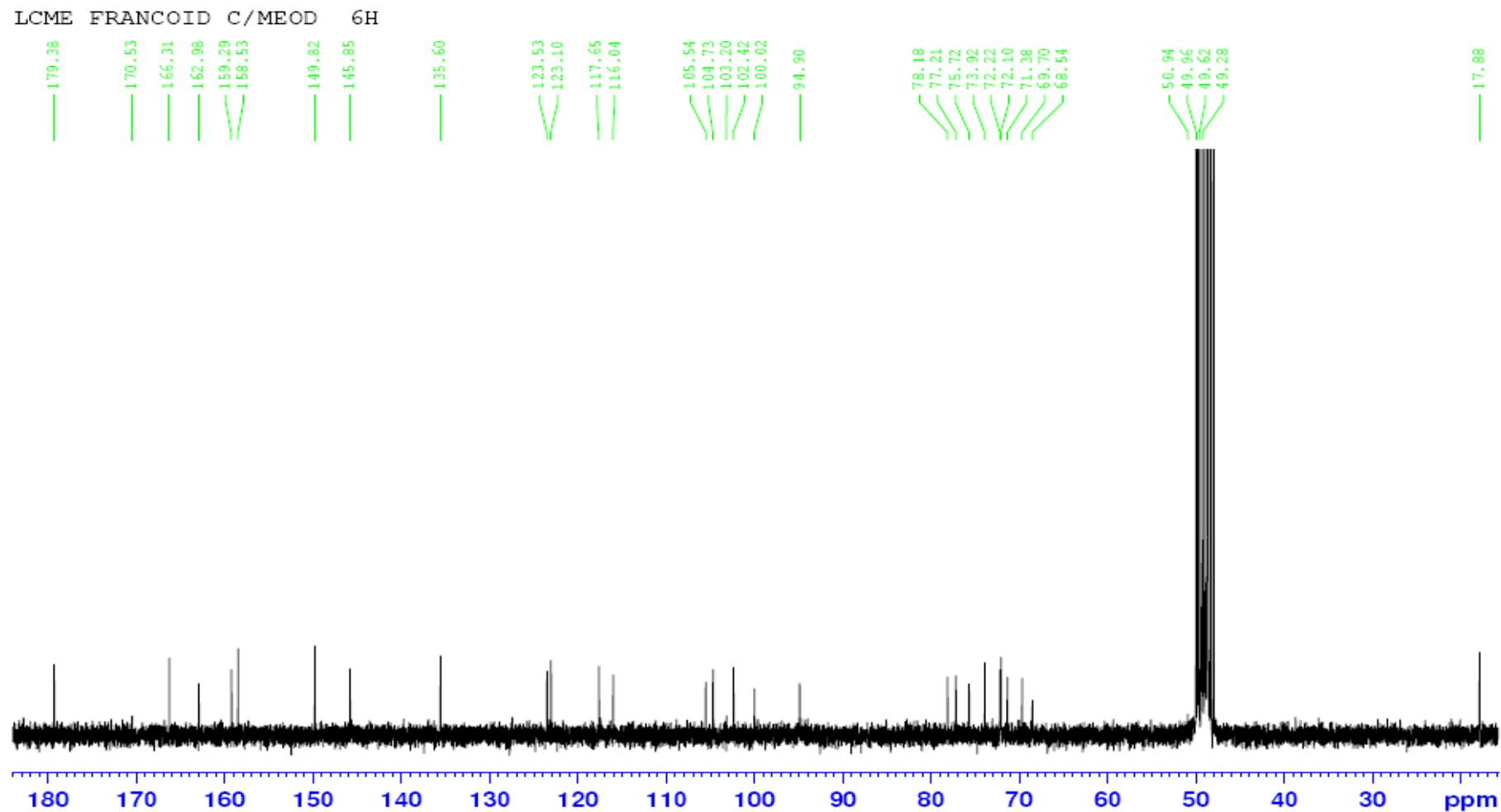


Figure 57: Spectre RMN (^{13}C) du composé (X_8): (rutine) (122)

Varian MS

File: C:\Users\Loïc\Documents\Stage M2 LSMCL\FTICRMS\LCME\ESI_ech18_neg.trans
Base-Peak Amplitude: 199.2851 Total Intensity: 349.984 Scans: 1 Negative Ions External Calibration

07-MAY-2010 14:52:44

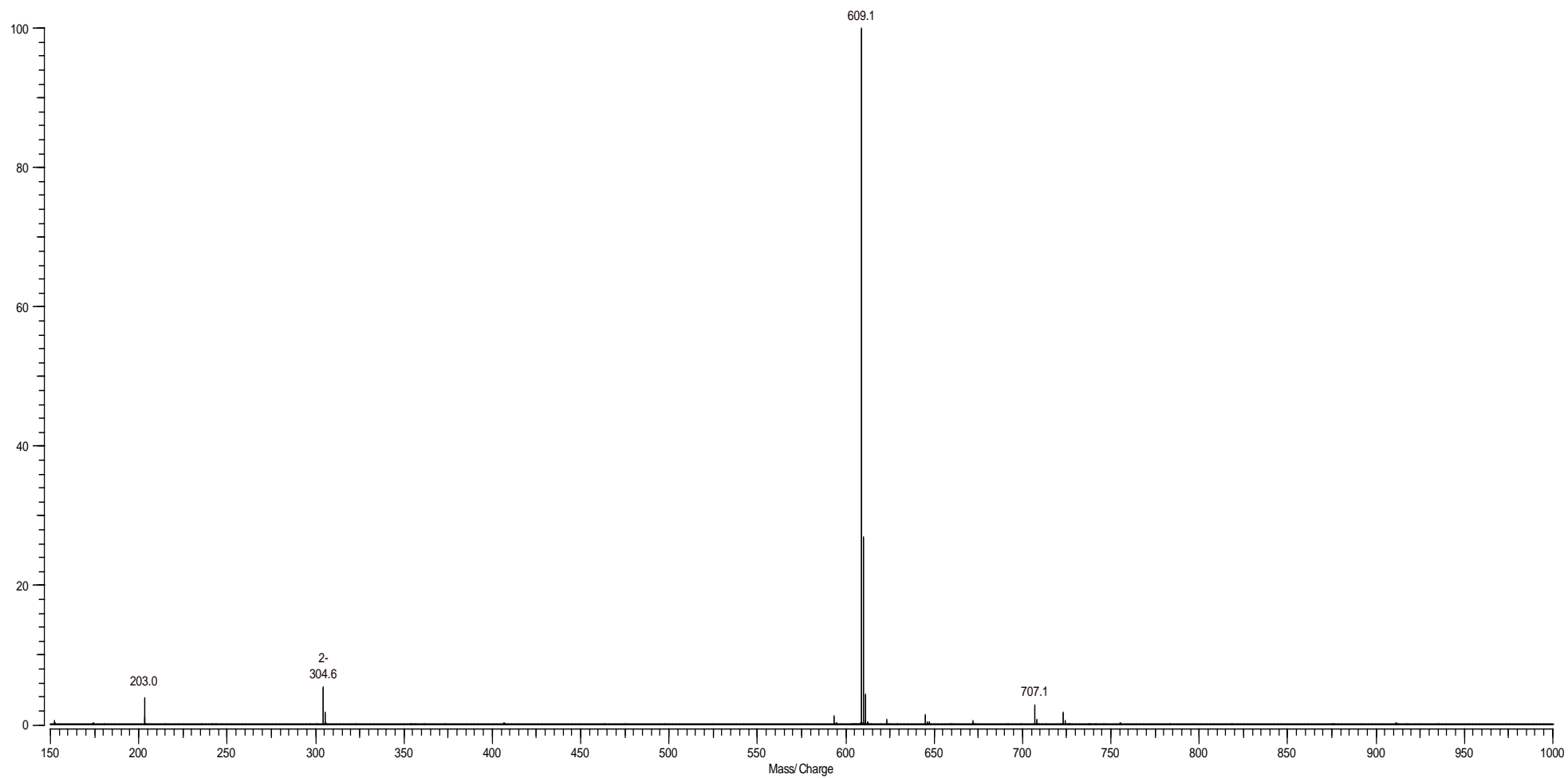


Figure 58: Spectre (SM) (X₈): rutine (122)

LCME Francois D dans MeOD NS=8

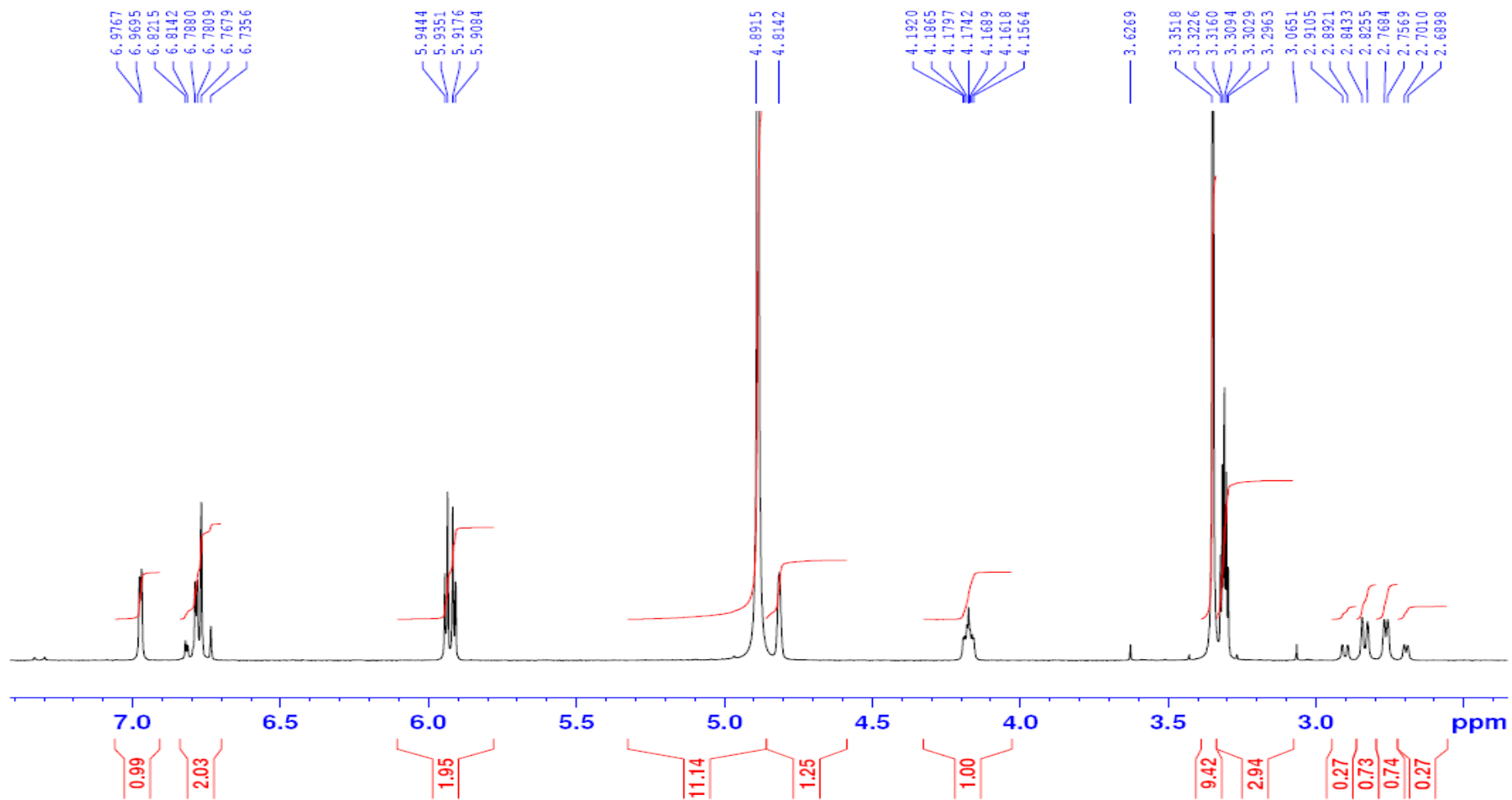


Figure 59: Spectre RMN (^1H) du composé (X_3): (épicatechine) (123)

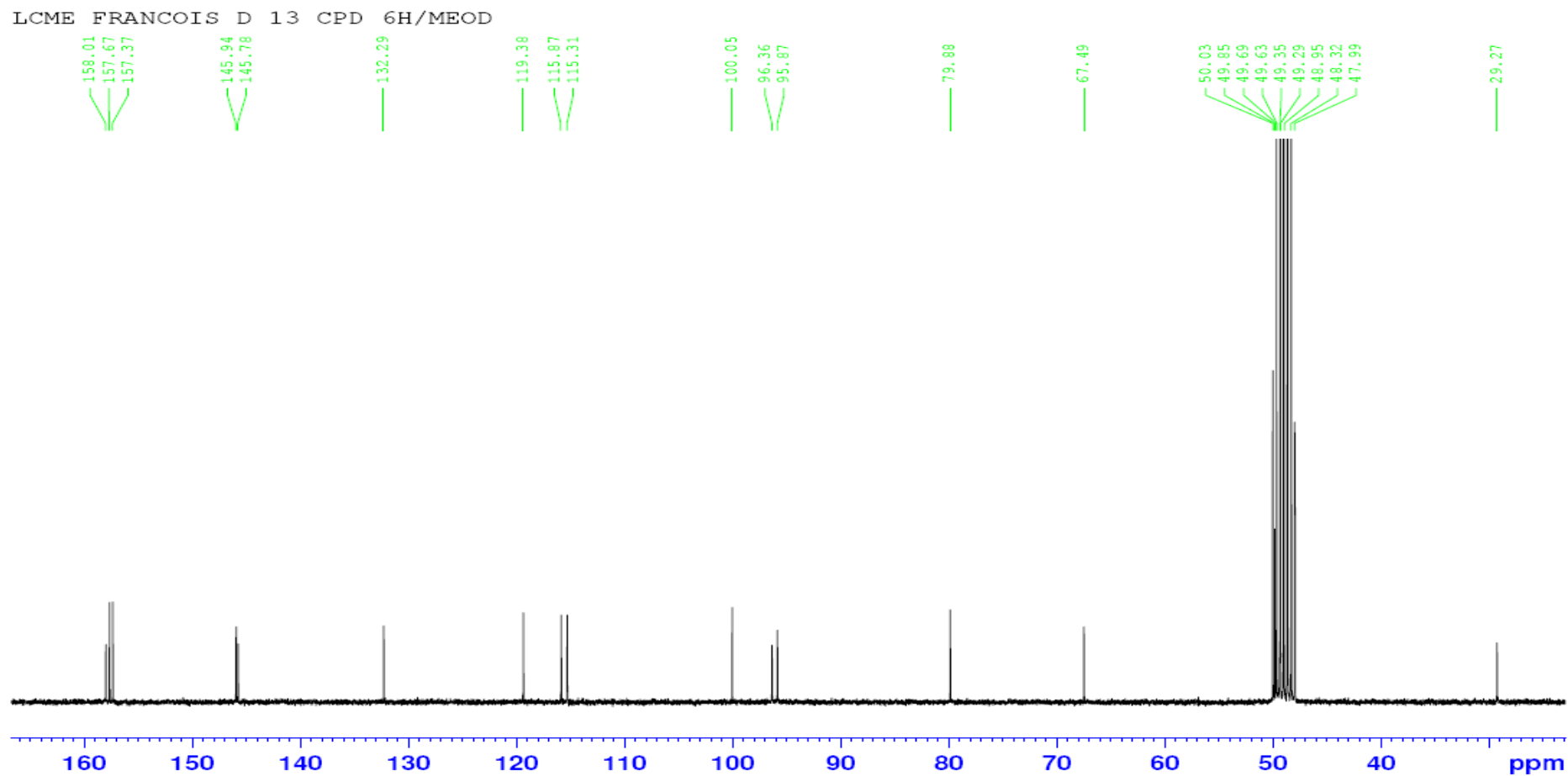


Figure 60: Spectre RMN (¹³C) du composé (X₃): (épicatéchine) (123)

Varian MS

File: C:\Users\Loïc\Documents\Stage M2 LSMCL\FTICRMS\LCME\cESI_ech19_neg.trans
Base-Peak Amplitude: 20.1707 Total Intensity: 52.360 Scans: 1 Negative Ions External Calibration

07-MAY-2010 14:56:18

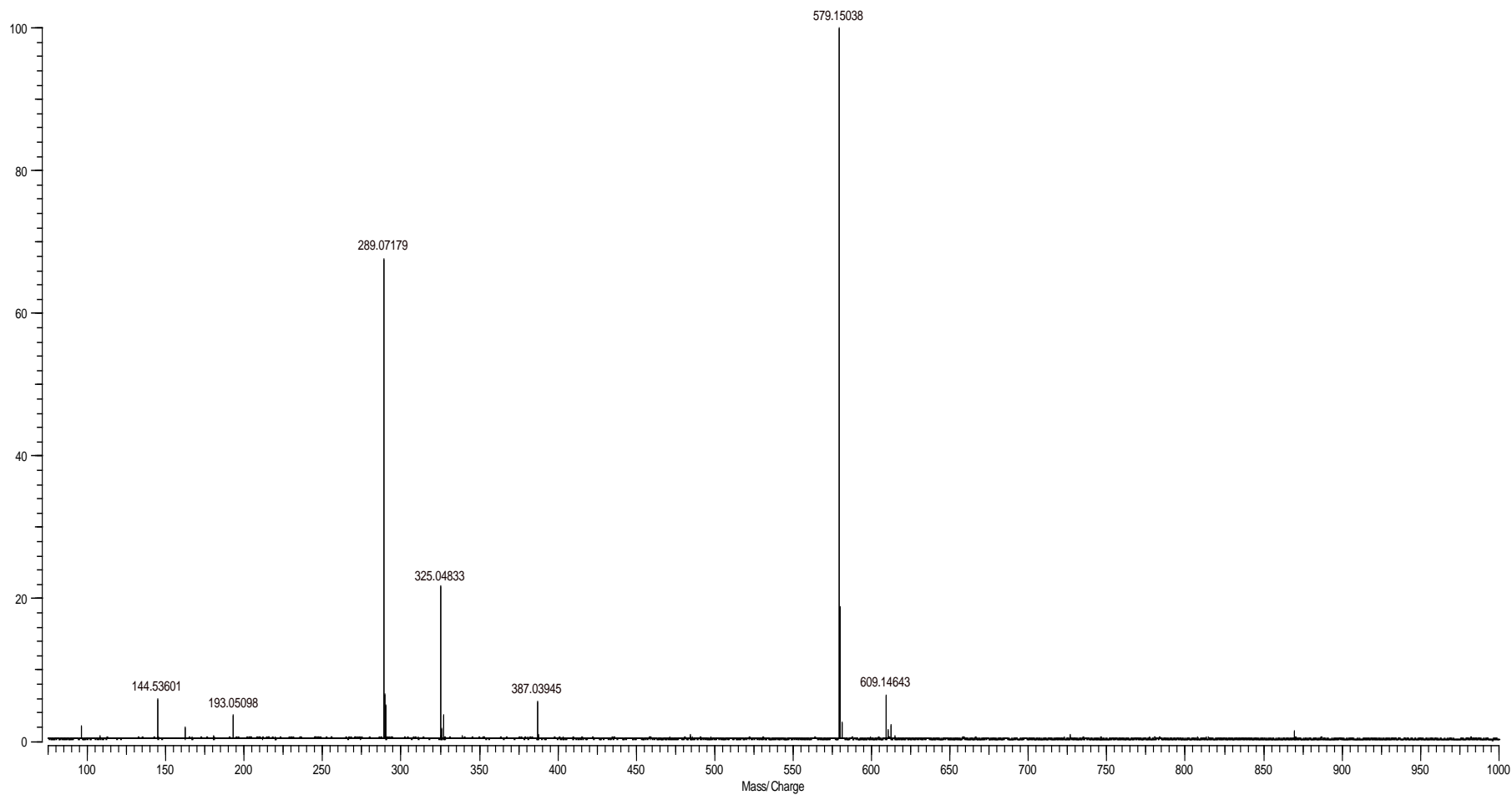


Figure 61: Spectre (SM) (X₃): épicatechine (123)

E

LCME BCalH Francois dans MeOD NS=8

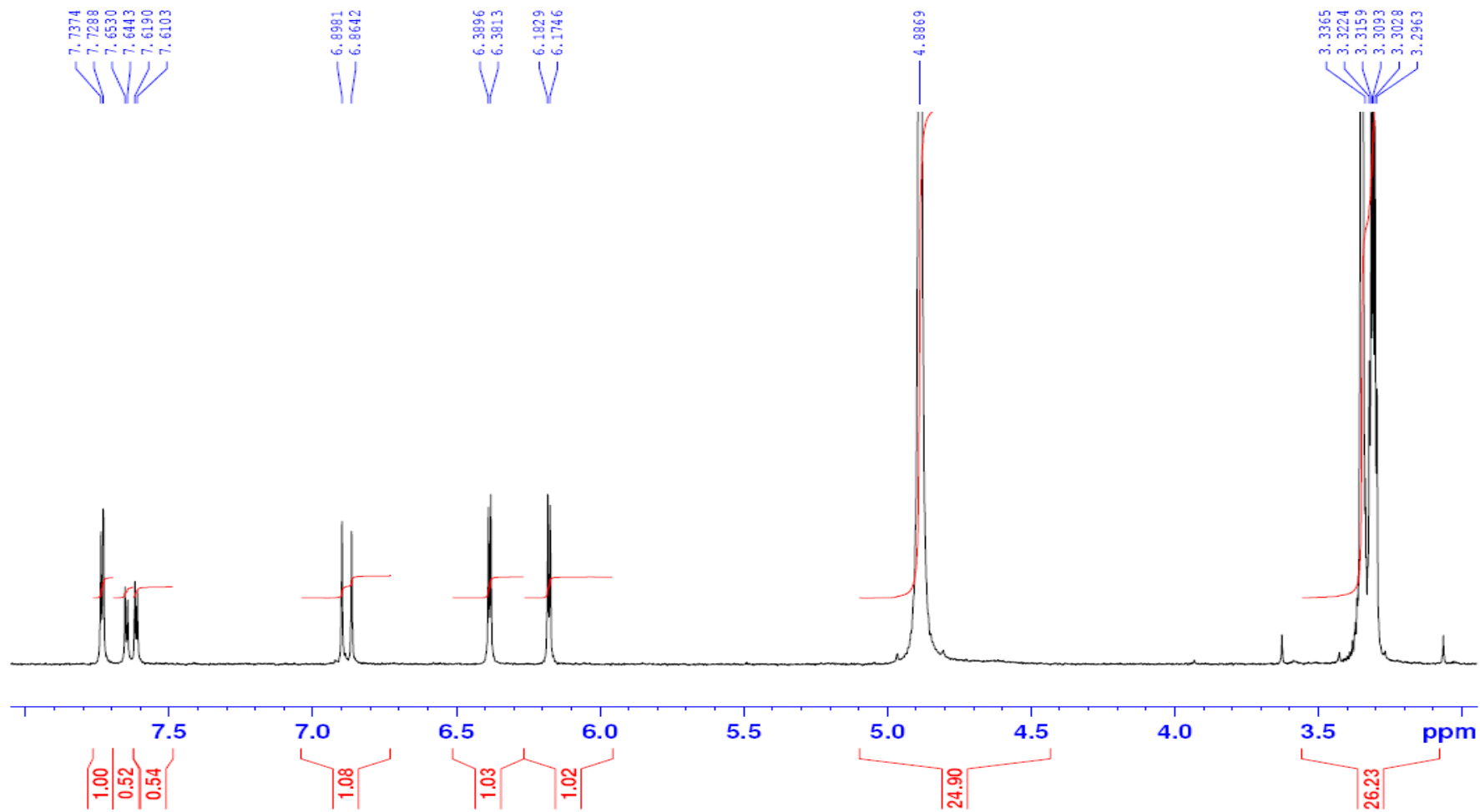


Figure 62: Spectre RMN (^1H) du composé (X_{13}): (quercétine) (124)

LCME FRANCOIS E /MEOD 6H

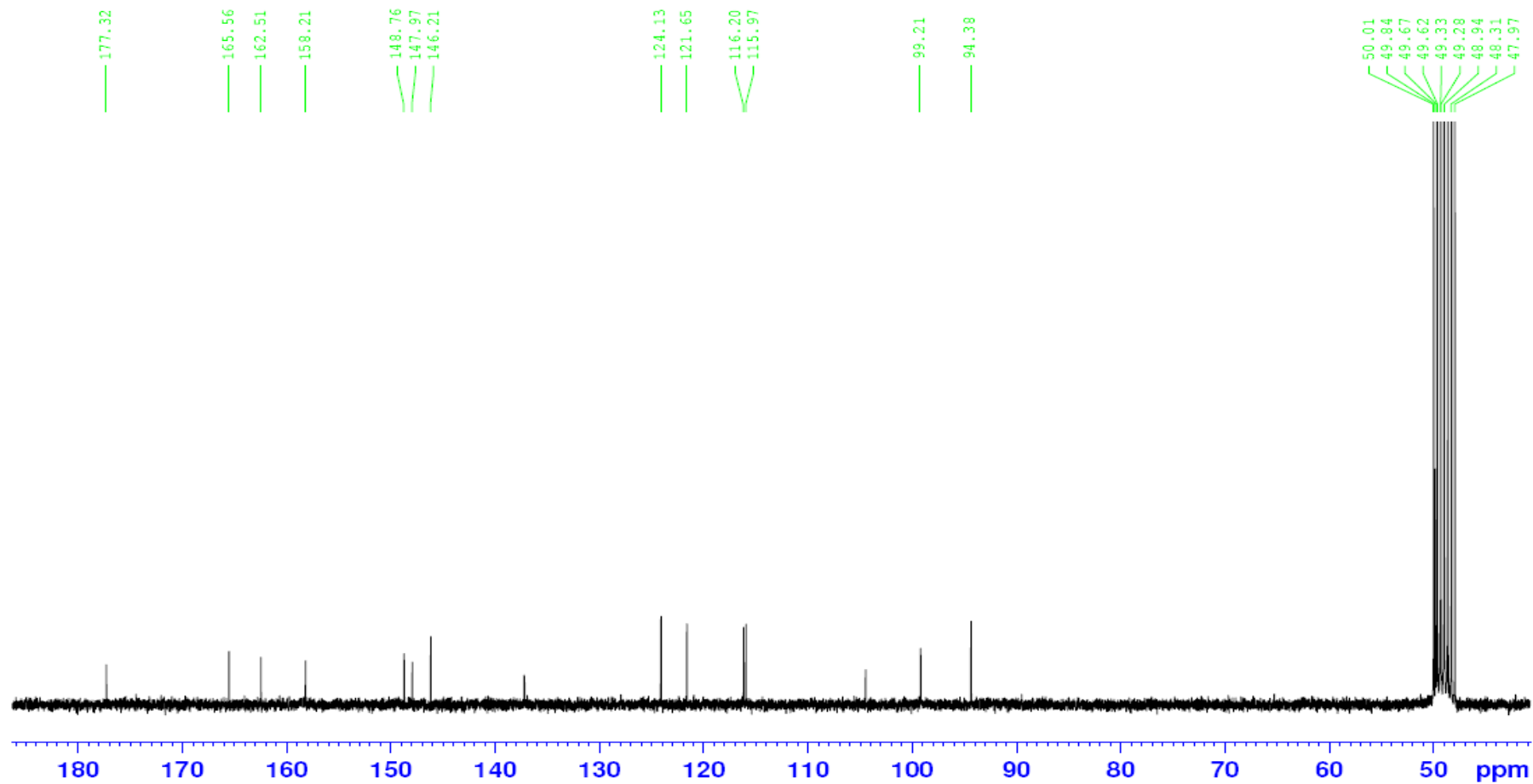


Figure 63: Spectre RMN (¹³C) du composé (X₁₃): (quercétine) (124)

Varian MS

File: C:\Users\Loïc\Documents\Stage M2 LSMCL\FTICRMS\LCME\cESI_ech17_neg.trans
Base-Peak Amplitude: 83.8443 Total Intensity: 270.721 Scans: 1 Negative Ions External Calibration

07-MAY-2010 11:22:10

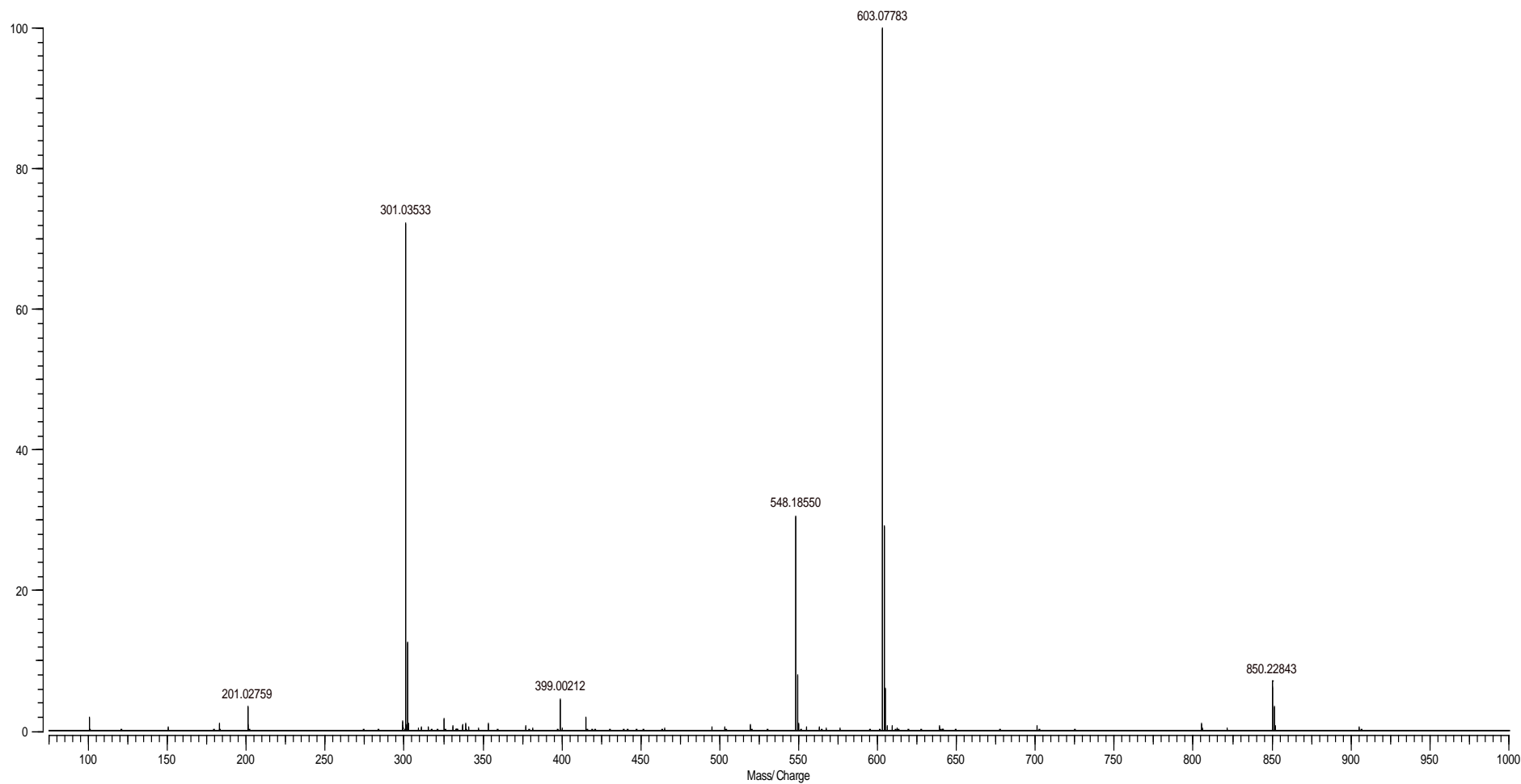


Figure 64: Spectre (SM) (X_{13}): quercétine (124)

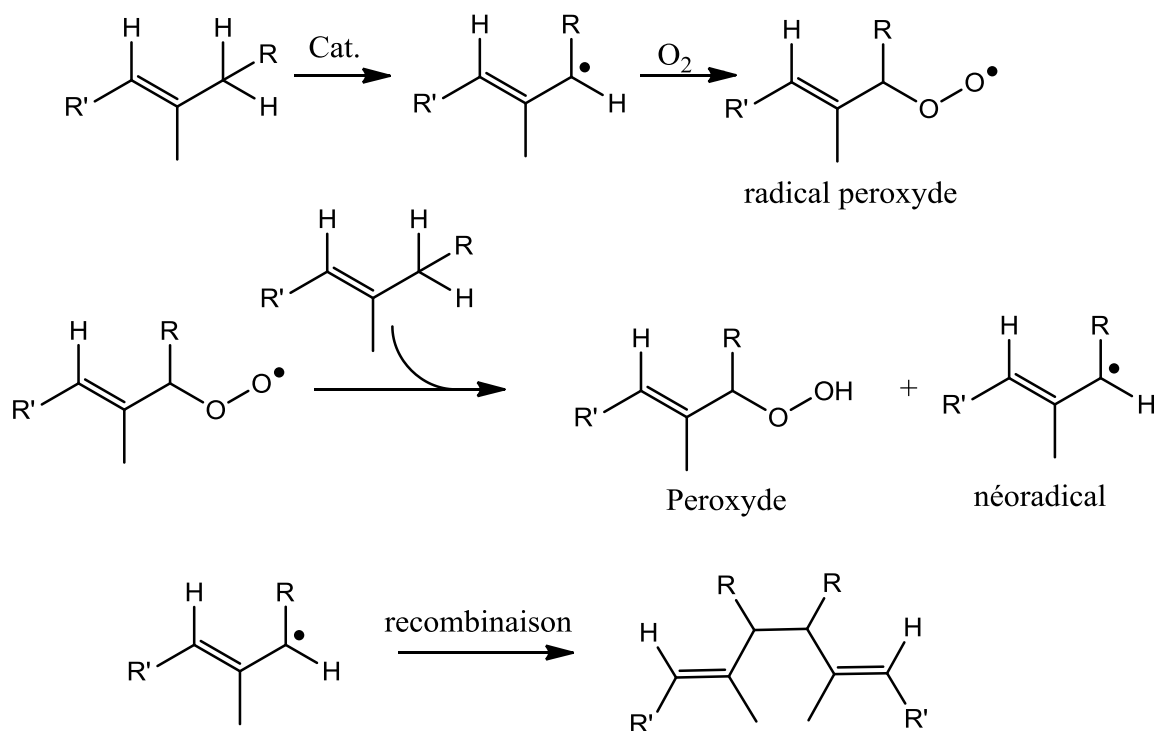
III.3.1.6. Détermination de l'activité antioxydante des extraits

III.3.1.6.1. Rappel sur les processus d'oxydation

Les mécanismes d'oxydations des composés biologiques insaturés (acides gras, caroténoïdes, polyphénols...) sont souvent des réactions radicalaires avec l'oxygène moléculaire et présentent trois phases principales :

La phase d'initiation où se forme un premier radical libre encore appelé précurseur radicalaire. Cette étape est favorisée par la présence d'un rayonnement, d'un catalyseur (métaux tels que Cu, Fe, Co, Mn, Ni...) ou d'un autre radical suffisamment stable.

La phase de propagation est celle au cours de laquelle, l'oxygène se fixe pour donner un radical peroxyde qui réagit avec une autre molécule et conduit à un néoradical libre et un hydroperoxyde.



Les hydroperoxydes instables se scindent en composés courts [192].

La phase de terminaison, où se recombinent différents radicaux formés. Globalement, ce processus conduit à des hydrocarbures, des aldéhydes, des cétones, des acides, des esters, des peracides, des peroxydes, mais aussi à des produits de polymérisation.

Evaluation de l'activité antioxydante

La mesure du potentiel antioxydant est réalisée en déterminant les produits résultant de l'oxydation ou en évaluant l'aptitude à piéger des radicaux de modèles réactionnels.

Le premier mode, plus ancien, nécessite une connaissance préalable des composés issus de l'oxydation. En effet ces méthodes recherchent certains groupements fonctionnels (aldéhydes, cétones, dicarbonylés...) dans les dérivés des constituants d'origine. Le second relie la quantité de radicaux piégés à celle d'antioxydant utilisé.

Nous avons choisi parmi de nombreux modes d'expression de cette mesure d'utiliser le pourcentage d'inhibition (IP) et/ ou l'équivalence en Vitamine C (VCE) obtenu par spectroscopie UV-Visible.

Le pourcentage d'inhibition qui permet d'évaluer l'activité antioxydante d'un échantillon se calcule selon la formule suivante:

$$IP (\%) = [(a-b) / (a)] \times 100$$

Avec : a = absorbance de la solution oxydée en absence d'agents antioxydant, b = absorbance de la solution oxydée en présence d'agents antioxydant.

L'évaluation de l'aptitude du composé (extrait) à piéger des radicaux libres consiste donc à mesurer sa capacité à piéger les radicaux libres et donc à ralentir ou inhiber la création de radicaux libres.

Dans le cas de l'évaluation de l'activité antioxydante en fonction de l'équivalence en vitamine C, la méthode consiste à comparer l'absorbance de nos échantillons à celle d'une droite d'étalonnage qui relie l'absorbance à la concentration en vitamine C.

Les trois types de radicaux que nous avons utilisés pour évaluer l'activité antioxydante de nos extraits de plantes sont: le radical ABTS, le radical DPPH et le radical PPM.

❖ **ABTS test**

Ce test est basé sur le mécanisme d'oxydoréduction de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2, 2'- azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) (schéma 20). Au cours de ce test le sel d'ABTS perd un électron pour former un radical cation ($ABTS^{\bullet +}$) de couleur sombre en solution. En présence de l'agent antioxydant, le radical ainsi formé est réduit pour donner le cation $ABTS^+$, ce qui entraîne la décoloration de la solution.

Travaux personnels

A cet effet, deux différentes solutions constituées de l'AAPH ((2,2'-azo-bis (2-amidino-propane) dihydrochloride)) (1 mM) et de l'ABTS (2,5 mM), ont été préparées en utilisant un tampon phosphate de potassium. La solution tampon est constituée de KH_2PO_4 (100 mM) pH (7,4) et de 150 mM de NaCl.

Le mélange de deux solutions est incubé à 68 °C pendant au moins 20 minutes, jusqu'à ce que la concentration du complexe radical cation ABTS (ABTS^{*+}) bleu-verdâtre donne une absorbance comprise entre $0,65 \pm 0,02$ à 734 nm.

A 60 μl de l'extrait, nous avons ajouté 2,94 ml de la solution bleu-verdâtre d' ABTS^{*+} , le mélange est ensuite incubé à 37 °C pendant 20 minutes à l'abri de la lumière.

Le témoin est constitué de 60 μl de méthanol auquel nous avons ajouté 2,94 ml de la solution ABTS^{*+} bleu- verdâtre.

Une droite d'étalonnage est établie avec des solutions d'acide ascorbique (vitamine C) préparées à différentes concentrations (corrélation $R^2 = 0,9968$ (figure 65)).

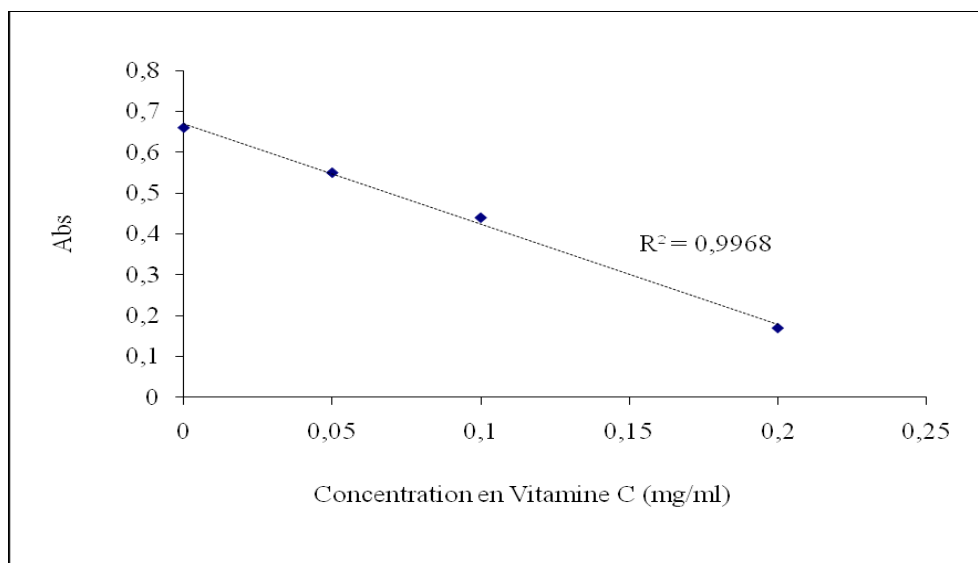


Figure 65: Etalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration en Vitamine C

Les échantillons à analyser, la solution témoin (blanc) et les étalons sont analysés dans les mêmes conditions. Après 20 minutes d'incubation, la décroissance de l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 734 nm. Les résultats sont exprimés en mg équivalent vitamine C par g de matière sèche (EVC/gdM). Compte tenu de l'instabilité des réactifs utilisés ceux-ci ont été préparés quotidiennement.

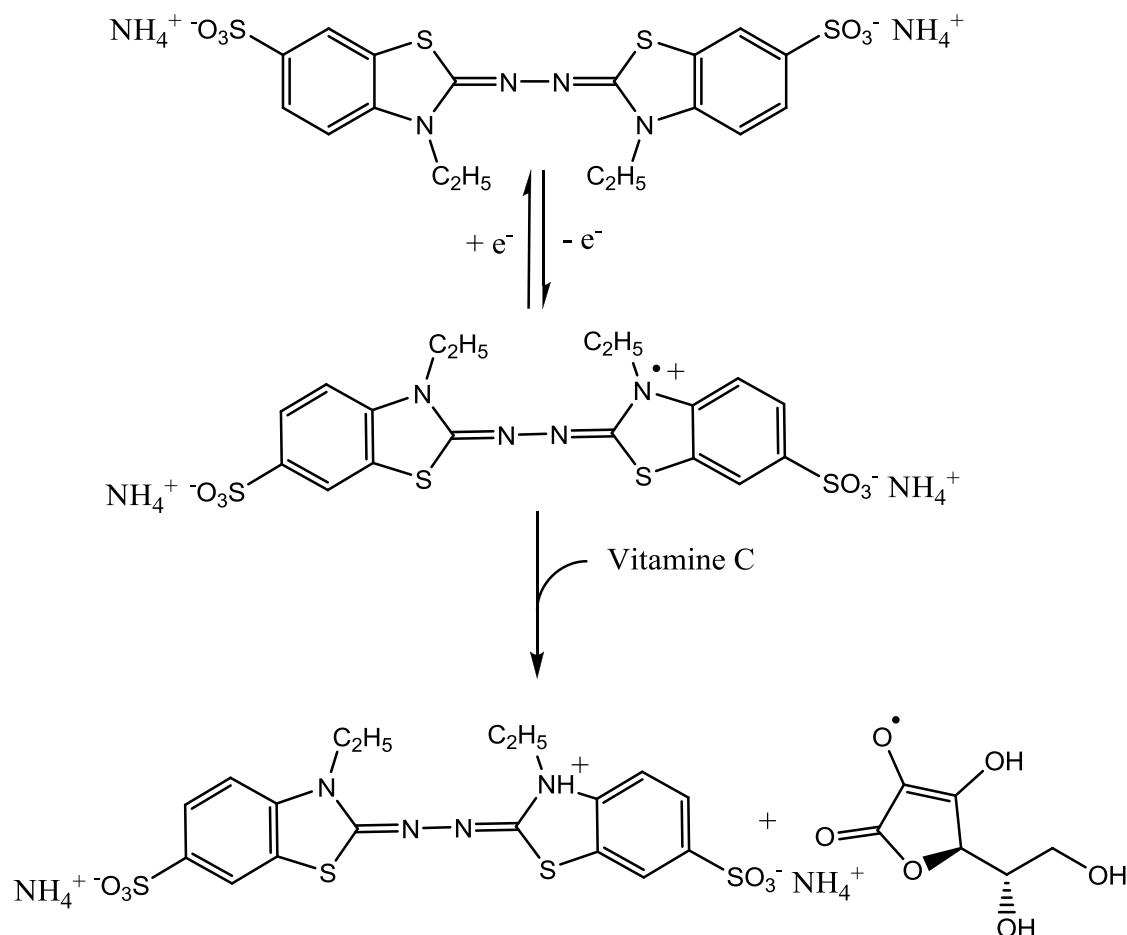


Schéma 20: Formation et piégeage du radical ABTS^{•+} par de la Vitamine C

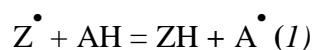
❖ **DPPH test**

Le test DPPH (diphénylpicrylhydrazyl) est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante.

