MINISTERE DES ENSEIGNEMENTS
SECONDAIRE SUPERIEUR ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
****

FACULTE DES SCIENCES
ET TECHNIQUES (FAST-UB)

Année Universitaire 2008 - 2009

ENQUETE ETHNOBOTANIQUE DE SIX PLANTES MEDICINALES MALIENNES - EXTRACTION, IDENTIFICATION D'ALCALOÏDES - CARACTERISATION, QUANTIFICATION DE POLYPHENOLS : ETUDE DE LEUR ACTIVITE ANTIOXYDANTE

THESE

En cotutelle avec

L'UNIVERSITE PAUL VERLAINE DE METZ –UPV- M (France)

Soutenue à la Faculté des Sciences et Techniques de Bamako

le …… pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BAMAKO

(Mention CHIMIE ORGANIQUE)

Présentée par

DONATIEN KONE

JURY

Monsieur Lassine SIDIBE (Rapporteur)

Monsieur Abdelouaheb. DJILANI (Rapporteur)

Monsieur le Professeur Drissa DIALLO

Monsieur Rachid SOULIMANI

Monsieur Babakar DIOP Co-Directeur de thèse

Monsieur le Professeur Amadou DICKO Co-Directeur de Thèse

A mon père Baba Joachim (in memoriam) à ma mère Wazoun DIARRA et à ma tante Thérèse DAKOUO ;

A mes frères Yves, Justin, Philippe et sœurs Agnesse, Reine Marie ;

A mon épouse Vinima Félicité Diarra et à nos enfants Lucie et Baba Armel.

REMERCIEMENTS

J'ai eu la chance et le plaisir d'effectuer ce travail de recherche entre la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) de l'Université de Bamako sous la direction du Professeur Babakar DIOP et le Laboratoire de Chimie et de Méthodologie de l'environnement (LCME) de l'Université Paul Verlaine de Metz (UPV-M) – France sous la co-direction du Professeur Amadou DICKO en collaboration avec le Département Médecine Traditionnelle (DMT) dont le directeur est le professeur Drissa DIALLO. Je tiens donc à remercier :

- Le Professeur Babakar DIOP

Professeur de Chimie organique à la faculté des sciences et Techniques (FAST) de l'université de Bamako

D'avoir accepté de diriger mes travaux de thèse, durant ces trois années, en me faisant bénéficier de votre expérience, vos conseils et vos encouragements. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

- Le Professeur Amadou DICKO,

Professeur de chimie organique à l'Unité de Formation et de Recherche Sciences Fondamentales et Appliquées (UFR Sci.F.A.)- UPV-M (France)

Je tiens particulièrement à vous remercier d'abord pour m'avoir facilité l'obtention de la bourse de la coopération franco-malienne sans laquelle cette thèse n'aurait pas lieu et de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Chimie et de Méthodologie pour l'environnement (LCME). Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

- Le Professeur Drissa DIALLO

Chef du Départementdela Médecine Traditionnelle(INRSP) et 1er assesseur de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS) de l'Université de Bamako

D'avoir accepté de m'accompagner durant toute la formation de 3ème cycle. En me proposant ce thème vous m'avez fait une marque de confiance. Malgré vos occupations diverses, vous avez été toujours disponible pour partager avec moi votre expérience, vos conseils, vos encouragements. Que grandissent la volonté et le pouvoir d'aider avec rigueur dans l'honnêteté dont vous faites preuve. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

Je voudrais aussi remercier ici le Professeur Catherine LAVAUD du laboratoire de Pharmacognosie de l'UFR de Pharmacie – Université de Reims (France) d'avoir accepté de me faire avec plaisir l'enregistrement et l'interprétation des différents spectres pour

l'identification structurale des composés isolés. Je souhaite que cette collaboration, initiée à la base pour m'aider à faire cette thèse, se poursuive. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Permettez moi aussi de remercier les professeurs Rachid SOULIMANI et Chafic YOUNOS ainsi que Fred DESOR et Hassane RAMMAL du Laboratoire d'Ethnobotanique et de Pharmacologie (INRA) pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont réservé et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

J'aimerais également remercier les rapporteurs : Monsieur Abdelouaheb DJILANI et Monsieur Lassine SIDIBE. Vous avez accepté prendre de votre temps pour juger cette thèse.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur Drissa DIALLO d'avoir accepté de présider le jury de cette soutenance de thèse.

Je tiens à remercier également :

Les membres du décanat de la Faculté des Sciences et Techniques (FAST- UB) en particulier le Doyen, le Professeur Salikou SANOGO pour leur soutien constant ;

L'ambassade de la France au Mali qui m'a attribué une bourse en alternance sans laquelle ces travaux n'auraient pas vu le jour.

Mes remerciements vont également à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, et notamment à :

Mes collègues ainsi que le corps professoral du Laboratoire de Chimie et de Méthodologie pour l'Environnement : LCME –Metz (France), Elodie CHENOT et Louis Pergaud SANDJO du LIMBP –Metz (France) ;

Mes collègues doctorants en Chimie au Mali : Baba FOFANA, Brahima DIALLO et Adama DEMBELE ;

Tous mes collègues doctorants de la coopération franco-malienne ;

L'ensemble du corps professoral de la Faculté des Sciences et Techniques ainsi que mes professeurs de l'Ecole Normale Supérieure en particulier les Professeurs Abdoulaye Salim CISSE et Mama PLEA ;

Mes promotionnaires du DER de physique chimie de l'ENSUP en particulier Mamadou COULIBALY de m'avoir guidé pour le choix d'option et pour son soutien constant durant tous ces travux ;

Mes amis d'enfance et de tous les jours Valérien MOUNKORO, Beredougou Romaric KONE (Bamako), Zéphirin DIARRA, Sanmou DIARRA à DOBWO et leurs familles respectives ;

Mon oncle Araba KONE et famille, tous les habitants du village de DOBWO ;

Mes cousins Maurice DIARRA et famille, Julien DIARRA et famille à DOBWO, Fidèle DIARRA et famille à Cuba, Antoine de Padoue DIARRA et famille, Félicien DIARRA et famille (Bamako) ;

Mes amis et collègues enseignants de l'IFM de Mopti-Sevaré ;

Christophe DIARRA et famille qui m'ont beaucoup aidé à travailler ces plantes, Noël DIARRA (OMH) et famille pour leur soutien constant ;

Aux membres de l'association des ressortissants des villages de DOBWO –SE'UY résidant à Bamako et Kati et tous ceux dont les noms ne figurent pas ici.

Veuillez recevoir mes sincères remerciements pour vos conseils et encouragement pendant les moments les plus difficiles.

ABREVIATIONS

- 3GT : flavonoides-3-glycosyltransferase
- AAPH : chlorure du 2, 2'-azobis (2-amidino-propane)
- ABTS : acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique
- ANR : anthocyanidine réductase
- ANS : anthocyanidine Synthase
- As : aurones Synthase
- CC : Chromatographie sur Colonne ouverte
- CCM : Chromatographie sur Couche Mince
- CD_3OD : méthanol deuterié
- CDCl3 : chloroforme deutérié
- CHI : chalcone isomérase
- CHR : chalcone réductase
- CHS : chalcone Synthase
- COSY : *COrrelated SpectroscopY*
- *d* : doublet
- *dd* : doublet dédoublé
- DFR : dihydroflavonol-4-reductase
- DPPH : diphényl picrylhydrazyl
- EI : ionisation par impact électronique (*Electron Impact ionization*)
- ESI : ionisation par électrospray (*ElectroSpray Ionization*)
- F3'5'H : flavonoide-3', 5'-hydroxylase
- F3H : flavanone hydroxylase
- F3'H : flavonoide-3'-hydroxylase
- FLS : flavonols Synthase
- FNS : flavones Synthase

- HMBC : *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
- HPLC : chromatographie liquide à haute performance (*High Performance Liquid Chromatography*)
- HSQC : *Heteronuclear Single Quantum Coherence*
- Hz : Hertz
- IFS : isoflavones Synthase;
- *J* : constante de couplage
- LAR : réductase de leucoanthocyanidin;
- *m* : multiplet
- *m/z* : masse / charge atomique
- MS : spectrométrie de masse (*Mass Spectroscopy*)
- NOESY : *Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY*
- ppm : partie par million
- RMN : résonance magnétique nucléaire
- RMN-^{13}C (J mod) : résonance magnétique nucléaire du carbone (en mode J modulé)
- RMN-^{1}H : résonance magnétique nucléaire du proton
- ROS : espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*)
- *s* : singulet
- SCS : secologanine synthase
- STR : Strictosidine synthase
- StS : stilbène Synthase
- TDC : tryptophane decarboxylase
- δC : déplacement chimique du carbone (en ppm)
- δH : déplacement chimique du proton (en ppm)

SOMMAIRE

INTRODUCTION

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

1. Chimie des métabolites secondaires des végétaux

1.1 Les saponines

1.2 Les alcaloïdes
1.2.1 Définition
1.2.2 Alcaloïdes pyrrolizidiniques
1.2.3 Alcaloïdes tropaniques
1.2.4 Alcaloïdes quinoléïques
1.2.5 Rôle des alcaloïdes

1.3 Les composes phénoliques
1.3.1 Les phénols simples
1.3.2 Les acides phénoliques
1.3.3 Les stilbènes
1.3.4 Les Flavonoïdes
1.3.5 Les tanins hydrolysables et condensés
1.3.6 Les coumarines
1.3.7 Les lignanes et les lignines
1.3.8 Les xanthones
1.3.9 Rôle des flavonoïdes

2. Monographie des plantes étudiées

2.1 *Anogeissus leiocarpus* (DC.) Guill. et Perrot.
2.1.1 Etude Botanique
2.1.2 Systématique et Caractères morphologiques
2.1.3 Distribution / Habitat
2.1.4 Utilisations en médecine traditionnelle
2.1.5 Données pharmacologiques et toxicologiques
2.1.6 Constitution chimique

2.2 *Cissus populnea* Guill. et Perr. (Vitidaceae)
2.2.1 Etude Botanique
2.2.2 Systématique et Caractères morphologiques
2.2.3 Distribution / Habitat
2.2.4 Utilisations en médecine traditionnelle
2.2.5 Données pharmacologiques et toxicologiques
2.2.6 Constitution chimique

2.3 *Mitragyna inermis* (Willd.)O. Ktze.
2.3.1 Etude Botanique
2.3.2 Systématique et Caractères morphologiques
2.3.3 Distribution / Habitat
2.3.4 Utilisations en médecine traditionnelle
2.3.5 Données pharmacologiques et toxicologiques
2.3.6 Constitution chimique

2.4 *Terminalia macroptera* Guill. et Perrott. (Combretaceae)
2.4.1 Etude Botanique
2.4.2 Systématique et Caractères morphologiques
2.4.3 Distribution / Habitat
2.4.4 Utilisations en médecine traditionnelle
2.4.5 Données pharmacologiques et toxicologiques
2.4.6 Constitution chimique

2.5 *Vepris heterophylla* R. Let.
2.5.1 Etude Botanique
2.5.2 Systématique et Caractères morphologiques
2.5.3 Distribution / Habitat
2.5.4 Utilisations en médecine traditionnelle
2.5.5 Données pharmacologiques et toxicologiques
2.5.6 Constitution chimique

2.6 *Zizyphus mucronata* Willd.
2.6.1 Etude Botanique
2.6.2 Systématique et Caractères morphologiques
2.6.3 Distribution / Habitat
2.6.4 Utilisations en médecine traditionnelle
2.6.5 Données pharmacologiques et toxicologiques
2.6.6 Constitution chimique

3. L'activité antioxydante

Introduction

3.1 Quantification des polyphénols
3.1.1 Les méthodes spectrophotométriques
3.1.2 Analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

3.2 Méthodes de détermination de l'activité antioxydante
3.2.1 Le test d'ABTS
3.2.2 Le test du DPPH
3.2.3 Le test TPTZ

PARTIE II : ETUDES EXPERIMENTALES

1. Enquête ethnobotanique

Introduction

1.1 Description et Choix des localités de l'enquête

1.2 Méthodologie

1.3 Résultats de l'enquête ethnobotanique

1.4 Discussions des résultats de l'enquête ethnobotanique
1.4.1 Maladies et parties de plantes
1.4.2 Voies d'administration et sûreté

2. Isolement et identification structurale de deux alcaloïdes de *Vepris heterophylla* R Let. (Rutaceae)
2.1 Extraction des alcaloïdes totaux
2.2 Isolement et caractérisation
2.3 Identification structurale par spectroscopie RMN 2D
2.3.1 Analyse par Résonance Magnétique Nucléaire 2D (^{1}H, ^{13}C)
2.3.2 Composé A_1
2.3.3 Composé A_2

3. Quantification et caractérisation des polyphénols et des flavonoïdes

3.1 Méthodes spectrophotométriques
3.1.1 Matériel végétal
3.1.2 Réactifs chimiques
3.1.3 Préparation des extraits
3.1.4 Détermination de la teneur en polyphénols totaux
3.1.5 Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux
3.1.6 Résultats

3.2 Caractérisation et quantification de quelques polyphénols et flavonoïdes par HPLC
3.2.1 Préparation des solutions standards - courbes de régression
3.2.2 Appareil et condition d'analyse des polyphénols
3.2.3 Résultats
3.2.4 Analyse statistique

3.3 Interprétation et discussion

4. Détermination de l'activité antioxydante des plantes

4.1 Test d'ABTS

4.2 Test du DPPH

4.3 Résultats

Bibliographie

Conclusion générale et perspectives

Annexe I : Questionnaire de l'enquête ethnobotanique

Annexe II : Phytochemical composition and antioxidant capacity of three Malian medicinal plant parts

Annexe III : Identification, Quantitative Determination, and Antioxidant properties of Polyphenols of Some Malian medicinal plant parts used in folk medicine.

Introduction

Les plantes ont été utilisées dans la médecine traditionnelle pendant plusieurs millénaires. La curiosité et le principe innés de la doctrine de signature préconisée par Paracelsus (1493–1541) qui, indiquant la possibilité d'identification des particularités et vertus de chaque plante par sa " signature " (forme, couleur), ont guidé les premiers hommes dans le choix des nouvelles préparations devant être testées (Rodriguez, 2007). Dans les dernières décennies il y a eu un intérêt croissant pour l'étude des plantes médicinales et leur utilisation traditionnelle dans différentes régions du monde (Muthu et al., 2006). L'enquête ethnobotanique s'est avérée une des approches la plus fiable pour la découverte de nouveaux médicaments. Ainsi le maprouneacin (*Maprounnea africana*) utilisé comme agent antidiabétique, le taxol (*Breviflora taxus*) utilisé comme drogue antitumorale, l'artemisinine (*Artemisia annua*) utilisé comme composé antipaludique efficace contre toutes les souches résistantes de *Plasmodium* ont été découverts à partir de plantes et sont directement employés (Ajibesin et al., 2008). Il y a environ près de 240 000 à 300 000 espèces de plantes à fleur sur terre. Moins de 10% de ces espèces auraient été étudiés scientifiquement pour leurs propriétés pharmacologiques (Diallo, 2000; Anthony et al., 2005).

Dans le cadre de la valorisation de la médecine traditionnelle, il y a eu un intérêt croissant ces dernières décennies dans l'étude des plantes médicinales et leurs utilisations traditionnelles dans différentes régions du monde. Aujourd'hui, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près de 80% des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire. Des avantages économiques considérables dans le développement de la médecine traditionnelle et dans l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement des diverses maladies ont été constatés (Muthu et al., 2006) d'où la nécessité d'une valorisation de la médecine traditionnelle.

La situation sanitaire au Mali, qui se situe en Afrique Occidentale, est caractérisée par une prédominance des infections, des maladies parasitaires et alimentaires (Inngjerdingen et al., 2004). On y trouve également d'importantes endémies parasitaires telles que le paludisme et la bilharziose (Bah et al., 2006).

Les principales difficultés qui accompagnent le traitement des maladies par les médicaments conventionnels sont : leur inaccessibilité en particulier à cause de leur coût élevé, la résistance progressive de l'agent pathogène vis-à-vis des substances actives et la manifestation d'effets secondaires sévères voire même toxique dans certains cas. Au Mali, le coût du médicament en tant que produit générique est toujours trop cher pour la majorité des populations le rendant ainsi inaccessible pour la gestion de la schistosomiase en particulier la schistosomiase intestinale (Bah et al., 2006). Sans énumération exhaustive de cas, plusieurs résistances ont été rapportées, en particulier celle du *Plasmodium falciparum* face aux médicaments standards antipaludiques (Kraft et al., 2002 ; Portet et al., 2007). Des suspicions de résistance des parasites de la bilharziose contre le praziquantel sont rapportées (Soliman & Ibrahim, 2005). En terme de contre effets, le métronidazole provoquerait maux de tête et nausées ; il serait même cancérogène, tératogène (Calzada et al., 2006). De même, la leishmaniose, un des problèmes importants de santé publique selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) entraînant une morbidité et une mortalité significatives est cliniquement traitée par les composés de l'antimoine pentavalent qui seraient toxiques et présenteraient des effets secondaires. Les médicaments alternatifs, l'amphotéricine B et la pentamidine présentent aussi des effets secondaires indésirables (Iranshahi et al., 2007 ; Filho et al., 2008). La gestion classique des douleurs accompagnant les diverses maladies utilise principalement les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et les opiacés auxquels appartiennent respectivement l'acide salicylique et la morphine. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens manifestent des effets secondaires tels que lésions et irritations gastro-intestinales, toxicité rénale tandis que l'usage des opiacés est réservé aux douleurs sévères à cause de leurs effets secondaires adverses : dépression respiratoire, dépendance, sédation (Schenone et al., 2006).

Le Mali, à l'instar des autres pays africains pour valoriser la médecine traditionnelle, a créé un institut de phytothérapie en 1968, ce dernier aujourd'hui est devenu le département de la médecine traditionnelle (DMT), organe de l'institut national de recherche en santé publique (INRSP- Bamako). Il est le premier établissement de recherches pour l'étude des plantes médicinales au Mali et est un centre partenaire de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Il a pour but d'enregistrer les tradithérapeutes, d'améliorer la connaissance des plantes médicinales traditionnelles et de développer des Médicaments Traditionnels Améliorées (MTA).

- *Enregistrement des tradithérapeutes*

Un guérisseur traditionnel est défini comme étant une personne ayant une compétence pour la pratique de la médecine traditionnelle ; l'expression médecine traditionnelle se rapportant aux pratiques, méthodes, savoirs et croyances en matière de santé qui impliquent l'usage à des fins médicales de plantes, de parties d'animaux et de minéraux, de thérapies spirituelles, de techniques et d'exercices manuels – séparément ou en association – pour soigner, diagnostiquer et prévenir les maladies ou préserver la santé (OMS, 2003). L'enregistrement officiel d'un tradithérapeute se concrétise par la remise d'une carte d'identification.

Le regroupement des tradithérapeutes en associations à pour but essentiel de promouvoir la médecine traditionnelle. Les tradithérapeutes ainsi organisés peuvent également jouer un rôle pour la préservation de la diversité de la faune et la flore locale (Inngjerdingen et al., 2004 ; Togola et al., 2005). Ces associations de tradithérapeutes en collaboration avec le DMT ont réussi à mettre en place des centres de séchage, de stockages de matières premières afin de rationaliser leur exploitation.

- *Connaissance des plantes médicinales et leurs utilisations traditionnelles*

Au Mali, les détenteurs du savoir sur les plantes médicinales sont les tradithérapeutes, le recensement des plantes médicinales ainsi que leurs utilisations traditionnelles ne peuvent se faire qu'avec leur concours. La collaboration des diverses associations de tradithérapeutes avec le DMT a permis d'organiser des entretiens et ainsi de collecter des informations enregistrées ensuite sur des fiches d'enquête ou dans un questionnaire. Il est important de signaler que tous les tradithérapeutes qui ont accepté de participer aux enquêtes ont reçu en dédommagement des noix de cola et une somme de 2000 FCFA.

- *Développement de Médicaments Traditionnels Améliorées (MTA)*

Plusieurs plantes médicinales ont été étudiées dans le laboratoire du DMT en utilisant les méthodes classiques de phytochimie, de pharmacologie et de toxicologie. Les résultats issus de ces études ont permis de développer des formules pharmaceutiques sous formes normales, d'infusions, d'onguents ou de sirops. Ces nouvelles formules pharmaceutiques démunies de toxicité qui possèdent des dates de péremption déterminées sont appelées Médicaments Traditionnelles Améliorées (MTA) ; ils sont au nombre de douze dont sept sont reconnus comme médicaments essentiels. Ces MTA sont : *Balembo* contre la toux, *Dysenterial* contre la dysenterie, *Gastrosedal* contre les ulcères et les gastrites, *Hepatisane*

contre l'hépatite, *Laxia-cassia* contre la constipation, *malarial* contre le paludisme et *Psorospermine* contre la dermatose. Ils sont vendus dans les pharmacies au Mali.

En raison de la prédominance du développement de la résistance du *Plasmodium falciparum* à la chloroquine et à d'autres drogues antipaludiques standards, le traitement du paludisme devient de plus en plus difficile, alors que dans les années 1960, l'organisation mondiale de la santé avait prévu l'éradication de la maladie dans un avenir proche. Le paludisme demeure la maladie parasitaire la plus importante dans le monde avec près de 300 - 500 millions de cas cliniques par an et une mortalité correspondante de 2 - 3 millions de décès par an dont les 80% en Afrique. Environ 40% de la population mondiale vivent dans les pays endémiques du paludisme (Kraft et al., 2002 ; Sanon et al., 2003 ; Dolabela et al., 2008).

Le Mali, pour mieux contrôler le paludisme, a créé le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) connu notamment à travers la promotion de moustiquaires imprégnées, l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP) qui à travers le département médecine traditionnelle DMT a déjà mis au point un médicament antipaludique, le malarial ; le centre de recherche et de formation sur le paludisme (Malaria research and training center: MRTC) œuvre pour une mise au point d'un vaccin contre le paludisme.

Malgré tous ces efforts, le paludisme demeure encore un problème prioritaire de santé publique dans les pays en développement en particulier au Mali de par sa fréquence, sa gravité, particulièrement pour les couches vulnérables de la population (mères et enfants) et de par son impact socio-économique (PNLP, 2005).

La principale stratégie de l'OMS pour lutter contre le paludisme est l'usage d'antipaludéens efficaces pour réduire la mortalité, notamment chez les enfants. Des molécules (quinine, artémesine) et préparations (malarial) antipaludiques efficaces sont déjà obtenues à partir de plantes médicinales.

De plus, il apparaît clairement que la douleur et les réactions inflammatoires qui accompagnent la plupart des maladies constituent un problème très important nécessitant un traitement. La réaction inflammatoire est un mécanisme de défense qu'oppose l'organisme en réponse à une blessure ou à une invasion microbienne. La fréquence élevée de ces deux phénomènes et les effets secondaires liés à leurs gestions par les médicaments conventionnels déjà existants (Okoli et Akah, 2004 ; Schenone et al., 2006) incitent le monde scientifique à

chercher de nouvelles sources médicamenteuses qui produiraient de nouvelles molécules efficaces, accessibles aux populations et sans effets secondaires.

Compte tenu de la variété et de la richesse de la flore malienne, ainsi que du nombre restreint de plantes locales ayant fait l'objet d'investigation clinique, il nous a semblé intéressant d'étudier quelques unes de ces plantes déjà utilisées en médecines traditionnelle.

Au cours de ce travail, nous avons choisi six plantes médicinales : *Anogeissus leiocarpus* (DC.) Guill. et Perrot (Combretaceae), *Mitragyna inermis* (Willd.) O. Ktze. (Rubiaceae), *Terminalia macroptera* Guill. et Perrott (Combretaceae), *Vepris heterophylla* R. Let. (Rutaceae), *Cissus populnea* Guill. et Perr. (Vitidaceae), et *Zizyphus mucronata* Willd. (Rhamnaceae), les quatre premières pour leur action antipaludique (Von Maydell, 1983 ; Malgras, 1992 ; Burkill, 1997 ; Sanon et al, 2003) et les deux dernières pour leurs activités anti-inflammatoires et antalgiques potentielles.

Pour mieux comprendre l'activité de nos plantes, nous nous sommes intéressés aux propriétés antioxydantes de leurs extraits. En effet, l'activité antioxydante semble être le principe d'action d'un certain nombre de produits pharmaceutiques. Au cours de ce processus, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) libérées par l'organisme humain au cours des diverses attaques sont éliminées ou piégées ; les dommages causés sont réparés. Les molécules douées de telles propriétés sont les antioxydants dont le rôle dépasse de loin celui d'un simple piégeur ou de suppresseur de radicaux libres. Ils sont efficaces dans la prévention et ou dans le traitement des affections parasitaires et non parasitaires. Les antioxydants existent dans les plantes médicinales et alimentaires tels que les composés phénoliques, appartenant à la classe des composés dits de métabolisme secondaire manifestent un spectre de propriétés pharmacologiques telles que : antibactériennes, anti-inflammatoires, vasodilatoires, anticancerigènes, antithrombique anti-atherogeniques et analgésique parmi tant d'autres. Ils exercent ces propriétés en tant qu'antioxydants (Gómez-Caravaca et al., 2006 ; Wollgast & Anklam, 2000).

Ce travail est le fruit d'une collaboration entre la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) de l'Université de Bamako, le Département de la Médecine Traditionnelle (DMT) et le Laboratoire de Chimie et de Méthodologie pour l'Environnement (LCME) de l'Université Paul Verlaine-Metz (UPV-M France).

Dans la première partie de ce mémoire, nous rapporterons une étude bibliographique, consacrée à:

- à la présentation quelques métabolismes secondaires des plantes,
- à une monograpghie de nos plantes d'intérêt,
- à la description des méthodes de caractérisation et d'évaluation de l'activité antioxydante de nos extraits végétaux.

Dans la deuxième partie, nous rapporterons les résultats de notre enquête ethnobotanique, puis nous nous intéresserons à l'isolement et à l'identification, par spectroscopies SM et RMN 2D, de deux alcaloïdes issus de *Vepris heterophylla* et enfin, nous quantifierons par spectroscopie UV-visible les polyphénols et les flavonoïdes totaux et nous caractériserons par HPLC quelques uns d'entre eux avant de décrire l'activité antioxydante des extraits de nos six plantes médicinales.

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouveaux Médicaments Traditionnels Améliorés (MTA) d'origine naturelle en l'occurrence des plantes médicinales pour combattre, en particulier les maladies constituant un problème de santé publique, préoccupation essentielle du DMT.

Partie I

Synthèse bibliographique

Chapitre 1

Chimie des métabolites secondaires des végétaux

Introduction

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. Ils sont classés en quatre grandes catégories : les glucides, les lipides, les acides aminés et les acides nucléiques.

Les métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils y jouent différents rôles, dont celui de moyen de défense contre les agressions externes. Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante.

Les produits du métabolisme secondaire sont en très grand nombre, plus de 200.000 structures définies (Hartmann, 2007) et sont d'une variété structurale extraordinaire mais sont produits en faible quantité. Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique. Les composés phénoliques, les terpénoïdes, les stéroïdes et les alcaloïdes sont des exemples de métabolites secondaires ; ils ont de nombreuses applications pharmaceutiques.

Les métabolites secondaires prénylés, du point de vue pharmacologique sont généralement plus efficaces que leurs analogues. La prénylation, fixation d'une chaîne latérale (pentenyle, geranyle et farnesyle) à une molécule acceptante occupe une place importante dans la biosynthèse d'un spectre des métabolites secondaires aromatiques à propriétés pharmacologiques reconnues à travers les différentes classes de ces composés. Ils constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anticancéreuses (Epifano et al., 2007).

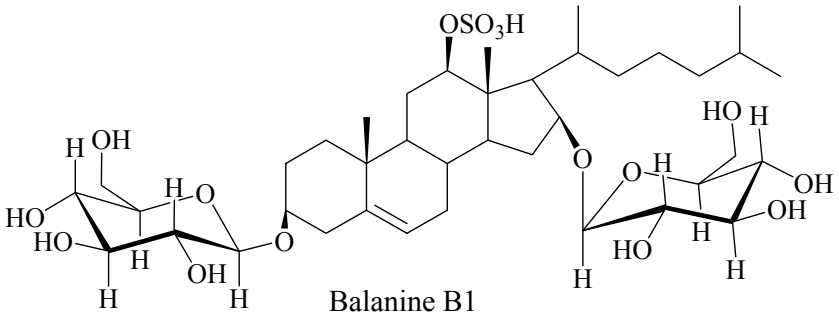
L'usage et le développement des techniques spectrales : la résonance magnétique nucléaire (RMN) à une ou à plusieurs dimensions, la spectroscopie de masse (SM), la spectroscopie UV-Visible et la chromatographie liquide haute performance (HPLC) permettent de préciser et de quantifier un plus grand nombre de structures des métabolites secondaires.

Dans ce chapitre, nous présenterons à travers des exemples de molécules parmi lesquelles figurent les prénylées, l'aspect structural et biosynthétique des saponines, des alcaloïdes et des composés phénoliques qui constituent les catégories les plus importantes des métabolites secondaires.

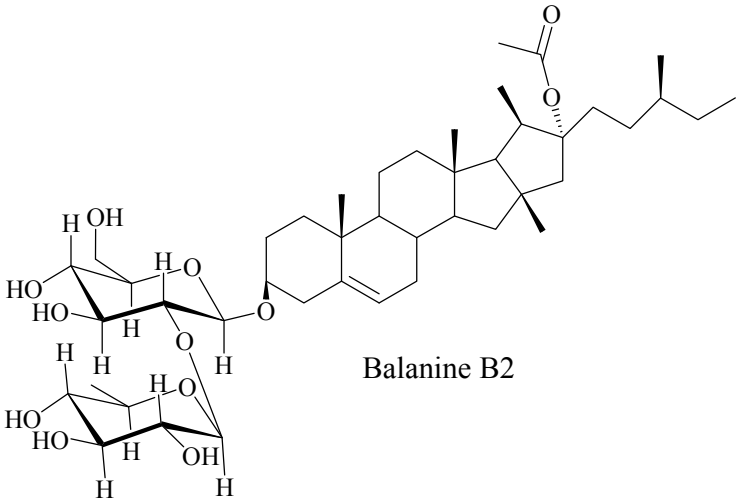
1.1 Les saponines

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 à plusieurs sucres. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires en leurs molécules explique leur comportement moussant en solution aqueuse. Comme définition, on dirait qu'une saponine est un glycoside de stéroïde ou de triterpène. Ainsi on distingue fondamentalement, les saponines stéroïdiques et les saponines triterpéniques dérivant tous deux, biosynthétiquement de l'oxydosqualène.
Ils manifestent des propriétés hémolytiques, antimicrobiennes, insecticides, molluscicidales (Vincken et al., 2007), anti-inflammatoires et antalgiques (Speroni et al., 2005).

Les balanines (B1, B2) isolées des écorces de tronc de *Balanites aegyptiaca* L. Delile (Zygophyllaceae) sont des exemples de saponines stéroïdiques à propriétés anti-inflammatoires et antalgiques (Speroni et al., 2005).

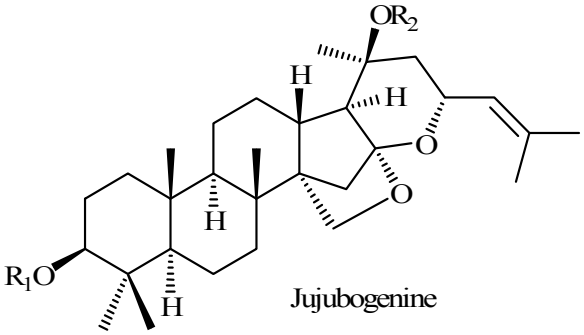


Balanine B1



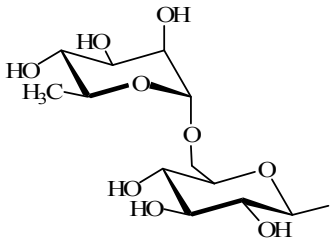
Balanine B2

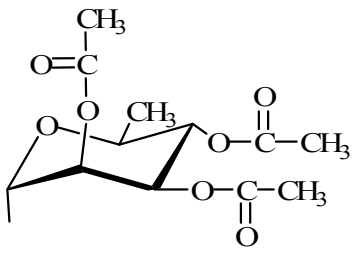
Les damaranes isolées de *Zyziphus lotus* donc de la famille des Rhamnaceae sont des exemples de saponines triterpéniques (Maciuk et al., 2004)



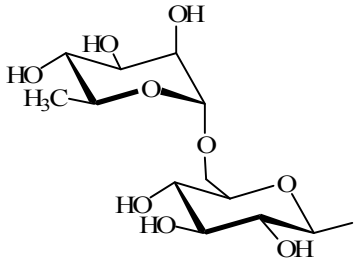
Jujubogenine

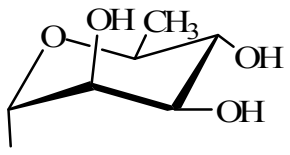
R_1 R_2





3-*O*- α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyljujubogenin-20-*O*-(2,3,4-*O*-triacetyl)-α-L rhamnopyranoside





3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyljujubogenin-20-*O*-α-L-rhamnopyranoside

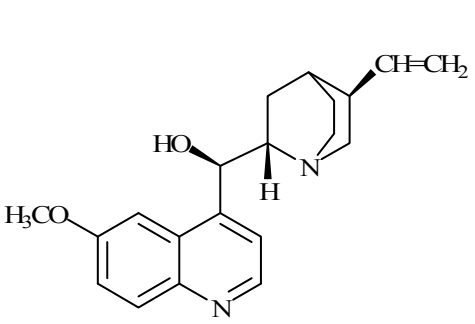
1.2 Les alcaloïdes

1.2.1 Définition

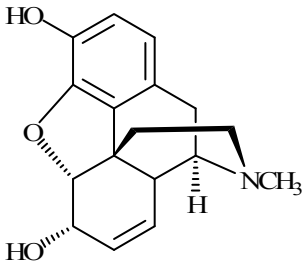
Le terme d'alcaloïde a été introduit par W. Meisner au début du XIXème. La définition admise des alcaloïdes est celle donnée par Winterstein et Trier en 1910.

Un alcaloïde est un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose (Bruneton, 1999 ; Zenk et Juenger, 2007).

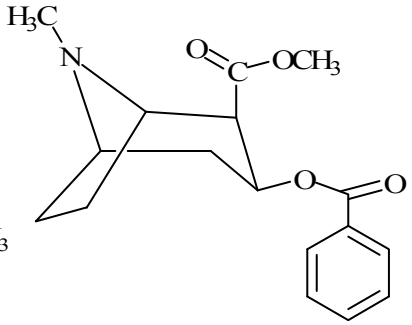
Représentant un groupe fascinant de produits naturels, ils constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec près de 10 000 à 12 000 différentes structures (Roberts & Wink, 1999 ; Stöckigt et al., 2002). Ci-dessous se trouvent représentées les molécules d'alcaloïdes les plus courantes.



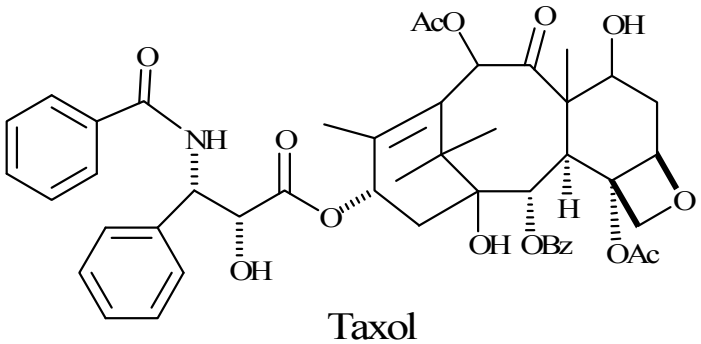
Quinine



Morphine



(2R, 3S)-Cocaïne



Taxol

Du point de vue structural, nous présenterons les alcaloïdes pyrrolizidiniques, les alcaloïdes tropaniques pour leur abondance d'une part et les alcaloïdes quinoléiques que nous avons isolés des feuilles de *Vepris heterophylla*.

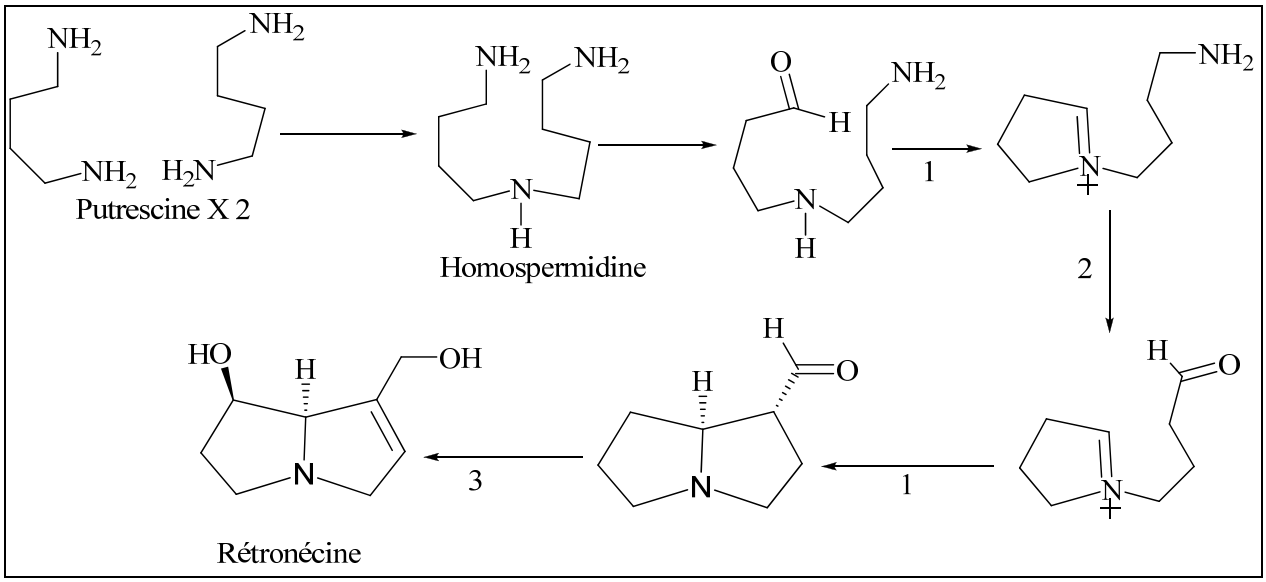
1.2.2 Les alcaloïdes pyrrolizidiniques

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques représentent un excellent système pour étudier non seulement l'aspect phytochimique et biochimique des métabolites secondaires des plantes

mais également leur évolution moléculaire. Plus de 400 structures d'alcaloïdes pyrrolizidiniques sont connues (Frölich et al., 2006). On estime que le nombre d'espèces contenant ces alcaloïdes est supérieur à 6000 ou 3% des plantes à fleur dans le monde entier. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont caractéristiques des Asteraceae, des Boraginaceae, des Leguminaceae et des Orchidaceae; 95% des espèces qui contiennent ces alcaloïdes appartiennent à une de ces quatre familles [Réf].

Ces alcaloïdes sont des toxines qui manifestent des propriétés hepatotoxique, pneumotoxique, mutagène, cancérigène et embryotoxique. Dans certains cas, leur hémisynthèse a permis d'améliorer quelques propriétés telles que : virustatique, antileucémique, anesthésique, hypotensive, antispasmodique, neuromusculaire et d'assurer le blocage ganglionique (Alali et al., 2008).

Du point de vue structural les alcaloïdes pyrrolizidiniques, dérivent du méthyl pyrrolizidine composé de deux cycles à cinq chaînons avec l'azote en tête de pont. La biosynthèse du bicycle (nécine) est représentée sur le schéma 1:



1 **: Désamination oxydative ;** 2 **: Formation d'une base de Schiff ;** 3 **: réaction de Mannich**

Schéma 1: Biosynthèse de la retronécine (Bruneton, 1999).

1.2.3 Les alcaloïdes tropaniques

Plus de 200 structures d'alcaloïdes tropaniques isolés de differentes familles de plantes seraient connus (Dräger, 2002). L'ornithine et l'arginine sont les précurseurs du noyau tropanique. Ceux-ci, par décarboxylation, conduisent à la putrescine qui par putrescine méthyltransférase (PMT) aboutit à la formation de la N-méthylputrescine. L'étape suivante est une désamination oxydative transformant la N-méthylputrescine en N-

méthylaminobutanal qui, spontanément se cyclise pour donner le sel de N-méthylpyrrolillium. A ce stade, l'acétate apporte les carbones supplémentaires nécessaires à l'élaboration du cycle pipéridinique du tropane comme illustré dans le schéma 2 (Bruneton, 1999 ; Heim et al., 2007). Du point de vue pharmacologique, les alcaloïdes tropaniques sont des agents anticholinergiques.

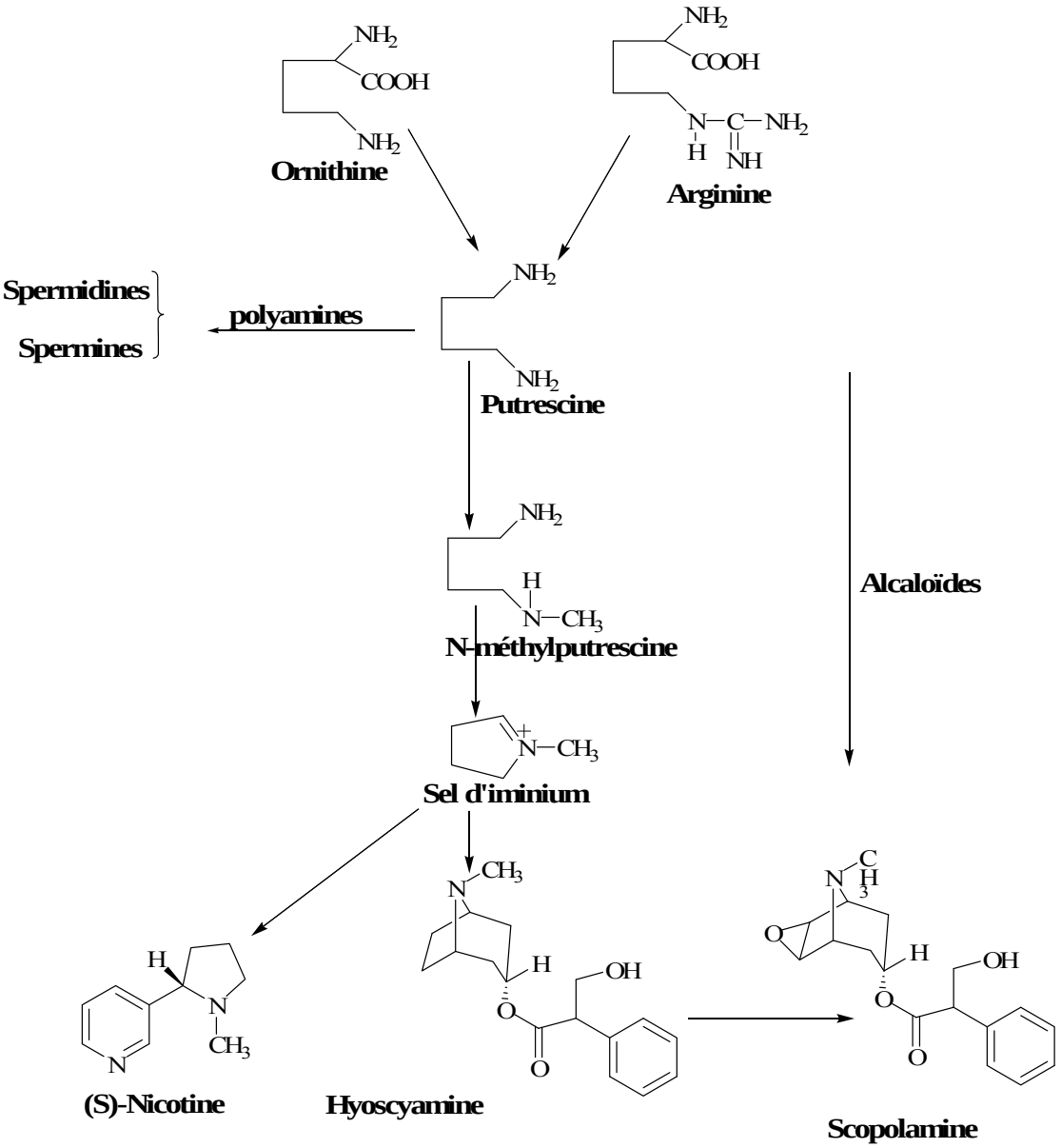
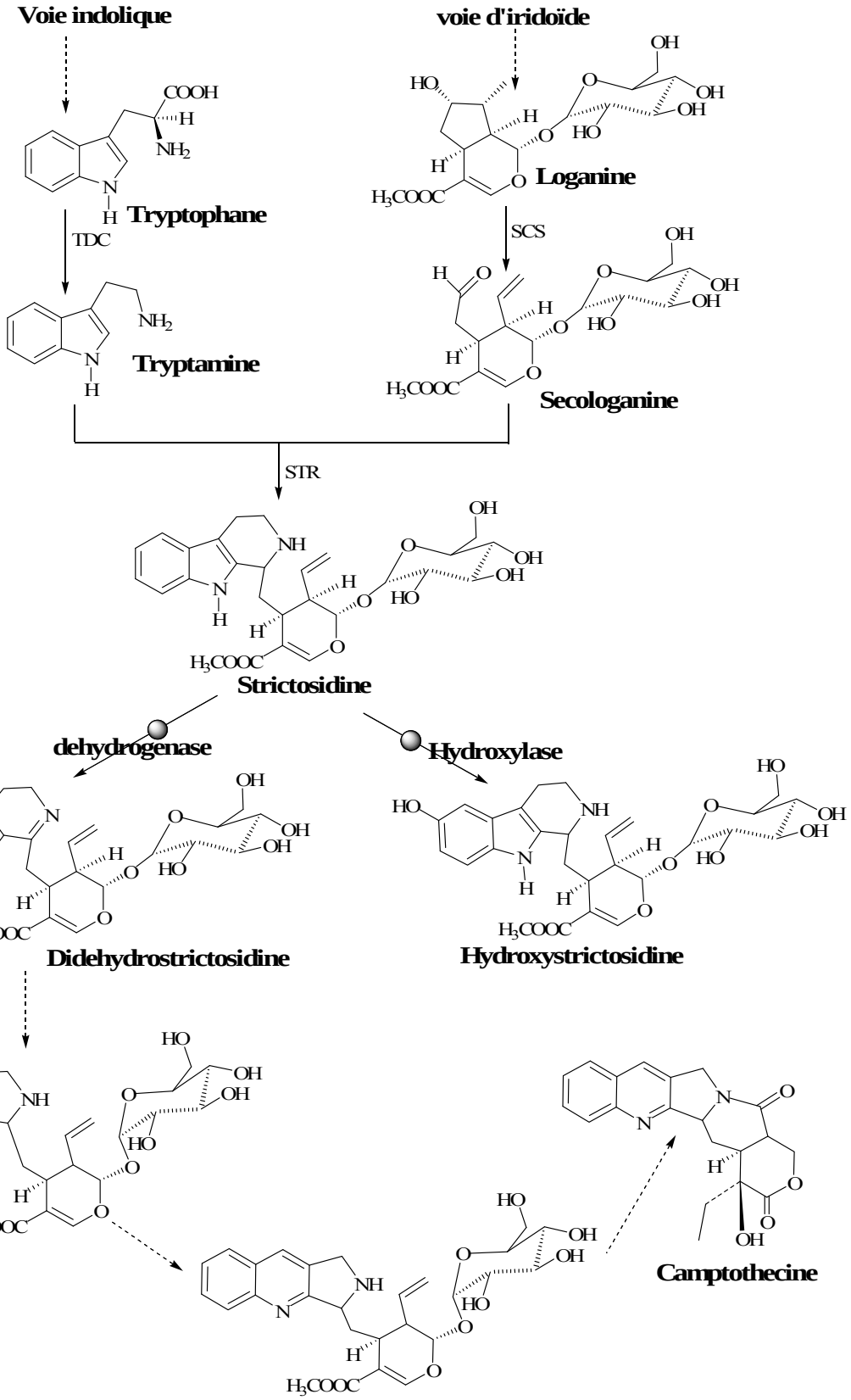


Schéma 2: Biosynthèse des alcaloïdes tropanique et pyridinique (Moyano et al., 2002)

1.2.4 Les alcaloïdes quinoléiques

La condensation de la tryptamine avec la secologanine forme la strictosidine, intermédiaire central dans la formation de plusieurs alcaloïdes avec comme enzyme clé la strictosidine synthase. La strictosidine par déshydrogénase conduit à la didéhydrostrictosidine dont la biotransformation en plusieurs étapes aboutit à la formation de la camptothecine, qui

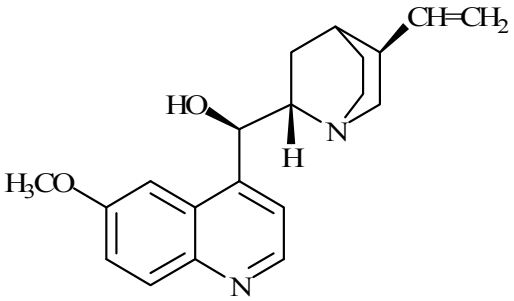
est un alcaloïde quinoléique (schéma 3). Des alcaloïdes quinoléiques se trouvent dans les écorces de *Cinchona.*



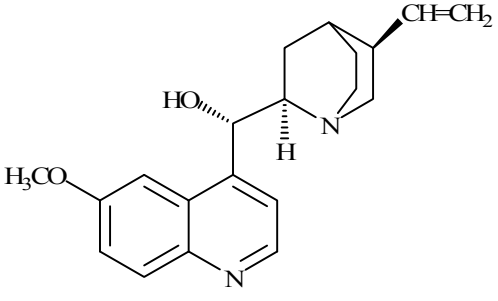
TDC, tryptophane decarboxylase; SCS : secologanine synthase; STR: strictosidine synthase. Les flèches en pointillé signifient plus d'une étape (Silvestrini et al.2002).