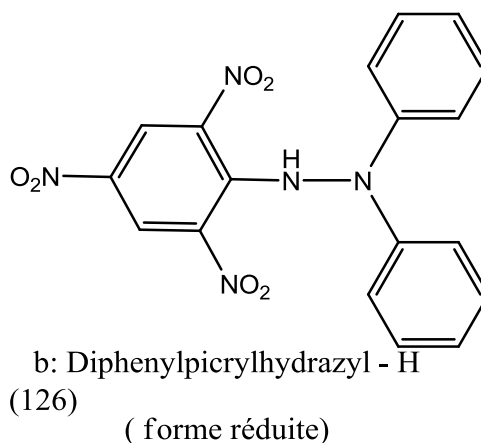
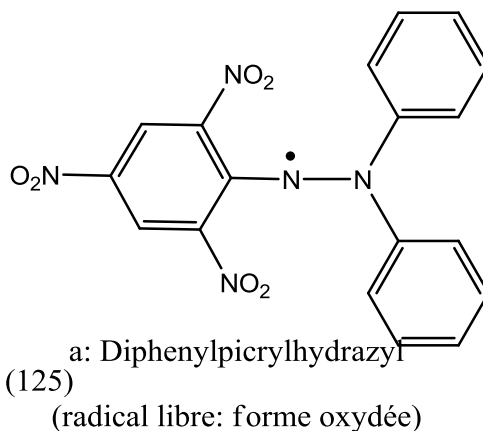
En effet, le DPPH (a) (125) se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule.

La présence de ces radicaux DPPH[•] donne lieu à une coloration violette foncée de la solution, qui absorbe aux environs de 517 nm. La réduction des radicaux DPPH[•] par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution (b) (126).

Dans la réaction ci-dessous (1), le radical DPPH est représenté par Z[•] et la molécule du donneur par AH, la réaction primaire est:



ZH est la forme réduite du radical DPPH[•]. Notons que compte tenu de la solubilité en milieu organique du DPPH, cette méthode est plus adaptée pour les dosages qui se déroulent en milieu alcoolique (méthanol et éthanol) [193].



L'évaluation de la capacité antioxydante est réalisée comme suit : à 1 ml d'une solution méthanolique de DPPH (100 μ M) a été mélangé 0,1 ml de l'extrait de la plante. Le mélange obtenu est ensuite gardé à l'abri de la lumière à la température ambiante pendant 20 minutes. Puis l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un témoin composé de 1 ml de la solution de DPPH et de 0,1 ml de méthanol.

La préparation des échantillons et du témoin est réalisée dans les mêmes conditions opératoires. La décroissance de l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre et le % IP (pourcentage d'inhibition) est calculé suivant la formule ci-dessous

$$\% \text{ IP} = [(A_{t_0} - A_{t_{20}}) / A_{t_0} \times 100]$$

Avec A_{t_0} : absorbance du témoin (ne contenant aucun antioxydant) après 20 minutes

$A_{t_{20}}$: absorbance des extraits mesurés après 20 minutes

En faisant varier la concentration des extraits et en calculant pour chaque concentration le % IP correspondant, nous avons établi une régression linéaire entre les différentes concentrations et les % IP.

A partir de cette régression, nous avons déduit la valeur correspondante d'IC₅₀. Notons que le pourcentage d'inhibition (IP%) est inversement proportionnel à IC₅₀.

L'évaluation de l'activité antioxydante peut également s'exprimer en VCE selon la méthode suivante:

A 2,90 ml de la solution de méthanol (100 µM DPPH), est ajouté 100 µl de l'extrait de la plante. La solution est mélangée puis mise à l'abri de la lumière à la température ambiante pendant 30 minutes.

Une courbe d'étalonnage est réalisée avec des solutions de vitamine C préparées à des concentrations différentes et un témoin composé de 100 µl de méthanol et 2,90 ml de la solution de DPPH (corrélation $R^2 = 0,99$ (figure 66)).

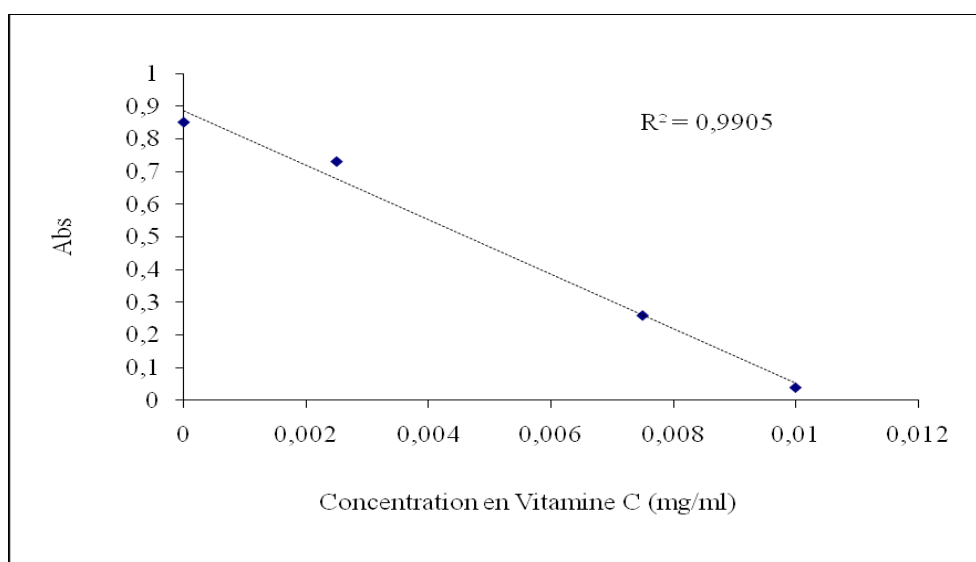


Figure 66 : Etalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration en Vitamine C

Les échantillons, les étalons et le banc sont préparés dans les conditions similaires. Après 30 minutes, la décroissance de l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre UV à 517 nm. L'activité antioxydante mesurée est exprimée en mg équivalent Vitamine C/g de matière sèche (VCE/g dM). Compte tenu de l'instabilité des réactifs à utiliser ceux-ci sont préparés quotidiennement.

❖ PPM test

Le test du PPM (PhosPhoMolybdate) est une variante du test au DPPH. Au cours de ce test, l'hydrogène et l'électron sont transférés du composé réducteur (extrait-antioxydant) vers le complexe oxydant (PPM). Ce transfert dépend du potentiel redox, du pH du milieu et de la structure du composé antioxydant.

Le test est basé sur la réduction du molybdène de l'étage d'oxydation (VI) à l'étage d'oxydation (V). Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/ Mo (V)) à un pH acide. On mesure la diminution de la coloration du complexe molybdène (VI) en présence d'antioxydant. A la différence des autres tests, ce test permet non seulement de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des polyphénols mais aussi d'autres composés antioxydants tel que les vitamines (C, E...) [194].

La méthode consiste à introduire dans un tube Eppendorff 100 µl de l'extrait de plante mélangés à 900 µl d'un réactif composé de H₂SO₄ (0,6 M), de NaH₂PO₄ (28 mM) et du molybdate d'ammonium (4 mM). Le tube est ensuite bien fermé puis incubé à 95°C pendant 90 minutes. Après les avoir refroidis, l'absorbance est mesurée à 695 nm. Le témoin est constitué de 100 µl de méthanol mélangé avec 900 µl du réactif mentionné ci-dessus.

Les étalons, les échantillons et les témoins sont incubés dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent vitamine C par gramme de matière sèche (mg VCE/gdM).

III.3.1.6.2. Résultats

L'ensemble des extraits étudiés révèlent des propriétés antioxydantes intéressantes ce qui se manifeste par de faibles valeurs de IC₅₀. La capacité antioxydante des extraits analysés sont rassemblées dans le tableau 38. De ce tableau, nous remarquons que les valeurs des IC₅₀ des extraits varient entre 2,7 et 10,2 µg/ ml pour les feuilles de *D. oliveri* et les feuilles de *F. capensis* respectivement.

Les activités antioxydantes ont été classés en 3 groupes en fonction de la plante et/ ou des diverses parties des plantes étudiées.

Ainsi le groupe ayant les valeurs de IC₅₀ < 5 µg/ ml indiquent une activité atioxydante relativement importante c'est le cas des extraits de *D. oliveri* « Et (2,9 µg/ m), Er (2,8 µg/ ml), F (2,7 µg/ ml) »; *V.doniana* « Et (2,9 µg/ ml), Er (2,9 µg/ ml), F (2,9 µg/ ml) »; *D. adscendens* « F (4 µg/ ml) »; *F. capensis* « Et (2,9 µg/ ml) » et *S. rebaudiana* « Er (2,9 µg/ ml) ».

Travaux personnels

Le deuxième groupe est celui des extraits des plantes ayant les valeurs de IC_{50} autour de $5 \mu\text{g/ml}$, il indique une activité antioxydante (AAO) moyenne. Dans ce groupe nous citerons les extraits des écorces des racines de *S. longependunculata* « Er ($5,5 \mu\text{g/ml}$) » et les extraits des *F. capensis* « Er ($8,8 \mu\text{g/ml}$) ».

Enfin, le troisième groupe est constitué des extraits ayant les valeurs de $IC_{50} > 5 \mu\text{g/ml}$. Dans ce groupe sont classés les extraits des plantes ou parties de plantes considérés comme ayant une AAO moins significatives. C'est le cas des extraits de feuilles de *F. capensis* IC_{50} ($10,2 \mu\text{g/ml}$), des huiles essentielles (*S. rebaudiana* IC_{50} « ($23,3 \mu\text{g/ml}$) » et *F. capensis* « (IC_{50} ($19,3 \mu\text{g/ml}$) » (tableaux 36, 38).

L'analyse des résultats des AAO des huiles essentielles de feuilles de *S. rebaudiana* et *F. capensis* nous indique que les activités antioxydantes de ces huiles ne dépendent pas de composés phénoliques (tableau 36).

Tableau 36: Activités antioxydantes des huiles essentielles des feuilles *S. rebaudiana* et *F. capensis*

Nom	ABTS (mgVCE/gMs)	DPPH (mgVCE/gMs)	%IP	IC_{50} $\mu\text{g/ml}$
<i>F. capensis</i>	$0,14 \pm 0,03$	$0,08 \pm 0,01$	$56,83 \pm 4,80$	$23,3 \pm 0,1$
<i>S. rebaudiana</i>	$0,22 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$	$77,55 \pm 3,45$	$19,3 \pm 0,3$

Par la suite la méthodologie utilisée pour les analyses AAO des extraits des plantes a été appliquée pour l'évaluation des AAO des exsudats racinaires de MXG (*Miscanthus X géant*), les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 37.

Tableau 37: Activités antioxydantes des exsudats des racines de *Miscanthus X giganteus*

MxG	ABTS	DPPH
Extrait 1	$0,10 \pm 0,04$	$0,12 \pm 0,02$
Extrait 2	$0,08 \pm 0,03$	$0,10 \pm 0,01$

Travaux personnels

Tableau 38: Activités antioxydantes (AAO) des extraits méthanol-eau des plantes étudiées

Extraits de la plante/ou parties		Tests				
		PPM mg VCE/gMs	ABTS mg VCE/gMs	mg VCE/gMs	DPPH %IP	IC ₅₀ (µg/ml)
<i>D. Oliveri</i>	Et	5,86 ± 0,01	1,28 ± 0,01	1,94 ± 0,02	86,1 ± 1,4	2,9 ± 0,1
	Er	6,06 ± 0,01	1,24 ± 0,01	1,96 ± 0,01	87,6 ± 0,3	2,8 ± 0,1
	F	5,26 ± 0,04	1,09 ± 0,04	2,10 ± 0,01	93,3 ± 0,2	2,7 ± 0,1
<i>D. adscendens</i>	Et	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	Er	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	F	Nd	1,67 ± 0,02	1,98 ± 0,05	95,98 ± 0,10	4,0 ± 0,1
<i>F. Capensis</i>	Et	2,80 ± 0,03	1,21 ± 0,06	1,96 ± 0,03	85,40 ± 1,80	2,9 ± 0,1
	Er	1,26 ± 0,01	0,60 ± 0,02	0,91 ± 0,05	28,41 ± 0,3	8,8 ± 0,1
	F	Nd	1,37 ± 0,02	0,98 ± 0,02	83,32 ± 2,3	10,2 ± 0,1
<i>S. Longependunculata</i>	Et	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	Er	Nd	0,75 ± 0,10	1,53 ± 0,22	86,41 ± 1,64	5,5 ± 0,2
	F	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
<i>S. rebaudiana</i>	Et	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	Er	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	F	Nd	1,17 ± 0,02	1,78 ± 0,01	96,61 ± 0,90	2,9 ± 0,1
<i>V. Doniana</i>	Et	2,05 ± 0,02	0,74 ± 0,06	1,30 ± 0,01	84,9 ± 1,3	2,9 ± 0,1
	Er	1,94 ± 0,07	1,26 ± 0,09	2,00 ± 0,01	87,7 ± 0,1	2,8 ± 0,1
	F	1,80 ± 0,05	1,27 ± 0,01	1,95 ± 0,01	84,9 ± 0,7	2,9 ± 0,1

III.3.1.7. Relation entre composés phénoliques et AAO

Dans cette partie nous avons cherché à établir une relation entre la présence des composés phénoliques et l'activité antioxydante de certains extraits. Cette relation établie une corrélation linéaire entre les composés phénoliques et la capacité antioxydante qu'ils manifestent.

En effet, une très bonne corrélation a été établit entre les composés phénoliques et les activités antioxydantes des extraits des feuilles de *D. adscendens*, *S.rebaudiana* et des racines de *S. logependuculata* (R^2 : variant entre 0,80-0,99) (figure 67-69). Par contre pour les extraits de *D. oliveri*, de *F.capensis* et de *V. doniana*, l'activité antioxydante des extraits n'est pas liée à la présence des composés phénoliques d'autant plus que la régression linéaire établit entre les composés phénoliques et les AAO correspondantes donne des corrélations (R^2) extrêmement faibles 0,0998, 0,1641, et 0,1135 pour *D. oliveri*, *F.capensis* et *V. doniana* respectivement (figure 70).

Relation entre AAO et composés phénoliques des extraits des feuilles *D. adscendens*

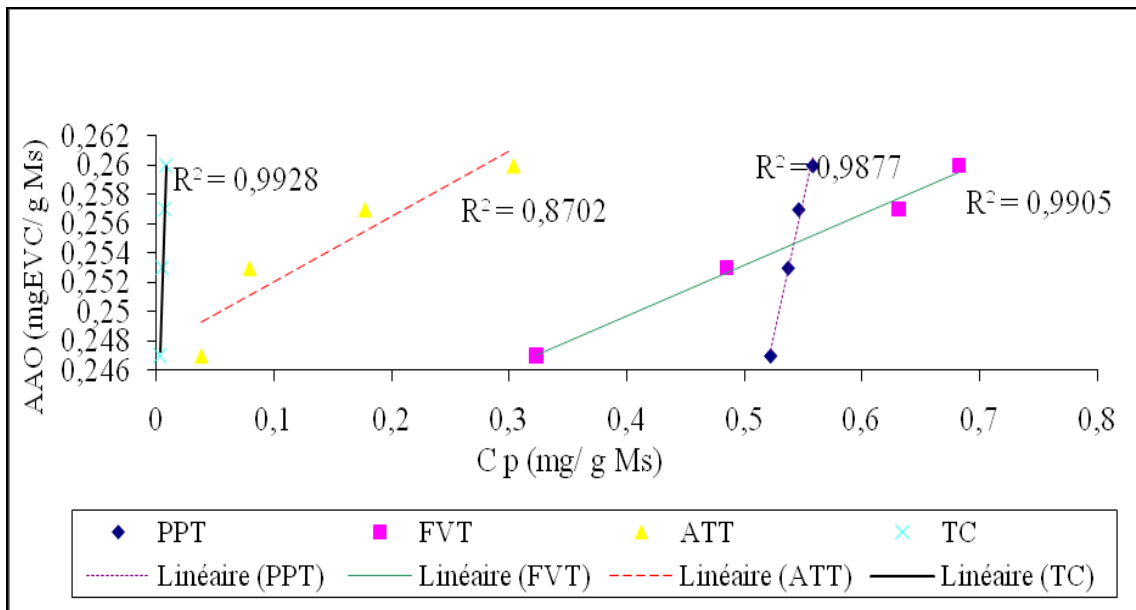


Figure 67: Relation entre AAO et composés phénoliques des extraits de *D. adscendens*
 PPT: Polyphénols totaux (mg Ega/gMs); FVT: flavonoïdes totaux(mg ECt/ gMs); ATT: anthocyanines totaux (mg ECg/ gMs);TC: tanins condensés (mg ECt/ g Ms); Cp: composés phénoliques.

✚ Relation entre AAO et composés phénoliques des extraits des écorces des racines de *S. longependunculata*

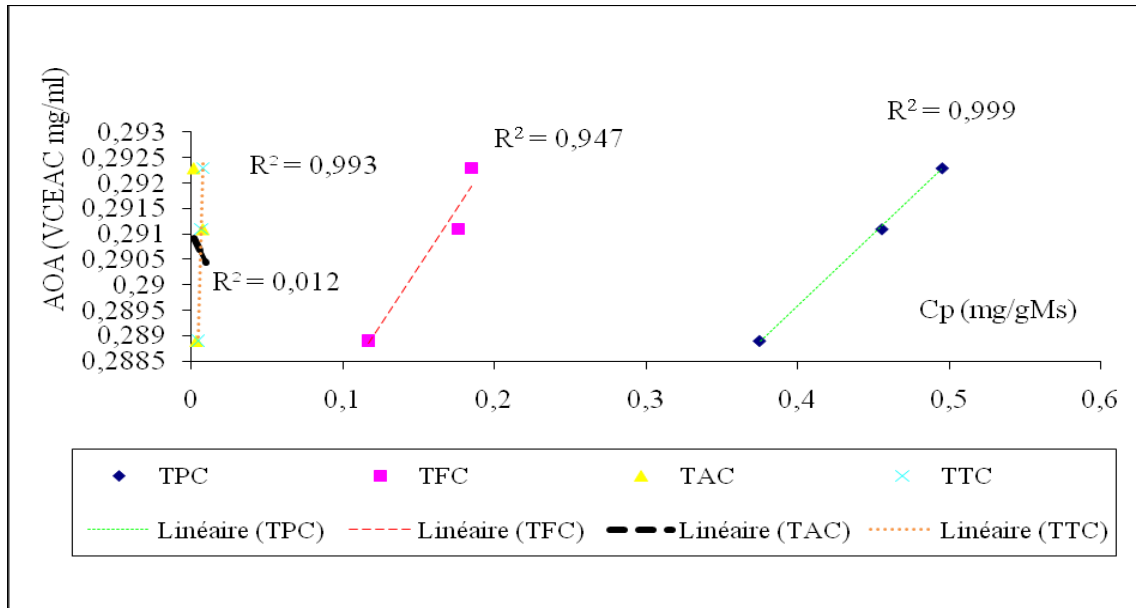


Figure 68: Relation entre l'activité antioxydante et les composés phénoliques des extraits de *S. longependunculata*

✚ Relation entre AAO et composés phénoliques des extraits des feuilles de *S. rebaudiana*

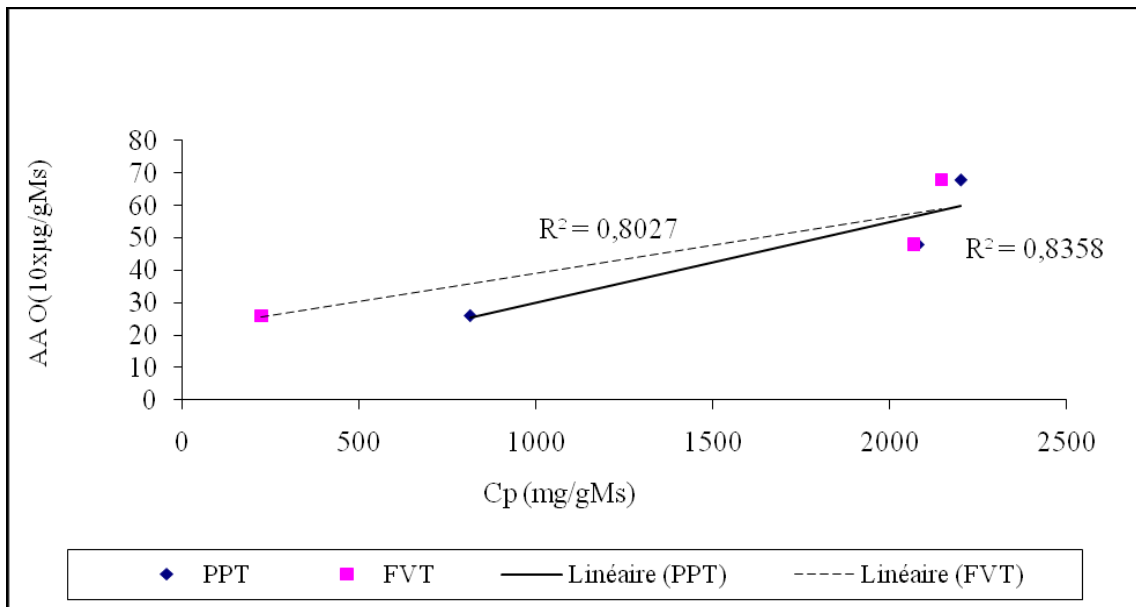


Figure 69: Corrélation entre AAO et composés phénoliques des extraits de *S. rebaudiana* (He, Ee, MEe)

- Relation entre AAO et composés phénoliques des extraits de *D. oliveri*, de *F. capensis* et de *V. doniana*.

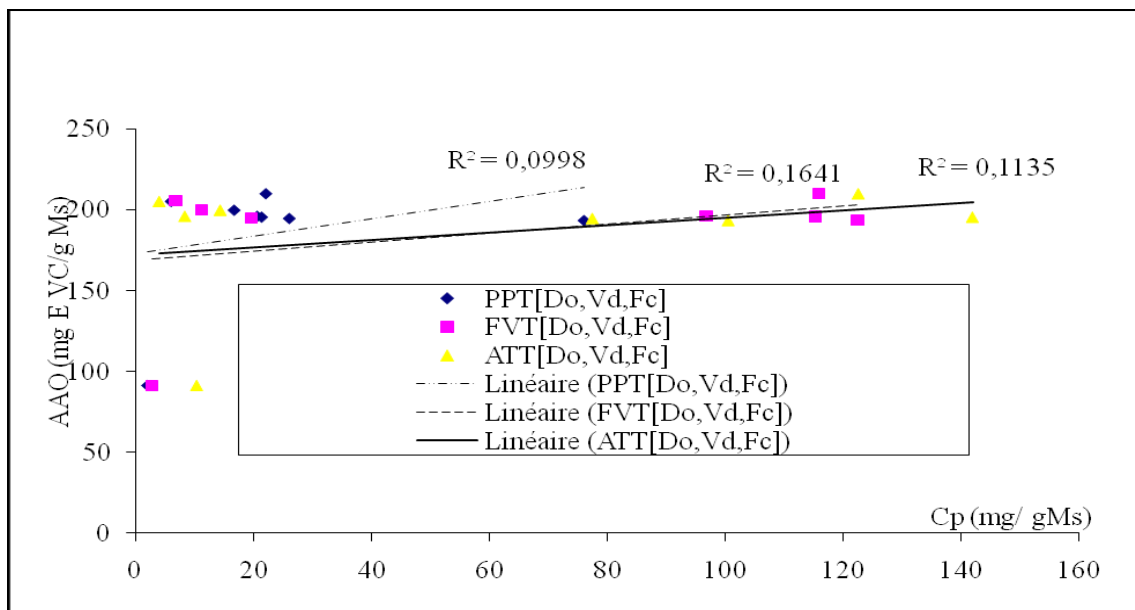


Figure 70: Relation entre les composés phénoliques et les activités antioxydantes des extraits de *D. oliveri* (D.o), *F. capensis* (Fc) et *V. doniana* (Vd)
 Cp: composés phénoliques (ABTS). PPT (mg Ega/gMs), FVT (mg ECt/ gMs), ATT (mg ECg/ gMs) et Tc (mg ECt/ g Ms).

III.3.2. Analyses biologiques des extraits

III.3.2.1. Détermination de l'activité antimicrobienne des extraits des plantes et des huiles essentielles

❖ Rappel sur la notion d'activité antimicrobienne

L'effet bactériostatique

C'est une activité bactérienne au cours de laquelle il ne se manifeste aucune destruction bactérienne, on remarque une inhibition de la croissance bactérienne, croissance qui reprend dès que la substance disparaît.

En limitant la croissance bactérienne, le médicament permet aux défenses naturelles de l'organisme d'entrer en jeu sans être dépassées.

L'effet bactériostatique d'un médicament est évalué par la concentration minimale inhibitrice (CMI en µg/ ml). Pour une souche donnée, la CMI est la plus faible concentration d'antibiotique inhibitrice pour la quelle il n'a plus des germes microbiens visibles.

L'effet bactéricide

C'est un effet qui se manifeste par une accélération de la mort des bactéries aux concentrations d'ATB utilisées *in vivo* ou *in vitro*; s'il persiste moins de 0,01% de survivants après 18 h de culture en présence d'antibiotique.

Détermination de la CMI

❖ Méthode de diffusion

Les disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé (Müller Hinton), préalablementensemencé avec une suspension bactérienne (10^6 CFU/ml) en phase exponentielle de croissance.

A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose, sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration). Les boîtes de Pétri (milieu de culture) sont incubation (18 h à 37 °C), on constate que chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des microorganismes s'arrête là où il existe une concentration d'antibiotique supérieur ou égale à la CMI. Le schéma 21 montre une représentation théorique de cette technique.

Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur approchée de la CMI de l'agent antimicrobien vis à vis de la souche étudiée. En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celui de la CMI, celle-ci est établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des espèces différentes.

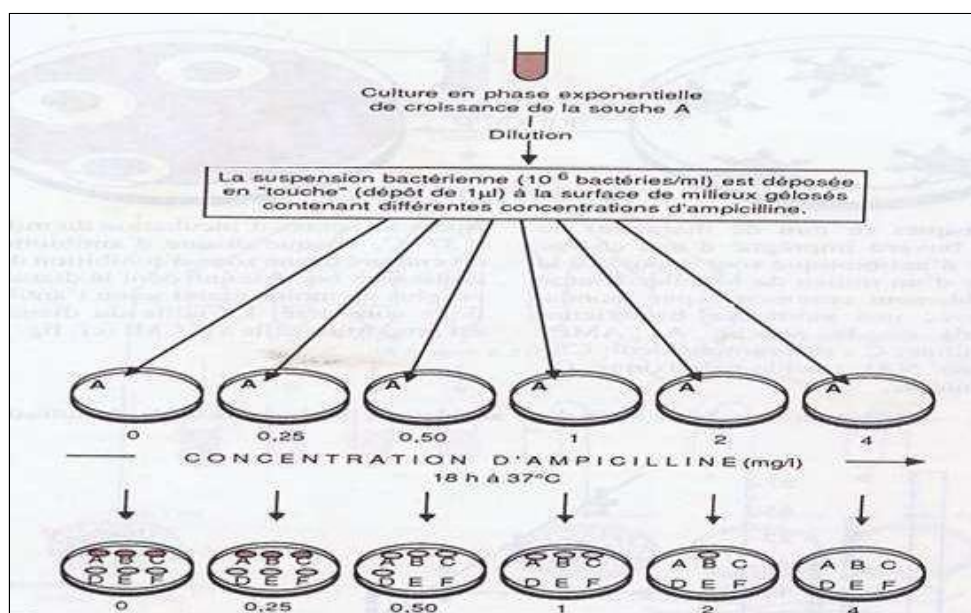


Schéma 21: Détermination de CMI d'un antibiotique par la méthode de diffusion

❖ Méthode de dilution

C'est la méthode de référence, qui peut être pratiquée en milieu solide et liquide.

La mesure de la CMI en milieu liquide est effectuée de la manière suivante, on distribue dans un premier temps dans une série de tubes à hémolyse stériles (ou dans les capsules d'une plaque), un même volume des concentrations décroissantes d'antibiotiques (habituellement en progression géométrique de raison 2). Puis on ajoute dans chacun de tubes, un même volume de culture bactérienne en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ 10^6 bactéries/ml (inoculum bactérien optiquement invisible).

La CMI de l'antibiotique sur la souche étudiée est définie comme la plus faible concentration inhibant toute croissance bactérienne visible à l'œil après 18 ou 24 h de contact à 37°C .

Le principe de la technique en milieu solide est identique, l'antibiotique étant ici incorporé dans un milieu de culture rendu solide par la présence de gélose. L'intérêt de cette technique en milieu solide réside dans la possibilité d'étudier un grand nombre de souches bactériennes. Cette technique est illustrée par le schéma 22.

Toutefois, ces deux techniques sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine d'un grand nombre d'antibiotique sur une souche bactérienne [195].

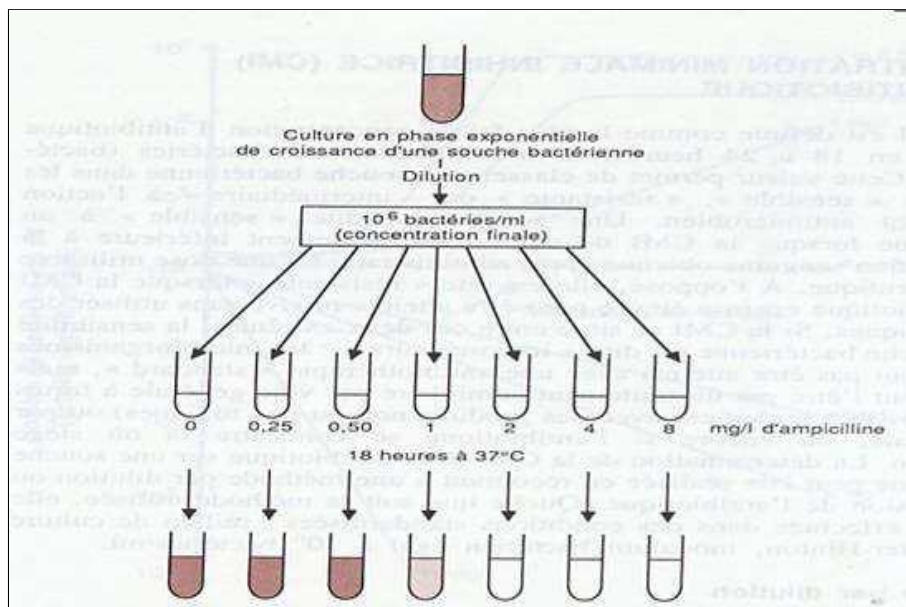


Schéma 22: Détermination de CMI d'un antibiotique par la méthode de dilution en milieu liquide

L'Effet antifongique

Les antifongiques sont des substances qui manifestent un effet fongicide ou fongistatique. Ils sont efficaces sur les levures, les champignons. Ces composés sont efficaces contre les dermatophytes et les moisissures. Les antifongiques sont éventuellement bactéricides.

❖ Matériels, réactifs chimiques, microorganismes et milieux de cultures

Les analyses antimicrobiennes ont été réalisées sur les extraits *D. oliveri* (feuilles, écorces racines et tronc), *D. adscendens* (feuilles), *F. capensis* (feuilles, écorces de racines et de troncs), *V. doniana* (feuilles, huiles essentielles, écorces de racines et de troncs), *S. rebaudiana* (feuilles et huiles essentielles). Ces analyses ont été réalisées au laboratoire de microbiologie de l'IUT de Thionville (Université P. Verlaine de Metz/IBiSE/IUT/ Thionville/ France). Tous les matériels, les réactifs chimiques, les microorganismes et les milieux de cultures utilisés sont conformes aux normes d'analyses, ils nous ont été fournis par ce laboratoire.

Microorganismes

- Souches bactériennes: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Bacillus subtilis* (ATCC 6059), *Echerichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853).
- Champignons et levures: *Candida albicans* (ATCC90028), *Aspergillus niger* (135550/99).

Milieux de cultures: Mueller-Hinton-Agar stérile (26g/ l).

Antibiotiques: Ampicilline, gentamicine, nystatine.

Matérielles et Solvants: Eau distillée, eau physiologique stérile, disques antibiotiques stériles de 6 mm de diamètre

❖ Méthodes d'analyses

Préparation des extraits

2 g d'extrait de la plante ou de la partie de plante lyophilisée sont dissoutes dans 10 ml de solvant (méthanol 50 % et eau distillée). Les solutions sont laissées en agitation pendant 30 minutes puis filtrées à travers un filtre (PTTE) stérile de 0,22 µm.

Les opérations se font sous un filtre à flux laminaire à fin d'éviter les contaminations extérieures et le plan du travail est préalablement stérilisé avec de l'alcool dénaturé.

Préparation des suspensions bactériennes

Les suspensions bactériennes sont préparées 24 h avant l'ensemencement afin d'atteindre une concentration moyenne de $1 \text{ à } 2 \times 10^6$ CFU/ml (Colonies Forming Units par ml) ou bactéries/ ml de sorte à obtenir des colonies juste confluentes. Il est obtenu à partir d'une culture d'environ 24 heures (en phase stationnaire) sur gélose non inhibitrice. L'ajustement de la concentration de l'inoculum de $1 \text{ à } 2 \times 10^6$ CFU/ ml (bactéries/ ml) est essentiel pour la qualité de l'analyse.

Pour cela, nous avons prélevé sur une gélose nutritive quelques colonies de la bactérie à étudier et émulsionner dans un tube en verre contenant 5 ml du milieu de suspension (milieu de Mueller Hinton liquide). Puis nous avons ajusté la concentration à la valeur requise par dilution en utilisant de l'eau physiologique.

Ajustement de la concentration de l'inoculum

Nous avons placé environ 2 ml de la suspension bactérienne dans la cuve du photomètre réglé à 550 nm. Selon les espèces bactériennes, une DO (densité optique) de 0,10-0,12 correspond à $1\text{-}3 \times 10^8$ bactéries/ ml.

La suspension est ajustée à une DO de 0,12 comme précédemment indiquer jusqu'à avoir la concentration requise (10^6 CFU/ ml) pour les bactéries et (10^5 CFU/ ml) pour les champignons et les levures.

Préparation du milieu Mueller Hinton (M.H)

Environ 26 g d'agar nutritif sont pesés puis dissous dans 1 l d'eau distillée, la solution obtenue est ensuite stérilisée à l'autoclave. Le milieu est refroidi, ensuite coulé (environ 25 ml du milieu préparé dans chaque boîte de Pétri jusqu'à la solidification), les boîtes sont séchées sous laminoir (flux à air stérile). Environ 10 billes de verres stériles sont ajoutées dans chaque boîte de Pétri.

Ensemencement

L'ensemencement du milieu s'est fait par inondation (flottage), cette méthode donne des colonies justes confluentes. Ce qui est une des conditions de la bonne réalisation de l'antibiogramme. Pour cela, la boîte de Pétri est inondée de 100 μ l de la suspension à l'aide d'une pipette pasteur, ensuite la suspension est étalée à l'aide de billes de verres préalablement introduites. Les boîtes sont ensuite séchées pendant environ 15 minutes. Les disques (stériles) sont inhibés de 10 μ l de l'extrait de la plante avant d'être étalés sur la surface de la boîte de Pétri puis mises au frais pendant 3 heures pour assurer une bonne diffusion de la suspension microbienne. Les disques sont appliqués sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince en appuyant légèrement.

Des boîtes dites *témoins positifs* dans lesquelles sont mises des disques imbibés de différentes solutions d'antibiotiques (ampicilline, gentamycine et nystatine) et d'autres dites *témoins négatifs* « avec disques imbibés d'eau distillée stérile et du méthanol-eau (50 % v/v) ». Chaque essai est réalisé en triplicata.

Après 1 heure de réfrigération, toutes les boîtes inoculées sont incubées: les bactéries à 37 °C pendant 24 heures, les levures à 36 °C pendant 48 heures tandis que les champignons à 30 °C pendant 72 heures.

Pour chaque boîte, nous avons mesuré la zone d'inhibition avec une latte graduée appliquée presque au contact de la surface de la gélose.

Détermination de la CMI

La CMI a été déterminée suivant la méthode de diffusion décrite ci-dessus (III.3.2). Diverses solutions d'extraits de plantes et d'huiles essentielles ont été préparées à des concentrations différentes (0,25; 0,50; 1; 1,5; 2; 4 et 5 mg/ ml). Ces divers extraits ont été imbibés sur des disques (papier buvard stéril) comme indiqué au ci-dessus puis incubés à 37 °C pendant 24 heures. La CMI de l'antibiotique ou de l'extrait de la plante sur la souche étudiée est définie comme sa plus faible concentration inhibant l'activité microbienne après 18 à 24 h de contact à 37°C, c'est à dire on observe aucune croissance bactérienne visible à l'œil nu.

La boîte correspondant à l'avant dernière à laquelle une croissance bactérienne a été constatée correspond à la boîte de Pétri dont la concentration correspond à la concentration minimale inhibitrice (CMI).

Evaluation des effets bactériostatiques, levostatiques et fongostatiques

Les effets bactériostatiques, levostatiques et fongostatiques ont été évalués en enlevant les divers disques imbibés d'extrait après incubation dans le boîte de Pétri. Concrètement après incubation toutes les boîtes dans lesquelles un halo a été observé sont mises de côté. Après mesure du diamètre du halo, les disques ont été enlevés et les boîtes ont été remises en incubation pendant 3 heures. Si les microorganismes n'ont pas repoussés ceci signifie que l'extrait présente un effet bactériostatique, levostatique ou fongostatique.

III.3.2.2. Résultats des analyses antimicrobiennes

Les résultats de l'évaluation antimicrobienne des extraits sont repris ci-dessous (tableaux 39-46). Dans ces tableaux sont inclus d'une part les valeurs en (mm) zones ou diamètres d'inhibitions, représentant la grandeur du halo formé par les microorganismes détruites par l'activité antimicrobienne (tableaux 39, 41, 43, 45) et d'autre part les valeurs de différentes concentrations minimales inhibitrices (CMI) (tableaux 40, 42, 44, 46). Les figures 71-75 donnent une illustration de la capacité antimicrobienne des certains extraits vis-à-vis des germes tels que les *E.coli*, *B. subtilis*...

Pour l'ensemble des extraits, nous remarquons que les extraits MEe montrent une activité plus élevée que les extraits Ee. Une concentration microbienne minimale inhibitrice de 150 µg/ ml a été évaluée pour l'inhibition de l'ensemble de germes. Quant aux propriétés biostatiques (bactériostatique, fongistatique et levurostatique), tous les extraits étudiés ont manifesté des propriétés actives, l'exemple (figure 73) sur les extraits *F. capensis* (*B. subtilis*). Un résumé complet de l'ensemble des résultats des analyses antimicrobiennes est repris dans le tableau 47.

- Analyses antimicrobiennes des extraits de *D. oliveri*

Tableau 39: Détermination de la zone d'inhibition des extraits de *D. oliveri*

M.O	Zone d'inhibition (ø mm) (<i>D. oliveri</i>)										
	E _t		E _r		E _f		CN (-)		CN(+)		Ny
	Ee	MEe	Ee	MEe	Ee	MEe	H ₂ Od	MeOH (50%)	Ap	Gt	
E.c.	8±1	10±1	7±1	8±1	8±1	12±1	0	0	58±3	55±2	
C.a.	na	16±1	na	na	na	10±1	0	0	na	na	53 ±1
A.n.	n.a	16±2	na	na	na	Na	0	0	na	na	47 ±1
P.a.	14±1	19±1	6±1	8±1	10±1	14±2	0	0	45±3	45±2	na
B.s.	8±2	13±2	6±1	6±1	11±1	11±1	0	0	55±3	45±2	na
S.a.	10±1	11±2	7±1	9±1	11±1	10±1	0	0	56±3	44±2	na

CN: control; *M.O*: microorganisme; *S.a*: *Staphylococcus aureus*; *B.s.*: *Bacillus subtilis*; *E.c.*: *Escherichia coli*; *P.a.*; *Pseudomonas aeruginosa*; *A.n.*; *Aspergillus niger*; *C.a*: *Candida albicans*; *Ee*: Eau extrait; *ME*: méthanol-Eau extrait; *H₂O (-)*: eau didistillée control (-), *MeOH (-)*: méthanol – eau (50/50 v/v) control négative ; *Ap (+)*: Ampicilline control positif; *Gt (+)*: gentamicine control positif; *Ny (+)*: Nystatine control positif; *na*: non actif

Travaux personnels

Tableau 40: Détermination de CMI des extraits de *D. oliveri*

M.O	CMI (mg/ml) (<i>D. oliveri</i>)								
	E _t		E _r		E _f		CN(+) µg/ml		
	Ee	MEe	Ee	MEe	Ee	MEe	Ap	Gt	Ny
E.c.	150	100	>150	>150	150	100	10	10	nd
C.a.	nd	>150	nd	nd	nd	>100	nd	nd	10
A.n.	N	150	nd	nd	nd	nd	nd	nd	10
P.a.	100	100	>150	150	150	100	10	10	nd
B.s.	100	100	>150	150	150	100	10	10	nd
S.a.	100	100	>150	150	150	100	10	10	nd

nd: non déterminé; CMI: concentration microbienne critique

Tableau 41: Détermination de la zone d'inhibition des extraits de *D. adscendens*

M.O	Zone d'inhibition (ø mm) (<i>D. adscendens</i>)							Ny
	Ee	E _f	CN (-)		Ap	CN(+) Gt		
			H ₂ Od	MeOH (50%)				
E.c.	9±1	12±1	0	0	58±3	55±2	na	
C.a.	na	10±1	0	0	na	Na	53±1	
A.n.	na	na	0	0	na	Na	47±1	
P.a.	7±1	11±2	0	0	45±3	45±2	na	
B.s.	8±1	11±1	0	0	55±3	45±2	na	
S.a.	11±2	13±2	0	0	56±3	44±2	na	

Tableau 42: Détermination de la zone d'inhibition des extraits de *D. adscendens*

M.O	CMI (mg/ml) (<i>D. adscendens</i>)					
	Ee	E _f	MEe	Ap	CN(+) µg/ml Gt	
						Ny
E.c.	150	100	100	10	10	nd
C.a.	nd	>100	Nd	nd	Nd	10
A.n.	nd	Nd	nd	nd	Nd	10
P.a.	>150	100	100	10	10	nd
B.s.	>150	100	100	10	10	nd
S.a.	>150	100	100	10	10	nd

nd: non déterminé

Travaux personnels

Tableau 43: Détermination de la zone d'inhibition des extrais de *F. capensis*

M.O	E _t		E _f		CN (-)		CN(+)		
	Ee	MEe	Ee	MEe	H ₂ O _d	MeOH (50%)	Ap	Gt	Ny
E.c.	6±1	7±1	8±1	21±1	0	0	58±3	55±2	n.a
C.a.	na	11±1	na	10±1	0	0	na	Na	53±1
A.n.	na	na	na	24±2	0	0	n.a	Na	47±1
P.a.	8±1	11±1	na	na	0	0	45±3	45±2	na
B.s.	na	Na	11 ±1	16±2	0	0	55±3	45±2	na
S.a.	8±1	10±2	Na	10±1	0	0	56±3	44±2	na

Tableau 44: Détermination de CMI des extrais de *F. capensis*

M.O	E _t		E _f		CN(+) µg/ml		
	Ee	MEe	Ee	MEe	Ap	Gt	Ny
E.c.	>150	100	>150	100	10	10	nd
C.a.	nd	>150	nd	>150	nd	Nd	10
A.n.	nd	nd	nd	nd	nd	Nd	10
P.a.	100	100	nd	nd	10	10	nd
B.s.	nd	Nd	>150	100	10	10	nd
S.a.	100	100	>150	100	10	10	nd

Tableau 45: Détermination de la zone d'inhibition des extrais de *S. rebaudiana*

M.O	Zone d'inhibition (ø mm) (<i>S. rebaudiana</i>)							
	He	E _f		CN (-)		CN(+)		
		Ee	MEe	H ₂ O _d	MeOH (50%)	Ap	Gt	Ny
E.c.	10±1	13±1	21±2	0	0	58±3	55±2	Na
C.a.	15±1	11±2	17±1	0	0	na	Na	53±1
A.n.	19±3	na	16±2	0	0	na	Na	47±1
P.a.	na	13±1	15±2	0	0	45±3	45±2	Na
B.s.	12±2	12±3	10±2	0	0	55±3	45±2	Na
S.a.	12±3	10±1	19±2	0	0	56±3	44±2	Na

Tableau 46: Détermination de CMI des extraits de *S. rebaudiana*

M.O	CMI (mg/ml) (<i>S. rebaudiana</i>)					
	He	E _f		CN(+) µg/ml		
		Ee	MEe	Ap	Gt	Ny
E.c.	>100	100	70	10	10	-
C.a.	>150	100	100	-	-	10
A.n.	>150	na	100	-	-	10
P.a.	nd	>150	70	10	10	-
B.s.	>100	>150	70	10	10	-
S.a.	>100	>150	70	10	10	-

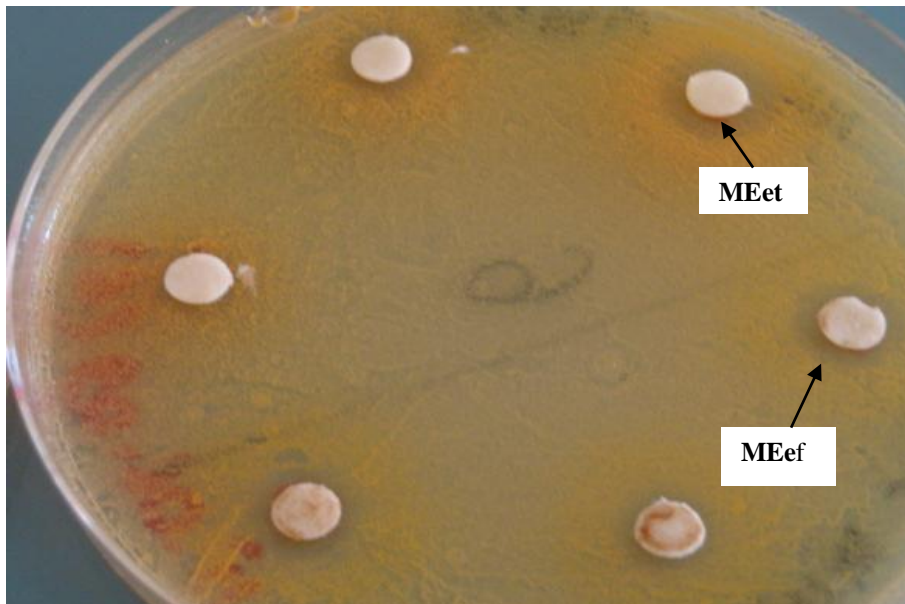


Figure 71: *D. oliveri* (*E.coli*)

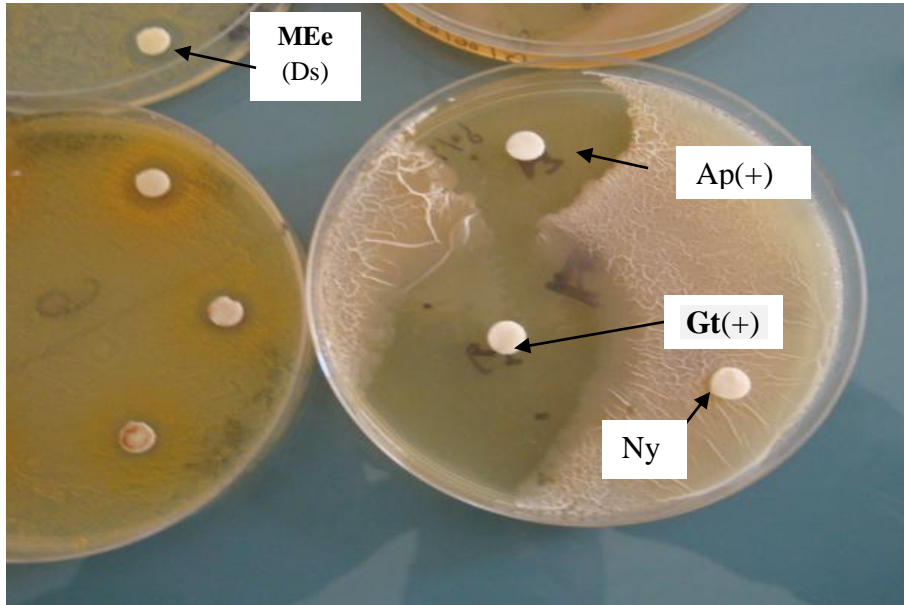


Figure 72: Ds: *Desmodium*, Control (+) (Ap) Gt (+) et Ny (-) (*E. coli*)

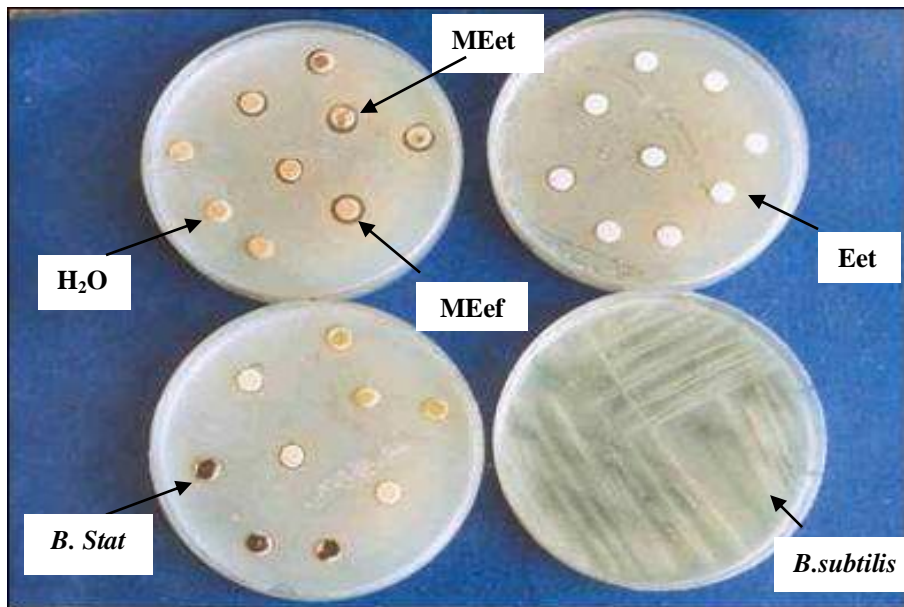


Figure 73: *F. capensis* (*B. subtilis*) Stat: évaluation biostatique

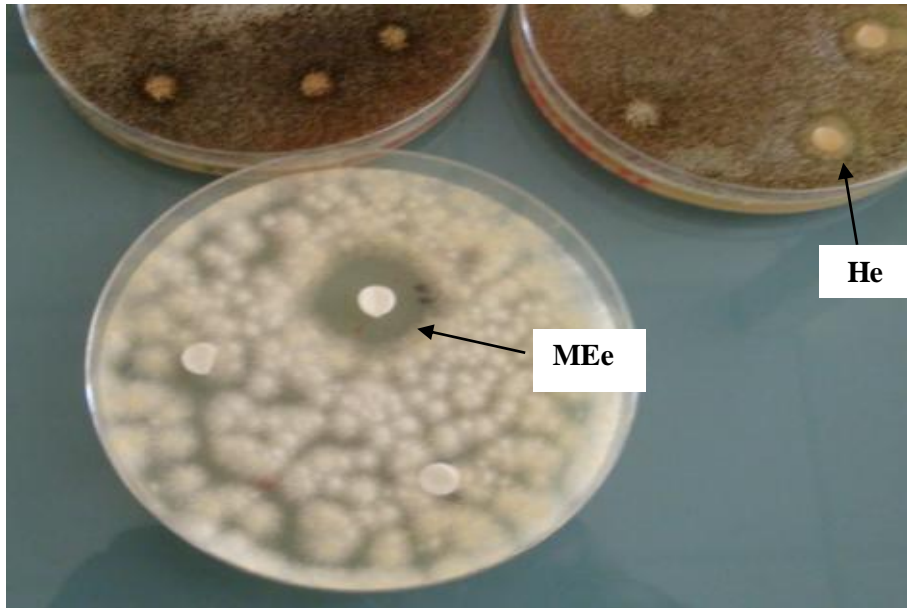


Figure 74: *S. rebaudiana* (*C. albicans*)

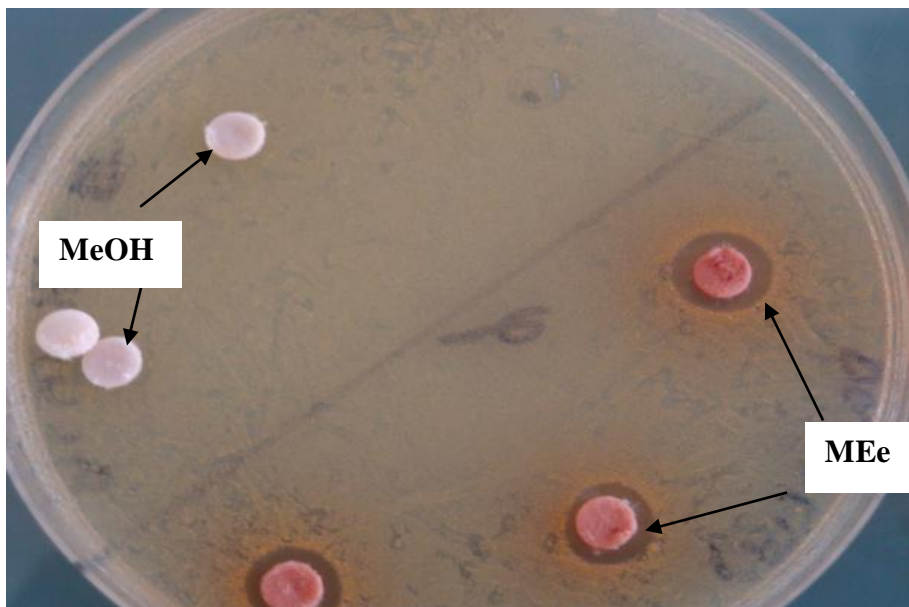


Figure 75: *Stevia rebaudiani* (MEE) contrôle (-): MeOH (50%) (*E.coli*)

Travaux personnels

Tableau 47: Récapitulatif des analyses antimicrobiennes

(Zones d'inhibitions (ø mm))

	(Zones d'inhibitions (ø mm))																					
	<i>D. Oliveri</i>						<i>D. adscendens</i>				<i>F. Capensis</i>				<i>S. rebaudiana</i>			<i>CN</i>				
	Et		Er		F		F		Et		Er		F		F			CN (-)		CN (+)		
	Ee	MEe	Ee	MEe	Ee	MEe	Ee	MEe	Ee	MEe	Ee	MEe	Ee	MEe	He	Ee	MEe	Eau	Met	Ap	Gt	Ny
<i>E. coli</i>	8	10	7	8	8	12	9	12	6	7	nd	nd	8	21	10	13	21	0	0	58	55	n.a
<i>C. albicans</i>	na	16	Na	na	na	10	na	10	na	11	nd	nd	na	10	15	11	17	0	0	n.a	n.a	53
<i>A. niger</i>	n.a	16	Na	na	na	na	na	na	n.a	Na	nd	nd	na	24	19	n.a	16	0	0	n.a	n.a	47
<i>P. aeruginosa</i>	14	19	6	8	10	14	7	11	8	11	nd	nd	na	na	n	13	15	0	0	45	45	na
<i>B. subtilis</i>	8	13	6	6	11	11	8	11	na	na	nd	nd	11	16	12	12	10	0	0	55	45	na
<i>S. aureus</i>	10	11	7	9	11	10	11	13	8	10	nd	nd	na	10	12	10	19	0	0	56	44	na

III.3.2.3. Analyse *in vitro* de propriétés anti-inflammatoires de quelques extraits

III.3.2.3.1. Rappel sur la notion d'activité anti-inflammatoire

Définition

L'anti-inflammatoire, désigne une substance qui s'oppose ou combat l'inflammation. De façon générale l'inflammation correspond à un ensemble de phénomènes survenant à un point d'irritation après l'invasion par un agent pathogène (susceptible d'engendrer une maladie). À la suite d'une agression constituée par une blessure, une infection ou un traumatisme consécutif à un acte chirurgical, il se crée dans l'organisme ce que l'on appelle une inflammation. Classiquement, une inflammation se manifeste par quatre signes principaux : rougeur, chaleur, tuméfaction (gonflement), douleur.

Le mécanisme inflammatoire fait intervenir un grand nombre de substances présentes dans le sang, entre autres de nombreuses hormones, comme les prostaglandines, l'histamine, des compléments, les cytokines participent à l'inflammation.

Classification

Les anti-inflammatoires sont classés en stéroïdiens (médicaments composés de molécules stéroïdiennes telles que les corticoïdes, les gluco-corticostéroïdes et ses dérivés), et en non stéroïdiens (pyrazolés, molécules divers comme l'aspirine, les oxycams, les dérivés carboxyliques et indoliques). A titre d'exemple, les glucocorticostéroïdes sont essentiellement utilisés comme antiallergique et immunosuppresseur (procédé provoquant une diminution ou une abolition des réactions immunitaires). Ceci permet en cas de greffe d'organes, la prévention du rejet. Ces médicaments sont également employés en cas de leucémie, parfois en association avec des produits anticancéreux.

Matériels, réactifs chimiques

- *Matériels végétaux*

Les analyses anti-inflammatoires ont été réalisées sur les extraits de *F. capensis* (feuilles), *S. longependunculata* (écorces de racines) et *S. rebaudiana* (feuilles et huiles essentielles).

- Réactifs de Griess

Composition (A): 0,1% sulfanilamide dans l'acide phosphorique concentré soit 0,5g de sulfanilamide dans 1,47 ml d'acide phosphorique concentré, ajusté le volume à 50 ml avec de l'eau distillée; puis gradé au frais (+4 C°).

(B): 0,05% N-(naphthyl-1) éthylène diamine dans 0,25% d'acide phosphorique concentré soit 0,25 g de NEDA dans 1,47 ml H₃PO₄ conc.

Médiateurs chimiques (inducteur de la production de NO): lipopolysaccharide (*LPS*) et gamma interféron (*IFN*γ)

III.3.2.3.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire par le test de nitrite

Principe de la méthode

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité anti inflammatoire est celle basée sur la réduction du nitrite. En effet, le test utilisé pour évaluer le potentiel anti-inflammatoire de molécules consiste à déterminer leur capacité à inhiber la production de NO dans les macrophages activés [196]. La production du le nitrite (NO₂) dans le milieu de culture a été mesuré comme un indicateur de la production de NO selon le test colorimétrique basée sur la réaction de Griess [197].

Brièvement, 150 µl de surnageant (extrait) ont été mélangés avec 150 µL de réactif de Griess, à température ambiante pendant 30 min. La concentration de nitrite est déterminée par la mesure l'absorbance à 548 nm au spectrophotomètre UV en utilisant une courbe standard de NaNO₂. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la production de NO par rapport à la formule suivante: % Inhibition = 100 × ([NO₂]⁻_{control} - [NO₂]⁻_{Extrait}) / [NO₂]⁻_{control}

[NO₂]⁻_{control}: concentration de nitrite produit en absence d'extrait

[NO₂]⁻_{Extrait}: concentration de nitrite produit en présence d'extrait

Courbe d'étalonnage

La réalisation de la courbe d'étalonnage, figure 76, est établit en préparant divers solutions de NaNO₂ notamment (0,02 mg/ ml, 0,04 mg/ ml, 0,06 mg/ ml, 0,08 mg/ ml et 0,1 mg/ ml) Les solutions sont mélangées avec les réactifs de Griess comme indiqué ci- haut. Les solutions étalons et les échantillons sont préparés et analysés dans les mêmes conditions.

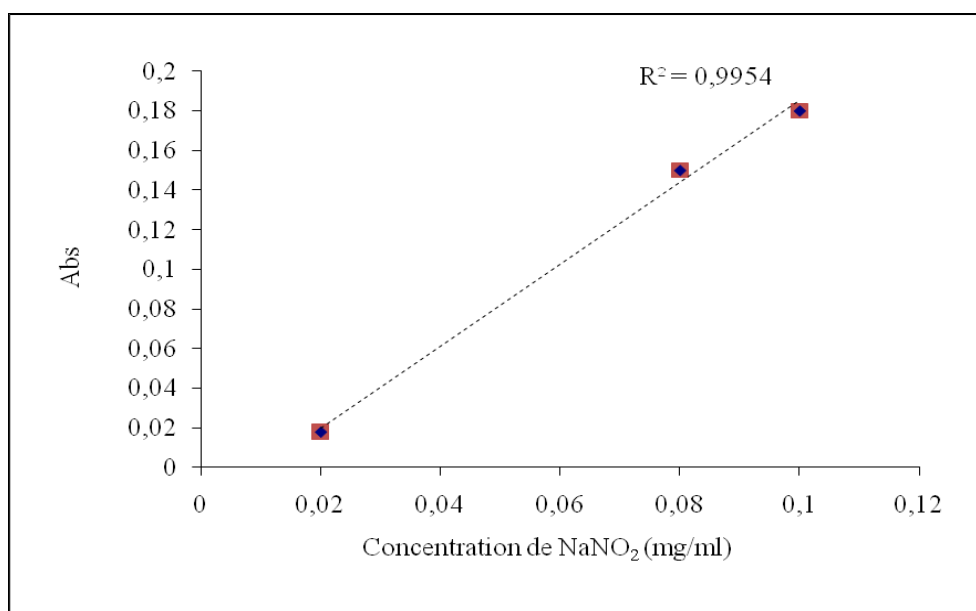


Figure 76: Droite d'étalonnage NaNO₂ pour l'évaluation in vitro de l'activité anti-inflammation

III.3.2.3.3. Résultats de l'évaluation in vitro des propriétés anti-inflammatoires des extraits

- Extraits des écorces feuilles des *F. capensis*

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits (He, Ee, MEe) de *F. capensis* est reportée dans la figure 82. Nous remarquons que la quantité de NO₂⁻ dosée est proportionnelle à la concentration de l'extrait (volume) et que l'ensemble des extraits étudiés ont une activité anti-inflammatoire significative. Mais les valeurs mesurées sont dans l'ordre croissant des huiles essentielles aux extraits hydro-méthanoliques (He < Ee < MEe).

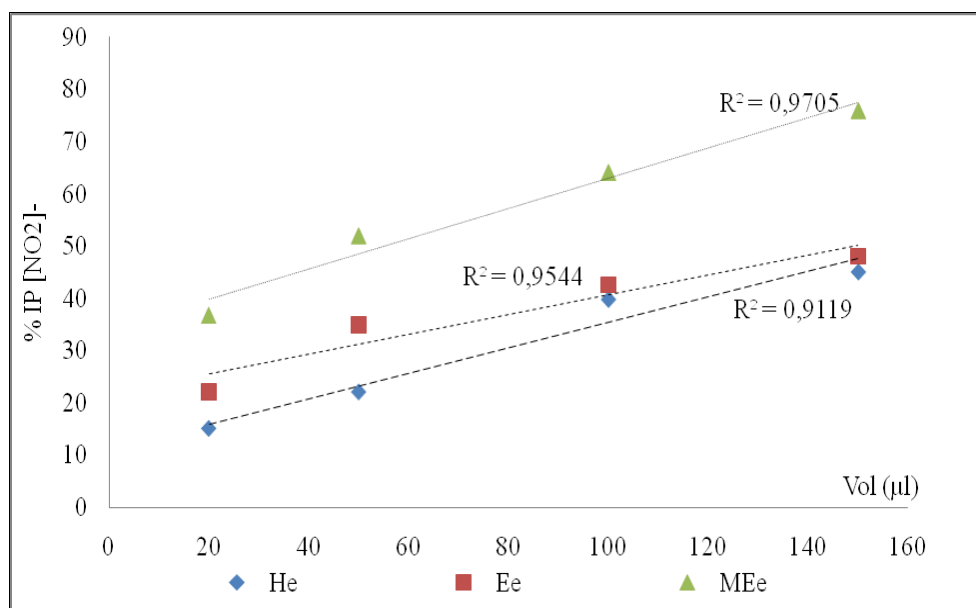


Figure 77: Evolution de l'activité anti-inflammatoire des extraits des feuilles de *F. capensis* (He: huile essentielle, Ee: extrait aqueux; MEe: extrait méthanol-eau)

- Extraits des écorces des racines de *S. longependunculata*

Les résultats présentés dans la figure 83 montrent que les extraits de *S. longependunculata* présentent des propriétés anti-inflammatoires significatives.

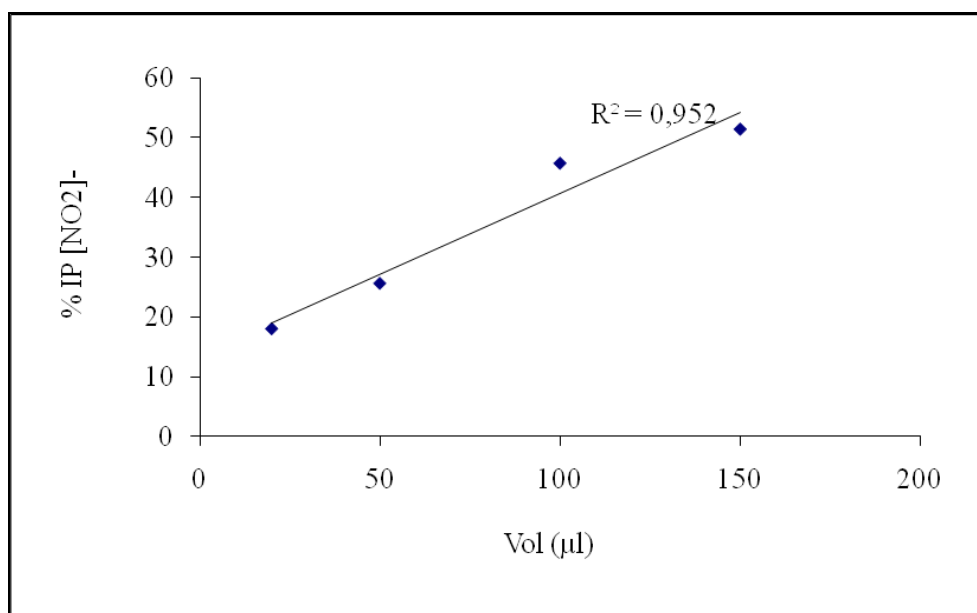


Figure 78: Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits des racines de *S. longependunculata*

- Extraits des feuilles de *Stevia rebaudiana*

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits (He, Ee, MEe) de *Stevia rebaudiana* est reportée dans la figure 84. Comme pour le cas des extraits de *F. capensis*, nous remarquons que la quantité de NO₂⁻ dosée est proportionnelle à la concentration de l'extrait (volume) et que ces extraits ont une activité anti-inflammatoire significative beaucoup plus importante que celle de *F. capensis* et les valeurs mesurées sont aussi dans l'ordre croissant des huiles essentielles aux extraits hydro-méthanoliques (He < Ee < MEe).

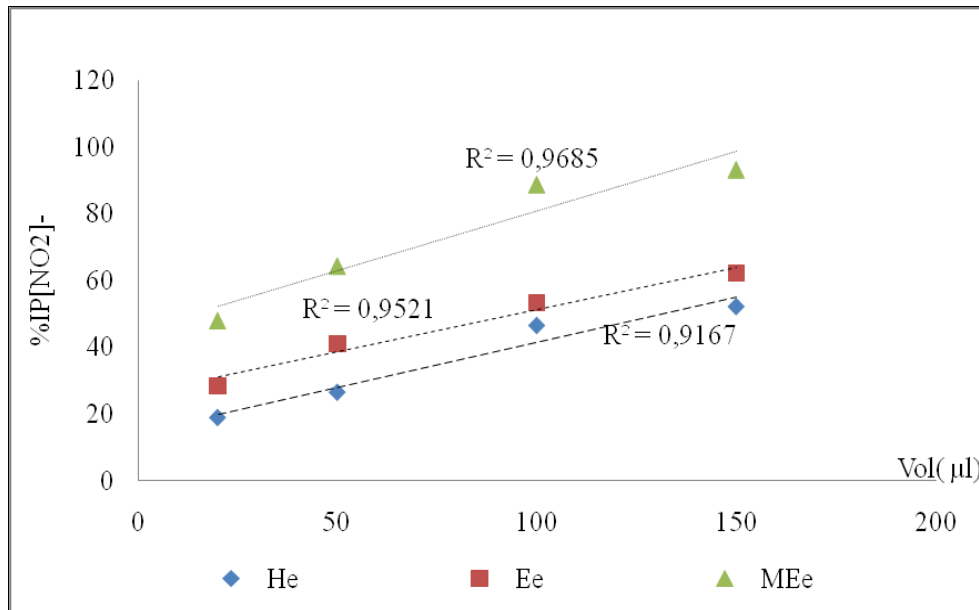


Figure 79: Evaluation de l'activité anti inflammatoire des extraits des feuilles de *S. rebaudiana* (He: huile essentielle, Ee: extrait aqueux; MEe: extrait Méthanol-eau)

III.3.2.4. Relation entre composés phénoliques et propriétés biologiques

Dans la figure 85 nous avons tracé les droites de corrélation entre l'activité anti-inflammatoire des extraits de feuilles de *S. rebaudiana* et les composés phénoliques. Nos résultats montrent qu'il existe une corrélation positive qui varie entre $R^2 = 0,73$ et $0,97$, en fonction de la nature des polyphénols (PPT, FVT, ATT, TC). L'analyse des coefficients de corrélation nous indique que l'activité anti-inflammatoire dépend d'abord des anthocyanines ($R^2 = 0,97$) puis des tanins ($R^2 = 0,79$), des flavonoïdes ($R^2 = 0,77$) et enfin des polyphénols totaux ($R^2 = 0,73$).

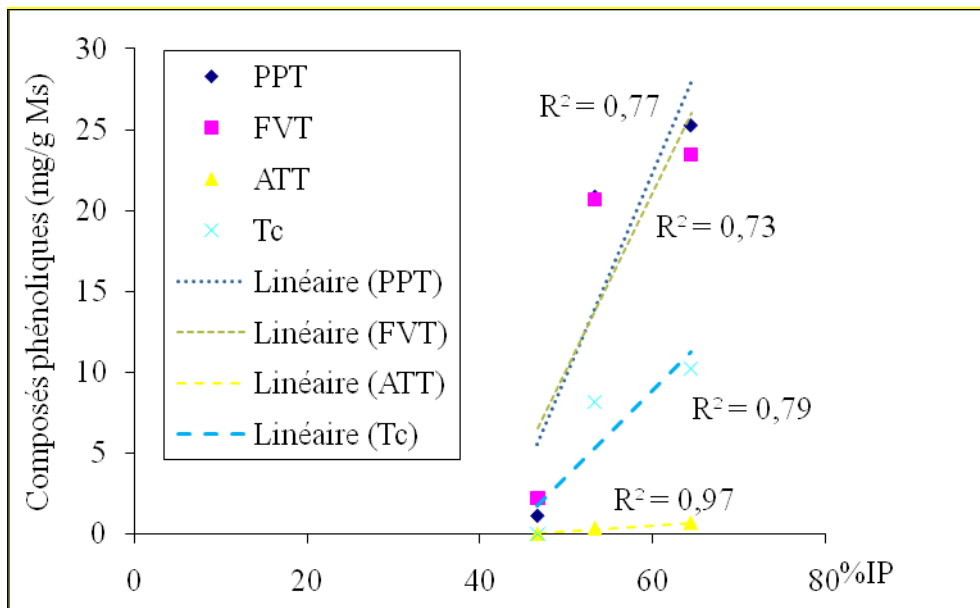


Figure 80: Relation entre les composés phénoliques et les propriétés anti-inflammatoires des extraits de *S. rebaudiana*.

III.3.2.5. Evaluation de l'influence des composés phénoliques sur la biorémédiation des sols pollués

L'influence des composés phénoliques sur la biorémédiation des sols pollués a été mise en évidence par une étude *in vitro* réalisée au laboratoire de microbiologie de L'IUT de Thionville, dans le cadre de la thèse de Didier Técher (thèse en cours « Réhabilitation de sols pollués par des HAPs (Hydrocarbures polycycliques aromatiques) grâce aux bactéries associées à la rhizosphère de *Miscanthus X giganteus* », LIEBE, Université Paul Verlaine-IUT Thionville-Yutz).

Cette étude est basée sur les processus de bioremédiation de sols pollués par des HAPs. L'identification des exsudats racinaires de *Miscanthus X giganteus* (MXG) a été réalisée, avec d'une part la mise en évidence de molécules servant de substrats de croissance non spécifique (acides-aminés, sucres), et d'autre part de molécules à structure cyclique plus particulière de type flavonoïdes. Ces dernières peuvent être impliquées dans les processus de biodégradation des HAP par cométabolisme.

L'étude de l'impact de l'ajout d'exsudats totaux de MXG sur la microflore bactérienne a montré une stimulation significative de la croissance bactérienne, ainsi que le maintien et l'augmentation plus spécifique de l'activité de biodégradation des souches HAP-dégradantes, un phénomène pouvant en partie être expliqué par la présence de quercétine et de rutine au sein des métabolites secondaires identifiés.

Les conclusions préliminaires de cette étude montrent clairement que les composés phénoliques influent sur le processus de la biorégénération des sols pollués en favorisant la dégradation des certains HAPs par des microorganismes.

CONCLUSION

Etant donné la toxicité et/ou les effets secondaires indésirables des molécules de synthèse ainsi que la résistance de certains germes microbiens face aux médicaments existants, l'utilisation des plantes qui contiennent des composés bio-actifs est en progression constante. En effet, compte tenu de leur meilleure biocompatibilité on observe une demande croissante des produits d'origine naturelle.

L'objet de notre travail a porté sur l'étude phytochimique de *D. oliveri*, de *D. adscendens*, de *F. capensis*, de *S. longependunculata*, de *S. rebaudiana* et de *V. doniana* qui sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle.

Une étude bibliographique réalisée sur ces espèces a montré que l'on ne disposait que de peu d'informations de nature chimique et/ou biologique. Pour pallier ce manque d'informations, notre étude s'est focalisée sur les analyses qualitative et quantitative, les évaluations du potentiel antioxydant et de l'activité biologique des extraits de ces plantes d'intérêt.

Afin d'identifier, de caractériser les polyphénols, les flavonoïdes, les anthocyanines et les tannins de nos extraits, puis d'évaluer leur potentiel antioxydant nous avons appliqué une méthodologie essentiellement basée sur la combinaison de différents modes d'extractions, de moyens de spectroscopie UV-visible, SM, RMN (^1H , ^{13}C) et de méthodes de chromatographie (CCM, CC, HPLC, GC-MS).

Nos résultats montrent que nos plantes contiennent toutes des composés phénoliques, celles qui en contiennent le plus sont: le *D. oliveri* et le *F. capensis*. Une caractérisation, par RMN 2D, de la rutine, la quercétine, l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique et l'acide cinnamique, composés isolés dans les extraits de feuilles de *D. adscendens*, a été réalisée.

L'évaluation des propriétés antioxydantes révèle que toutes ces plantes manifestent une forte activité et plus particulièrement les extraits de *D. oliveri* et de *V. doniana*. De plus, une corrélation positive entre l'activité antioxydante et la teneur en composés polyphénoliques a été établie dans le cas des extraits de *D. adscendens*, de *S. longependunculata* et de *S. rebaudiana*.

Cette méthodologie a également été appliquée avec succès aux exsudats de *Miscanthus x giganteus*.

L'effet pharmacologique de nos plantes a été mis en évidence par une évaluation de leurs propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires. Il apparaît que ces plantes, et plus particulièrement les feuilles de *S. rebaudiana* présentent des propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires intéressantes.

Une corrélation positive entre l'activité anti-inflammatoire et les composés polyphénoliques a été établie dans le cas des extraits de feuilles de *S. rebaudiana*.

Cette étude valide scientifiquement l'usage traditionnel de ces plantes et révèle leur intérêt dans le cadre d'une exploitation en biotechnologie.

Pour la suite, il serait intéressant d'isoler et de caractériser les composés phénoliques des autres extraits plantes (*D. oliveri*, *S. longepedunculata*, *V. doniana*, *S. rebaudiana*, *F. capensis*). Aussi, serait-il souhaitable, pour une meilleure compréhension du mode d'action des dérivés polyphénoliques, d'évaluer *in vitro* et *in vivo* l'activité antioxydante de chacun de ces composés pris séparément. Ce qui permettrait alors de mettre en évidence le principe actif des extraits de plante et/ou une éventuelle synergie entre les différents composés phénoliques.

Références bibliographiques

1. Boldi A.M., 2004. Libraries from natural product-like scaffolds. *Current Opinion in Chemical Biology* 8: 281 - 286.
2. Clardy J., Walsh C., 2004. Lessons from natural molecules. *Nature* 432: 729 - 837.
3. Koehn F. E., Carter G.T., 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Review Drug Discovery* 4: 206 - 220.
4. Newman D.J., Cragg G.M., Snader K.M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981 - 2002. *Journal of Natural Products* 66: 1022 - 1037.
5. Newman D. J., Cragg G. M., Snader K. M., 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Report* 17: 215 - 234.
6. Calixto J. B., 2005a. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 131 - 134.
7. Marston A. L. M. and Hosttemann K., 2003. Triterpenoid saponins from the roots of *Silene cucubalus*. *Fitoterapia* 74: 237 - 241.
8. Gurib-Fakim A., 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 1 - 93.
9. Gómez - Caravaca A. M, Gómez - Romero M, Arráez - Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A., 2006. Advances in the analysis of phenolic compound in products derived from bees. *Journal of Pharmacology and Biomedicine Analysis* 41: 1220 - 34.
10. Muanda N. F., Koné D., Dicko A., Soulimani R., Younos C. 2009. Phytochemical composition and antioxidant capacity of three Malian Medicinal plant parts. *ECAM* doi:10.1093/ecam/ nep109: 1 - 8.
11. Bhattacharyya B., Johri B.M., 1998. Flowering Plants Taxonomy and Phylogeny, pp: 526, Springer - Verlag, Norsa *Publishing House*, New York.
12. Guignard J.L., 1972. Abrégé de botanique, Ed. *Masson*, Paris, 257 p.
13. Guignard J.L., 1996. Abrégé de biochimie végétale, Ed. *Masson*, Paris, 160 p.
14. Malagas D., 1992. Arbres et arbustes guérisseurs des savanes Maliennes. ACCT - Karthala, p. 232.
15. Traoré-Keïta, F., Gasquet, M., Di Giorgio, C., Ollivier, E., Delmas, F., Keïta, A., Doumbo, O., Balansard, G., Timon-David, P., (2000). Antimalarial activity of four plants used in traditional Medicine in Mali. *Phytotherapy Research* 14, 45-47.

16. Ahmadu A., Kaita H., Garba M., Yaro A., 2003. Antispasmodic actions of the leaves of *Daniellia oliveri*. *Nigerian Journal of Natural Products and Medicine* 7: 13 - 15.
17. Onwukaemen N.D., 2006. Pharmacological activities of extracts of *Daniella oliveri* [Rolfe] Hutch. and Dalz. [Leguminosae]. *Phytotherapy-research* 9: 306 - 308.
18. Iwueke A.V., Nwodo O. F.C., 2008. Antihyperglycaemic effect of aqueous extract of *Daniella oliveri* and *Sarcocephalus latifolius* roots on key carbohydrate metabolic enzymes and glycogen in experimental diabetes. *Biokemistri* 20: 63 - 70.
19. Onwukaema D, N and Udoh F., 1999. Anti-ulcer activity of the Stem bark of *Daniellia oliveri*. *Nigerian Journal of Nature Produit and Medecine* 3: 39 - 41.
20. El-Mahmood A.M., Doughari J. H., Chanji F.J., 2008. In vitro antibacterial activities of crude extracts of *Nauclea latifolia* and *Daniella oliveri*. *Scientific and Essay* 3: 102 - 105.
21. Fané S., 2003. Etude de la toxicité de certaines plantes vendues sur les marchés du district de Bamako. *Thèse de pharmacie*, Bamako, 130 p.
22. <http://database.prota.org/recherche.htm> [consulté le 12 .10. 2009].
23. <http://en.wikipedia.org/wiki/Desmodium> [consulté le 16. 10. 2009].
24. Ampopo O., 1977. Plants that heal. *World Health*. 26 - 30.
25. Addy M. E. and Awumeye M. K., 1984. Effects of the extracts of *Desmodium adscendens* on anaphylaxis. *Journal of Ethno pharmacology* 11: 283 - 292.
26. <http://www.rain-tree.com/ethnic.htm> [consulté le 12.10. 2009].
27. Mamyrbékova-Békro J. A., Konan K. M., Békro Y. A., Djié Bi M. G., Zomi Bi T. J., Mambo V., Boua Boua B., 2008]. Phytocompounds of the Extracts of Four Medicinal Plants of Côte d'Ivoire and Assessment of their Potential Antioxidant by Thin Layer Chromatography. *European Journal of Scientific Research* 24: 219 - 228.
28. Heard O., 1994. Contribution à l'étude du *Desmodium Adscendens*: chimie et pharmacologie". Thèse de pharmacie, Université de Tours, France.
29. Addy M.E., Burka J.F., 1990. Effect of *Desmodium Adscendens* fraction 3 on contractions of respiratory smooth muscle. *Journal of Ethno pharmacology* 29: 325 - 335
30. N'gouemo P., Baldy-moulinier M., Nguemby-bina C., 1996. Effects of an ethanolic extract of *Desmodium Adscendens* on central nervous system in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 52: 77 - 83.
31. *Desmodium adscendens*, 1989a. Evaluation de la toxicité aiguë par voie orale chez le rat. *Centre International de Toxicologie*. Evreux, France.

32. *Desmodium adscendens*, 1989b. Test du micronoyau chez la souris. *Centre International de Toxicologie*. Evreux, France.
33. *Desmodium adscendens*, 1990. Essai de mutation reverse par le test d'Ames. Centre International de Technologie. Evreux, France.
34. *Desmodium adscendens*, 2004. Etudes ethnobotanique et toxicologique. *Ethnobotanique & Pharmacologie Laboratory*, Université de Metz, France.
35. *Desmodium adscendens*, 2006. Etude des effets immunomodulateur et antioxydants. *Ethnobotanique & Pharmacologie*, Université de Metz, France.
36. <http://www.foa.org> [2003]. The Wodaabe's Ecological Analysis of the Plant World/ [Arbres fruitiers sauvages et protégés en préfecture Logone Oriental, S. Tchad, Roger Blench. Overseas Development Institutes à Londres] [consulté le 16. 10. 2009].
37. Thomas D. W., 1988. The influence of aggressive ants on fruit removal in the tropical tree, *Ficus capensis* [Moraceae]. *Biotropica* 20: 49 - 53.
38. <http://www.proto.org>
39. Lumbile A. U. and Mogotsi K. K., 2008. *Ficus sur Forssk.* [Internet] Fiche de Protabase. Louppe D., Oteng-Amoako A. A. & Brink M. [Editeurs].
40. Diawara D., 2000. Les données statistiques sur les produits forestiers non-ligneux en république de Guinée programme de partenariat ce-fao [1998 - 2001] www.fao.org, 2000.
41. Daffalla H.A.A., 2005. Studies on the constituents of *Ficus capensis* [Thunb]. *Pakistan journal of social science* 3: 751 - 754.
42. Oyeleke, S. B., Dauda, B. E. N., Boye, O. A., 2008. Antibacterial activity of *Ficus capensis*. *African Journal of Biotechnology* 7: 1414 - 1417.
43. Ahmadu A. A., Zezi A. U., Yaro A. H., 2007. Anti-diarrheal activity of the leaf extracts of *Daniellia oliveri* Hutch and Dalz [Fabaceae] and *Ficus sycomorus* Miq [Moraceae]. *African Journal of Traditional, Complimentary and Alternative Medicines* 4: 524 - 528.
44. Kunle O.O., Shittu A., Nasipuri R.N., Kunle O.F, Wambebe C., Akah P.A. 1999. Gastrointestinal activity of *Ficus sur*. *Fitoterapia* 70: 542 - 547.
45. Lansky E. P., Paavilainen H. M, Pawlus A. D, Newman R.A., 2008. *Ficus spp.* [fig]: Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. *Journal of Ethnopharmacology* 119: 195 - 213.
46. Luna L. E., 1984a. The healing practices of a Peruvian shaman. *Journal of Ethnopharmacology* 11:123 - 133.

47. Luna L. E., 1984b. The concept of plants as teachers among four mestizo shamans of Iquitos, Northeastern Peru. *Journal of Ethnopharmacology* 11: 135 - 156.

48. Ayinde B.A., Omogbai E.K., Amaechina F.C., 2007. Pharmacognosy and hypotensive evaluation of *Ficus exasperata* Vahl [Moraceae] leaf. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 64: 543 - 546.

49. Watson L., and Dallwitz M.J., 1992. Onwards the families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Version: 24th October 2009 [[http://www. delta-intkey.com](http://www.delta-intkey.com)].

50. Brooth F. E. M. and Wickens G. E., 1988. Non-timber uses of selected arid zone trees and shrubs in Africa, Rome, F.A.O, *conservation Guide* n 19, 176p.

51. Alexandre D. Y., 2002. Initiation à l'agroforesterie en zone sahélienne. *Ed. Karthala*, p 154.

52. Adebisi R. A., Elsa A. T., Agaie B. M, Etuk E.U., 2006. Antinociceptive and antidepressant like effects of *Securidaca longepedunculata* root extract in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 234 - 239.

53. Nébié R.H.C., Yaméogo R.T., Bélanger A., Sib F.S., 2004. Salicylate de méthyle, constituant unique de l'huile essentielle de l'écorce des racines de *Securidaca longepedunculata* du Burkina Faso. *Comptes Rendus Chimie* 7: 1003 - 1006.

54. Ruakuambo N.C., Meyer, J. J. M., Hussein A., Huyser C., Mdlalose S.P., Raidani T.G., 2006. In vitro effect of medicinal plants used to treat erectile dysfunction on smooth muscle relaxation and human sperm. *Journal of Ethnopharmacology* 105, 84 - 88.

55. Yang Xue-Dong, Xu Li-Zhen, Yang Shi-Lin, 2001. Xanthones from the stems of *securidaca inappendiculata*. *Phytochemistry* 58: 1245-1249.

56. Okoli CO, Akah PA, Ezugworie U., 2006. Anti-inflammatory activity of extracts of root bark of *Securidaca longipedunculata* fres [polygalaceae]. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 3: 54 - 63.

57. Junaid S. A, Abubakar A., Ofodile, A. C., Olabode A. O., Echeonwu, G. O. N., Okwori A. E. J., Adetunji J. A., 2008. Evaluation of *Securidaca longipedunculata* leaf and root extracts for antimicrobial activities. *African Journal of Microbiology Research* 2: 322 - 325.