Schéma 3 : Biosynthèse de la camptothecine (alcaloïdes quinoléique)

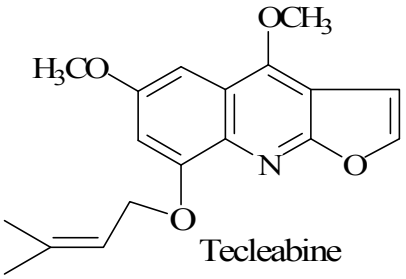
Les alcaloïdes furoquinoléiques constituent un sous groupe des alcaloïdes quinoléiques ; ils sont caractéristiques des rutaceae (Ayafor et al., 1982 ; Bhattacharyya *et al*., 1984 ; Al-Rehaily et al., 2003).



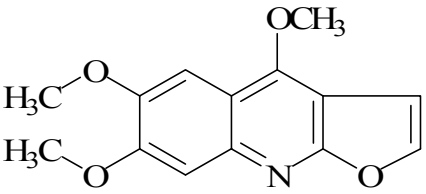
Cinchonidine



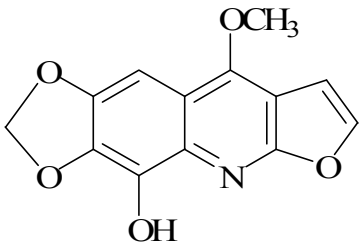
Quinidine



Tecleabine



Kokusaginine



Tecléine

1.2.5 Rôle des alcaloïdes

Si dans les plantes, les alcaloïdes en tant que composés du métabolisme secondaire jouent un rôle écologique de défense contre des herbivores, ils trouvent cependant plusieurs applications pharmaceutiques chez l'homme (McCalley (2002), Silvestrini et al. (2002), Stöckigt et al. (2002)) :

- Antitumoraux : vincaleucoblastine, vincristine, taxol, camptothecine
- Antalgiques : morphine, codeïne
- Spasmolytiques : tubocurarine et papaverine,
- Vasodilatateurs : vincamine et ajmalicine,

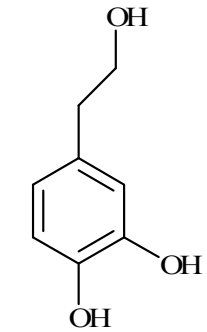
- Emétiques : émétine,
- Antitussifs : codéine,
- Antiarythmiques : quinidine et ajmaline,
- Antipaludiques : quinine
- Ils sont également des agents de traitement de la maladie d'Alzheimer : galanthamine.

1.3 Les composes phénoliques

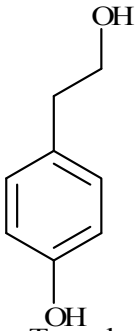
Près de 8000 composés naturels appartiennent à cette famille; ils ont en commun un noyau benzénique portant au moins un groupement hydroxyl. Selon le nombre d'unités phénoliques présents, on les classe en composés phénoliques simples et polyphénols. Par abus, on les appelle indifféremment composés phénoliques ou polyphénols et comprennent essentiellement les phénols simples, les acides phénoliques, les stilbènes, les flavonoïdes, les tanins hydrolysables et condensés, les coumarines, les lignanes les lignines et les xanthones (Stalikas, 2007).

1.3.1 Les phénols simples

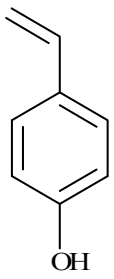
Ceux sont les composés renfermant une ou plusieurs unités phénoliques sans d'autre fonction particulière impliquant le(s) noyau(x) benzénique(s) comme le 3-hydroxytyrosol, le tyrosol, le 4-vinylphénol.



3-hydroxytyrosol



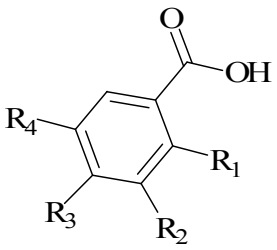
Tyrosol



4-vinylphénol

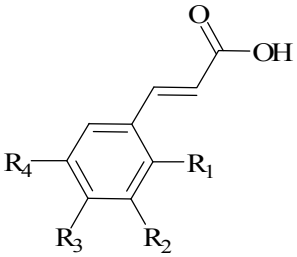
1.3.2 Les acides phénoliques

Ce sont les dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique. Ils sont représentés dans les tableaux 1 et 2



R1	R2	R3	R4	Nom de composés
H	H	H	H	Acide benzoïque
OH	H	H	H	Acide salicylique
H	H	OH	H	Acide parahydroxybenzoïque
H	OCH_3	OH	H	Acide vanilique
H	OH	OH	OH	Acide gallique (acide trihydroxy di-méta parabenzoïque)
H	OH	OH	H	Acide 3, 4-dihydroxybenzoïque (acide protocatéchique
H	OCH_3	OH	OCH_3	Acide syringique
OH	H	H	OH	Acide gentisique
H	OCH3	OCH3	H	Acide veratrique

Tableau 1 : Dérivés de l'acide benzoïque



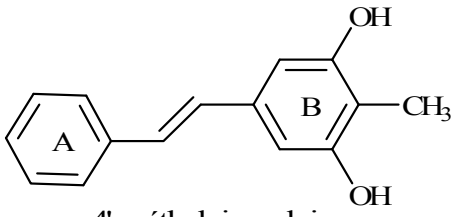
R1	R2	R3	R4	Nom de composés
H	H	H	H	Acide cinnamique
OH	H	H	H	Acide ortho coumarique

H	OH	H	H	Acide meta-coumarique
H	H	OH	H	Acide para-coumarique
H	OCH_3	OH	H	Acide ferulique
H	OCH_3	OH	OCH_3	Acide sinapique
H	OH	OH	H	Acide caféique

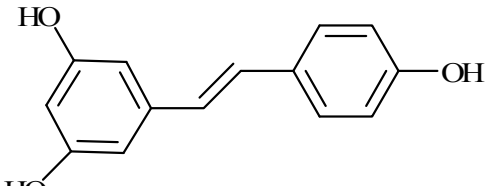
Tableau 2 : Dérivés de l'acide cinnamique

1.3.3 Les stilbènes

Ce sont les composés ayant comme structure de base le 1,2-diphenylethylène (C_6-C_2-C_6) dont quelques représentants sont :



4'-méthylpinosylvine



(E)-3,4',5-trihydroxystilbène,

Biosynthétiquement, ils dérivent de la condensation partielle d'acides propanoïques (acides en C_9) sous leur forme active avec trois moles de malonate (C_6).

1.3.4 Les Flavonoïdes

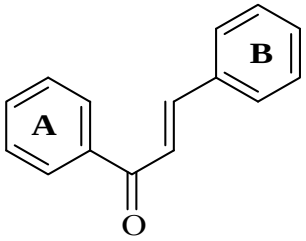
Près de 6500 flavonoïdes repartis en 12 classes sont connus (De Rijke et al, 2006) et leur nombre ne cesse d'accroître. Par définition, ce sont les composés qui ont en commun la structure du diphényl propane C_6-C_3 C_6 ; les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C (Wollgast & Anklam, 2000). L'existence des différentes classes structurales des flavonoïdes serait fonction des modifications de l'hétérocycle C.

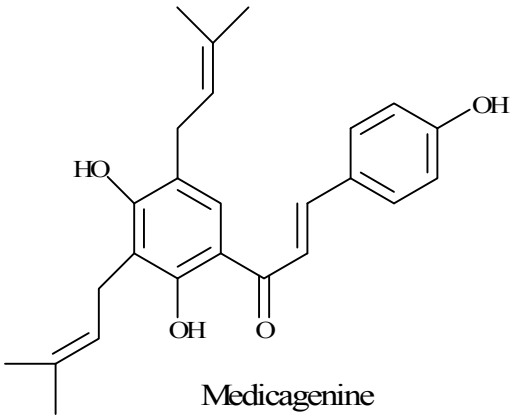
Représentation structurale

Les différentes classes des flavonoïdes sont résumées dans le tableau 3 :

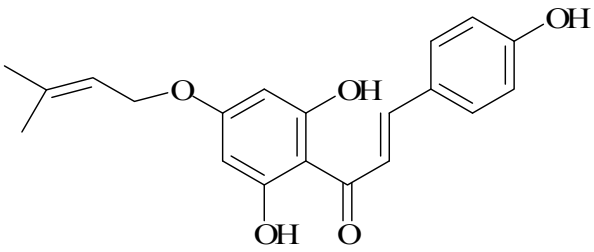
Groupe de flavonoïdes	Structure de base	Exemples

Chalcones



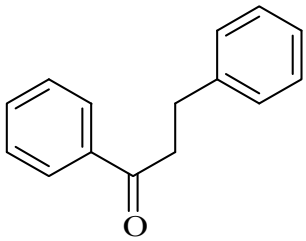


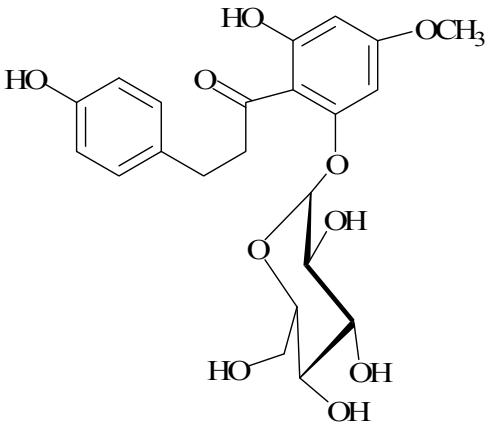
Medicagenine



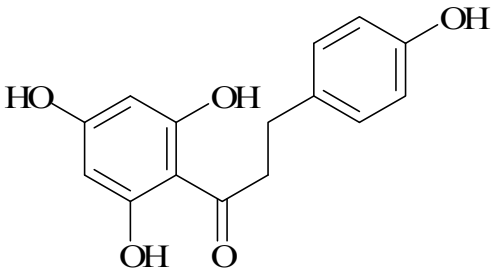
-2 ,4,6 trihydroxy-4 -O-isopentenyl chalcone

Dihydrochalcones



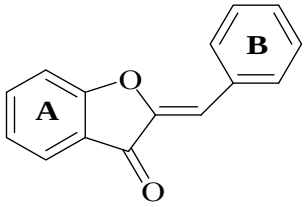


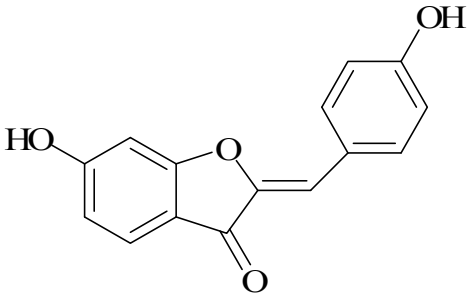
2',4-dihydroxy-4 -méthoxy-6 -O-ß-glucopyranoside dihydrochalcone



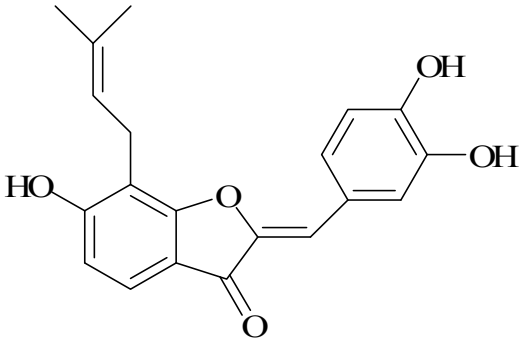
Phloretine

Aurones



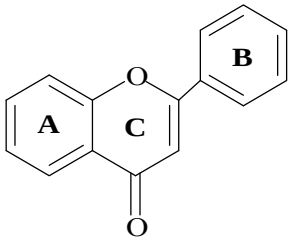


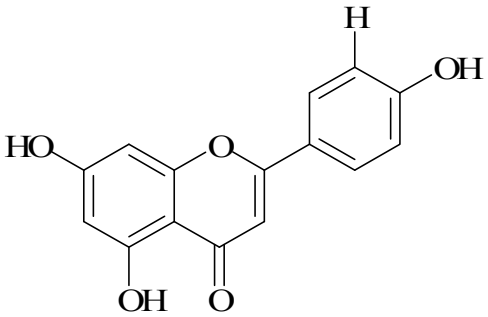
Hispidol



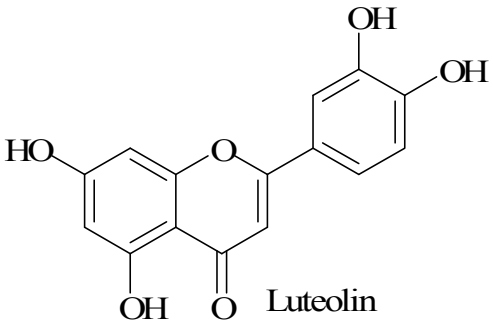
Licoagroaurone

Flavones



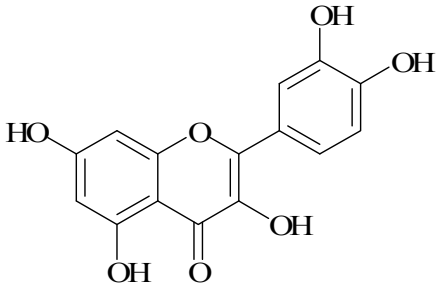


Apigenin

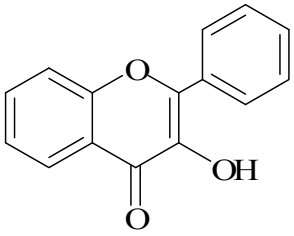


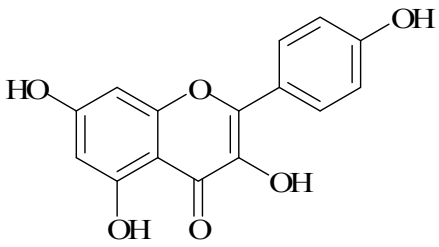
Luteolin

Flavonols

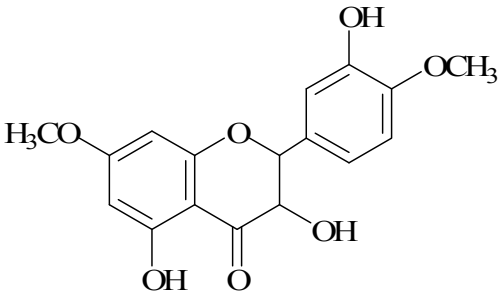


Quercétine





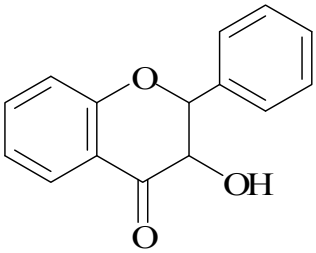
Kaempférol

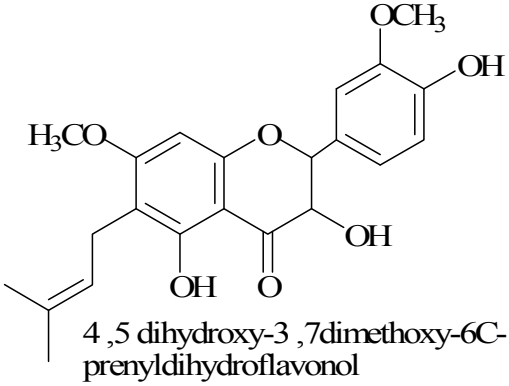


-3 ,5- dihydroxy
-4 ,7- dimethoxydihydroflavonol

Flavanonols

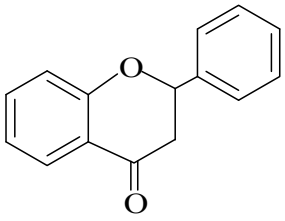
(dihydroflavonols)

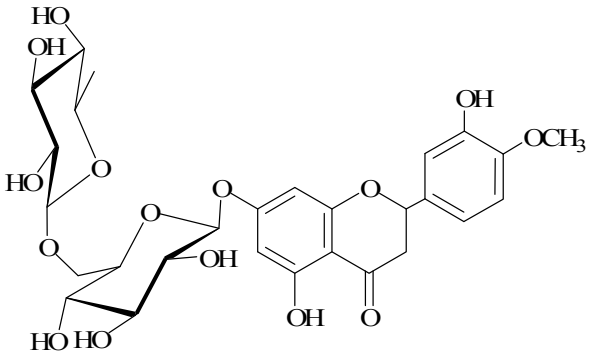




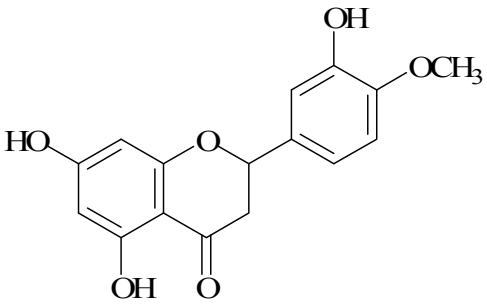
4 ,5 dihydroxy-3 ,7dimethoxy-6C-prenyldihydroflavonol

Flavanones



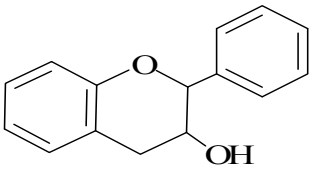


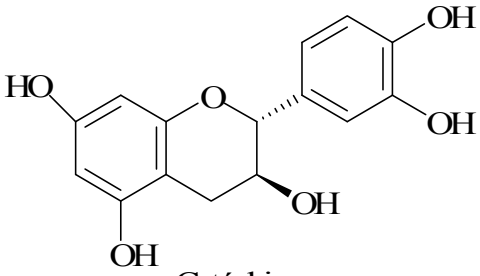
Hesperedine



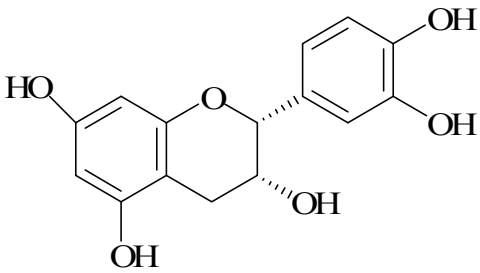
Hesperetine

Flavan-3- ols

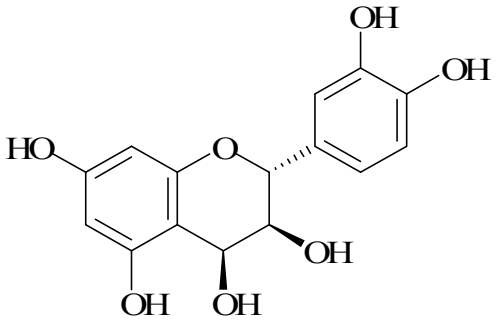




Catéchine



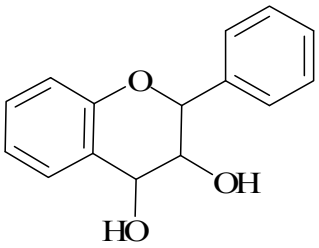
Epicatéchine

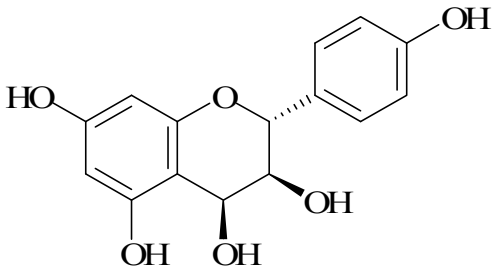


Leucocyanidine

Flavanediols ou Leucoantho

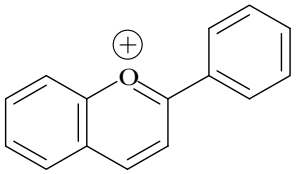
cyanidines

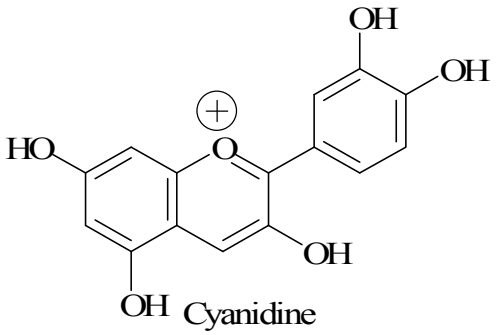




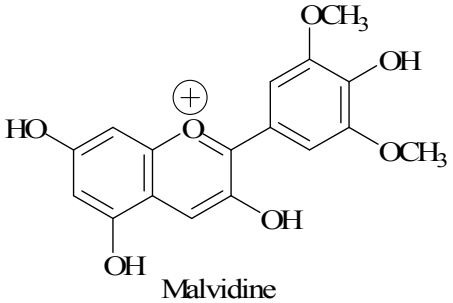
Leucopelargonidine

Anthocyanidines



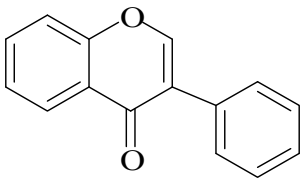


Cyanidine

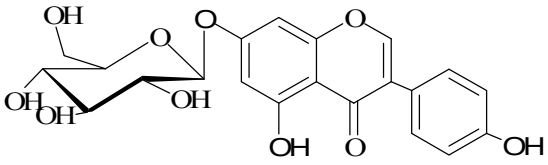


Malvidine

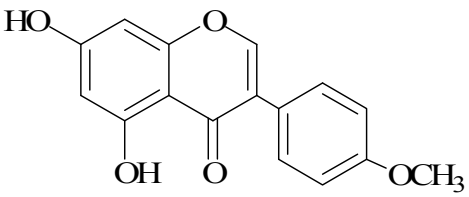
Isoflavonoïdes



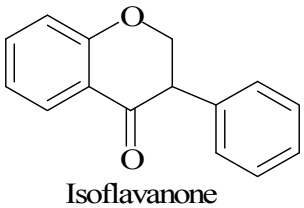
Isoflavone



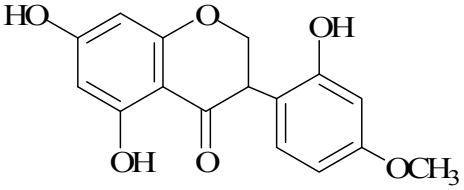
Genistine



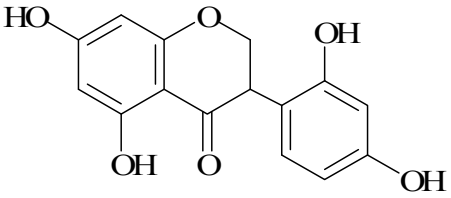
Biochanine A



Isoflavanone

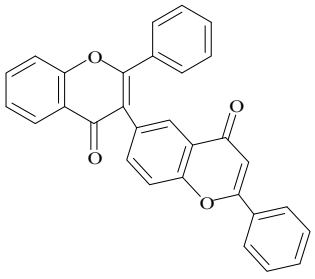


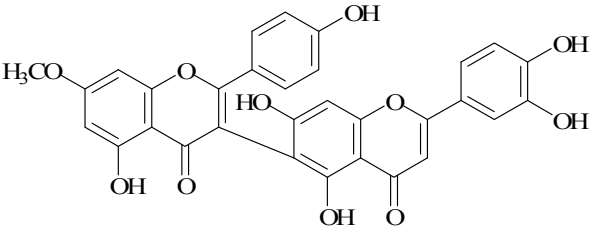
Ferreirine



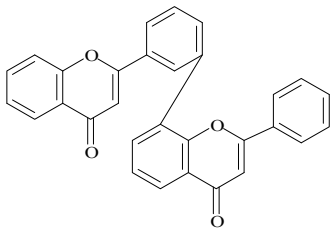
Dalbergioidine

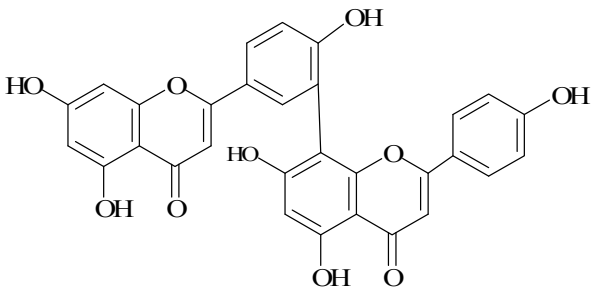
Biflavonoïdes





Ridiculuflavone





Amentoflavone

Tableau 3 : Groupes de flavonoïdes

Les biflavonoïdes isolés des écorces de tiges d'*Ouratea flava* (Mbing et al., 2003), des feuilles d'*Aristolochia ridicula* (Machado & Lopes, 2008) des tiges de *Daphne giraldii* (Zhang et al., 2008) sont des exemples de biflavonoïdes formés d'unités de chalcone et d'unités structurales de classes différentes (chalcone- flavone, chalcone flavanone, chalcone-flavane ou chalcone- flavanol). Des tétraflavonoïdes ont été isolés récemment d'*Aristolochia ridicula* (Machado & Lopes, 2008).

Origine biogénétique des flavonoïdes

Les précurseurs de la plupart des flavonoïdes sont le malonyl-CoA et le p - coumaroyl-CoA, dérivant respectivement de la voie métabolique des carbohydrates et des phénylpropanoïdes. Les acides propanoïques (acides en C_9) sous leur forme active se condensent avec trois moles de malonate (C_6) pour former un chalcone en C_{15}. La fermeture et l'hydratation ultérieures selon le cycle conduisent à la formation des divers flavonoïdes. Ainsi le cycle A des flavonoïdes résulte de la condensation de trois moles de malonyl-CoA et les cycles C et B sont formés par les acides phénylpropanoïques comme illustré dans le schéma 4 (Formica & Regelson, 1995 ; Wollgast & Anklam, 2000 ; Schijlen et al., 2004 ; Ferrer et al., 2008).

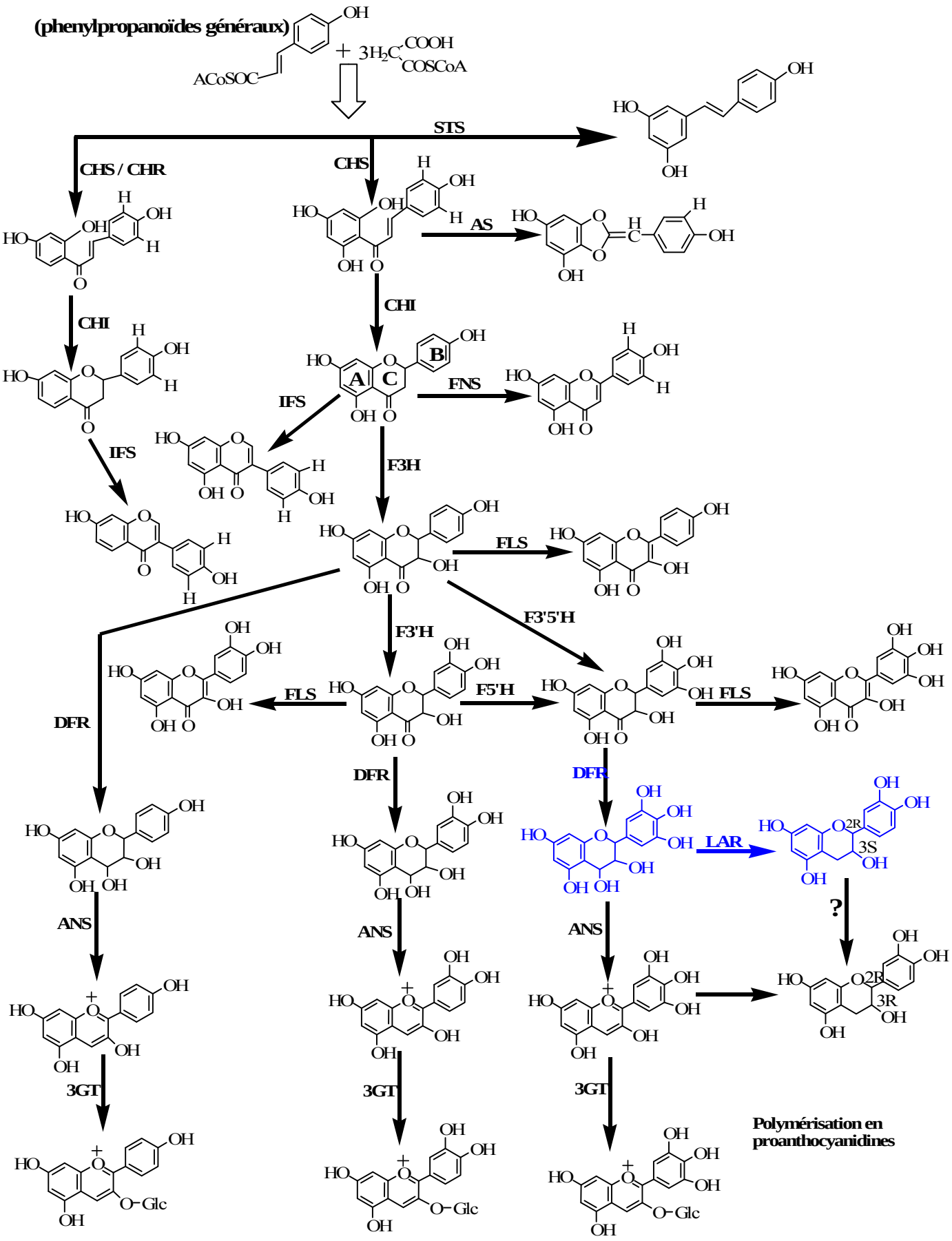


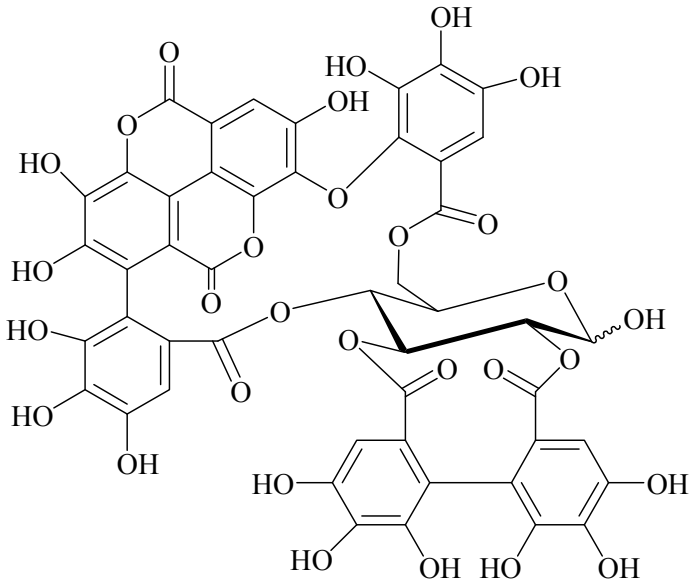
Schéma 4 : Vue d'ensemble sur la biosynthèse des principales classes des flavonoïdes

1.3.5 Les tanins hydrolysables et condensés

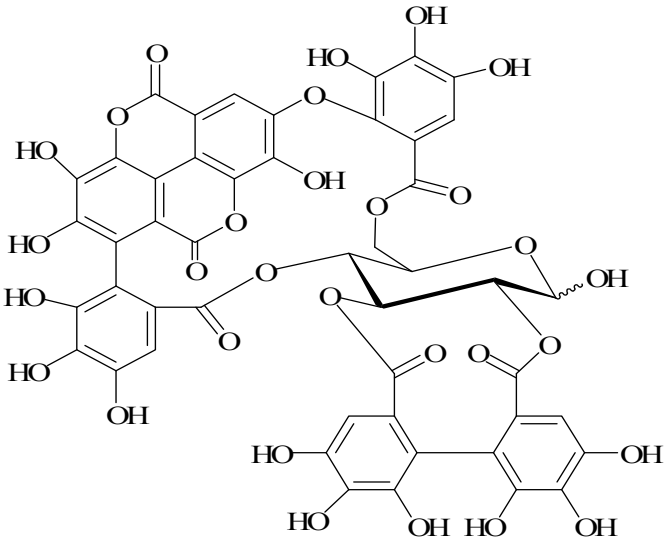
Le terme tanin dérive de la capacité de tannage de la peau animale en la transformant en cuir par le dit composé (Bravo, 1998). On distingue :

Les tanins hydrolysables

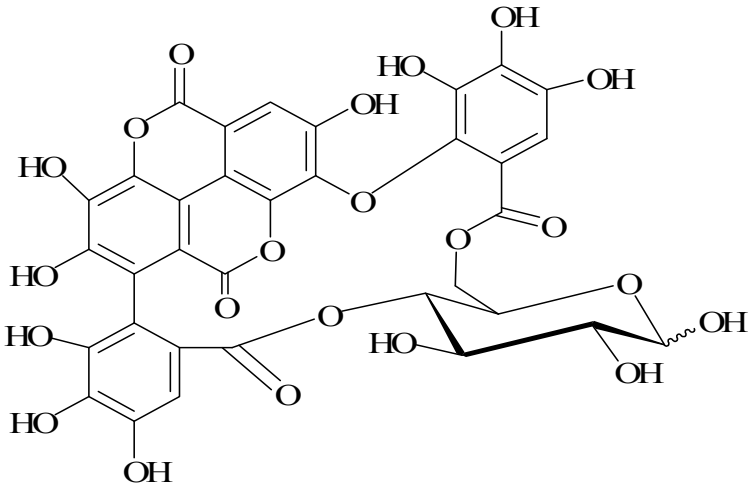
Ils comprennent l'acide gallique et les produits de condensation de son dimère, l'acide hexahydroxydiphenique. Comme leur nom l'indique, ces tanins subissent facilement une hydrolyse acide et basique; ils s'hydrolysent sous l'action enzymatique et d'eau chaude. Des tanins hydrolysables dont certains, représentés ci-dessous, sont isolés des racines (Silva et al., 2000) et des écorces de tronc (Conrad et al., 2001) de *Terminalia macroptera*.



Isoterchebuline



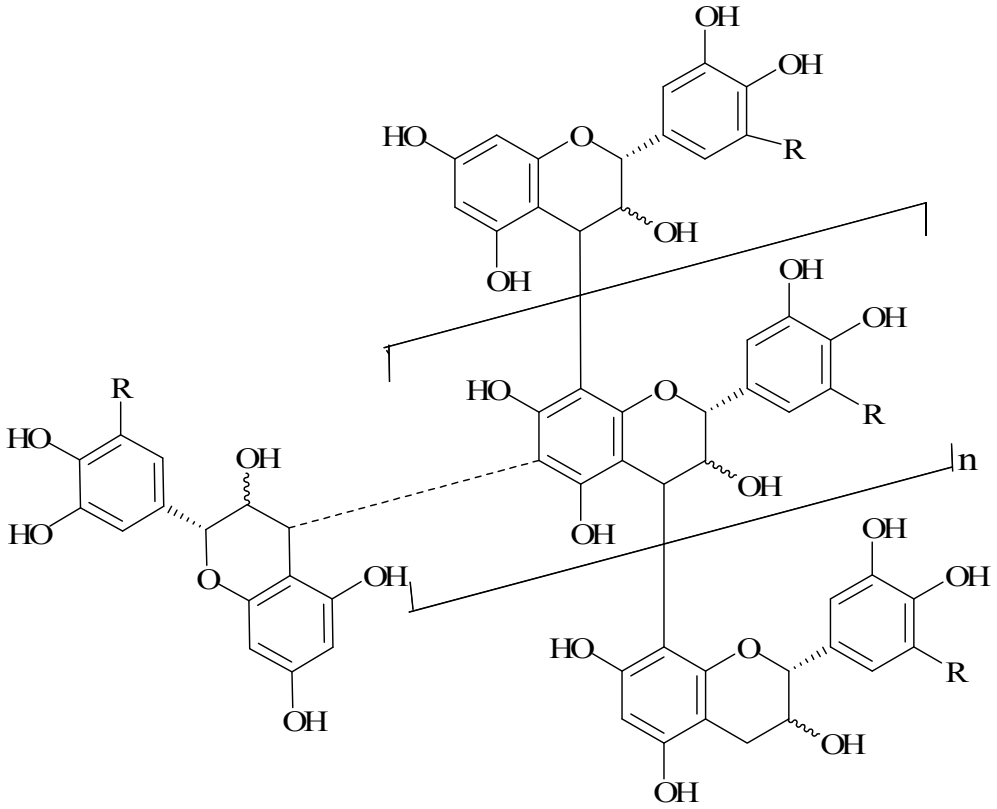
Terchebuline



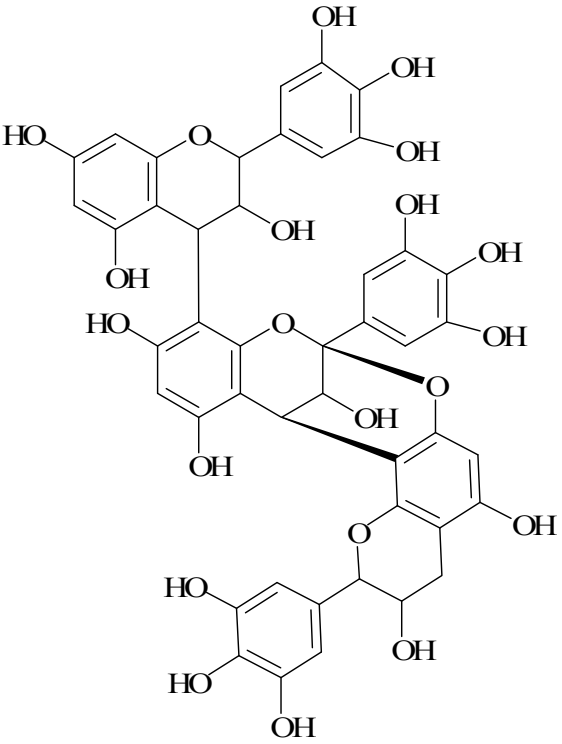
4,6-O-isoterchebuloyl-D-glucose

Les tanins condensés

Les tanins condensés, appelés proanthocyanidines ou procyanidines, sont des polyphénols de masse molaire moléculaire élevée. Ils résultent de la polymérisation auto-oxydative ou enzymatique des unités de flavan-3-ol et/ou de flavan-3,4-diol liées majoritairement par les liaisons C_4-C_8 (parfois C_4-C_6) des unités adjacentes, et se nomment ainsi proanthocyanidines 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 type A (Wollgast & Anklam, 2000 ; Dykes & Rooney, 2006).



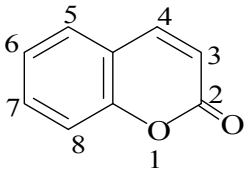
Modèle de structure d'un tanin condensé de type B. Si R = H ou OH, la structure représente respectivement un procyanidine ou un prodelphinidine. La liaison 4-6 en pointillés est une alternative de liaison interflavanique. On note la présence d'unité terminale dans une telle structure (Schofield et al., 2001)



Prodelphinidine (type A)

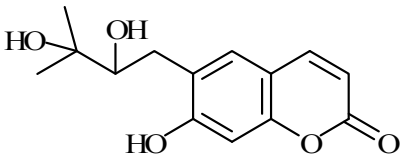
1.3.6 Les coumarines

Ceux sont des héterocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Isolées la première fois de *Coumarouna odorata* par Vogel en 1820, aujourd'hui, près de 1000 composés coumariniques sont isolés dans plus de 800 espèces de plantes et dans les micro-organismes. Dans les plantes, on les rencontre dans les Apiaceae, Asteraceae, Fabaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Rutaceae et Solanaceae. Du point de vue structural, on les classe en coumarines simples avec des substituants sur le cycle du benzène, les furanocoumarines, les pyranocoumarines, ceux substitués en position 3 et ou 4 et le dernier groupe serait celui des dimères (Smyth et al., 2009). Les differents groupes sont représentés dans le tableau 4 ci-dessous.

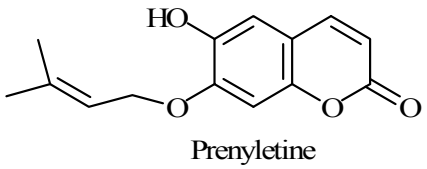


Benzo-2-pyrone

Coumarines simples

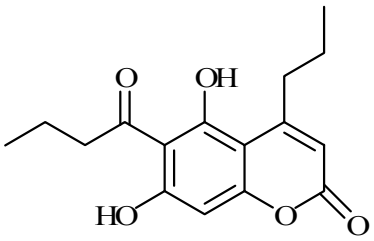


Peucédanol

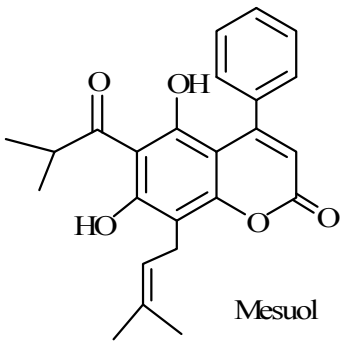


Prenyletine

Coumarines substituées en position 4

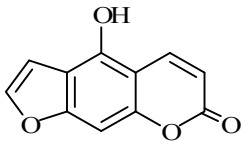


Mammea B / AC

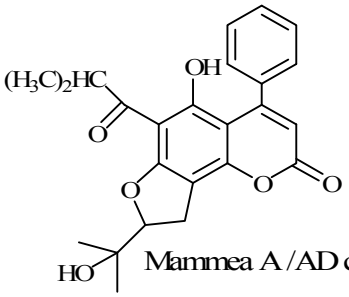


Mesuol

furanocoumarines

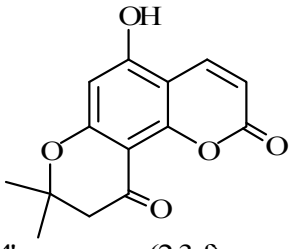


5-hydroxypsoralène



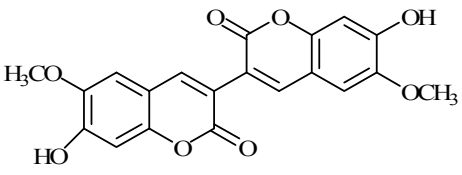
Mammea A /AD cyclo F

pyranocoumarines

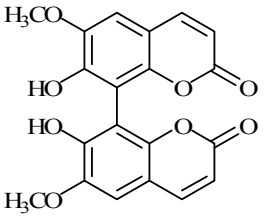


5-hydroxy-4' -oxopyrano(2,3-f)coumarin

bicoumarines



7,7'-dihydroxy-6,6'-dimethoxy -3,3'-biscoumarin.



7,7'- dihydroxy-6,6'-dimethoxy -8,8'-biscoumarin.

Tableau 4 : Groupes des coumarines

1.3.7 Les lignanes et les lignines

Les monolignols sont les dérivés de l'acide cinnamique et servent de précurseurs pour les composés de type phénylpropanoïde tels que les lignanes et les lignines.

Les lignanes

Ils répondent à une représentation structurale de type $(C_6C_3)_2$; l'unité C_6C_3 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 5). Le terme neolignane est employé pour définir tous les autres types de liaison. Lorsqu'il n'y a pas de liaison directe C–C entre les unités C_6C_3 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 de C_6C_3) et les dinéolignanes (contenant quatre unités de C_6C_3). **http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/lignan/** page consultée le 14 août 2008 à 10h. Les lignanes matairesinol, secoisolariciresinol et d'autres lignanes auraient été détectés dans le vin rouge donc dans les vtidaceae (Nurmi et al., 2003), les neolignanes biphenyles sont isolés de *Magnolia officinalis* (Fukuyama et al., 2002) et les oxynéolignanes, de *Bursera tonkinensis* Guillaum (Burseraceae) (Jutiviboonsuk et al., 2005).

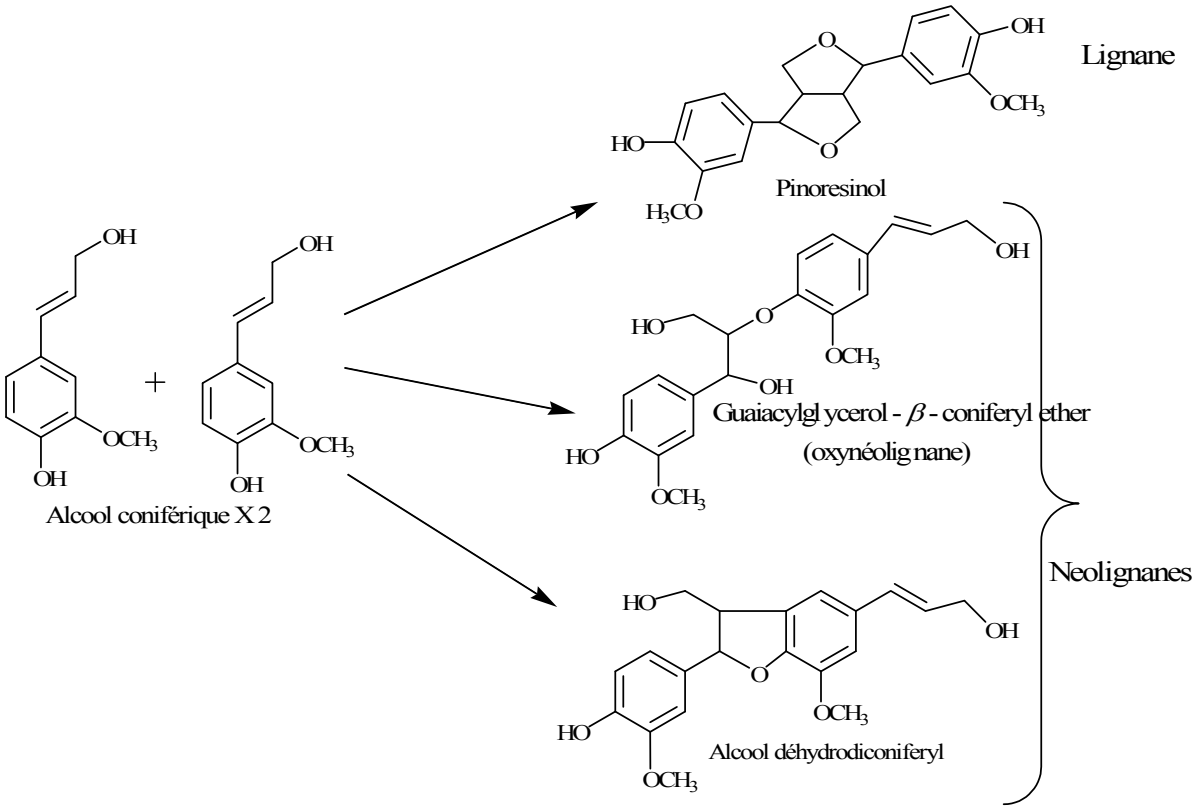


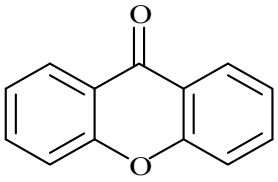
Schéma 5 : Biosynthèse des lignanes selon Beejmohun et al. (2007)

Les lignines

Les lignines constituent une classe importante de produits naturels dans le règne végétal et seraient formés par polymérisation oxydative de monolignols (monomères) qui sont les alcools *p*-coumarique, coniferique et sinapique (Sakagami et al., 2005) représentés ci-dessous.