58. Bah S., Jäger, A. K., Adsersen, A., Diallo, D., Paulsen B. S., 2007. Antiplasmodial and GABA_A-benzodiazepine receptor binding activities of five plants used in traditional medicine in Mali, West Africa. *Journal of Ethnopharmacology* 110: 451 - 457.

59. Mahmood N., Moore P. S., Tomasi N. D., Simone F. D., Colman S., Hay A. J., Pizza C., 1993. Inhibition of HIV infection by cafeoyquinic acid derivatives. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 4: 235 - 240.
60. Dapar L. P. M., Aguiyi C. J., Wannang N. N., Gyang S. S., Tanko M. N., 2007. The histopathologic effects of *Securidaca longepedunculata* on heart, liver, kidney and lungs of rats. *African Journal of Biotechnology* 6: 591 - 595.
61. Rendle A. B., 1979. The classification of flowering plants. Cambridge University Press, Vol. II, India, pp. 587.
62. Brandle J. E., Starratt A. N., Gijzen M., 1998. *Stevia rebaudiana* Its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian Journal of Plant Sciences* 78: 527 - 536.
63. Cario F., 2002. Étude de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Rapport de recherche bibliographique, DESS Ingénierie documentaire. Ecole nationale Supérieure des Sciences de l'information et des Bibliothèques.
64. Yao Y., Ban M., Brandle J., 1999. A genetic linkage map for *Stevia rebaudiana*. *Genome* 42: 657 - 661.
65. Midmore D. J. and Rank A. H., 2002. A new rural industry-*Stevia*-to replace imported chemical sweeteners, pp.1-23.
66. De-Oliveira V. M., Forni-Martins E. R., Magalhães P. M., Marcos N. A., 2004. Chromosomal and morphological studies of diploid and polyploid cytotypes of *Stevia rebaudiana* Bertoni [Eupatorieae, Asteraceae]. *Genetics and Molecular Biology* 27: 215 - 222
67. Uddin M. S., Chowdhury M. S. H., Khan M. M .H., Uddin M. B., Ahmed R. , Baten M. A., 2006. In vitro propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Bangladesh. *African Journal of Biotechnology* 5: 1238 - 1240.
68. Anonymous-a, 1999. Opinion on *Stevia rebaudiana* Bertoni plants and leaves [http:// ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out36_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out36_en.pdf) [Accessed on 18/ 010/ 09].
69. Worku F., 2005. In vivo antimalarial activity studies, preliminary standardization and formulation of the extracts of *Ajuga remota* Benth [Labiatae]. M.Sc thesis, Addis Ababa University, Ethiopia, pp. 29 - 33.
70. Mantovaneli I. C. C., Ferretti E. C., Simões M. R., Da Silva F. C., 2004. The effect of temperature and flow rate on the clarification of the aqueous stevia-extract in a fixed-bed column with zeolites. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 21: 449 - 458.

71. McGarvey B. D., Attygalle A. B., Starratt A. N., Xiang B., Schroeder F.C., Brandle J. E. and Meinwald, J. [2003]. New non-glycosidic diterpenes from the Leaves of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Natural Product* 66: 1395 – 1398.
72. Savita S. M., Sheela K., Sunanda S., Shankar A. G., Ramakrishna P. , Sakey S., 2004. Health implications of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Human Ecology* 15: 191 - 194.
73. Jeppesen P. B., Gregersen S., Rolfsen S. E. D., Jepsen M., Colombo M., Agger A., Xiao J., Kruhøffer M., Ørntoft T., Hermansen K., 2003. Antihyperglycemic and blood pressure-reducing effects of Stevioside in the diabetic Goto-Kakizaki Rat. *Metabolism*, 52: 372 - 378.
74. Ahmed M. J. and Smith R. M., 2002. Determination of stevioside by high performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Separation Science* 25: 170 - 172.
75. Geuns J. M. C., 2003. Molecules of Interest Stevioside. *Phytochemistry* 64: 913 - 921.
76. Arbonier M., 2004. Trees, shrubs and lianas of West African dry zones. *Cirad Margraf* 510 - 511.
77. Kilani A. M, 2006. Antibacterial assessment of whole stem bark of *Vitex doniana* against some enterobactriaceae. *African Journal of Biotechnology* 5: 958 - 959.
78. Bouquet A., 1972. Plantes médicinales du Congo-Brazzaville: Uvari- oopsis, Pauridiantha, Fiospyros. *Travaux et Documents de l'ORS TOM*, Paris, p. 13.
79. Sridhar C., Rao K.V.; Subbaraju G.V., 2005. Flavonoids, triterpenoids and a lignan from *Vitex altissima*. *Phytochemistry* 66: 1707 - 1712.
80. Higham J.P., Ross C., Warren Y., Heistermann M., MacLarnon A. M. 2007. Reduced reproductive function in wild baboons [*Papio hamadryas anubis*] related to natural consumption of the African black plum [*Vitex doniana*]. *Hormones and Behavior* 52: 384 - 390.
81. Nyiligira E., Viljoen A.M, Van Heerden F.R., Van Zyl R.L., Van Vuuren S.F., Steenkamp P.A., 2008. Phytochemistry and *in vitro* pharmacological activities of South African *Vitex* (Verbenaceae) species. *Journal of Ethnopharmacology* 119: 680 - 685.
82. Suleiman M. M., Yusuf S., 2008. Antidiarrheal Activity of the Fruits of *Vitex doniana* in Laboratory Animals. *Pharmaceutical Biology* 46: 387 - 392.
83. Ajiwe V. I. E., Okeke C. A., Ogbuagu J. O., Ojukwu U., Onwukeme V. I., 1998. Characterization and Applications of Oils Extracted from *Canarium Schweinfurttii*, *Vitex*

doniana and *Xylopiya aethiopica* Fruits/ Seeds. *Bioresource Technology* 64: 249 - 252.

84. Ibrahim M.A, Nwude N., Ogunsusi R.A, Aliu Y.O., 1983. Screening of West African plants for anthelmintic activity. A paper presented at the 5th *International Symposium on Medicinal Plants*, University of Ife, Ile-Ife, Nigeria.

85. Geotz p., 2006. Traitement des troubles de la libido masculine. *Phytothérapie clinique* 1:9 - 14.

86. Iwueke A. V, Nwodo O. F. C, Okoli C. O., 2006. Evaluation of the anti-inflammatory and analgesic activities of *Vitex doniana* leaves. *African Journal of Biotechnology* 5: 1929 - 1935.

87. Ahmad I., Aqil F., Owais M., 2006. Modern Phytomedicine Turning Medicinal Plants into Drugs. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, p. 218.

88. Abdulrahman F.I, Onyeyili P.A., Sandabe U.K., Ogugbuaja V.O., 2007. Evaluation of effects of the aqueous extract of *Vitex doniana* root barks on the peripheral and central nervous system of laboratory animals. *Journal of applied Sciences* 7:1397 - 1403.

89. Ladeji O., Okoye Z. S., 1996. Anti-Hepatotoxic Properties of *Vitex doniana* Bark Extract. *Pharmaceutical Biology* 34: 355 - 358.

90. Renvoize S. and Gilbert D., 1992. Taxonomy and cultivars, In: Rutherford I., Heath M.C. The potential of *Miscanthus* as a fuel crop. *ETSU Report No. B 1354*: 21 - 29.

91. Linde-Laursen I.B., 1993. Cytogenetic analysis of *Miscanthus* 'Giganteus', an interspecific hybrid. *Hereditas* 119: 297 - 300.

92. [http:// www.horticlick.com/sc/miscanthus.html](http://www.horticlick.com/sc/miscanthus.html) [Consulté 18. 10. 2009].

93. Hansen J., Kristiansen K., 1997. Short-term in vitro storage of *Miscanthus X ogiformis* Honda 'Giganteus' as affected by medium composition, temperature and photon flux density, *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 49:161-169.

94. Groleau H., 2008. Le *Miscanthus Giganteus*, une culture d'avenir 71^e congrès de l'ordre des agronomes du Québec [www.oaq.qc.ca Consulté 18. 10. 2009].

95. Edwards N.T., 1986. Uptake, translocation and metabolism of anthracene in bush bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Environnemental Toxicology and Chemistry* 5: 659 - 65.

96. Hartley W., Dickinson N., Riby P., Lepp N. 2009. Arsenic mobility in brownfied soils amended with green waste compost or biochar and planted with *Miscanthus*. *Environmental pollution* 157: 2654-2662.

97. Neukirchen D., Himken M., Lammel J., Czypionka-Krause U., Olf H.W., 1999. Spatial and temporal distribution of the root system and root nutrient content of an established *Miscanthus* crop. *European Journal of Agronomy* 11: 301 - 309.
98. Schwarz H., Liebhard P., Ehrendorfer K., Ruckebauer P., 2007. Potential growth and biomass productivity of *Miscanthus giganteus* as affected by plant density and N-fertilization in central Greece. *Biomass and Bioenergy* 31: 145 - 152.
99. [http:// www.bical.net/france/](http://www.bical.net/france/) [Consulté le 20.10. 2009].
100. [http:// www.miscanthus-rhizome.at/](http://www.miscanthus-rhizome.at/) [Consulté le 20.10.2009].
101. <http://www.miscanthus.de/pflanzgut.htm> [consulté le 20.10.2009].
102. Schwarz H., Liebhard P., Ehrendorfer K., Ruckebauer P., 1994. The effect of fertilization on yield and quality of *Miscanthus sinensis giganteus*. *Industrial Crops and Products* 2: 153 - 159.
103. Greef J.M., Deuter M., 1993, Syntaxonomy of *Miscanthus x giganteus* Greef et Deu, *Angewandte Botanik* 67:87 - 90.
104. Jones M., Walsh M., 2001. *Miscanthus* for energy and fibre, in Chapter 1, James & James publishers.
105. [http:// horticulture.coafes.umn.edu/miscanthus/ research.html](http://horticulture.coafes.umn.edu/miscanthus/research.html) [visité le 18.10. 2009].
106. *Miscanthus sinensis*, 1998. Etude agrice [[http://WWW. arvalisinstitutvegetal. fr](http://WWW.arvalisinstitutvegetal.fr) consulté le 20.10. 2009].
107. Olatunji G., 2000. Diterpene lactone from the heartwood of *Daniella Oliveri*. *Cellulose chemistry and technology* 34: 505-507.
108. Maiga A., Diallo D., Fane S., Sanogo R., Paulsen B. S., Cisse, B., 2005. A survey of toxic plants on the market in the district of Bamako, Mali: traditional knowledge compared with a literature search of modern pharmacology and toxicology. *Journal of Ethnopharmacology* 96: 2005, 183 - 193.
109. Brandao M. G. L. ; Grandi T. S. M. ; Rocha E. M. M. ; Sawyer D. R. ; Krettli A. U., 1992. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology* 36: 175 - 182.
110. Addy M. E. and Burka J.F., 1987a. Dose-response effect of one subfraction of *Desmodium adscendens* aqueous extract on antigen- and arachidonic acid-induced contractions of guinea pig airways. *Phytotherapy Research* 1: 180 - 186.

111. Addy M. E. and Burka J.F., 1987b. Effect of *Desmodium adscendens* fractions on antigen- and arachidonic acid-induced contractions of guinea pig airways. *Canada Journal Physiology Pharmacology* 66: 820 - 825.
112. Addy M. E. and Burka J.F., 1989a. Effect of *Desmodium adscendens* fraction F1 [DAFL] on tone and agonist-induced contractions of guinea pig airway smooth muscle. *Phytotherapy Research* 3: 85 - 90.
113. Addy M. E. and Schwartzman M.L., 1995. An extract of *Desmodium adscendens* activates cyclooxygenase and increases prostaglandin synthesis by ram seminal vesicle microsomes. *Phytotherapy Research* 9: 287 - 93
114. Addy M. E., 1989b. Several chromatographically distinct fractions of *Desmodium adscendens* inhibit smooth muscle contractions. *International Journal of Crude Drug Research* 27: 81 - 91.
115. Addy M. E., 1992. Some secondary plant metabolites in *Desmodium adscendens* and their effects on arachidonic acid metabolism. *Prostaglandins, Leukotrienes Essential and Fatty Acids* 47: 85 - 91.
116. Addy M. E., Dzandu W. K., 1996. Dose-response effects of *Desmodium adscendens* aqueous extract on histamine response, content and anaphylactic reactions in the guinea pig. *Journal of Ethnopharmacology* 18: 13 - 20.
117. McManus O. B., Harris G. H., Giangiacomo KM, Feigenbaum P, Reuben JP, Addy ME, Burka JF, Kaczorowski GJ, Garcia ML., 1993. An activator of calcium-dependent potassium channels isolated from a medicinal herb. *Biochemistry* 32: 6128 - 6133.
118. Barreto G. S., 2002. Effect of butanolic fraction of *Desmodium adscendens* on the anococcygeus of the rat. *Brazilia Journal of Biology* 62: 223 - 30.
119. Keita A., 1995. Protocole et essais cliniques sur le *Desmodium adscendes* - Institut de Médecine Traditionnelle - Hôpital de Bamako, Mali [Disponible sur demande].
120. Grandi M., 1995. Studio preliminare sull'attività epatoprotectrice di *Desmodium Adscendens*. Ecole de Médecine de Turin Italie.
121. Kapooria R.G., Aime M.C., 2005. First report of *Olivea scitula* on *Vitex doniana* in Zambia. *Plant Disease* 89:431.
122. Ladeji O.; Okoye Z. S.; 1993. Chemical analysis of the fruit of *Vitex doniana* (Verbanaceae). *Journal of the science of food and agriculture* 63:483 - 484.
123. Agbede J. O; Ibitoye A. A.; 2007. Chemical composition of black plum [*Vitex doniana*]: an under-utilized fruit. *International journal of food, agriculture and environment*, 5: 95 - 96.

124. [http:// www.miscanthus.de](http://www.miscanthus.de)
125. Hartmann T., 2007. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68: 2831 - 2846.
126. Epifano F., Genovese S., Menghini L., Curini M., 2007. Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry* 68:939 - 953.
127. Brzozowska J., Hanower P., 1976. Recherches sur les composés phénoliques des végétaux et leur rapport avec un déficit hydrique chez des cotonniers. *Annales de l'université d'Abijan, série C (Science)*, tome XII: 65 - 80.
128. Zenk MH., Jueng M., 2007. Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry* 68: 2757- 2772.
129. Stöckigt J., Sheludko Y., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha H., Stöckigt D., 2002. High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic- electrospray ionization mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of chromatography A* 967: 85-113.
130. Manach C., Scalbert A., Morand C., Jiménez L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79:727 - 747.
131. Fleuriet A., Jay-Allemand C., Macheix J.J., 2005. Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes* pp 121-216.
132. Stalikas C. D., 2007. Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* 30:3268-3295.
133. [Http://www.chem.qmul.ac.uk/jupac/lignan](http://www.chem.qmul.ac.uk/jupac/lignan) (consulté le 23.11.09) à 15h.04.
134. Nurmi T.; Voutilainen S.; Nyyssönen K.; Adlercreutz H.; Salonen J. T., 2003. Liquid chromatography method for plant and mammalian lignans in human urine. *Journal of chromatography* 798:101 - 110.
135. Fukuyama y.; Nakahara M.; Minami H., Kodama M., 1996. Two new benzofuran-type lignans from the wood of *Viburnum awabuki*. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 44:1418 - 1420.
136. Jutiviboonsuk A., Zhang H., Tan T.G., Ma C., Van Hung N., Cuong N.M., Bunyaphatsara N., Soejarto D D., Fong H H S., 2005. Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*. *Phytochemistry* 66: 2745 - 2751.
137. Sakagami H., Hashimoto K., Suzuki F., Ogiwara T., Satoh K., Ito H., Hatano T., Takashi Y., Fujisawa S., 2005. Molecular requirements of lignin-carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. *Phytochemistry* 66: 2108 - 2120.

138. De Rijke E., Out P., Niessen W M A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U A T., 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* 1112: 31 - 63.
139. Gàbor M, Cody V, Middleton E J, Harborne J B, Beretz A, Liss A R, 1988. *Plants Flavonoids in biology and Medecine II; Biochemical, Cellular and Medecinal properties*. New York, 1-15 p.
140. Alais C.; Linden G., 1997. Editeur : 1997. *Abrégé de biochimie alimentaire*. Masson (Paris) France 247p.
141. Santhos A. S., Caetano L.C., Sant'ana A.E.G., 1998. A 12a - hydroxyrotenoid from roots of *Boerhaavia coccinea*. *Phytochemistry* 49: 255 - 258.
142. Yi-Fen W., Ji-jun C., Yan Y., Yong-tang Z., Shao-zong T., Shi- De L., 2002. New totenoids from roots of *Mirabilis jalapa*. *Helvetica Chimica Acta* 85: 2342 - 2348.
143. Wangenstein H., Alamgir M., Rajia S., Samuelsen A.B., Malterud K. E., 2005. Rotenoids and isoflavones from *Sacolobus globosus*. *Planta medica* 71: 754 - 758.
144. Ribereau G P, 1968. *Les composés phénoliques des végétaux*. Dunod, Paris, 254 p.
145. Harbone J B, 1967. *Comparative biochimitry of the flavonoides*. Academic press. New York, 1-130 p.
146. Brouillard R, 1986. The flavonoids *Advances. Research science*: 525-538 p.
147. Harbone J B, Grayer R J, 1988. The flavonoids, *Advances. Research science*: 1-20 p.
148. Alkurd A., Hamed T. R., Al-Sayyed H., 2008. Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 4: 265 - 274.
149. Conrad J; Vogler B.; Klaiber I.; Roos G., Walter U.; Kraus W., 1998. Two triterpene esters from *Terminalia macroptera* bark. *Phytochemistry* 48: 647 - 650.
150. Wollgast J., Anklam E., 2000. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identi@cation and quanti@cation. *Food Research International* 33: 423 - 447.
151. Dykes L., Rooney LW., 2006. Sorghum and millet phenols and antioxidants. *Journal of cereal Sciences* 44: 236 - 241.
152. Schofield P., Mbugua D M., Pell A N., 2001. Analysis of condensed tannins: A review *Animal Feed Sciences and Technical*: 91: 21 - 40.

153. Sannomiya M., Fonseca V B., Da silva M A., Rocha LRM. Dos Santos L C, Hiruma-Lima C A., Britoc A R M S, Vilegas W., 2005. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 1- 6.

154. De Barros M P., Lemos M. Maistro E L., Leite M F., Soosa J P B., Bastos J K de Andradede SF., 2008. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. *Journal of Ethnopharmacology* 120: 372-377.

155. Gurbuz I., Yesilada E., Ito S., 2009. An anti-ulcerogenic flavonol diglucoside from *Equisetum palustre* L. *Journal of Ethnopharmacology* 121: 360 -365.

156. Ito C., Itoigawa M., Onoda S., Hosokawa A., Ruabgrungsi N., Okuda T., Tokuda H., Nishino H. Furukawa H., 2005. Chemical constituents of *Murraya siamensis*: three coumarins and their anti- tumor promoting effect. *Phytochemistry* 66: 567 -572.

157. Win N N., Awale S. Esumi H, Tezuka Y., Kadota S., 2008. Novel anticancer agents, kayeassamins C-I from the flower of *Kayea assamica* of Myanmar. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16: 8653 - 8660.

158. Hitara T., Fujii M., Akita K., Yanaka N., Ogawa K., Kuroyanagi M., Hongo D., 2009. Identification and physiological evaluation of the components from *Citrus* fruits as potential drugs for anti-corpulence and anticancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17: 25-28.

159. Melagraki G., Afantitis A., Igglessi- Markopoulou O., Detsi A., Koufaki M., Kontogiorgis C., Hadjipavlou, Litina DJ., 2009. Synthesis and evaluation of the antioxidant and anti inflammatory activity of Novel coumarin – 3 –aminoamides and their α -lipoic acid adducts. *European Journal of Medicinal Chemistry* doi: 10.1016/j. ej: mech.2008.12.087.

160. Kalkhambar R G., Kulkarni GM., Shivkumar H., Rao R N., 2007. Synthesis of novel triheterocyclic thiazoles as anti inflammatory and analgesic agents. *European journal of Medicinal chemistry* 42: 1272-1276.

161. Smyth T; Ramachandran V. N.; Smyth W. F., 2009. A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *International journal of antimicrobial agents* 33: 421 - 426.

162. Tripoli E., Guardia M L Giammanco S. Di Majo D. Giammanco M., 2007. Review Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: *Food chemistry* 104: 466 - 479.

163. Li F., Awale S., Tezuka Y., Kadota S., 2008. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure- activity relationship. *Bioorganic & Medicinal chemistry* 16: 5434 - 5440.

164. Rao Y K., Fang S H, Hsieh S C, Yeh T H, Tzeng Y M., 2009. The constituents of *Anisomeles indica* and their anti-inflammatory activities. *Journal of Ethnopharmacology* 121: 292 - 296.
165. Vafeiadou K., Vauzour D., Lee H Y., Rodriguez- Mateos A., Williams R. J., Spencer JPE., 2009. The citrus flavonone naringenin inhibits inflammatory signaling in glial cells 3 and protects against neuroinflammatory injury. *Archives of Biotechnology and Biophysics* doi: 10.1016/j.abb.
166. Sutradhar R K., Rahman A K M., Ahmad M U., Bachar S C., 2008. Bioactive flavones of *Sida cordifolia*. *Phytochemistry Letters* 1: 179 - 182.
167. Choi H J., Kim J H., Lee CH., Ahn Y J. Song J H., Baek, SH., Kwon DH., 2009. Antiviral activity of quercetin 7- rhamnoside against porcine epidemic diarrhea virus. *Antiviral Research* 81: 77 - 81.
168. Maurya R, Gupta P, Chand K, Kumar M, Dixit P, Singh N, Dube A., 2009. Constituents of *Tinospora sinensis* and their antileishmanial activity against *Leishmania donovani* 23: 1134-43.
169. Raimundo N., Shadel G S., 2009. A “radical” mitochondrial view of autophagy related pathology. *Aging Journal* 1: 354 - 356.
170. Shon H Y, Son K H, Kwon C S, Kang S S. , 2004. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medical plants: *Morus alba* *Echinosophara koreesis* Nakai. *Phytomedicine* 11: 666 - 672.
171. Bruneton J, 1993. Pharmacognosie et phytochimie plantes médicinales. Paris, France: Lavoisier. 278 - 279p.
172. Masquelier J, Dumon M et Dumas J, 1979. Stabilisation des collagènes par des oligomères procyanidoliques. *Acta thérapeutique* 1, 101-104 p.
173. Okamura H, Mimura A, Yakou Y, Niwano M, Takahara Y, 1993. Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry* 33: 557-561.
174. Kubata BK., Nagamune K., Murakami N, Merkel P., Kabututua Z., Martin SK., Kalulug TM., Mustakuk H., Hoshida M., Ohnishi-kameyama M., Kinoshita T., Duszenko M., Uradea Y., 2005. *Kola acuminata* proanthocyanidins: a class of anti-trypanosomal compounds effective against trypanosome brucei. *International Journal for Parasitology* 35: 91- 103.
175. Kim J Y., Lim H J., Lee D Y., Kim D H., Jeon R., Ryu J H., 2009. In vitro anti inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargessii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19: 937 -940.

176. Nebeling L., 2002. Phytochemicals, the color of a Healthy Diet. *Health Promotion Research Branch National Cancer Institute*, Maryland.

177. Lemieux G., Germain D., 2002. Le Bois Rameal Fragmenté: la clé de la fertilité durable du sol. Ed. Groupe de coordination sur les bois Rameaux, Université Laval.

178. Ekoumou C., 2003. Etudes phytochimiques et pharmacologiques de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse pharmacie, Bamako, 145 p.

179. Cavin A., 1999. Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: *Tinospora crispa* (Menispermaceae) *Merremia emarginata* (Convolvulaceae) et *Orophea enneandra* (Annonaceae). Thèse Université de d'Indonésie.

180. Ahamet S., 2003. Etudes phytochimiques et des activités biologiques de *Balanites aegyptica* (Balanitaceae). Thèse de pharmacie, Bamako, 117 p.

181. Franceschini P., 1994. La peau et son vieillissement. *Ed Flammarion Dominos*, Paris, 125 p.

182. Mandal S, Hazra B, Sarkar R, Biswas S, Mandal N., 2009. Assessment of the antioxidant and Reactive oxygen species scavenging activity of methanolic extract of *Caesalpinia crista* leaf. *ECAM*, doi:10.1093/ecam/nep072: 1-11.

183. LePerchec, 1994. Le Perchec P., 1994. Les molécules de la beauté, de l'hygiène et de la protection. *Ed. Nathan*, Paris, 142 p.

184. Mieyal J J., 1978. Mecanism of enzyme like reactions involving human hemoglobin. *Bioorganic chemistry*, vol IV, Van Tamelen. *Acad. Press*, New York, 315 - 348.

185. Bossokpi.I.P.L. ,2002). Etude des activités biologiques de *Fagara xanthoxyloïdes* LAM (Rutaceae). Thèse de pharmacie, Bamako, 133 p.

186. Curtay J P., Robin J M., 2000. Intérêt des complexes antioxydants. *Nutrithérapie Info*: 1 - 4.

187. Naczk M, Shahidi F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054: 95 – 111.

188. Goris A. et Liot A., 1942. Pharmacie galénique. *Edition Masso et cie*, Vol. 2 tome 1 pp. 937.

189. Gerothanassis I.P., Exarchou V., Lagouri V., Troganis A., Tsimidou M., Boskou D., 1998. Methodology for Identification of Phenolic Acids in Complex Phenolic Mixtures by High - Resolution two- dimensional nuclear magnetic resonance. Application to

methanolic extracts of two Oregano Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4185 - 4192.

190. Niassy B., Um B., Lobstein A., Weniger B., Koné M., Anton R., 2004. Flavonoïdes de *Tephrosia deflexa* et *Tephrosia albifoliolis*. *Comptes Rendues de Chimie* 7, 993-996.

191. Saucier C., Guerra C., Pianet I., Laguerre M., Glories Y., 1997. *Phytochemistry*, 46, 229-234.

192. Lien Ej., Ren S., Bui H.H., Wang R., 1999. Quantitative structure- activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*; 26:285 - 294.

193. Molyneux P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal Science of Technology*, (26): 211-219.

194. Prieto P., Pineda M., Aguillar M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of phosphomolybdenum complex: specific application to determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*; 269: 337-341.

195. Berche P., Gaillard J.L., Simonet M., 1988. Bactériologie, les bactéries des infections humaines. *Ed Flammarion Médecine-Sciences*, Paris, 660 p.

196. Pacheco-Sanchez M., Boutin Y., Angers P., Gosselin A., Tweddell. R. J., 2007. Inhibitory effect of CDP, a polysaccharide extracted from the mushroom *Collybia dryophila*, on nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in macrophages. *European Journal of Pharmacology*, 555(1), 61-66.

197. Granger D.L., Tanito R. R., Boockvar K.S., 1995. Determination of nitrate and nitrite in biological samples using bacterial nitrate reductase coupled with the Griess reaction. *Acompanion to Methods in Enzymology* 7, 78-83.

198. Ghedira K., 2005. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* 4, 162-169.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Analyses élémentaires (% de Ms)	42
Tableau 2: Analyses de la cendre (% Ms)	42
Tableau 3: Récapitulatifs des usages traditionnels, données pharmacologique et phytochimiques de parties des plantes étudiés selon la littérature	44
Tableau 4: Récapitulatif de la classification des différentes plantes (ou parties) d étudiées	44
Tableau 5: Propriétés biologiques des quelques polyphénols dans l'organisme	78
Tableau 6: Rendement d'extraction des composés phénoliques	92
Tableau 7. Rendement d'extraction des huiles essentielles des feuilles des plantes étudiées	93
Tableau 8: Composition phytochimique des extraits de <i>D.oliveri</i>	98
Tableau 9. Composition phytochimique des extraits de feuilles de <i>D. adscendens</i>	98
Tableau 10: Composition phytochimique des extraits de plante de <i>F. capensis</i>	99
Tableau 11: Composition phytochimique des extraits des écorces des racines de <i>S. longependunculata</i>	100
Tableau 12: Composition phytochimique des extraits de feuilles de <i>S. rebaudiana</i>	100
Tableau 13: Composition phytochimique des extraits de <i>V. doniana</i>	101
Tableau 14: Analyse par CCM sur papier des quelques composés phénoliques	102
Tableau 15: Profil du gradient d'analyse HPLC de composés phénoliques utilisés	119
Tableau 16: Composés phénoliques identifiés dans les extraits de <i>D. oliveri</i>	125
Tableau 17: Concentration des composés phénoliques contenus dans les extraits d'eau (Ee) et du méthanol- eau (MEe)	128
Tableau 18: Concentration de composés phénoliques contenus dans les extraits du <i>F.capensis</i> (MEe)	132
Tableau 19: Concentration de composés phénoliques contenus dans les extraits (Ee et MEE) du <i>S. longependunculata</i>	135
Tableau 20: concentration de composés phénoliques contenus dans les extraits (MEe et Ee) du <i>S. rebaudiana</i> (280 et 320 nm)	138
Tableau 21: Composition en composés phénoliques des extraits de <i>Vitex doniana</i>	142
Tableau 22: Composition chimique des extraits des exsudats des racines de <i>Miscanthus X giganteus</i>	143
Tableau 23: Synthèse des analyses qualitatives et quantitatives des extraits des plantes étudiées	144
Tableau 24: Analyse quantitative et qualitative des huiles essentielles de <i>D. oliveri</i>	147
	232

Travaux personnels

Tableau 25: Analyses qualitatives et quantitatives des huiles essentielles du <i>D. adscendens</i>	148
Tableau 26: Composition phytochimique de l'huile essentielle de <i>F. capensis</i>	149
Tableau 27: Composition phytochimique de l'huile essentielle de feuille <i>S. rebaudiana</i>	151
Tableau 28: Composition phytochimique de l'huile essentielle de <i>V. doniana</i>	153
Tableau 29: Composés isolés et identifiés par HPLC	155
Tableau 30: Composés isolés et leurs R_f s	160
Tableau 31: Caractéristiques structurales RMN du composé X_5	164
Tableau 32: Caractéristiques structurales RMN du composé X_2	165
Tableau 33: Caractéristiques structurales RMN du composé X_8	166
Tableau 34: Caractéristiques structurales RMN du composé X_3	168
Tableau 35: Caractéristiques structurales RMN du composé X_{13}	169
Tableau 36: Activités antioxydantes des extraits des huiles essentielles <i>S. rebaudiana</i> et de <i>F. capensis</i>	192
Tableau 37: AAO des extraits exsudats des racines de <i>Miscanthus X giganteus</i>	192
Tableau 38: Synthèse des AAO des extraits des plantes étudiées	193
Tableau 39: Détermination de la zone d'inhibition des extraits de <i>D. oliveri</i>	202
Tableau 40: Détermination de CMI des extraits de <i>D. oliveri</i>	203
Tableau 41: Détermination de la zone d'inhibition des extraits de <i>D. adscendens</i>	203
Tableau 42: Détermination de CMI zone d'inhibition des extraits de <i>D. adscendens</i>	203
Tableau 43: Détermination de la zone d'inhibition des extraits de <i>F. capensis</i>	204
Tableau 44: Détermination de CMI des extraits de <i>F. capensis</i>	204
Tableau 45: Détermination de la zone d'inhibition des extraits de <i>S. rebaudiana</i>	204
Tableau 46: Détermination de CMI des extraits de <i>S. rebaudiana</i>	205
Tableau 47: Récapitulatif des analyses antimicrobiennes (Zone d'inhibition (\varnothing mm))	208

LISTES DE FIGURES

Figure 1: Caractéristiques des feuilles & des fleurs du <i>Daniella oliveri</i> Rolfe Hutch. & Dalz	6
Figure 2. Caractéristiques des feuilles et des fleurs du <i>Desmodium adscendens</i> SW	11
Figure 3: Caractéristiques des feuilles et des fruits du <i>Ficus capensis</i> Thunb & Forssk	18
Figure 4: Caractéristiques des feuilles et fleurs de <i>Securidaca longependunculata</i> Fresen	23
Figure 5: Caractéristiques des feuilles et des fleurs de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	29
Figure 6: Caractéristiques des feuilles, des fleurs et des fruits de <i>Vitex doniana</i> Sweet	34
Figure 7a : Caractéristiques du <i>Miscanthus sinensis</i>	39
Figure 7b: Caractéristiques du <i>Miscanthus géant</i>	39
Figure 8: Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux	108
Figure 9: Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux	108
Figure 10: Courbe d'étalonnage pour le dosage des anthocyanines totaux (510 nm)	109
Figure 11: Courbe d'étalonnage pour le dosage des anthocyanines totaux (700 nm)	110
Figure 12: Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins condensés	110
Figure 13: Composition phénolique des extraits de <i>D. oliveri</i>	111
Figure 14: Composition phénoliques des extraits des feuilles de <i>D. adscendens</i>	112
Figure 15: Composition phenoliques des extraits de <i>F.capensis</i>	112
Figure 16: Composition phénoliques des extraits des écorces des racines de <i>S. longependunculata</i> .	113
Figure 17: Composition phénoliques des extraits des feuilles de <i>S. rebaudiana</i>	114
Figure 18: Composition en composés phénoliques des extraits des feuilles de <i>V. doniana</i>	114
Figure 19: Compositions phénoliques des extraits des exsudats des racines de <i>Miscanthus X giganteus</i>	115
Figure 20: Profil du chromatogramme du mélange des étalons (280 nm)	120
Figure 21: Profil du chromatogramme du mélange des étalons (320 nm)	121
Figure 22a: Profil chromatographique de l'extrait des écorces des troncs de <i>D. oliveri</i>	122
Figure 22b: Profil chromatographique de l'extrait des écorces des troncs de <i>D. oliveri</i>	122
Figure 23a: Profil chromatographique de l'extrait des écorces des racines de <i>D. oliveri</i>	123
Figure 23b: Profil chromatographique de l'extrait des écorces des racines de <i>D. oliveri</i>	123
Figure 24a: Profil chromatographique de l'extrait des feuilles de <i>D. oliveri</i> (280 nm)	124
Figure 24b: Profil chromatographique de l'extrait des feuilles <i>D. oliveri</i> (320 nm)	124
Figure 25a: Profil chromatographique de l'extrait Ee des feuilles du <i>D adscendens</i>	126
Figure 25b: Profil chromatographique de l'extrait Ee des feuilles du <i>D. adscendens</i>	126

Travaux personnels

Figure 26a: Profil chromatographique de l'extrait MEe des feuilles du <i>D. adscendens</i>	127
Figure 26b: Profil chromatographique de l'extrait MEe des feuilles du <i>D. adscendens</i>	127
Figure 27a: Profil chromatographique de l'extrait des écorces des troncs <i>F. capensis</i>	129
Figure 27b: Profil chromatographique de l'extrait des écorces des troncs <i>F. capensis</i>	129
Figure 28a: Profil chromatographique de l'extrait des écorces des racines <i>F. capensis</i>	130
Figure 28b: Profil chromatographique de l'extrait des écorces des racines <i>F. capensis</i>	130
Figure 29a: Chromatogramme des extraits des feuilles de <i>F. capensis</i> MEe	131
Figure 29b: Chromatogramme des extraits MEe des feuilles de <i>F. capensis</i>	131
Figure 30a: Chromatogramme des extraits Ee des écorces racines <i>S. longependunculata</i>	133
Figure 30b: Chromatogramme des extraits Ee des écorces racines <i>S. longependunculata</i>	133
Figure 31a: Chromatogramme des extraits MEe écorces racines <i>S. longependunculata</i>	134
Figure 31b: Chromatogramme des extraits MEe écorces racines <i>S. longependunculata</i>	134
Figure 32a : Profil chromatographique de l'extrait MEe des feuilles de <i>S. rebaudiana</i>	136
Figure 32b : Profil chromatographique de l'extrait MEe des feuilles de <i>S. rebaudiana</i>	136
Figure 33a : Profil chromatographique de l'extrait Ee des feuilles de <i>S. rebaudiana</i>	137
Figure 33b : Profil chromatographique de l'extrait Ee des feuilles de <i>S. rebaudiana</i>	137
Figure 34a: Profil chromatographique des extraits des écorces des troncs de <i>V. doniana</i>	139
Figure 34b: Profil chromatographique des extraits des écorces des troncs de <i>V. doniana</i>	139
Figure 35a: Profil chromatographique des extraits des écorces des racines de <i>V. doniana</i>	140
Figure 35b: Profil chromatographique des extraits des écorces des racines de <i>V. doniana</i>	140
Figure 36a: Profil chromatographique des extraits des feuilles de <i>V. doniana</i>	141
Figure 36b: Profil chromatographique des extraits des feuilles de <i>V. doniana</i>	141
Figure 37a: Profil chromatographique de l'extrait de l'exsudat E1 à 280 nm	142
Figure 37b: Profil chromatographique de l'extrait de l'exsudat E2 à 280 nm	143
Figure 38: Chromatogramme d'analyse GC-MS des huiles essentielles de <i>D. oliveri</i>	146
Figure 39: Chromatogramme d'analyse GC-MS des huiles essentielles de <i>D. adscendens</i>	148
Figure 40: Profil d'analyse chromatographique des huiles essentielles des feuilles de <i>F. capensis</i>	149
Figure 41: Profil chromatographique d'analyses GC-MS de l'huile essentielle de <i>S. rebaudiana</i>	150
Figure 42: Profil chromatographique d'analyses GC-MS de l'huile essentielle des feuilles de <i>V. doniana</i>	152
Figure 43: Composé X ₂ (acide caféique)	156
Figure 44: Composé X ₃ (épicatéchine)	157

Figure 45: Composé X ₅ (acide <i>p</i> -coumarique)	157
Figure 46: Composé X ₈ (rutine)	158
Figure 47: Composé X ₉ (quercétine glucosé)	158
Figure 48: composé X ₁₁ (acide cinnamique)	159
Figure 49: composé X ₁₃ (quercétine)	159
Figure 50: Spectre RMN (¹ H) du composé (X ₅): (acide <i>p</i> -coumarique) (120)	170
Figure 51: Spectre RMN (¹³ C) du composé (X ₅): (acide <i>p</i> -coumarique) (120)	171
Figure 52: Spectre (SM) (X ₅): (<i>p</i> - coumarique) (120)	172
Figure 53: Spectre RMN (¹ H) du composé (X ₂): (acide caféique) (121)	173
Figure 54: Spectre RMN (¹³ C) du composé (X ₂): (acide caféique) (121)	174
Figure 55: Spectre (SM) (X ₂): acide caféique (121)	175
Figure 56: Spectre RMN (¹ H) du composé (X ₈): (rutine) (122)	176
Figure 57: Spectre RMN (¹³ C) du composé (X ₈): (rutine) (122)	177
Figure 58: Spectre (SM) (X ₈): rutine (122)	178
Figure 59: Spectre RMN (¹ H) du composé (X ₃): (épicatéchine) (123)	179
Figure 60: Spectre RMN (¹³ C) du composé (X ₃): (épicatéchine) (123)	180
Figure 61: Spectre (SM) (X ₃): épicatéchine (123)	181
Figure 62: Spectre RMN (¹ H) du composé (X ₁₃): (quercétine) (124)	182
Figure 63: Spectre RMN (¹³ C) du composé (X ₁₃): (quercétine) (124)	183
Figure 64: Spectre (SM) (X ₁₃): quercétine (124)	184
Figure 65: Courbe d'étalonnage Vitamine C (AAO/ ABTS)	187
Figure 66: Courbe d'étalonnage Vitamine C (AAO/ DPPH)	190
Figure 67: Relation entre les composés phénoliques et AAO des extraits <i>D. adscendens</i>	194
Figure 68: Relation entre AAO et composés phénoliques des extraits des écorces de racines de <i>S. longependunculata</i>	195
Figure 69: Relation entre activité antioxydante et composés phénoliques des extraits de <i>S. rebaudiana</i>	195
Figure 70: Relation entre activité antioxydante et composés phénoliques des extraits de <i>D. oliveri</i> , <i>V. doniana</i> et <i>F. capensis</i>	196
Figure 71: <i>D. oliveri</i> (<i>E. coli</i>)	205
Figure 72: Ds: <i>Desmodium</i> , Control (+) (Ap) Gt (+) et Ny (-) (<i>E. coli</i>)	206
Figure 73: <i>F. capensis</i> (<i>B. subtilis</i>)	206
Figure 74: <i>S. rebaudiana</i> (<i>C. albicans</i>)	207
Figure 75: <i>Stevia rebaudiana</i> (MEe) contrôle (-): MeOH (50%) (<i>E. coli</i>)	207

Figure 76: Droite d'étalonnage NaNO_2 pour l'évaluation in vitro de l'activité anti inflammation	211
Figure 77: Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits des feuilles de <i>F. capensis</i>	211
Figure 78: Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits des racines de <i>S. longependunculata</i>	212
Figure 79: Evaluation de l'activité anti inflammatoire des extraits des feuilles de <i>S. rebaudiana</i>	213
Figure 80: Relation entre les composés phénoliques et les propriétés anti-inflammatoires des extraits de <i>S. rebaudiana</i>	213

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1: Classification de l'espèce <i>Daniella oliveri</i>	7
Schéma 2: Classification de l'espèce <i>Desmodium adscendens</i>	12
Schéma 3: Classification de l'espèce <i>Ficus capensis</i> Thunb	19
Schéma 4: Classification de l'espèce <i>Securidaca longependunculata</i> Fresen	24
Schéma 5: Classification de l'espèce <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	30
Schéma 6: Classification de l'espèce <i>Vitex doniana</i> Sweet	34
Schéma 7: Classification de l'espèce <i>Miscanthus X géant</i>	40
Schéma 8: Synthèse des stéroïdes à partir de l'acétyl- CoA	53
Schéma 9: Classification de quelques métabolites secondaires	55
Schéma 10: Biosynthèse de grandes classes des flavonoïdes et des leurs conversions	75
Schéma 11: La Biosynthèse de grandes classes des isoflavonoïdes et leurs conversions	76
Schéma 12: Métabolites secondaires et prévention des certaines maladies	81
Schéma 13: Production des formes actives de l'oxygène et des intermédiaires qui en découlent	83
Schéma 14: Principe du spectrophotomètre UV-visible monofaisceau	104
Schéma 15: Le processus général d'analyse quantitative et qualitative des extraits des plantes étudiés	105
Schéma 16: Phases de l'injection avec une boucle	117
Schéma 17: Principe de fonctionnement de l'HPLC	118
Schéma 18: Protocole de séparation des composés polyphénoliques contenu dans les feuilles du <i>D. adscendens</i>	154
Schéma 19: Structure d'un spectromètre de masse	162
Schéma 20: Formation et piégeage du radical $ABTS^{\circ +}$ par un antioxydant donneur de H^+	188
Schéma 21: Détermination de CMI d'un antibiotique par la méthode de diffusion	197
Schéma 22: Détermination de CMI d'un antibiotique par la méthode de dilution en milieu liquide	198

ANNEXES

Liste des publications

1. F. Muanda, D. Koné, A. Dicko*, R. Soulimani, C. Younos, 2009. Phytochemical Composition and Antioxidant Capacity of Three Malian Medicinal Plant Parts. *eCAM*, doi:10.1093/ecam/nep109, 1 - 8.
2. F. Muanda *, A. Dicko, R. Soulimani, 2010. Chemical composition and biological activities of *Ficus capensis* leaves extracts. *Journal of Natural Products* 3, 147-160
3. F. Muanda,*A. Dicko, R. Soulimani, 2010. Assessment of polyphenolic compounds, in vitro antioxidant and anti-inflammation properties of *Securidaca longepedunculata* root barks. *C. R. Biologies*, 333, 663-669.
4. F. Muanda, J. Bouayed, A. Djilani, Chun yan Yao, R. Soulimani, A. Dicko*, 2010. Chemical composition and cellular evaluation of the antioxidant activity of *Desmodium adscendens* leaves. *Ecam*/ doi: 10.1155/2011/620862, 2011 article ID 620862.
5. F. Muanda*, A. Dicko, R; Soulimani, 2010. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* leaves. Article In press *LWT-Food Science and Technology* (Acceptée).