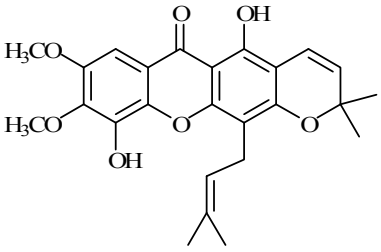
1.3.8 Les xanthones

Ils constituent une famille de composés polyphénoliques généralement isolés dans les plantes supérieures et dans les microoganismes répondant à une structure de base C_6-C_1-C_6 représentée de la façon suivante :

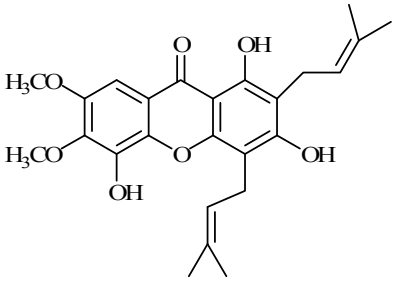


Xanthène-9-one

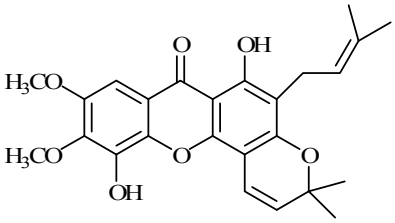
Des xanthones à activités antiplasmodiques réprésentées ci-dessous sont isolées des graines de *Symphonia globulifera* (Ngouela et al., 2006).



Gaboxanthone



Globuliferine



Symphonine

1.3.9. Rôle des flavonoïdes

Chez les plantes

Les composés phénoliques en particulier les flavonoïdes seraient impliqués dans un certain nombre de fonctions :

- ils assurent la pigmentation des fleurs, des fruits et des graines pour attirer les pollinisateurs et les disperseurs de graine,
- représentent un système de défense contre les organismes micro pathogènes,
- protègent les plantes contrent les radiations UV en absorbant à la fois ces radiations et les espèces réactives de l'oxygène formées,

- interviendraient dans la fertilité des plantes et la germination du pollen (Schijlen et al., 2004 ; Stalikas, 2007).

Chez l'homme

Plusieurs propriétés biologiques ont été attribuées aux polyphénols:

— Anticancérigènes : flavonoïdes (Ko et al., 2000 ; Tripoli et al., 2007; Li et al., 2008 ; Hirata et al., 2009) coumarines (Ito et al., 2005 ; Win, et al.,2008; Hirata et al., 2009)

— anti-ulcéreuses : flavonoïdes et acides phénoliques (Martin et al., 1993 ; Sannomiya et al., 2005 ; De Barros et al., 2008 ; Gurbuz et al., 2009) ;

— anti-inflammatoires : flavonoïdes (Nowakowska, 2007 ; Sutradhar et al., 2008 ; Rao et al., 2009 ; Vafeiadou et al., 2009) les lignanes (Hwang et al., 2003 ; Küpeli et al., 2003 ; da Silva et al., 2005 ; da Silva et al., 2008, Kim et al., 2009), coumarines (Kalkhambkar et al., 2007 ; Melagraki et al., 2009) ;

— analgésiques : flavonoïdes (Küpeli, Yesilada, 2007 ; Sutradhar et al., 2008 ; lignanes (Borsato et al., 2000 ; Küpeli et al., 2003 ; da Silva et al., 2005), coumarines (Lino et al., 1997 ; Kalkhambkar et al., 2007

— antiparasitaires : les composés phénoliques manifestent des activités contre un spectre de parasites :

- le genre *Leishmania* : les flavonoïdes (Nowakowska, 2007 ; Ganapaty et al., 2008), les lignanes (Sauvain et al., 1996 ; Barata et al., 2000 ; Filho et al., 2008) ; les coumarines (Iranshahi et al., 2007)
- le genre Trypanosoma : les flavonoïdes (Prytzyk et al., 2005 ; Güida et al., 2007 ; Ganapaty et al., 2008), les tanins (Kubata et al., 2005), les lignanes (matins et al., 2003 ; Felippe et al., 2008; Silva et al., 2008);
- le genre *plasmodium* (*falciparum*): les flavonoïdes en particulier les chalcones manifestent d'intéressantes activités antiplasmodiques très prometteuses (Froelich et al., 2005; Nowakowska, 2007; Portet et al., 2007).
- Bactéries : flavonoïdes (Sohn et al., 2004), les coumarines (Smyth et al., 2009)

— Vasodilatoires : flavonoïdes (Padilla et al., 2005), les lignanes (Raimundo et al., 2009)

— L'activité antivirale des flavonoïdes est connue (Choi et al., 2009).

— Ostéogène : flavonoïdes (Trivedi et al., 2008 ; Sheng et al., 2008 ; Maurya et al. 2009)

— anti-atherogeniques, antithrombotique, anti-allergénique (Wollgast & Anklam, 2000).

Chapitre 2
Monographie des plantes étudiées

2.1 Anogeissus leiocarpus (DC.) Guill. et Perrot.

Anogeissus leiocarpus appartient à la famille des Combretaceae, plante tropicale et subtropicale et mal connue du point de vue chimique. C'est une espèce riche en tanins et exsudant de la gomme.

2.1.1 Etude Botanique

- Nom scientifique : *Anogeissus leiocarpus* (DC.) Guill. Et Perrot.
- Synonymes :

- *Anogeissus schimperi* Hochst. Ex Hutch. et Dalz. ;
- *Conocarpus leiocarpus* DC. ;
- *Anogeissus leiocarpus* var. *schimperi* (Hochst. Ex Hutch. et Dalz) Aubrev.

- Noms vernaculaires : (Selon H. – J. von Maydell, 1983)

Français : Bouleau d'Afrique
Bambara : N'galama
Peul : Godoli, kodjoli, kolioli, kolioni
Bwa : Èminù
Djerma : Gonga
Tamacheck : Akorkara, akoukou
Serer: Godal
Wolof: Ngegan.

2.1.2 Systématique et Caractères morphologiques

Systématique

Règne : végétal
Embranchement : Spermaphytes
Classe : Dicotylédone

Sous classe : Rosidae

Ordre : Myrtales

Famille : Combretaceae

Genre: *Anogeissu*s.

Espèce: *leiocarpus*.

Caractères morphologiques :

Arbre atteignant 30 m de haut avec écorce grise, jaunâtre, écailleuse, devenant noirâtre avec l'age, à tranche jaune flammée exsudant une gomme foncée. Rameaux fins et retombants.

Feuilles solitaires ou opposées, ovales, de 4 à 7 cm de long; à pétiole court, pointues à la base et mucronnées à la pointe, 4 à 8 nervures latérales, face inférieure légèrement poilue.

Fleurs vert jaune à blanc crème avec calice rouge à 5 sépales soudés et longues étamines réunies en boules insérées axillairement sur des pédoncules de 5 à 10 mm quelque fois à plusieurs. Fruits petits (environ 10 à 15 mm), en forme de cônes, se cassent facilement à plusieurs graines à deux ailes (Von Maydell 1983).



Figure 1 : Feuilles et écorces de tronc d'*Anogeissus leiocarpus*

2.1.3 Distribution / Habitat

Du Sénégal au Cameroun jusqu'en Ethiopie, assez commune, localement abondante et grégaire, peut former des peuplements purs.

Savanes, forêts sèches et galeries forestières soudano-saheliennes à soudano-guinéennes, sur sols généralement compacts (argileux). Tolère les inondations temporaires.(Arbonnier, 2002).

Au Mali, *Anogeissus leiocarpus* affectionne les sols frais et riches des savanes claires en zone soudanienne et soudano-guinéenne, peut former en conditions favorables des forêts claires presque pures (Malgras, 1992).

2.1.4 Utilisations en médecine traditionnelle

La plante serait indiquée dans le traitement d'un certains nombre de maladies telles que la bilharziose urinaire, dysenterie amibienne, paludisme, brûlures, douleur, trypanosomiase et des helminthiases (Malgras, 1992 ; Inngjerdingen et al, 2004 ; Laurent et al, 2004 ; Bah et al., 2006)

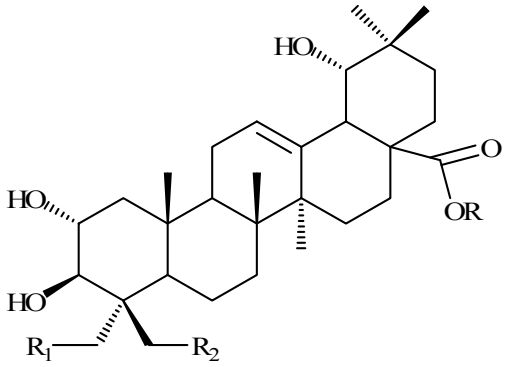
2.1.5 Données pharmacologiques et toxicologiques

Des extraits réalisés avec différentes parties de l'espèce ivoirienne auraient manifesté des activités significatives dans le traitement du paludisme, de la trypanosomiase et des helminthiases (Laurent et al, 2004). Les extraits hydroéthanoliques des feuilles, des écorces de tronc et des écorces de racines manifestent des activités antifongiques remarquables (Batawila et al, 2005). L'extrait aqueux des racines aurait montré une activité antibacterienne potentielle contre un large spectre de bactéries incluant la resistance méthiciline, *Staphilococcus aureus*, la résistance à la vancomicine vis-à-vis d'*Enterrococcus* et de nombreuses autres résistances à l'égard de *Burkholderia cepacia et Pseudomonas aeruginosa* ont été signalées (Taiwo et al, 1999). L'extrait méthanolique produit une inhibition contre les contraintes cliniques isolées de *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes, Staphilococcus aureus*, *Staphilococcus pneumoniae et moraxella catarrhalis*, tous responsables des infections respiratoires (Maïga et al, 2005).

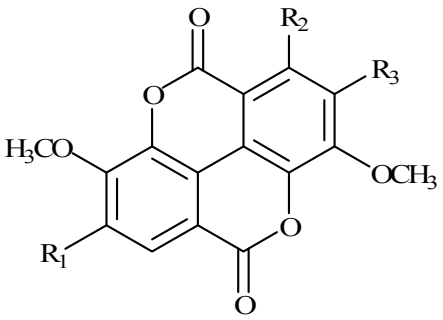
Les signes toxiques rapportés par les tradipraticiens seraient : salivation, nausée, vomissement ; effets qu'on remédierait par la décoction des feuilles de *Guierra senegalensis* J.F. Gmel.(Maïga et al, 2005). L'extrait de dichlorométhane des feuilles manifeste une activité cytotoxique avec une concentration d'inhibition CI_{50}=71,9 µg/ml (Vonthron-Senecheau, 2003).

2.1.6 Constitution chimique

Les feuilles contiennent des tanins et des saponines ; les écorces de tronc, présentent une trace d'alcaloïdes. La gomme issue de ces écorces contiendrait 22 % d'acide uronique. Les écorces de racine sont riches en tanins (17 %) et stérols de même que les graines. (*Maydell,* 1983 ; Burkill, 1985). Les acides : gentisique, protocatechuique, gallique, chébulagique, chébulinique, éllagique, d'autres polyphénols et des triterpènes représentés ci-dessous se trouveraient dans la plante (Chaabi et al., 2008).



R_1	R_2	R	
H	OH	glucose	Sericoside
H	OH	H	Acide séricique
OH	OH	Glucose	Trachelosperoside E1
OH	OH	H	Trachelosperogenine E
OH	H	H	Arjungenine



R_1	R_2	R_3	
-OCH3	-OH	-OH	Acide 3,3',4'-tri-O-methylflavellagique
-OH	-H	-OH	acide 3,3'-di-O-methylellagique
-OCH3	-OH	-glucose	Acide 3,4,3'-tri-O-methylflavellagique -4'-β-D-glucose

2.2 Cissus populnea Guill. et Perr. (Vitidaceae)

Cissus populnea appartient à la famille des Vitaceae ou Vitidaceae ou encore Ampelidaceae famille des régions tropicales et tempérées. C'est une espèce grimpante riche en mucilage.

- Autres Cissus :

Cissus quadrangularis L.

Cissus aralioïdes

2.2.1 Etude botanique :

- Nom scientifique : *Cissus populnea* Guill. et Perr.
- Synonyme : *Vitis pallida* Bak
- Noms vernaculaires :

Français : Oseille des pygmées ;

Bambara : garo, ngaro, karo.

Peul : Bakani

Bwa : Puatua :

Serer : Dôm, mbogoy.

2.2.2 Systématique et caractères morphologiques

Systématique

Règne : Végétal

Embranchement : Spermaphytes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Rosidae

Famille : Vitaceae (=Ampelidaceae)

Ordre : Rhamnales.

Genre : *Cissus*

Espèce : *populnea*

Caractères morphologiques

Liane à vrilles ramifiées de 8 à 10m de haut souvent à tige annuelle se desséchant durant la saison sèche, recouvrant les arbres dans lesquels elle est accrochée. Ecorce crème et lisse à l'état jeune puis grise et écailleuse, se desquamant par écailles fibreuses sur les pieds

âgés, à tranche orange en surface et jaunâtre dessous. Rameau finement pubescent devenant glabre, vert.

Feuilles alternes, finement pubescentes devenant rapidement glabres, ovales à suborbiculaires de (5-)10-18 cm de long et de large à sommet courtement acuminé ou pointu à base cordée.

Inflorescence : panicule, plusieurs fois ramifiée, longuement pédonculée, de 10-20 cm de long et disposée à l'opposé d'une feuille. Fleur verdâtre, à pédicelle de 1 – 3 cm de long, à 4 pétales, de 3 – 4 mm de diamètre. Fruit est une baie ovoïde, lisse, dure de 20- 25 x 10- 15 mm, noir violet à maturité (Arbonnier, 2002).



Figure 2 : Feuilles de *Cissus populnea*

2.2.3 Distribution / Habitat

Répartition dissimulée généralement à travers la région côtière de la forêt boisée soudanienne et sahélienne du Sénégal et du Nigeria, en travers l'Afrique : Soudan, Abyssinie et Ouganda.(Burkill, 2000).

Il se rencontre dans les bosquets et galeries forestières des zones sahéliennes, les savanes soudano-guinéennes et guinéennes sur tout type de sol (Arbonnier, 2002).

2.2.4 Utilisations en médecine traditionnelle

La plante serait citée dans le traitement de l'œdème, de la douleur intestinale, des plaies, des affections oculaires (Burkill, 2000 ; Inngjerdingen et al, 2004).

2.2.5 Données pharmacologiques

Les feuilles ne manifestent aucune activité molluscicide envers l'escargot d'eau douce, *Bulinus globulus*, parasite vecteur de la schistosomiase (Burkill, 2000). L'extrait éthanolique de la racine aurait des effets antibactériens sur *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aures* et *Streptococcus pyogenes* (Koné et al, 2004). Selon Moody et al (2003), l'extrait méthanolique de la racine et ses fractions manifestent des activités anti-anémiques. Les investigations pharmacologiques ont attribué des propriétés hypoglycémiques au supplément pulvérulent brut de la plante chez le rat (Geidan et al., 2004). L'extrait aqueux de l'écorce de la tige n'a apparemment pas d'effets sur l'amélioration de la fertilité et sur les paramètres de sperme. Le criblage antimicrobien de l'extrait contre quelques isolats microbiens impliqués dans l'infertilité masculine aurait indiqué une inactivité totale (Ojekale et al., 2006).

2.2.6 Constitution chimique

Cissus populnea renferme des mucilages dans les tiges et les racines (Kerharo et Adam, 1974). Des essais phytochimiques sur l'espèce nigériane auraient prouvé l'absence d'alcaloïdes (Burkill, 2000) tandis que Moody et al (2003) auraient observé la présence d'anthraquinones, de glucosides et de saponines dans les racines.

2.3 Mitragyna inermis (Willd.)O. Ktze.

Mitragyna inermis appartient à la famille des Rubiaceae, plante tropicale occupant une place prépondérante dans la matière médicale avec des drogues fébrifuges, antimalariques, émétiques, et antiamibiennes… Elle renferme des alcaloïdes, groupe manifestant des activités biologiques en particulier pharmacologiques très marquées.

- Autres *Mitragyna* : *Mitragyna stipulosa* (DC.) O.Ktze.

2.3.1 Etude botanique :

- Nom scientifique : *Mitragyna inermis* (Willd.) O. Ktze.
- Synonymes :

Mitragyna africana (Willd.) Korth. ;

Nauclea africana Willd.;

Uncaria inermis Willd.

- Noms vernaculaires :

Français : Pied d'éléphant;

Bambara : Diu, Dion, Dyum ;

Peul : Kadioli, Kauli, Koli, Ngoboli ;

Bwa : Sasaho ;

Tamachek : Tadgalalt :

Serer : Ngaul.

2.3.2 Systématique et caractères morphologiques

Systématique.

Règne : Végétal

Embranchement : Spermaphytes

Classe : Dicotylédone

Sous classe : Asteridae.

Famille : Rubiaceae

Ordre : Rubiales

Genre : *Mitragyna*

Espèce : *inermis*

Caractères morphologiques

Arbre atteignant en moyenne 16 m de hauteur ou arbuste buissonnant, rond et épais de 4 à 5 m (quelque fois plus) de hauteur. Ecorce lisse ou écailleuse, grise, tendre, à tranche fibreuse, brun clair, fonçant rapidement à la lumière.

Feuilles élliptiques, acuminées, cunéiformes, arrondies ou cordées à la base, de 6 à 9 cm de long sur 3,5 à 5 cm de large, un peu pubescentes sur le dessous des nervures.

Fleurs crème, en boules solitaires, terminales, courtement pédonculées très odorantes d'environ 2 à 3,5 cm de diamètre, 5 sépales collants ou pubescents. Fruits sphériques, brun foncé, composés de nombreuses petites capsules s'ouvrant en deux valves, chacune contenant de nombreuses petites graines ailées. Les fruits secs restent longtemps sur le buisson ; diamètre environ 1,5 cm (Maydell, 1983).



Figure 3 : pieds de *Mitragyna inermis*

2.3.3 Distribution / Habitat.

Du Sénégal au Cameroun jusqu'au Soudan, Bénin, Togo, république démocratique du Congo.

Bas-fonds inondés temporairement, rives de mares et de rivières des zones sahelo-soudaniennes à guinéenne. Indicateur de sols lourds, argileux et mal drainés.

Au Mali, on rencontre *Mitragyna inermis* dans les forêts galeries, et bas-fonds argileux en zone soudano-guinéenne, vallées inondées périodiquement en zone soudanienne et jusqu'aux abords du Sahel, au bord des mares permanentes ou temporaires (Malgras, 1992).

2.3.4 Utilisations en médecine traditionnelle

La plante serait indiquée dans le traitement d'un certain nombre de maladies comme la bilharziose urinaire, les arthrites, rhumatisme, douleur, dysenterie, paludisme, gonorrhée, ictère (Maydell, 1983 ; Malgras, 1992 ; Burkill, 1997).

2.3.5 Données pharmacologique et toxicologique

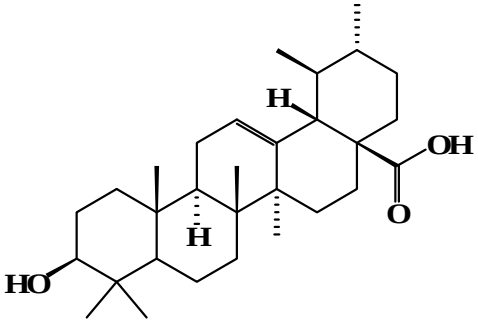
Les extraits totaux de la drogue sont fébrifuge et hypotenseur ; effet qu'on peut attribuer aux alcaloïdes, particulièrement à la rhynchophylline (Kerharo et Adam, 1974). Les alcaloïdes isolés de la plante seraient responsables d'une activité sur *plasmodium falciparum* avec une CI_{50}= 5µg/mL. (Traoré Phanta, 1999). La décoction aqueuse des tiges et des racines pourrait avoir des effets sur les symptômes du paludisme (fièvre, maux de tête et autres) mais son effet sur le *Plasmodium falciparum* lui même serait moindre pour plusieurs espèces de *Plasmodium falciparum*. (Valentin et al., 2000). L'extrait méthanolique des écorces de tronc aurait des effets sur l'*Anopheles* mais il est sans action sur *Aedes* et *Culex* (D. Diallo et al,

2001) et une activité larvicide sur *Anopheles gambiae larva* (Maïga et al, 2005). L'extrait aqueux des écorces de tronc manifeste des activités myorelaxantes et antispasmodiques. Le macéra d'écorces de tronc induit de façon significative une diminution de la pression sanguine chez le rat anesthésié et provoque un effet dose dépendance sur le cœur isolé, une augmentation de contractions cardiaques et d'écoulement coronaires sans effet significatif sur le cœur du rat (Ouédrago et al, 2004).

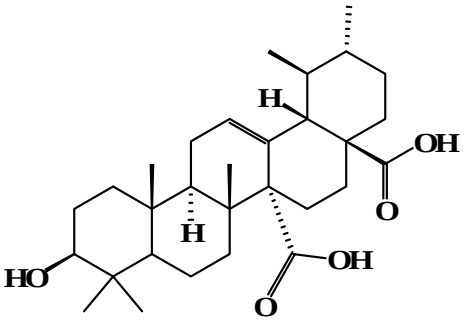
Le signe toxique rapporté par les tradithérapeutes serait un vomissement que l'on remédierait avec une décoction de feuilles de *Vitex doniana* Sweet, Verbenaceae (Maïga et al., 2005). Les extraits (hydro-méthanolique, aqueux, chloroformique) des feuilles et des racines seraient dépourvus de toxicité sur les macrophages péritonéaux (Traoré-Keïta et al, 2000). L'étude de la toxicité et de la génotoxicité des extraits antimalariques riches en alcaloïdes a montré une inhibition forte de la synthèse de protéine en cellules mammifères mais n'a pas démontré une activité mutagénique ou génotoxique (Traoré et al, 2000). L'étude de la toxicité aiguë et chronique de l'extrait hydro-éthanolique (40 : 60) des feuilles par gavage de rat ne montre pas de signe de toxicité aux doses de 300 mg/kg et 3g /kg . Seulement à la dernière dose de légères anomalies histologiques sont observées (Monjanel-Mouterde et al., 2006). Les alcaloïdes des feuilles et la spéciophylline seraient sans effets hépatotoxiques sur les rats (Touré et al., 1996). L'acide 3-*O*-(β-D-6-deoxy- glucopyranosyl quinovique isolé de l'extrait méthanolique des écorces de tronc serait responsable d'une activité cytotoxique et affiche 43,01 et 91,74% d'inhibition de cellules Hela aux concentrations de10^2 et 10^3 µg /mL respectivement (Cheng et al, 2002).

2.3.6 Constitution chimique

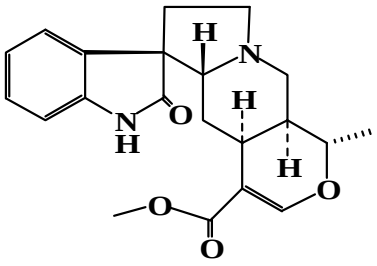
La plante contient dans ces différents organes les oxindolo-alcaloïdes, des triterpènes et stérols (Kerharo et Adam, 1974, Traoré-Keïta et al., 2000), des triterpénoïdes (Cheng et al, 2002) dont certaines sont représentées ci-dessous.



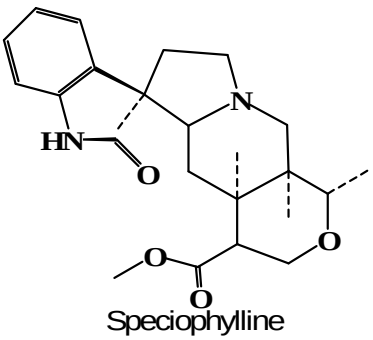
Acide ursolique



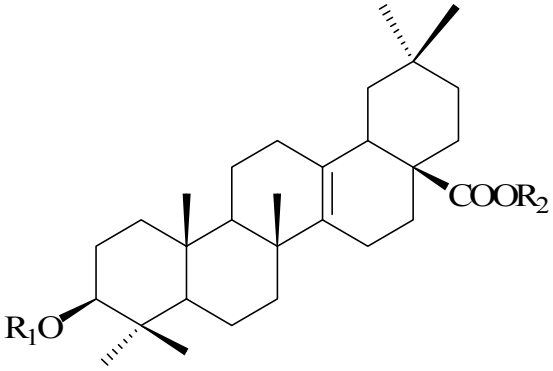
Acide quinovique



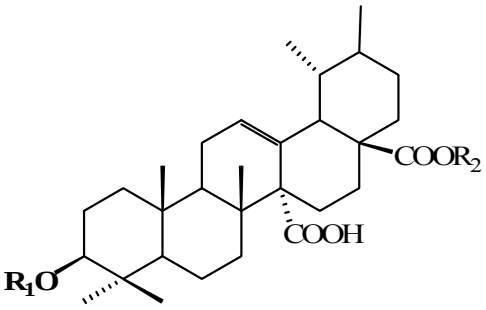
Uncarine D



Speciophylline



R_1	R_2	
Glc″-(1→6)-Glc′	6-deoxy-D-Glc‴	Inermicide I
6-deoxy-D-Glc	H	Inermicide II
H	H	Acide pyrocyncholique



R_1	R_2	
Glc-rha	H	Acide 3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→ 4)-α-L-rhamnopyranosyl]-quinovoïque
Glc	Glc	Quinoviate de -β-D-glucopyranosyl-[3-O-(β-D-glucopyranosyl]
6-deoxy-D-Glc	H	Acide -3-O- (β-6-deoxy-D-glucopyranosyl) quinovique

2.4 Terminalia macroptera Guill. et Perrott. (Combretaceae)

Terminalia macroptera est de la famille des Combretaceae, plante des régions tropicales et subtropicales. C'est une espèce riche en tanins.

- Autres *Terminalia* en Afrique :
  - T*erminalia albida* Sc. Elliot.
  - *Terminalia avicennioïdes* Guill et Perr.
  - *Terminalia brownii* Fresen.
  - *Terminalia catappa* L.
  - *Terminalia glaucescens* Planch.
  - *Terminalia laxiflora*. Engl.
  - *Terminalia mantaly* H. Perrier.
  - *Terminalia moltis* Laws.

2.4.1 Etude botanique

- Nom scientifique : *Terminalia macroptera* Guill. et Perrott
- Synonymes :
  - *Terminalia chevalleri* Diels,
  - *Terminalia suberosa* Chev.;
  - *Terminalia adamauensis* Engl.,
  - *Terminalia dawei* Rolfe.
- Noms vernaculaires :
  - Français : Badamier du Sénégal, Badamier Sessile.
  - Bambara: Wolo, wolo-ba, wolo-muso ;
  - Peul: Bodevi;
  - Bwa: Huanu;

- Serer: Mbalack;

2.4.2 Systématique et caractères morphologiques

Systématique

Règne : Végétal;
Embranchement : Spermaphytes
Classe : Dicotylédone.
Sous classe : Rosidae
Ordre : Myrtales
Famille : Combretaceae
Genre : *Terminalia*
Espèce : *macroptera*.

Caractères morphologiques

Arbre de 10 à 12 m au fût trapu, court à écorce noirâtre profondément striée, fissurée, à cime dense ovoïde.

Feuilles alternes, vert clair, brillantes, glabres, obovales, très longuement cunées à la base, le long de la nervure médiane jusqu'à la base du pétiole. Limbe sessile ou subsessile de 25 cm ou plus sur 10 cm avec une dizaine de paires de nervures latérales proéminentes sur les deux faces.

Epis axillaires solitaires de 10 cm de long, densément couverts de fleurs blanches à parfum peu agréable. Fruits ailés vert clair, glabre de 10 sur 3,5 cm, à corps bombé sans crête anguleuse bien marquée (Kerharo et Adam, 1974).



Figure 4 : Feuilles et fruits de *Terminalia macroptera*

2.4.3 Distribution / Habitat

Très répandu en Afrique, du Sénégal à l'Ouganda (Maydell, 1983).

Terrains frais, périodiquement inondés au bord des cours d'eau, des mares, dans les bas-fonds proches de la nappe souterraine. Souvent directement sur les termitières. Sur sol tassé (Maydell, 1983).

Au Mali, *Terminalia macroptera* affectionne les terrains frais, humides, les bas-fonds inondables (Boullard, 2001).

2.4.4 Utilisations en médecine traditionnelle

Aphrodisiaque, dépression, dépuratives, diurétiques, hypertension, ictère, diabète, douleur dentaire, dysenterie, gingivites, hémorroïdes (Maydell, 1983 ; Malgras, 1992 ; Burkill, 1985).

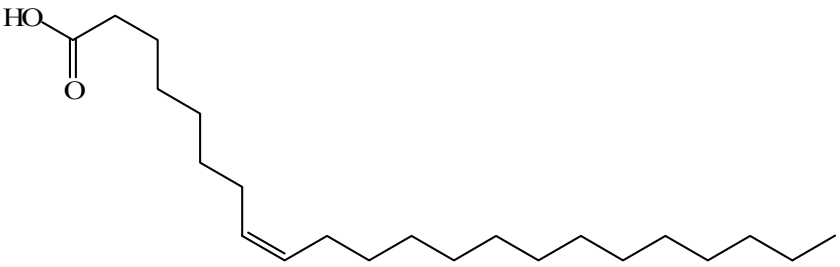
2.4.5 Données pharmacologique et toxicologique

L'extrait éthanolique de la racine et ses fractions manifesteraient une activité significative contre *Staphylococcus aureus*, *Shiguella disenteriae*, *Vibrio cholera* ; ces propriétés seraient dues aux éllagitanins majoritaires dans l'extrait éthanolique et dans les fractions actives (Silva et al, 1997). L'extrait aqueux des écorces de racine aurait un effet très significatif sur le *Plasmodium falciparum* (CI_{50}= 1 µg/mL) ; cette activité serait due aux saponines (Sanon et al, 2003). L'extrait des feuilles aurait une activité contre toutes les contraintes de *Neisseria gonorrhée* (Silva et al, 2002). Selon (Conrad et al 1998), les composés triterpéniques isolés des écorces de tronc afficheraient des activités biologiques (antibactériennes, antifongiques, anthelminthiques) et des propriétés hémolytiques. Les extraits hydro-éthanoliques des feuilles, des écorces de tronc et des racines manifesteraient des activités antifongiques remarquables (Batawila et al, 2005).

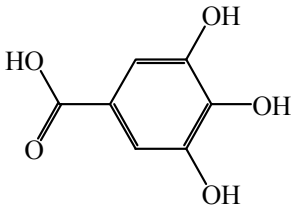
L'extrait éthanolique de l'écorce de tronc a une dose létale minimale de 250 mg/kg chez le rat. Les tanins 2, 3-O-(S) hexahydroxydiphénoyl-D-glucose et punicacortéine C seraient toxiques pour les cellules cancéreuses 5637 (Conrad et al, 2001).

2.4.6 Constitution chimique

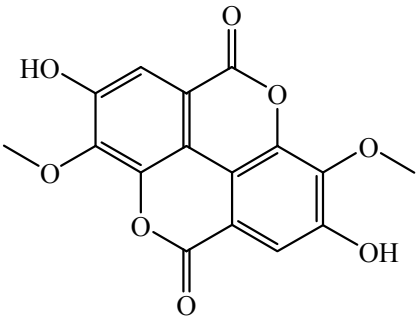
La plante contiendrait des triterpènes, des tanins, des flavonoïdes (Conrad et al., 1998 ; Silva et al 2000 ; Conrad et al., 2001) dont quelques structures sont représentées ci-dessous



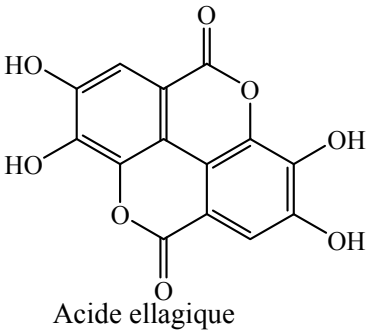
Acide serucique



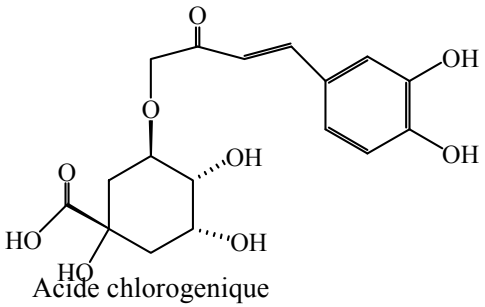
Acide gallique



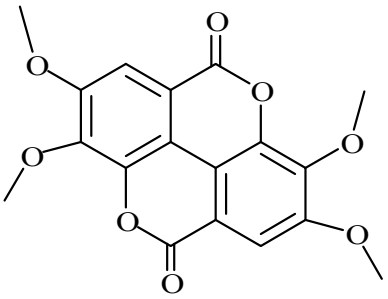
Acide 3, 3' di-O-méthylellagique



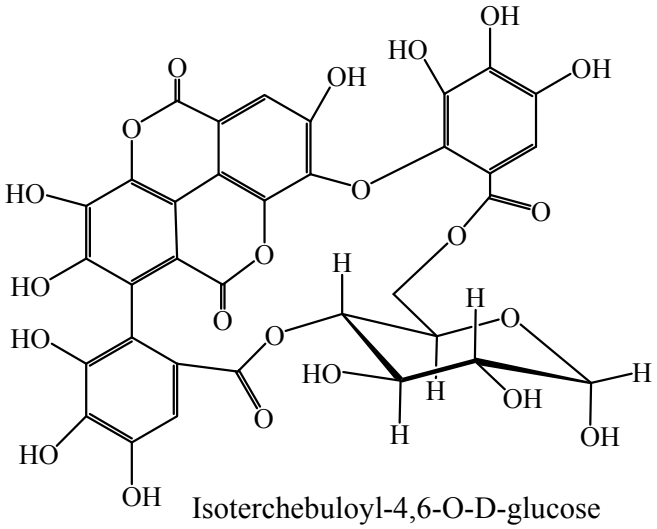
Acide ellagique



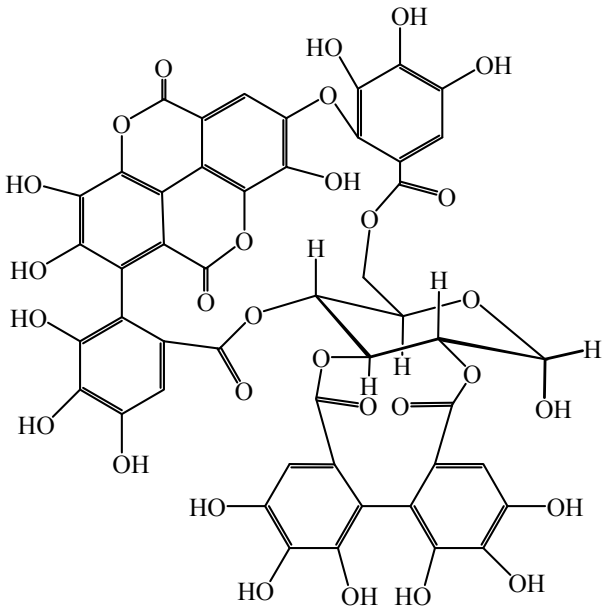
Acide chlorogenique



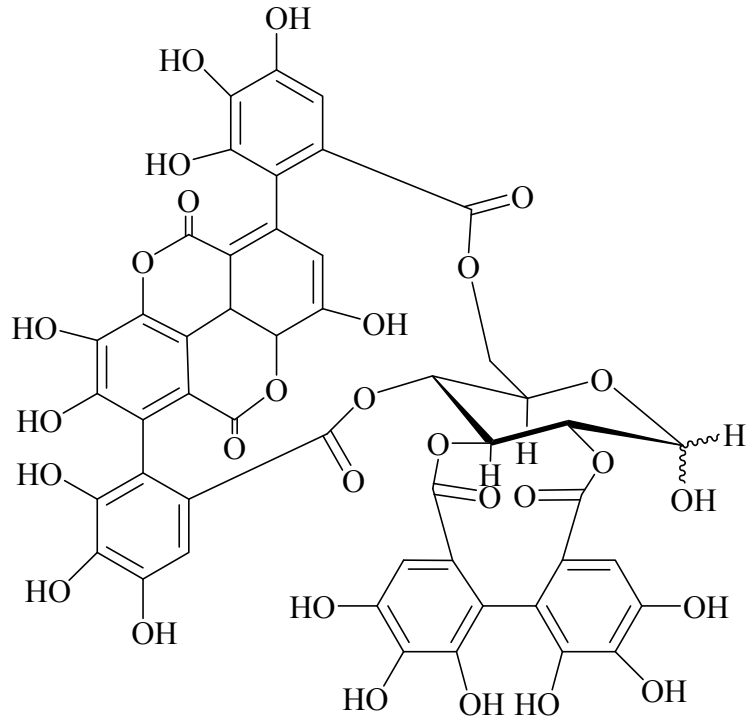
Acide 3, 3', 4, 4' tetra- O-méthylellagique



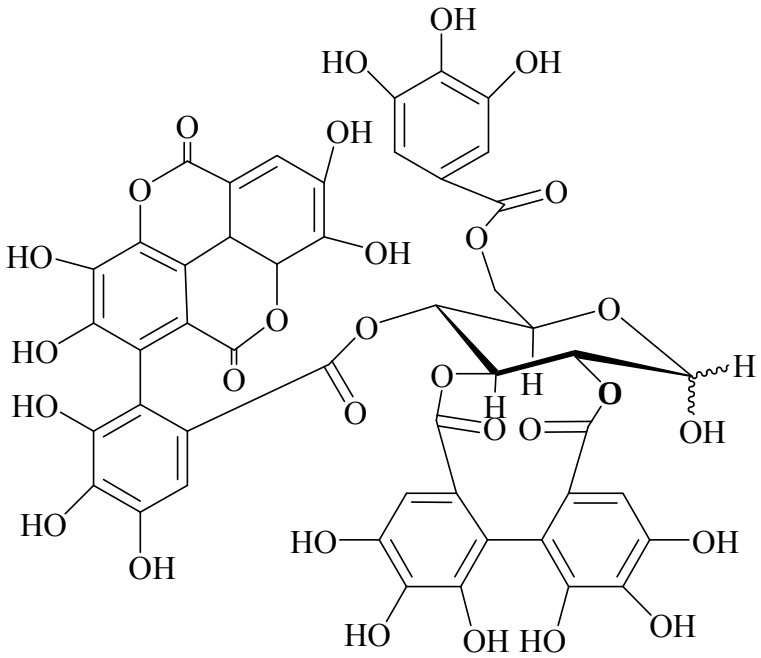
Isoterchebuloyl-4,6-O-D-glucose



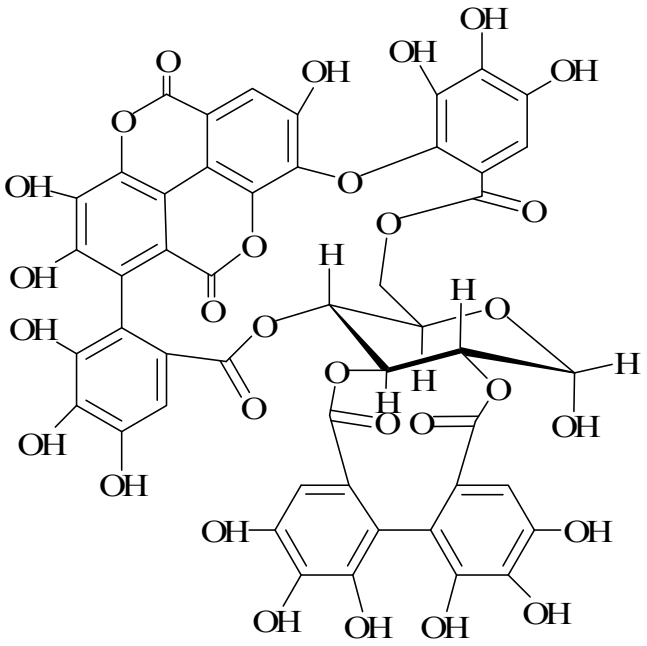
Terchebuline



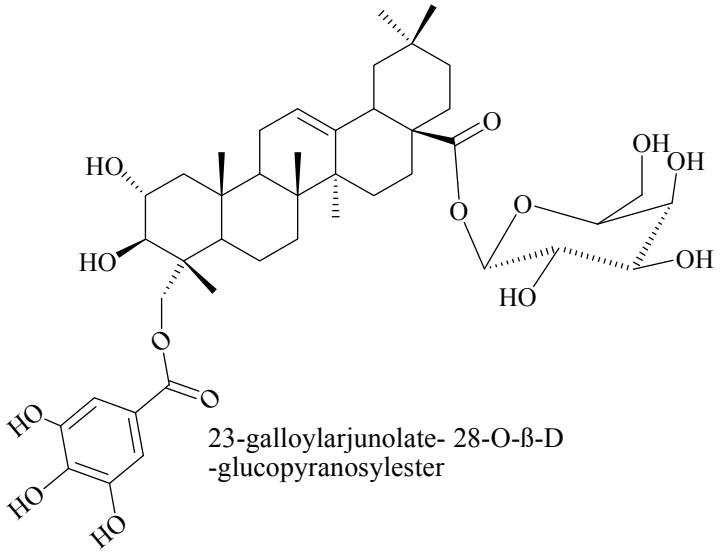
Punicalagine



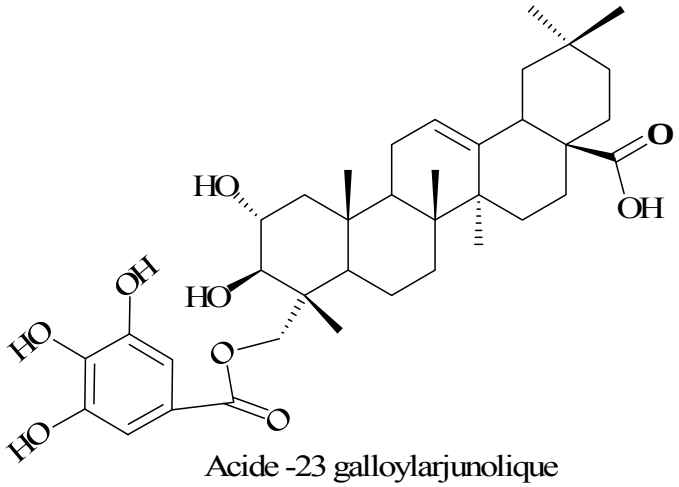
Terflavine



Isoterchebuline



23-galloylarjunolate- 28-O-ß-D
-glucopyranosylester



Acide -23 galloylarjunolique

2.5 Vepris heterophylla R. Let.

Le *Vepris heterophylla* est un arbuste d'Afrique tropicale appartenant à la famille des Rutaceae.

2.5.1 Etude botanique :

- Nom scientifique : *Vepris heterophylla* R. Let.
- Synonymes :

Teclea heterophylla Engl. ;
Toddioliopsis heterophylla Engl. ;
Teclea sudanica A. Chev.;
Vepris sudanica (A. Chev.) Letouzey.

- Noms vernaculaires :

Français : Kinkeliba de Kita, Kinkéliba de Boulouli, Kinkéliba des pères, Kinkéliba des roches ;
Bambara : Kita Kinkeliba.

2.5.2 Systématique et caractères morphologiques

Systématique

Règne: Végétal;
Embranchement: Spermaphytes
Classe : Dicotylédones
Sous classe : Rosidae
Ordre : Sapindales
Famille Rutaceae
Genre : *Vepris*
Espèce : h*eterophylla*

Caractères morphologiques :

Arbuste souvent ramifié dès la base et plus ou moins sarmenteux, de 2-4 m de haut, à cime arrondie et assez dense. Ecorce grise, plus ou moins lisse, à tranche jaune ou brunâtre. Feuilles alternes trifoliées, glabres étroitement élliptiques, de 4-10 (-12) x 2-3 (-5) cm, à sommet longuement acuminé, à base en coin plus ou moins aigu.

L'inflorescence panicule peu fleurie, disposée à la base des feuilles sur les jeunes rameaux, de 3-4 cm de long. Fleur sessile, jaunâtre, d'environ 3 mm de diamètre à calice courtement lobé et cilié, à corolle à (3-) 4 pétales.

Fruit drupe globuleuse, à surface lisse ou légèrement grenue, plus ou moins brillante, de 0,8-1 (-1,5) cm de diamètre, jaune ou rouge à maturité (Arbonnier, 2002).



Figure 5 : Feuilles de *Vepris heterophylla*

2.5.3 Distribution / Habitat.

Du Mali au Cameroun. Distribution irrégulière, espèce mentionnée comme menacée d'extinction au Mali, Ghana et Cameroun par l'UICN, Union mondiale pour la nature (Arbonnier, 2002).

Collines dénudées, escarpements gréseux et bordures de torrents en savanes soudaniennes (Arbonnier, 2002).

Au Mali, on rencontre le *Vepris heterophylla* dans le massif gréseux entre Toukoto et Kita où il est localement grégaire en bordures des torrents (Malgras, 1992) et sur les collines de Siby.

2.5.4 Utilisations en médecine traditionnelle

Les usages du *Vepris heterophylla* se résument essentiellement à ses interventions dans le traitement du paludisme, de l'hypertension. Il est aussi utilisé pour ses propriétés diurétiques (Malgras, 1992 ; Burkill, 1997).

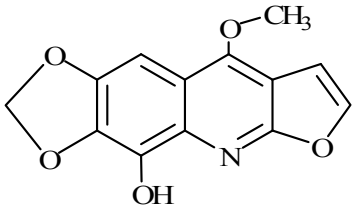
2.5.5 Données pharmacologique et toxicologique

Les alcaloïdes contenus dans les feuilles auraient une activité sur les bactéries et les champignons. Kokusaginine aurait une activité sur *Escherichia coli* et sur *Bacillus subtilis* avec une concentration minimale inhibitrice égale à celle de la gentamycine (4,88 µg / mL) ; l'alcaloïde maculine serait deux fois plus actif sur *Bacillus subtilis* que la kokusaginine donc que la gentamicyne (CMI = 1,22 µg / mL) ; ces deux alcaloïdes auraient une activité quatre fois moindre sur *Microsporum audorium* que le composé de référence nystatine (Kuete et al., 2008). Le Kokusaginine n'aurait pas d'activité sur les souches résistantes à la chloroquine (Al-Rehaily et al., 2003). La skimmianine contenue deans ses feuilles aurait des activités cytotoxiques sur les cellules cancereuses de sein et des tumeurs épidermiques (Cui et al., 1999).

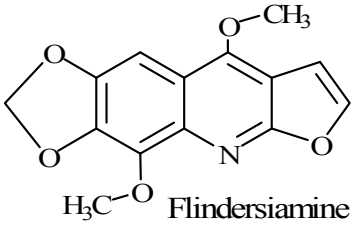
2.5.6 Constitution chimique

La plante contiendrait des alcaloïdes furoquinoléiques : maculine, skimmianine, flindersiamine, tecléine (Burkill, 1997), kokusaginine, evolatine, tecleaverdoornine *(www.rsc.org/ej/NP/1997/NP9971400011.pdf - page consultée le 23 Mars à 12H)*, http://www.google.com/search?hl=en&q=related:www.rsc.org/ej/NP/1997/NP9971400011.pdfdes C- glycosides : 2''-O-glucosylisovitexine, 2''-O-glucosylvitexine, isovitexine et du trans-sinapate de méthyle sont isolés des feuilles (Gomes et al, 1983).

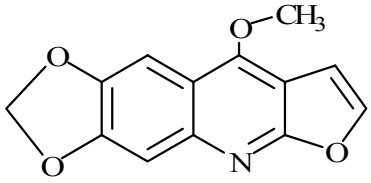
Quelques structures contenues dans *Vepris heterophylla*.



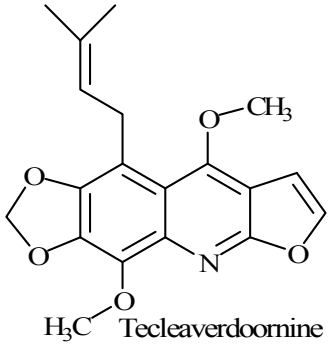
Técleïne



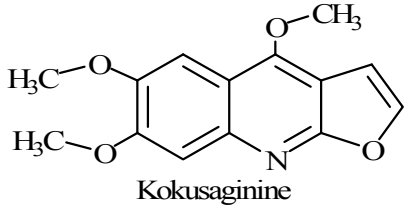
Flindersiamine



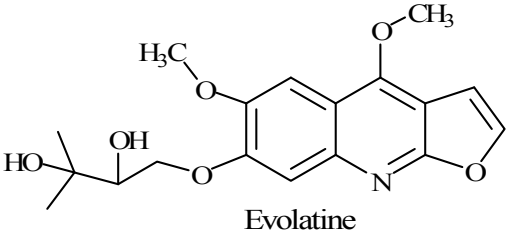
Macukine



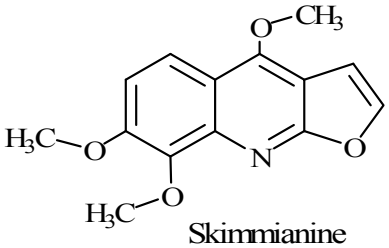
Tecleaverdoornine



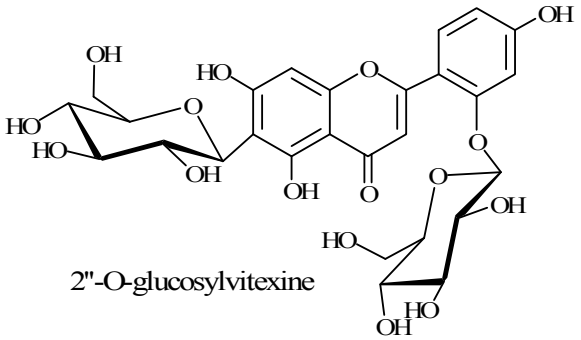
Kokusaginine



Evolatine



Skimmianine



2"-O-glucosylvitexine

2.6 Zizyphus mucronata Willd.

Zizyphus mucronata est une plante de la famille des Rhamnaceae, plante des régions chaudes et tempérées. Cet arbuste épineux est riche en tanins.

Il existe d'autres *Zizyphus* comme :

Zizyphus lotus subsp *saharae* Maire ;

Zizyphus abyssinica Hochst. ex. A. Rich. ;

Zizyphus mauritiana Lam.

Zizyphus spina (L.) Desf.

2.6.1 Etude botanique :

- Nom scientifique : *Zizyphus mucronata* Willd.
- Synonymes :

Zizyphus mitis A. Rich.

- Noms vernaculaires :

Français : Jujubier de la hyène

Bambara : Surukutomôlô

Peul: Dabiforu, gulijabi, gulunjaabi, N'gulunjaabi.

Bwa: Dèdèra tobo, Namuini tobo.

Tamachek: Bischon, Finta.

Serer: Ngick- Mon

2.6.2 Systématique et caractères morphologiques

Systématique

Règne : Végétal;

Embranchement : Spermaphytes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Asteridae

Ordre : Rhamnales

Famille : Rhamnaceae

Genre : *Zizyphus*

Espèce : *mucronata*.

Caractères morphologiques :

Arbuste sarmenteux, rarement arbre atteignant 9m de hauteur et 25 cm de diamètre. Ecorce brun gris à tranche blanche. Rameaux brun foncé à noirâtre et pubescents, retombants. Epines par paires, en général, une droite, l'autre recourbée.

Feuilles alternes, en général glabres sauf, le pétiole, largement ovées et acuminées, à base asymétrique subcordée, crenulée de 3 à 8 cm sur 2 à 6 cm.

Inflorescences verdâtres, courtement pédonculées. Fleurs hermaphrodites, en cimes axillaires. Fruits ronds (jusqu'à 2 cm de diamètre), avec un gros noyau. Péricarpe brillant et cassant,

brun rouge foncé. Les fruits sont frappants, surtout après la chute des feuilles. Pulpe amère (Maydell, 1983).



Figure 6 : Feuilles et Fruits de *Zizyphus mucronata*

2.6.3 Distribution / Habitat.

Toute l'Afrique dans les régions semi-arides ; Péninsule arabique (Maydell, 1983). Savanes soudaniennes à guinéennes, sur divers sols, gravillonnaires ou rocheux, bords des rivières ou termitières (Arbonnier, 2002). Au Mali, *Zizyphus mucronata* est assez commun et disséminé dans les savanes soudaniennes et sahelo-soudaniennes le long des berges des rivières (Malgras, 1992).

2.6.4 Utilisations en médecine traditionnelle

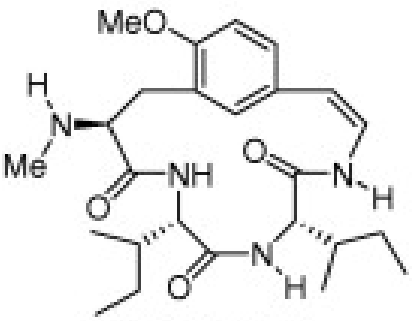
La plante est indiquée dans le traitement d'une multitude d'affections telles que adénites, furoncle, abcès, rougeole, douleur générale, dysenterie (Burkill, 1997).

2.6.5 Données pharmacologiques de Zizyphus mucronata

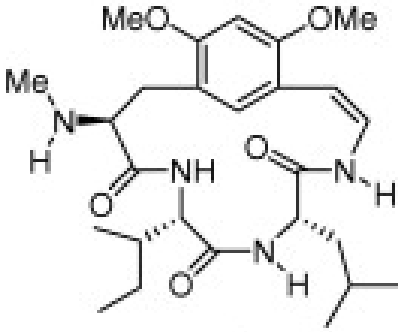
Les écorces de racines manifesteraient des activités marquées contre les cestodes de *Hymenolepsis diminuta* (Molgaard et al 2001). L'extrait de l'écorce de racine testé contre *Schistosoma mansoni* n'a pas montré de résultats intéressants. L'extrait de dichlorométhane des racines serait mutagénique contre la résistance TA98 de *Salmonella typhimurium* de même que l'extrait méthanolique à 90 % (Elgorashi et al, 2003).

2.6.6 Constituants chimiques

L'écorce de l'espèce sud africaine contiendrait 12,2–15,7 % de matières tanniques. L'espèce de Tanzanie donnerait des réactions positives concernant la présence d'alcaloïdes et de saponosides (Kerharo et Adam, 1974). Selon Burkill (1997), la racine contiendrait trois alcaloïdes qui seraient la mucronine J, la mucronine D et l'abyssenine A d'après Auvin et al (1996).



abyssenine B



mucronine E

Chapitre 3
L'activité antioxydante

Introduction

La génération des espèces réactives de l'oxygène dénommées ROS (Reactive Oxygen Species) se produit naturellement au cours de la respiration cellulaire (Tarnawski et al., 2005). Les ROS désignent une appellation collective et comprennent les radicaux libres et certaines molécules qui sont des agents d'oxydation et ou facilement convertis en radicaux. Les ROS dont les plus courants : le radical hydroxyl (•OH), l'anion superoxyde ($\bullet O^{2}-$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le dioxygène singulet ($1O_2$) endommagent la vie cellulaire en causant l'oxydation des lipides, des protéines et de l'acide désoxyribonucléique (ADN). L'évolution de cette oxydation semble être la cause de plusieurs maladies telles que le diabète, le cancer, les infections inflammatoires, les maladies cardiaques ou neurodégénératives et accélèrent le processus de vieillissement (Luximon Ramma et al., 2002 ; Dasgupta & De, 2007). Elle serait même impliquée dans la pathologie du paludisme et des ulcères gastriques (Gülçin et al., 2006).

Un antioxydant est une substance qui en faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable qui, de manière significative retarde ou empêche l'oxydation de ce substrat. Il peut agir en supprimant les ROS ou en empêchant leur formation ou encore en réparant les dommages causés par ceux-ci (Halliwell, 1991). Des activités antioxydantes liées aux saponines, aux triterpènes aux esters gras dérivant tous des plantes ont été reportées (Djeridane et al., 2006). Mais l'activité antioxydante des extraits de plante est essentiellement attribuée aux composés phénoliques en particulier aux flavonoïdes.

Ainsi dans la détermination de l'activité antioxydante d'extraits de plante, la teneur en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes totaux est aussi déterminée dans le but d'établir une corrélation essentielle entre teneur en composés phénoliques et activité antioxydante et ou entre teneur en flavonoïdes et activité antioxydante.

Les antioxydants de synthèse tels que le butyl hydroxy anisole (BHA) et le butyl hydroxy toluène (BHT) sont certes très efficaces mais susceptibles de manifester des effets secondaires et voir même toxiques (Manian et al., 2008). Plusieurs molécules à propriétés antioxydantes sont isolées des plantes (Lee et al., 2000; Cakir et al., 2003; Kumaran &

Karunakaran, 2007). Il est donc louable de chercher des antioxydants naturels efficaces sans ou présentant moins d'effets secondaires pour remplacer les synthétiques ou pour plus de choix à partir des plantes alimentaires et médicinales.

3.1 Quantification des polyphénols

L'estimation des polyphénols se fait couramment à travers les méthodes colorimétriques et d'analyse par chromatographie liquide haute pression (HPLC)

3.1.1 Les méthodes spectrophotométriques

Elles sont couramment utilisées, principalement pour leur simplicité, leur sensibilité élevée. La teneur en polyphénols totaux est déterminée par le test de Folin-Ciocalteu (760 - 765 nm, (Singleton et Rossi, 1965 ; Kim et al., 2003 ; Djeridane et al., 2006) ou le test du Prussian Blue (Price & Butler, 1977 ; Matuschek & Svanberg, 2005). Une courbe d'étalonnage est établie avec l'acide gallique et les résultats sont exprimés en équivalence d'acide gallique. Ces tests ayant comme principe le phénomène d'oxydo-réduction ne sont pas spécifiques à une classe de polyphénols et souffrent d'interférences avec les amino-acides de type tyrosine et d'autres composés non phénoliques tels que l'acide ascorbique (Dyke & Rooney, 2006).

Les flavonoïdes sont quantifiés par la méthode du trichlorure d'aluminium ; les tests de vanilline / acide chlorhydrique et butanol / acide chlorhydrique sont respectivement utilisés pour l'analyse de la catéchine et des proanthocyanidines. Des courbes d'étalonnage sont établies avec la catéchine en qualité de standards. Les résultats sont exprimés en équivalence et ne présentent pas de spécificité.

3.1.2 Analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide haute pression est sans doute la technique d'analyse, de caractérisation d'extraits en composés phénoliques la plus utilisée (Gomez- Caravaca et al., 2006) car présentant une haute résolution, une reproductibilité élevée, et une durée d'analyse relativement courte (Wollgast & Anklam, 2000). Elle peut être employée pour la séparation, la détermination quantitative, et l'identification des polyphénols. Utilisée généralement en phase inverse, elle comporterait trois points essentiels selon Wollgast & Anklam, 2000 ; Stalikas, 2007).

- **La colonne** :

Les colonnes les plus utilisées sont les RP C18 s'étendant de 100 à 250 millimètres de longueur avec un diamètre interne habituelle de 3,9 à 4,6 millimètres ; les dimensions particulaires vont de 3-10 µm.

- **Solvant d'élution**

Les solvants d'élution couramment utilisés sont le méthanol et l'acétonitrile en utilisant de l'acide acétique, formique, phosphorique ou trifluoroacétique. L'ajout d'acide en petite quantité a pour but de supprimer l'ionisation des composés phénoliques et des groupes carboxyliques ; apportant ainsi une bonne résolution et une bonne reproductibilité de lecture. L'analyse peut se faire en isocratique ou en gradient ; le débit couramment utilisé est de 1 mL / min.

- **La détection en HPLC**

Les composés phénoliques absorbent bien les rayonnements UV et le détecteur d'UV ou d'UV - Vis à longueurs d'onde variables est le plus généralement utilisé en chromatographie liquide haute pression. Aucune longueur d'onde ne peut à elle seule permettre la détection de toutes les différentes classes des composés phénoliques puisqu'elles présentent des maxima d'absorption à des différentes longueurs d'ondes. Néanmoins la détection à 280 nm est la plus utilisée pour l'analyse simultanée de mélange d'acides phénoliques et de flavonoïdes.

3.2 Méthodes de détermination de l'activité antioxydante

Il existe plusieurs méthodes spectrophotométriques de détermination de l'activité antioxydante. Les tests courants utilisés à cet effet selon Ozgen et al., 2006 sont:

- le test de l'acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS) ;
- le test du diphényl picrylhydrazyl (DPPH) ;
- le test utilisant le pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP) = ferric reduccing antioxidant power

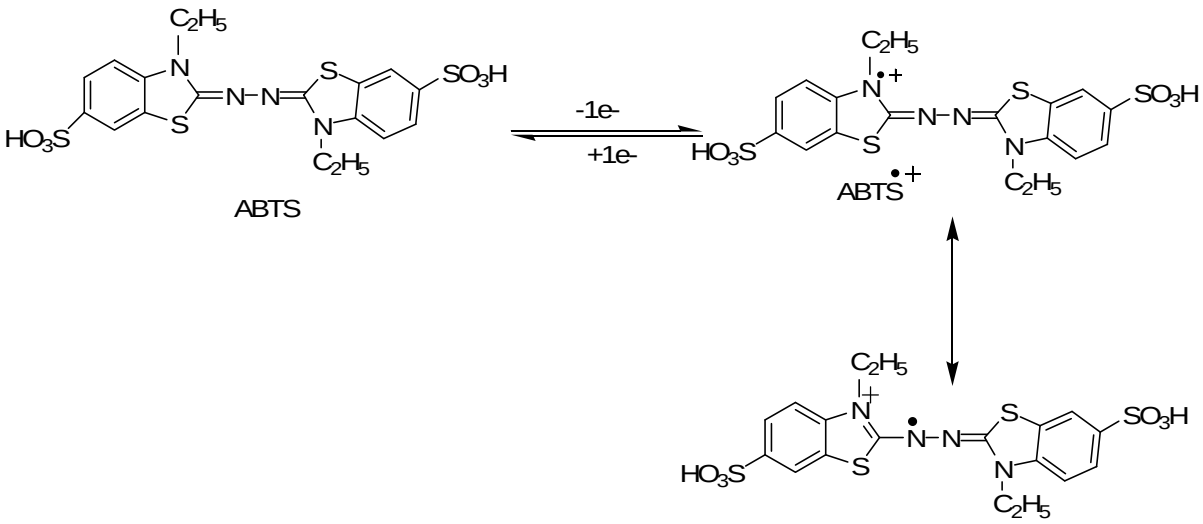
3.2.1 Le test d'ABTS

L'extrait de plante est mis en contact avec les radicaux libres d'ABTS préformés et l'absorbance est lue avec un spectrophotomètre à 734 nm. Les radicaux libres d'ABTS sont fondamentalement créés de deux manières :

A partir de l'ABTS et du persulfate de potassium $K_2S_2O_8$: les deux produits en solution aqueuse sont mélangés et mis à l'abri de la lumière pendant 12- 16H ; l'absorbance de la solution ainsi obtenue est ajustée à 0.700 ± 0.020 à 734 nm avant l'usage.

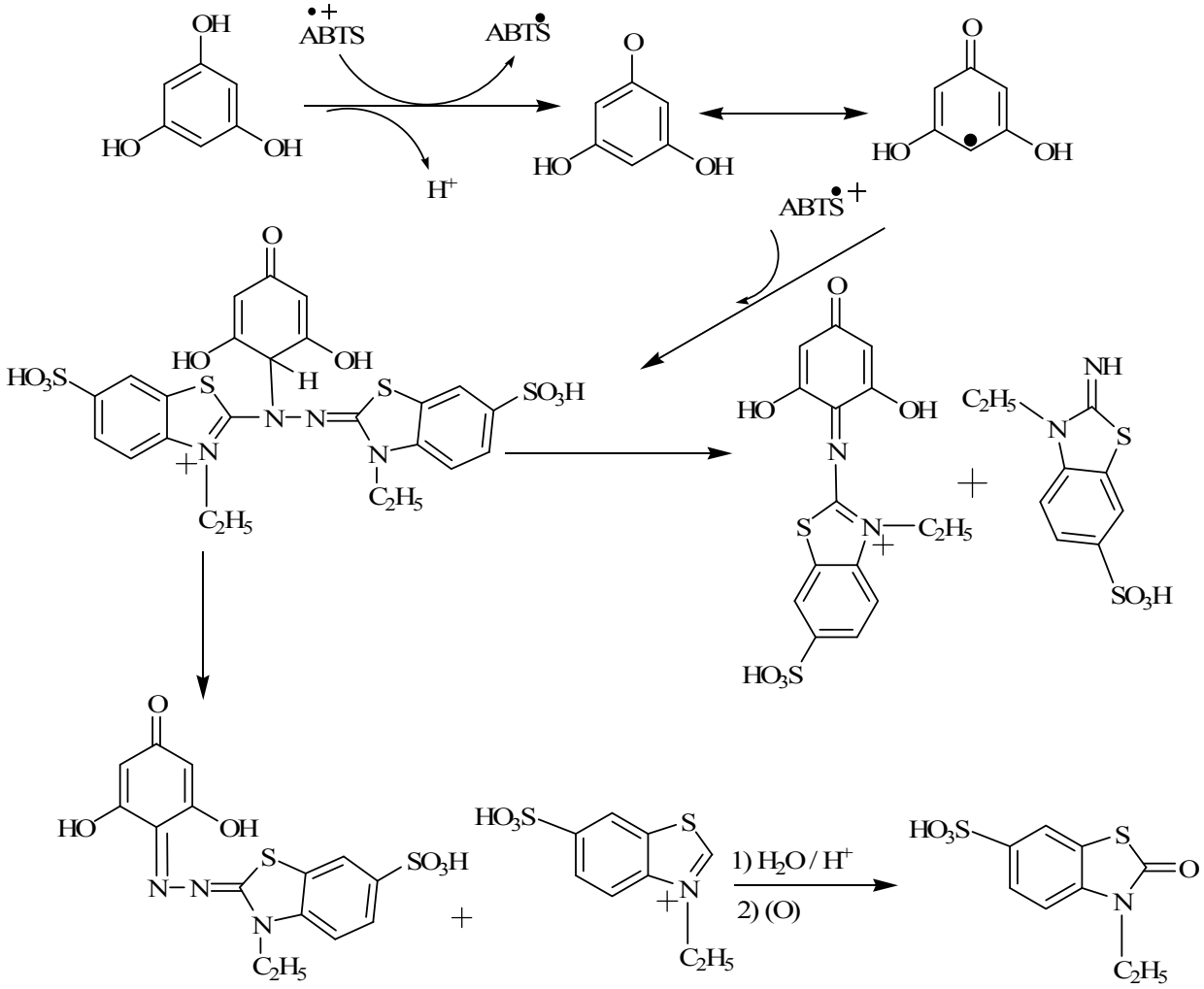
A partir de l'ABTS et du chlorure du 2, 2'-azobis (2-amidino-propane) (AAPH) jouant le rôle d'initiateur de réaction dans le tampon phosphate salin (PBS) à pH 7,4. Le mélange est chauffé à 68°C. L'absorbance de la solution obtenue (bleu – vert) est ajustée à 0,650 ± 0,020 à 734 nm (Kim et al., 2003).

Dans les deux cas, on assiste à une oxydation partielle de l'ABTS selon l'équation suivante :



Equation (1)

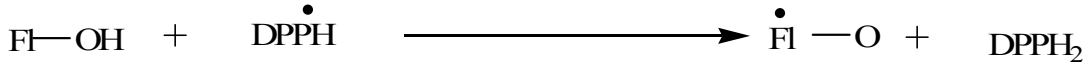
L'activité antioxydante de l'extrait est comparée à celle d'un antioxydant de référence en termes d'équivalence ou en termes d'inhibition. Les réactions qui se déroulent peuvent être de type ABTS / trans-3,3',4', 5,7-pentahydroxyflavan (catéchine) ou ABTS / 1, 3,5-trihydroxybenzène (phloroglucinol) schématisées par les réactions suivantes :



Equation (2) (Osman et al., 2006)

3.2.2 Le test du DPPH

Les radicaux du 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl sont dissous dans du méthanol généralement à 0,004 % (P/V). L'extrait de plante ou l'antioxydant de référence est mis en contact avec la solution radicalaire de DPPH ; après incubation l'absorbance est lue à 515-517 nm. Les réactions qui se déroulent peuvent être de type



Equation (3)

L'activité antioxydante de l'extrait est comparée à celle d'un antioxydant de référence en terme d'équivalence ou en terme d'inhibition.

3.2.3 Le test TPTZ

La réduction des ions ferriques est aussi utilisée pour déterminer le potentiel antioxydant. Le réactif est fraîchement préparé en mélangeant une solution de 10 mM de 2, 4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) et de 20 mM de chlorure ferrique dans un tampon acétate (0.25- 0,3 M) à pH = 3,6 dans le rapport 1 / 1 / 10. L'absorbance du mélange (extrait de plante et réactif) est lue à 593 nm après incubation à la température ordinaire. L'activité antioxydante de l'extrait de plante est comparée à celle d'un antioxydant de référence en terme d'équivalence ou en terme d'inhibition (Luximon-Ramma et al., 2002 ; Ozgen et al., 2006 ; Céspedes et al., 2008).

Partie II

Etude expérimentale

Chapitre 1
Enquête ethnobotanique

Introduction

La médecine traditionnelle demeure le recours principal pour une grande majorité des populations pour résoudre leurs problèmes de santé, non seulement du fait qu'elle constitue un élément important du patrimoine culturel, mais aussi pour les raisons de moyens financiers limités face aux produits conventionnels. Elle a été transmise d'une génération à l'autre par la communication orale, posant le danger de perte d'une certaine connaissance. L'enquête ethnobotanique s'avère indispensable pour la connaissance des plantes médicinales et leurs utilisations. Une vaste connaissance de la façon d'utiliser les plantes contre les différentes maladies est fort envisageable dans les zones où l'utilisation des plantes est toujours de grande importance.

Le but de notre étude était d'identifier les différentes utilisations médicinales traditionnelles des six plantes médicinales, et de documenter la connaissance médicinale traditionnelle liée à l'utilisation de ces plantes à Siby et à Kolokani en collaboration avec les tradithérapeutes et les héraldistes qui sont les détenteurs du savoir dans ce domaine. Les résultats donneront un aperçu général sur le pouvoir curatif de ces plantes selon les guérisseurs dans ces localités.

1.1. Description et Choix des localités de l'enquête

L'étude ethnopharmacologique a été réalisée de septembre 2005 à octobre 2005 dans les districts de Siby et de Kolokani appartenant à la région de Koulikoro.

- Siby, situé à 50 kilomètres au sud de Bamako avec une population estimée à près de 60000 habitants comporte 54 localités malinkées. La précipitation annuelle moyenne est de 1032,70 mm environ en 2004.

- Kolokani, avec une superficie de 3300 km^2 se situe à 140 kilomètres au nord de Bamako. La ville a une population estimée à près de 80000 habitants et comporte 111 localités. Les précipitations annuelles moyennes sont de 607,7 mm. (Les données statistiques viennent de la Direction Nationale de la Statistique et de l'Informatique : DNSI dans l'annuaire de Koulikoro 2003, 2004).

La position de ces deux villes peut être lue sur la carte établie à cet effet (voir figure 7) Ces deux localités ont été choisies pour leur facilité d'accès et du fait que les guérisseurs traditionnels sont organisés et réputés pour avoir une bonne connaissance sur l'utilisation des plantes médicinales.

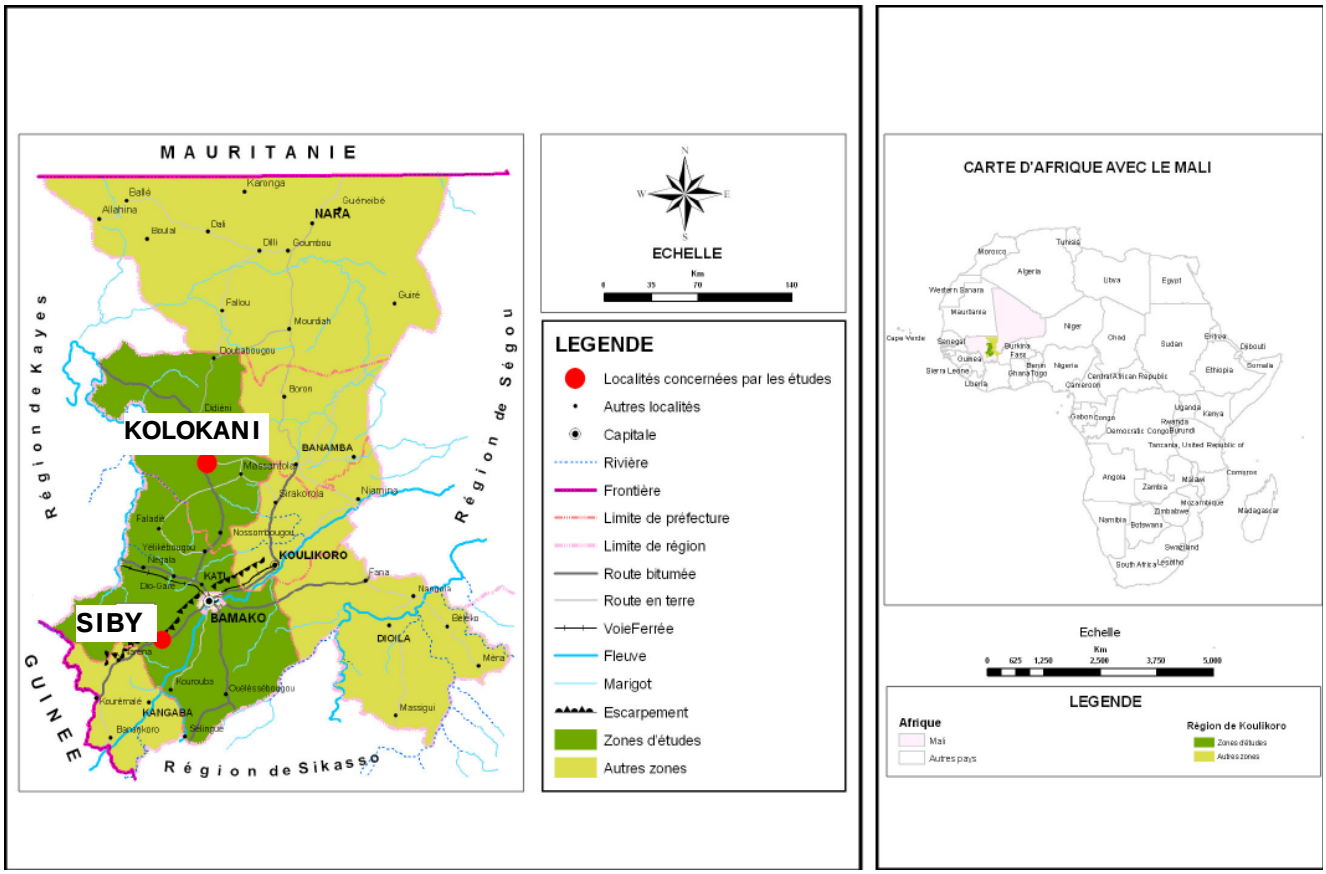


Figure 7 : Carte relative à l'enquête ethnobotanique

1.2. Méthodologie

La méthodologie utilisée est celle du DMT. Nous nous sommes entretenus avec 44 guérisseurs des deux villes (22 par ville) ; les hommes avec un âge moyen de 60 ans étaient au nombre de 32 tandis que le reste était composé des femmes dont l'âge moyen est de 66 ans. Les informations sur les utilisations des six plantes ont été collectées à l'aide d'un

questionnaire semi structuré à travers des conversations avec les guérisseurs en utilisant la langue nationale (bambara). Les guérisseurs ayant accepté de partager avec nous leur savoir ont été invités à donner leur connaissance au sujet des maladies pour lesquelles ils utilisent ces plantes, la méthode de la préparation du médicament ainsi que les détails de son administration, y compris les quantités et le nombre approximatifs de doses par jour ou par semaine, la durée du traitement, les effets secondaires et comment traiter ces effets secondaires. Le questionnaire utilisé pour cette circonstance se trouve en annexe 1. Les utilisations principales de ces plantes ont été déterminées par leur fréquence d'utilisations car dans une étude ethnopharmacologique, la fréquence par laquelle une plante donnée est mentionnée dans le traitement d'une affection peut être un bon indicateur de son efficacité. Les six plantes suivantes étaient l'objet de l'étude : *Anogeissus leiocarpus* (D.C.) *Guill*. et Perrot (Combretaceae), Cissus *populnea Guill*. et Perr. (Vitidaceae), *Mitragyna inermis* (Willd.) O. Ktze. (Rubiaceae), *Terminalia macroptera Guill*. et Perrott (Combretaceae), *Vepris heterophylla R. Let* Rutaceae, *Zizyphus mucronata* Willd. (Rhamnaceae). La matière végétale a été authentifiée par le DMT, Bamako, Mali, où les spécimens sont déposés dans leur herbarium.

1.3. Résultats de l'enquête ethnobotanique

Les résultats de l'enquête ethnobotanique sont présentés dans le tableau 5 ci-dessous

Espèces, famille Nom local	Usages	Parties utilisées	Préparation	Administration
Anogeissus leiocarpus	Douleur abdominale, aperitif	F, ET	Décoction, infusion	Boisson.
	Vomissement	F	Décoction	Voie orale
	Toux	ET	Infusion (poudre carbonisée).	Voie orale
	Maladie causant des tremblements	ET, ER	Décoction.	Voie orale

(DC). Guill. & Perr (Combretaceae) (a) Ngalama (b) kèrèkètè	Fièvre	F, ET, R, ER, fleurs,	Décoction, infusion.	Voie externe, interne	38
	Douleur générale, fièvre infantile	F	Décoction.	Voie externe, interne	
	Fatigue générale	F	Décoction.	Externe, interne	
	Hemorroïdes	F	Décoction.	Voie externe	
	jaunice infantile, laxatif	F	Décoction.	Bain, boisson.	
	Jaunice	F, ET, R	Decoction, infusion	Bain, boisson	17
	Leucorrhée	F, ET	Décoction, infusion.	Bain, boisson.	
	Maladie de poumons	F	Décoction.	Fumigation, bain, boisson.	
A. leiocarpus (suite)	paludisme	F, ET, R, ER	Décoction, infusion	Fumigation, bain, boisson	5
	Constipation infantile	F	Décoction.	Boisson	
	Impotence Sexuelle	F, ET	Infusion.	Voie orale	
	Schistosomiase urinaire	F, R	Decoction	Fumigation, bain boisson.	3
	douleur abdominale, infection de la prostate	R	Infusion.	Boisson	

	Aménorrhée	Stem	Infusion.	Voie orale	
	Stérilité, laxatif	R	infusion	Voie orale.	
Cissus populnea Guill. et Perr. (Vitidaceae) (a)(b) : N'garo	Dermatose	Stem	Poudre de tiges carbonisées + beurre de *Vitellaria paradoxa*.	Appliquer sur la peau	
	Diarrhée	F, stem	Infusion	Boisson	
	Distension, hypertension	F	Décoction	Boisson	
	Dysenterie	Stem	Décoction.	Voie orale	
	Fièvre	F	Décoction	Bain, boisson.	
	Hemorroïdes	F, stem, R	Décoction, infusion.	Bain, boisson	3
	Augmentation de spermes	F, tiges, R	Décoction, infusion..	Voie orale	6
	Parasites Intestinaux	stem	Infusion.	Voie orale	
	Jaunice	F, R	Décoction.	Voie, externe, interne	
	Accouchement naturel	Stem	Infusion.	Voie orale.	
C. populnea (suite)	Impotence sexuelle	F, stem, R	Décoction, infusion	voie orale.	3
	Maux d'estomac	F, R	Décoction, infusion	Voie orale	4

	Enflures	tiges, R, peau de racines	Pâtes.	Voie externe	15
Mitragyna inermis (Willd.) O. Ktze. (Rubiaceae) (a)(b) Djoun	Douleur abdominale	ET, R	décoction.	Voie orale	
	Vomissement, rhume	F	Décoction.	Fumigation, bain, boisson.	
	Anxieté	Gui	Infusion, macération	Voie externe	
	Apéritif	F	Décoction..	Voie externe et interne	
	Maladie du diable	F	Décoction	Bain et boisson.	
	Fièvre	F, ET, R	Décoction, infusion	Fumigation, bain, boisson.	37
	Gonorrhée	ET, R	décoction..	Voie orale	
	Maux de tête	F	Poudre sur des braises ardentes.	fumigation	
	Boulle interne	R	Macération	Voie interne.	
M.inermis (suite)	Vers intestinaux	F, ET, ER,	Décoction, infusion	voie interne	
	Jaunice	F	Décoction	Bain	
	Maladie de foie	F	Décoction	voie externe, interne	
	Paludisme	F, ET	Décoction,	Voie interne.	3

			infusion		
	Impotence sexuelle	F, ET, R, ER	Décoction, infusion.	Voie interne	
	Fatigue	F	Décoction. Fumigation,	Bain, boisson	
Terminalia macroptera Guill. et Perrott (Combretaceae)	Douleur abdominale	F, ET, R	Décoction, infusion, macération	par voie orale.	
(a)(b): Wolo	Anti-abortif	R	Décoction, maceration.	Boisson	
	Asthme, maladie des os	F	Décoction	Voie externe, interne	
	Cessité	F, ET, ER	Décoction	Voie externe.	5
	brûlures causées par l'huile ou l'eau chaude	ET, ER	Sève des fibres.	Application locale	
	Douleur de poitrine	F, ET	Decoction	application locale	7
	Plaie de circumcis	F, ET	Décoction	Voie externe.	
	Toux	ET	Infusion	Voie interne.	
	Dermatose	F, ET, ER	Decoction, infusion, maceration	Application externe.	3
T. macroptera (suite)	Diabète	F	Décoction	voie orale	
	Diarrhée	F, R	Décoction;	Voie interne.	
	Vertiges	F, ET	Décoction,	Voie externe,	

		infusion.	interne.	
Maux d'yeux	F	Sève	Voie externe	
Fertilité de femme	mistFetoe	Décoction, infusion.	Voie externe	
Fièvre	F, ET, R, ER	Décoction, infusion	Voie externe interne.	6
Douleur générale	F	Décoction	Voie externe interne	
Hémorroïdes	ET, ER	Décoction, infusion.	Voie externe	
Maux de tête	F	Décoction	Voie externe.	
Plaies internes	F, ET, ER	Décoction, infusion.	Voie interne.	
Parasites intestinaux	ET	Décoction.	Voie interne.	
Jaunice	F, ET, R	Décoction,	voie externe interne.	6
Laxatif	F, ET, R	Décoction,	voie externe interne.	
Leucorrhée	ET, R	Décoction	voie interne et externe	3
Paludisme	F, R	Décoction	Voie externe et interne	3
Menstruations irregulières	ER	Maceration, infusion..	Voie interne	
Plaies de bouche	ET	Décoction;	Voie externe.	

	Purgatif	ET, ER	Décoction, infusion..	Voie interne	
	Impotence sexuelle	F, ET, ER	Décoction, infusion.	Voie externe, interne	
T. macroptera (suite)	Maux d'estomac	ET, ER	Macération	Voie interne	3
	Enflures	F	Décoction	Voie externe, interne	
	Schistosomiase urinaire	F	Décoction	Voie externe, interne	
	plaies	F, ET, R	Décoction	Application locale	
Vepris heterophylla R. Let. (Rutaceae)	Douleur abdominale, vomissement	F	Décoction	Voie interne.	
(a): Kita Kinkeliba (b) Fomina, Tilojan	Aperitif	F	Décoction,	Voie interne.	
	Aphrodisiaque	F	Décoction, infusion.	Voie orale.	
	Maladie alterant la couleur des urines	F	Décoction;	Voie interne.	
	Epilepsie	F, R	Décoction.	en voie externe et interne	
	Fièvre	F, ET, R	Décoction, infusion.	Voie interne	18
	Hypertension	F, ET, R	Décoction, infusion.	Voie interne	3

	Jaunice	F	Décoction, infusion.	voie interne	
	Laxatif	F	Décoction	Voie interne.	
	Paludisme	F	Décoction	Voie orale.	
	Gargouillement	F	Décoction	Voie orale.	
	Impotence sexuelle	F, R	Décoction.	en voie interne et externe	
Zizyphus mucronata Willd. (Rhamnaceae)	Douleur abdominale	F, ET, R, ER, fruit	Décoction, infusion	Voie orale	18
(a)(b): Suruku-tomolon	Douleur abdominale (après accouchement)	ER	Infusion.	voie interne	
	Aménorrhée	ER	Infusion	voie interne	
	Aperitif	ET	Decoction,.	voie orale	
	Contrôle de naissance	Fruit	Avaler les fruits sans contact avec les dents.	Voie orale	
	Diabète	F, ET, R, ER	Décoction.	, voie externe et interne	
	Diurétique	R	Décoction	Voie orale	
	Dysenterie	R	Infusion	Voie orale	
	Dysménorrhée	F, ET, R	Décoction	Voie orale	
Z. mucronata (suite)	Maux d'yeux	Fruit, R	Avaler les fruits sans contact avec les dents	Voie orale	
			Décoction	voie externe	

			(racines) .		
	Fièvre	ET	Décoction	voie orale.	
	Lactation	F, fruits	Poudre	Voie orale	
	Gonorrhée	ER	Infusion.	voie orale	
	Maux de tête	ET	Poudre sur des braises	inhalation	
	Hernie	F, ET, R	Décoction, infusion, macération	Voie orale.	3
	Augmentation de spermes	ER	Décoction	Voie orale.	
	parasites intestinaux	F, ET, R, ER	Decoction, infusion.	Voie orale.	3
	Onchocercose	R	Macération	Voie orale.	
	Menstruation Prolongée	F, ER	Decoction, infusion;.	voie interne	
	Impotence sexuelle	ER	Infusion..	Voie orale	3
	Dermatose	ET	Décoction	Application locale	
Z. mucronata (suite)	Maladies inconnues	F, ET, R, ER	Décoction, Poudre sur des braises ardentes.	Voie externe et interne.	
	Schistosomiase urinaire	F, ER	Décoction, infusion..	Voie externe et interne	
	Plaies	F, ET, ER	Pâte avec le beurre *Vitellaria paradoxa*;.	Application locale	

Tableau 5 : Résultats de l'enquête ethnobotanique

1.4. Discussions des résultats de l'enquête ethnobotanique

1.4.1 Maladies et parties de plantes

Les résultats sont présentés dans le tableau 5. La distribution des tradithérapeutes déclarant connaître ces plantes ainsi que leurs utilisations médicinales est comme suit : *Anogeissus leiocarpus* (44), *Cissus* populnea *(*32), *Mitrag*yna *inermis* (*41) Terminalia macroptera* (36), *Vepris heterophylla* (24) et *Zizyphus mucronata* (28). L'étude a en général identifié environ 70 maladies dont les principales sont : fièvre, paludisme, ictère, blessures, hémorroïdes, douleur, impuissance sexuelle, aménorrhées, dysménorrhées, maux d'estomac. Environ 20 maladies peuvent être traitées par *Anogeissus* leiocarpus, 19 par *Cissus populnea*, 16 par *Mitragyna inermis*, 35 par *Terminalia* macroptera, 13 par *Vepris* heterophylla et 24 maladies par *Zizyphus mucronata*. En tenant compte du nombre de tradithérapeutes soumis à l'enquête ethnobotanique, nous avons estimé qu'un usage mentionné avec une fréquence de trois au moins pourrait avoir une présomption d'être considéré comme usage majeur de la plante et mérite une attention particulière. Ces résultats montrent clairement que quatre des plantes d'étude auraient avoir des propriétés antipaludiques puisque le paludisme est connu de ces tradithérapeutes sous le nom fièvre qui est un signe clinique de la maladie, une plante à propriétés anti-inflammatoire (*C. populnea*) et une plante à propriétés antalgiques (*Z. mucronata*).

Du point de vue pharmacologique, par rapport aux usages majeurs de ces plantes, l'activité antipaludique d'*A. leiocarpus* est démontrée (Vonthron-Sénécheau et al., 2003 ; *Okpekon et al* 2004), celle de *T. macroptera* par Sanon et al. (2000) mais les principes actifs ne sont pas identifiés. L'activité antipaludique de *M. inermis* serait due aux alcaloïdes oxyindoliques contenues dans les diverses parties de la plante et à l'acide ursolique (Maïga et al., 2005). L'étude pharmacologique a cependant révélé l'inactivité de *C. populnea* par rapport à l'amélioration de la fertilité et aux paramètres de sperme (Ojekale et al., 2006).

Les feuilles sont les plus utilisées, constituant environ 54,35% des préparations suivies des racines 26,35 %, écorce de tronc 14,82 %, tiges 3,06 %, fruit, gui et fleur 1,42%. Ces résultats seraient en accord avec ceux de Maregesi et collaborateurs (2007) ceux de Rodrigues (2007) qui ont trouvé que les feuilles, les racines et les écorces sont les parties de plante les plus utilisées. Notre étude a dans l'ensemble indiqué que les parties aériennes de quatre

plantes sont les plus employés par les guérisseurs de ces deux localités. Les racines seraient les plus utilisées dans les diverses préparations de Cissus populnea et de *Zizyphus mucronata* avec des pourcentages de 54,90 % et de 57,58 % respectivement. Selon De-la-Cruz et al. (2007), pour la survie d'une plante, la racine ne peut intervenir seulement dans peu de préparations médicinales car l'enlèvement des racines pourrait causer la mort de la plante, mettant l'espèce dans une situation vulnérable quand la récolte est significative et quand il n'y a aucun plan de culture. *C. populnea* et *Z. mucronata* seraient alors menacés de disparition puisqu'il n'ya pas un plan de culture pour ces plantes. Le mode de préparation le plus utilisé était la décoction de la matière végétale fraîche, sèche en poudre ou non ; ceci serait en accord avec les résultats de Inngjerdingen et al. (2004), Bah et al. (2006), Rodrigues (2007).

1.4.2 Voies d'administration et sûreté

La plupart des préparations, décoctions, infusion macération se prendraient oralement et quelques fois de façon topique. Toutefois certaines préparations telles que sève, pâtes obtenues en malaxant la poudre de la matière végétale sèche avec le beurre de *Vitellaria paradoxa* ou avec de l'eau sont employés extérieurement pour le traitement œdémateux, les blessures et d'autres infections de la peau. L'inhalation de vapeur résultant de certaines préparations, le bain avec macéré, infusion ou décoctions sont aussi d'autres voies d'administration. Les durées de traitement et les doses sont très diverses.

L'usage de certaines préparations obtenues à partir d'*A. leiocarpus* et de *Z. mucronata* ne serait pas souhaitable chez les femmes enceintes car jugées amères et de ce fait sont susceptibles d'être abortives. En fait, il est rapporté que les plantes présentant des effets toxiques, teratogènes et abortifs ont généralement un gout amère (Rodrigues, 2007).

Certains tradithérapeutes ont évoqué quelques effets secondaires liés à l'usage de certaines préparations tels que vomissement dans le cas d'*Anogeissus leiocarpus*, vertige, tremblement dans le cas de *Terminalia macroptera* et vertige, diarrhée seraient liés à la prise d'une combinaison obtenue à partir *Zizyphus mucronata* et de *Mitragyna inermis*., que l'on pourrait remédier avec un bain tiède et on préconise la prise de lait frais, jus du citron, décoction ou infusion des fruits *de Tamarindus indica* pour les cas d'intoxication. Une autre enquête conduite à propos des plantes toxiques sur les différents marchés de Bamako par Maîga et al. (2005) aurait indiqué que l'on observerait salivation, nausée, vomissement avec l'usage de preéparation à base d'*Anogeissus leiocarpus* et vomissement dans le cas de *Mitragyna inermis*. Ces effets pourraient être traités par la décoction des feuilles de *Guiera senegalensis*

J.F.Gmel (Combretaceae) et celle des feuilles de *Vitex doniana* Sweet (Verbenaceae) respectivement. Par ailleurs, l'étude toxicologique a montré chez les rats que l'extrait éthanolique des écorces de tronc de *T macroptera* affiche une dose létale de 250 mg/kg (Conrad et al., 2001) et a révélé une absence de toxicité de l'extrait hydroéthanolique des feuilles de *M. inermis* (Monjanel-Mouterde et al., 2006). En fait il est difficile de conclure sur l'aspect effets secondaires et toxicologique de ces plantes puisque le concept de dose n'est pas maîtrisé par ces guérisseurs; les effets évoqués pourraient être liés à un surdosage.

Conclusion

Nous avons collecté des informations relatives aux diverses utilisations traditionnelles médicinales de six plantes maliennes à Kolokani et à Siby situés dans la région de Koulikoro (Mali). Les résultats obtenus à partir de cette enquête nous ont permis de déterminer les principales utilisations médicinales dans chacune de ces localités. Des études phytochimiques, pharmacologiques et toxicologiques sur ces plantes seront faites dans le but d'une validation scientifique des usages traditionnels de ces plantes et pour en faire des MTA efficaces et non-toxiques à la population malienne, chez laquelle les plantes médicinales jouent encore un rôle essentiel dans les soins de santé primaire.

Chapitre 2

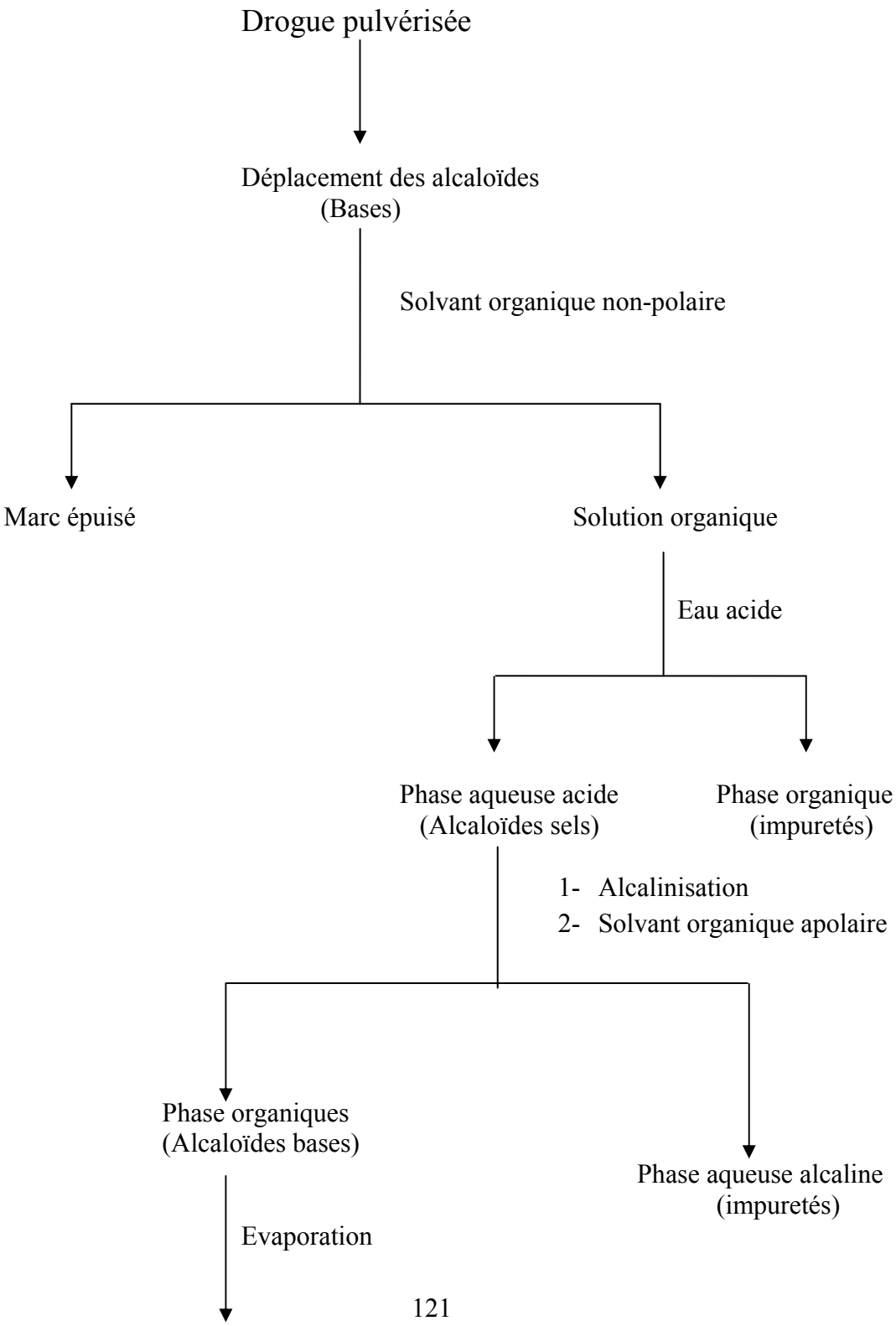
Isolement et identification structurale de deux alcaloïdes de *Vepris heterophylla* R Let. (Rutaceae)

L'enregistrement des spectres de masse et les expériences de RMN 2D ainsi que leurs interprétations ont été réalisés à l'Université de Reims (France) à l'UFR de pharmacie au laboratoire de pharmacognosie.