Original Article

Phytochemical Composition and Antioxidant Capacity of Three Malian Medicinal Plant PartsFrançois Muanda¹, Donatien Koné¹, Amadou Dicko¹, Rachid Soulimani² and Chafique Younos²¹Chemistry Laboratory and Methodologies for the Environment, Paul-Verlaine University and²Ethnobotanic, Pharmacology, Anxiety, Stress Oxidative and Bioactivity Laboratory, University P. Verlaine-Metz, Metz, France

This study evaluates the levels of total polyphenolic compounds in three Malian medicinal plants and determines their antioxidant potential. Quantitative and qualitative analysis of polyphenolics contained in plants extracts were carried out by RP-C18 RP-HPLC using UV detector. The antioxidant activity was determined by three tests. They are phosphomolybdenum, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic)] tests. The total phenolic and the total flavonoid contents varied from 200 to 7600 mg 100 g⁻¹ dry weight (dw), expressed as gallic acid equivalents and from 680 to 12 300 mg 100 g⁻¹ dw expressed as catechin equivalents, respectively. The total anthocyanin concentrations expressed as cyanin-3-glycoside equivalent varied from 1670 to 28 388 mg 100 g⁻¹ dw. The antioxidant capacity was measured by determining concentration of a polyphenolic (in mg ml⁻¹) required to quench the free radicals by 50% (IC₅₀) and expressed as vitamin C equivalent antioxidant capacity. The IC₅₀ values were ranked between 2.68 and 8.80 µg ml⁻¹ of a solution of 50% (v/v) methanol in water. The uses of plants are rationalized on the basis of their antioxidant capacity.

Keywords: anthocyanins – flavonoids – Malian herbs – polyphenolic compounds – RP-HPLC**Introduction**

Several epidemiological studies suggest that plants rich in antioxidants play a protective role in health and against diseases (1), and their consumption lowered risk of cancer, heart disease, hypertension and stroke (2-4). The major groups of phytochemicals that may contribute to the total antioxidant capacity of plant include polyphenols and vitamins (C and E). Phenolic compounds can be nonnutrients (5). Phenolic compounds of plants are hydroxylated derivatives of benzoic acid and cinnamic acids and have been reported to possess

antioxidative and anticarcinogenic effects. Phenolic compounds including flavonoids are important in plant defense mechanisms against invading bacteria and other types of environmental stress (5,6). Flavonoids have long been recognized to possess anti-inflammatory, anti-allergic, antiviral and antiproliferative activities (5-9). Several reports indicate that the antioxidant potential of medicinal plants may be related to the concentration of their phenolic compounds which include phenolic acids, flavonoids, anthocyanins and tannins (10,11). These compounds are of great value in preventing the onset and/or progression of many human diseases (12). The health-promoting effect of antioxidants from plants is thought to arise from their protective effects by counteracting reactive oxygen species (11). Antioxidants are compounds that help delay and inhibit lipid oxidation and when

For reprints and all correspondence: A. Dicko, Chemistry Laboratory and Methodologies for the Environment, Paul-Verlaine University, 1, Bd. Arago Technopole 2000, 57078 Metz, France. Tel: +33-3-8731-5431; Fax: +33-3-8737-8506; E-mail: dicko@univ-metz.fr

© The Author(s) 2009. Published by Oxford University Press.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/uk/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1. Name, traditional uses and phytochemicals data

Plant name	Family	Uses	Pharmacology data	Phytochemicals data
<i>Daniella oliveri</i> (<i>D. thurifera</i>) Rolfe	Caesalpinaceae	Treatment diarrheic (leaves), Bactericide, anti-inflammatory, analgesic, antiseptic, anti-diabetic, antispasmodic, anti-haemorrhoid, aphrodisiac, relaxing	Analgesic (hexane extract), anti- pyretic (ethyl acetate extract), anti-inflammatory, bactericide, anti-histamic (methanol extract) (18–21)	Polyphenols, flavonoids, anthocyanins, glycosides, tannins, saponins, terpenes, alkaloids
<i>Vitex doniana</i> (<i>V. umbrosa</i>)	Verbenaceae	Bactericide (leaves and stems); diuretic (leaves) tonifiant (roots); aphrodisiac (leaves, roots) (22,23); anti-diabetic (stems) antiseptic (leaves)	Bactericide (aqueous extract)	Saponins, steroids, terpene, (24) flavonoids, polyphenols, vitamins C, A, E
<i>Ficus capensis</i> (Thumb) (Forssk)	Moraceae	Bactericide, anti-diabetic, diuretic, aphrodisiac (stems, roots) (20,25,26)	Anti-diabetic, diuretic (methanol extract)	Polyphenols, flavonoids, tannins, vitamin C

added to foods tend to minimize rancidity, retard the formation of toxic oxidation products, help maintain the nutritional quality and increase their shelf life (13).

We have recently reported the evaluation of the antioxidant potential of some medicinal and dietary plants (14,15) and the positive correlation between peripheral blood granulocyte oxidative status and level of anxiety in mice (15–17).

The objectives of this investigation are (i) to evaluate the level of total phenolics, flavonoids and anthocyanins in three sub-Saharan medicinal plants (*Daniella oliveri*, *Ficus capensis* and *Vitex doniana*) used for treating hypertension and considered as diuretic, anti-inflammatory, antipyretic and antipurulent agents (Table 1) and (ii) to evaluate total antioxidant potential by using vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) tests.

Methods

Apparatus

The RP-HPLC analyses were performed with a Waters 600E pump coupled to a Waters 486 UV visible tunable detector and equipped with a Alltech Intertsil ODS column (RP C18 column size 4.6 mm × 150 mm; particle size, 5 µm). In addition, spectrophotometer analyses were carried out with UV-Vis spectrophotometer (Cary 50 scan).

Chemicals

Folin-Ciocalteu's phenol reagent, aluminum chloride, catechin, gallic acid, *p*-coumaric acid, coumarin, rutin, protocatechic acid, vitamin acid, caffeic acid, isovitexin, chlorogenic acid, delphinidin, orientin, malvidin, homo-orientin, ellagic acid, L-cyanidin, peonidin were purchased from Across Organics. Sodium carbonate, sodium nitrite, chlorhydric acid, ethyl acetate, sodium sulfate anhydrous, ammonium phosphate, ferric ammonium

sulfate, acetonitrile, methanol, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) (ABTS), PBS buffer, AAPH [2,2'-azo-bis(2-amidino-propane)dihydrochloride; ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic)] and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) were obtained from Sigma and Roth (France). The chemicals used were all of analytical grade.

Procurement and Preparation of Samples

The plants *D. oliveri*, *F. capensis* and *V. doniana* were obtained from the Department of Traditional Medicine of Mali, upon arrival at the laboratory, different parts of the plants (leaves, root barks and stem barks) were dried at room temperature, powdered and sifted in a sieve (0.750 µm). The plant material was biologically authenticated by the National Institute for Research in Public Health of Bamako.

Samples Extractions

Total Phenolic, Flavonoid, Anthocyanin Contents and Antioxidant Capacity

Samples for total phenolic compounds (TPC), total flavonoid compounds (TFC), total anthocyanin compounds (TAC) and total antioxidant capacity assays were extracted from the different powders as described by Makkard *et al.* (27) slightly modified. The powder sample (2 g) was extracted twice with 20 ml of cold aqueous methanol solution (50%). The two volumes were combined, made up to 40 ml, centrifuged at 1238g for 20 min and transferred in small sample bottles and stored at +4°C in the dark until analysis.

Extraction of Polyphenol Compounds for RP-HPLC Analysis

Polyphenols were extracted following the method described by Muchuweti *et al.* (28) slightly modified.

Fresh samples (5g) of plants portions were extracted twice with ethyl acetate (20ml) and organic fractions were combined. After 30min of drying with anhydrous NaSO_4 , the extract was evaporated to dryness at 40°C . Then, the residue was dissolved in methanol/water [2ml 1:1(v/v)] before analysis by RP-HPLC. The standard solutions were prepared by dissolving 1 mg ml^{-1} (m/v).

Dosage of Phenolic Compounds

Spectrophotometer Analysis

Dosage of TPC

TPC were determined following Muchuweti *et al.* (28) method which was slightly modified. To a sample of $100\mu\text{l}$, distilled water was added to make the quantity 2ml (Eppendorff tube), followed by addition of 1ml of Folin-Ciocalteu reagent (1N) and sodium carbonate (20%). After 40min at room temperature, absorbance at 725nm was read on a spectrophotometer against a blank that contained methanol instead of sample. TPC were expressed in terms of equivalent amounts of gallic acid (GAE).

Determination of TFC

TFCs were measured according to a colorimetric assay slightly modified (12,29). A $250\mu\text{l}$ of standard solution of catechin at different concentrations or appropriately diluted samples was added to 10ml volumetric flask containing 1ml of didistillate waters (ddH_2O). At time 0min, $75\mu\text{l}$ of NaNO_2 (5%) was added to the flask. After 5min, $75\mu\text{l}$ of AlCl_3 (10%) was added. At 6min, $500\mu\text{l}$ of NaOH (1N) was added to the mixture. Immediately, the solution was diluted by adding 2.5ml ddH_2O and mixed thoroughly. Absorbance of the mixture, pink in color, was determined at 510nm versus the prepared blank. TFCs in medicinal plants were expressed as microgram-catechin equivalents (CE)/gram dry weight (dw). Samples were analyzed in three replications.

Evaluation of TAC

The anthocyanin contents of samples was estimated by a UV-spectrophotometer with the pH-differential method (30,31) using two buffer systems, potassium chloride buffer, pH 1.0 (0.025M) and sodium acetate buffer, pH 4.5 (0.4M). Briefly, $400\mu\text{l}$ of extract was mixed in 3.6ml of corresponding buffer solutions and read against a blank at 510 and 700nm . Absorbance (ΔA) was calculated as: $\Delta A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}4.0}$ (30–32). Monomeric anthocyanin pigment concentration in the extract was calculated and expressed as cyaniding -3 glycoside (mg l^{-1}): $\Delta A \times \text{MW} \times \text{Df} \times 1000 / (\text{Ma} \times 1)$ (30–33) with ΔA : Absorbance, Mw: molecular weight (449.2), Ma: Molecular absorptivity (26.900) and Df: dilution factor.

RP-HPLC Analysis

RP-RP-HPLC analysis was performed according to the modified method describe (34,35). Extracted sample was filtered through a $0.45\text{-}\mu\text{m}$ polytetrafluoroethylene syringe tip filter, using a $20\text{-}\mu\text{l}$ sample loop. The sample was analyzed using an RP-HPLC system equipped with a waters UV-Visible tunable detector on a Reverse Phase (RP C18) column Alltech Intertsil ODS- $5\mu\text{m} \times 4.6\text{mm} \times 150\text{mm}$. The flow rate was set at 1ml min^{-1} at room temperature. A gradient of three mobile phases was used in the study, solvent A: 50mM ammonium phosphate ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) pH 2.6 (adjusted with phosphoric acid); solvent B: Which was constituted of 80:20 (v/v) acetonitrile/solvent A, and solvent C, constituted of 200mM phosphoric acid pH 1.5 (pH adjusted with ammonium hydroxide). The solvents were filtered through a Whatman Maidstone England paper No. 3 and putted in an ultrasonic apparatus for 25min. The gradient profile was linearly change as follows (total 60min): 100% solvent A at 0min, 92% A/8% B at 4min, 14% B/86% C at 10min, 16% B/84% C at 22.5min, 25% B/75% C at 27.5min, 80% B/20% C at 50min, 100% A at 55min, 100% A at 60min (36). After each run, the system was reconditioned for 10min before analysis of next sample. Under these conditions, $20\mu\text{l}$ of sample were injected. All sample analysis was done in triplicate. Polyphenolic standards prepared by dissolving 1 mg ml^{-1} were used to generate characteristic UV spectra and calibration curves. The individual polyphenolic compounds in the sample were identified by comparison of their UV-visible spectra and their retention times with the spike of the corresponding polyphenolic standards.

The detection was carried out at 280 and 320nm and their quantification was obtained by the comparison of the peaks area with the corresponding standards calibration curves. Collected results were reported as equivalent amount of commercial standard.

Antioxidant Activity

Three different tests have been used to determine the total antioxidant capacity: the phosphomolybdenum (PPM) test, the ABTS test and the DPPH test (37,38).

PPM Test

The PPM assay is a DPPH scavenging method in which, hydrogen and electron transfer from antioxidant analytes to DPPH and Molybdenum(VI) complex occur in the DPPH and PPM. The transfers occur at different redox potentials in the two assays and also depend on the structure of antioxidant. Several flavonoids and phenols have been isolated from plant parts with potent DPPH scavenging activities (39), whereas the PPM method usually detects antioxidants such as vitamins C, E and some specific phenol (37). In general, the extraction solvent

affects the antioxidant capacity, the aqueous methanol extract showed better antioxidant activities than the organic extract, aqueous alcohol is considered to be the best solvent for the extraction of phenolic compounds from plant materials (40,41).

The total antioxidant capacity of the plant extracts was measured by the method described by Prieto *et al.* (37); 100 µl of the sample solution was mixed with 900 µl of the reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate) against a blank containing 100 µl of methanol mixed with 900 µl of reagent solution. The absorbance of the test sample was measured at 695 nm. The antioxidant activity was expressed as vitamin C equivalent (mg 100 g⁻¹ dry matter).

ABTS Test

The method used in this test is the one developed by Vanden Berg *et al.* (38), slightly modified. One millimolar of AAPH solution was mixed with 2.5 mM ABTS as diammonium salt in phosphate buffered saline (PBS) solution 100 mM potassium phosphate buffered (pH 7.4) containing 150 mM NaCl. The mixture was heated in a water bath at 68°C for 20 min. The concentration of the resulting blue-green ABTS radical anion solution was adjusted to an absorbance of 0.65 ± 0.02 at 734 nm. The sample solution (60 µl) was added to 2.94 ml of the resulting blue-green ABTS radical solution. The mixture, protected from light, was incubated in a water bath at 37°C for 20 min. Then the decrease of absorbance was measured at 734 nm. The control solution was consisted by 60 µl of methanol and 2.94 ml of ABTS radical anion solution. The stable ABTS radical anion scavenging activity of the plants phenolic compounds in the extracts was expressed as mg 100 g⁻¹ dry plants powders and as mg 100 ml⁻¹ standards compounds of VCEAC in 20 min. All radical stock solutions were prepared fresh daily.

DPPH Test

DPPH Evaluation

The antioxidant activity of plant extract was estimated using a slight modification of the DPPH radical scavenging protocol reported by Chen *et al.* (42); 1 ml of 100 µM DPPH solution in methanol was mixed with 0.1 ml of plant extract. The reaction mixture was incubated in the dark for 20 min and thereafter the optical density was recorded at 517 nm against the blank.

For the control, 1 ml of DPPH solution in methanol (100 µM) was mixed with 0.1 ml of methanol and optical density of the solution was recorded after 20 min. The decrease in optical density of DPPH on addition of test samples in relation to the control was used to calculate the antioxidant activity as percentage of inhibition (%IP) of DPPH radical, %IP = [(A_{t0} - A_{t20})/(A_{t0} × 100)] (12,43)

where A_{t0}: absorbance of the sample test after 0 min and A_{t20}: absorbance of the control after 20 min. Each assay was carried out in triplicate.

From a plot of concentration against %IP, a linear regression analysis was performed to determine the IC₅₀ value [concentration of a polyphenolic (in mg ml⁻¹) required to quench the free radicals by 50%] for each plant extract. The DPPH radical scavenging activity of phenolic compounds was expressed as IC₅₀ value in micrograms per milliliter of fresh weight. A low IC₅₀ value represents a high antioxidant activity.

DPPH Determination

The DPPH scavenging activity was determined using a modified method of Kim *et al.* (35). To 2.90 ml of an aqueous methanol solution (50%) of 100 µM of DPPH, 100 µl of the plant extracts solution was added. The mixture was shaken and allowed to stand at 20°C in dark for 30 min. After the decrease in absorbance, the resulting solution was monitored at 517 nm. The DPPH radical scavenging activity of phenolic compounds was expressed as mg 100 g⁻¹ of dry matter and as mg 100 ml⁻¹ of VCEAC in 30 min. The control solution was consisted by 100 µl of methanol and 2.90 ml of DPPH solution. The radical solution was prepared daily.

Statistical Analysis

Results are presented as mean ± standard error; statistical analysis of experimental result was based on analysis of variance. Significant difference was statistically considered at the level of *P* < 0.001.

Results

TPCs, TFCs and TACs

TPCs, TFCs and TACs were quantified using a UV-vis spectrophotometric apparatus. The results of analysis are showed in Fig. 1. No data were recorded for *F. capensis* leaves due to lack of sample.

RP-HPLC Analysis

Quantitative and qualitative comparison of polyphenolic compounds (TPC, TFC, TAC) were conducted using RP-HPLC.

The retention time of standards and their corresponding concentration in the samples were collected in Table 2. The experimentation has been done in four replicates. However, it is important to note that numerous peaks were not identified owing to the absence of suitable standards.

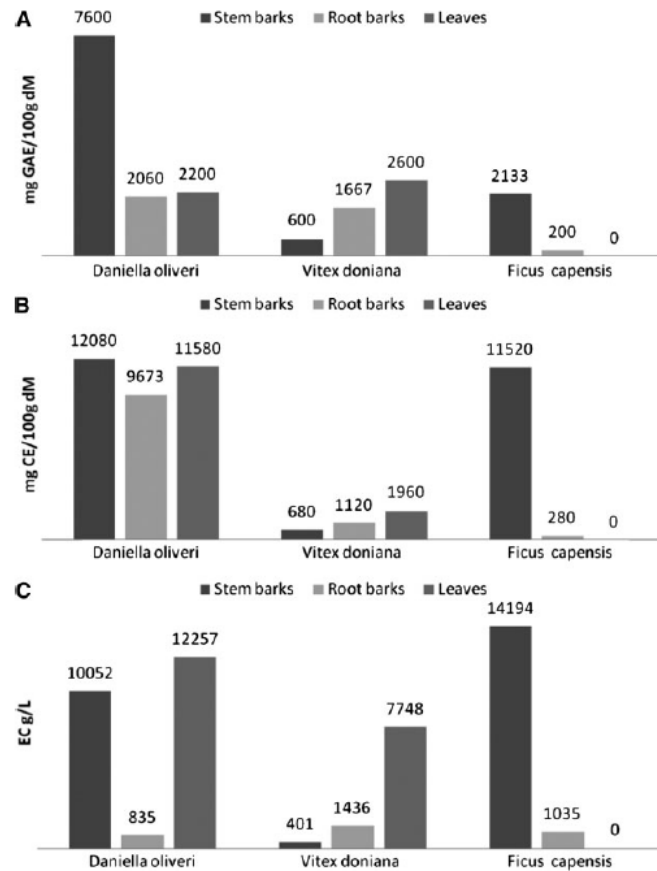


Figure 1. (A) Total polyphenols, (B) total flavonoids, (C) total anthocyanins.

Table 2. Compounds identified in the different plant parts and their concentration

Name of compound	Family	Retention time (min)	Stem barks ($\mu\text{g ml}^{-1}$)			Root barks ($\mu\text{g ml}^{-1}$)			Leaves ($\mu\text{g/ml}$)	
			<i>D. oliveri</i>	<i>V. doniana</i>	<i>F. capensis</i>	<i>D. oliveri</i>	<i>V. doniana</i>	<i>F. capensis</i>	<i>D. oliveri</i>	<i>V. doniana</i>
Galic acid	P	11.2	210.1 \pm 1.5	190.9 \pm 0.2	1180 \pm 4	1202 \pm 2	168.6 \pm 0.4	1.6 \pm 0.1	292.5 \pm 0.3	471.4 \pm 0.2
Protocatechic acid	P	17.0	19.8 \pm 0.2	63.5 \pm 1.4	71.6 \pm 0.3	1.2 \pm 0.1	22.7 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1	34.8 \pm 0.3
Catechin	F	25.0	ND	10.4 \pm 0.1	3.0 \pm 0.1	ND	51.5 \pm 0.2	0.8 \pm 0.1	4.1 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1
Chlorogenic acid	P	26.5	505.2 \pm 0.4	4.2 \pm 0.1	12.3 \pm 0.1	ND	ND	0.6 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	1.7 \pm 0.1
Caffeic acid	P	28.7	2410.4 \pm 12	8.2 \pm 0.1	12.7 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1	ND	5.2 \pm 0.1	13.6 \pm 0.2	ND
<i>p</i> -Coumaric acid	P	33.5	322.4 \pm 3.7	9.2 \pm 0.1	827.2 \pm 3.5	127.6 \pm 2.1	ND	827.2 \pm 0.8	18.9 \pm 0.2	18.8 \pm 0.3
Homo-orientin	F	35.4	784.4 \pm 4.9	453.6 \pm 4.0	36.6 \pm 0.1	6.2 \pm 0.2	2804 \pm 4	194.9 \pm 0.3	894.9 \pm 4.5	384.1 \pm 2
Orientin	F	36.4	ND	3.8 \pm 0.1	9.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	247.1 \pm 2.0	9.0 \pm 0.1	ND	1.0 \pm 0.2
Rutin	F	37.1	144.2 \pm 2.4	34.9 \pm 0.2	22.7 \pm 0.2	1.0 \pm 0.1	6363 \pm 2	6.1 \pm 0.1	ND	11943 \pm 5
Quercitrin-glucosyl	F	38.0	224.1 \pm 0.7	96.3 \pm 0.3	ND	115.6 \pm 0.4	18.1 \pm 0.1	ND	12.3 \pm 0.2	12.6 \pm 1
Quercitrin dehydrate	F	39.3	5.0 \pm 0.2	78.7 \pm 0.2	1.8 \pm 0.1	22.4 \pm 0.1	1346 \pm 1	83.2 \pm 0.5	ND	1.7 \pm 0.1
Coumarin	P	40.4	1.9 \pm 0.1	2.5 \pm 0.1	13.8 \pm 0.1	4.9 \pm 0.1	33.9 \pm 0.7	2.9 \pm 0.1	29.2 \pm 0.4	10.9 \pm 0.1
Malvidin	A	42.0	ND	39.1 \pm 0.2	ND	ND	110.0 \pm 0.6	ND	ND	8.3 \pm 0.1
Delphinidin	A	42.5	1.1 \pm 0.1	35.3 \pm 0.1	34.4 \pm 0.1	ND	ND	7.6 \pm 0.1	ND	ND
Quercitrin	F	44.0	1.0 \pm 0.1	ND	109.5 \pm 1.0	5.0 \pm 0.1	323.2 \pm 0.1	63.3 \pm 0.2	ND	1831 \pm 18
Ascorbic acid	Vit. C	56.5	2.5 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1	14.5 \pm 0.4	4.0 \pm 0.1	ND	1.3 \pm 0.1	ND	ND

ND: not determinate; A: Anthocyanidins; F: Flavonoids; P: Polyphenol. Data were reported as mean \pm SEM ($n=4$).

Table 3. Antioxidant activity *in vitro* analysis

Plants	Parts	Test PPM (mg 100 g ⁻¹ dw)	Test ABTS (mg 100 g ⁻¹ dw)	Test DPPH		
				VCEAC (mg 100 g ⁻¹ dw)	% IP	IC ₅₀ (µgml ⁻¹)
<i>Daniella oliveri</i>	Stem barks	586 ± 12	127.5 ± 0.1	193.7 ± 1.8	86.1 ± 1.4	2.9 ± 0.1
	Root barks	606 ± 1	124.1 ± 0.9	196.3 ± 0.7	87.6 ± 0.3	2.8 ± 0.1
	Leaves	526 ± 4	109.2 ± 3.8	210.3 ± 0.4	93.3 ± 0.2	2.7 ± 0.1
<i>Vitex doniana</i>	Stem barks	74 ± 6	129.6 ± 0.1	205.5 ± 2.3	84.9 ± 1.3	2.9 ± 0.1
	Root barks	194 ± 7	126.2 ± 0.9	200.1 ± 1.1	87.7 ± 0.1	2.8 ± 0.1
	Leaves	180 ± 5	127.1 ± 0.1	195.0 ± 1.3	84.9 ± 0.7	2.9 ± 0.1
<i>Ficus capensis</i>	Stem barks	280 ± 3	120.8 ± 6.1	195.8 ± 3.3	85.40 ± 1.80	2.9 ± 0.1
	Root barks	60 ± 2	122.5 ± 1.4	91.3 ± 0.5	28.41 ± 0.23	8.8 ± 0.1

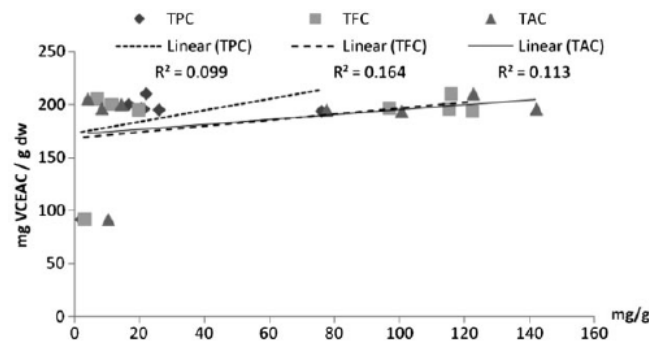


Figure 2. Relationship between the antioxidant activities and the polyphenolic compounds TPC (Total Phenolic Compounds); TFC (Total Flavonoid compounds) and TAC (Total Anthocyanin Compounds).

Antioxidant Activity

On the three plants screened, the extracts revealed good scavenging antioxidant activities as well as by PPM, ABTS or DPPH tests. The scavenging antioxidant activities of the different samples were reported in Table 3. Figure 2 showed the relationship between the antioxidant activities and the polyphenolic compounds (TPC, TFC, TAC) in the samples.

Discussion

The distribution of TPC in *D. oliveri* and *V. doniana* differs. The content of TPC are higher in leaves than in stem barks in *V. doniana*, whereas in *D. oliveri* TPC is more concentrated in the stem barks (Fig. 1). The concentration of TFC is very low in the root barks of *F. capensis*. The stem bark extracts of *D. oliveri* and *F. capensis* contain almost the same levels of TFC. *Daniella oliveri* plant parts, stem barks, root barks and leaves exhibit a similar TFC (Fig. 1). For all the three plants, the concentration of TAC is lowest in the root barks.

RP-HPLC analysis revealed that the caffeic acid in the stem barks of *D. oliveri* is the most important phenolic

compound (2410.4 µgml⁻¹), whereas its levels are too low in the other two plants (*V. doniana*, 8.2 µgml⁻¹ and *F. capensis*, 12.7 µgml⁻¹). Moreover, it appears that rutin is in very high concentration (6363.0 µgml⁻¹) in the root barks of *V. doniana* and almost absent in the root barks of *D. oliveri* and *F. capensis*.

Rutin is the most important phenolic compound (11943.0 µgml⁻¹) in the leaves of *V. doniana*, while it is not detected in the leaves of *D. oliveri* (Table 2).

Antioxidant activity has been evaluated by three tests: PPM, ABTS and DPPH. The PPM assay showed that the highest value was 606.0 mg 100 g⁻¹ dw (VCEAC) for the root barks of *D. oliveri*; in contrast, the lowest one was 60.0 mg 100 g⁻¹ dw for the root barks of *F. capensis* (Table 3). The great variations observed between the different plants and plant parts could be explained by the fact that PPM essay evaluates the antioxidant activity of polyphenols, and others antioxidant agents which are not phenolic compounds (43). To be more accurate about phenolic compounds, ABTS and DPPH tests have been done. ABTS tests showed that the antioxidant activity of different plants was almost the same. DPPH tests expressed as VCEAC varied from 91.3 mg 100 g⁻¹ dw for the root barks of *F. capensis* to 205.5 mg 100 g⁻¹ dw for the stem barks of *V. doniana*. In addition,

the antioxidant activity evaluated as %IP revealed a similar behavior. The highest IP value was 93.3% for the stem barks of *V. doniana* and the lowest one was 28.4% for the root barks of *F. capensis*. The %IP and IC₅₀ (µg ml⁻¹) have been calculated to compare the antioxidant capacity of the studied plant parts extracts with those described by other authors in literature such as Adesegun *et al.* (44) and Ruchi *et al.* (43). %IP values were relatively high (28.41–93.3%) and IC₅₀ relatively weak (2.7–8.8 µg ml⁻¹). This revealed that these three Malian plants have very good antioxidant activities. Each plant contains generally different phenolic compounds with different amount of antioxidant activity.

Many studies indicate linear relationship between total phenolics and antioxidant activity (10,12,45). In this study we found that polyphenolic compounds were not major contributors to antioxidant activity, since for TPCs, TFCs and TACs versus antioxidant activity, the correlation coefficients $R^2=0.0998, 0.1641, 0.1135$, respectively were weak (Fig. 2). These correlations have been established using all plant parts (stem barks, root barks, leaves). In conclusion, our results suggest that these plants are strong radical scavengers and can be seen as potential source of natural antioxidants for medicinal and commercial uses.

Acknowledgements

Mr Frédéric Desort (Ethnobotanique et Pharmacologie, Anxiété, Stress oxydant et Bioactivité. Université P. Verlaine-Metz, Metz, France) is acknowledged for technical assistance.

Funding

Ministry of Scientific Research of the Republic Democratic of Congo grant (No. 132.49/060/KMB/07).

References

1. Millner A. Functional foods and health promotion. *J Nutr* 1999;129:1395–7.
2. Marco D, Joseph V, John K. Mechanisms of disease: antioxidants and atherosclerotic heart disease. *New Eng J Med* 1997;6:408–16.
3. Vision J, Su X, Zubik L, Bose P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruit. *J Agric Food Chem* 2001;11:5315–21.
4. Wolfe KW, Liu RH. Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem* 2003;3:609–14.
5. Ndhala AR, Kasiyamhuru A, Mupure C, Chitindingu K, Benhura MA, Muchuweti M. Phenolic composition of *Flacourtia indica*, *Opuntia megacantha* and *sclerocarya birrea*. *Food Chem* 2007;103:82–7.
6. Wallace G, Fry SC. Phenolic components of the plant cell wall. *Int Rev Cytol* 1994;151:229–67.
7. Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 1993;341:454–7.
8. Kuda T, Tsunekawa M, Goto H, Araki Y. Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. *J Food Comp Anal* 2005;18:625–33.
9. Sharma S, Stutzman J, Kellof G, Steele V. Screening of potential chemo-preventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res* 1994;54:5848–55.
10. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna Stocker P, Vidal N. Antioxidant of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem* 2006;97: 654–60.
11. Wong C, Li H, Cheng K, Feng C. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem* 2006;97: 705–11.
12. Kim D, Ock K, Young J, Hae-Yeon M, Chang YL. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J Agric Food Chem* 2003;51:6509–15.
13. Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities and phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 2000;48: 3597–604.
14. Bouayed J, Piri K, Rammal H, Dicko A, Desor F, Younos C, et al. Comparative evaluation of the antioxidant potential of some Iranian medicinal plants. *Food Chemistry* 2007;104:364–8.
15. Bouayed J, Djilani A, Rammal H, Dicko A, Younos C, Soulimani R. Quantitative evaluation of the antioxidant properties of *Catha edulis*. *J Life Sci* 2008;2:7–14.
16. Bouayed J, Rammal H, Dicko A, Younos C, Soulimani R. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *J Neurol Sci* 2007;262:77–84.
17. Bouayed J, Rammal H, Younos C, Soulimani R. Positive correlation between peripheral blood granulocyte oxidative status and level of anxiety in mice. *Eur J Pharmacol* 2007;564:146–9.
18. Ahmadi A. Phytochemical and antimicrobial activities of the *Daniella oliveri* leaves. *Fitoterapia* 2004;75:729–32.
19. Balogun E.A, Adebayo J. Effect of ethanolic extract of *Daniella oliveri* leaves on some cardiovascular indices in rats. *Pharmacognosy Mag* 2008;4:16–20.
20. El-Mahmoud J, Doughari J, Chanji F. In vitro antibacterial activities of crude extracts of *Nauclea latifolia* and *Daniella oliveri*. *Acad J* 2008;3:102–5.
21. Onwukaeme ND, T. Y., Lot TY, Udoh FV. Effects of *Daniellia oliveri* Stem Bark and Leaf Extracts on Rat Skeletal Muscle. *Phytother. Res.* 1999;13:419–21.
22. Ouattara F. Traitement traditionnelle des infections sexuellement transmissibles au Mali: Etude de la phytochimie et des activités biologiques des *Amona senegalesis* L. (Annonaceae) et de *stochytarpheta augustifolia* Valh (Verbenaceae). *Thèse de doctorat* Université de Bamako, 2005.
23. Goetz P. Traitement des troubles de la libido masculine. *Phytothérapie clinique* 2006;1:9–14.
24. James P, Caroline R, Ymke W, Michael H, Ann M. Reduced reproductive function in wild baboons (harmadry as Anubis) related to natural consumption of the African black plum (*Vitex doniana*). *Hormones Behaviors* 2007;52:384–90.
25. Balde NM, Youla A, Balde M.D, Kake A, Diallo MM, Balde MA, Maudgendre D. Herbal medicine and treatment of diabetes in Africa an example from Guinea. *Masson Paris* 2007;2:171–5.
26. Peter AG, Desmet M. Traditional pharmacognosy and medicine in Africa ethnopharmacological in sub-saharan art objet and utensils. *J Ethnopharmacol* 1999;63:1–175.
27. Makkar HPS. *Quantification of Tannins in Tree Foliage: A Laboratory Manual for the FAO/IAEA Co-ordinate Research Project on Use of Nuclear and Related Techniques to Develop Simple Tannin Assay for Predicting and Improving the Safety and Efficiency of Feeding Ruminants on the Tanniniferous Tree Foliage*. Vienna, Austria: Joint FAO/IAEA Division of nuclear techniques in Food and Agriculture, 1999, 1–29.
28. Muchuweti M, Ndhala, Kasiyamhuru A. Analysis of phenolic compounds including tannins, gallotannins and flavanols of Uapaca kirkiana fruit. *Food Chem* 2006;94:415–19.
29. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 1999;64:555–9.
30. Sellappan S, Akoh C. C. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *J Agric Food Chem* 2002;50:2432–8.

31. Sellappan S. and Akoh C.C. Flavonoids and antioxidant capacity of Georgia-grown vidalia onions. *J Agric Food Chem* 2002;50: 5338–42.
32. Jimaima L, Craige Trenerry V, Mark W, Naiyana W, Subramaniam S, Robert P. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chem* 2007;101:1727–41.
33. Prio RL, Cao G. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: diet and health implications. *Horticultural Sci* 2000;4: 588–92.
34. Arnao M, Cano A, Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem* 2001;73: 239–44.
35. Kim D, Ki Won L, Hyong J, Chang Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J Agric Food Chem* 2002;50:3713–17.
36. Jennifer L, Anne S, Andrew L. Phenolic Composition and Antioxidant of prunes and prunes juice (*Prunus domestica*). *J Agric Food Chem* 1998;46:1247–52.
37. Prieto P, Pineda M, Aguillar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of phosphomolybdenum complex: specific application to determination of vitamin E. *Anal Biochem* 1999;269:337–41.
38. Van den Berg R, Haenen G, Van den Berg H, Bast A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem* 1999;66:511–17.
39. Lee S, Mbwambo Z, Chung H, Luyengi L, Gamez E, Mehta R. Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening* 1998;1: 35–46.
40. Antolovich M, Prenzler P, Robards K, Ryan D. Sample preparation in the analysis of phenolic compounds in fruits. *Analyst* 2000;125: 989–1009.
41. Negi P, Jayaprakasha G, Jena B. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chem* 2003;80:393–7.
42. Chen Y, Wang M, Rosen R, Ho C. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging active components from polygonum multiflorum Thumb. *J Agric Food Chem* 1999;47:2226–8.
43. Ruchi G, Majekodunmi O, Ramla A, Gouri B, Hussain A, Suad K. Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food Chemistry* 2007;101:465–70.
44. Adesegun SA, Fajana A, Orabueze CI, Coker HAB. Evaluation of antioxidant properties of *Phaulopsis fascisepala* C.B.CI (Acanthaceae). *eCAM* 2009;6:227–31.
45. Van den Berg R, Haenen G, Van den Berg H, Van den Berg V, Blast A. The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chem* 2000;70:391–5.

Received October 17, 2008; accepted July 22, 2009

Chemical composition and biological activities of *Ficus capensis* leaves extracts

François Muanda N^{1*}, Amadou Dicko¹, Rachid Soulimani²

¹Chemistry Laboratory and methodology for Environment. Paul- Verlaine University 1, Bd Arago Technopole 2000. 57078 Metz (France).

²Neurotoxicology Alimentary and Bioactivity Laboratory, University P. Verlaine-Metz, BP 4102, 57040, Metz (France).

* Corresponding author

(Received 10 April 2010; Revised 16-26 April 2010; Accepted 02 May 2010)

ABSTRACT

The leaves of *Ficus capensis* were investigated for the phytochemicals, antioxidant, anti-inflammation and antibacterial properties. Three samples were evaluated; E.O (essential oils) MWE (methanol – waters extract) and WE (water - extract). The contents of bioactive components were quantified and identified by GC/MS, UV - spectrophotometer and RP-HPLC. The antioxidant capacities were measured using ABTS and DPPH assay expressed as IC₅₀ (µg/ml). The anti - inflammation properties was quantified by the NO inhibition and the antimicrobial by the disk diffusion method. The major compounds identify in E.O are carvacrol (65.78%), α- caryophyllene (29.81), caryophyllene oxide (25.70 %), linalool (3.97%), 3-tetradecanone (2.90 %), geranylacetone (1.20), 3,7,11-trimethyl-3-hydroxy-6;10-dodecadiene-1-yl acetate (1.53 %), hexahydrofarnesyl acetone (1.21 %), α-caryophyllene (0.81 %), 2-methyl-3-hexyne (0.69 %) and scytalone (0.69%). The total phenolics, total flavonoids, total anthocyanins and condensed tannins evaluate were (16.47mg gallic acid equivalent (GAE), 6.92 mg catechin equivalent (CE), 9.52 mg cyaniding glucosyl equivalent (CgE), and 4.21 mg catechin equivalent (CE) / gm dw (dry weight) of plant material respectively. Quercetin dihydrat (4.48 mg/ml) and protocatechuic acid (1.46 mg/ ml) were the major compounds identify. The IC₅₀ value was 10.25 µg/ ml. The results show that these extracts have good antioxidant and antiinflammation properties. The anti microbial analyses suggest that *F. capensis* can be used in treatment of diseases caused by *E. coli* and *Bacillus subtilis*.

Keywords: *Ficus capensis*; Antioxidant; Polyphenolics; RP-HPLC; Antimicrobial.

INTRODUCTION

In recent years, there has been growing interest in alternative therapies and the therapeutic use of natural products and a renewed interest has occurred in the last decade to search for phytochemicals of native and naturalized plants for pharmaceutical and nutritional purposes (Oktay, et al., 2003; Wangenstein, et al., 2004). Also, it is well known that plants contain essential oils and various extracts that

may be used as alternative remedies for many infectious diseases. The antimicrobial compounds found in plants are interest because of antibiotic resistance which is becoming a worldwide public health concern especially in terms of food, borne, illness and nosocomial infections (Mora, et al., 2005; Navon-Venezia, et al., 2005). Naturally occurring antimicrobials are being sought as replacements for synthetic preservatives such as parabens (ethyl, methyl, butyl and propyl parabens), butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxanisole (BHA) that are under scrutiny as suspected cancer causing agents (Wangensteen, et al., 2004; Bergfeld, et al., 2005). Plants produce a multitude of organic compounds that have anti - inflammation and antimicrobial activities. *Ficus capensis* Thumb (family-Moraceae) is an evergreen tree widely distributed in tropics, both leaves and roots have been used for leprosy, leucodermia and swollen feets (Nguyi, 1988; Dafalla, 2005; Oyeleke, et al., 2008). A search of the literature did not reveal any report on antioxidant and anti inflammation properties of the essential oil and the leaves extract of *F. capensis*.

The objectives of this study are to determine the phytochemicals compounds, to evaluate the antioxidant, the anti - inflammation and the antimicrobial proprieties of various samples prepared from the leaves of *Ficus capensis*.

MATERIALS AND METHODS

Dried leaves of *Ficus capensis* (Moreaceae) were obtained from Mali, and the botanical identification was carried out by Professor Max Henry, from Botanic and Mycology Laboratory, France. A Voucher specimen has been kept in our Laboratory for future reference. All plant materials were dried at room temperature and powered and sifted in a sieve (0.750 µm).

Chemicals: All the chemicals used were analytical grade. 1,1-Diphenyl-2-picryl hydrazyl radical (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) (ABTS), 2,2'-azo-bis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH), gallic acid, folin-Ciocalteu's phenol reagent, aluminium chloride, catechin, *p*-coumaric acid, rutin, procatechiuc acid, vitamin C, caffeic acid, isovitexin, vitexin, chlorogenic acid, catechin, quercetin, quercetin dihydrat, quercetin-3-β-D glucosyl, epicatechin, Kuromanin chloride, cyaniding chloride were purchased from Across organics (Geel, Belgium). Sodium carbonate, sodium nitrite, chlorhydric acid, ethyl acetate sodium, sodium sulphate anhydrous, ammonium phosphate, acetonitrile, methanol, interferon-gamma (IFN-γ), polysaccharide of salmonella typhimurium (LPS), sulfanilamide, NEDA (N-(1-naphtyl) ethylenediamine dihydroxy chloride), vanillin reagent, n-hexane were obtained from Sigma and Roth (Strasbourg, France). Agar nutrient (Mueller- Hinton - agar) (Becton Dickinson, Heidelberg), paper discs, ampicillin, gentamicin, nystatin, pures cultures of the bacteria (*Staphylococcus aureus* (ATCC29213), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Bacillus subtilis* (ATCC6059) and fungi (*Aspergillus niger* (135550/99), *Candida albicans* (ATCC90028)) were given by the I.B.I.S.E laboratory (UIT Thionville, France).

Preparation of essential oil: The essential oil was prepared according to a previously reported method (El-Massy, et al., 2009). Dried powered plant materials (250gm) were placed in a 2L round-bottom flask and mixed with 1L of deionised water. The solution was distilled for 5 h. The essential oil obtained was dried over anhydrous sodium sulphate, which was subsequently removed with filtration.

Preparation of total phenolic compounds (TPC), total flavonoid compounds (TFC) and total anthocyanin compounds (TAC) extract: Total phenolic compounds (TPC), total flavonoid compounds (TFC), and total anthocyanin compounds (TAC) were

extracted from the powders as described by Chitindingue, et al. (2007). Two grams of powdered sample were extracted twice with 10 ml of cold aqueous methanol solution (50%).

The two volumes were combined, made up to 40 ml, centrifuged at $1532 \times g$ for 20 minutes and transferred in small sample bottles and stored at $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in the dark until analysis.

Preparation of condensed tannins (CT) extract: Samples for CT were extracted from the powders as described by Villareal-Lozoya, et al., (2007) slightly modified. 1gm of powder was extracted twice with 20 ml of n-hexane while 20 minutes, filtered and the remaining powder was dried at $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ under vacuum for 2 h. The powder was stored at $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analyses.