2.1. Extraction des alcaloïdes totaux

La poudre des feuilles (650 g) de *Vepris heterophylla* est extraite avec 1,5 L de méthanol à reflux (12h). Après filtration et rinçage du marc, le méthanol a été évaporé à l'aide d'un rotavapor (Heidolph) et le résidu est repris dans une solution d'ammoniaque diluée à ½ pour être soumis au protocole classique d'extraction des alcaloïdes selon le schéma 1. La solution alcaline a été extraite par du chloroforme. Cette phase chloroformique a été concentrée partiellement pour être extraite par une solution aqueuse d'acide sulfurique à 5 % à volumes égaux quatre fois. La phase acide a été à son tour alcalinisée par une solution d'ammoniaque diluée à ½ pour être en fin extraite par du chloroforme. Après évaporation, il est obtenu un résidu pâteux d'alcaloïdes totaux de couleur brune et de masse 5,75g, soit un rendement de 0,88 %.

Schéma 1 : Extraction des alcaloïdes par des solvants non-polaires



Résidu d'alcaloïdes totaux

2.2. Isolement et caractérisation

Une colonne de 3cm de diamètre et de 60 cm de hauteur contenant 100 g de silice de 200 mesh a été utilisée. L'élution est faite en utilisant le mélange acétate d'éthyle : méthanol : ammoniaque dans les proportions (100 : 0 : 0 ; 90 :10 : 0,5 ; 80 : 20 : 0,5 ; 50 : 50 : 0,5) successivement (Balansard et al., 2007). Deux fractions majeures réagissant avec le réactif de Dragendorff sur plaque de CCM notées F1 (0,4g) et F_2 (0,77 g) ont été obtenues.

La fraction F_1 a été ensuite purifiée sur colonne (dimensions : 2 cm de diamètre, et 40 cm de long) contenant 35 g de gel de silice et éluée avec un système dichlorométhane : méthanol (98 : 2). Il est obtenu un composé noté A_1 de masse 63 mg qui se présente sous la forme d'une poudre blanche.

Le spectre de masse du composé A1 réalisé en Impact Electronic (EI) indique des pics moléculaires m/z à 259 (100%) et à 260 respectivement relatifs à $M^{+\bullet}$ et à $[M+H]^+$ correspondant à une masse molaire moléculaire de 259 (figure 8).

La fraction F2 a été purifiée sur une colonne remplie identique, mais éluée avec un mélange dichlorométhane : méthanol (95 : 5). Il en est obtenu un composé A2 de masse 163 mg, qui se présente également sous forme d'une poudre blanche dont le pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D$ = -7,9 (c 0,252 ; MeOH).

Le spectre de masse du composé A2 réalisé en Elestro Spray (ES) en mode positif indique des pics moléculaires m/z à 348,2 et à 370,1(100%) correspondant respectivement $[M+H]^+$ et à $[M+Na]^+$; on en déduit une masse molaire moléculaire de 347 g .mol^{-1} (figure 9).

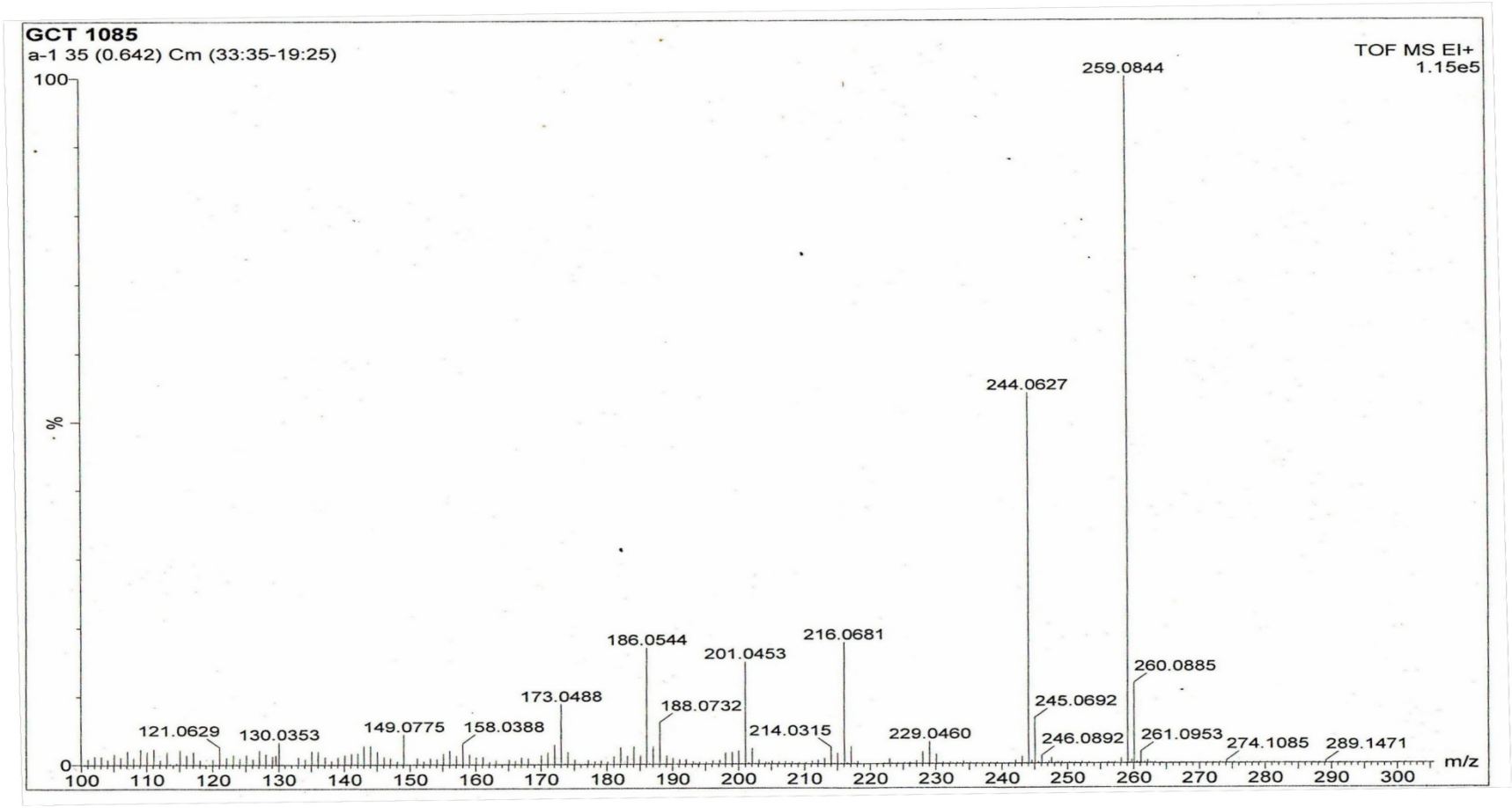


Figure 8 : Spectre de masse du composé A1 (EI-MS)

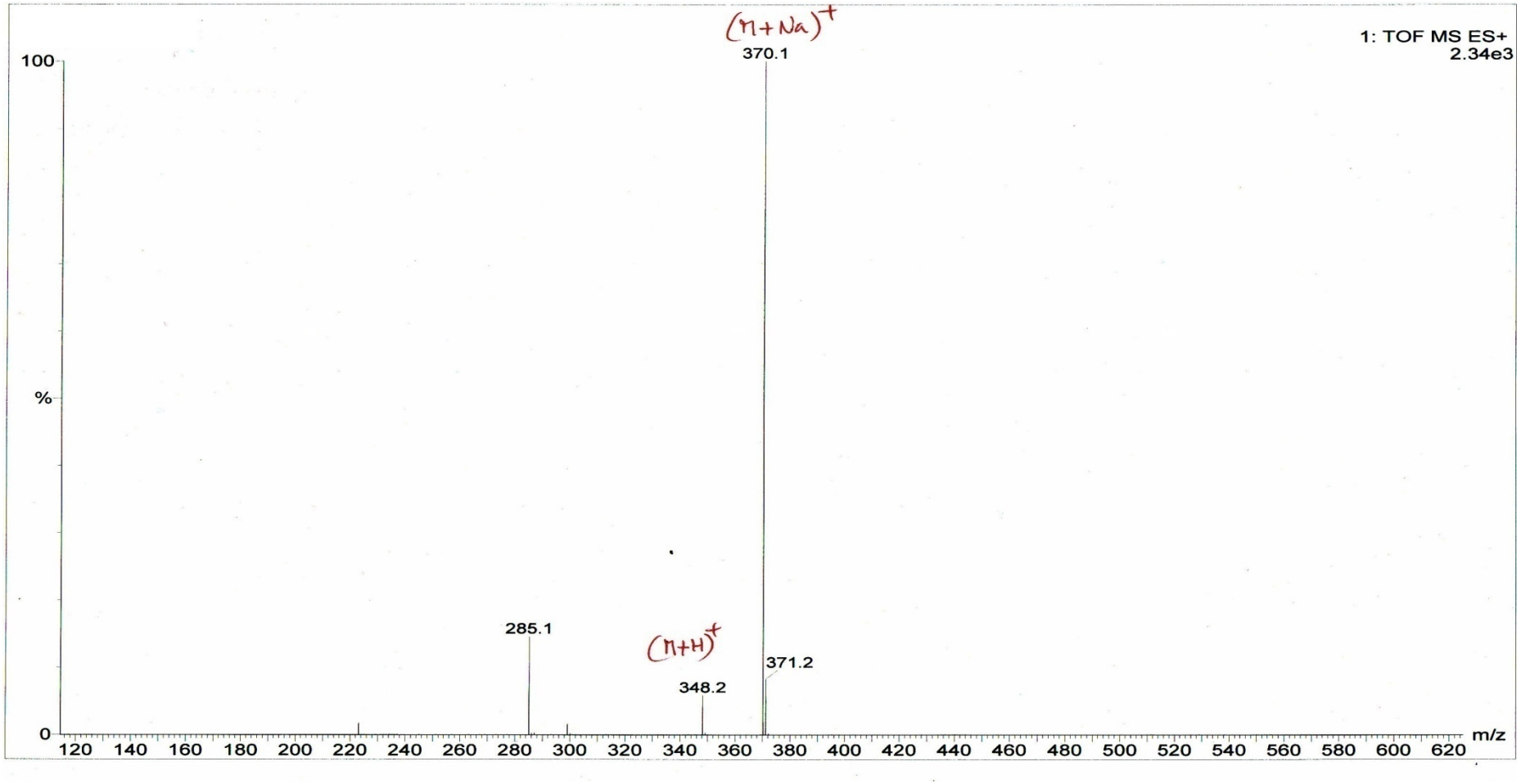


Figure 9 : Spectre de masse du composé A2 (MS - ES) en mode positif

2.3 Identification structurale par spectroscopie RMN 2D

2.3.1 Analyse par Résonance Magnétique Nucléaire 2D (^{1}H, ^{13}C)

La résonance magnétique nucléaire à haute résolution est une méthode physique essentielle pour l'analyse des structures et des conformations moléculaires. Grâce aux progrès considérables accomplis dans la méthodologie de cette technique durant les 20 dernières années (développement de spectromètres à haut champ, augmentation de la puissance des ordinateurs, découverte de la RMN multidimensionnelle), la RMN est devenue un outil indispensable pour l'analyse des produits naturels complexes.

L'étude structurale d'un produit naturel nécessite dans un premier temps l'enregistrement des spectres 1D (RMN, ^{1}H, ^{13}C) dans les meilleures conditions possibles. Ce qui permet d'obtenir des informations importantes sur le déplacement chimique, et les constantes de couplage. Par ailleurs, des expériences d'irradiation sélective et de découplage peuvent être effectuées pour identifier les signaux complexes d'un système de spin.

Malheureusement, dans les molécules complexes comme c'est souvent le cas pour les produits naturels, l'information sur les déplacements chimiques et les constantes de couplage sont parfois inaccessibles dans les spectres de RMN à une dimension à cause des recouvrements de signaux.

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 de structures complexes.

Nous nous intéresserons non pas à la description mathématique et à l'explication des séquences d'impulsion, mais à l'évaluation pratique des spectres et à leur importance dans l'élucidation de nos structures. Nous exposerons ici les techniques de RMN 2D homonucléaire (NOESY) et hétéronucléaire (HMBC) employées pour la détermination de nos structures.

- RMN homonucléaire :

L'une des techniques les plus importantes est l'expérience COSY (homonuclear COrrelated SpectroscopY), dont les spectres montent 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 alors 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 y a un carbone quaternaire.

L'expérience NOESY (homonucléaire Nuclear Over hauser Effect spectroscopY) effectuée dans notre cas, a l'avantage par rapport à la technique COSY de montrer des interactions de longue distance entre deux protons, traduisant ainsi leur proximité spatiale (2 à 5 Å).

- RMN 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 alors recours à la RMN hétéronucléaire du carbone 13 ou de l'azote 15.

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 ou ^{15}N a 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_{C-H}) hétéronucléaire qui transfère la polarisation du noyau le plus sensible (^{1}H) vers le noyau le moins sensible (^{13}C). Ce qui permet alors soit, de corréler les signaux d'un proton à celui du noyau ^{13}C auquel il est lié dans le cas des expériences HMQC (^{1}H-detected chemical shift correlation via Multiple Quantum Coherence), ou de déterminer des couplages lointains ^{1}H—^{13}C à travers 2, 3 ou 4 liaisons covalentes, dans le ces des expériences HMBC (^{1}H-detected chemical shift correlation via Multiple Band Coherence).

2.3.2 Composé A_1

Les déplacements chimiques et les attributions des signaux ainsi que les constantes de couplages sont présentés dans le tableau 6. Le spectre RMN ^{1}H est représenté à la figure 10 et celui du spectre ^{13}C sur la figure 11 et l'expérience HMBC qui en découle est représentée sur la figure 12.

	δ_H (ppm)	Signal (m)	J (Hz)	δ_C (ppm)
1				163
2	7,58	dd	2,7	142,5
3	7,05	dd	2,7	104,6
3a				102,1
4				155,5
4a				112,9
5	7,48	s		100,2
6				147,7
7				152,5
8	7,36	s		106,6
8a				142,4
4-OCH_3	4,44	s		58,8
6-OCH_3	4,05	s		55,9
7-OCH_3	4,06	s		56

Tableau 6 : Données RMN ^{1}H et RMN ^{13}C du composé A1 (RMN 500 MHz ; $CDCl_3$)

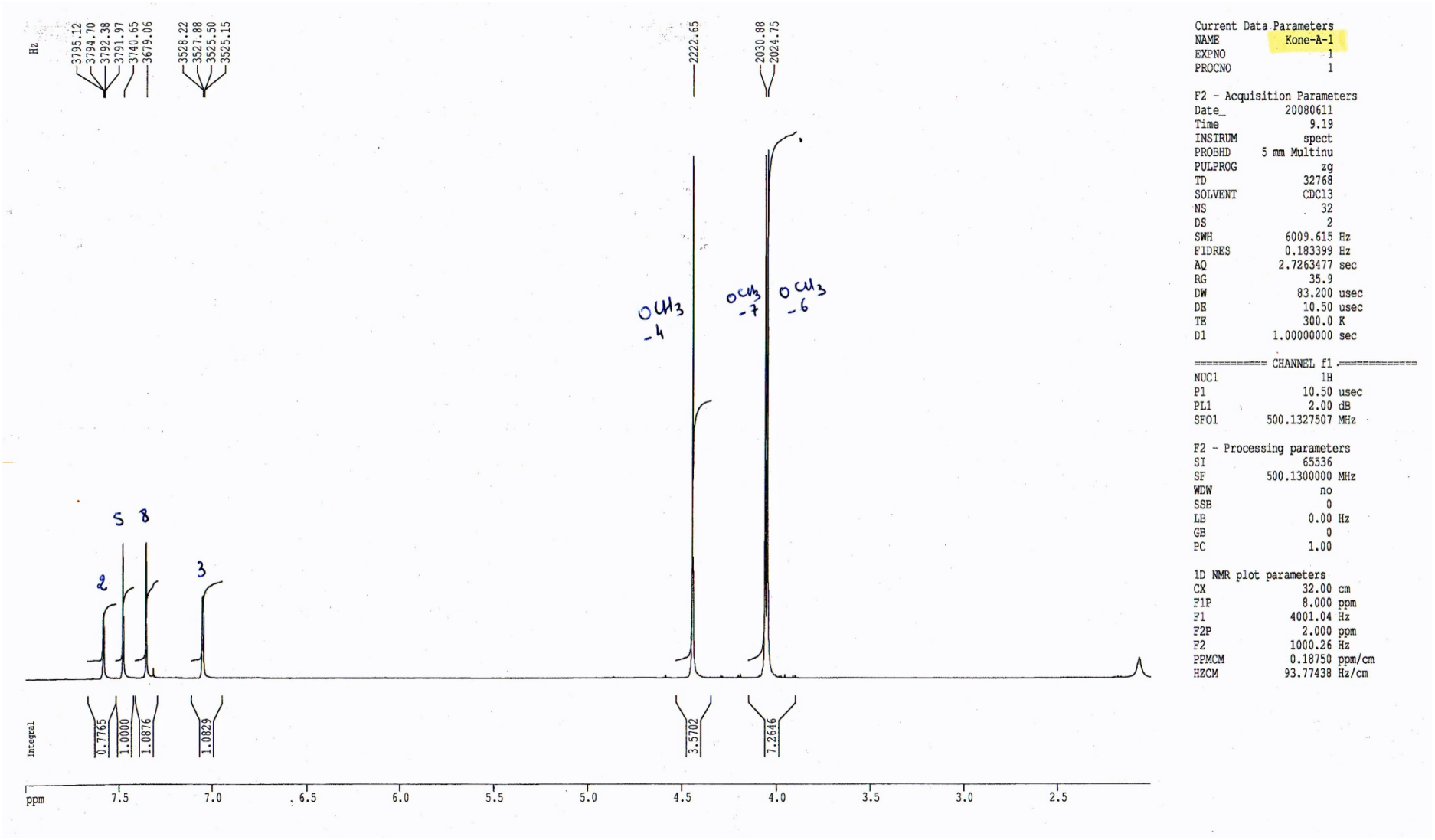


Figure 10 : Spectre RMN ^{1}H du composé A1

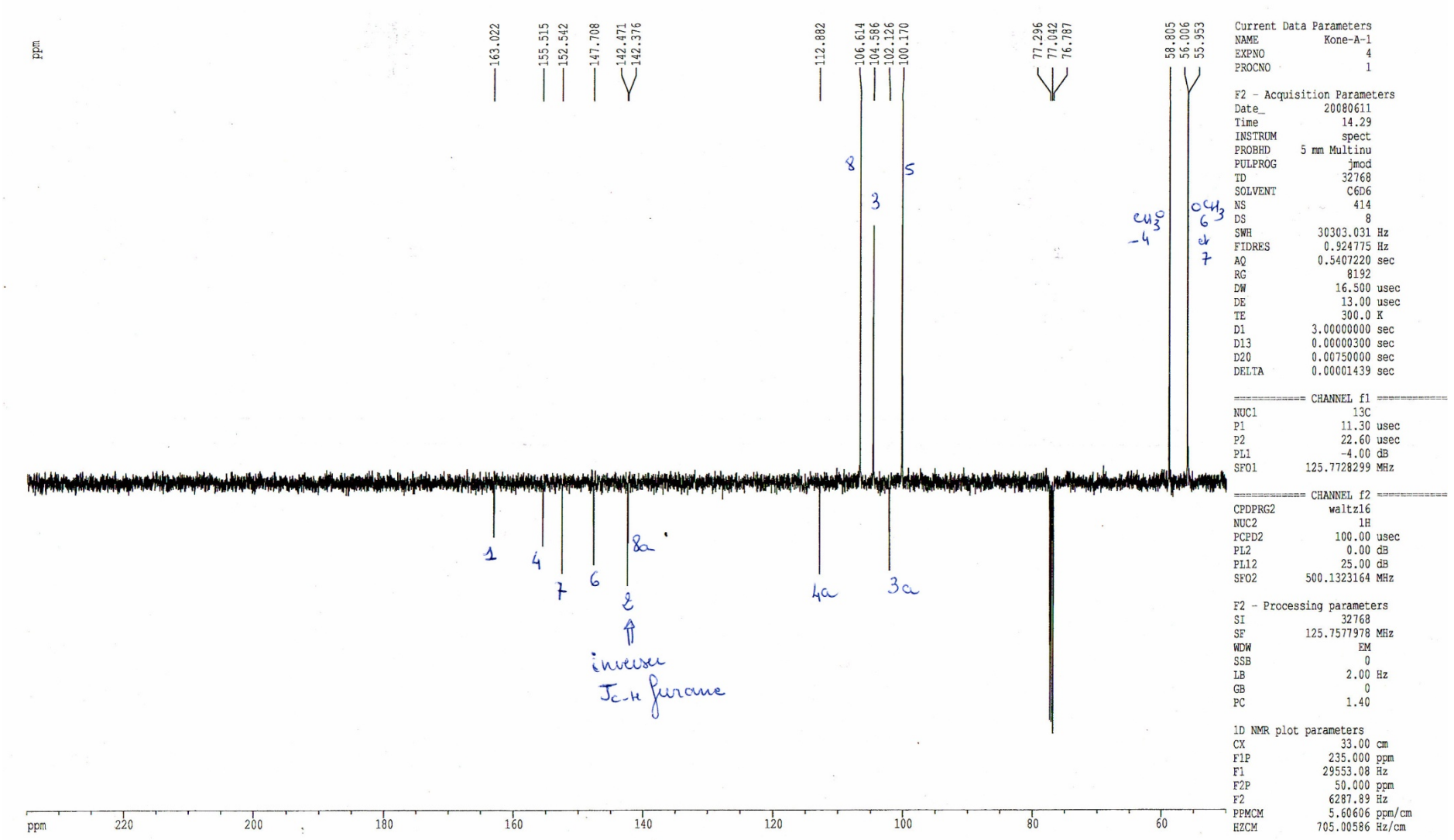


Figure 11 : Spectre RMN ^{13}C du composé A1

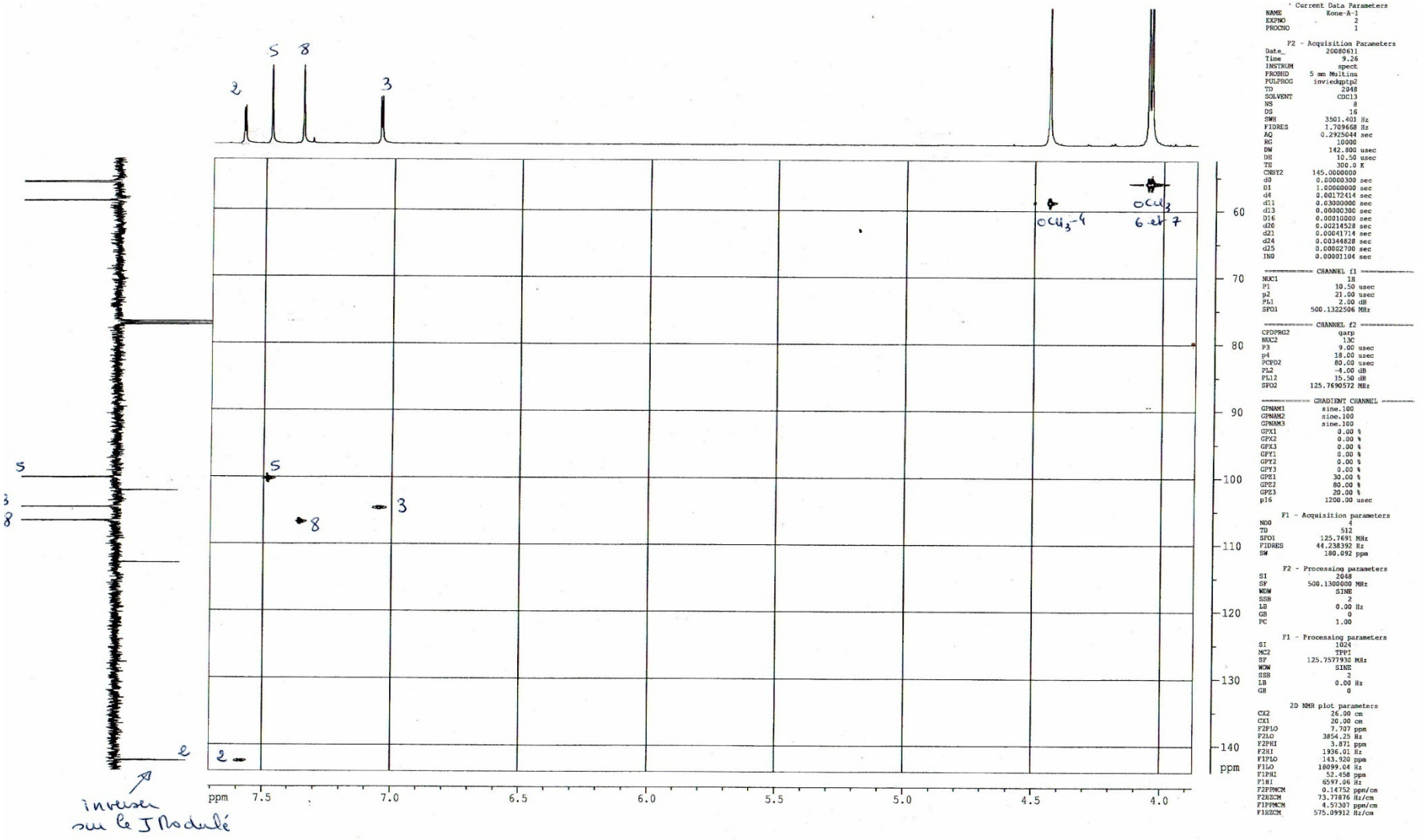
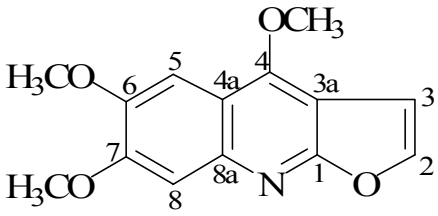


Figure 12 : Spectre HMBC du composé A_1

Le spectre RMN ^{13}C (en J mod.) révèle la présence de 14 pics donc 14 carbones. Ces données associées à celles de la RMN ^{1}H et de la RMN bidimensionnelle HMBC, sont identiques à celles indiquées dans la littérature pour la kokusaginine, un alcaloïde furoquinoléique de formule brute $C_{14}H_{13}NO_4$ isolé de *Teclea ouabanguiensis* par Ayafor et al. (1982) et de *Teclea nobilis* par Al-Rehaily et al. (2003), des plantes de la famille des rutaceae. L'exitence de la kokusaginine dans le *V. heterophylla* a été déjà signalé (www.rsc.org/ej/NP/1997/NP9971400011.pdf - page consultée le 23 Mars à 12H)http://www.google.com/search?hl=en&q=related:www.rsc.org/ej/NP/1997/NP9971400011.pdf



Kokusaginine

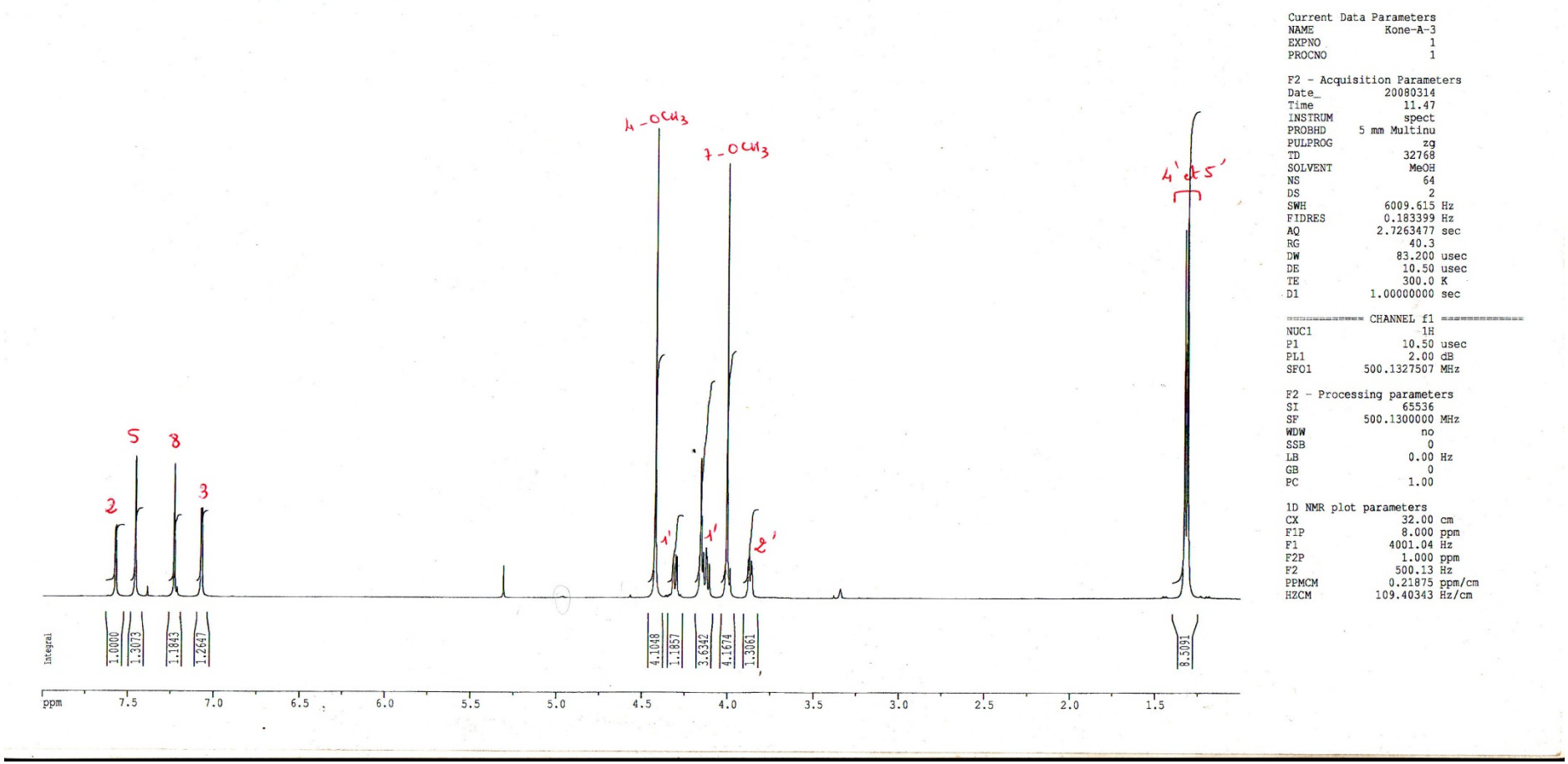
2.3.3 Composé A2

Les déplacements chimiques et les attributions des signaux ainsi que les constantes de couplages sont présentés dans le tableau 7. Le spectre RMN ^{1}H est représenté à la figure 13 et celui du spectre ^{13}C sur la figure 14. L'expérience NOESY est représentée sur la figure 15.

	δ_H (ppm)	Signal (m)	J (Hz)	δ_C (ppm)
1				163
2	7,57	d	2,7	142,2
3	7,07	d	2,7	104,7
3a				102,3
4				156
4a				112,9
5	7,46	s		101,7
6				146,6

7				152,5
8	7,23	s		105,9
8a				142,0
1’	4,31	dd	9,5 ; 2,8	70,5
	4,12	dd	9,4 ; 7,6	
2’	3,87	dd	7,4 ; 2,8	75,3
3’				71,8
4’	1,31	s		25,4
5’	1,32	s		25,5
4-OCH_3	4,44	s		58,8
7-OCH_3	4,05	s		55,9

Tableau 7 : Données RMN ^{1}H et RMN ^{13}C du composé A2 (RMN 500 MHz ; $CDCl_3$ + CD_3OD).




```
Current Data Parameters
NAME                  Kone-A-3
EXPNO                        1
PROCNO                       1

F2 - Acquisition Parameters
Date_                 20080314
Time                     11.47
INSTRUM                  spect
PROBHD       5 mm Multinu
PULPROG                    zg
TD                        32768
SOLVENT                  MeOH
NS                          64
DS                           2
SWH                   6009.615 Hz
FIDRES                0.183399 Hz
AQ                    2.7263477 sec
RG                         40.3
DW                       83.200 usec
DE                       10.50 usec
TE                       300.0 K
D1                    1.00000000 sec

========== CHANNEL f1 ==========
NUC1                         1H
P1                       10.50 usec
PL1                       2.00 dB
SFO1                500.1327507 MHz

F2 - Processing parameters
SI                        65536
SF                  500.1300000 MHz
WDW                         no
SSB                          0
LB                        0.00 Hz
GB                           0
PC                        1.00

1D NMR plot parameters
CX                       32.00 cm
F1P                       8.000 ppm
F1                     4001.04 Hz
F2P                       1.000 ppm
F2                      500.13 Hz
PPMCM                  0.21875 ppm/cm
HZCM                 109.40343 Hz/cm
```

Figure 13 : Spectre RMN ^{1}H du composé A2 ($CDCl_3$ + CD_3OD - 500MHz

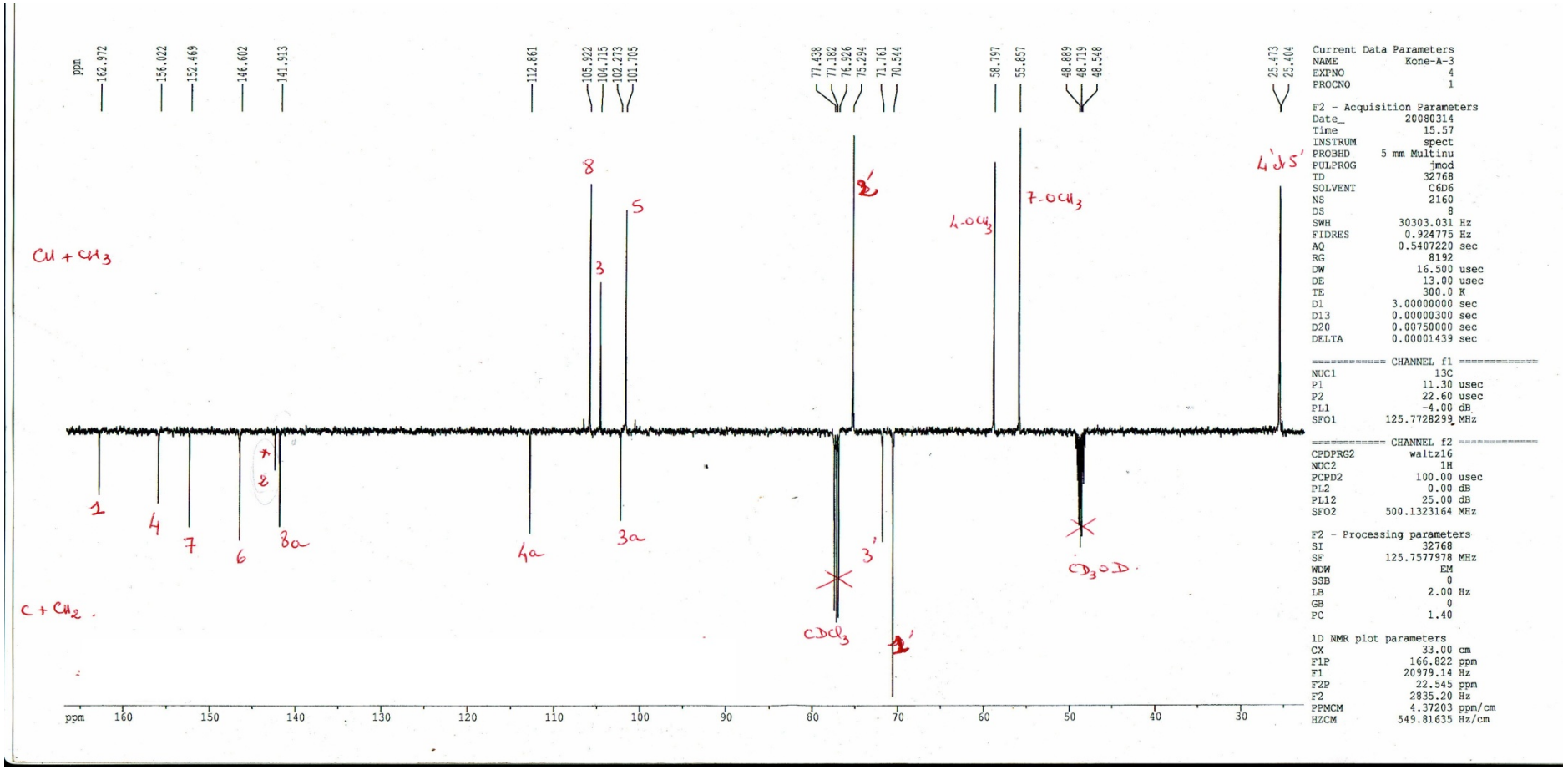


Figure 14 : Spectre RMN ^{13}C du composé A2 ($CDCl_3$ + CD_3OD)

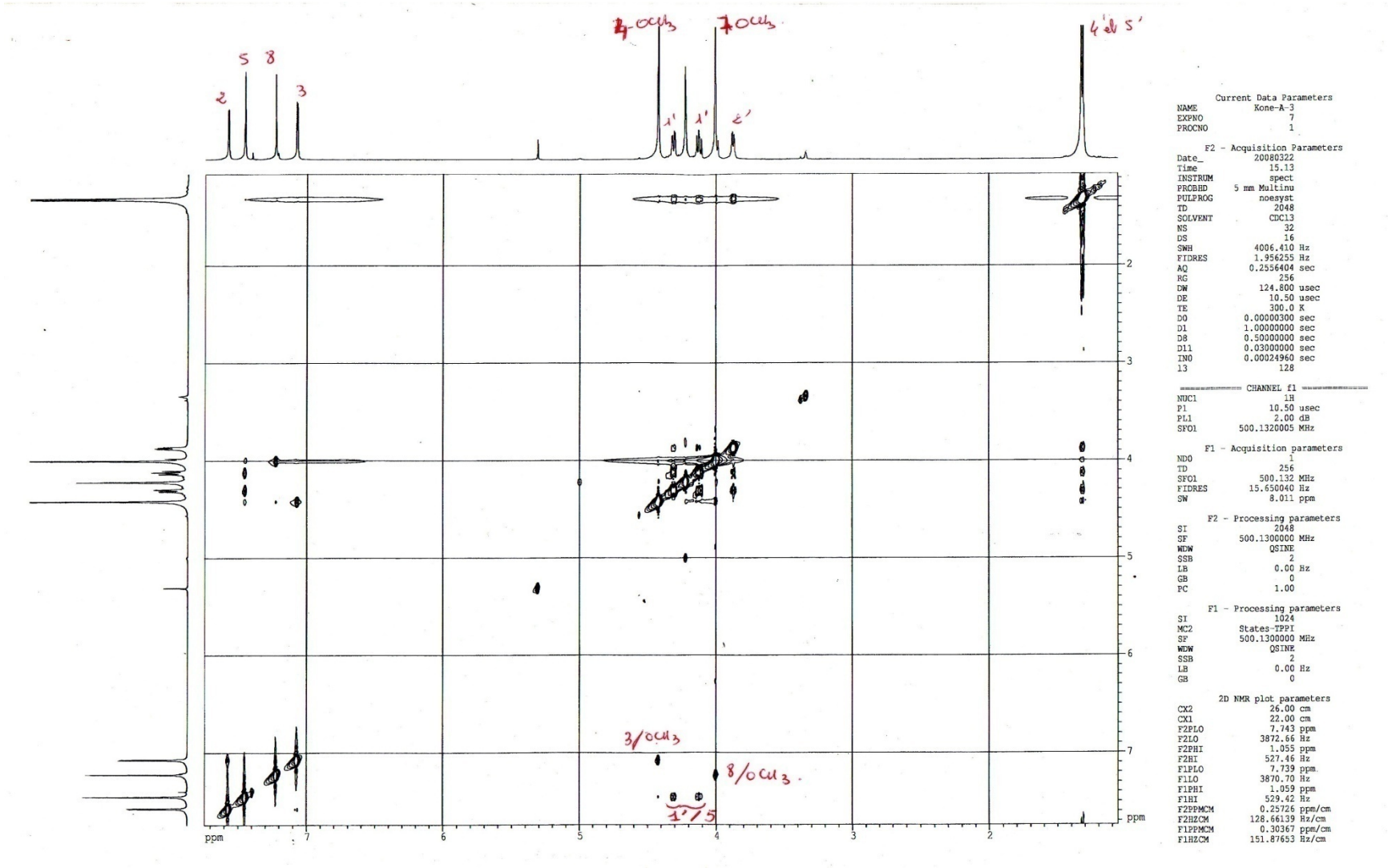
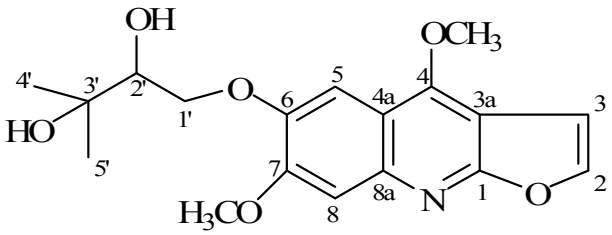


Figure 15 : Spectre NOESY du composé A2

L'analyse du spectre RMN ^{13}C du composé révèle 18 pics donc 18 carbones dont 4 primaires, 1 secondaire, 5 tertiaires et 8 quaternaires ; le carbone secondaire se situant à δ_c = 70,5 ppm Les différentes informations avec les corrélations observées en NOESY sont identiques à celles indiquées dans la littérature pour la montrifoline, un alcaloïde furoquinoléique de formule brute ($C_{18}H_{21}NO_6$) isolé de *Teclea ouabanguiensis* par Ayafor et al. (1982) et de *Monnieria trifolia* par Bhattacharyya et al. (1984), des plantes de la famille des rutaceae.



Montrifoline

Conclusion

Cette étude phytochimique confirme le fait que les alcaloïdes furoquinoléiques sont caractéristiques des rutaceae en particulier du genre *Teclea*. A notre connaissance c'est la première fois que la montrifoline soit isolé de *Vepris héterophylla*.

Chapitre 3 :

Quantification et caractérisation des polyphénols et des flavonoïdes

3.1 Méthodes spectrophotométriques

3.1.1 Matériel végétal

Le matériel végétal a été collecté autour du district de Bamako, à Kolokani et à Siby de septembre à décembre 2005. Il a été botaniquement authentifié par le Département Médecine Traditionnelle (DMT), organe de l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP) de Bamako. Chaque partie de plante a été séchée à l'ombre pendant une à deux semaines puis réduite en poudre. Ces parties de plante ont été choisies essentiellement sur la base de leur fréquence d'emploi obtenue au cours de l'enquête ethnobotanique effectuée par nous même.

3.1.2 Réactifs chimiques

Le chlorure d'aluminium hexahydraté ($AlCl_3$. $6H_2O$), la catéchine et l'acide gallique proviennent d'Across Organics. L'acide ascorbique (vitamine C), le diammonium 2-2'-azino-bis (3ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS), le tampon PBS, 2-2'-Azobis (2-methylpropionamidine) chlorure (AAPH), le réactif de Folin-Ciocalteu, le carbonate Sodium (Na_2CO_3), le nitrite de sodium ($NaNO_2$), les radicaux diphényl picrylhydrazil DPPH proviennent de chez Sigma, société de produits Chimiques. Ces produits étaient de grade d'analyse.

3.1.3 Préparation des extraits

L'extraction des échantillons est assistée d'un bain ultrasonique. La poudre de plante sèche (10g) est extraite avec 100 mL de méthanol - eau (8 : 2) pendant 20 min. Après filtration le résidu est ensuite rincé avec 50 mL de méthanol et extrait de nouveau avec 100

mL de méthanol - eau (8 : 2) dans les mêmes conditions. Après évaporation le résidu est dissous dans 50 mL de méthanol et le volume est ensuite complété à 100 mL avec de l'eau bidistillée. Le mélange obtenu est centrifugé puis complété à 100 mL avec du méthanol à 50 % et est gardé à 0°C avant les analyses (Kim et al., 2002; 2003). Durant tous les travaux d'analyses, ceux sont les mêmes extraits qui ont été utilisés.

3.1.4 Détermination de la teneur en polyphénols totaux

L'extrait de plante (1mL) convenablement dilué ou la solution d'acide gallique (20, 40, 60, 80, 100 mg/L) est introduit dans une fiole jaugée de 25 mL contenant initialement 9 mL d'eau distillée ; ajouter ensuite 1 mL du réactif de Folin et agiter. Après 5 min une solution de Na_2CO_3 à 7 % (10 mL) est ajoutée tout en agitant. La solution est immédiatement diluée et ajustée au trait de jauge avec de l'eau distillée et est mélangée vigoureusement. Après une incubation de 90 min à 23 °C l'absorbance est lue avec un blanc fait à partir d'eau distillée à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 50 Scan UV-Visible. La teneur des composés phénoliques est exprimée en mg d'acide gallique équivalents (GAE) / g de plante sèche. Tous les essais sont reproduits au moins trois fois (Kim et al., 2003).

3.1.5 Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux

La détermination de la teneur en flavonoïdes totaux par la méthode colorimétrique est faite selon la méthode utilisée par Zhishen Mengcheng et Jianming (1999); Kim et al. (2003). L'extrait convenablement dilué (1 mL) ou la solution du composé étalon, catéchine (20, 40, 60, 80, 100 mg /L) est introduit dans une fiole jaugée de 10 mL contenant au préalable 4 mL d'eau distillée. A l'instant t = 0 on y introduit 0,3 mL de $NaNO_2$ à 5 % (P/v). A t = 5 mn on y ajoute 0,3 mL de $AlCl_3$ à 10 % ; 6 mn après, 2 mL de NaOH à 1M. Immédiatement le mélange réactionnel est dilué avec 2,4 mL d'eau bidistillée et est agité vigoureusement. L'absorbance de la solution rose est déterminée à 510 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre Varian Cary 50 Scan UV-Visible. La teneur en flavonoïdes totaux des différentes parties de plante est exprimée en milligramme de catéchine équivalent (mg CE) par gramme de plante sèche. Tous les essais sont reproduits au moins trois fois.

3.1.6 Résultats

En se basant sur les valeurs d'absorbance des diverses solutions d'extrait, ayant réagi avec le réactif de Folin Ciocalteu et comparées à la solution étalon en équivalence d'acide gallique comme décrit ci-dessus, les résultats de l'analyse colorimétrique des composés phénoliques totaux et flavonoïdes totaux sont résumés dans le tableau 9 et sont représentés sur la figure16.

Plantes	Parties utilisées	Teneur en composés phénoliques (mg GAE)	Teneur en flavonoïdes totaux (mg CE)
A. leiocarpus	Feuilles	223,13 ± 0,23A	38,90 ± 1,70B
	E. de tronc	26,53 ± 0,42G	10,30 ± 0,30EF
C. populnea	Peau de racines	76,40 ± 1,13D	27,60 ± 1,20D
	Racines -peau	13,87 ± 0,23G	10,93 ± 0,96EF
M. inermis	Feuilles	99,00 ± 0,20C	46,80 ± 0,31A
	E. de tronc	19,50 ± 0,70G	11,08 ± 1,33EF
T. macroptera	E. de tronc	48,47 ± 1,27F	14,20 ±1,40E
	E. de racines	219,60 ± 0,40B	33,13 ± 1,30C
V. heterophylla	Feuilles	51,47 ± 0,50E	9,27 ± 0,87F
Z. mucronata	Feuilles	52,20 ± 0,53E	14,40 ± 0,80E
	E. de racines	19,27 ± 0,64G	8,60 ± 1,60F

Tableau 8: Résultats de quantification spectrophotométrique

E = écorces ; la teneur en composés phénoliques est exprimée en milligrammes équivalents à l'acide gallique (mg GAE); celle des flavonoïdes totaux en milligrammes équivalent à la catéchine (mg CE). Ces résultats se rapportent à un gramme de matière sèche. Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures ± déviation standard. Les valeurs d'une même colonne affectées de mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $P < 0,05$.

La quantité de composés phénoliques totaux aurait varié considérablement à travers les diverses parties de plante et s'est étendu de 13,87 à 223,13 mg d'acide gallique équivalent / g de matière sèche respectivement dans la chaire de racines de *C. populnea* et dans les écorces de racines de *T. macroptera*.

Selon les valeurs d'absorbance des diverses solutions d'extrait, comparées à la solution étalon en équivalent de catéchine, les résultats de l'analyse colorimétrique en flavonoïdes totaux sont

donnés dans le tableau 6. La quantité de flavonoïdes totaux aurait varié de 8,60 (écorces de racines de *Z. mucronata*) à 46,80 mg de catéchine équivalent / g de matière sèche (feuilles de *M. inermis*). Parmi les feuilles, celles d'*A. leiocarpus* contenaient la teneur en polyphénols totaux la plus élevée ; elle est 4 fois plus grande que celle des feuilles de *V. heterophylla* qui renfermeraient la plus basse teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux. Dans les écorces de tronc, celles de *T. macroptera* renfermeraient à la fois la teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes totaux la plus élevée suivies de celles d'*A. leiocarpus* puis viennent les écorces de tronc de *M. inermis.* Pour ce qui concerne les écorces de racine, la quantité la plus élevée en composés phénoliques et en flavonoïdes totaux ont été trouvés dans celles de *T. macroptera* suivies de celles de *C. populnea*. La plus faible quantité de flavonoïdes a été trouvée dans les écorces racine de *Z. mucronata*. La teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes totaux des écorces de racine *de T. macroptera* était 11 fois et 4-fois plus grande que celle des écorces de racines de *Z. mucronata* respectivement.

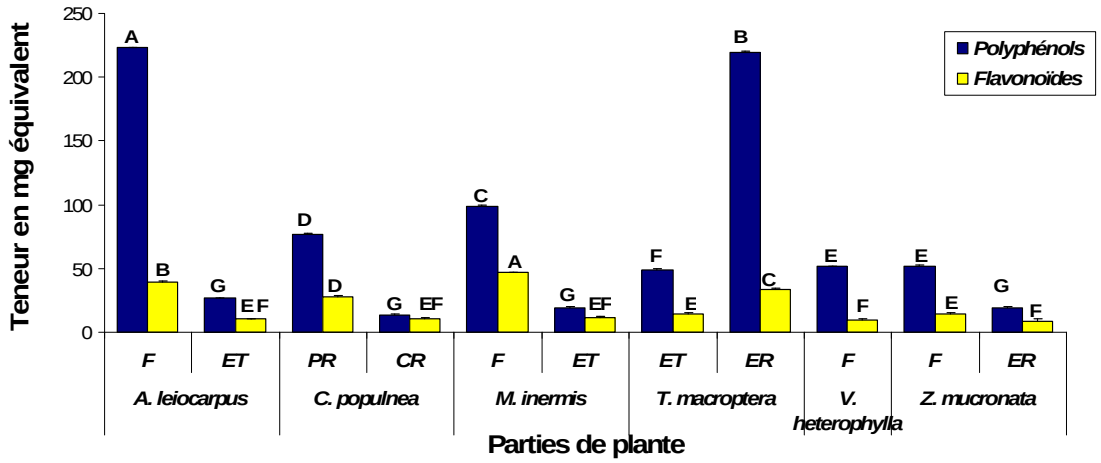


Figure 8 : Teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes

La teneur en composés phénoliques est exprimée en milligrammes acide gallique équivalent (mg GAE) et celle en flavonoïdes en milligrammes catéchine équivalent (mg CE) par gramme de plante sèche. Les valeurs portant les mêmes lettres dans chaque test ne sont pas significativement différentes à $P < 0.05$. F = feuilles, PR = peau de racines, CR = chaire de racine ; ET = écorces de tronc ; ER = écorces de racines.

3.2 Caractérisation et quantification de quelques polyphénols et flavonoïdes par HPLC

3.2.1 Préparation des solutions standard - courbes de régression

Les solutions des acides gallique, protocatéchique, chlorogénique, caféique, paracoumarique, sont préparées en dissolvant 0,5 mg de chaque dans 1mL de mélange méthanol - eau (1:1) ; de même que la solution d'isovitexine et de la quercetine-3-β-D glucose. La solution contenant les acides phénoliques est diluée dans l'ordre de 62,5 – 500 mg / L et a été injectée à cinq différentes concentrations en raison de trois injections par concentration. Les droites d'étalonnage sont obtenues en traçant la courbe traduisant la variation des différentes concentrations en fonction des aires de pics correspondantes. Les composes phénoliques et les flavonoïdes ont été identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux des standards et l'estimation quantitative des acides phénoliques a été faite en utilisant les courbes de régression. Quant à l'estimation des deux flavonoïdes, elle a été faite en considérant les moyennes des aires de pic car leur quantité ne nous permettait pas d'établir les droites de régression.

3.2.2 Appareil et conditions d'analyse des polyphénols

L'appareil utilisé est un water 600 Pump équipé d'une boucle d'injection de 20 µL. Les analyses ont été réalisées sur une colonne Alltech Intertsil ODS-5 ; 4,6 mm, la taille des particules est de 5 µm. Le détecteur est un Waters 486 Tunable.

Les mesures ont été réalisées à la longueur d'onde 280 nm. Les éluants ont été dégazés ; les extraits et les standards ont été filtrés sur membrane millipore (0,45 µm) pour éviter d'endommager la colonne et limiter les interférences dues aux impuretés.

Le système d'éluant est celui utilisé par Nakatani et al (2000) et se compose de :

A : 50 mM NaH_2PO_4 à pH 2,6

B : 80 % acétonitrile, 20 % A

C : 200 mM H_3PO_4 (acide phosphorique) à pH 1,5

Les injections, de volume 25 µL sont faites dans la table ci-dessous avec un débit de 1mL / min.

gradient	Instants (min)	%A	%B	%C
	0- 4	100	0	0
	4 -10	92	8	0
	10 – 22,5	0	14	86
	22,5 – 27,5	0	16,5	83,5
	27,5 – 50 min	0	25	75
	50 – 55 min	0	80	20
	55 – 60 min	100	0	0

Tableau 9: table d'injection des extraits en HPLC

3.2.3 Résultats

Les temps de rétention ainsi que les équations des courbes de régression des standards sont résumés dans le tableau 10. Les composés contenus dans les diverses parties de plantes sont identifiés par comparaison des temps de retentions des standards avec les composés des différents chromatogrammes. L'ensemble des résultats sont représentés dans le tableau 11 et sur la figure 18.

Standards	Temps de rétention (min)	Equation de droite d'étalonnage	R^2
Acide gallique	10,82	y = 1E-08x - 0,0221	0,9973
Acide protocatéchique	14,84	y = 2E-08x - 0,012	0,9965
Acide chlorogénique	22,13	y = 2E-08x - 0,0012	0,9975
Acide caféique	24,96	y = 1E-08x - 0,0811	0,9916
Acide paracoumarique	33,88	y = 6E-09x - 0,0065	0,9949
Isovitexine	41,05	---	---
Quercétine-3-β-D-glucose	42,65	---	---

Tableau 10 : Temps de rétention des polyphénols standards et les équations des courbes de régression

Les composés les plus rencontrés sont identifiés en comparant leur temps de rétention à celui des standards et leurs quantités respectives dans 100g de matière sèche étaient l'acide protocatéchique (792,00 - 7,93 mg), l'acide paracoumarique (1833,56 - 4,2 mg), l'acide gallique (69,00 - 5,14 mg) et l'acide chlorogénique (2286,08 - 62,09 mg). L'acide caféique (149,86 -43,46 mg / 100g de matière sèche), l'isovitexine (182,22 – 31, 46 mg / 100g et la quercetine-3-β-D-glucose (83,53 - 70,89 mg / 100g) étaient les moins détectés dans ces extraits. Les écorces de tronc et de racines de *T. macroptera* et les feuilles de *V. heterophylla* renferment le plus grand nombre des standards ; aucun n'a été trouvé dans les écorces de racines de *Z mucronata.* L'ensemble de ces résultats est récapitulé dans le tableau 11. Le chromatogramme des standards des feuilles d'*A. leiocarpus* et des écorces de racines de *Z. mucronata* sont représentés sur la figure 17.

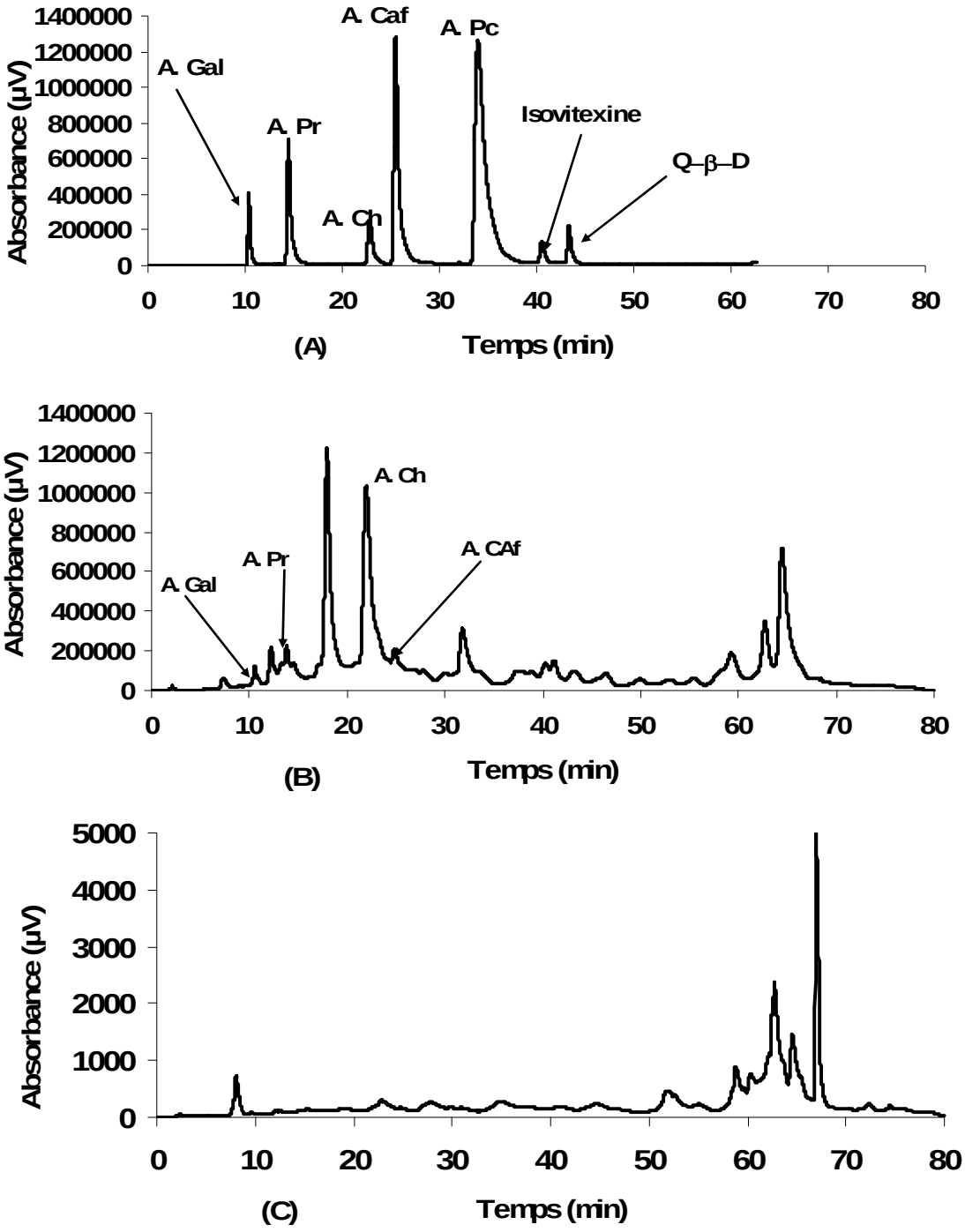


Figure 9 : Chromatogrammes (A) = des standards ; (B) = des feuilles d'*A. leiocarpus* ; (C) = des écorces de racines de *Z. mucronata.*

Gal = Acide gallique ; A. Pr = Acide protocatéchique ; A. Ch = acide chlorogénique ; A. Caf = acide caféique ; A. Pc = acide paracoumarique ; Q-β-D = Quercétine-3-β-D-glucose.

Nom de Plante	parties de Plantes	A. G	A. Pr	A. Ch	A. Pc	A. Caf	Isovitexine	Quercetine-3 -ß-D- glucose
A. leiocarpus	Feuilles	49.06 ±3.50	67.63±0.318	2286.08±80.58	nd	30,13±2,50	nd	nd
	E. Tronc	5,14±0,21D	35,55±0,25D	nd	221,40± 2B	nd	nd	nd
	E. racines	trace	26,03±1,23E	62,09±0,46C	4,2±0,2C	nd	nd	70,89±0,49B
C. populnea	Racines- E	nd	8,41± 0,18F	nd	1,76±0,01C	nd	nd	83,53±0,54A
M. inermis	F	trace	33,56 ±2,00	468,22± 16,91	nd	62,49 ±1,25	nd	nd
	E. Tronc	5,91±0,16D	53,24±1,19C	nd	7,53±0,59C	nd	nd	nd
T. macroptera	E.Tronc	16.39±2.19C	7.93 ±1.34 F	67.14 ± 2.01	59.37±2.20	nd	182.22± 42	nd
	E. Racines	69,00±1,42A	792±7,16A	113,40±1,41C	1833,56±4,58A	149,86±2,62	nd	nd
V. heterophylla	Feuilles	5,75±0,34D	11,03±0,09F	78,92±1,71C	218,87±3,15B	nd	31,46±1,08	nd
Z. mucronata	Feuilles	nd	53,03±0,40C	683,17±20,70B	nd	43,46±1,36	nd	nd
	E. racines	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Tableau 11: résultats de l'analyse chromatographique (HPLC)

A.G = acide gallique; A. pr = acide protocatéchique; A. Ch = acide chlorogénique; A. Pc. = acide paracoumarique; A. Caf. = acide caféique; nd = non détecté ; E = écorces. Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures ± déviation standard et sont exprimées en mg / 100 g de matière sèche. Les valeurs d'une même colonne affectées de

mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à P <0,05.

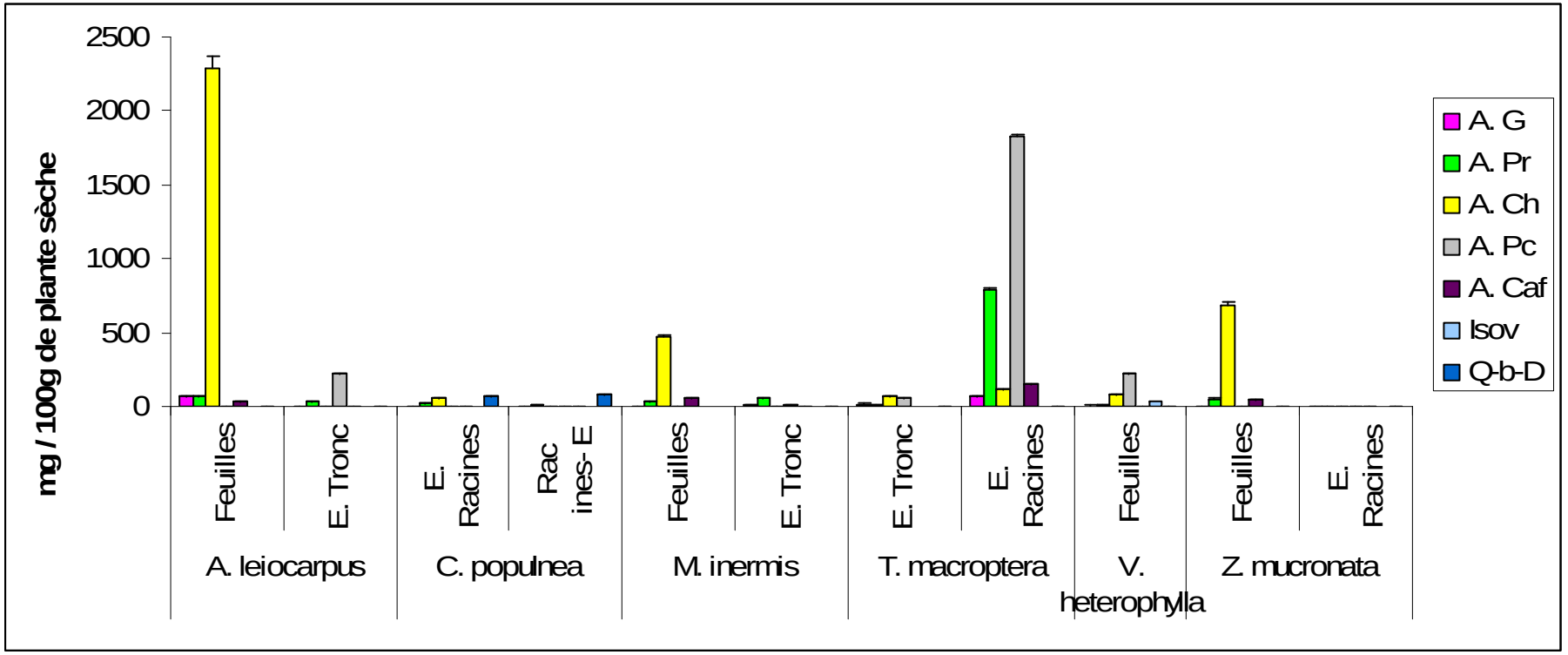


Figure 10 : Représentation graphique des résultats de HPLC

3.2.3 Analyse statistique

Les données sont représentées par leur moyenne ± ESM. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Statview 4.5. L'analyse paramétrique a été réalisée par le test ANOVA (analyse de variances) suivi du test PLSD de Fisher lorsque le nombre de groupes comparés est supérieur à deux. Le test de Student a été utilisé pour comparer deux groupes non appariés.

3.3 Interprétation et discussion

L'analyse colorimétrique a révélé une forte teneur en composés phénoliques dans les diverses parties des plantes soumises à l'étude en particulier dans les combretaceae (*T. macroptera* et *A. leiocarpus*). Ceci serait en accord avec les différents travaux d'isolement de plusieurs composés phénoliques dans ces deux plantes (Silva et al., 2000 ; Conrad et al., 2001 ; Chaabi et al., 2008). Les résultats de l'analyse HPLC confirment ceux de l'analyse colorimétrique à travers l'identification de quelques composés phénoliques excepté le cas des écorces de racines de *Z. mucronata* où aucun des standards n'a été détecté. Nos résultats ont aussi montré que les acides protocatéchique, p-coumarique, gallique et chlorogénique étaient les plus rencontrés dans les diverses parties de nos plantes ; ceci serait en accord avec les résultats de Stalikas (2007). L'acide cafféique n'apparaît en quantité significative que dans le *Terminalia macroptera* (écorces de racines), dans le *Z. mucronata* (feuilles), dans les feuilles de *M. inermis* et dans les feuilles d'*A. leiocarpus*. Par contre l'acide chlorogénique serait contenu dans tous nos extraits de plantes.

Les investigations phytochimiques menées sur les différentes parties de *T macroptera* auraient conduit à la caractérisation de plusieurs *C* - et *O* - flavones glucosidiques, de la quercétine, des acides chlorogénique et gallique, (Silva et al, 2000; Conrad et al, 2001). La présence des acides 3, 4-dihydroxybenzoique (acide protocatechique), acide p-coumarique, acide gallique dans *T. catappa* (Chyau et al., 2006) dans *A. leiocarpus* (Chaabi et al., 2008), d'*A. latifolia.* (Govindarajan et al, 2004) a été détectée. Ceci pourrait ainsi expliquer la présence de ces composés dans les différentes parties *de T. macroptera* et d'*A. leiocarpus* de la famille des combretaceae. L'acide protocatéchique détecté de *M. inermis* a été trouvé dans *Mitragyna rotundifolia* (Kang et al, 2006). La présence des flavonoïdes dans *C. populnea* et de l'isovitexine des feuilles de *V. heterophylla* a été rapportée (Gomes et al, 1983 ; Ojekale et al., 2006).

Conclusion

Nous avons réalisé une quantification des polyphenols totaux et des flavonoïdes totaux à travers une méthode colorimétrique et une analyse HPLC. Ces techniques ont montré que les six plantes médicinales maliennes renfermeraient une forte teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux ; elles affichent donc la forte présomption que ces plantes peuvent servir de sources d'antioxydants naturels. La caractérisation par HPLC tout en confirmant les résultats de la colorimétrie nous aurait permis de détecter la présence de quelques acides phénoliques et de deux flavonoïdes et de les quantifier. Les pics ainsi détectés au cours de cette analyse, menée sans être associée à une technique spectrale pourraient correspondre réellement aux standards utilisés d'autant plus que bon nombre de ces composés ont été isolés de ces plantes ou d'autres plantes de la même famille.

Chapitre 4

Détermination de l'activité antioxydante des plantes

A travers notre étude bibliographique, il apparaît clairement qu'une seule méthode ne suffit pas ni pour caractériser les propensions antioxydantes *in vitro* et *in vivo*, ni ne peut donner une prévision complète de l'efficacité antioxydante. L'utilisation de plus d'une méthode est donc nécessaire et nous avons choisi le test d'ABTS et du DPPH pour leur facilité de mise en œuvre pour évaluer l'activité antioxydante de nos extraits de plante ; ceci nous permettra de mieux généraliser les résultats.

4.1 Test d'ABTS

Les radicaux d'ABTS sont produits selon la méthode de Kim et al. (2003). L'initiateur de radicaux, AAPH (1mM) est mélangé avec 2,5 mM d'ABTS dans un tampon phosphate salin PBS (100 mM de phosphate de potassium pH 7,4 contenant 150mM Na Cl).

L'extrait de plante (20 µL) est ajouté à 980 µL de la solution radicalaire d'ABTS. Le mélange est incubé à 37 °C dans un bain marie à l'abri de la lumière pendant 10 mn. Un contrôle constitué de 20 µL de 50% MeOH et de 980 µL de la solution d'ABTS est lu avec chaque série d'extrait à 734 nm. La capacité antioxydante totale des extraits de plante ainsi déterminée est exprimée en mg de vitamine C équivalent (mg VCE) par g de matière sèche. La solution radicalaire d'ABTS est préparée fraîchement. Tous les tests sont reproduits au moins trois fois (Kim et al., 2002 ; 2003).

4.2 Test du DPPH

La capacité antioxydante des extraits de plante est déterminée selon la méthode de Kim et al. (2002). L'extrait de plante (0,1 mL) est ajouté à 2,9 mL de DPPH à 0,004% (P/V) dans du méthanol- eau (8 : 2). La lecture de l'absorbance est faite à 517 nm après 30 mn d'incubation dans l'obscurité. Un blanc constitué de 50 % de méthanol et la solution de DPPH

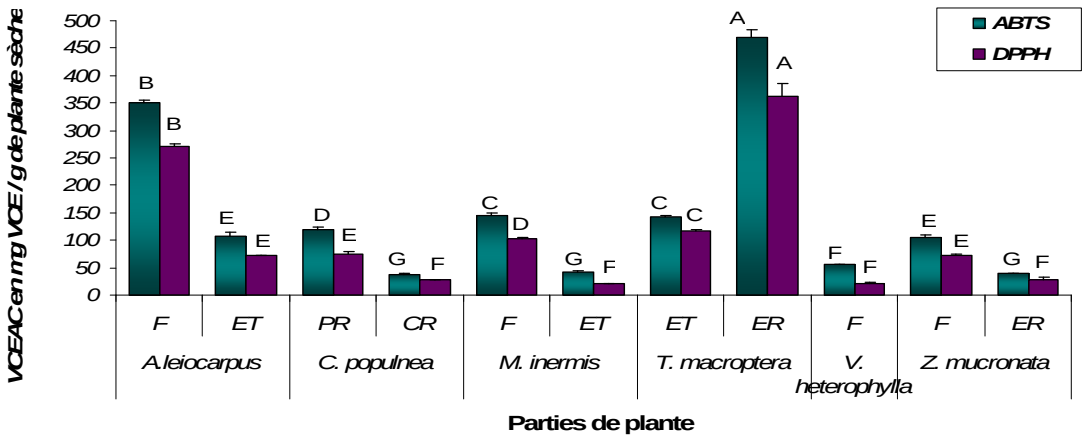
accompagne la lecture de chaque série. La vitamine C (acide ascorbique) est utilisée comme composé étalon et le résultat est exprimé en mg de vitamine C équivalent (mg VCE) par g de matière sèche. La solution radicalaire de DPPH est préparée fraîchement et les essais sont repris au moins trois fois (Kim et al., 2002).

4.3 Résultats

Les résultats de l'activité antioxydante déterminée à l'aide des tests d'ABTS et de DPPH sont résumés dans le tableau 12 et sur la figure19.

Plantes	Parties utilisées	Test d'ABTS	Test de DPPH
A. leiocarpus	feuilles	350,53 ± 5,03B	271,87 ± 3,33B
	E. de tronc	108,00 ± 5,66E	71,40 ± 2,11E
C. populnea	Peau de racines	119,80 ± 4,61D	74,67 ± 3,72E
	Racine - peau	36,67 ±1,89G	27,87± 0,83F
M. inermis	Feuilles	145,4 ± 3,31C	102,27 ± 2,14D
	E. de tronc	42,53 ± 2,37G	20,93 ± 1,03F
T. macroptera	E. de tronc	141,60 ± 2,43C	116,4 ± 2,43C
	E. de racines	468,80 ± 15,24A	361,60 ± 23,77A
V. heterophylla	Feuilles	55,20 ± 1,91F	21,93 ± 1,50F
Z. mucronata	Feuilles	106,13 ± 2,8E	71,80 ± 3,67E
	E. de racines	38,93 ± 1,63G	28,80 ± 3,33F

Tableau 12 : Résultats de l'activité antioxydante des extraits de plante



PR = peau de racines, CR = chaire de racine ; ET = écorces de tronc ; ER = écorces de racines. E = écorces, F = feuilles. Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures ± déviation standard. Les activités antioxydantes portant les mêmes lettres dans chaque test ne sont pas significativement différentes à $P < 0,05$.

Figure 11 : Capacité antioxydante exprimée en vitamine C (mg VCE / g de matière sèche) selon les tests d'ABTS et de DPPH

Les écorces de racine de *T. macroptera* exhibent la plus grande valeur d'activité antioxydante dans les deux tests ; la chaire de racines de *C. populnea* affiche la plus faible valeur dans le test d'ABTS tandis que les écorces de tronc de *M. inermis* renferment la plus faible valeur dans le test du DPPH.

La classification des différentes parties de plante selon leur activité antioxydante et d'après le test de l'ABTS par ordre décroissant est la suivante : *T. macroptera* écorces de racines > *A. leiocarpus* feuilles > *M. inermis* feuilles >*T. macroptera* écorces de tronc > *C. populnea* peau de racines > *A. leiocarpus* écorces de tronc > *Z. mucronata* feuilles > *V. heterophylla* feuilles > *M. inermis* écorces de tronc > *Z. mucronata* écorces de racines > *C. populnea* chaire de racines.

D'après le test de DPPH, cet ordre est énoncé comme suit : *T. macroptera* écorces de racines > *A. leiocarpus* feuilles >*T. macroptera* écorces de tronc >*M. inermis* feuilles > *C. populnea* peau de racines > *Z. mucronata* feuilles ≈ *A. leiocarpus* écorces de tronc > *Z. mucronata* écorces de racines ≈ *C. populnea* racines - peau > *V. heterophylla* feuilles >*M. inermis* écorces de tronc. L'ordre de succession des parties de plante selon leur activité antioxydante demeure à peu près le même.

L'écorce de racine de *T. macroptera* affiche la plus grande activité antioxydante ; ceci semble être en accord avec les résultats de l'analyse colorimétrique et de l'analyse HPLC.

Cette dernière aurait révélé que la partie de plante renfermerait le plus grand nombre de composés (5) correspondants à nos standards et à des concentrations élevées. Le punicalagine et l'acide ellagique ont été isolés par Silva et al., (2000) et son activité antioxydante a été démontrée par Kulkarni et al. (2004), Srivastava et al. (2006). Leur présence éventuelle et celle des autres tanins hydrolisables dans l'extrait pourrait participer à rehausser la valeur de son activité antioxydante. Quant aux feuilles d'*A. leiocarpus*, elle renfermeraient une forte teneur de polyphénols totaux et l'analyse HPLC aurait montré qu'elles contiendraient trois acides phénoliques parmi lesquels l'acide chlorogénique aurait une teneur 2286, 08 mg / 100 g de matière sèche. L'activité antioxydante de ses écorces de tronc vaut 0,40 mmol VCE / g de matière sèche avec le test du DPPH. Govindarajan et collaborateurs (2004) auraient trouvé que la capacité antioxydante de l'écorce de tronc de l'*Anogeissus latifolia* est de 149 nmol VCE / g ; l'acide gallique (0,95 %) serait responsable de l'activité observée.

Les feuilles de *Vepris heterophylla* affichent une activité antioxydante relativement faible malgré la présence de quelques polyphénols évoquée par Gomes et al. (1983). Ces composés ne sont peut être pas extraits ou se trouveraient en faible quantité comme l'atteste l'analyse HPLC.

On observe une sous estimation de la capacité antioxydante par le test du DPPH. Ce fait, observé par Arnao (2000) et par Kim et al. (2002) s'expliquerait par les interférences qui se produiraient à 417 nm et par la non solubilité du DPPH en milieu aqueux. Malgré ces difficultés liées à l'usage du DDPH, il continue toujours à être utilisé. Cependant une bonne corrélation est établie entre les deux tests $R^2 = 0,99$ (figure 20) tandis que Delgado-Andrade et al. (2005) auraient trouvé une corrélation de coefficient $R^2 = 0.97$ entre les deux tests. Cette corrélation voudrait dire que ces tests sont distincts ; chacun évaluant l'activité antioxydante de sa manière.

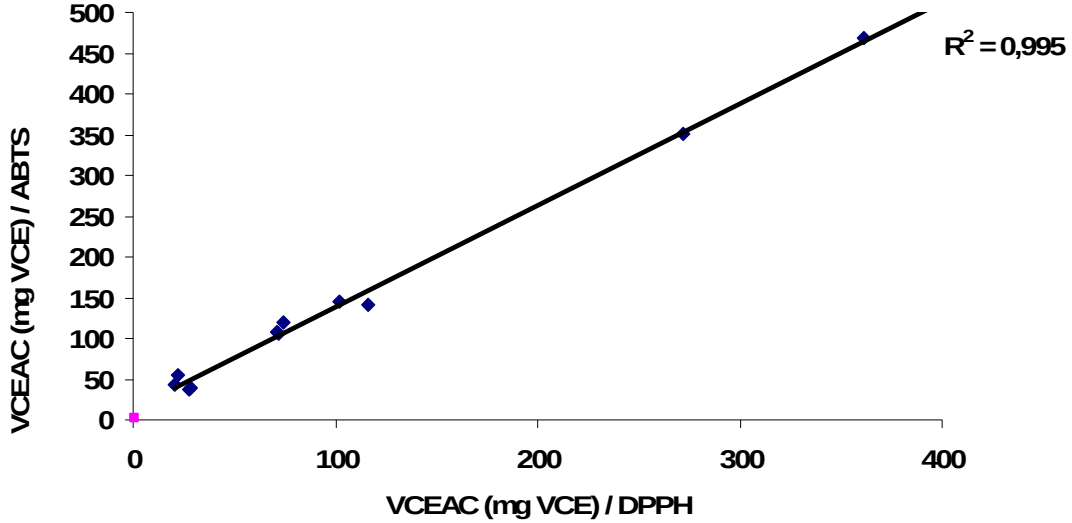


Figure 12: Corrélation linéaire entre ABTS et DPPH.

L'existence d'une bonne corrélation linéaire ($R^2_{/ABTS}$ = 0,91; $R^2_{/DPPH}$ = 0,89) entre la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante de nos différents extraits suggererait que pour chacune de ces plantes, les composés phénoliques ayant des activités analgésiques, anti-inflammatoire, anticancérigène, antithrombique, et anti-atherogenique selon Gómez-Caravaca et al., (2006) seraient responsables de l'activité antioxydante. L'activité antioxydante proviendrait principalement des polyphénols. Une corrélation linéaire entre polyphénols totaux et activité antioxydante montre que l'essentiel de cette activité est due majoritairement à la présence des polyphénols et non à celle des flavonoïdes (Gheldof & Engeseth, 2002; Holasova et al., 2002 ; Kumaran et Karunakaran, 2005).

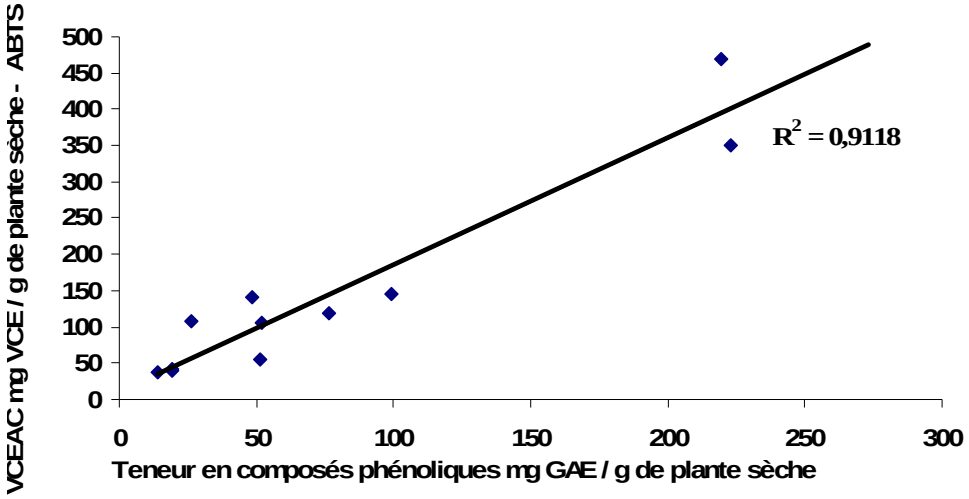


Fig.21.a

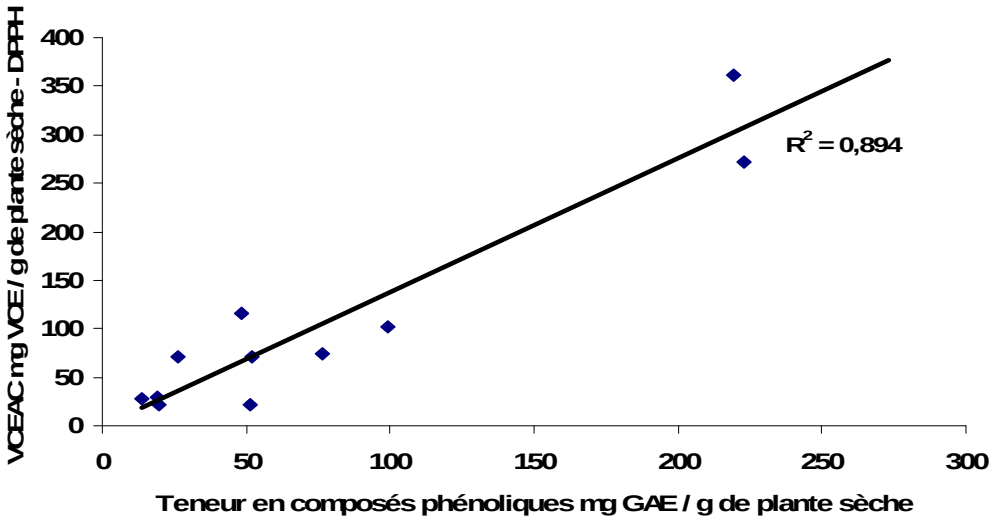


Fig. 21.b.

Figure 13 : Corrélation linéaire entre composés phénoliques et activité antioxydante, (a) avec le test d'ABTS ; (b) avec le test de DPPH.

Conclusion

Cette étude montrerait le potentiel scavenger de radicaux libres des six plantes médicinales traditionnelles maliennes et pourraient être considérées comme des sources d'antioxydants naturels. L'activité antioxydante observée qui serait due à leur teneur en polyphénols totaux déterminée par colorimétrie et par l'analyse par HPLC qui n'est qu'une partie de la colorimetrie (puisque tous les pics n'ont pas été identifiés) pourraient expliquer l'usage

traditionnel de ces plantes dans le traitement des affections liées à l'activité antioxydante en particulier l'usage de *C. populnea* dans le traitement œdémateux.

Conclusion et perspectives

Le présent travail avait pour but l'identification des usages traditionnels de six plantes médicinales maliennes, l'isolement des alcaloïdes d'une d'entre elles, la détermination de leur teneur en polyphénols totaux ainsi que leur activité antioxydante correspondante. Ainsi ce travail comprenait :

- une enquête ethnobotanique sur l'usage médicinal des différentes plantes ;
- l'extraction et l'isolement d'alcaloïdes de *Vepris heterophylla ;*

- la quantification et caractérisation des polyphénols ;
- la détermination de l'activité antioxydante des diverses parties des six plantes étudiées.

L'enquête ethnobotanique, réalisée dans la région de koulikoro précisement à Siby et à Kolokani, deux milieux respectivement malinké et bambara à l'aide d'un questionnaire aurait révélé que quatre des six plantes seraient selon les traditherapeutes antipaludiques et deux (*C. populnea et Z. mucronata*) seraient utilisées dans le traitement des affections inflammatoires et douloureuses. Au cours de cette investigation, il est apparu que les parties aériennes des plantes à usages antipaludiques seraient les plus utilisées tandis que les racines des deux autres seraient les plus utilisées ; en la matière on en déduit que ces deux plantes sont menacées de disparition. Les modes de préparation les plus utilisées sont la décoction, la macération.

L'extraction et l'isolement des alcaloïdes n'ont concerné que *V. heerophylla* et ont abouti à l'élucidation structurale de deux alcaloïdes furoquinoléiques (kokusaginine, montrifoline) par comparaison de leurs données spectrales par rapport à celles indiquées dans la littérature. Les alcaloïdes furoquinoléiques sont caractéristiques des rutaceae mais à notre connaissance, ce fut la première fois que la présence de la montrifoline soit signalée dans le *V. heterophylla*.

La quantification des polyphénols totaux a été réalisée par la méthode colorimétrique en utilisant le réactif de Folin – Ciocalteu ; cette analyse a montré que les extraits hydrométhanoliques issus des différentes parties de plante sont riches en polyphénols totaux en particulier les deux combretaceae. La quantification des flavonoïdes est faite en utilisant le trichlorure d'aluminium ; elle a aussi affiché une grande teneur en flavonoïdes totaux mais cependant, on a noté l'absence d'une bonne corrélation entre polyphénols totaux et flavonoïdes totaux. La caractérisation par HPLC a permis l'identification de quelques acides phénoliques et de deux flavonoïdes ainsi que leur quantification ; ces résultats sont en accord avec ceux de l'analyse colorimétrique. Ces deux analyses ont indiqué que les plantes médicinales pourraient servir de sources d'antioxydants naturels.

L'activité antioxydante des différentes parties de plante a été déterminée par les tests d'ABTS et de DPPH ; les deux ayant confirmé leur pouvoir scavenger de radicaux libres. Une bonne corrélation a été établie entre activité antioxydante et teneur en polyphénols totaux prouvant que l'activité observée est due aux polyphénols totaux mais une telle corrélation n'a pas été établie entre activité antioxydante et teneur en flavonoïdes totaux. Ces plantes maliennes pourraient être considérées donc comme des sources d'antioxydants naturels pour des fins médicinales en particulier le traitement des affections liées à la péroxydations des membranes lipidiques, de l'ADN.

En perspectives nous envisageons de :

- tester l'activité antihypertensive, antipyrétique des alcaloïdes isolés de *V. héterophylla* et l'activité antipaludique de la montrifoline ; ces activités biologiques répondent aux usages majeurs de la plante selon les résultats de l'enquête ethnobtanique ;
- isoler en particulier les polyphénols et les métabolites secondaires en général et les tester contre les utilisations traditionnelles majeures des plantes dont ces molécules seraient issues. Notons que nous avons déjà isolé des écorces de racines de *Z. mucronata* l'acide bétulinique (spectres non montrés).

Le présent travail n'est que le commencement d'une longue investigation ; l'étude des plantes médicinales au Mali, en l'occurrence les plantes étudiées ici devant se poursuivre pour identifier et caractériser de nouveaux médicaments traditionnels améliorés.

Références bibliographiques

— Aharoni, A., Jongsma, M.A. and Bouwmeester, H. J., **2005**. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. Trends in Plant Science **Vol.10** No.12, December

— Ajibesin, K.K., Ekpo, B.A., Bala, D. N., Essien, E. E., Adesanya, S. A., (**2008).** Ethnobotanical survey of Akwa Ibom State of Nigeria. Journal of Ethnopharmacology **115**, 387–408

— Al-Rehaily, A. J., Ahmad, M.S., Muhammad,I., Al-Thukair, A.A., Perzanowski, H. P. **(2003)**. Furoquinoline alkaloids from Teclea nobilis Phytochemistry **64**, 1405–1411

— Anthony, J.P., Fyfe, L. and Smith, H., (**2005)**. Plant active components - a resource for antiparasitic agents? TRENDS in Parasitology **Vol. 21,** No.10 October

— Arbonnier, M., 2002. Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. 2 ème Edits CIRAD – UICN 574 P.

— Arnao, M.B., **(2000).** Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. Trends in Food Science & Technology **11**, 419 – 421.

— Atawodi, S.E., Ameh, D.A., Ibrahim, S., Andrew, J.N., Nzelibe, H.C., Onyike, E.O., Anigo, K.M., Abu, E.A., James, D.B., Njoku, G.C., Sallau, A.B., **(2002)**. Indigenous knowledge system for treatment of Trypanosomiasis in Kaduna state of Nigeria. Journal of Ethnopharmacology **79**, 279 – 282.

— Auvin, C., Lezenven, F., Blond A., Augeven-Bour, I., Pousset, J.L., Bodo,B., Camara, J., **(1996)**. Mucronine J, a 14 membered cyclopepetide alkaloid from *Zizyphus mucronata.* J. Nat.Prod. **59**, 676-678.

— Ayafor, J.F., Sondengam, B.L., Bilon, A.N., Tsamo, E., Kimbu, S.F., and Okogun, J.I., **(1982)** Furoquinoline alkaloids of teclea Ouabanguiensis. Journal of Natural Products, Nov-Dec **Vol. 45**, No. 6

— Bachmann, B.O., (2007). Foundations for directed alkaloid biosynthesis. Chemistry & Biology, doi : 10.1016/j.chembiol.2007.08.001

— Bagchi, D., Sen, C.K., Ray, S.D., Das, D.K., Bagchi, M., Preuss, H.G., Vinson, J.A., **(2003** Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract, Review. Mutation Research **523–524**, 87–97.

— Bah, S., Diallo, D., Dembele, S., Paulsen, B.S., **(2006)**. Ethnopharmacological survey of plants used for the treatment of schistosomiasis in Niono District, Mali. Journal of Ethnopharmacology, **105**, 387–399.

— Barata, L.E.S., Santos, L.S., Ferri, P.H., Phillipson, J.D., Paine, A., Croft, S.L., (**2000)**. Antileishmanial activity of neolignans from Virola species and synthetic analogues. Phytochemistry **55**, 589–595.

— Beejmohun, V., Fliniaux, O., Hano, C., Pilard, S., Grand, E., Lesur, D., Cailleu, D., Lamblin, F., Lainé, E., Kovensky, J., Fliniaux, M.-A. Mesnard, F., **(2007)**. Coniferin dimerisation in lignan biosynthesis in flax cells, Phytochemistry **68**, 2744–2752

— Bhattacharyya, J., Serur, L.M. and Cheriyan, U.O., **(1984)** Isolation of the alkaloids of *Monnieria Trifolia*. Journal of Natural Products, Mar-Apr **Vol. 47**, No. 2, pp. 379-381.

— Bizimana, N., Tietjen, U., Zessin, K.H., Diallo, D., Djibril, C., Matthias, F., Melzig, Clausen, P.T., **(2006).** Evaluation of medicinal plants from Mali for their in vitro and in vivo trypanosidal activity. Journal of Ethnopharmacology **103**, 350–356

— Borsato, M.L.C., Grael, C. F.F., Souza, G. E.P., Lopes, N.P. **(2000)** Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. Phytochemistry **55**, 809 – 813.

— Bruneton, J., (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Editions TEC & DOC, 3ème édition, PP 783- 785.

— Burkill, H.M., 1985. Useful plants of West Tropical Africa, volume 1 second ed. Royal Botanic Gardens, Kew, London; 960 P.

— Burkill, H.M., 1997. Useful plants of West Tropical Africa, volume 4 second ed. Royal Botanic Gardens, Kew, London; 969 P.

— Burkill, H.M., 2000. Useful plants of West Tropical Africa, volume 5 second ed. Royal Botanic Gardens, Kew, London; 686 P.

— Cakir, A., Mavi, A., Yıldırım, A., Duru, M.E., Harmandar, M., Kazaz, C., 2003. Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fractionation. Journal of Ethnopharmacology 87, 73–83.

— Calzada, F., Yépez-Mulia L., Aguilar, A., **(2006).** *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. Journal of Ethnopharmacology **108**, 367–370.

— Céspedes, C.L., El-Hafidi, M., Pavon, N., Alarcon, J., **(2008)**. Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry Aristotelia chilensis (Elaeocarpaceae), Maqui. Food Chemistry **107**, 820–829.

— Chaabi, M., Benayache, S., Benayache, F., N'Gom, S., Kone, M., Anton, R., Weniger, B., Lobstein, A., **(2008)**. Triterpenes and polyphenols from *Anogeissus leiocarpus* (*Combretaceae*). Biochemical Systematics and Ecology **36**, 59 – 62.

— Chatter, R., Kladi, M., Tarhouni, S., Maatoug, R., Kharrat, R., Vagias, C., Roussis, V., **(2009)**. Neorogioltriol: A brominated diterpene with analgesic activity from Laurencia glandulifera. Phytochemistry Letters **2**, 25–28

— Cheng, S.Y., Wen, Z.H., Wang, S.K., Chiou, S.F., Hsu, C.H., Dai, C.F., and Duh, C.Y., **(2009)**. Anti-inflammatory cembranolides from the soft coral *Lobophytum durum* Bioorganic & Medicinal Chemistry doi: 10.1016/j.bmc.2009.04.053

— Cheng, Z.H., Yu, B.H., Yang, X.W., **(2002)**. 27-Nor-triterpenoid glucosides from *Mitragyna inermis*; Phytochemistry, **61**, 379-382.

— Choi, H.J., Kim, J.-H., Lee, C-H., Ahn, Y.J., Song, J.-H., Baek, S.-H., Kwon, D.-H. **(2009)** Antiviral activity of quercetin 7-rhamnoside against porcine epidemic diarrhea virus.

— Conrad, J., Vogler, B., Reeb, S., Klaiber,I., Papajewski,S., Roos,G., Vasquez,E., Setzer,M.C.,and Kraus, W., **(2001)**. Isoterchebulin and 4, 6-O- Isoterchebulloyl-D- glucose, novel hydrolizable tannin from *Terminalia macroptera*. J. Nat. Prod. **64,** 294-299

— Conrad, J., Vogler,B., Klaiber,I., Roos, G ,Walter, U., and Kraus, W., **(1998)**. Two triterpene esters from *Terminalia macroptera* bark. Phytochemistry **vol. 48**; N°4, 647-650.

— Conrad, J., Vogler,B., Kleiber,I., Reeb, S., Guse, G.H., Roos, G., Kraus, W., **(2001)**. Vanilic acid 4-O-β-D-(6'-O-galloyl) glucoside and other constituents from the bark of *Terminalia macroptera* Guill et perr. Nat. Prod lett. **15**, 35-42.

— Corea, G., Fattorusso, E., Lanzotti, V., Di Meglio, P., Maffia, P., Grassia, G., Ialenti, A., and Ianaro, A. (**2005).** Discovery and Biological Evaluation of the Novel Naturally Occurring Diterpene Pepluanone as Anti-inflammatory Agent. J. Med. Chem. **48,** 7055-7062.

— da Silva, R., de Souza, G.H. B., da Silva, A. A. de Souza, V. A., Pereira, A.C., Royo, V.A., Silva, M.L. A., Donate, P. M ., Ara újo, A.L.S.M., Carvalho, J.C. T.and Bastos, J.K. **(2005)**. Synthesis and biological activity evaluation of lignan lactones derived from (-)-cubebin. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **15**, 1033–1037

— da Silva, R., Saraiva J., de Albuquerque, S., Curti, C., Donate, P.M., Bianco, T.N.C., Bastos, J.K. Silva, M.L.A. **(2008)** Trypanocidal structure–activity relationship for cis- and trans-methylpluviatolide. Phytochemistry **69**, 1890 – 1894.

— Dasgupta, N., De, B., **(2007)**. Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: a comparative study. Food Chemistry **101**, 471 – 474

— De Barros, M. P., Lemos, M., Maistro, E. L., Leite, M. F., Sousa, J.P.B., Bastos, J.K., de Andraded, S.F. **(2008).** Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. Journal of Ethnopharmacology **120,** 372–377

— Delgado-Andrade, C., Rufiaän- Henares, J.A., and Morales, F.J., **(2005)**. Assessing the Antioxidant Activity of Melanoidins from Coffee Brews by Different Antioxidant Methods J. Agric. Food Chem. **53**, 7832-7836.