Extraction of polyphenol compounds for RP-HPLC analysis: Polyphenols were extracted according to a slightly modified method previously described by Sharma, et al., (2005). A fresh sample (0.4gm) was extracted with 2×5 ml of aqueous methanol (50/ 50: v/v) with intermittent shaking (2 minutes) on vortex mixer for 30 minutes. The sample was centrifuged at $1536 \times g$ for 20 minutes at 20°C . The supernatant was taken into a 10 ml volumetric flask. The extract is stable for 24 h if stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Analysis of essential oils: The essential oils were analysed and identified by GC/MS. An HP model 6890 GC equipped with a $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm}$ i.d. (df: $0.25\text{ }\mu\text{m}$) DB-5 bonded-phase fused-silica capillary column (Agilent, Folsom, CA) and a flame ionization detector (FID) were used. Injector and detector temperatures were 200 and $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively. The oven temperature was programmed from 35 to 250°C at $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and held for 50 min. The linear velocity of the helium carrier gas was 30 cm/s . Injections were in the split-less mode. An HP model 6890 GC interfaced to an HP 5791A mass selective detector (GC/MS) was used for mass spectral identification of the GC components at a MS ionization voltage of 70 eV . A $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm}$ i.d. (df = $0.25\text{ }\mu\text{m}$) DB wax bonded-phase fused-silica capillary column (Agilent, Folsom, CA) was used for GC. The linear velocity of the helium carrier gas was 30 cm/s .

The temperature of injector and detector was $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. The oven temperature was programmed from 50° to 250 at $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and held for 50 min. The percentage of each compound in the oil is determined from peak areas without correction factors account assuming that all components have coefficients of neighboring rethinking. Identification of constituents was performed by coupling an HP model 6890 GC gas to a mass spectrometer type an HP 5791A mass selective detector (GC/MS). The volume injected is $1\text{ }\mu\text{l}$ of a pure oil solution diluted to 1% in dichloromethane. Qualitative analysis was based on the comparison of retention times and the computer mass spectra libraries using Wiley GC/MS Library and Nist, Tutore Libraries. The percentage composition was computed from the GC peak areas.

Dosage of phenolic compounds

Determination of total phenolic compounds (TPC): The Folin-Ciocalteu method was used to measure the total phenolic compounds (Dzingira, et al., 2007). To a sample ($100\text{ }\mu\text{l}$), distilled water was added to make 2 ml (Eppendorff tube), followed by 1 ml of Folin Ciocalteu reagent 1N and sodium carbonate (20 %). After 40 minutes at room temperature, absorbance at 725 nm was read on a Spectrophotometer against a blank that contained methanol instead to sample. The results were compared to a gallic acid calibration curve, and the total phenolic compounds were determined as gallic acid equivalents (GAE). Determination of each sample was performed in triplicate.

Determination of total flavonoid compounds (TFC): The flavonoids contents were measured according to a colorimetric assay (Kim, et al., 2003). A $250\text{ }\mu\text{l}$ of standard

solution of catechin at different concentrations or appropriately diluted samples was added to 10 ml volumetric flask containing 1 ml of distillate waters. At zero time, 75 μ l of NaNO₂ (5%) was added to the flask. After 5 minutes, 75 μ l of AlCl₃ (10%) was added. At 6 minutes, 500 μ l of NaOH (1N) was added to mixture. Immediately, the solution was diluted by adding 2.5 distillate water and mixed thoroughly. Absorbance of the mixture, pink in colour, was determined at 510 nm versus the prepared blank. Total flavonoid compounds in medicinal plant were expressed as mg catechin equivalents (CE /g dry weight (dW)). Samples were analysed in three replications.

Evaluation of total anthocyanin compounds (TAC): The total anthocyanin compound of the samples was estimated using a UV-spectrophotometer by the pH-differential method reported by Abu Bakar, et al. (2009). Two buffer systems, potassium chloride buffer, pH 1.0 (0.0025M) and sodium acetate buffer, pH 4.5 (0.4 M) were used. Briefly, 400 μ l of extract was mixed in 3.6 ml of corresponding buffer solutions and read against a blank at 510 and 700 nm. Absorbance (ΔA) was calculated as: $\Delta A = (A_{510} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{510} - A_{700})_{pH4.0}$ Monomeric anthocyanin pigment concentration in the extract was calculated and expressed as equivalent cyaniding-3 glycoside (mg l⁻¹):

$$\Delta A \times MW \times Df \times 1000 / (Ma \times 1)$$

- With ΔA : difference of absorbance,
- Mw is a molecular weight for cyaniding-3-glucoside (449.2) and
- Df is the dilution factor of the samples, Ma is the a the molar absorptivity of cyaniding-3-glucoside (26.900)

Results were expressed as mg of cyaniding-3-glucoside equivalents in 100g of dried sample.

Determination of condensed tannin (CT): The condensed tannin content was estimate using the method slightly modified described by Villareal-Lozoya, et al. (2007). Briefly, an aliquot of 0.5 g of powder obtained after lixiviation (n-hexane) was placed in a centrifuge tube and 15 ml of 1% HCl in methanol was added to each sample. Each tube was vortexed and placed in a water bath at 35 °C with constant shaking for 20 minutes and vortexing every 5 minutes. After incubation, the tubes were centrifuged (1532 \times g) and the supernatants were extracted. Aliquots of the supernatants (100 μ l) were placed in two separate assay tubes, one for the sample determination and the other for blank determination. Samples and blanks were incubated for exactly 20 minutes after adding 5 ml of vanillin reagent (0.5 gm of reagent and 200 ml of 4% HCl methanol) to samples and 4 % HCl in methanol to the blanks. After 20 minutes, absorbance was read at 500 nm from of each sample and blank using UV-spectrophotometer Varian Cary 50. Samples absorbance was rectified with the blank standard and compared against a standard curve made with catechin. Results were expressed as mg catechin equivalent /gm of lixiviating sample (mg CE/gm). The analysis of each sample was performed at least in three replications.

Identification of polyphenolic compounds

The identification was done by RP-HPLC according to a modified method described by Sharma, et al. (2005). Extracted samples (Methanol, Methanol - water, and H₂Odd (didistillate water) were filtered through a 0.45 μ m PTFE syringe tip filter, using a 20 μ l sample loop. The sample was analyzed using an RP - HPLC system equipped with a waters UV-Visible tuneable detector on a reverse phase (RP C₁₈) column Alltech Interstsil ODS-5 μ m \times 4.6 mm \times 150 mm. The flow rate was set at 1 ml / minute at room temperature. To perform this study a gradient of three mobile phases was used. Solvent A: 50 mM ammonium phosphate (NH₄H₂PO₄) pH 2.6 (adjusted with phosphoric acid), solvent B: (80: 20 (v/v)) acetonitrile / solvent A, and solvent C: 200 mM of phosphoric acid pH 1.5 (pH adjusted with ammonium hydroxide). The

solvents were filtered through a Whatman Maidstone England paper N° 3 and putted in an ultrasonic apparatus for 25 minutes. The gradient profile was linearly change as follows (total 60 minutes): 100 % solvent A at zero minutes, 92% A / 8% B at 4 minutes, 14 % B / 86% C at 10 minutes, 16% B / 84% C at 22.5 minutes, 25 %B / 75% C at 27.5 minutes, 80 % B / 20% C at 50 minutes, 100% solvent A at 55 minutes, 100 % A at 60 minutes. After each run, the system was reconditioned for 10 minutes before analysis of next sample. Under these conditions, 20 µl of sample were injected. External polyphenolic standards were prepared by dissolving 2 mg ml⁻¹ and used as external reference. Individual polyphenol in the sample were identified by comparison of their retention times with spiked in put of the corresponding external polyphenolic standards. The detection was carried out at 280 and 320 nm and their quantification was obtained by the comparison of the peaks area of individual polyphenol with the corresponding external standards peaks. All sample analysis was done in triplicate.

Antioxidant activity analysis

Two tests were used to determine the total antioxidant capacity, the DPPH and the ABTS tests.

Evaluation of radical scavenging activity by DPPH assay: The DPPH radical scavenging activity was evaluated according to a previously method slightly modified described by Pothitirat, et al. (2009). 1 ml of 100 µM DPPH solution in methanol was mixed with 1 ml of plant extract. The reaction mixture was incubated in the dark for 20 minutes and there after the optical density was recorded at 517 nm against the blank. For the control, 1 ml of DPPH solution in methanol was mixed with 1 ml of methanol and optical density of solution was recorded after 20 minutes. The decrease in optical density of DPPH on addition of test samples in relation to the control was used to calculate the antioxidant activity as percentage of inhibition (% IP) of DPPH radical:

$$\% \text{ IP} = [(A_{t_0} - A_{t_{20}}) / (A_{t_0} \times 100)]$$

- Where A_{t_0} : absorbance of sample test after zero minutes and
- $A_{t_{20}}$: absorbance of control after 20 minutes.
- Each assay was carried out in triplicate.

From a plot of concentration against % IP, a linear regression analysis was performed to determine the IC₅₀ value for each extract. The DPPH radical scavenging activity of phenolic compounds was expressed as IC₅₀ value in micrograms per ml of fresh weight. A low IC₅₀ value represents a high antioxidant activity.

Determination of radical scavenging activity by DPPH assay: To 2.90 ml of an aqueous methanol solution (50%) of 100 µM of DPPH, 100 µl of the plant extract solution was added. The mixture was shaken and allowed to stand at 20°C in dark for 40 minutes. After the decrease in absorbance, the resulting solution was monitored at 517 nm. The DPPH radical scavenging activity of phenolic compounds was expressed as mg/100g of dry matter of VCE in 40 minutes. The control solution was consisted by 100 µl of methanol and 2.90 ml of DPPH solution. The radical solution was prepared daily.

ABTS radical scavenging test: The method developed by Djeridane, et al. (2006) slightly modified was used in this experiment; 1.0 mM of AAPH solution was mixed with 2.5 mM ABTS as diammonium salt in phosphate buffered saline (PBS) solution 100 mM potassium phosphate buffered (pH 7.4) containing 150 mM NaCl. The mixture was heated in a water bath at 68 °C for 20 minutes. The concentration of the resulting blue-green ABTS^{•+} (radical cation solution) was adjusted to an absorbance of 0.65 ± 0.02 at 734 nm. The sample solution of 60 µl was added to 2.94 ml of the

resulting blue-green ABTS radical solution. The mixture, protected from light, was incubated in a water bath at 37 °C for 20 minutes. Then the decrease of absorbance at 734 nm was measured. The control solution was consisted by 60µl of methanol and 2.94 ml of ABTS⁺ solution. The stable ABTS radical scavenging activity of the phenolic compounds in the extract was expressed as mg/100 gm dry plants part powders of VCE. All radical stock solutions were prepared fresh daily.

Determination of antimicrobial activities

The following bacterial strains were employed in the screening: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and fungi: *Aspergillus niger*, *Candida albicans* given by IBiSE (UIT Thionville - Metz University). The antimicrobial activities were examined by the disk - diffusion method (Bauer, et al., 1966). The bacterial cell suspension was prepared from 24h culture and adjusted to an inoculation of 1×10^6 colony forming units per ml. Sterile nutrient agar (Immun präparate, Berlin, D, 26 g agar/ 1 distilled water) was inoculated with bacterial cells (100 µl of bacterial cell suspension in 25 ml medium) and poured into dishes to give a solid plate. Yeasts and hyphomycetes (1×10^6 colony forming units per ml) were inoculate into sterile Mueller-Hinton-agar (Becton Dickinson, Heidelberg) according to DIN E 58940-3 for the agar disc-diffusion assay (Al-Fatimi, et al., 2007).

10 µl of test material (250 gm/ 500 ml) dissolved in the same solvent like for extraction, were applied on sterile paper discs (6 mm diameter). Ampicillin, gentamicin, and nystatin were used as positive control, and the solvents water and methanol-water (50/ 50 v/v) as negative control. The solvents were allowed to evaporate in a stream of air and the discs were deposited on the surface of inoculated agar plates. Plates were kept for 1 h in refrigerator to permit good prediffusion of substances into the agar. The Plates with bacteria were incubated for 24 h at 37°C, the plates with yeast for 48h at 36 °C and the plates with hyphomycetes for 72 h at 30°C. Inhibition zone diameters around each of the disc (diameter of inhibition zone plus diameter of the disc) were measured and of the incubation time. An average zone of inhibition was calculated for the three replicates.

Minimal inhibitory concentrations (Mics) were determined by the agar diffusion technique as described by Rajbhandari and Schöpke (1999). The highest concentration of extract tested during the experiment was 2 mg/ ml. The MIC (minimum inhibitory concentration) corresponds to the lowest concentration of the tested extracts (water, or methanol - water extract), able to inhibit any visible microbial growth. Several concentrations of the extracts were prepared, (2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.5, and 0.05 ml/ 10 ml) the different solutions were agitated vigorously. And approximately 20 µl ml of each concentration mixture was transferred in the disk. Then the disks were transferred in the Petri dishes containing the microorganism testing. The plates were incubated for 24 h at 37°C for bacteria, for 48 h at 36 °C for yeast, and for 72 h at 30 °C for the fungal. After incubation, the number of colonies in each plate was counted. Each assay replicated three times.

Anti-inflammatory activity by nitrite assay

The test used to assess the potential anti-inflammatory activity of molecules consisted of evaluating their capacity to inhibit NO production in activated macrophages (Pacheco-Sanchez, et al., 2007). Released nitrite (NO₂⁻) in the culture medium was measured as an indicator of NO production according to the colorimetric test based on the Griess reaction. Briefly, 1ml of plant extract was mixed with 1ml of Griess reagent at room temperature for 30 min. The nitrite concentration was determined by measuring the absorbance at 548 nm using a standard curve of NaNO₂.

The results were expressed as percentage of NO production compared to the control as follows:

$$\% \text{ Inhibition} = 100 \times [\text{NO}_2^-]_{\text{control}} - [\text{NO}_2^-]_{\text{Ex}} / [\text{NO}_2^-]_{\text{control}}$$

- With [NO₂⁻] control is the concentration of nitrite released without addition of the extract, and
- [NO₂⁻]_{Ex} the concentration of nitrite released by the cells in presence of the plant extract.

Statistical analysis: Results are presented as mean ± standard Error; statistical analysis of experimental result was based on analysis of variance one way ANOVA. Significant difference was statistically considered at the level of P < 0.001.

RESULTS

Chemical identified in Essential Oils: Yields of essential oils from the leaves of *F. capensis* were 0.65 ± 0.02 g/100 gm of dry leaves (w/w). The value is the mean of standard deviation (n = 3) (P ≤ 0.05). Quantitative and qualitative analytical results are shown in Table 1.

Total phenolic contents: In table 2 is shown the amount of phenolic compounds analysis. The values are the mean ± SD (n = 3, w/w)

Qualitative and quantitative analysis of polyphenolic compounds: The figures 1 and 2 show the corresponding RP-HPLC chromatogram of MWE and WE respectively. Peaks were identified and quantified on the basis of their retention time values and UV spectra by comparison with those of the single compound in the standard solution. The retention time and the concentration of polyphenolic compounds contained in the extracts are reported in the Table 3. There were numerous peaks that were not identified because of lack of suitable standards. The samples were analyzed at least four replications at 280 and 320 nm.

Antioxidant analysis: In table 4 is reported the DPPH and ABTS antioxidant test values.

Antimicrobial analysis: The results of antimicrobial tests are shown in tables 5 and 6.

Anti-inflammation properties of phenolic compounds: The anti-inflammation properties of EO, WE and MWE are reported in figure 3.

DISCUSSION

About 31 compounds are identified in the *F. capensis* essential oil, as the results demonstrate the major are carvacrol (65.78%), α-caryophyllene (29.81), caryophyllene oxide (25.70 %), linalool (3.97%), 3 - tetradecanone (2.90 %); geranylacetone (1.20), 3,7, 11 - trimethyl-3-hydroxy-6;10-dodecadiene-1-yl acetate (1.53 %), hexahydrofarnesyl acetone (1.21 %), α- caryophyllene (0.81 %), 2- methyl-3-hexyne (0.69 %) and scytalone (0.69%). Most of the compounds identify play important roles in the aromas of essential oils for example, caryophyllene possess a woody-spicy odour with a somewhat bitter taste and has been used particularly for chewing gum as well as in spice blends and flavour compositions (El-Massy, et al., 2009). But, several authors showed that the relative composition of some compounds change significantly because of the use of dry leaves (Omidbaigi, et al., 2004). Volatile aroma compounds are the most sensitive components in the process of food drying but the loss of volatiles in herbs and spices during drying depends mainly on drying conditions and the biological characteristics of plants; the antioxidant activity of essential oils was also affected (Omidbaigi, et al., 2003). The results of phenolic compounds content reveal that the leaves of *Ficus capensis* are mainly composed by total polyphenolic compounds (16.47 mg GAE/g dw). The amounts of total

anthocyanin and total flavonoid are 9.52 mg CgE/g dw and 6.92 mg CE/g dw respectively. The amount of total tannins observed was weak (4.21 mg CE/g dw). Quantitative and qualitative analysis of individual phenolics compounds by HPLC show that water is not the best extract solvent for phenolic compounds. This is in concordance with Muanda, et al., (2009), which report that an aqueous alcohol is considered to be the best solvent for extracting phenolic compounds from plant materials.

These results show the most important compound identifies in WE is epicatechin (1.21 mg/ml) and the less one is catechin (0.19 mg/ml). While in MWE, rutin (1.69 mg/ml) is the major. For the antioxidant property, it is well known that plants contain various antioxidants such as ascorbic acid, tocopherols, polyphenols and terpenoids (Graddmann, 2005). Phenolic compounds have received much attention as one of the principle antioxidants found in plants; several authors reported that some essential oils and organic solvent extracts from plants possess antioxidant activity (El-ghorab, et al., 2007).

In this study, the radical scavenging effect of leaves extract was determined by ABTS and DPPH colouring methods and the values were comparing to VCE. The radical scavenging effects of the E.O (Essential oils), MWE (Methanol-water extract) and WE (Water extract) extracts reveal a positive control on both ABTS and DPPH tests (Table 3). The ABTS test and the DPPH values express as mg VCE / g dw varied between 1.37 and 0.09 mg. In addition to compare this antioxidant capacity with the others plants previously described in the literature such as *Mangosteen* fruit, *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita*, *Matricaria recutiat*, *Cymbopogon citrate*, the antioxidant activity was expressed as IC₅₀. The IC₅₀ values of *F. capensis* leaves extracts (MWE, WE, E.O) by DPPH assay were IC₅₀: 10.25, 13.07 and 23.34 µg/ml respectively (Table 3). These results, compared to the extract from *Mangosteen* fruit (IC₅₀: 10.94 µg/ml) (Pothitirat, et al., 2009), *Melissa officinalis* (IC₅₀: 32. µg/ml (WE), (IC₅₀: 24.3 (ME) µg/ml), *Matricaria recutita* (IC₅₀: 947.2 µg/ml (WE), (IC₅₀: 115.9 µg/ml (ME) and *Cymbopogon citrates* IC₅₀: 1615.7 µg/ml (WE), (IC₅₀: 85.7 (ME) µg/ml (Pereira, et al., 2009) reveals that *F. capensis* leaves extract has significant antioxidant activities.

Phytochemical screening of leaves extracts of *F. capensis* revealed the presence phenolic compounds (polyphenols, flavonoids, anthocyanins, tannins, terpenoids, etc.), the presence of these metabolites reveals its activity against pathogenic bacteria. According to Ebana, et al. (1991), alkaloids inhibit pathogenic bacteria and tannins are important in herbal medicine in treating wounds and to arrests bleedings (Nguyi, 1988). This also confirms the use of *F. capensis* for wounds in circumcision (Oyeleke, et al., 2008).

The extracts had varying degree of antimicrobial activity against the test organisms. The MWE has the highest activity with zone of inhibition between 10 – 21 mm as compared to that of the WE. The essential oil showed moderate activity (Table 4). This antioxidant activity may be due to the presence of terpenes with antioxidant activity such as, caryophyllene, linalool and carvacrol with strong antioxidant activity (El-Massy, et al., 2009). The results are in accordance with those found by Oyeleke, et al. (2008). The minimum inhibitory concentration (MIC) obtained reveals the effectiveness of the plant extract as chemotherapeutic agents. The organisms were inhibited at concentrations > 1000 µg/ml (Table 5). The most susceptible organisms to the antimicrobial activity of *F. capensis* were *E. coli* and *Bacillus subtilis*.

About the anti-inflammation properties; the anti-inflammatory activity of EO, WE and MWE was studied for their inhibitory effects on chemical mediators release

(LPS/IFN γ -induced NO production) from macrophages. Activated macrophages produce large amounts of chemical mediators that indicate inflammation. NO, a bioactive free radical, is one of these critical mediators which is produced by inducible NO synthase (iNOS) in inflammatory macrophages when stimulated with LPS/ IFN γ mixture (Pacheco-Sanchez, et al., 2007). Excessive production of NO is indicated both in chronic and acute inflammation (Terra et al., 2007). In fact, NO production induced by LPS/ IFN γ through iNOS induction may reflect the degree of inflammation and may provide a measure for assessing the effect of the extract/ fractions on the inflammatory process. As shown in Figure 4, the addition of EO at different concentrations (20, 50, 100 and 150 μ l) significantly reduced NO production, resulting in 15.05%, 22.03%, and 39.80% inhibition of NO production in macrophages stimulated with LPS/IFN γ , respectively. As for the WE and the MWE, their use showed significant inhibitor effect varying between (22.03 to 48.08 %) for WE and (36.75 to 75.98 %) for MWE. These results show a significantly reduced NO production in a dose-dependent manner. Similarly to these results, it has been demonstrated in several studies that extract rich in flavonoids and proanthocyanidins inhibited NO production in RAW 264.7 macrophages (Clancy, et al., 1998; Ho, et al., 2007; Diouf, et al., 2009). These results seem to indicate that phenolic compounds present in the extracts are responsible for the anti-inflammatory activity. Nevertheless, in the EO, the anti-inflammatory activity is correlated positively with the radical-scavenging activity and the highest antioxidant activity was correlated with the highest total phenol content and/or the highest anti-inflammatory activity of the tested extract/fraction.

In conclusion, the phytochemicals, the antioxidant, anti-inflammation and antimicrobial activities of the leaves of *Ficus capensis* were evaluated; the results demonstrate that the MWE was more effective against pathogens and the inhibition percentage of NO was high. These properties are correlated to the antioxidant properties. The results of the present study support the view that the leaves of *F. capensis* could be a potential source of natural antioxidant/antimicrobial and anti-inflammation drugs.

Acknowledgments: This work was supported by a grant from the Ministry of Scientific Research of Republic Democratic of Congo (N $^{\circ}$ 132.49/060/KM/07). Mr. Frederic Desort (Neurotoxicology Alimentary and Bioactivity Laboratory. University P. Verlaine-Metz, BP 4102, 57040, Metz (France) is also acknowledged for technical assistance.

REFERENCES

- Abu Bakar, M. F., Mohamed, M., Rahmat, A., Fry, J., (2009): Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (*Mangifera pajang*) and tarap (*Artocarpus odoratissimus*). *Food Chem.*, 113: 479 - 483.
- Al-Fatimi, M., Wurster, M., Schröder, G., Lindequist, U., (2007): Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *J. Ethnopharmacol.*, 111: 657 - 666.
- Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sheriss, J. C., Turck, M., (1966): Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45: 493 - 496.
- Bergfeld, W. F., Belsito, D. V, Marks, J. G. J., Andersen, F. A., (2005): Safety of ingredients used in cosmetics. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 52: 125 - 132.
- Chitindingue, K., Ndhilala, A. R., Chapano, C., Benhura, M. A., Muchuweti, M., (2007): Phenolic compound content, profiles and antioxidant activities of *Amaranthus hybridus* (pigweed), *Brachiaria brizantha* (upright brachiaria) and *Panicum maximum* (guinea grass). *J. Food Biochem.*, 31,: 206 - 216.

François Muanda N, et al., /Journal of Natural Products, Vol. 3(2010):147-160

- Clancy, R. M., Varneika, B., Rediske, J., Stoyanovsky, D., Wink, D., Abramson, S. B., (1998): Thenitric oxide (N.O) paradox resolved by Angeli's salt: Tissue injury depends upon NO redox state. *Arthritis. Rheum.* 41: S 143
- Dafalla, H. A. A., (2005): Studies on constituents of *Ficus capensis* Thumb. *Pakistan J. soc. Sci.*, 3: 751 - 754.
- Diouf, P.N., Stevanovic, T., Cloutier, A., (2009): Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea mariana* bark and its proanthocyanidin-rich fractions. *Food Chem.*, 113: 897 – 902.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., (2006): Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.*, 97: 654 - 660.
- Durga, K. R., Karthikumar, S. Jegatheesan, K., (2009): Isolation of potential antibacterial and antioxidant compounds from *Acalypha indica* and *Ocimum basilica*. *J. Med. plants Res.*, 3: 703 - 706.
- Dzingira, B., MuChuweti, M., Murenje, T., Chidewe, C., Benhura, M. A. N., Chagonda, L. S., (2007): Phenolic content and phospholipids peroxidation inhibition by methanolic extracts of two medicinal plants: *Elionurus muticus* and *Hypoxis hemerocallidea*. *Afr. J. Biochem. Res.*, 1: 137 - 141.
- Ebana, R. U. B., Madunagu, B. E., Ekpe, E. D., Otung, I. N., (1991): Microbiological exploitation of cardiac glycosides and alkaloids from *Garcinia kola*, *Borreria ocymoides*, *Kola nitida* and *Citrus aurantifoli*. *J. Appl. Biotechnol.*, 71: 398 - 401.
- El-Massy. K. F., El-Ghorab, A. H., Shaaban, H. A., Shibamoto, T., (2009): Chemical compositions and antioxidant/ antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* cultivated in Egypt., *J. Agric. Food Chem.*, 57: 5265-5270.
- El-ghorab, A., El- Massy, K.F., Shibamoto, T., (2007): Chemical composition of the volatile extract and antioxidant activities of the volatile and non volatile extracts of Egyptian corn silk (*Zea mays* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 55: 9124 - 9127.
- Graddmann, J., (2005): Terpenoids as plant antioxidants. *Vitam. Horm.* 72: 505 - 535.
- Ho, S. C., Hwang, L. S., Shen, Y. J., Lin, C. C., (2007). Suppressive effect of a proanthocyanidin-rich extract from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) flowers on nitric oxide production in LPS-stimulated macrophage cells. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 10664 – 10670.
- Kim, D. O., Jeong, S. W., Lee, C. Y., (2003): Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.*, 81: 321 - 326.
- Mora, A., Blanco, J. E., Blanco, M., Alonso, M. P., Dhahi, G., Echeita, A. et al., (2005): Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157: H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. *Res. Microbiol.*, 156: 793 - 806.
- Muanda, N. F., Koné, A., Dicko, D., Soulimani, R., Younos, C., (2009): Phytochemical Composition and Antioxidant Capacity of Three Malian Medicinal Plant Parts. *ECAM*, doi: 10.1093/nep109/ 1 - 8.
- Navon-Venezia, S., Ben-Ami, R., Carmeli, Y., (2005): Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 18: 306 - 313.
- Nguyi, A., (1988): Tannins of some Nigerian flora. *J. Biotechnol.*, 6: 221 - 226.
- Oktay, M., Gülçin, I., Küfrevioğlu, O. I., (2003): Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *LWT.*, 36: 263 - 271.
- Omidbaigi, R., Selidkom, F., Kazemi, F., (2004): Influence of drying methods on essential oil content and composition of *Roman chamomile*. *Fav. Fragr J.*, 19: 196 - 198.
- Omidbaigi, R., Selidkom, F., Kazemi, F., (2003): Chemical composition, physical properties and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods. *Food Chem.*, 83: 85 - 92.
- Oyeleke, S. B., Dauda, B. E. N., Boye, O. A., (2008): Antibacterial activity of *Ficus capensis*. *Afr. J. Biotechnol.*, 7: 1414 - 1417.

François Muanda N, et al., / *Journal of Natural Products*, Vol. 3(2010):147-160

- Pacheco-Sanchez, M., Boutin, Y., Angers, P., Gosselin, A., Tweddell, R. J., (2007): Inhibitory effect of CDP, a polysaccharide extracted from the mushroom *Collybia dryophila*, on nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in macrophages. *Eur. J. Pharmacol.*, 555: 61 – 66.
- Pereira, R. P., Fachineto, R., De Souza Prestes, A., Puntel, R. L., Santos da Silva, G. N., Heinzmann, B. M. et al., (2009): Antioxidant Effects of Different Extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citrates*. *Neurochem. Res.*, 34: 973 - 983.
- Pothitirat, W., Chomnawang, M. T., Supabphol, R., Gritsanapan, W., (2009): Comparison of bioactive compounds content, free radical scavenging and anti-acne inducing bacteria activities of extracts from the *Mangosteen* fruit rind at two stages of maturity. *Fitoterapia*, 80: 442 - 447.
- Rajbhandari, M. and Schöpke T., (1999): Antimicrobial activity of some Nepalese medicinal plants. *Pharmazie*, 54: 232 - 233.
- Sharma, V., Gulati, A., Ravindranath, S. D., Kumar, V., (2005): A simple and convenient method for analysis of tea biochemicals by reverse phase HPLC. *J. Food Compos. Anal.*, 18: 583 - 594.
- Terra, X., Valls, J., Vitrac, X., Merrillon, J.M., Arola, L., Ardevol, A., Blade, C., Fernandez Larrea, J., Pujadas, G., Salvado, J., Slay, M., (2007): Grape-Seed Procyanidins Act as Antiinflammatory Agents in Endotoxin-Stimulated RAW 264.7 Macrophages by Inhibiting NFκB Signaling Pathway. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 4357–4365.
- Villareal-Lozoya, J. E., Lombardini, L., Cisneros-Zevallos, L., (2007): Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. *Food Chem.*, 102: 1241 - 1249.
- Wangensteen, H., Samuelsen, A. B., Malterud, K. E., (2004): Antioxidant activity in extracts from coriander. *Food Chem.*, 88: 293 - 297.

Table-1: Main components (%) of the essential oils of *Ficus capensis* (leaves).

Num.	Rt (min)	Compound	Concentration (%)
1	3.04	3-hexen-1-ol	0.67
2	3.09	2- pentyl- Furan	0.40
3	3.13	Linalool	3.97
4	3.15	pelargonaldehyde	0.27
5	3.17	caprinaldehyde	0.21
6	3.19	2-decenal	0.28
7	3.33	theaspirane	0.41
8	6.95	2-tert- buty-3,4,5,6-tetrahydropyridine	0.34
9	7.07	capric acid	0.18
10	13.40	terpinolene	0.25
11	13.50	geranylacetone	1.20
12	13.94	α - caryophyllene	29.81
13	18.22	β -ionone	0.38
14	20.09	3,7,11-trimethyl-3-hydroxy-6,10-dodecadiene-1-yl acetate	1.53
15.	20.26	caryophyllene oxide	25.70
16	20.88	3-tetradecanone	2.90
17	20.96	2-methyl-3-hexyne,	0.69
18	21.70	3,3- dimetyl - heptane	0.23
19	21.84	myristaldehyde	0.46
20	22.07	myristic acid	0.16
21	22.08	5,10-pentadecadien-1-ol,(z,z)-	0.17
22	23.43	hexahydrofarnesyl acetone	5.21
23	24.07	scytalone	0.69
24	29.08	1-hexyl-2-nitrocyclohexane	0.65
25	27.93	carvacrol	65.78
26	50.96	cetylic acid (Palmitic Acid)	0.19
27	51.07	2-methyloxazoline	0.19
28	51.15	isopropenyl methyl ketone	0.22
29	51.49	2-methyl-4-oxo-2 pentenoic acid	0.26
30	51.68	3-butenyl propyl Ether	0.27
31	51.81	heptacosane	0.20

Table-2: *Ficus capensis* leaves phenolic compounds composition.

Extract mg/gm dw	TPC (GAE)	TFC (CE)	TAC (CgE)	CT (CE)
MWE (50/50 v/v)	16.47	6.92	9.52	4.21

Table- 3: MWE and WE compounds identify in *F.capensis* leaves and their concentrations by HPLC.

Name of compound	Rt (min)	MWE (mg/ml)	WE (mg/ml)
gallic acid	11.98 ± 0.22	0.28 ± 0.05	n.d
protocatechuic acid	14.78 ± 0.92	0.37 ± 0.06	0.45 ± 0.01
catechin	23.96 ± 0.23	0.63 ± 0.02	0.19 ± 0.01
caffeic acid	28.92 ± 0.29	0.82 ± 0.09	n.d
epicatechin	31.45 ± 0.55	0.24 ± 0.03	0.28 ± 0.02
p-coumaric acid	33.25 ± 0.36	0.85 ± 0.11	1.21 ± 0.04
rutin	37.02 ± 0.36	1.68 ± 0.13	0.17 ± 0.02
quercetin glucosyl	37.71 ± 0.18	0.98 ± 0.08	0.29 ± 0.03
quercetin dihydrat	39.47 ± 0.19	n.d	0.25 ± 0.02
cinnamic acid	41.68 ± 0.65	0.83 ± 0.06	0.20 ± 0.01
quercetin	42.43 ± 0.30	0.19 ± 0.04	0.46 ± 0.02

- WE: water extract; MWE: Methanol water extract; Rt: retention time in minute, nd: not detected,
- values are mean ± SD of three determinations.

Table-4: AOA of *F. capensis* leaves extract.

Extracts	ABTS		DPPH	
	mg VCE/gm dw	mg VCE/gm dw	% IP	Ic ₅₀ (µg/ ml)
E.O	0.14 ± 0.03	0.09 ± 0.01	56.83	23.34 ± 0.07
MWE	1.37 ± 0.22	0.98 ± 0.02	83.32	10.25 ± 0.03
WE	0.60 ± 0.05	0.43 ± 0.01	71.89	13.07 ± 0.02

- Values are mean ± SD of three determinations.

Table-5: Antibacterial activity of leaf and stem bark extracts of *Ficus capensis*.

Leaf extracts	Organisms (zones of inhibition in mm)					
	E.c.	C.a.	A.n.	P.a.	B.s.	S.a.
MWE	21	10	24.3	n.a	16	10.0
WE	8	n.a	n.a	n.a	11.0	n.a
Wdd(-)	0	0	0	0	0	0
MW(-)	0	0	0	0	0	0
Ap.(+)	58 ± 3	n.a	n.a	45 ± 3	55 ± 3	56 ± 3
Gt.(+)	55 ± 2	n.a	n.a	45 ± 2	45 ± 2	44 ± 2
Ny(+)	n.a	53 ± 1	47 ± 1	48 ± 1	47 ± 1	47 ± 1

- Values are mean ± SD of three determinations
- S.a.: *Staphylococcus aureus*; B.s.: *Bacillus subtilis*; E.c.: *Escherichia coli*; P.a.: *Pseudomonas aeruginosa*; A.n.: *Aspergillus niger*; C.a.: *Candida albicans*; WE: water extract; MWE: methanol-water extract; W(-): didistillate water negative control, MW (-): methanol - water (50/50 v/v) negative control ; Ap(+): Ampicillin positif control; Gt(+): gentamicin positif control; Ny (+): Nystatin positif control; Na: not actif.

Table 6: Minimal inhibitory concentrations of E.O, MWE and WE.

Samples extract	MIC (µg/ ml)					
	E.c.	C.a.	A.n.	P.a.	B.s.	S.a.
E.O	> 1500	NI	NI	NI	> 1500	> 1500
MWE	> 500	>1000	>1000	NI	> 500	> 500
WE	> 1000	NI	NI	NI	> 1000	NI

- NI: not inhibited; values are mean ± SD of three determinations

François Muanda N, et al., *J Journal of Natural Products*, Vol. 3(2010):147-160

Figure Captions

Figure-1a: chromatogram *Ficus capensis* leaves extract (MWE) 280 nm.

1: gallic acid, 2: protocatechuic acid, 3: catechin, 4: caffeic acid, 5: epicatechin, 6: *p*-coumaric acid, 7: rutin, 10: cinnamic acid, 11: quercetin

Figure-1b: chromatogram *Ficus capensis* leaves extract (MWE) 320 nm.

1: gallic acid, 2: protocatechuic acid, 4: caffeic acid, 5: epicatechin,
6: *p*-coumaric acid, 8: quercetin glucosyl, 10: cinnamic acid, 11: quercetin

Figure-2a: chromatogram WE *F. capensis* leaves analysis (280nm).

5: epicatechin, 6: *p* - coumaric acid, 8: quercetin glucosyl, 9: quercetin dihydrat, 10: cinnamic acid, 11: quercetin

Figure-2b: WE chromatogram *F. capensis* (320 nm).

2: protocatechiuc acid, 3: catechin, 5: epicatechin, 6: *p*-coumaric acid, 7: rutin, 8: quercetin glucosyl, 9: quercetin dihydrat, 10: cinnamic acid

Figure-3: Relationship between inhibition percentage of NO₂⁻ and the concentration (volume) of [NO₂].

IP: % Inhibition

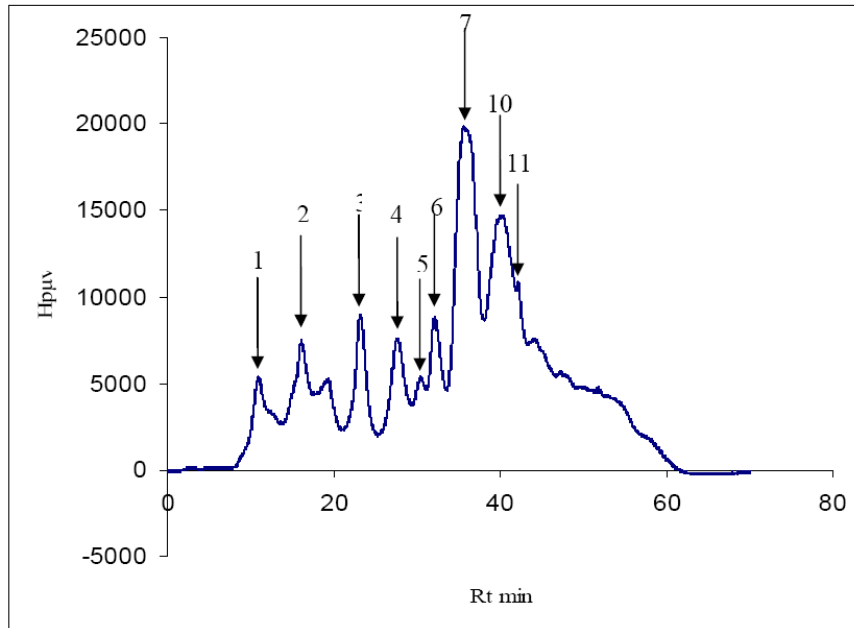


Figure-1a: chromatogram *Ficus capensis* leaves extract (MWE) 280 nm.
1: gallic acid, 2: protocatechuic acid, 3: catechin, 4: caffeic acid, 5: epicatechin, 6: *p*-coumaric acid, 7: rutin, 10: cinnamic acid, 11: quercetin

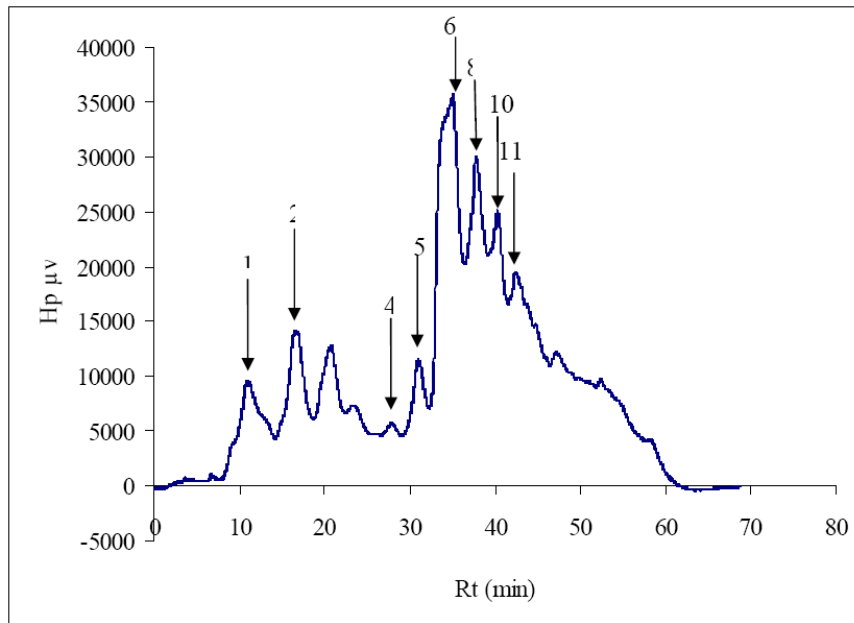


Figure-1b: chromatogram *Ficus capensis* leaves extract (MWE) 320 nm.
1: gallic acid, 2: protocatechuic acid, 4: caffeic acid, 5: epicatechin, 6: *p*-coumaric acid, 8: quercetin glucosyl, 10: cinnamic acid, 11: quercetin

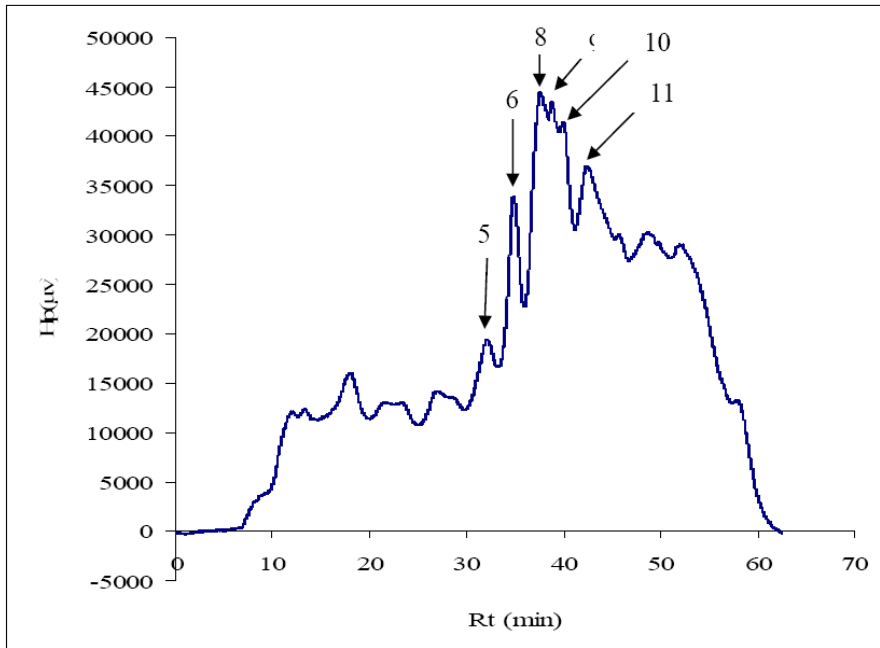


Figure-2a: chromatogram WE *F. capensis* leaves analysis (280nm).

5: epicatechin, 6: p - coumaric acid, 8: quercetin glucosyl, 9: quercetin dihydrat, 10: cinnamic acid, 11: quercetin

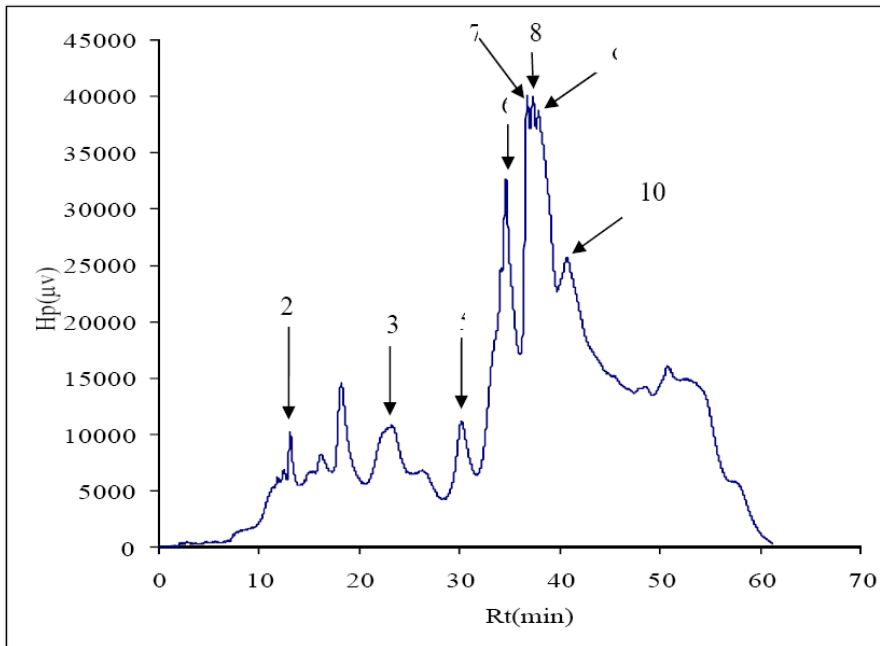


Figure-2b: WE chromatogram *F. capensis* (320 nm).