— Demuner, A.J., Barbosa, L.C.A., Veloso, D.P., Alves, D.L.F., Howarth, O.W., (**1996).** Structure and Plant Growth Regulatory Activity of New Diterpenes from Pterodon polygalaeflorus *J. Nat. Prod.***, 59**, 770-772

— Diallo, D., **(2000)** ethnopharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four them: *Glinus oppositifolius* (Aizoaceae), *Diospyros abyssinica* (Ebenaceae), *Entada africana* (mimosaceae), *Trichilia emetica* (Meliaceae). Thèse de doctorat, 221 P, Lausane (Suisse)

— Diallo, D., Marston, A., Terreaux, C., Touré, Y., Paulsen, B.S., and hostettmann, K., 2001. Screening of Malian medicinal plants for antifungal larvicidal, molluscicidal, anti-oxidant and Radical Scavenging activities. Phytotherapy Research 15, 401- 406.

— 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 Chemistry **97**, 654–660.

— Dolabela M.F., Oliveira S. G., Nascimento, J.M., Peres, J.M., Wagner, H., Póvoa, M.M., de Oliveira, A.B. **(2008)** In vitro antiplasmodial activity of extract and constituents from Esenbeckia febrifuga, a plant traditionally used to treat malaria in the Brazilian Amazon Phytomedicine **15**, 367–372.

— Dräger B., **(2002).** A nalysis of tropane and related alkaloids, Review. Journal of Chromatography A, **978** 1–35.

— Dua, V.K., Ojha, V.P., Roy, R., Joshi, B.C., Valecha, N., Devi, C.U., Bhatnagar, M.C., Sharma V.P., Subbarao, S.K., **(2004)**. Anti-malarial activity of some xanthones isolated from the roots of *Andrographis paniculata*. Journal of Ethnopharmacology **95,** 247–251

— Elgorashi, E.E.,. Taylor J.L.S., Maes, A., van Staden, J., De Kimpe, N., Verschaeve, L., 2003. Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. Toxicology Letters 143, 195 - 207

— Epifano, F., Genovese, S., Menghini, L., Curini, M., **(2007)**. Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites, Review. Phytochemistry **68,** 939 - 953

— Felippe, L.G., Baldoqui, D.C., Kato, M. J., Bolzani, V.S., Guimara˜es, E. F., Cicarelli, R. M. B., Furlan, M., **(2008)**, Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. Phytochemistry **69**, 445–450

— Ferrer, J.-L, Austin, M.B., Stewart Jr, C., Noel, J.P., **(2008)**. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids, review. Plant Physiology and Biochemistry **46**, 356 -370.

— Filho, A.A.S., Costa, E. S., Cunha, W.R., da Silva, M.L. A., Nanayakkara, N. P. D. and. Bastos, J.K., **(2008)** *In vitro* Antileishmanial and Antimalarial Activities of Tetrahydrofuran Lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). *Phytother. Res.* **22**, 1307–1310

— Formica, J. V., & Regelson, W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. Food and Chemical Toxicology, 33(12), 1061 - 1080.

— Froelich, S., Schubert, C., Bienzle, U., Jenett-Siems, K., (**2005)**. In vitro antiplasmodial activity of prenylated chalcone derivatives of hops (Humulus lupulus) and their interaction with hemin. J. Antimicrob. Chemother. **55**, 883–887.

— Ganapaty, S., Pannakal, S.T., Srilakshmi, G.V.K., Lakshmi, P., Waterman, P.G., Brun, R., **(2008)** Pumilanol, an antiprotozoal isoflavanol from *Tephrosia pumila*. Phytochemistry Letters **1**, 175–178

— Gheldof, N., & Engeseth, N. J., (**2002).** Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **50**, 3050–3055

— Gomes, E., Dellamonica, G., Gleye, J., Moulis, C., Chopin, J., and Stanislas, E., **(1983)**. Phenolic compounds from *Vepris heterophylla*. Phytochemistry, **vol.22**, 2628-2629

— Gómez-Caravaca A.M., Gómez-Romero M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., **(2006)**. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **41**, 1220–1234.

— Govindarajan, R., Vijayakumar, M., Venkateshwara,C., RAO, Shirwaikar, A., Rawat, A.K.S., Mehrotra, S., and Pushpangadan, P., **(2004)**. Antioxidant Potential of *Anogeissus latifolia Biol.* Pharm. Bull. **27(8),** 1266-1269

— Güida, M. C., Esteva, M. I., Camino, A., Flawiá, M.M., Torres, H.N., Paveto, C., **(2007)** Trypanosoma cruzi: In vitro and in vivo antiproliferative effects of epigallocatechin gallate (EGCg). Experimental Parasitology **117**, 188–194

— Gülçin, I., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., **(2006)**. Screening of antiradical and antioxidant activity of monodesmosides and crude extract from Leontice smirnowii tuber Phytomedicine **13**, 343–351.

— Gurbuz, I., Yesilada, E., Ito, S. **(2009)**. An anti-ulcerogenic flavonol diglucoside from *Equisetum palustre* L. Journal of Ethnopharmacology **121,** 360–365

— Halliwell, B., **(1991)**. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. Am J Med. **91(3C):**14S-22S

— Hartmann, T., **(2007)**. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism, Review. Phytochemistry **68** 2831–2846

— Hirata, 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

— Holasova, M., Fiedlerova, V., Smrcinova, H., Orsak, M., Lachman, J., Vavreinova, S., **(2002)**. Buckwheat - the source of antioxidant activity in functional foods Food Research International **35**, 207–211.

— Ignatushchenko, M.V., winter, R.W., Bächinger, H.P., Hinrichs, D.J., Riscoe, M.K., **(1997).** Xanthones as antimalarial agents; studies of a possible mode of action. FEBS letters 409, 67-73.

— Inngjerdingen, K., Nergard, C.S., Diallo, D., Mounkoro, P.P., Paulsen, B.S., **(2004)**. An Ethnopharmacological survey of plants used for wounds healing in dogoland, Mali, West Africa. Journal of Ethnopharmacology **92**, 233 – 244.

— Iranshahi, M., Arfa, P., Ramezani, M., Jaafari, M. R., Sadeghian, H., Bassarello, C., Piacente, S., Pizza, C., **(2007)**. Sesquiterpene coumarins from Ferula szowitsiana and in vitro antileishmanial activity of 7-prenyloxycoumarins against promastigotes. Phytochemistry, **68**, 554–561.

— Ito, C., Itoigawa, M., Onoda, S., Hosokawa, A., Ruangrungsi, 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

— Kalkhambkar, R.G., Kulkarni G.M., 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.

— Kaur, K., Jain, M., Kaur, T., Jain, R., **(2009).** Antimalarials from nature Review Bioorganic & Medicinal Chemistry, doi: 10.1016/j.bmc.2009.02.050

— Kerharo, J., Adam, G., **(1974)**. Pharmacopée Sénégalaise Traditionnelle – Plantes médicinales et toxiques. Vigot et Frères ; 1011 P.

— Kim, D - O., Lee, K.W., Lee, H. J. and Lee, C.Y., **(2002)**. Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals J. Agric. Food Chem. **50,** 3713-3717.

— Kim, D-O.; Seung, W. J.; Lee, C.Y. **(2003).** Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. Food Chemistry **81**, 321–326.

— Kim, J.Y, Lim, H.J., Lee, D.Y., Kim, J.S., Kim, D.H., Lee, H.J., Kim, H.D., Jeon, R., Ryu, J.H. **(2009).** In vitro anti-inflammatory activity of lignans isolated from Magnolia fargesii. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **19**, 937 - 940

— Ko, W. G., Kang, T. H., Lee, S. J., Kim, N. Y., Kim, Y. C., Sohn, D. H. and Lee B. H. **(2000),** Polymethoxyflavonoids from *Vitex rotundifolia* inhibit proliferation by inducing apoptosis in human myeloid leukemia cells; Food and Chemical Toxicology **38**, 861 – 865

— Kone, W.M., Kamanzi, A.K.K., Terreaux, C., Hostettmann, K., Traoré, D., Dosso, M., **(2004)**. Traditional Medicine in North Côte d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for anti-bacterial activity. Journal of Ethnopharmacology **93**, 43–49

— Kraft, C., Jenett-Siems, K., Köhler, I., Tofern-Reblin, B., Siems, K., Bienzle, U., Eich, E., **(2002)**. Antiplasmodial activity of sesquilignans and sesquineolignans from Bonamia spectabilis. Phytochemistry, **60**, 167–173.

— Kubata, B.K., Nagamune, K., Murakami, N., Merkel, P., Kabututua, Z., Martin, S.K., Kalulug, T.M., Mustakuk, H., Yoshida, M., Ohnishi-Kameyama M., Kinoshita, T., Duszenko, M., Uradea, Y., **(2005)**. Kola acuminata proanthocyanidins: a class of anti-trypanosomal ompounds effective against Trypanosoma brucei. International Journal for Parasitology **35**, 91-103

— Kuete, V., Wansi, J.D., Mbaveng, A.T., Sop, M.M. K., Tadjong, A. T. Beng, V. P., Etoa, F.-X., Wandji, J., Meyer, J.J. M., Lall, N. **(2008)** Antimicrobial activity of the methanolic extract and compounds from Teclea afzelii (Rutaceae); South African Journal of Botany **74**, 572–576.

— Kulkarni, A.P., Aradhya, S.M., Divakar, S., (**2004).** Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit Food Chemistry **87**, 551–557.

— Kumaran, A., Joel Karunakaran, R., **(2005)**. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India. LWT **40,** 344–352.

— Kumaran, A., Joel Karunakaran, R., **(2007)**. Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of Coleus aromaticus. Food Chemistry **100**, 356–361.

— Küpeli, E., Erdemoğlu, N., Yeşilada, E., Şener, B. **(2003)** Anti-inflammatory and antinociceptive activity of taxoids and lignans from the heartwood of *Taxus baccata* L. Journal of Ethnopharmacology **89**, 265 – 270

— Küpeli, E., Yesilada, E., **(2007)** Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures. Journal of Ethnopharmacology **112**, 524–530

— Lee, K.Y., Weintraub, S.T., Yu, B.P., **(2000)**. Isolation and identification of a phenolic antioxidant from *Aloe barbadensis*. Free Radical Biology & Medicine, **Vol. 28**, No. 2, pp. 261–265.

— Li, F., Awale, S., Tezuka, Y. and Kadota, S., **(2008)**, Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship Bioorganic & Medicinal Chemistry **16**, 5434–5440

— Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Soobrattee, M.A., and Aruoma, O.I., **(2002)**. Antioxidant Activities of Phenolic, Proanthocyanidin, and Flavonoid Components in Extracts of *Cassia* fistula J. Agric. Food Chem. **50**, 5042-5047

— Maciuk, A., Lavaud, C., Thépenier, P., ´ Jacquier, M-J., Ghédira, K., and Zèches-Hanrot, M., **(2004)**. Four New Dammarane Saponins from *Zizyphus lotus*. Journal of Natural Products, **Vol. 67**, No. 10.

— Maïga, A., Diallo,D., Fané,S., Sanogo,R., Paulsen, B.S., and Cissé, 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**, 183-193.

— Malgras, D., (**1992)**. Arbres et arbustes guérisseurs des savanes maliennes. Edits Karthala et ACCT, Paris, 474 P.

— Mambu, L., Grellier, P., Florent, L., Joyeau, R, Ramanitrahasimbola, D., Rasoanaivo, P., Frappier, F., **(2006)**. Clerodane and labdane diterpenoids from Nuxia sphaerocephala. Phytochemistry **67,** 444–451

— Manian, R., Anusuya, N., Siddhuraju, P., Manian, S. **(2008)**. The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of Camellia sinensis (L.) O. Kuntz, Ficus bengalensis L. and Ficus racemosa L. Food Chemistry **107**, 1000–1007

— Martin, M. J., Motilva, V.and de la Lastra, C. A. Quercetin and Naringenin; Effects on Ulcer **(1993)**. Formation and Gastric Secretion in Rats. Phytotherapy Research **VOL. 7**, 150-153

— Martins, R.C.C., Lago, J.H.G., Albuquerque, S., Kato, M. J., **(2003)**. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of Piper solmsianum. Phytochemistry **64**, 667–670

— Maurya, R., Yadav, D. K., Singh, G., Bhargavan, B., Murthy, P. S. N., Sahai, M., Singh M. M., **(2009)**. Osteogenic activity of constituents from Butea monosperma Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **19**, 610–613

— McCalley, D.V., **(2002)**. Analysis of the *Cinchona* alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques, Review. Journal of Chromatography A, **967,** 1–19

— Melagraki, G., Afantitis, A., Igglessi-Markopoulou, O., Detsi, A., Koufaki, M., Kontogiorgis C., Hadjipavlou – Litina, D. J., **(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.ejmech.2008.12.027

— Monjanel-Mouterde, S., Traoré,F., Gasquet,M., Dodero, F., Delmas, F., Ikoli, J.F., Lorec, A.M., Chamlian,V., Portugal, H., balansard, G., and Pisano, P., (**2006)**. Lack of toxicity of hydroethanolique extract from *Mitragyna inermi*s (Willd.) O. Kuntze by gavage in the rat. Journal of Ethnopharmacology, **1003**, 319-326.

— Moody, J.O., Ojo, O.O., Omotade, O.O., Adeyamo, A.A., Olumese, P.E., and Ogundipe, O.O., **(2003)**. Anti-sickling potential of a Nigeria Herbal Formula (Ajawaron HF) and the major plant compound (*Cissus populnea* L. CPK); phytotherapy research **17**, 1173-1176.

— Mustofa, Valentin, A., Benoit-Vical, F., Pellissier, Y., Koné-Bamba, D., Mallié, M., **(2000)**. Antiplasmodial activity of plants extracts used in West African traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology **73**, 145-151.

— Muthu, C., Ayyanar, M., Raja, N., and Ignacimuthu, S., (**2006)**. Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, **2:43** doi:10.1186/1746-4269-2-43

— Nakatani, N., Kayano, S., Kikuzaki, H. Sumino, K., Katagiri, K. and Mitani, T., **(2000).** Identification, Quantitative Determination, and Antioxidative Activities of Chlorogenic Acid Isomers in Prune (Prunus domestica L.) J. Agric. Food Chem., **48**, 5512-5516;

— Ngouela, S., Lenta, B.N., Noungoue, D. T., Ngoupayo, J., Boyom, F.F., Tsamo, E., Gut, J., Rosenthal, P.J., Connolly, J. D. **(2006)**. Anti-plasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globulifera* Linn f. Phytochemistry **67**, 302–306

— Nowakowska, Z., **(2007)**. Mini-review, A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. European Journal of Medicinal Chemistry **42**, 125 -137

— Ojekale, A.B., Lawal, O.A., Lasisi, A.K., Adeleke, T.I., **(2006).** Phytochemisty and spermatogenic potentials of aqueous extract of *Cissus populnea* (Guill. and Per) stem bark TheScientificWorldJournal, **6,** 2140-2146.

— Okoli, C.O., Akah, P.A., **(2004).** Mechanisms of the anti-inflammatory activity of the leaf extracts of Culcasia scandens P. Beauv (Araceae). Pharmacology, Biochemistry and Behavior **79**, 473–481

— Okpekon, T., Yelou, S., Gleye, C., Roblot, F., Loiseau, P., Bories, C., Grellier, P., Frappier, F., Laurens, A., Hocquemiller, R., **(2004)**. Antiparasitic activities of medicinal plants used in Ivory Coast. Journal of Ethnopharmacology **90**, 91-97.

— Okunade, A L., Elvin-Lewis M P. F., Lewis, W H., **(2004)**. Natural antimycobacterial metabolites: current status Review. Phytochemistry **65**, 1017–1032

— Osman, A.M.,. Wong, K.K.Y., Fernyhough, A., **(2006)**. ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. Biochemical and Biophysical Research Communications **346**, 321–329

— Ospina, C.A. and Rodriguez, A. D., **(2006)**. Bioactive Compounds from the Gorgonian *Briareum polyanthes*. Correction of the structures of four asbestinane-Type diterpenes. J. Nat. Prod., **69,** 1721-1727

— Ouédrago, S., Ranaivo, H.R., Ndiaye, M., Kaboré, Z.I., Guissou, I.P., Bucher, B., Andriantsitohaina, R., **(2004)**. Cardiovascular properties of aqueous extract from Mitragyna inermis (Willd). Journal of Ethnopharmacology **93**, 345-350.

— Ozgen, M., Reese, R.N., Tulio JR, A. Z., Scheerens J.C. and Miller, A.R., **(2006)**. Modified 2, 2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2, 2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. J. Agric. Food Chem. **54**, 1151-1157.

— Padilla, E., Ruiz, E., Redondo, S., Gordillo-Moscoso, A., Slowing, K., Tejerina, T., **(2005)**. Relationship between vasodilation capacity and phenolic content of Spanish wines European Journal of Pharmacology **517**, 84 – 91

— Peng, J., Walsh, K., Weedman, V., Bergthold, J. D., Lynch, J., Lieu, K.L., Braude, I. A., Kelly, M. and Hamann, M. T., **(2002).** The new bioactive diterpenes cyanthiwigins E–AA from the Jamaican sponge Myrmekioderma styx Tetrahedron **58**, 7809–7819

Phytochemical molecule icariin stimulates osteogenic but inhibits adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells (A14) Abstracts / Bone **43,** S38–S75

— PNLP : Programme National de lutte contre le paludisme **(2005)**. Rapport sur la situation du paludisme au Mali.

— Portet, B., Fabre, N., Roumy, V., Gornitzka, H., Bourdy, G., Chevalley, S., Sauvain, M., Valentin, A., Moulis, C., **(2007)**. Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from Piper hostmannianum var. berbicense. Phytochemistry **68** 1312 – 1320

— Prytzyk, E., Dantas, A. P., Salomão, K., Pereira, A.S., Bankova, V. S., De Castro, S. L., Neto, F.R. A. **(2003)**. Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis Journal of Ethnopharmacology **88,** 189 – 193

— 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.

— Roberts M.F. and Wink M., **(1999).** Alkaloids - Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. Book Reviews / Phytochemistry, **52**, 1177 - 1180

— Rodrigues, E., **(2007)**. Plants of restricted use indicated by three cultures in Brazil (Caboclo-river dweller, Indian and Quilombola). Journal of Ethnopharmacology **111**, 295–302

— Rotimi, V.O., Laughon, B.E., Bartlett, J.G. and Mosadomi, H.A. **(1988).** Activities of Nigerian chewing stick extract against Bacteroides gingivalis and Bacteroides melaninogenicus. Antimicrob. Agents Chemother, **32**, 598-600.

— Saewan, N., Sutherland, J. D., Chantrapromma, K., **(2006)**, Antimalarial tetranortriterpenoids from the seeds of *Lansium domesticum* Corr. Phytochemistry **67**, 2288–2293

— Sannomiya, M., Fonseca, V.B., da Silva, M.A., Rocha, L.R.M., 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

— Sanon, S., Ollivier, E., Azas, N., Mahiou, V., Gasquet, M., Ouattara, C.T., Nebie, I., Traoré, A.S., Esposito, F., Balansard, G., Timon-David, P., Fumoux, F., **(2003)**. Ethnobotanical survey and in vitro antiplasmodial activity of plants used in traditional medicine in Burkina Faso. Journal of Ethnopharmacology **86**, 143-147.

— Sauvain, M., Kunesch, N., Poisson, J., Gantier, J.C., Gayral, P., Dedet, J.P., **(1996)**. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from the Amazonian liana Doliocarpus dentatus (Dilleniaceae). Phytother. Res. **10**, 1–4.

— Schenone, S., Brullo, C., Bruno, O., Bondavalli, F., Ranise, A., Filippelli, W., Rinaldi, B., Capuano, A. and Falcone, G., **(2006).** New 1, 3, 4-thiadiazole derivatives endowed with analgesic and anti-inflammatory activities. Bioorganic & Medicinal Chemistry **14**, 1698–1705

— Sheu, J.H., Sung, P.J., Cheng, M-C., Liu, H.Y., Fang, L.S., Duh, C.Y., and Chiang, M.Y., (**1998).** Novel Cytotoxic Diterpenes, Excavatolides A-E, Isolated from the Formosan Gorgonian *Briareum excavatum*. J. Nat. Prod. **61,** 602-608

— Silva, O., Duarte, A., Pimentel, M., Viegas, S., Barrosso, H., Machado, J., Pires, I., Cabrita, J., Gomes, E., **(1997)**. Antimicrobial activity of *Terminalia macroptera* root. Journal of Ethnopharmacology **57**, 203-207.

— Silva, O., Ferreira, E., Vaz Pato M., Canica, M., Gomes, E.T., **(2002).** In vitro anti-Neisseria gonorrhoeae activity of *Terminalia macroptera* leaves. FEMS Microbiology Letters, **211**, 203-206.

— Silva, O., Gomes, E.T., Wolfender, J.L., Marston, A., and Hostettmann, K., **(2000)**. Application of high Performance liquid chromatography couplet with ultraviolet spectroscopy

and Electrospray Mass Spectrometry to the Characterisation of Ellagitannins from *Terminalia macroptera* roots. Pharmaceutical Research, **vol. 17**, N° 11.

— Silva, O., Gomes, E.T., Wolfender, J.L., Marston, A., and Hostettmann, K., **(2000).** Application of high Performance liquid chromatography couplet with ultraviolet spectroscopy and Electrospray Mass Spectrometry to the Characterisation of Ellagitannins from *Terminalia macroptera* roots. Pharmaceutical Research, vol. 17, N° 11.

— Sohn, H.-Y., Son, K.H., Kwon, C.-S., Kwon, G.-S., Kang, S.S., **(2004)**. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., Morus mongolica Schneider, Broussnetia papyrifera (L.) Vent, Sophora flavescens Ait and Echinosophora koreensis Nakai. Phytomedicine **11**, 666–672

— Soliman, M. F.M., Ibrahim, M., M. **(2005)**. Antischistosomal action of atorvastatin alone and concurrently with medroxyprogesterone acetate on *Schistosoma haematobium* harboured in hamster: surface ultrastructure and parasitological study. Acta Tropica, **93**, 1 – 9.

— Srivastava, A., Rao, L.J.M., Shivanandappa, T., **(2007)**. Isolation of ellagic acid from the aqueous extract of the roots of Decalepis hamiltonii: Antioxidant activity and cytoprotective effect. Food chemistry **103**, 224–233.

— Stalikas, C. D. **(2007).** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids Review. J. Sep. Sci. 30, 3268 – 3295

— Stöckigt, J., Sheludko, Y., Unger, M., Gerasimenko, I., Warzecha, H., Stöckigt, D., **(2002).** High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic–electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups Review Journal of Chromatography A, **967**, 85–113

— Sutradhar, R. K., Rahman, A.K.M. M., Ahmad M.U.,. Bachar, S. C., **(2008).** Bioactive flavones of *Sida cordifolia*. Phytochemistry Letters **1,** 179–182

— Sy, G.Y., Sarr, A., Dèye, A.M. and Faye, B., **(2004)**. Myorelaxant and antispasmodic effects of the aqueous extract of *Mitragyna inermis* barks on Wistar rat ileum. Fitoterapia **75**, 447-450.

— Togola, A., Diallo, D., Dembélé, S., Barsett, H., and Paulsen, B. S. (**2005)** Ethnopharmacological survey of different uses of seven medicinal plants from Mali, (West Africa) in the regions Doila, Kolokani and Siby. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, **1:7** doi: 10.1186/1746-4269-1-7

— Touré, H., Balansard, G., Pauli, A.M., Scotto, A.M., **(1996)**. Pharmacological investigation of alkaloids from leaves of *Mitragyna inermis* (Rubiaceae). Journal of Ethnopharmacology **54**, 59-62.

— Traoré, F., Gasquet, M., Laguet, M., Guiraud, H., Di Giorgio, C., Azas, N., Doumbo, O., Timon-David, P., **(2000)**. Toxicity and genotoxicity of antimalarial alkaloid rich extracts derived from *Mitragyna inermis* O. Kuntze and Nauclea latifolia. Phytotherapy Research **14**, 608-611.

— 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.

— 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.

— Trivedi, R., Kumara, S., Kumara, A., Siddiquia, J.A., Swarnkara, G., Gupta, V., Kendurker, A., Dwivedi, A.K., Romerod, J.R., Chattopadhyaya, N. **(2008)** Kaempferol has osteogenic effect in ovariectomized adult Sprague–Dawley rats. Molecular and Cellular Endocrinology **289**, 85–93.

— Vafeiadou, K., Vauzour, D., Lee, H.Y., Rodriguez-Mateos, A., Williams, R. J., Spencer J. P.E., **(2009)**. The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells 3 and protects against neuroinflammatory injury Archives of Biochemistry and Biophysics doi:10.1016/j.abb.2009.01.016

— Vincken, J.P., Heng, L., De Groot, A., Gruppen, H. (2007) Review Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. Phytochemistry **68**, 275–297

— Von Maydell, H-J. (**1983)** Arbres et arbustes du sahel : Leurs caracteristiques et leurs applications, 260 P.

— Vonthron – Sénécheau, C., Weniger, B., Ouattara, M., Tra Bi, F., Kamenan, A., Lobstein, A., Brun, R., Anton, R., (**2003)**. In vitro antiplasmodial activity and citotoxicity of ethnobotanically selected Ivorian plants. Journal of Ethnopharmacology, **87**, 221 – 225.

— 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

— Wollgast, J., Anklam, E., **(2000)**. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. Food Research International **33**, 423 – 447.

— Wu, S.L., Su, J.H., Wen, Z.H., Hsu, C.H., Chen, B.W., Dai, C.F., Kuo, Y.H. and Sheu, J.H., **(2009)**. Simplexins A-I, Eunicellin-Based Diterpenoids from the Soft Coral *Klyxum simplex*. J. Nat. Prod. DOI : 10.1021/np900064a

— Zapata-Sudo, G., **(2009)**. The lignan eudesmin extracted from Piper truncatum induced vascular relaxation via activation of endothelial H1 receptors. European Journal of Pharmacology, doi: 10.1016/j.ejphar.2009.01.038

— Zenk, M.H., Juenger, M. **(2007)** Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. Phytochemistry Review **68**, 2757 – 2772

— Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. **(1999)**. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry, **64**, 555– 559.

Sites internet

— http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs134/fr/ page consultée, lundi 2 mars, 2009 à 10h.

— **http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/lignan/** page consultée le 14 août 2008 à 10h.

— www.rsc.org/ej/NP/1997/NP9971400011.pdf -- *page consultée le 23 Mars à 12H*

Annexes

Annexe I

QUESTIONNAIRE D'ENQUETE ETHNOBOTANIQUE

Fiche N°……Nom (herboriste, tradipraticien)…….

Age : ……. Sexe : M ☐ F ☐ Lieu :…….

PLANTE : Nom scientifique **:** ……**.**(Willd.) O. Ktze. ; Nom bambara ……..

- Connaissez-vous cette plante ? oui ☐ non ☐
- Quelles utilisations faites-vous de cette plante ?
- Quelles maladies soigne-t-elle ?
- Quelles parties récolter (Feuilles ☐ Ecorces de tronc ☐ Racines ☐ ……) ?
- Quand doit-on récolter ?
- Faut-il l'utiliser à l'état frais ou sec ?
- Comment procède t-on au séchage ?
- Comment se fait la préparation ?
- Quelle quantité de drogue faut-il prendre et dans quel volume d'eau?
- En cas de décoction ou d'infusion quelle est la durée correspondante ?

- Comment utilise-t-on la préparation ?

- Quelle est la dose journalière ? (adulte - enfant - femme en état de grossesse)

- En cas d'intoxication comment procéder ?

- Quelle est la durée du traitement ?

- Quel type d'aliment manger ou éviter pendant le traitement ?

- Quels sont les effets secondaires liés à la prise de la plante ?

Annexe II

Publication en révision soumise au journal : Evidence Based Complementary and Alternative Medicine, REF : ECAM -08-0348.R3

Phytochemical composition and antioxidant capacity of three Malian medicinal plant parts

François Muanda N[1], Donatien Koné[1], Amadou Dicko[1], Rachid Soulimani[2] and Chafique Younos[2]

[1] Chemistry Laboratory and methodologies for the Environment, Paul -Verlaine University, 1, Bd Arago Technopole 2000, 57078 Metz, and

[2] Ethnobotanic, Pharmacology, Anxiety, Stress oxidative and Bioactivity Laboratory, University Paul - Verlaine, BP 4102, 57040, Metz, France

Abstract

This study evaluates the levels of total polyphenolic compounds in three Malian medicinal plants and determines their antioxidant potential. Quantitative and qualitative anlysis of polyphenolics contained in plant extracts were carried out by RP-C18 RP-HPLC using UV detector. The antioxidant activity was determined by three tests. They are phosphomolybdenum, DPPH and ABTS tests. The total phenolic and the total flavonoid contents varied from 200 to 7600 mg/100 g dry weight, expressed as gallic acid equivalents (GAE) and from 680 to 12300 mg/100g dry weight expressed as catechin equivalent (CE) respectively. The total anthocyanin concentrations expressed as cyanin-3-glycoside equivalent varied from 1670 to 28388 mg/100 g dry weight. The antioxidant capacity was measured by determining IC_{50} and expressed as VCEAC. The IC_{50} values were ranked between 2.68 and 8.80 $\mu g\ ml^{-1}$ of a solution of 50% (v/v) methanol in water. The uses of plants are rationalized on the basis of their antioxidant capacity.

Keywords: Polyphenolic compounds – flavonoids – anthocyanins – RP-HPLC – Malian herbs

1. 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 many contribute to the total antioxidant capacity of plant include polyphenols and vitamins (vitamin C and E). Phenolic compounds can be non-nutrients (5). Plants phenolic compounds are hydroxylated derivatives of benzoic acid and cinnamic acids and have been reported to have 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 anti-proliferative activities (5-9). Several reports indicate that the antioxidant potential of medicinal plants may be related to the concentration of their phenolic compounds which includes 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 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 (1) to evaluate the level of total phenolics, flavonoids and anthocyanins in three sub-saharian medicinal plants (Daniella oliveri, Ficus capensis and Vitex doniana) used for treating hypertension and considered as diuretic, anti-inflammatory, antipyretic and anti-purulent agents (Table 1), and (2) to evaluate total antioxidant potential by using VCEAC (vitamin C equivalent antioxidant capacity) tests.

Table 1: Name, traditional uses and phytocomponents data

Plant name	Family	Uses	Pharmacology data	Phytocomponents data
***Daniella oliveri (D.thurifera)* Rolfe**	Caesalpiniaceae	Treatment diarrheic (Leaves), Bactericide, anti-inflammatory, Analgesic, antiseptic, Anti-diabetic, antispasmodic, Anti-haemorrhoid, aphrodisiac, Relaxing	Analgesic (hexane extract) Antipyretic (ethyl acetate extract) Anti-inflammatory, Bactericide, Anti-histamic (methanol extract) (18, 19, 20, 21)	Polyphenols, flavonoids, anthocyanins, glycosides, tannins, saponins, terpenes, alkaloids
***Vitex doniana* (*V.umbrosa*)**	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, vitamin C,A, E
***Ficus capensis* (Thumb) (Forssk)**	Moraceace	Bactericide, anti-diabetic, diuretic, aphrodisiac (Stems, Roots) (20,25, 26)	Anti-diabetic, diuretic (methanol extract)	Polyphenols, flavonoids, tannins, vitamin C

2. Material and methods

2.1. 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 x 150 mm; particle size, 5 µm).

Spectrophotometer analyses were carried out with UV-Vis spectrophotometer (Cary 50 scan).

2.2. Chemicals

Folin-Ciocalteu's phenol reagent, aluminium chloride, catechin, gallic acid,p-coumaric acid, coumarin, rutin, protocatechic acid, vitamin acid, caffeic acid, isovitexin, chlorogenic acid, delphinidin , orientin, malvidin, homoorientin, ellagic acid, l-cyanidin , peonidin were purchased from Across Organics. Sodium carbonate, sodium nitrite, Chlorhydric acid, ethyl acetate, sodium sulphate anhydrous, ammonium phosphate, ferric ammonium sulphate, acetonitrile, methanol, ABTS, PBS buffer, AAPH and DPPH were obtained from sigma and Roth. The chemicals used were all of analytical grade.

2.3. Procurement and preparation of samples

The plants *Daniella oliveri*, *Ficus capensis* and *Vitex doniana* were obtained from the " Department of Traditional Medicine " of Mali, upon arrival at the laboratory, the 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.

2.4. Samples extractions

2.4.1. 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 (TAC) 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 3000 rpm for 20 minutes and transferred in small sample bottles and stored at + 4 °C in the dark until analysis.

2.4.2. Extraction of polyphenol compounds for RP-HPLC analysis

Polyphenols were extracted following the method described by Muchuweti et *al*. (28) slightly modified. Fresh samples (5 g) of plants portions were extracted twice with ethyl acetate (20 ml) and organic fractions were combined. After 30 minutes of drying with anhydrous $NaSO_4$, the extract was evaporated to dryness at 40°C. Then, the residue was dissolved in methanol/ water (2 ml 1:1(v/v)) before analysis by RP-HPLC. The standards solutions were prepared by dissolving 1 mg ml^{-1} (m: v).

2.5. Dosage of phenolic compounds

2.5.1. Spectrophotometer analysis

2.5.1.1. Dosage of total phenolic compounds (TPC)

Total phenolic compounds were determined following Muchuweti et *al*. (28) method slightly modified. To a sample (100 µl), 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. Total phenolic compounds were expressed in terms of equivalent amounts of gallic acid (GAE).

2.5.1.2. Determination of total flavonoid compounds (TFC)

Total flavonoid contents were measured according to a colorimetric assay slightly modified (12, 29). A 250 µl of standard solution of catechin at different concentrations or appropriately diluted samples was added to 10 ml volumetric flask containing 1ml of didistillate waters (dd H_2O). At zero time, 75 µl of $NaNO_2$ (5%) was added to the flask. After 5 minutes, 75 µl of $AlCl_3$ (10%) was added. At 6 minutes, 500 µl of NaOH (1N) was added to the mixture. Immediately, the solution was diluted by adding 2.5 ml ddH_2O and mixed thoroughly. Absorbance of the mixture, pink in color, was

determined at 510 nm versus the prepared blank. Total flavonoid contents in medicinal plants were expressed as mg catechin equivalents (CE)/ g dry weight (dw). Samples were analyzed in three replications.

2.5.1.3. Evaluation of total anthocyanin compounds (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, pH1.0 (0.025 M) and sodium acetate buffer, pH 4.5 (0.4 M). Briefly, 400 µl 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: $\Delta A= (A_{510} - A_{700})\ pH_{1.0} - (A_{510} - A_{700})\ pH_{4.0}$ (30-32). Monomeric anthocyanin pigment concentration in the extract was calculated and expressed as cyaniding –3 glycoside (mg / l): ΔA x MW x Df x1000/ (Ma x 1) (30−33) with: ΔA: Absorbance, Mw: Molecular weight (449.2), Ma: Molecular absorptivity (26.900) and Df: dilution factor.

2.5.2. 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 µm PTFE syringe tip filter, using a 20 µl 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 µm x 4.6 mm x 150 mm. The flow rate was set at 1ml / minute at room temperature. A gradient of three mobile phases was used in the study, solvent A: 50 mM ammonium phosphate ($NH_4H_2PO_4$) 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 200 mM 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 at10 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% A at 55 minutes, 100% A at 60 minutes (36). After each run, the system was reconditioned for 10 minutes before analysis of next sample. Under these conditions, 20 µl of sample were injected. All sample analysis was done in

triplicate. Polyphenolic standards prepared by dissolving 1mg 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 320 nm 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.

2.6. Antioxidant activity

Three different tests have been used to determine the total antioxidant capacity: the phosphomolybenum test, the ABTS test and the DPPH test (37, 38).

2.6.1. Phosphomolybdenum test

The phosphomolybdenum 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 phosphomolybdenum. 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 phosphomolybdenum method usually detects antioxidants such as vitamin 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 sulphuric 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 / g).

2.6.2. ABTS test

The method used in this test is the one developed by Vanden Berg et *al.* (38), slightly modified. 1.0 mM of AAPH solution was mixed with 2.5 mMABTS 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 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 minutes. 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 dry plants powders and as mg /100 ml standards compounds of VCEAC in 20 minutes. All radical stock solutions were prepared fresh daily.

2.6.3. DPPH test

2.6.3.1. 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 minutes and thereafter the optical density was recorded at 517 nm against the blank.

For the control, 1ml 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 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, $\%\ IP = [(At_0 - At_{20}) / (At_0 \times 100)]$ (12, 43) were At_0 : absorbance of the sample test after zero minute and At_{20} : absorbance of the 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 plant extract. The DPPH radical scavenging activity of phenolic compounds was expressed as IC_{50} value in micrograms per ml of fresh weight. A low IC_{50} value represents a high antioxidant activity.

2.6.3.2. DPPH determination

The DPPH scavenging activity was determined using a modified method of Kim D. 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 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 /100 g of dry matter and as mg /100 ml of VCEAC in 30 minutes. The control solution was consisted by 100 µl of methanol and 2.90 ml of DPPH solution. The radical solution was prepared daily.

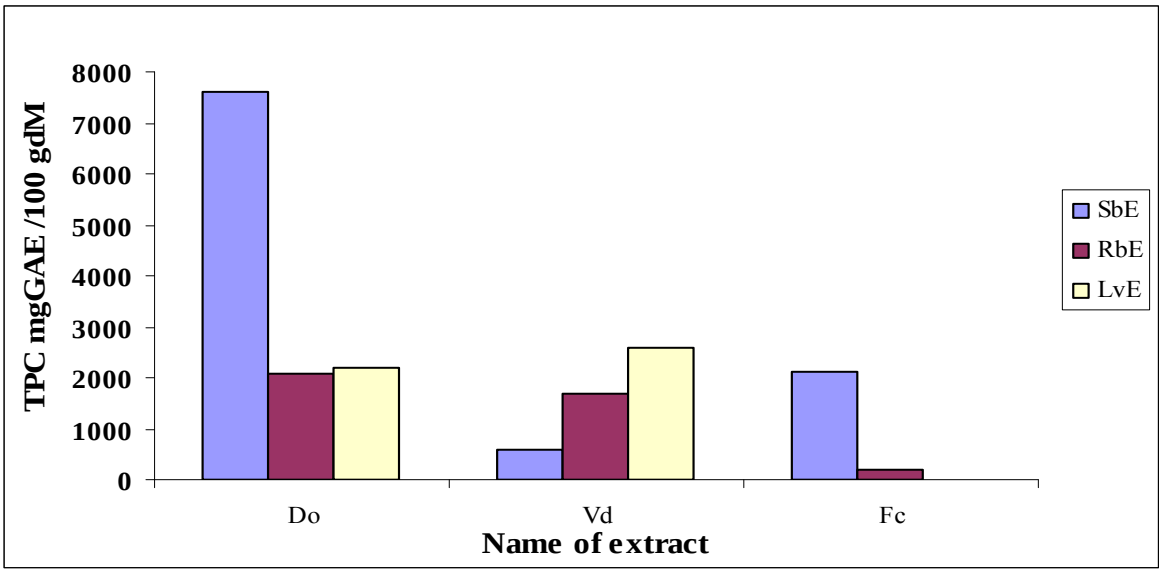
3. Statistical analysis

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 $P < 0.001$.

4. Results

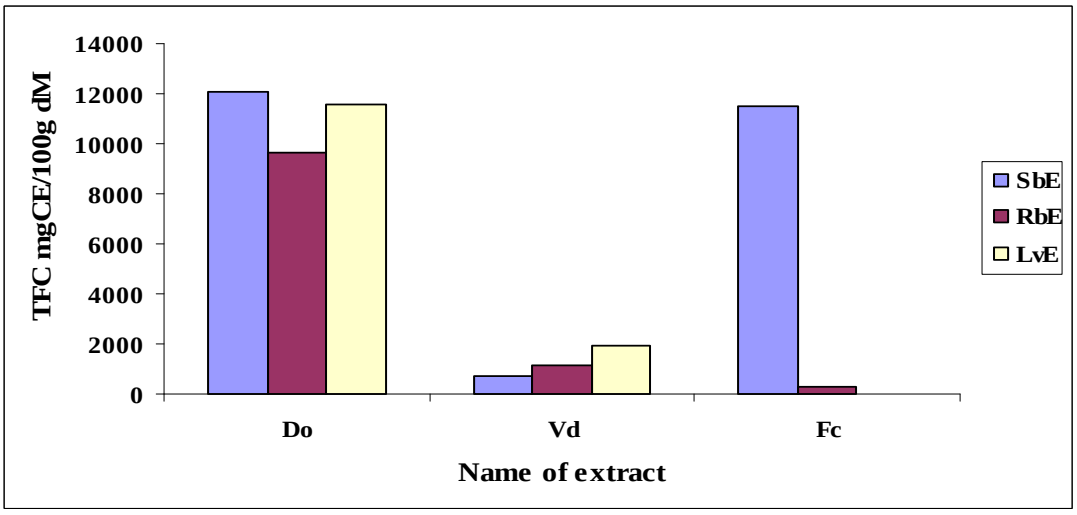
4.1. Total phenolic, flavonoid, and anthocyanin contents

Total phenolic, flavonoid, and anthocyanin compounds were quantified using an UV-Vis Spectrophometric apparatus. The results of analysis are showed in figure 1. No data were recorded for *Ficus capensis* leaves due to lack of sample.



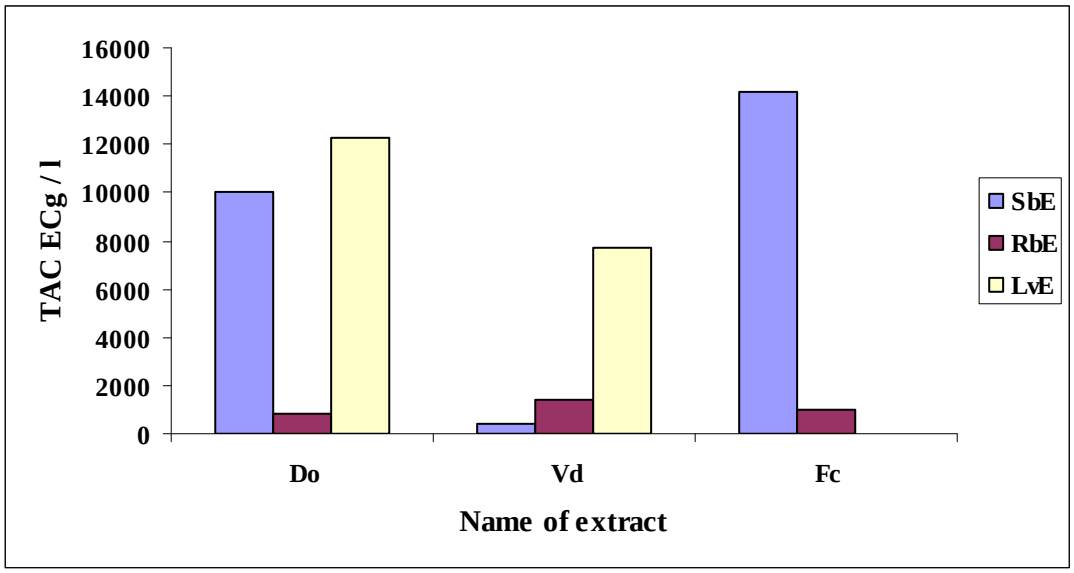
SbE: stem bark extract, RbE: root bark extract, LvE: leaves extract Do: daniella oliveri,Vd: vitex doniana, Fc: ficus capensis

Figure 1a: Total polyphenol compounds in the plants extracts



SbE: stem bark extract, RbE: root bark extract, LvE: leaves extract Do: daniella oliveri,Vd: vitex doniana, Fc: ficus capensis

Figure 1b: Total flavonoid compounds in the extracts



SbE: stem bark extract, RbE: root bark extract, LvE: leaves extract Do: daniella oliveri,Vd: vitex doniana, Fc: ficus capensis

Figure 1c: Total anthocyanin compounds in the extracts

4.2. 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 4 replicates. However, it is important to note that numerous peaks were not identified owing to the absence of suitable standards.

Table 2: Compounds identified in the different plant parts and their concentration

			Stem barks (µg/ml)			Root barks (µg/ml)			Leaves (µg/ml)	
Name of compound	Family	Rt (min)	***Daniella oliveri***	***Vitex doniana***	***Ficus capensis***	***Daniella oliveri***	***Vitex doniana***	***Ficus capensis***	***Daniella oliveri***	***Vitex doniana***
Gallic ac.	P	11.2	210.1 ± 1.5	190.9 ± 0.2	1180 ± 4	1202 ± 2	168.6 ± 0.4	1.6 ± 0.1	292.5 ± 0.3	471.4 ± 0.2
Protocatechic ac.	P	17.0	19.8 ± 0.2	63.5 ± 1.4	71.6 ± 0.3	1.2 ± 0.1	22.7 ± 0.1	1.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	34.8 ± 0.3
Catechin	F	25.0	ND	10.4 ± 0.1	3.0 ± 0.1	ND	51.5 ± 0.2	0.8 ± 0.1	4.1 ± 0.1	1.4 ± 0.1
Chlorogenic ac.	P	26.5	505.2 ± 0.4	4.2 ± 0.1	12.3 ± 0.1	ND	ND	0.6 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.7 ± 0.1
Caffeic ac.	P	28.7	2410.4 ± 12	8.2 ± 0.1	12.7 ± 0.1	0.9 ± 0.1	ND	5.2 ± 0.1	13.6 ± 0.2	ND
p-Coumaric ac.	P	33.5	322.4 ± 3.7	9.2 ± 0.1	827.2 ± 3.5	127.6 ± 2.1	ND	827.2 ± 0.8	18.9 ± 0.2	18.8 ± 0.3
Homo-orientin	F	35.4	784.4 ± 4.9	453.6 ± 4.0	36.6 ± 0.1	6.2 ± 0.2	2804 ± 4	194.9 ± 0.3	894.9 ± 4.5	384.1 ± 2
Orientin	F	36.4	ND	3.8 ± 0.1	9.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	247.1 ± 2.0	9.0 ± 0.1	ND	1.0±0.2
Rutin	F	37.1	144.2 ± 2.4	34.9 ± 0.2	22.7 ± 0.2	1.0 ± 0.1	6363 ± 2	6.1 ± 0.1	ND	11943 ± 5
Quercitrin-G	F	38.0	224.1 ± 0.7	96.3 ± 0.3	ND	115.6 ± 0.4	18.1 ± 0.1	ND	12.3 ± 0.2	12.6 ± 1
Quercitrin dH	F	39.3	5.0 ± 0.2	78.7 ± 0.2	1.8 ± 0.1	22.4 ± 0.1	1346 ± 1	83.2 ± 0.5	ND	1.7 ± 0.1
Coumarin	P	40.4	1.9 ± 0.1	2.5 ± 0.1	13.8 ± 0.1	4.9 ± 0.1	33.9 ± 0.7	2.9 ± 0.1	29.2 ± 0.4	10.9 ± 0.1
Malvidin	A	42.0	ND	39.1 ± 0.2	ND	ND	110.0 ± 0.6	ND	ND	8.3 ± 0.1
Delphinidin	A	42.5	1.1 ± 0.1	35.3 ± 0.1	34.4 ± 0.1	ND	ND	7.6 ± 0.1	ND	ND
Quercitrin	F	44.0	1.0 ± 0.1	ND	109.5 ± 1.0	5.0 ± 0.1	323.2 ± 0.1	63.3 ± 0.2	ND	1831 ± 18
Ascorbic ac.	Vit. C	56.5	2.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	14.5 ± 0.4	4.0 ± 0.1	ND	1.3 ± 0.1	ND	ND

Ac.: acid; G: glucosyl; dH: dehydrate; Rt.: retention time; ND: not determinate; A: Anthocyanidins; F: Flavonoids; P: Polyphenol; Data were reported as mean ± SEM (n=4)

4.3. Antioxidant activity

On the three plants screened, the extracts revealed good scavenging antioxidant activities as well as by phosphomolybdenum, 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.