2: protocatechiuc acid, 3: catechin, 5: epicatechin, 6: p-coumaric acid, 7: rutin, 8: quercetin glucosyl, 9: quercetin dihydrat, 10: cinnamic acid

François Muanda N, et al., / *Journal of Natural Products*, Vol. 3(2010):147-160

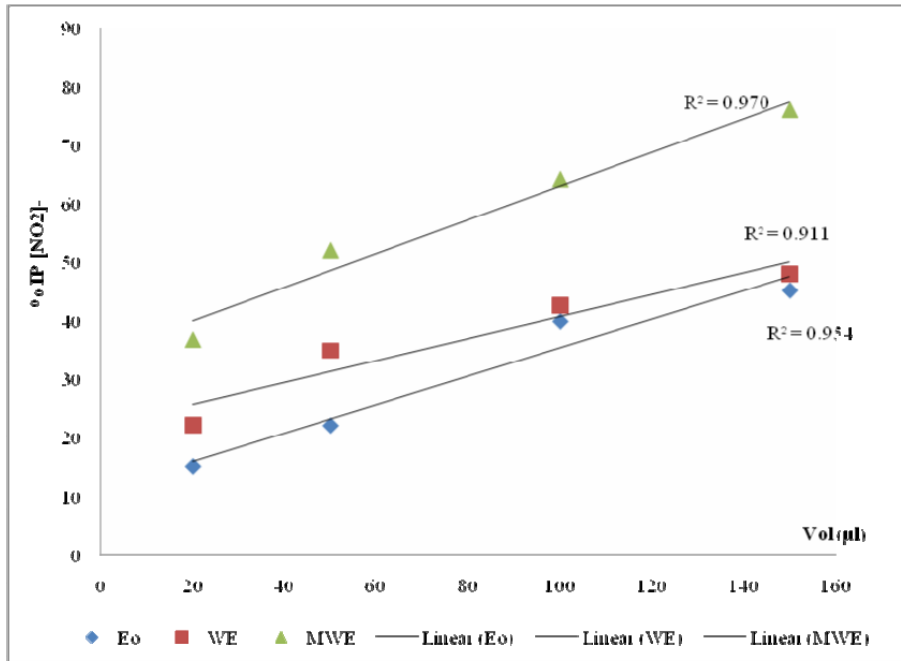


Figure-3: Relationship between inhibition percentage of NO₂⁻ and the concentration (volume) of [NO₂⁻].
IP: % Inhibition



Plant biology and pathology/Biologie et pathologie végétales

Assessment of polyphenolic compounds, in vitro antioxidant and anti-inflammation properties of *Securidaca longepedunculata* root barks

François Nsemi Muanda^{a,*}, Amadou Dicko^a, Rachid Soulimani^b^a Chemistry Laboratory and methodology for Environment, Paul-Verlaine University, 1, boulevard Arago, 57078 Metz, France^b Neurotoxicology Alimentary and Bioactivity Laboratory, University Paul-Verlaine, BP 4102, 57040 Metz, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 April 2010

Accepted after revision 6 July 2010

Keywords:

Polyphenolic compounds

Flavonoids

Free radicals

RP-HPLC

Medicinal plants

Antioxidant activity

ABSTRACT

The present study was carried out to evaluate the antioxidant activities of the root bark extract of *Securidaca longepedunculata*. This plant material is commonly used in folk medicine in several parts in the world. The bark extracts of *S. longepedunculata* were evaluated for their total phenols, flavonoids, anthocyanins, tannins content and total antioxidant capacity. The compounds were identified and quantified both by RP-HPLC and UV spectrophotometer; the antioxidant capacity was assessed by ABTS and DPPH tests and expressed as IC₅₀. The total phenolic compounds determinate was 9.86 mg gallic acid equivalents/g dw, the total flavonoid contents was 5.85 mg catechin equivalents/g dw, the total anthocyanin contents was 0.032 mg cyanidin-3-glycosyl equivalents/g dw and the condensed tannins content were 1.03 mg catechin equivalents/g dw. The major compound identified using RP-HPLC was quercetin (0.98 mg/ml). The IC₅₀ value reached 5.5 µg/ml, revealing that the root barks of *S. longepedunculata* have a very high antioxidant and anti-inflammation properties.

© 2010 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Around the world, people having difficulties accessing modern medicine use traditional medicine as an alternative to conventional treatments. The medicinal value of these plants lies in some chemical substances that produce a definite physiological action on the human body. Numerous investigations prove that among the secondary metabolites of medicinal plants, polyphenolic compounds exhibiting pharmacological properties take more and more importance. Several classes of phenolic compounds exist, including phenols, phenolic acids, phenyl propanols, flavonoids, minor flavonoids, tannins and quinines [1]. Recent studies reveal that they act as anti-allergenic, antimicrobial, anti-inflammatory, vasoprotector and anti-tumour agents. Some of the potential health benefits of

these polyphenolic substances have been attributed to their antioxidant capacity due to their free radical scavenger properties [2,3].

Much research takes a great interest in medical plants for their phenolic compounds concentrations and related total antioxidant potential [4–9]. The rich identifying of phytochemicals with the capacity to interfere carcinogenesis has received considerable attention. Oxidation and inflammation are well recognized to be closely linked. Therefore, the determination of antioxidation functions has been proposed as a good indicator for screening or evaluating plants for medical properties [10].

In this spirit, the present study was carried out to characterize the root barks of *Securidaca longepedunculata* with regard to their phenolic contents, anti-inflammation and antioxidant properties. *S. longepedunculata* is widely used for several diseases, in America (Venezuela) traditional medicine use *S. longepedunculata* dried barks for the treatment of epilepsy [11]. In Africa (Ghana, Nigeria) the plant decoction is prescribed by Ghanaian healers to treat

* Corresponding author.

E-mail address: franckmuanda@gmail.com (F.N. Muanda).

asthma and other diseases associated with smooth muscle contraction [12] and as antinociceptive and antidepressant [13].

Moreover, the traditional use of *S. longepedunculata* root bark against the hepatic infection has been reported and their anti-allergenic effects were verified in vivo [14,15].

To our knowledge, few investigations have been made about the antioxidant properties of *S. longepedunculata* root bark, although that this medicinal plant is widely used by African traditional healers. So, the aims of this study were: (a) to determine the total phenolic, the total flavonoid, the total anthocyanin, and the condensed tannin contents, (b) to identify and quantify some of them by RP-HPLC methods; and (c) to evaluate the antioxidant, anti-inflammation properties of the extracts of the *S. longepedunculata* root bark using an UV-spectrophotometer. It was hoped to confirm and justify the use of this plant material in folk medicine.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

All the chemicals used were analytical grade. 1,1-Diphenyl-2-picryl hydrazyl radical (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) (ABTS), 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH), gallic acid, folin-Ciocalteu's phenol reagent, aluminium chloride, catechin, *p*-coumaric acid, rutin, procatechiuc acid, vitamin C, caffeic acid, isovitexin, vitexin, chlorogenic acid, catechin, quercetin, quercetin dihydrat, quercetin-3- β -*D*-glucosyl, epicatechin, Kuromanin chloride, cyaniding chloride were purchased from Across organics (Geel, Belgium). Sodium carbonate, sodium nitrite, chlorhydric acid, ethyl acetate sodium, sodium sulphate anhydrous, ammonium phosphate, acetonitrile, methanol, interferon-gamma (IFN- γ), polysaccharide of salmonella typhimurium (LPS), sulfanilamide, NEDA (N-(1-naphtyl) ethylene-diamine dihydroxy chloride), vanillin reagent, n-hexane were obtained from Sigma and Roth (Strasbourg, France).

2.2. Procurement and preparation of plant materials

Dried *S. longepedunculata* root bark (Polygalaceae) was obtained from Nigeria, and the botanical identification was carried out by Professor Max Henry, from the Botanic and Mycology Laboratory, Nancy University, France. A Voucher specimen has been kept in our Laboratory for future reference. All plant materials were dried at room temperature and powered and sifted in a sieve (0.750 μ m).

2.3. Sample extractions

2.3.1. Total phenolic compounds (TPC), total flavonoid compounds (TFC), and total anthocyanin compounds (TAC)

Total phenolic compounds (TPC), total flavonoid compounds (TFC), and total anthocyanin compounds (TAC) were extracted from the powders as described by a previously reported method [6]. Two grams of powdered sample were extracted twice with 10 ml of cold aqueous methanol solution (50%). The two volumes were combined,

made up to 40 ml, centrifuged at 1532 \times g for 20 minutes and transferred in small sample bottles and stored at +4 °C in the dark until analysis. The analysis was carried out with a UV-Vis spectrophotometer (Varian Cary 50 scan).

2.3.2. Preparation of condensed tannins extracts (CT)

Samples for the CT were extracted from the powders as described by a previously reported method slightly modified [16]. One gram of powder was extracted twice with 20 ml of n-hexane during 20 minutes, filtered and the remaining powder was dried at 35 °C under vacuum for 2 h. The powder was stored at +4 °C until analyzes. A UV-vis spectrophotometer Varian Cary 50 Scan was used for the analyzes.

2.3.3. Extraction of polyphenol compounds for RP-HPLC analysis

Polyphenols were extracted according to the method described by a previously reported method slightly modified [17]. A fresh sample (0.4 g) was extracted with 2 \times 5 ml of aqueous methanol (20/80) with intermittent shaking (2 minutes) on vortex mixer for 30 minutes. The sample was centrifuged at 1532 \times g for 20 minutes at 20 °C. The supernatant was taken into a 10 ml volumetric flask. The extract is stable for 24 h if stored at 4 °C. The extracts were filtered through a 0.45 μ m (PTFE) filter before the injection was made. The analyzes were carried out on a RP-HPLC with a Waters 600E pump coupled to a Waters 486 UV visible tunable detector and equipped with a 20 μ l injection loop and an Alltech Intertsil ODS column (RP C18 column size 4.6 mm \times 150 mm; particle size, 5 μ m).

2.4. Determination of total phenolic compounds (TPC)

The Folin-Ciocalteu method [4] was used to measure the total phenolic compounds. To a sample (100 μ l), distilled water was added to make 2 ml (Eppendorff tube), followed by 1 ml of Folin Ciocalteu reagent 1N and sodium carbonate (20%). After 40 minutes at room temperature, absorbance at 725 nm was read on a spectrophotometer against a blank that contained methanol instead to sample. The results were compared to a gallic acid calibration curve, and the total phenolic compounds were determined as mg gallic acid equivalents (GAE mg/g dry weight (dw)). Determination of each sample was performed in triplicate.

2.5. Determination of total flavonoid compounds (TFC)

The flavonoid contents were measured according to a colorimetric assay [18]. A 250 μ L of standard solution of catechin at different concentrations or appropriately diluted samples was added to 10 ml volumetric flask containing 1 ml of distillate water. At zero time, 75 μ l of NaNO₂ (5%) was added to the flask. After 5 minutes, 75 μ l of AlCl₃ (10%) was added. At 6 minutes, 500 μ l of NaOH (1N) was added to mixture. Immediately, the solution was diluted by adding 2.5 ml of distillate water and mixed thoroughly.

Absorbance of the mixture, pink in colour, was determined at 510 nm versus the prepared blank. Total flavonoid compounds in medicinal plant were expressed as

mg catechin equivalents (CE mg/g dw). Samples were analyzed in three replications.

2.6. Evaluation of total anthocyanin compounds (TAC)

The total anthocyanin compound of the samples was estimated using a UV-spectrophotometer by the pH-differential method [6,19]. Two buffer systems, potassium chloride buffer, pH 1.0 (0.0025 M) and sodium acetate buffer, pH 4.5 (0.4 M) were used. Briefly, 400 μ l of extract was mixed in 3.6 ml of corresponding buffer solutions and read against a blank at 510 and 700 nm. Absorbance (ΔA) was calculated as: $\Delta A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH 1.0}} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH 4.0}}$ monomeric anthocyanin pigment concentration in the extract was calculated and expressed as equivalent cyaniding-3-glucoside (mg/l): $\Delta A \times MW \times Df \times 1000 / (Ma)$ with ΔA : difference of absorbance, Mw: molecular weight for cyaniding-3-glucoside (449.2); Df: the dilution factor of the samples, and Ma: molar absorptivity of cyaniding-3-glucoside (26,900). Results were expressed as mg of cyaniding-3-glucoside equivalents in 100 g of dried sample.

2.7. Determination of condensed tannins (CT)

The condensed tannins content was estimate using a previously reported method [16] with some modifications. Briefly, an aliquot of 0.5 g of powder obtained after lixiviation (n-hexane) was placed in a centrifuge tube and 15 ml of 1% HCl in methanol was added to each sample. Each tube was vortexed and placed in a water bath at 35 °C with constant shaking for 20 minutes and vortexing every 5 minutes.

After incubation, the tubes were centrifuged (1532 \times g) and the supernatants were extracted. Aliquots of the supernatants (100 μ l) were placed in two separate assay tubes, one for the sample determination and the other for blank determination.

Samples and blanks were incubated for exactly 20 minutes after adding 5 ml of vanillin reagent (0.5 g of reagent and 200 ml of 4% HCl methanol) to samples and 4% HCl in methanol to the blanks. After 20 minutes, absorbance was read at 500 nm from each sample and blank using UV-spectrophotometer Varian Cary 50.

Samples absorbance was rectified with the blank standard and compared against a standard curve made with catechin. Results were expressed as mg catechin equivalent/g (mg CE/g) of lixiviating sample. The samples were analyzed at least for three replications.

2.8. RP-HPLC analysis

The RP-HPLC analyzes were performed according to the modified method described by a previously reported method [20], using an elution gradient of three mobile phases; solvent A: 50 mM ammonium phosphate ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) pH 2.6 (adjusted with phosphoric acid), solvent B: (80:20 (v/v)) acetonitrile/solvent A, and solvent C: 200 mM of phosphoric acid pH 1.5 (pH adjusted with ammonium hydroxide). The gradient profile was linearly changed as follows (total 60 minutes): 100% solvent A at

zero minutes, 92% A/ 8% B at 4 minutes, 14% B/ 86% C at 10 minutes, 16% B/ 84% C at 22.5 minutes, 25% B/ 75% C at 27.5 minutes, 80% B/ 20% C at 50 minutes, 100% solvent A at 55 minutes, 100% A at 60 minutes. The flow rate was set at 1 ml/minute at room temperature. Before the injection, the samples were filtered through a 0.45 μ m PTFE syringe tip filter. Detection was done at 280 and 320 nm. Polyphenolic external standards were prepared by dissolving 2 mg/ml.

In each sample, a polyphenolic compound was identified by matching its retention time to the corresponding external standard and the concentration of the polyphenolic compound was calculated by comparing their peak areas. The samples were analyzed at least three replications.

2.9. Antioxidant activities

Two tests have been used to determine the total antioxidant capacity, the DPPH and the ABTS tests.

2.9.1. DPPH radical scavenging test

The DPPH radical scavenging activity was evaluated according to the method slightly modified described by others [21,22]. 1 ml of 100 μ M DPPH solution in methanol was mixed with 1 ml of plant extract. The reaction mixture was incubated in the dark for 20 minutes, and the optical density was recorded at 517 nm against the blank. For the control, 1 ml of DPPH solution in methanol was mixed with 1 ml of methanol and optical density of solution was recorded after 20 minutes.

The decrease in optical density of DPPH in samples with regard to control system was used to calculate the antioxidant activity as a percentage inhibition (%PI) of DPPH radical, $\%IP = [(A_{t_0} - A_{t_{20}}) / (A_{t_0})] \times 100$ where A_{t_0} : absorbance of the test sample after zero minutes and $A_{t_{20}}$: absorbance of control after 20 minutes. Each assay was carried out in triplicate.

From a plot of concentration against %IP, a linear regression analysis was performed to determine the IC_{50} value for each extract. The DPPH radical scavenging activity of phenolic compounds was expressed as IC_{50} value in μ g/ml of dry weight. A low IC_{50} value represents a high antioxidant activity.

To 2.90 ml of an aqueous methanol solution (50%) of 100 μ M of DPPH, 100 μ l of the plant extract solution was added. The mixture was incubated in a 20 °C water bath under restricted light for 40 min. A control (100 μ l of 50% methanol and 2.90 ml of DPPH solution) was run with each series of samples. The reduction of absorbance at 517 nm was measured 40 min later. The radical solution was prepared daily. The DPPH radical scavenging activity of phenolic compounds was expressed as mg/g dw of Vitamin C Equivalents (VCE) in 40 minutes.

2.9.2. ABTS radical scavenging test

The method developed by a previous one [23] (slightly modified) had been used in this experiment. 1.0 mM of AAPH solution was mixed with 2.5 mM ABTS as diammonium salt in phosphate buffered saline (PBS) solution 100 mM potassium phosphate buffered (pH 7.4) containing 150 mM NaCl. The mixture was heated in a water bath at 68 °C for 20 minutes. The concentration of the resulting

blue-green ABTS^{•+} (radical cation solution) was adjusted to an absorbance of 0.65 ± 0.02 at 734 nm. The sample solution of 60 μ l was added to 2.94 ml of the resulting blue-green ABTS radical solution.

The mixture, protected from light, was incubated in a water bath at 37 °C for 20 minutes. A control solution (60 μ l of methanol and 2.94 ml of ABTS^{•+}) was monitored with each series of samples. Then the decrease of absorbance at 734 nm was measured. The stable ABTS radical scavenging activity of the phenolic compounds in the extract was expressed as mg/g dry plants part powders of Vitamin C Equivalents (VCE) in 20 minutes. All radical stock solutions were prepared fresh daily.

2.10. Anti-inflammatory activity by nitrite assay

The test used to assess the potential anti-inflammatory activity of molecules consisted of evaluating their capacity to inhibit NO production in activated macrophages [24]. Released nitrite (NO_2^-) in the culture medium was measured as an indicator of NO production according to the colorimetric test based on the Griess reaction. Briefly, 1 mL of plant extract was mixed with 1 mL of Griess reagent at room temperature for 30 minutes. The nitrite concentration was determined by measuring the absorbance at 548 nm using a standard curve of NaNO_2 .

The results were expressed as percentage of NO production compared to the control as follows:

$$\% \text{Inhibition} = 100 \times \frac{[\text{NO}_2^-]_{\text{control}} - [\text{NO}_2^-]_{\text{Ex.}}}{[\text{NO}_2^-]_{\text{control}}}$$

where $[\text{NO}_2^-]_{\text{control}}$ is the concentration of nitrite released without addition of the extract, and $[\text{NO}_2^-]_{\text{Ex.}}$ the concentration of nitrite released by the cells in presence of the plant extract.

2.11. Statistical analysis

Results are presented as mean \pm standard Error; statistical analysis of experimental result was based on analysis of variance. Correlation analyzes of antioxidant activity versus the total polyphenolic contents were carried out using the Statview[®] 4.5 statistical package (Abacus Concepts, Inc). Significant difference was statistically considered at the level of $P < 0.001$.

3. Results and discussion

3.1. Total phenolic contents

The root of *S. longependunculata* is mainly composed of polyphenolic (9.86 mg GAE/g dw) and flavonoid compounds (5.85 mg CE/g dw). The amount of total tannin and total anthocyanin compounds are weak 1.03 mg CE/g dw and 0.032 mg CgE/g dw, respectively (Fig. 1).

3.2. HPLC analysis

The RP-HPLC analysis of the extracts were conducted in two solvents: water (WE: water extract) and methanol-

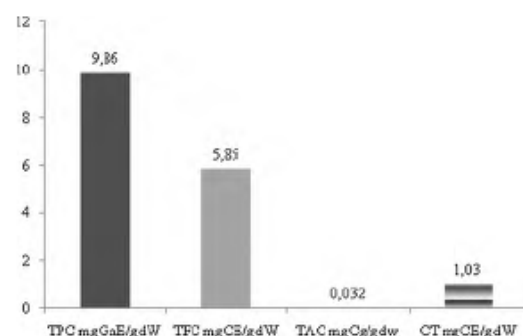


Fig. 1. Phenolic compounds of the root barks of *S. longependunculata*. Gallic acid equivalent (GAE); Catechin equivalent (CE); Total phenolic compounds (TPC); Total flavonoid compounds (TFC); Total anthocyanin compounds (TAC); Condensed tannins (CT).

water (MWE: methanol-water extract). Figs. 2 and 3 show the profiles of the injection of the extracts detected at 280 and 320 nm. In Table 1, the retention time of external standards were reported and their corresponding concentration in the extracts were expressed in mg/ml.

Quantitative and qualitative analysis show that water is not the best extract solvent for phenolic compounds, that is in concordance with previously studies, which report that an aqueous alcohol solvent is the best one to extract phenolic compounds from plant materials [20,22]. The most important compound identified in WE was quercetin (0.61 mg/ml) and the less one was gallic acid (0.03 mg/ml). In the MWE, quercetin (0.98 mg/ml) and apigenin (0.68 mg/ml) were the major compounds identified. Gallic acid (0.02 mg/ml) followed by acid p-coumaric acid (0.05 mg/ml) and quercetin glucosyl (0.05 mg/ml) were minor. The samples were analyzed at least four replications.

3.3. Antioxidants activities

ABTS and DPPH tests revealed that *S. longependunculata* root barks had good scavenging antioxidant activities. Little variation had been observed ABTS test value express as mg VCE/g dw is 1.351 and DPPH value is 9.48 mg VCE/g dw. To compare the antioxidant capacity of *S. longependunculata* root barks extract with others plants previously described in the literature, this value was reported as IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) (Table 2).

These results show that the *S. longependunculata* root barks extract present a good antioxidant capacity.

Because its IC_{50} value ($\text{IC}_{50} = 5.5 \mu\text{g/ml}$) is greater than those of some others plant extracts, well known for their antioxidant properties such as *Litchi* seeds ($\text{IC}_{50} = 4.8 \mu\text{g/ml}$), *Anogeissus dhofarica* A.J. Scott ($\text{IC}_{50} = 4.5 \mu\text{g/ml}$), *Alliophylus rubifolius* Hoschst ex A. Rich Engl. ($\text{IC}_{50} = 7.1 \mu\text{g/ml}$), orange juice and orange wine ($\text{IC}_{50} = 0.31$ & 0.46 mg/ml) [22,25,26].

3.4. Relation between phenolic compounds and antioxidant capacity

In Fig. 4, we found that phenolic compounds were major contributors to antioxidant activity, because

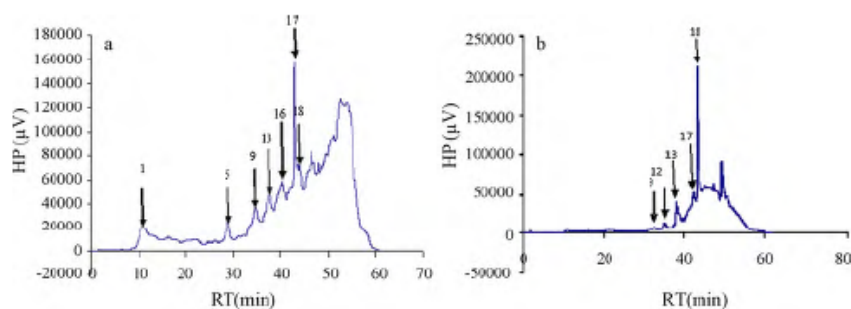


Fig. 2. a: Chromatogram of the *S. longepedunculata* root bark extract (WE) (280 nm). 1: gallic acid; 5: caffeic acid; 9: *p*-coumaric acid; 13: quercetin glucosyl; 16: cinnamic acid; 17: quercetin; 18: apigenin. b: Chromatogram of the *S. longepedunculata* root bark extract (WE) (320 nm). 9: *p*-coumaric acid; 12: rutin; 13: quercetin glucosyl; 16: cinnamic acid; 18: apigenin.

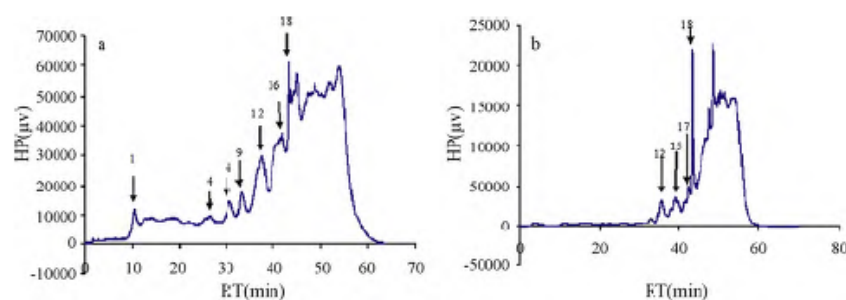


Fig. 3. (a) Chromatogram of the *S. longepedunculata* root bark extract (MWE) (280 nm). 1: gallic acid; 4: chlorogenic acid; 6: epicatechin; 9: *p*-coumaric acid; 12: rutin; 16: cinnamic acid; 18: apigenin. (b) Chromatogram of the *S. longepedunculata* root bark extract (MWE) (280 nm). 12: rutin; 15: quercetin dihydrat; 17: quercetin; 18: apigenin.

Table 1

Compounds of *S. longepedunculata* root bark and their concentrations in WE and MWE (280 & 320 nm).

Compound numbers	Name of compounds	Rt (min)	WE (mg/ml)	MWE (mg/ml)
1	Gallic acid	11.98 ± 0.22	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01
3	Chlorogenic acid	26.51 ± 0.48	nd	0.04 ± 0.01
5	Caffeic acid	28.92 ± 0.29	0.05 ± 0.02	nd
6	Epicatechin	31.45 ± 0.55	nd	0.06 ± 0.01
9	<i>p</i> -coumaric acid	33.25 ± 0.36	0.15 ± 0.03	0.05 ± 0.02
12	Rutin	37.02 ± 0.36	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.03
13	Quercetin glucosyl	37.71 ± 0.18	0.17 ± 0.05	nd
15	Quercetin dihydrat	39.35 ± 0.58	nd	0.05 ± 0.01
16	Cinnamic acid	41.68 ± 0.65	0.06 ± 0.01	0.21 ± 0.07
17	Quercetin	42.43 ± 0.30	0.61 ± 0.05	0.68 ± 0.01
18	Apigenin	43.80 ± 0.29	0.23 ± 0.02	0.98 ± 0.06

MWE: methanol water extract; WE: water extract; nd: not determinate; Rt: retention time.

antioxidant activity and phenolics TPC, TFC and TAC showed a good correlation with coefficient correlations of $R^2 = 0.92$, $R^2 = 0.94$ and $R^2 = 0.87$, respectively. However, antioxidant capacity and condensed tannin showed a very weak relationship with a correlation coefficient of $R^2 = 0.04$. Although the majority antioxidant capacity of plants is not only represented by phenolics, flavonoids, anthocyanins or tannins which have a strong antioxidant potential, but is also due to other compounds such as vitamin [22].

3.5. Anti-inflammatory properties of phenolic compounds

The anti-inflammatory activity of MWE was studied *in vitro* for their inhibitory effects on chemical mediators release (LPS/ IFN γ -induced NO production) from macrophages. Activated macrophages produce large amounts of chemical mediators that indicate inflammation.

NO, a bioactive free radical, is one of these critical mediators which is produced by inducible NO synthase (iNOS) in inflammatory macrophages when stimulated

Table 2
Antioxidant activity in vitro analysis.

Sample	ABTS test	DPPH test
<i>S. longependunculata</i> root barks extract	VCE mg/ g dw 11.53 ± 0.22	mg VCE/g dw 7.47 ± 0.10
	IC ₅₀ (µg/ml)	5.50 ± 0.25

IC₅₀: concentration of a polyphenolic in mg/ml required to quench the free radicals by 50%; dw: dry weight; Vitamin C equivalent: VCE.

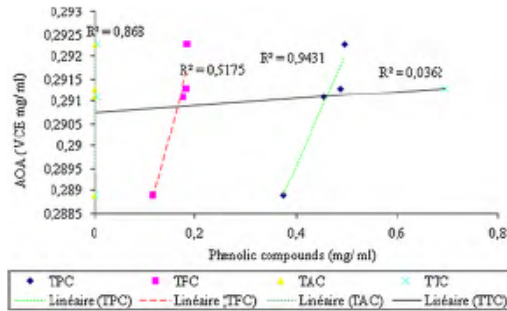


Fig. 4. Relationship between phenolic compounds and antioxidant activities. Antioxidant activities (AOA); Gallic acid equivalent (GAE); Catechin equivalent (CE); Total phenolic compounds (TPC); Total flavanoid compounds (TFC); Total anthocyanin compounds (TAC); Condensed tannins (CT).

with LPS/IFN γ mixture [24]. Excessive production of NO is indicated both in chronic and acute inflammation [27].

In fact, NO production induced by LPS/IFN γ through iNOS induction may reflect the degree of inflammation and may provide a measure for assessing the effect of the extract/fractions on the inflammatory process.

As shown in Fig. 5, the addition of MWE at different concentrations (20, 50, 100 and 150 μ l) significantly reduced NO production, resulting in 18.08, 25.65, 45.67 and 51.35% inhibition of NO production in macrophages stimulated with LPS/IFN γ , respectively. These results show a significantly reduced NO production in a dose-dependent manner. Similarly to our results, it has been demonstrated in several studies that extract rich in flavonoids and proanthocyanidins inhibited NO production in RAW 264.7 macrophages [28–30]. These results seem to indicate that phenolic compounds present in the extracts are responsible for the anti-inflammatory activity.

The anti-inflammatory activity correlates positively with the radical-scavenging activity and the highest

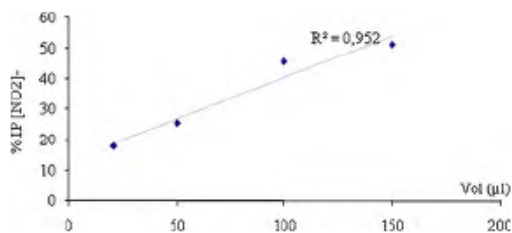


Fig. 5. Relationship between inhibition percentage of NO $_2^-$ and the concentration (volume) of [NO $_2^-$].

antioxidant activity was correlated with the highest total phenol content and/or the highest anti-inflammatory activity of the tested extract/fraction. These results are consistent with those of Ojewole [15] and Akinmoladun et al. [31].

In this study, for the first time, phenolic contents and antioxidant activity of the root barks of *S. longependunculata* have been examined. The results indicated that from all phenolic compounds identified in the root barks extracts of *S. longependunculata*, quercetin was the most abundant phenolic compound. The root barks extracts scavenge for the super oxide radicals and anti-inflammation properties in vitro.

Our results show an IP superior to 80%. In conclusion, we can say that our results further support the view that *S. longependunculata* root barks are promising sources of natural antioxidants and can be seen as potential sources of useful drugs.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Ministry of Scientific Research of Republic Democratic of Congo (No. 132.49/060/KM/07). Mr. Frederic Desort (Neurotoxicology Alimentary and Bioactivity Laboratory). University P. Verlaine-Metz, BP 4102, 57040, Metz (France) is also acknowledged for technical assistance.

References

- [1] J.B. Harbone. Phytochemical methods, a guide to modern techniques of plant analysis. Third ed., Chapman and Hall, London, 1998, pp. 4–55, 150–160, 235–236.
- [2] S.C. Gordona, M.D. Sonja, M.C. Jasna, T.T. Vesna. Antioxidant proprieties of marigold extracts, Food Res. Int. 37 (2004) 643–650.
- [3] K. Chitindingu, A.R. Ndhlala, C. Chapano, M.A. Benhura, M. Muchuweti. Phenolic compound content, profiles and antioxidant activities of *Amaranthus hybridus* (Pigweed, Brachiaria Brizantha) (Upright Brachiaria) and *Panicum maximum* (Guinea grass), J. Food Biochem. 31 (2006) 206–216.
- [4] B. Dzingira, M. Muchuweti, T. Murenje, C. Chidewe, M.A.N. Benhura, I.S. Chagonda. Phenolic content and phospholipids peroxidation inhibition by methanolic extracts of two medicinal plants: *Blonurus muticus* and *Hypoxis hemerocallidea*, Afr. J. Biochem. Res. 1 (2007) 137–141.
- [5] C. Mariani, A. Bracca, S. Vitalini, N. De Tommasi, F. Visioli, G. Fico. Flavonoid characterization and in vitro antioxidant activity of *Aconitum anthora* (Ranunculaceae), Phytochemistry 69 (2008) 1220–1226.
- [6] M.F. Abu Bakar, M. Mohamed, A. Rahmat, J. Fry. Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (*Mangifera pajang*) and tarap (*Artocarpus odoratissimus*), Food Chem. 113 (2009) 479–483.
- [7] P. Nuntanakorn, B. Jiang, H. Yang, M. Cervantes-Cervantes, F. Kronenberg, E.J. Kennelly. Analysis of polyphenolic compounds and radical scavenging activity of Four American Actaea species, Phytochem. Anal. 18 (2007) 219–228.
- [8] F. Shariffar, G. Dehghn-Nudeh, M. Mirtajaldini. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L, Food Chem. 112 (2009) 885–888.
- [9] E. Pastor-Cavada, R. Juan, J.E. Pastor, M. Alaiz, J. Vioque. Antioxidant activity of seed polyphenols in fifteen wild Lathyrus species from south Spain, LWT Food Sci. Technol. 42 (2009) 705–709.
- [10] T. Tzungu-Hsu, T. Po-Jan, H. Su-Chen. Antioxidant and anti-inflammatory activities of several commonly used spices, J. FoodSci. 70 (2005), C 93–C97.
- [11] O. Heard, Contribution of the study of *Desmodium adscendens*: chemistry & pharmacology [Dissertation], Ph.D., thesis, University of Tours, France, 1994.
- [12] N.C. Rakuambo, J.J.M. Meyer, A. Hussein, C. Huyser, S.P. Mdlalose, T.G. Raidani. In vitro effect of medicinal plants used to treat erectile

- dysfunction on smooth muscle relaxation and human sperm, *J. Ethnopharmacol.* 105 (2006) 84–88.
- [13] R.A. Adebiyi, A.T. Elsa, B.M. Agala, E.U. Etuk, Antinociceptive and antidepressant like effects of *Securidaca longepedunculata* root extract in mice, *J. Ethnopharmacol.* 107 (2006) 234–239.
- [14] L.P.M. Dapar, C.J. Aguiyi, N.N. Wannang, S.S. Gyang, M.N. Tanko, The histopathologic effects of *Securidaca longepedunculata* on heart, liver, kidney and lungs of rats, *Afr. J. Biotechnol.* 6 (2007) 591–595.
- [15] J.A. Ojewole, Analgesic and hypoglycaemic effects of *Securidaca longepedunculata* (Presl) root-bark aqueous extract, *Inflammopharmacology* 16 (2008) 174–181.
- [16] J.E. Villareal-Lozoya, L. Lombardini, L. Cisneros-Zevallos, Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars, *Food Chem.* 102 (2007) 1241–1249.
- [17] V. Sharma, A. Gulati, S.D. Ravindranath, V. Kumar, A simple and convenient method for analysis of tea biochemicals by reverse phase HPLC, *J. Food Comp. Anal.* 18 (2005) 583–594.
- [18] D.O. Kim, O.K. Chun, Y.J. Kim, H.Y. Moon, C.Y. Lee, Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 6509–6515.
- [19] J. Lako, V.C. Trenery, M. Wahlqvist, N. Wattanapenpaiboon, S. Sotheeswaran, R. Premier, Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods, *Food Chem.* 101 (2007) 1727–1741.
- [20] N. F. Muanda, D. Konè, A. Dicko, R. Soulimani, C. Younos: Phytochemical composition and antioxidant capacity of three Malian medicinal plant parts. *ECAM.* (2009) 1–8, doi: 10.1093/nep109.
- [21] D.O. Kim, S.W. Jeong, C.Y. Lee, Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums, *Food Chem.* 81 (2003) 321–326.
- [22] R.G. Marwah, M.O. Fatope, R.A. Mahrooqi, G.B. Varma, H.A. Abadi, S.K.S. Al-Burtaman, Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman, *Food Chem.* 101 (2007) 465–470.
- [23] A. Djeridane, M. Yousfi, B. Nadjemi, D. Boutassouna, P. Stocker, N. Vidal, Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds, *Food Chem.* 97 (2006) 654–660.
- [24] M. Pacheco-Sanchez, Y. Boutin, P. Angers, A.R.J. Gosselin Tweddell, Inhibitory effect of CDP, a polysaccharide extracted from the mushroom *Collybia dryophila*, on nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in macrophages, *Eur. J. Pharmacol.* 555 (2007) 61–66.
- [25] K. Nagendra Prasad, B. Yang, S. Yang, Y. Chen, M. Zhao, M. Ashraf, Y. Jiang, Identification of phenolic compounds and appraisal of antioxidant and antityrosinase activities from litchi (*Litchi sinensis* Sonn) seeds, *Food Chem.* (116) (2009) 1–7.
- [26] H. Kelebek, S. Selli, A. Canbas, T. Cabaroglu, HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan, *Microchem. J.* 91 (2009) 187–192.
- [27] X. Terra, et al., Grape-seed procyanidins act as anti-inflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 Macrophages by Inhibiting NF κ B signaling pathway, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 4357–4365.
- [28] R.M. Clancy, B. Varneika, J. Rediske, D. Stoyanovsky, D. Wink, S.B. Abramson, Thenitric oxide (N \cdot O) paradox resolved by Angeli's salt: tissue injury depends upon NO redox state, *Arthritis Rheum.* 8 (1998), 41, S 143.
- [29] S.C. Ho, L.S. Hwang, Y.J. Shen, C.C. Lin, Suppressive effect of a proanthocyanidin-rich extract from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) flowers on nitric oxide production in LPS-stimulated macrophage cells, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 10664–10670.
- [30] P.N. Diouf, T. Stevanovic, A. Cloutier, Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea mariana* bark and its proanthocyanidin-rich fractions, *Food Chem.* 113 (2009) 897–902.
- [31] A.C. Akinmoladun, E.M. Obuotor, E.O. Farombi, Evaluation of antioxidant and free radical scavenging capacities of some Nigerian indigenous medicinal plants, *J. Med. Food* 13 (2010) 444–451.

Hindawi Publishing Corporation
Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Volume 2011, Article ID 620862, 9 pages
doi:10.1155/2011/620862

Research Article

Chemical Composition and Cellular Evaluation of the Antioxidant Activity of *Desmodium adscendens* Leaves

François Nsemi Muanda,¹ Jaouad Bouayed,² Abdelouaheb Djilani,¹ Chunyan Yao,³ Rachid Soulimani,³ and Amadou Dicko¹

¹Chemistry Laboratory and Methodology for the Environment, Paul-Verlaine University Metz, 1, boulevard Arago Technopole 2000, 57078 Metz, France

²Environment and Agro-Biotechnologies Department, CRP—Gabriel Lippmann, L-4422 Belvaux, Luxembourg

³Laboratory of Neurotoxicology Alimentary and Bioactivity, Paul-Verlaine University Metz, BP 4102, 57040 Metz, France

Correspondence should be addressed to Amadou Dicko, dicko@univ-metz.fr

Received 12 February 2010; Revised 2 May 2010; Accepted 31 August 2010

Copyright © 2011 François Nsemi Muanda et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Desmodium adscendens plant is widely used as juice or tea in various parts of the world against a wide range of diseases. This study determines the quality and the quantity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins, and tannins in *D. adscendens* leaves by UV-spectrophotometry and RP-HPLC methods. In addition, the antioxidant capacity of these phenolic compounds is evaluated by ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic)), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), and Cellular tests. *D. adscendens* leaves are mainly composite of flavonoid compounds with 12.8 mg of catechin equivalent (CE)/g dw. The amounts of total polyphenol compounds are 11.1 mg of gallic acid equivalent (GAE)/g dw. The quantity of total anthocyanin and total tannin compounds is not considerable 0.0182 mg CgE/g dw and 0.39 mg CE/g dw, respectively. A direct correlation between phenolic compounds and antioxidant activity is observed ($R^2 = 0.96$). The RP-HPLC analyses reveal that the main phenolic compound identified in the methanol-water extract is quercetin dihydrat (2.11 mg/mL). According to the results, it is observed that *D. adscendens* leaves possess a considerable scavenging antioxidant and antiradical capacity, therefore these antioxidant properties might increase the therapeutic value of this medicinal plant.

1. Introduction

Medicinal plants are of great importance to the health of individuals and communities; many people in the world have difficulty in gaining access to modern medicine; they use traditional medicine, based on the use of medicinal herbs and plants, as an alternative to a conventional treatment for their recovery. Several papers have been published for pharmacological proprieties in medicinal plants or their isolated constituents like antioxidant, antidiabetic, antibacterial, antiviral, and antiulcer activities [1–5].

Plants (fruits, vegetables, medicinal herbs, etc.) contain a wide variety of free radical scavenging molecules, such as phenolic compounds (e.g., phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, and tannins), nitrogen compounds (alkaloids, amines, and betalains), vitamins, terpenoids (including carotenoids), and some other endogenous metabolites,

which are rich in antioxidant activity [6, 7]. Epidemiological studies have shown that many of these antioxidant compounds possess anti-inflammatory, antiatherosclerotic, antitumor, antimutagenic, anticarcinogenic, antibacterial, or antiviral activities to a greater or lesser extent [8–10]. The intake of natural antioxidants has been associated with reduced risks of cancer, cardiovascular disease, diabetes, and diseases associated with ageing [10].

Phenolics inhibit carcinogenesis by affecting the molecular events in the initiation, promotion, and progression stages [11]. They modulate the secretion of protein kinases in tumor cell proliferation and induce the expression of anticarcinogenic enzymes or inhibit induction of cancer-promoting enzymes [12–14].

Antioxidant activity is a fundamental important property for human life. Many of the biological functions, including antimutagenicity, anticarcinogenicity, and antiaging, among others, originate from this property [8, 11].

Recently, Abu Bakar et al. [15] reported that phenolic compounds have potentially beneficial effects on human health by reducing the occurrence of coronary heart disease, age-related eyes diseases, and arterogenic processes. These compounds also have antioxidant and anti-free-radical properties that allow them to quench free radicals in the body [16].

Moreover, it was reported that antioxidants with ROS scavenging ability have great relevance in the prevention of oxidative stress which is responsible for the majority of diseases [17].

Desmodium adscendens is a vine, which grows wild in the Amazon rainforest of Peru, in South American countries and as well on the West Coast of Africa. Native people use this plant as a juice or a tea. Also, *D. adscendens* is a medicinal plant which is widely used in popular medicine in different parts of the world. In the Brazilian traditional medicine, the leaves of this plant treat leucorrhoea, body aches, pains, ovarian inflammations, excessive urination, gonorrhoea, and diarrhoeas [18]. Its positive effect against hepatic infection was also verified in vivo [19]. In African traditional medicine, *D. adscendens* is extensively used to treat asthma and other diseases associated with smooth muscle contraction [20]. The Congolese healers treat fever, pain, and even epilepsy with aqueous extracts of the leaves of *D. adscendens* [21]. To our knowledge, there is still no report on the phytochemicals and the antioxidant properties of this plant leaf. The present study is aimed to identify, to quantify the phenolic compounds contained in the leaves of *D. adscendens*, and to evaluate their antioxidant capacity by ABTS, DPPH, and cellular tests.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals. All the chemicals used were of analytical grade. 1,1-Diphenyl-2-picryl hydrazyl radical (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) (ABTS), HBSS buffer, dioxygen water (H₂O₂), 2,2'-azo-bis (2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH), 2',7'-diacetate dichlorofluorescein (DCFH-DA), gallic acid, folin-Ciocalteu's phenol reagent, alumin chloride, catechin, *p*-coumaric acid, rutin, procatechiuc acid, vitamin C, caffeic acid, isovitexin, vitexin, chlorogenic acid, orientin, malvidin, homoorientin, peonidin, catechin, quercetin, quercetin dihydrat, quercetin-3- β -D-glucosyl, epicatechin, kuromanin chloride, and cyanidin chloride were purchased from Across organics (Geel, Belgium). Sodium carbonate, sodium nitrite, chlorhydric acid, ethyl acetate sodium, sodium sulphate anhydrous, ammonium phosphate, ferric ammonium sulphate, acetonitrile, methanol, vanillin reagent, and n-hexane were obtained from Sigma and Roth (Strasbourg, France).

2.2. Apparatus. The RP-HPLC analyses were performed with a Waters 600E pump coupled to a Waters 486 UV visible tunable detector and equipped with a 20 μ L injection loop and an Alltech Intertsil ODS column (RP C18 column size 4.6 mm \times 150 mm; particle size, 5 μ m).

Flow cytometry is used to separate the different immune cell populations according to size (forward light scatter, FSC) and relative granularity (side light scatter, SSC). FSC and SSC were used after excitation of the immune cells with using 488 nm argon laser beams. The level of intracellular ROS was measured in the granulocytes by monitoring the emitted fluorescence of these cells (FACS-Scan, Becton-Dickinson, Immunofluorometry Systems, France). In addition, spectrophotometer analyses were carried out with UV-Vis spectrophotometer (Cary 50 scan).

2.3. Animals. Swiss albino male mice (OF1) aged 9 weeks at the receipt from the breeder company (Charles River, France) and weighing 40–45 g were used. They were maintained under standard environmental conditions with free access to water and food (SD Diated-France). All animal procedures were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

2.4. Plant Materials. Dried leaves of *D. adscendens* (Fabaceae) were obtained from Nigeria, and the biological authentication was carried out by Professor Max Henry in the Botanic and Mycology Laboratory, Nancy University (France). All plant materials were dried at room temperature and were ground and sifted in a sieve (0.75 μ m).

2.5. Sample Preparation

2.5.1. Total Phenolic, Flavonoid, and Anthocyanin Contents and Antioxidant Capacity. Samples for total phenolic compounds, total flavonoid compounds, total anthocyanin compounds, and antioxidant capacity assays were extracted from the powders as described by Chitindingue et al. [16].

Two grams of powdered sample were extracted twice with 10 mL of cold aqueous methanol solution (50%). The two volumes were combined, made up to 40 mL, centrifuged at 1536 \times g for 20 minutes, transferred in small sample bottles, and stored at +4°C in the dark until analysis.

2.6. Condensed Tannin (CT) Extraction. Samples for CT were extracted from the powders as described by Villarreal-Lozoya et al. [22]. One gram of powder was extracted twice with 20 mL of n-hexane for 20 minutes and filtered, and the remaining powder was dried at 35°C under vacuum for 2 h. The powder was stored at +4°C until analyses.

2.7. Phenolic Compounds Extraction for RP-HPLC Analysis. Polyphenols were extracted with water (WE) and with methanol-water (50-50, v-v) (MWE) as solvents according to the slightly modified method described by Sharma et al. [23]. A sample (0.4 g) was extracted with 2 \times 5 mL of solvent under intermittent shaking (2 minutes) on vortex mixer for 30 minutes. The sample was centrifuged at 1536 \times g for 20 minutes at 20°C. The supernatant was taken into a 10 mL volumetric flask. The extracts are stable for 24 h if stored at 4°C.

2.8. Preparation of Samples for Cellular Tests. The extract was prepared from the dried plant in the traditional way (Nigeria). A decoction was done for 1 h in distilled boiled (200 g/L) water. Then the resulting mixture was filtered and evaporated under reduced pressure and lyophilized by a Lyophilizer (ALPHA 1-2 LD, Fisher Bio Block). The amount of lyophilized extract obtained was 24.2 g.

2.9. Dosage of Phenolic Compounds

2.9.1. Total Phenolic Compounds. The Folin-Ciocalteu method was used to measure the total phenolic compounds (Dzingirai et al. [4]). To a sample (100 μ L), distilled water was added to make 2 mL (Eppendorff tube), followed by 1 mL of Folin Ciocalteu reagent 1 N and sodium carbonate (20%).

After 40 minutes at room temperature, absorbance at 725 nm was read on a Spectrophotometer against a blank that contained methanol instead to sample. The results were compared to a gallic acid calibration curve, and the total phenolic compounds were determined as gallic acid equivalents (GAEs). The samples were analyzed at least three replications.

2.9.2. Total Flavonoid Compounds. The flavonoid contents were measured according to a colorimetric assay reported by Muanda et al. [24]. A 250 μ L of standard solution of catechin at different concentrations or appropriately diluted samples was added to 10 mL volumetric flask containing 1 mL of distillate water. At the initial time, 75 μ L of NaNO₂ (5%) was added to the flask. After 5 minutes, 75 μ L of AlCl₃ (10%) was added and after 6 minutes, 500 μ L of NaOH (1 N) was added to mixture. Immediately, the solution was diluted by adding 2.5 mL of distillate water and mixed thoroughly. Absorbance of the mixture, pink in colour, was determined at 510 nm versus the prepared blank. Total flavonoid compounds in medicinal plant were expressed as catechin equivalents (CEs). Samples were analysed in three replications.

2.9.3. Total Anthocyanin Compounds. The total anthocyanin compound of the samples was estimated using a UV-spectrophotometer by the pH-differential method [15, 25]. Two buffer systems, potassium chloride buffer, pH 1.0 (0.025 M) and sodium acetate buffer, pH 4.5 (0.4 M) were used. Briefly, 400 μ L of extract was mixed in 3.6 mL of corresponding buffer solutions and read against a blank at 510 and 700 nm. Absorbance (ΔA) was calculated as $\Delta A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH 1.0}} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH 4.5}}$, monomeric anthocyanin pigment concentration in the extract was calculated and expressed as equivalent cyaniding-3-glucoside (mg/L): $\Delta A \times Mw \times Df \times 1000 / (Ma \times 1)$, with ΔA : difference of absorbance, Mw: molecular weight for cyaniding-3-glucoside (449.2), Df: the dilution factor of the samples, and Ma: molar absorptivity of cyaniding-3-glucoside (26 900). Results were expressed as mg of Cyaniding-3-glucoside Equivalents (CgEs).

2.9.4. Condensed Tannins. The condensed tannin content was estimated using the method described by Villarreal-Lozoya et al. [22] with some modifications. Briefly, an aliquot of 0.5 g of powder obtained after lixiviation (n-hexane) was placed in a centrifuge tube and 15 mL of 1% HCl in methanol was added to each sample. Each tube was vortexed and placed in a water bath at 35°C with constant shaking for 20 minutes and vortexing every 5 minutes. After incubation, the tubes were centrifuged (1536 \times g), and the supernatants were extracted. Aliquots of the supernatants (100 μ L) were placed in two separate assay tubes, one for the sample determination and the other for blank determination.

Samples and blanks were incubated for exactly 20 minutes after adding 5 mL of vanillin reagent (0.5 g of reagent and 200 mL of 4% HCl methanol) to samples and 4% HCl in methanol to the blanks. After 20 minutes, absorbance was read at 500 nm from each sample and blank using UV-spectrophotometer Varian Cary 50. Samples absorbance was rectified with the blank standard and compared against a standard curve made with catechin. Results were expressed as mg catechin equivalent (CE) of lixiviating sample. Analyses were triplicate.

2.10. RP-HPLC Analysis. The samples (WE) and (MWE) were filtered through a 0.45 μ m PTFE syringe tip filter and were analyzed using an RP-HPLC system equipped with a 20 μ L injection loop, a waters UV-Visible tuneable detector on a reverse phase (RP C₁₈) column Alltech Interstil ODS-5 μ m \times 4.6 mm \times 150 mm. The flow rate was set at 1 mL/minute at room temperature. To perform this study, a gradient of three mobile phases was used; solvent A: 50 mM ammonium phosphate (NH₄H₂PO₄) pH 2.6 (adjusted with phosphoric acid), solvent B: (80:20 (v/v)) acetonitrile/solvent A, and solvent C: 200 mM of phosphoric acid pH 1.5 (pH adjusted with ammonium hydroxide). The solvents were filtered through a Whatman Maidstone England paper N° 3 and placed in an ultrasonic apparatus for 25 minutes. The gradient profile was linearly changed as follows (total 60 minutes): 100% solvent A at zero minutes, 92% A/8% B at 4 minutes, 14% B/86% C at 10 minutes, 16% B/84% C at 22.5 minutes, 25% B/75% C at 27.5 minutes, 80% B/20% C at 50 minutes, 100% solvent A at 55 minutes, and 100% A at 60 minutes.

After each run, the system was reconditioned for 10 minutes before analysis of the next sample. Under these conditions, each sample analysis was done in triplicate. Polyphenolic external standards were prepared by dissolving 2 mg/mL and used as reference. In each sample, polyphenol was identified by comparing its retention time with that of the corresponding external standard. Detection was done at 280 and 320 nm, and quantification was calculated by comparing their peak areas.

2.11. Antioxidant Activity Analyses

2.11.1. DPPH Radical Scavenging Test. The DPPH radical scavenging activity was evaluated according to the method slightly modified described by Marwah et al., Shariffar et al.,

Adesengun et al., and Al-Zubairi et al. [26–29]. 1 mL of 100 μ M DPPH solution in methanol was mixed with 1 mL of plant extract. The reaction mixture was incubated in the dark for 20 minutes, and the optical density was recorded at 517 nm against the blank. For the control, 1 mL of DPPH solution in methanol was mixed with 1 mL of methanol, and optical density of solution was recorded after 20 minutes.

The decrease in optical density of DPPH in samples with regard to control system was used to calculate the antioxidant activity as a percentage inhibition (IP%) of DPPH radical, $IP\% = ((A_{10} - A_{20}) / (A_{10} \times 100))$ were A_{10} : absorbance of the test sample after zero minutes and A_{20} : absorbance of control after 20 minutes. Each assay was carried out in triplicate.

From a plot of concentration against %IP, a linear regression analysis was performed to determine the IC_{50} value for each extract. The DPPH radical scavenging activity of phenolic compounds was expressed as IC_{50} value in terms of μ g/mL of dry weight. To 2.90 mL of an aqueous methanol solution (50%) of 100 μ M of DPPH, 100 μ L of the plant extract solution was added. The mixture was shaken and stored at 20°C in the dark for 40 minutes. Then, the decrease of absorbance was measured; the resulting solution was monitored at 517 nm. The DPPH radical scavenging activity of phenolic compounds was expressed in terms of mg of Vitamin C Equivalents (VCEs) per g dw in 40 minutes. The control solution was consisted of 100 μ L of methanol and 2.90 mL of DPPH solution. The radical solution was prepared daily.

2.11.2. ABTS Radical Scavenging Test. The slightly modified method developed by Djeridane et al. [30] was used in this experiment. 1.0 mM of AAPH solution was mixed with 2.5 mM ABTS as diammonium salt in phosphate buffered saline (PBS) solution 100 mM potassium phosphate buffered (pH 7.4) containing 150 mM NaCl. The mixture was heated in a water bath at 68°C for 20 minutes. The concentration of the resulting blue-green $ABTS^{*+}$ (radical cation solution) was adjusted to an absorbance of 0.65 ± 0.02 at 734 nm.

The sample solution of 60 μ L was added to 2.94 mL of the resulting blue-green ABTS radical solution. The mixture, protected from light, was incubated in a water bath at 37°C for 20 minutes.

Then the decrease of the absorbance at 734 nm was measured. The control solution was consisted of 60 μ L of methanol and 2.94 mL of $ABTS^{*+}$ solution. The stable ABTS radical cation scavenging activity of the phenolic compounds in the extract was expressed in terms of mg of Vitamin C Equivalents (VCEs) per g dw in 20 minutes. All radical stock solutions were prepared daily.

2.11.3. Cellular Test. A cellular assay was used for the in vitro antioxidant activity evaluation; flow cytometry technique allows a separation of different immune cells population by size (forward light scatter, FSC) and relative granularity (side light scatter, ssc) parameters. FSC and SSC were used after excitation of the immune cells by the 488 nm laser beam of argon. The level of intracellular ROS was measured in

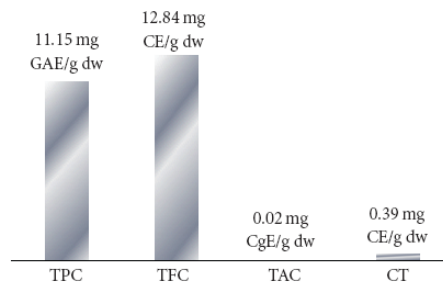


FIGURE 1: Phenolic compounds of leaves of *D. adscendens*. TPC: Total phenolic compounds; TFC: Total flavonoid Compounds; TAC: Total anthocyanin compounds; CT: Condensed tannins; dw: dry weight; GAE: Gallic Acid Equivalent; CE: Catechin Equivalent; CgE: Cyaniding-3-glycoside Equivalent.

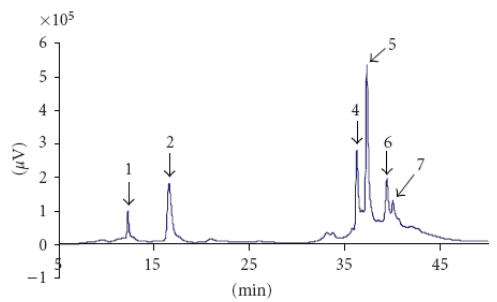
the granulocytes by monitoring of the emitted fluorescence by these cells.

The ROS level was quantified using 2',7'-diacetate dichlorofluorescein (DCFH-DA). Nonpolar DCFH-DA crosses the cellular membranes and is hydrolysed by intracellular esterase to form the polar, nonfluorescent dichlorofluorescein (DCFH). Then, the latter is oxidized to highly fluorescent substance, the 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) by intracellular ROS [31, 32].

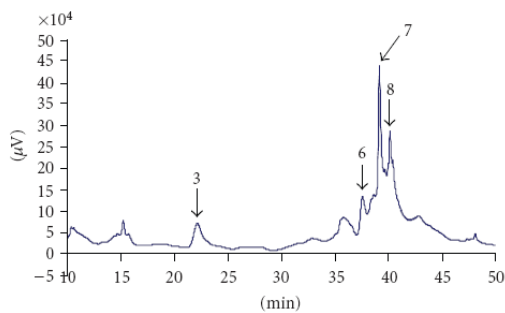
The mice were anesthetized with the halothane and sacrificed. The collected blood was heparinized and dispatched in volumes of 100 μ L in Eppendorff tubes. Erythrocytes were done using 2 mL of lysing solution in each tube; the whole was placed in darkness for 10 minutes. After centrifugation at 4°C (5 min; $1536 \times g$), the supernatant was eliminated, then 2 mL cell wash solution was added to sediment containing white cells, mixed, and followed by a new centrifugation in the same conditions. Supernatant was still eliminated.

Three groups of cell belonging to the same blood were used to assess the intracellular ROS level; the first one was a control without oxidative stress, and the second was a control with oxidative stress. The third group is served to evaluate the antioxidant activity of the extract. 1 mL of HBSS buffer was added and 5 μ L of DCFH-DA (50 μ M) to white cells. For the control (without oxidative stress), incubation was achieved in darkness during 30 minutes at 37°C. For the second control (with oxidative stress), incubation was performed in darkness during 15 min at 37°C, then is added 5 μ L of H_2O_2 (89 mM) to provoke oxidative stress, the incubation continued for 15 minutes more.

In the third group of cells, several concentrations of the extract (*D. adscendens*) were used for the evaluation of its antioxidant activity. So, to this group, in addition to HBSS buffer and DCFH-DA, 5 μ L of *D. adscendens* extract were added. After 15 minutes of incubation in darkness, the oxidative stress was induced by addition of 5 μ L of H_2O_2 (89 mM). It continued for 15 minutes at 37°C. As soon as incubation times were completed, the ROS levels were measured by the flow cytometry technique.



(a)



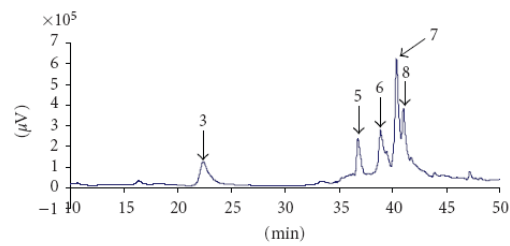
(b)

FIGURE 2: (a) WE, HPLC chromatogram at 280 nm of the leaves of *D. adscendens* 1: gallic acid; 2: protocatechuic acid; 4: rutin; 5: quercetrin glucosyl; 6: quercetrin dihydrat; 7: cinnamic acid. (b) WE, HPLC chromatogram at 320 nm of the leaves of *D. adscendens* 3: Catechin; 6: quercetrin glucosyl; 7: quercetrin dihydrat; 8: cinnamic acid.

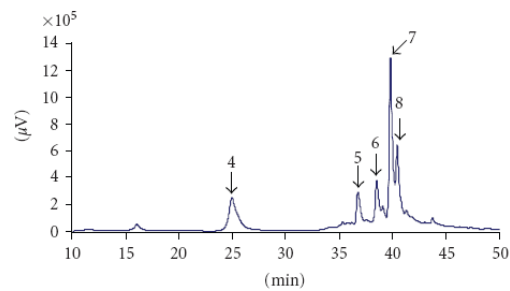
In this test, oxidative stress is induced by addition of H_2O_2 in the extracellular medium of the granulocytes. Exogenous H_2O_2 diffuses inside the cells, consequently their DCFH oxidation increases (C) compared to granulocytes without oxidative stress (A). Under oxidative stress conditions, *D. adscendens* extract led to the reduction of the fluorescence intensity of treated cells (B). The fluorescence intensity is expressed as decimal logarithm versus the cell number. (A) and (B) are the controls corresponding to the level of intracellular ROS without and with oxidative stress, respectively. (C) is the treated granulocytes corresponding to ROS level in these cells incubated in the presence of *D. adscendens* extract at 25 mg/mL then subjected to the oxidative stress.

The reduction percentage of ROS generated in granulocytes by exogenous H_2O_2 was calculated by the monitoring of the emitted fluorescence intensity (F_i). The following relation was used $(Fit_0 - Fit_1) \times 100 / (Fit_0 - Fit_2)$ with Fit_0 : control with oxidative stress; Fit_1 : treat cells; Fit_2 : control without oxidative stress.

2.12. *Statistical Analysis.* Results are presented as mean \pm standard Error; statistical analysis of experimental result was



(a)



(b)

FIGURE 3: (a) MWE, HPLC chromatogram at 280 nm of leaves of *D. adscendens* 3: catechin; 6: quercetrin glucosyl; 7: quercetrin dihydrat; 8: cinnamic acid. (b) MWE, HPLC chromatogram at 320 nm of leaves of *D. adscendens* 4: chlorogenic acid; 5: quercetrin glucosyl; 6: quercetrin dihydrat; 7: cinnamic acid; 8: cinnamic acid.

based on analysis of variance. Observed differences were statistically considered significant at the level of $P < .001$.

3. Results

3.1. *Total Phenolic Compounds.* The results reveal that 1 g of dry weight of *D. adscendens* leaves contains 11.15 mg GAE of total phenolic compounds, 12.84 mg CE of total flavonoid compounds, and 0.0182 mg CgE of total anthocyanins, and the amount of condensed tannins observed is 0.39 mg CE (Figure 1).

3.2. *HPLC Analysis.* The RP-HPLC profiles of the water extracts and the methanol-water extracts are shown in Figures 2 and 3, respectively. Peaks were identified and quantified on the basis of their retention time values and UV spectra by comparison with those of the single compound in the standard solution. The retention time and the concentration of polyphenolic compounds contained in the extracts are reported in Table 1. There were numerous peaks that were not identified because of the lack of suitable standards. The samples were analyzed at least four replications at 280 and 320 nm.

TABLE 1: Concentration of the phenolic compounds in the WE and the MWE.

Rt (min)	Ref.	Name of compounds	WE (mg mL ⁻¹)	MWE (mg mL ⁻¹)
11.98 ± 0.22	[1]	Gallic acid	0.12 ± 0.01	N.d
14.78 ± 0.92	[2]	Protocatechiuc acid	0.11 ± 0.02	N.d
23.96 ± 0.23	[3]	Catechin	0.06 ± 0.04	0.69 ± 0.04
25.80 ± 0.23	[4]	Chlorogenic acid	N.d	0.23 ± 0.06
37.02 ± 0.36	[5]	Rutin	0.24 ± 0.01	0.28 ± 0.04
37.71 ± 0.18	[6]	Quercetin glucosyl	0.46 ± 0.03	0.17 ± 0.01
39.47 ± 0.19	[7]	Quercetin dihydrat	0.17 ± 0.02	2.11 ± 0.16
41.68 ± 0.65	[8]	Cinnamic acid	0.14 ± 0.01	0.76 ± 0.07

WE: water extract; MWE: methanol water extract; Rt: Retention time in minute; N.d: not detected.

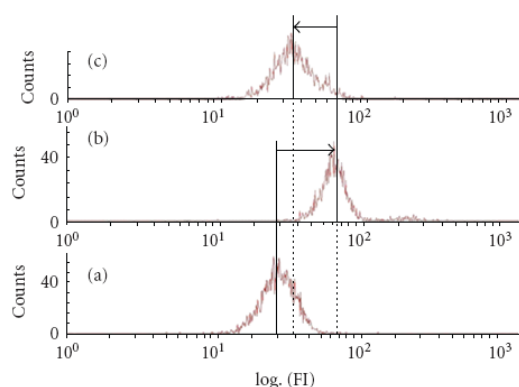


FIGURE 4: The ROS levels were measured by flow cytometry. The fluorescence intensity was expressed as decimal logarithm versus the cell number. (a) and (b) are the controls corresponding to the level of intracellular ROS without and with oxidative stress, respectively. (c) is the pretreated granulocytes corresponding to ROS level in these cells incubated in the presence of *Desmodium adscendens* extract at 25 mg/mL then subjected to the oxidative stress.

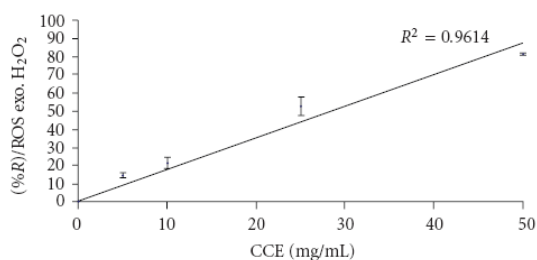


FIGURE 5: Concentration-response curve for reduction of ROS generated by exogenous H₂O₂. R (%) ROS exo H₂O₂, reduction (%) of ROS generated by exogenous H₂O₂; CCE: Concentration of extract.

3.3. Antioxidants Activities

3.3.1. ABTS and DPPH Tests. The ABTS test and the DPPH test reveal that the extracts of *D. adscendens* leaves possess a useful scavenging antioxidant activities, these results,

expressed as mg of VCE/g dw, are 12.83 mg (ABTS) and 8.47 mg DPPH.

3.3.2. Cellular Test. The ROS level was detected using a fluorescence probe, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), which can be oxidized to highly fluorescent dichlorofluorescein (DCF) by intracellular ROS [16]. In Figure 4, a decrease of the fluorescence intensity (FI) was observed, between (B) (log = 80) corresponding to control with oxidative stress and (C) (log = 35) representing the pretreated cells, which was close to the level of the control of cells without oxidative stress (A) (log = 30). This decrease is due to the effect of the extract of *D. adscendens* on the ROS level which is directly correlated to the FI.

The scavenging capacity of *D. adscendens* leaves extract on the ROS was highlighted. To a concentration of 25 mg/mL, it is observed a reduction of 83.21 ± 6.21% of ROS level generated by exogenous H₂O₂. Thus, pretreatment of granulocytes with this extract appreciably inhibited the ROS generation induced by H₂O₂.

4. Discussion

Among the phenolic compounds contained in the leaves of *D. adscendens*, the major was the anthocyanins, and the least was the condensed tannins.

Quantitative analyses carried out by RP-HPLC show that water is not the best extract solvent for polyphenolic compounds. This is in concordance with Marwah et al. [26], who have reported that aqueous alcohols are the best solvents for extracting polyphenolic compounds from plant materials. However, these results show that, in water, gallic acid (0.12 mg/mL) and the protocatechiuc acid (0.11 mg/mL) are more extracted than in the methanol-water medium because these acids can be transformed into their corresponding esters in hydroalcoholic medium [33].

The major compound identified in the WE was the quercetrin glucosyl (0.46 mg/mL) and the least was catechin (0.06 mg/mL).

In contrast, it was found that, in the MWE, the quercetrin glucosyl (0.17 mg/mL) was the least. In this extract, the quercetrin dihydrat concentration (2.11 mg/mL) was the highest followed by cinnamic acid (0.76 mg/mL).

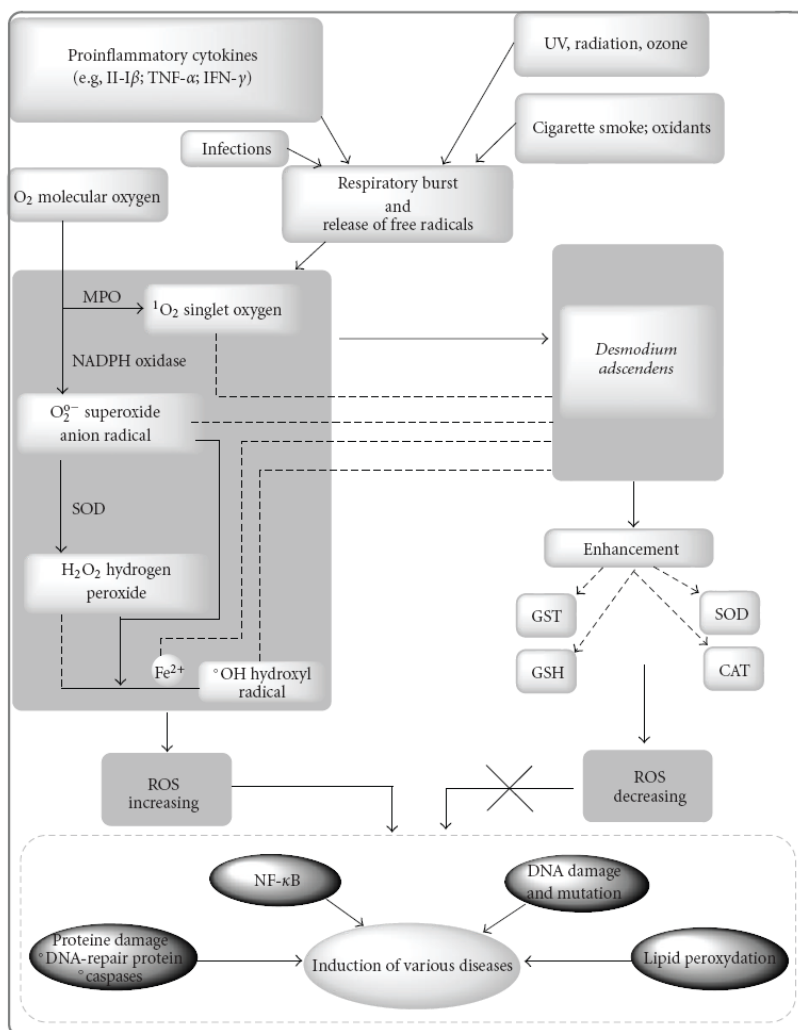


FIGURE 6: Role of *D. adscendens* in prevention of diseases caused by free radicals. Generation of ROS is initiated by respiratory burst, which is set off by various physiological and environmental factors. The fabrication of an assortment of ROS from the molecular O₂, carried by different enzymes such as MPO (myeloperoxidase), NADPH oxidase, and SOD (superoxide dismutase), leads to diverse cellular phenomena, namely, damage of DNA-repair proteins and caspases, lipid peroxidation, and DNA damage followed by mutation and NF- κ B activation. All these phenomena give rise to wide range of diseases. *D. adscendens* leaves extract inhibits the generations of the free radicals by scavenging both the mother and the daughter products and also by inducing the increase of SOD, CAT, GST, and GSH, resulting in the obstruction of various disease formation.

The antioxidant activities recorded both using the ABTS test and the DPPH test show that *D. adscendens* leaves possess useful antioxidant properties. To compare these activities with those other medicinal plants previously described in the literature such as *Allophylus rubifolius*, *Phaulopsis fascisepala*, *Anogeissus dhofarica*, and *Litchi* seeds, the antioxidant activities were expressed as IC₅₀. The IC₅₀ value of

D. adscendens extract was 4.00 μ g/mL; this result reveals that compared to *Allophylus rubifolius* (IC₅₀ = 7.1 μ g/mL) [26], *Phaulopsis fascisepala* leaves (IC₅₀ = 0.5 mg/mL) [28], *Anogeissus dhofarica* (IC₅₀ = 4.5 μ g/mL), and *Litchi* seeds (IC₅₀ = 4.8 μ g/mL) [34], *D. adscendens* leaves possess a significant antioxidant activities, since more the value of IC₅₀ is low more the antioxidant activity is high.

In order to confirm these results, the antioxidant capacity of *D. adscendens* was evaluated against ROS under biological medium by using a cellular test. The DCFH-DA was used to evaluate the intracellular redox status [28]. Concentration-response curve in the ROS reduction reveals a linear and positive relationship ($R^2 = 0.96$) between the scavenger capacity and the concentration of *D. adscendens* extracts. Then, this reduction is directly correlated to the ROS level decreasing (Figure 5).

The ROS are high energy forms of oxygen, they induce hyperoxidation, cytotoxicity of oxygen and they decrease the antioxidant activity [35, 36]. The present study indicates that *D. adscendens* extract restrains scavenging activity of ROS.

The reducing capacity of extracts of *D. adscendens* leaves may be used as a significant indicator of its potential antioxidant activity. As shown in Figures 4 and 5, it is observed that the plant extract has some reducing capacity, justifying its antioxidant properties.

Comparing to some plant extracts from *Ipomea batata*, *Moringa oleifera*, *Albelmoshus manihot*, *Latuca sativa* [25], *Oudneya africana*, *Thapsia garganica*, *Thymelaea hirsute*, *Teucrium polium*, *Artemisia arborescens*, *Ruta montana* [30], *D. adscendens* plant extract shows significant amount of phenolic, flavonoid, anthocyanin, and tannin compounds with antioxidant properties.

The antioxidative properties have been demonstrated by several studies in the literature [24, 36]. Polyphenolic, flavonoid, anthocyanin, and tannin compounds have high antioxidant properties, and their effects are significant on human nutrition and health. It has been reported that the body's antioxidant defense system consists of the activity of SOD, CAT, GST, and GSH [37]. SOD catalyzes the breakdown of endogenous cytotoxic superoxide radicals to H_2O_2 which is further degraded by CAT. Thus, they play a crucial role in maintaining the physiological levels of O_2 and H_2O_2 . GSH, in conjunction with GST, has a basic role in cellular defense against deleterious free radicals and other oxidant species [38]. GST catalyzes the conjugation of thiol group of glutathione to electrophilic substrates and thereby detoxifies endogenous compounds such as peroxidized lipids [39].

Our results signify that this plant is an important source of natural antioxidant, which could play a vital role in preventing the progress of various oxidative stresses, in the course of enhancing the generation of typical antioxidant enzymes (Figure 6) as illustrated by Mandal et al. [17], which involved the NO^* radical in the process.

In conclusion, the aim of the present study was to evaluate the antioxidant potency of the *D. adscendens* plant extract and to determine the polyphenolic compound contents. Since the extracts of *D. adscendens* leaves exhibit interesting antioxidant properties and ROS scavenging activity, the *D. adscendens* may be considered a rich source of natural antioxidants, which justifies its use in folk medicine. Furthermore, evaluation of in vitro antioxidant activity of these extracts has also provided interesting results that might be beneficial for the pharmacological use of this plant in clinical trials.

Acknowledgments

This work was supported by a Grant from the Ministry of Scientific Research of Republic Democratic of Congo (no. 132.49/060/KM/07). Mr. Frederic Desort (*Neurotoxicology Alimentary and Bioactivity Laboratory*, University P. Verlaine-Metz, BP 4102, 57040 Metz, France) is also acknowledged for technical assistance.

References

- [1] C. S. Nergard, D. Diallo, K. Inngjerdigen et al., "Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali: anti-ulcer-, radical scavenging- and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 96, no. 1-2, pp. 255-269, 2005.
- [2] C.-C. Wong, H.-B. Li, K.-W. Cheng, and F. Chen, "A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay," *Food Chemistry*, vol. 97, no. 4, pp. 705-711, 2006.
- [3] P. A. Meléndez and V. A. Capriles, "Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico," *Phytomedicine*, vol. 13, no. 4, pp. 272-276, 2006.
- [4] B. Dzingirai, M. MuChuweti, T. Murenje, C. Chidewe, M. A. N. Benhura, and L. S. Chagonda, "Phenolic content and phospholipids peroxidation inhibition by methanolic extracts of two medicinal plants: *Elionurus muticus* and *Hypoxis hemerocallidea*," *African Journal of Biochemistry Research*, vol. 1, pp. 137-141, 2007.
- [5] P. N. Diouf, T. Stevanovic, and A. Cloutier, "Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea mariana* bark and its proanthocyanidin-rich fractions," *Food Chemistry*, vol. 113, no. 4, pp. 897-902, 2009.
- [6] W. Zheng and S. Y. Wang, "Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, no. 11, pp. 5165-5170, 2001.
- [7] Y. Cai, M. Sun, and H. Corke, "Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, no. 8, pp. 2288-2294, 2003.
- [8] J. W. Mclarty, "Antioxidants and cancer: the epidemiologic evidence," in *Antioxidants and Disease Prevention*, H. S. Garewal, Ed., pp. 45-66, CRC Press, New York, NY, USA, 1997.
- [9] R. W. Owen, A. Giacosa, W. E. Hull, R. Haubner, B. Spiegelhalder, and H. Bartsch, "The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil," *European Journal of Cancer*, vol. 36, no. 10, pp. 1235-1247, 2000.
- [10] A. Sala, M. Del Carmen Recio, R. M. Giner et al., "Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum*," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 54, no. 3, pp. 365-371, 2002.
- [11] C. S. Yang, J. M. Landau, M.-T. Huang, and H. L. Newmark, "Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds," *Annual Review of Nutrition*, vol. 21, pp. 381-406, 2001.
- [12] C. T. Ho, T. Osawa, M. T. Huang, and R. T. Rosen, *Food Phytochemicals for Cancer Prevention II: Teas, Spices, and Herbs*, American Chemical Society, Washington, DC, USA, 1994.
- [13] T. L. Wadsworth and D. R. Koop, "Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory

- cytokine expression in RAW 264.7 macrophages," *Biochemical Pharmacology*, vol. 57, no. 8, pp. 941–949, 1999.
- [14] H. Sakakibara, Y. Honda, S. Nakagawa, H. Ashida, and K. Kanazawa, "Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, no. 3, pp. 571–581, 2003.
- [15] M. F. Abu Bakar, M. Mohamed, A. Rahmat, and J. Fry, "Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (*Mangifera pajang*) and tarap (*Artocarpus odoratissimus*)," *Food Chemistry*, vol. 113, no. 2, pp. 479–483, 2009.
- [16] K. Chitindingu, A. R. Ndhkala, C. Chapano, M. A. Benhura, and M. Muchuweti, "Phenolic compound content, profiles and antioxidant activities of *Amaranthus hybridus* (pigweed), *Brachiaria Brizantha* (upright *Brachiaria*) and *Panicum maximum* (Guinea grass)," *Journal of Food Biochemistry*, vol. 31, no. 2, pp. 206–216, 2007.
- [17] S. Mandal, B. Hazra, R. Sarkar, S. Biswas, and N. Mandal, "Assessment of the antioxidant and reactive oxygen species scavenging activity of methanolic extract of *Caesalpinia crista* leaf," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. In press.
- [18] G. Guarin, "Plantas medicinais do Estado do Mato Grosso," *Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior*, p. 31, 1996.
- [19] O. Heard, *Contribution of the study of Desmodium adscendens: chemistry & pharmacology*, Ph.D., University of Tours, France, 1994.
- [20] M. A. Gyamfi, M. Yonamine, and Y. Aniya, "Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries," *General Pharmacology*, vol. 32, no. 6, pp. 661–667, 1999.
- [21] E. J. Adjanohoun, "Contribution to ethnobotanical and floristic studies in the People's Republic of Congo," *Traditional Medicine and Pharmacopoeia Supplement*, vol. 3, p. 428, 1988.
- [22] J. E. Villarreal-Lozoya, L. Lombardini, and L. Cisneros-Zevallos, "Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars," *Food Chemistry*, vol. 102, no. 4, pp. 1241–1249, 2007.
- [23] V. Sharma, A. Gulati, S. D. Ravindranath, and V. Kumar, "A simple and convenient method for analysis of tea biochemicals by reverse phase HPLC," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 18, no. 6, pp. 583–594, 2005.
- [24] N. F. Muanda, D. Koné, A. Dicko, R. Soulimani, and C. Younos, "Phytochemical composition and antioxidant capacity of three Malian Medicinal plant parts," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. In press.
- [25] J. Lako, V. C. Trenerry, M. Wahlqvist, N. Wattanapenpaiboon, S. Sotheeswaran, and R. Premier, "Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods," *Food Chemistry*, vol. 101, no. 4, pp. 1727–1741, 2007.
- [26] R. G. Marwah, M. O. Fatope, R. A. Mahrooqi, G. B. Varma, H. A. Abadi, and S. K. S. Al-Burtamani, "Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman," *Food Chemistry*, vol. 101, no. 2, pp. 465–470, 2007.
- [27] F. Shariffar, G. Dehghn-Nudeh, and M. Mirtajaldini, "Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L.," *Food Chemistry*, vol. 112, no. 4, pp. 885–888, 2009.
- [28] S. A. Adesegun, A. Fajana, C. I. Orabueze, and H. A. B. Coker, "Evaluation of antioxidant properties of *phaulopsis fascisepala* C.B.Cl. (Acanthaceae)," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 6, no. 2, pp. 227–231, 2009.
- [29] A. S. Al-Zubairi, B. A. Abdul, I. S. Abdelwahab, Y. C. Peng, S. Mohan, and M. M. Elhassan, "Eleusine indica possesses antioxidant, antibacterial and cytotoxic properties," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. In press.
- [30] A. Djerdane, M. Yousfi, B. Nadjemi, D. Boutassouna, P. Stocker, and N. Vidal, "Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds," *Food Chemistry*, vol. 97, no. 4, pp. 654–660, 2006.
- [31] M. Carini, G. Aldini, M. Piccone, and R. M. Facino, "Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure," *Farmaco*, vol. 55, no. 8, pp. 526–534, 2000.
- [32] C. Rota, C. F. Chignell, and R. P. Mason, "Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: Possible implications for oxidative stress measurements," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 27, no. 7-8, pp. 873–881, 1999.
- [33] F. Mortier, "Préparation des extraits destinés à l'évaluation pharmacologique," in *Ethnopharmacologie: sources, méthodes, objectifs*, J. et Coll Fleurentin, Ed., pp. 199–209, ORSTOM et Société Française d'Ethnopharmacologie, Paris – Metz, France, 1991.
- [34] K. Nagendra Prasad, B. Yang, S. Yang et al., "Identification of phenolic compounds and appraisal of antioxidant and antityrosinase activities from litchi (*Litchi sinensis* Sonn.) seeds," *Food Chemistry*, vol. 116, no. 1, pp. 1–7, 2009.
- [35] M. Tarnawski, K. Depta, D. Grejciun, and B. Szelepin, "HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract—a natural immunomodulator," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 41, no. 1, pp. 182–188, 2006.
- [36] I. E. Kochevar and R. W. Redmond, "Photosensitized production of singlet oxygen," *Methods in Enzymology*, vol. 319, pp. 20–28, 2000.
- [37] U. Bandyopadhyay, D. Das, and R. K. Banerjee, "Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis," *Current Science*, vol. 77, no. 5, pp. 658–666, 1999.
- [38] S. Arivazhagan, S. Balasenthil, and S. Nagini, "Garlic and neem leaf extracts enhance hepatic glutathione and glutathione dependent enzymes during N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)-induced gastric carcinogenesis in rats," *Phytotherapy Research*, vol. 14, no. 4, pp. 291–293, 2000.
- [39] M. J. Leaver and S. G. George, "A piscine glutathione S-transferase which efficiently conjugates the end-products of lipid peroxidation," *Marine Environmental Research*, vol. 46, no. 1–5, pp. 71–74, 1998.

RESUME

Les substances naturelles issues de la biomasse des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans la biotechnologie tant dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique. Parmi ces composés on retrouve une grande partie des métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapie. On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions, les études des métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures in vitro et in vivo de tissus végétaux. C'est le cas notamment des composés phénoliques, polyphénols, flavonoïdes, anthocyanines et tanins, qui font l'objet de notre étude, composés largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydant et anti radicalaires. Nos travaux ont porté sur les extraits issus des 6 plantes (*Daniella oliveri*, *Desmodium adscendens*, *Ficus capensis*, *Securidaca longependunculata*, *Stevia rebaudiana*, *Vitex doniana*) utilisées traditionnellement pour traiter plusieurs maladies dans diverses parties du monde (Amérique, en Afrique). La méthodologie mise au point pour l'analyse de ces extraits a été appliquée pour le dosage des exsudats racinaires de *Miscanthus x géant*). La combinaison de certaines méthodes d'analyses chimiques, spectrophotométries (UV, RMN, SM), chromatographies (CCM, CC, HPLC, GC-MS) et biologiques nous ont permis de faire une évaluation quantitative, qualitative des composés phénoliques extraits des 7 plantes d'origines diverses utilisés par la médecine traditionnelle. Les analyses complémentaires ont permis de mettre en évidence les capacités antioxydantes et anti-radicalaires de ces extraits. Tandis que les tests biologiques ont été utilisés pour l'évaluation de certaines propriétés telles que les propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires. Les résultats de ces travaux nous ont permis d'affirmer que l'ensemble des extraits de plantes étudiés présente des très bonnes propriétés antioxydantes qui pourrait nous permettre de les recommander dans la biotechnologie.

Mots clés: Composés phénoliques, antioxydant, plantes médicinales, HPLC, DPPH, ABTS, polyphénols

ABSTRACT

Natural substances from biomass plant have taken advantage of multiple interests in the biotechnology industries both in food, cosmetic and pharmaceutical. Between these compounds are found much of secondary metabolites which are mainly illustrated in therapeutics. Traditional medicines has used for long time plant materials for healing without knowing what had caused their actions, then studies of secondary metabolites are the subject of numerous studies based on *in vitro* and *in vivo* cultures of plant tissues. These include phenolic compounds, polyphenols, flavonoids, anthocyanins, tannins ... which are the subject of our study, compounds widely used in therapeutics as vasculoprotective, anti-inflammatory, enzyme inhibitors, antioxidant and anti free radical. Our work has brought the excerpts from six plants (*Daniella oliveri*, *Desmodium adscendens*, *Ficus capensis*, *Securidaca longependunculata*, *Stevia rebaudiana*, and *Vitex doniana*) traditionally used to treat many diseases in various parts of the world (America, Africa, Asia). The methodology developed for the analysis of these extracts has been applied for the determination of root exudates of *Miscanthus x giganteus*. The combination of some methods of chemical analysis, spectrophotometry (UV, NMR, MS), chromatography (TLC, CC, HPLC, GC-MS) and biology allowed us to evaluate quantitative and qualitative phenolic extracts from these plants materials. Further analysis helped to highlight the antioxidant capacity and anti-radical of these extracts. While biology tests were used for the evaluation of certain properties such as antimicrobial and anti inflammatory. The results of this work have allowed us to conclude that all plant extracts studied has very good antioxidant properties that may allow us to recommend them in biotechnology.

Keywords: Phenolic compounds, antioxidant, medicinal plants, HPLC, DPPH, ABTS, polyphenolic