Table 3: Antioxidant activity *in vitro* analysis

Plants	**Parts**	**Test PPM**	**Test ABTS**	**Test DPPH**		
				VCEAC (mg /100g dw)	% IP	Ic_{50} (µg/ml)
Daniella oliveri	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
Vitex doniana	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
Ficus capensis	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

Ic50: concentration of a polyphenols in mg/ml required to quench the free radicals by 50%; % IP: inhibition percentage

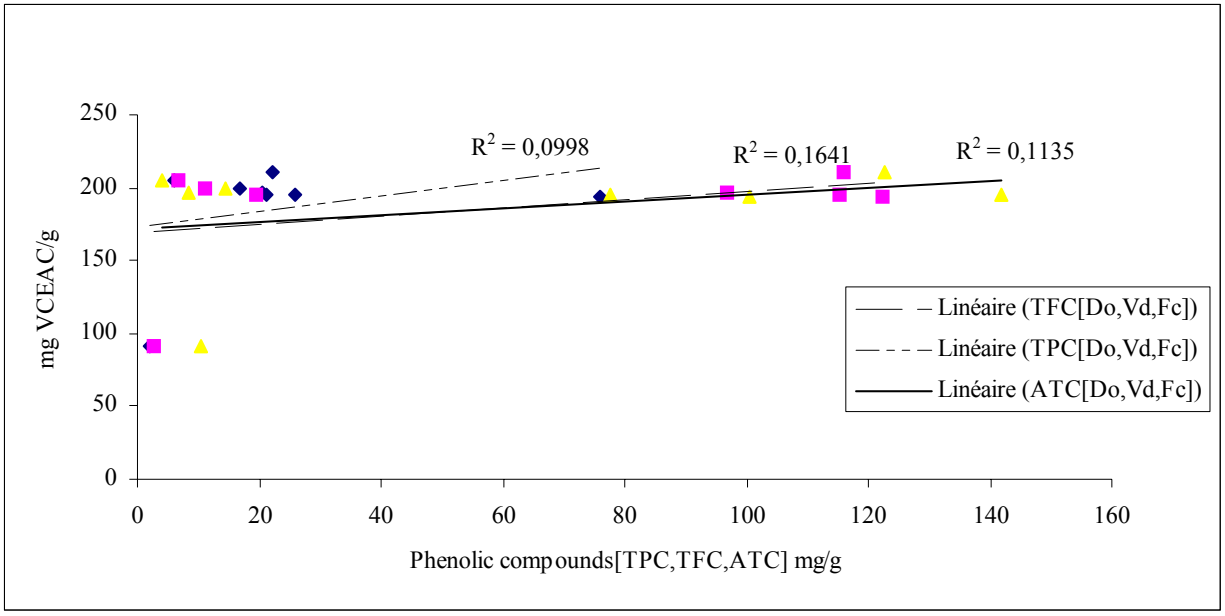


Figure 2: Correlation coefficient between DPPH VCEAC test and polyphenolics contains

5. Discussion

The distribution of total phenolic compounds (TPC) in *Daniella oliveri* and *Vitex doniana* differs, in that the content of TPC are higher in leaves than in stem barks in *Vitex doniana*, whereas in *Daniella oliveri* TPC is more concentrated in the stem barks (Fig.1). The concentration of total flavonoid compounds (TFC) is very low in the root barks of *Ficus capensis*. The stem barks extracts of *Daniella oliveri* and *Ficus capensis* contained almost the same levels of TFC. *Daniella oliveri* plant parts, stem barks, root barks and leaves exhibited a similar TFC (Fig.1). For all the three plants, the concentration of total anthocyanin compounds (TAC) is lowest in the root barks.

RP-HPLC analysis revealed that the caffeic acid in the stem barks of *Daniella oliveri* is the most important phenolic compound (2410.4 µg ml^{-1}), whereas its levels is too low in the other two plants (*Vitex doniana*, 8.2 µg ml^{-1} and *Ficus capensis*, 12.7 µg ml^{-1}). Moreover it appears that rutin is in very high concentration (6363.0 µg ml^{-1}) in the root barks of *Vitex doniana* and almost absent in the root barks of *Daniella oliveri* and *Ficus capensis.*

Rutin is the most important phenolic compound (11943.0 µg ml^{-1}) in the leaves of *Vitex doniana*, while it is not detected in the leaves of *Daniella oliveri* (Table2).

Antioxidant activity has been evaluated by three tests: PPM, ABTS and DPPH. The phosphomolybdenum assay showed that the highest value was 606.0 (VCEAC) mg /100 g dw for the root barks of Daniella oliveri, in contrast the lowest one was 60.0 mg /100 g dw for the root barks of Ficus capensis (Table3). The great variations observed between the different plants and plant parts could be explain by the fact that PPM essay evaluate the antioxidant activity of polyphenols, and others antioxidant agents which are not phenolic compounds Ruchi et al. (43). To be more accurate about phenolic compounds, ABTS and DPPH tests have been done. ABTS tests showed that the antioxidant activity of the different plants was almost the same. DPPH tests expressed as VCEAC varied from 91.3 mg /100 g dw for the root barks of *Ficus* capensis to 205.5 mg /100 g dw for the stem barks of *Vitex* 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 *Vitex* doniana and the lowest one was 28.4% for the root barks of *Ficus* capensis. The IP % and IC50 (µg ml-1) has been calculated to compare the antioxidant capacity of the plant parts extracts studied 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 to 93.3 %) and IC50, relatively weak (2.7 to 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 was not major contributors to antioxidant activity, since for the total phenolics, the total flavonoids and the total anthocyanins versus antioxidant activity the correlation coefficients $R^2 = 0.0998$, $R^2 = 0.1641$, $R^2 = 0.1135$ 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 scavenger and can be seen as potential source of natural antioxidants for medicinal and commercial uses.

ABBREVIATIONS USED

AAPH:2,2'-azobis (2-amidino-propane)dihydrochloride;ABTS:2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic); DPPH:2,2-diphenyl-1 picrylhydrazyl; IC_{50}:concentration of a polyphenolic in mg/ml required to quench the free radicals by 50%; VCEAC: vitamin C equivalent antioxidant capacity; Do: *Daniella oliveri*; Vd :*Vitex doniana*; Fc : *Ficus capensis*; Rt, temps de retention; M, Masse; Cg: cyanin glucosyl; n.d : not determinate. PTFE; polytetrefluoroethylene; % IP: inhibition percentage; dM, dry mater; DMT: Department of traditional medicine; dw, dry weight; PPM: phosphomolybenum; PBS phosphate buffer solution; SbE: stem bark extract; RbE: root bark extract; LvE: leaves extract.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by a grant from the Ministry of Scientific Research of the Republic Democratic of Congo (N° 132.49/060/KMB/07). Mr. Frédéric Desort (Ethnobotanique et Pharmacologie, Anxiété, Stress oxydant et Bioactivité. Université P. Verlaine-Metz, BP 4102, 57040, Metz (France)) is also acknowledged for technical assistance.

LITERATURE CITED

1. Millner A. Functional foods and health promotion. *Journal of Nutrition* 1999; 129**;** 1395-1397.
2. Marco D, Joseph V, John K. Mechanisms of disease: antioxidants and atherosclerotic heart disease. *New England journal of Medicine* 1997; 6; 408-416.
3. Vision J, Su X, Zubik L, Bose P. Phenol antioxidation quantity and quality in foods: fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001; 11; 5315-5321.
4. Wolfe K.W.X, Liu R.H. Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 3; 609-614.
5. Ndhala A.R, Kasiyamhuru A, Mupure C, Chitindingu K, Benhura M.A, Muchuweti M.. Phenolic composition of *Flacourtia indica*, *Opuntia megacantha* and *sclerocarya birrea*. *Food Chemistry* 2007; 103; 82-87.

6. Wallace G, Fry S. C. Phenolic components of the plant cell wall. *International Review of Cytology* 1994; 151; 229-267.
7. Frankel E.N, Kanner J, German J.B, Parks E, Kinsella J.E. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 1993; 341; 454-457.
8. Kuda T, Tsunekawa M, Goto H, Araki Y. Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. *Journal of Food composition and Analysis* 2005; 18; 625-633.
9. Sharma S, Stutzman J, Kellof G, Steele V. Screening of potential chemo-preventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Research* 1994; 54; 5848-5855.
10. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna, Stocker P, Vidal N. Antioxidant of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 2006; 97; 654-660.
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 Chemistry* 2006; 97; 705-711.
12. Kim D, Ock K, Young J, Hae-Yeon M, Chang Y.L. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51; 6509-6515.
13. Fukumoto L.R, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities and phenolic compounds. *Journal of agricultural and Food Chemistry* 2000; 48; 3597-3604.
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; 364-368.
15. Bouayed J, Djilani A, Rammal H, Dicko A, Younos C, Soulimani R. Quantitative evaluation of the antioxidant properties of *Catha edulis*. *Journal of Life Sciences* 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. *Journa*l *of the Neurological Sciences* 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. *European Journal of Pharmacology*, 2007; 564; 146-149.
18. Ahmadu A. Phytochemical and antimicrobial activities of the *Daniella oliveri* leaves. *Fitoterapia* 2004; 75; 729-32.
19. Balogun E.A. and Adebayo J. Effect of ethanolic extract of *Daniella oliveri* leaves on some cardiovascular indices in rats. *Pharmacognosy Magazine* 2008.
20. El-Mahmood A, Dougharı J, Chanji F. In vitro antibacterial activities of crude extracts of *Nauclea latifolia* and *Daniella oliveri*. *Academic Journals* 2008; 3; 102-105.
21. Onwukaeme N.D. Pharmacological activities of extract of *Daniella oliveri*. *University Jos*, *Fac. Pharmaceutical science jos Nigeria* 1995.
22. Ouattara F. Traitement traditionnelle des infections sexuellement transmissibles au Mali: Etude de la phytochimie et des activités biologiques des *Annona 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 and Behaviors 2007*; 52; 384-390.
25. Balde N.M., Youla A, Balde M. D, Kake A, Diallo M. M, Balde M.A, Maugendre D. Herbal medicine and treatment of diabetes in Africa an example from Guinea. *Masson Paris* 2007; 2; 171-175.
26. Peter A.G., Desmet M. Traditional pharmacognosy and medicine in Africa ethnopharmacological in sub-saharan art objet and utensils. *Journal of Ethnopharmacology* 1999; 63; 1-175.
27. Makkar H.P.S. 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. *Joint FAO/IAEA Division of nuclear techniques in Food and Agriculture,* Vienna, Austria 1999; 1-29.

28. Muchuweti M, Ndhlala, Kasiamhuru A. Analysis of phenolic compounds including tannins, gallotannins and flavanols of Uapaca kirkiana fruit. *Food Chemistry* 2006; 94; 415-419.
29. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 1999; 64; 555-559.
30. Sellappan S. and Akoh C. C. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002b; 50; 2432-2438.
31. Sellappan S. and Akoh C.C. Flavonoids and antioxidant capacity of Georgia-grown vidalia onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002a; 50; 5338-5342.
32. Jimaima L, Craige Trenerry V, Mark W, Naiyana W, Subramanium S, Robert P. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food chemistry* 2007; 101; 1727-1741.
33. Prio R.L, Cao. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: diet and health implications. *Horticultural Science* 2000; 4; 588-592.
34. Arnao M, Cano A, Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food chemistry* 2001; 73; 239-244.
35. Kim D, Ki Won L, Hyong J, Chang Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002; 50; 3713-37 17.
36. Jennifer L, Anne S, Andrew L. Phenolic Composition and Antioxidant of prunes and prunes juice (Prunus domestica). *Journal Agricultural Food Chemistry* 1998; 46; 1247-1252.
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. *Analytical Biochemistry* 1999; 269; 337-341.
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 Chemistry* 1999; 66; 511-517.
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 Chemistry* 2003; 80; 393-397.
42. Chen Y, Wang M, Rosen R, Ho C. 1.1-Diphenilyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging active components from polygonum multiform Thumb. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999; 47; 2226-2228.
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; 465-470.
44. Adesegun S.A, Fajana A, Orabueze C.I, Coker H.A.B. Evaluation of antioxidant properties of *Phaulopis fascisepala* C.B.CI (Acanthaceae). *Evidence Based Complementary and Alternative Medecine* 2007; 1-5.
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 Chemistry* 2000; 70; 391-395.

Annexe III

Publication en révision soumise au journal : Evidence Based Complementary and Alternative Medicine, REF : ECAM -08-0433.R1

Identification, Quantitative Determination, and Antioxidant properties of Polyphenols of Some Malian medicinal plant parts used in folk medicine.

Donatien Kone[1,3] ; François Muanda[1] ; Babakar Diop[3] ; Drissa Diallo[4] ; Rachid Soulimani[2]; Amadou Dicko[1*]

1. Laboratoire de Chimie et de Méthodologies pour l'Environnement. Université Paul Verlaine-Metz. 1, Bd. Arago Technopôle 2000. 57078 Metz (France).
2. Ethnobotanique et Pharmacologie, Anxiété, Stress oxydant et Bioactivité. Université P. Verlaine-Metz, BP 4102, 57040, Metz (France)
3. Faculté des Sciences et Techniques. BP E3206. Université de Bamako (Mali).
4. Département de Médecine Traditionnelle, BP 1746, INRSP Bamako (Mali).

* Corresponding author: Tel : +33 3 87 31 54 31; Fax +33 3 87 37 85 06. Email: dicko@univ-metz.fr (A. Dicko)

Abstract:

Medicinal plants are a source for a wide variety of natural antioxidants. In this study, the total phenolic and flavonoid content of six Malian medicinal plants collected around the district of Bamako in Mali and growing in the same natural conditions, have been quantified and their antioxidant capacity have been evaluated by ABTS and DPPH methods. The amount of total

phenolics and of total flavonoids were ranged from 19.3 ± 0.6 to 223.1 ± 0.2 mg GAE /g dry material and 9 ± 1.6 to 38.9 ± 1.7 mg CE / g dry weight respectively. Antioxidant capacity varied from 39 ± 1.6 to 468 ± 15.2 VCEAC / g dry weight using ABTS test and from 21 ± 1.0 to 361 ± 23.8 mg VCEAC / g dry weight using DPPH test. In these plant parts extracts, the RP-HPLC revealed the presence of *p*-coumaric acid in the roots of *T. macroptera* and chlorogenic acid in the leaves of *A. leiocarpus*, compounds known for their antioxidant properties.
Keywords: Medicinal plants, Phenolics, flavonoids, Antioxidant, RP-HPLC

Introduction

In biological systems during the cellular respiration, reactive oxygen species (ROS) like hydroxyl radical (•OH), superoxide anion ($•O_2^-$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) are formed, as natural consequence of oxidation reactions (1). Reactive oxygen species (ROS) damage living cells causing lipid, protein, and DNA oxidation. They are involved in the development of various diseases such as diabetes, rheumatic disorders (2), aging, cancer, cardiovascular or neurodegenerative disorders (1, 3), malaria, gastric ulcer (4).

Recently, interest has considerably increased in finding naturally occurring antioxidant for use in foods or medicinal materials to replace synthetic antioxidants, which are being restricted due to their side effects such as carcinogenesis (4). Many medicinal plants contain large amounts of antioxidants such as polyphenols, which can play an important role in adsorbing and neutralizing free radicals, quenching singlet and triplet oxygen, or decomposing peroxides. Compounds which are responsible of antioxidant activity could be used for the prevention and treatment of free radical-related disorders (5). Indeed, the consumption of antioxidants has been related to prevent different diseases such as neurological degeneration, inflammatory disorders, coronary diseases, aging and cancers, (6). Hence, the studies on natural antioxidants have gained increasingly greater importance.

An enormous variety of plants has been studied for new sources of natural antioxidants (7- 9). For the first time, we report here the antioxidant properties of extracts of the following six Malian folk medicine plants previously studied for their biological activities: *Anogeissus leiocarpus* (DC.) Guill. et Perrot (Combretaceae), *Cissus populnea* Guill. et Perr. (Vitidaceae), *Mitragyna inermis* (Willd.) O. Ktze. (Rubiaceae), *Terminalia macroptera* Guill. et Perrott (Combretaceae), *Vepris heterophylla* R. Let. (Rutaceae) and *Zizyphus mucronata*

Willd. (Rhamnaceae). These plants were chosen for their traditional utilizations in the treatment of inflammatory diseases such as: Malaria, Oedema, Arthritis, rheumatism, ulcer, gingivitis, conjunctivitis (10-13). C. Vonthron-Sénécheau et *al*. (14) report the *in vitro* antiplasmodial activity of extracts of leaves of *Anogeissus leiocarpus*, traditionally used to treat malaria, and observe an inhibition of the growth of *Plasmodium falciparum*. *Cissus populnea* is a plant associated with a myriad of medicinal uses in different parts of the world. M.A. Geidam, G.I. Adoga, F.A. Sanda (15) have reported evidence-proves of effects of aqueous stem bark extract of *Cissus populnea* on some serum enzymes in alloxane induced diabetic rats and have attributed hypoglycaemic properties to these extracts, under experimental protocol involving intragastric administration to rats. Aqueous extract from *Mitragyna inermis* has been used in traditional healers for the treatment of variety of diseases, particularly for hepatic illness, malaria and hypertention. Recent studies, undertaken by S. Ouédraogo et *al*. (16) on cardiac and vascular responses in isolated heart and blood vessels from coronary and tail arteries of rat, demonstrate hypotensive, cardiotropic and vasodilatory properties of bark aqueous extract from *Mitragyna inermis*. In the course of new antimalarial compounds and ethnobotanical survey, S. Sanon et *al*. (17) have selected *Terminalia macroptera* for an antiplasmodial screening. They observe a significant activity (IC_{50} = 1µg/ml) with aqueous extract of *Terminalia macroptera* tested on *Plasmodium falciparum* chlorine-resistant W2 strain. C. Moulis, I. Fouraste, A. Keita, J-M. Bessiere (18) have studied the volatile constituents of leaves of *Vepris heterophylla* and found that geijerene and pregeijerene are the main constituents among thirty-three compounds identified by of capillary GC. *Zyzyphus mucronata* is an herbal remedy traditionally applied for treatment of *Schistosomiasis*. Recently, P. Mølgaard et *al.* (19) report the good activity of extracts of root bark from *Zyzyphus mucronata* tested *in vitro* against tapeworms and schistosomules.

To the best of our knowledge, there are no previous reports concerning *in vitro* antioxidant activities of these plant parts extracts. The purposes of this study were to determine the total phenolic and the total flavonoid contents, to evaluate their antioxidant activities using 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) and 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) tests, and to identify and to quantify some polyphenolics using a RP-HPLC coupled to an UV detector.

Materials and methods

Plant material

Six plants have been evaluated in this study, namely *Anogeissus leiocarpus* (DC.) Guill. et Perrot (Combretaceae), *Cissus populnea* Guill. et Perr. (Vitidaceae), *Mitragyna inermis* (Willd.) O. Ktze. (Rubiaceae), *Terminalia macroptera* Guill. et Perrott (Combretaceae), *Vepris heterophylla* R. Let. (Rutaceae) and *Zizyphus mucronata* Willd. (Rhamnaceae). The plant material collected around Bamako district in December 2005 had been authentified by the National Institute for Research in Public Health of Bamako.

Chemical reagents

Standards: Catechin and Gallic acid, 3,4 dihydroxybenzoic acid (protocatechuic acid), chlorogenic acid, rutin were purchased from Across Organics. p-acoumaric acid, isovitexin and quercetin 3-ß-D-glucoside were obtained from Fluka Chemical Company. All commercial standards were of the highest analytical grade.

Aluminium chloride ($AlCl_3$), Ascorbic acid, 2-2'-Azino-bis (3ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), PBS buffer, 2-2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dichloride (AAPH), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, Sodium carbonate (Na_2CO_3), caffeic acid and Sodium nitrite ($NaNO_2$), stable free radical DPPH were purchased from Sigma Chemical Company. All other reagents were of analytical grade.

Preparation of extracts

Each plant material was dried in dark ventilated room for 5–7 days and then powdered.

Extraction of samples was performed by the ultrasound-assisted method (20-21). The air dried plant material (10 g) was extracted using 100 mL of 80% aqueous methanol. The mixture of freeze-dried powder and 80% aqueous methanol was sonicated for 20 min with continual nitrogen gas purging. The mixture was filtered through Whatman N°2 filter paper and rinsing with 50 mL of 100% methanol. Extraction of the residue was repeated using the same conditions. The two filtrates were combined and transferred into a 1 L evaporating flask with an additional 50 mL of 80% aqueous methanol. The solvent was evaporated using a rotary evaporator at 40 °C. The remaining extract concentrate was first dissolved in 50 mL of 100% methanol and diluted to a final volume of 100 mL using distilled deionized water (ddH_2O).

The mixture was centrifuged at 1500g for 20 min and stored at -4°C until analyses were performed.

Determination of the total phenolic and the total flavonoid contents

The concentration of total phenolics was measured by the method described by (21). Briefly, an aliquot (1 mL) of appropriately diluted extracts or standard solutions of gallic acid was added to a 25 mL volumetric flask containing 9 mL of ddH_2O. A reagent blank using ddH_2O was prepared. One mililiter of Folin & Ciocalteu's phenol reagent was added to the mixture and shaken. After 5 min, 10 mL of 7% Na_2CO_3 solution was added with mixing. The solution was then immediately diluted to volume (25 mL) with ddH2O and mixed thoroughly. After incubation for 90 min at 23 °C, the absorbance versus prepared blank was read at 750 nm (Cary 50 Scan UV-Visible apparatus). Total phenolic contents of plant parts were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) / g dry weight. All samples were analyzed in triplicate at least.

Total flavonoids were measured by a colorimetric assay developed by (22). A 1 mL aliquot of appropriately diluted sample or standard solutions of catechin was added to a 10 mL volumetric flask containing 4 mL ddH_2O. At zero time, 0.3 mL 5% $NaNO_2$ was added to the flask. After 5 min, 0.3 mL 10% $AlCl_3$ was added. At 6 min, 2 mL of 1 M NaOH was added to the mixture. Immediately, the reaction flask was diluted to volume with the addition of 2.4 mL of ddH2O and thoroughly mixed. Absorbance of the mixture was determined at 510 nm (Cary 50 Scan UV-Visible apparatus) versus prepared water blank. Total flavonoids of plant parts were expressed as mg / g dry weight of catechin equivalents (CE). Samples were analyzed in triplicate at least.

Determination of Total antioxidant activity

Various methods have been introduced for the measurement of the total antioxidant capacity (23, 4). In this study antioxidant activity was estimated by the method previously described (20-21). The *in vitro* antioxidant activities have been determined in two antioxidant tests. Among the different methods permitting to evaluate the antioxidant activities these two simple stable radical chromogens have a high level of sensitivity, and allow for analysis of a large number of samples in a timely fashion (20). It has been reported that no single antioxidant method can provide a complete picture of the antioxidant capacity of most complex natural products (24). Antioxidant capacity is expressed by mg of vitamin C equivalent (mg VCE) per g dry weight.

ABTS radical anion scavenging activity

ABTS radical anions were used, according to the method of (21). In brief, 1.0 mM of 2, 2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH), a radical initiator, was mixed with 2.5 mM ABTS in phosphate-buffered saline (pH 7.4). The mixed solution was heated in a water bath at 68 °C for 13 min. The resulting blue-green ABTS solution was adjusted to the absorbance of 0.650 ± 0.020 at 734 nm with additional phosphate-buffered saline. Twenty microliters of sample was added to 980 µL of the ABTS radical solution. The mixture was incubated in a 37°C water bath under restricted light for 10 min. A control (20 µL 50% methanol and 980 mL of ABTS radical solution) was run with each serie of samples. The decrease of absorbance at 734 nm was measured (Cary 50 Scan UV-Visible apparatus) at an endpoint of 10 min. Total antioxidant capacity of plant parts, was expressed as mg / g dry weight of vitamin C equivalents (VCEAC). The radical stock solution was freshly prepared, daily. All tested samples were replicated three times at least.

DPPH radical scavenging activity.

DPPH radical scavenging activity was determined according to the method of Kim et al. (20). DPPH radical (100 µM) was dissolved in 80% aqueous methanol. The plant extracts solutions, 0.1 mL, were added to 2.9 mL of the methanolic DPPH solution. The mixture was shaken vigorously and allowed to stand at 23 °C in the dark for 30 min. The decrease in absorbance of the resulting solution was monitored at 517 nm (Cary 50 Scan UV-Visible apparatus) at 30 min. A control consisted of 0.1 mL of 50% aqueous methanol and 2.9 mL of DPPH solution. The DPPH radical scavenging activity of plant extracts was expressed as mg per g dry weight of vitamin C equivalents VCEAC in 30 min reaction time. The radical stock solution was prepared fresh daily. All tested samples were replicated three times at least.

HPLC analysis

HPLC analysis was conducted with a Water 600 Pump apparatus equipped with a quaternary solvent delivery system, a Rheodyne injector with 20 µL sample loop and a UV detector Waters 486 Tunable fixed at 280 nm. Alltech Intertsil ODS-5 C18 reversed phase column (150 mm, 4.6 mm, 5µm particle size) was used throughout this study. The mobile phase under a flow rate of 1 mL /min. was a gradient elution adapted from (25, 32) of: A =50 mM $NH_4H_2PO_4$ at pH 2.60; B = 80% acetonitrile, 20 %A and C = 200 mM O-phosphoric acid at pH 1.50 (Table 1).

Table 1 : HPLC solvent gradient elution program

Times (min)	%A	%B	%C
0	100	0	0
5	65	12	23
11	0	15	85
29	0	22	78
36	0	25	75
42	0	25	75
55	0	35	65
60	0	50	50
70	0	100	0
75	100	0	0

Solvent composition: A =50 mM NH4H2PO4 at pH 2.60; B = 80% acetonitrile, 20 %A and C = 200 mM O-phosphoric acid at pH 1.50

Standards of five phenolic acids and two flavonoids were dissolved in 50% MeOH to make a concentration of 0.5; 0.25; 0.125 and 0.10 mg/mL. The plant part extracts and standard solutions were filtered through 0.45-µm olefin polymer (OP) syringe-tip filters.

Then phenolic acids and flavonoids contained in our extracts were identified by matching the retention time against their corresponding standard (fig.1). Quantitative analysis was made according to the linear calibration curves of standard compounds. Three replications were made at list for each standard and plant extract.

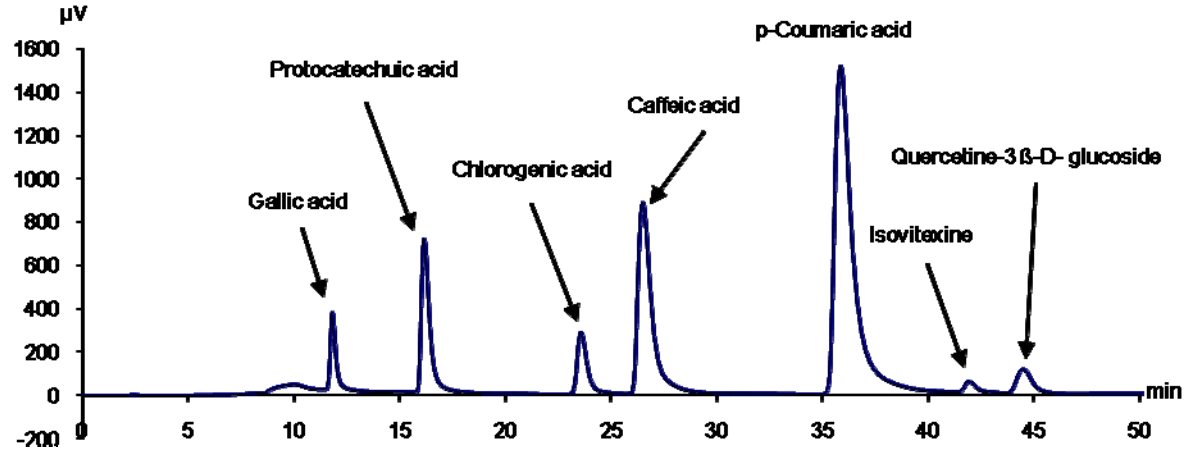


Fig. 1: Chromatogram of standards (1mg/ml)

Statistical analysis

Each of the measurements described above was achieved in at least three replicate experiments and the data were presented as the mean ± standard deviation. Data were reported as mean ± SEM. All statistical analyses were carried out using the Statview® 4.5 statistical package (Abacus Concepts, Inc).

Results

The results of the colorimetric analysis of total phenolics expressed as Gallic Acid Equivalents (GAE) and those of total flavonoids expressed as Catechine Equivalents (CE) are given (Table 2).

Table 2: Total phenolic and total flavonoids contents of the plant parts with their respective antioxidant capacity

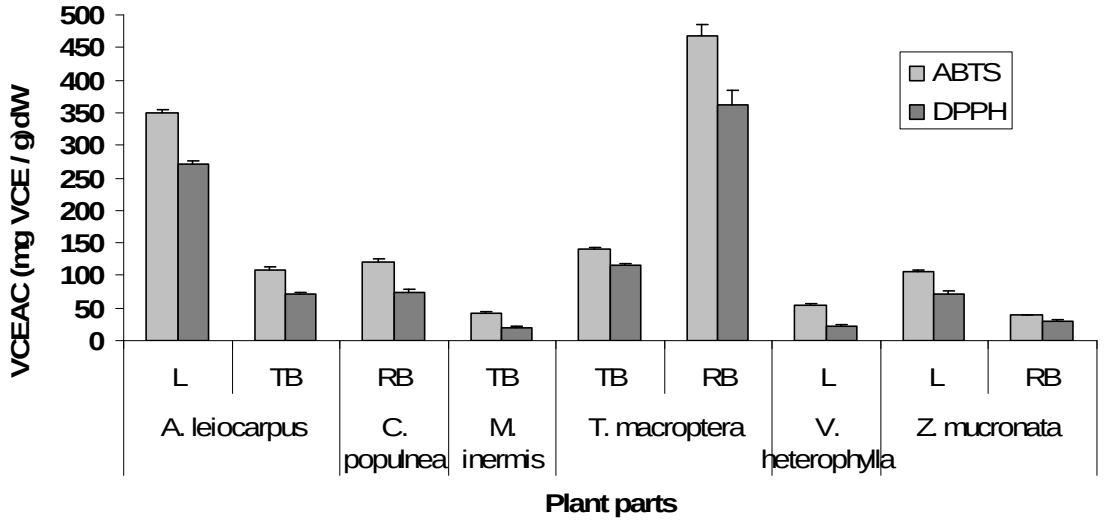
Plants name	Plant parts	Total phenolics (mg GAE)	Total Flavonoids (mg CE)	Antioxidant Capacity (mg VCE)	
				ABTS assay	DPPH assay
A. leiocarpus	L	223.1 ± 0.2	38.9 ± 1.7	350 ± 5.0	272 ± 3.3
	TB	26.5 ± 0.4	10.3 ± 0.3	108 ± 5.7	71 ± 2.1
C. populnea	RB	76.4 ± 1.1	27.6 ± 1.2	119 ± 4.6	75 ± 3.7
M. inermis	TB	19.5 ± 0.7	11.1 ± 1.3	42 ± 2.4	21 ± 1.0
T. macroptera	TB	48.5 ± 1.3	14.2 ±1.4	141 ± 2.4	116 ± 2.4
	RB	219.6 ± 0.4	33.1 ± 1.3	468 ± 15.2	361 ± 23.8
V. heterophylla	L	51.5 ± 0.5	9.3 ± 0.9	55 ± 1,9	22 ± 1.5
Z. mucronata	L	52.2 ± 0.5	14.4 ± 0.8	106 ± 2.8	72 ± 3.7
	RB	19.3 ± 0.6	9 ± 1.6	39 ± 1.6	29 ± 3.3

L= leaves; TB= trunk barks; RB= root bark.Total phenolics expressed as gallic acid equivalent (GAE), total flavonoids expressed as catechin equivalent (CE), total antioxidant activities for both ABTS test and DPPH test expressed as vitamin C equivalent (VCE) per g dry weight.

Values are means of triplicate determination ± standard deviation.

The total phenolic compounds which are present in plant materials were ranged from 19.3 ± 0.6 to 223.1 ± 0.2 mg GAE /g dry material and the total amount of flavonoids varied from 9 ± 1.6 to 38.9 ± 1.7 mg CE / g dry weight.

The antioxidant activity was studied using ABTS essay, the corresponding results were collected in (table 2) and illustrated in (fig.2).



Values are means of triplicate determination ± standard deviation. L= leaves; TB= trunk barks; RB= root barks

Fig. 2: Vitamin C equivalent antioxidant capacity (mg VCE per g dry weight) of some Malian medicinal plant parts using ABTS test and DPPH test.

The antioxidant activity using ABTS varied from 39 mg to 468 mg VCE per g dry weight. The overall antioxidant capacity of plant parts in VCEAC which was evaluated by ABTS assay was in the following order: *T. macroptera* root bark > *A. leiocarpus* leaves > *T. macroptera* trunk bark > *C. populnea* root bark > *A. leiocarpus* trunk bark > *Z. mucronata* leaves > *V. heterophylla* leaves > *M. inermis* trunk bark > *Z. mucronata* root bark.

The antioxidant activity using DPPH ranged from 21 mg to 361 mg VCE per g dry weight. The overall antioxidant capacity of plant parts in VCEAC which was evaluated by DPPH assay decreased in the following order: *T. macroptera* root bark > *A. leiocarpus* leaves >*T. macroptera* trunk bark > *C. populnea* root bark > *Z. mucronata* leaves ≈ *A. leiocarpus* trunk bark > *Z. mucronata* root bark > *V. heterophylla* leaves >*M. inermis* trunk bark.

High-performance liquid chromatography (HPLC) results clearly show the following points: the most encountered standards in high concentration in these extracts were protocatechuic acid (792.00 - 7.93 mg / 100g dry weight), *p*-coumaric acid (1833.56 - 4.2 mg / 100g dry weight) gallic acid (69.00 - 5.14 mg / 100g dry weight) and chlorogenic acid (2286.08 - 62.09 mg / 100g dry weight), whereas the Caffeic acid (149.86 -43.46 mg / 100g dry weight), isovitexin (182.22 - 31.46 mg / 100g dry weight) and quercetin-3-β-D-glucoside (83.53 - 70.89 mg /100g dry weight) were found in low concentration. It should be noted that the trunk and root barks of *T macroptera* and the leaves of *V. heterophylla* contain the greatest number of standards, whereas no standard was detected for the root barks of *Z. mucronat*a. The whole of these results was summarised in table 3.

Discussion

The leaves of *A. leiocarpus* had the highest total phenolic contents, which was 4- fold higher than those of the leaves of *V. heterophylla*. The lowest total phenolic and total flavonoid contents were found in the leaves of *V. heterophylla*. In the trunk barks of *T. macroptera*, the total phenolics and the total flavonoids were ranked in first, followed by *A. leiocarpus* then *M. inermis* ones. The amount of phenolic and flavonoid compounds were found in high concentration first in the root barks of *T. macroptera* followed by the root barks of *C. populnea.* In contrast it appeared that the lowest amount of flavonoids was for the root barks of *Z. mucronata*. The total phenolic and the total flavonoid contents of the root barks of *T. macroptera* were 11-fold and 4-fold greater than those of *Z. mucronata*, respectively.

Results obtained by ABTS and DPPH tests, showed that the antioxidant activity order for these different plant parts was approximately similar in both assays. However, the antioxidant capacity using DPPH compared to that obtained by ABTS essay was underestimated about 33%. The same fact was also observed by Arnao, M.B. (26) and Delgado-Andrade, C. et *al*. (23). These authors explain it by the fact that DPPH dissolves in alcoholic media only. In contrast ABTS radicals are solubilized in aqueous and in organic media, in which the

Table 3: Concentrations of flavonoids and phenolic acids in the medicinal traditional plant parts (mg / 100g of dry material)

Plant	Plant parts	Gallic Acid	Protocatechuic Acid	Chlorogenic Acid	Caffeic Acid	*p*-coumaric Acid	Isovitexin	Quercetin
Anogeissus leiocarpus	L	49.1 ± 3.5	67.6 ± 0.3	2286 ± 80	nd	nd	nd	nd
	T B	5.1 ± 0.2	35.5 ± 0.2	nd	nd	221 ± 20	nd	nd
Cissus populnea	R B	nd	26 ± 1.2	62.1 ± 0.5	nd	4.2 ± 0.2	nd	70.9 ± 0.5
Mitragyna inermis	T B	5.9 ± 0.16	53.2 ± 1.2	nd	nd	7.5 ±0.6	nd	nd
Terminalia macroptera	T B	16.4 ± 2.2	7.9 ± 1.3	67 ± 2	nd	59.3 ± 2.2	182 ± 42	nd
	R B	69 ± 1.4	792 ± 7	113.4 ± 1.4	149.9 ± 2.6	1833 ± 4.6	nd	nd
Vepris heterophylla	L	7.5 ± 0.44	10.1 ± 0.7	79 ± 1.7	nd	31.9 ± 2.15	31.5 ± 1.1	nd
Zizyphus mucronata	L	nd	53 ± 0.4	683 ± 20.1	43.5 ±1.4	nd	nd	nd

L= leaves; TB= trunk barks; RB= root barks; nd= not detected.

Values are means of triplicate determination at least ± standard deviation.

antioxidant activity measured is due to the hydrophilic and lipophilic nature of the compounds. In addition, at wavelengths (515 nm), near the visible region where the antioxidant activity is measured, interferences occur with DPPH coloration.

In this study, we found that phenolic compounds are major contributors to antioxidant activity, since total phenolics and antioxidant activity showed a good correlation with a correlation coefficient of R^2=0.9208 (Fig.3). However, we note that the trunk barks of *A. leiocarpus* exhibit a high antioxidant activity and a low level of total phenol antioxidant.

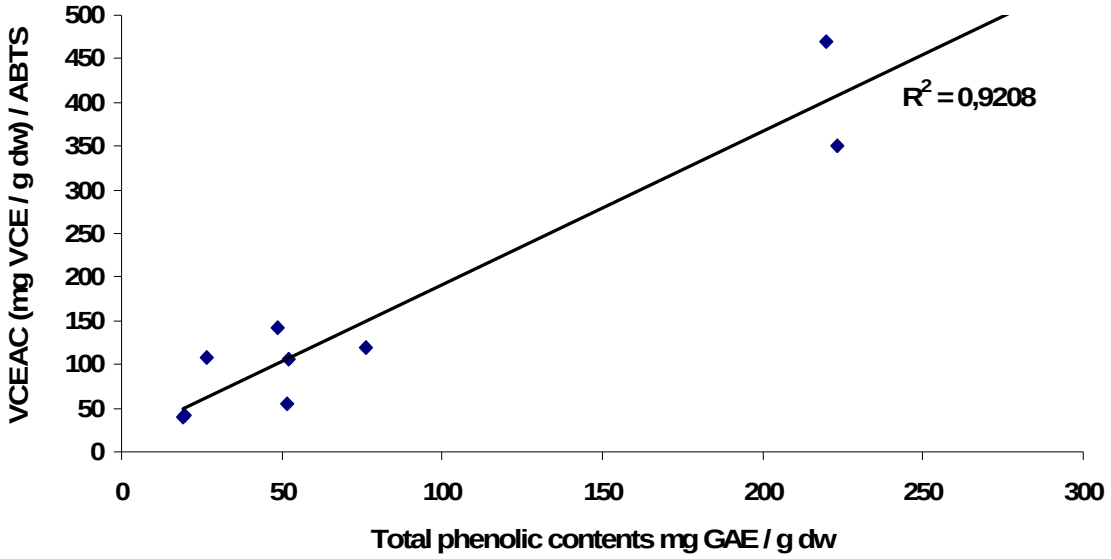


Fig. 3: Linear correlation between antioxidant activity and total phenolic contents of 6 Malian medicinal traditional plant parts with ABTS test.

These results showing that these plant parts having a good antioxidant activity are particularly interesting since the antioxidant agents would induce analgesic, anticarcinogenic, anti-inflammatory, antithrombotic, immune modulating and anti-atherogenic effects (6).

The results of HPLC analysis were in accordance with those previously reported in the literature. The phytochemical investigations of the different parts of *T. macroptera* led to the isolation of several *C*- and *O*-glycosyl flavones, chlorogenic acid, quercetin, gallic acid (27). Chyau,C-C et *al.* (28) identified 3,4-dihydroxybenzoic acid (protocatechuic acid), *p*-coumaric acid, gallic acid from the leaves of *T. catappa*. Moreover gallic acid was also found in the trunk barks of *A. latifolia* (29), these plants belong to the same family. Protocatechuic acid (3,4-dihydroxybenzoic acid) was found in *Mitragyna rotundifolia* (30). Ojekale et *al.* (31) have reported the presence of flavonoids in *C. populnea*. In this study the presence of isovitexin in the leaves of *V. heterophylla* was identified and quantified.

Conclusion

Phenolic contents, flavonoid contents and the antioxidant activity linked to six traditional medicinal plants have been determined. The highly phenolic phytochemical compounds and the observed efficient antioxidant activity enabled us to separate, identify and quantify some phenolic acids and two flavonoids known for their antioxidant activities by HPLC analysis. It was found that this method is reliable and avoids the use of UV spectroscopy one.

The amount of phenolics flavonoids and related total antioxidant activity of six Malian medicinal plant parts have been evaluated. Antioxidant activity varied greatly among the different plant parts and was highly correlated with the polyphenolic contents. Indeed, we take an interest in the leaves of *A.Leocarpus* and in the root barks of *T.Macroptera*, since they exhibited important antioxidant activities and could be attractive sources of natural antioxidants. Moreover, this comparative study permits to identify and determine by HPLC, five individual phenolic acids and two flavonids which are mainly at the origin of the antioxidant activity in these studied plant parts.

Acknowledgement

The authors are thankful to the Service de Cooperation d'Actions Culturelles (SCAC) of the French embassy in Mali for its financial support.

References

1) Tarnawski M, Depta K, Grejciun D, Szelepin B. HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract - a natural immunomodulator. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006; 41: 182–188.

2) Luximon-Ramma A, Bahorun T, Soobrattee MA, and Aruoma OI. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula. J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 5042-5047.

3) Ju EM, Lee SE, Hwang HJ, Kim JH. Antioxidant and anticancer activity of extract from *Betula platyphylla* var. japonica. *Life Sciences* 2004; 74: 1013–1026.

4) Gülçin I, Mshvildadze V, Gepdiremen A, Elias R. Screening of antiradical and antioxidant activity of monodesmosides and crude extract from Leontice smirnowii tuber. *Phytomedicine* 2006; 13: 343–351.

5) Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 2006; 97, 654–660.

6) Gómez-Caravaca AM, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006; 41: 1220–1234.

7) Lee KY, Weintraub ST, Yu BP. Isolation and identification of a phenolic antioxidant from *Aloe barbadensis*. *Free Radical Biology & Medicine* 2000; 28: 261–265.

8) Cakir A, Mavi A, Yıldırım A, Duru ME, Harmandar M, Kazaz C. Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fractionation. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 87: 73–83.

9) Kumaran A, Karunakaran R. Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry* 2007; 100: 356–361.

10) Burkill HM. *Useful plants of West Tropical Africa,* second ed. Royal Botanic Gardens, Kew, London 1985; 1: 960, 1997; 4: 969, 2000; 5:686.

11) Malgras D. *Arbres et arbustes guérisseurs des savanes maliennes*. Edits Karthala et ACCT, Paris 1992 ; 474.

12) Arbonnier M. *Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest*. 2 ème Edits CIRAD –UICN 2002 ; 574.

13) Inngjerdingen K, Nergard CS, Diallo D, Mounkoro PP, Paulsen BS. An Ethnopharmacological survey of plants used for wounds healing in dogoland, Mali, West Africa. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 92: 233 – 244.

14) Vonthron-Sénécheau C, Weniger B, Ouattara M, Tra Bi F, Kamenan A, Lobstein A, Brun R, Anton R. In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of

ethnobotanically selected Ivorian plants. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 87: 221 – 225.

15) Geidam M.A, Adoga G.I, Sanda F.A. Effects of aqueous stem bark extract of *Cissus populnea* on some serum enzymes in normal and alloxan induced diabetic rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2004; 7: 1427 – 1429.

16) Ouédraogo S, Ranaivo H.R, Ndiaye M, Kaboré Z.I, Guissou I.P, Bucher B, Andriantsitohaina R. Cardiovascular properties of aqueous extract from Mitragyna inermis. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 93: 345 – 350.

17) Conrad J, Vogler B, Klaiber I, Roos G, Walter U, Kraus W. Two triterpene esters from *Terminalia macroptera* bark. *Phytochemistry* 1998; 48: 647 – 650.

18) Moulis C, Fouraste I, Keita A, Bessiere J.M. Composition of leaf essential oil from *Vepris heterophylla*. *Flavour and Flagrance Journal* 1994; 9: 35 – 37.

19) Mølgaard P, Nielsen S.B, Rasmussen D.E, Drummond R.B, Makaza N, Andreassen J. Anthelmintic screening of Zimbabwean plants traditionally used against schistosomiasis. *Journal of Ethnopharmacology* 2001; 74: 257 – 264.

20) Kim DO, Lee KW, Lee HJ, Lee C.Y. Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 3713-3717.

21) Kim DO, Seung WJ, Lee CY. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry* 2003; 81: 321–326.

22) Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 1999; 64: 555–559.

23) Delgado-Andrade C, Rufiaän- Henares JA, Morales F.J. Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 7832-7836.

24) Ozgen M, Reese RN, Tulio JR AZ, Scheerens JC, Miller AR. Modified 2, 2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2, 2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 1151-1157.

25) Nakatani N, Kayano S, Kikuzaki H, Sumino K, Katagiri K, Mitani T. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.) *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 5512-5516.

26) Arnao MB. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology* 2000; 11: 419 – 421.

27) Silva O, Gomes ET, Wolfender JL, Marston A, Hostettmann K. Application of High Performance Liquid Chromatography coupled with Ultraviolet spectroscopy and Electrospray Mass Spectrometry to the characterisation of Ellagitannins from *Terminalia macroptera* Roots. *Pharmaceutical Research* 2000; 17: 1396-1401.

28) Chyau CC, Ko PT, Mau JL. Antioxidant properties of aqueous extracts from *Terminalia catappa* leaves. *LWT* 2006; 39: 1099–1108.

29) Govindarajan R, Vijayakumar M, Rao CV, Shirwaikar A, Mehrotra S, Pushpangadan P. Healing potential of *Anogeissus latifolia* for dermal wounds in rats. *Acta Pharmaceutica*. 2004; 54: 331-338.

30) Kang W, Hao X. Triterpenoid saponins from *Mitragyna rotundifolia*. *Biochemical Systematics and Ecology* 2006; 34: 585-587.

31) Ojekale AB, Lawal OA, Lasisi AK, Adeleke TI. Phytochemisty and spermatogenic potentials of aqueous extract of *Cissus populnea* (Guill. and Per) stem bark. *Thescientificworldjournal*. 2006; 6: 2140-2146.

32) Bouayed J, Rammal H, Dicko A, Younos C, Soulimani R. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects**.** *Journal of the Neurological Sciences*. 2007; 262: 77–84.

RESUME

Ce travail a porté sur la documentation des utilisations traditionnelles de six plantes médicinales maliennes, leur étude phytochimique ainsi que leur activité antioxydante. Une enquête ethnobotanique a été réalisée à l'aide d'un questionnaire semi-structuré pour la détermination des différentes utilisations médicinales de ces plantes et a montré que quatre de ces plantes seraient utilisées dans le traitement du paludisme et les deux autres, dans le traitement des affections douloureuses et inflammatoires ; ces dernières seraient d'ailleurs menacées de disparition. L'étude phytochimique a concerné d'une part l'isolement de deux alcaloïdes de *V. heterophylla* dont l'élucidation structurale à partir des techniques spectrales nous a permis de leur attribuer les formules de kokusaginine (a1) et de montrifoline (a2) et d'une part la détermination de leurs teneurs en polyphénols totaux à travers une méthode spectrophotométrique ainsi qu'une caractérisation en polyphénols à l'aide d'une analyse HPLC. Les résultats de cette quantification et ceux de l'activité antioxydante déterminée par le test d'ABTS et de DPPH ont montré clairement le potentiel biologique de ces plantes et pourraient justifier leur usage dans la médecine traditionnelle malienne.

Mots clés : plantes médicinales, enquête ethnobotanique, polyphénols, analyse colorimétrique et HPLC, activité antioxydante.

Abstract

This work concerned the documentation of the traditional uses of six Malian medicinal plants, their photochemistry study and their antioxidant activity. Ethnobotanical survey was carried out using a semi-structured questionnaire for the determination of the various medicinal uses of these plants and showed that four of these plants would be used in the treatment of malaria and the two others, in the treatment of the painful and inflammatory affections; these last would be threatened of disappearance. The photochemistry study related to on the one hand the isolation of two alkaloids from *V heterophylla* their structures were elucidated using ^{1}H- and ^{13}C-NMR techniques and others spectral techniques as kokusaginine (a1) and montrifoline (a2) and on the one hand the determination of their contents total polyphenols through a spectrophotometric method as well as a polyphenol characterization using HPLC analysis. The results of this quantification and those of the antioxidant activity determined by ABTS and DPPH tests clearly showed the biological potential of these plants and could support their use in Malian traditional medicine.

Key words: medicinal plants, ethnobotanical survey, polyphenols, colorimetric and HPLC analysis, antioxidant activity.