

UNIVERSITE OUAGA I Pr Joseph KI-ZERBO

**Ecole Doctorale
Sciences et Technologies**

**Laboratoire de Biochimie Alimentaire,
Enzymologie, Biotechnologie Industrielle et
Bioinformatique (BAEBIB)**



N° d'ordre : 473

Thèse Présentée par

M. Crépin IBINGOU DIBALA

Maître ès-Sciences

Diplômé d'Etudes Approfondies en Biochimie/Substances naturelles

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Ouaga I Pr Joseph KI-ZERBO

Option : Sciences Biologiques appliquées

Spécialité : Biochimie

**COMPOSÉS PHÉNOLIQUES ET PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DE DEUX
PLANTES DE LA PHARMACOPÉE TRADITIONNELLE UTILISÉES CONTRE
LES TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES AU BURKINA FASO**

Soutenue le 13 Janvier 2017 devant le jury composé de :

Président : Pr Alfred S. TRAORE, Professeur Titulaire, Université Ouaga I-Pr Joseph KI-ZERBO, Burkina Faso

Membres :

- Pr Eloi PALE, Professeur Titulaire, Université Ouaga I-Pr Joseph KI-ZERBO, Burkina Faso (Rapporteur)
- Dr. Pierre Polycarpe KAYODE, Maître de conférences, Université Abomey-Calavi, Bénin (Rapporteur)
- Dr. Martin KIENDREBEOGO, Maître de Conférences, Université Ouaga I-Pr Joseph KI-ZERBO
- Pr Mamoudou H. DICKO, Professeur Titulaire, Université Ouaga I-Pr Joseph KI-ZERBO, Burkina Faso (**Directeur de thèse**)

DEDICACE

Je dédie cette thèse

A mon feu père et ma mère

En témoignage de ma profonde affection et de ma reconnaissance infinie.

A mes sœurs et frères

Avec toute l'affection qui nous unit.

A mon épouse Line Gisèle DIBALA, mes enfants, Bastien, Elena et Lorenz pour leurs soutiens et encouragements.

Aux corsairiennes et corsairiens

En témoignage de ma sincère gratitude.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biochimie Alimentaire, Enzymologie, Biotechnologie Industrielle et Bioinformatique (BAEBIB) à l'UFR/SVT de l'Université de Ouagadougou. Ce travail de thèse de Doctorat de l'Université Ouaga I Pr Joseph Ki-Zerbo (PhD) a été réalisé sous la direction du Professeur Mamoudou H. DICKO, qui a œuvré à ma mise à disposition au Département de Biochimie/Microbiologie de l'UFR/SVT et qui a accepté également mon inscription en thèse. Qu'il trouve à travers ce mémoire l'expression de ma profonde gratitude.

Nos remerciements vont également à l'endroit :

- du Pr Nicolas Barro, je vous suis reconnaissant de m'avoir appuyé pour le volet microbiologique de ce travail.
- du Docteur Maurice OUEDRAOGO, Maître de Conférences, pour sa participation à l'élaboration de ce travail ;
- du Docteur Martin KIENDREBEOGO, Maître de Conférences, pour sa disponibilité, ses conseils et ses encouragements tout au long de ce travail ;
- du Docteur Kiessoun KONATE, Maître-assistant au centre universitaire de Dédougou pour sa contribution à la réalisation de ce travail ;
- du Docteur Mamounata DIAO/BAKO, Maître-assistante pour sa collaboration et ses encouragements ;
- du Docteur Arsène Yonly, Maître de conférences, pour son assistance technique pour la réalisation de ce travail ;
- du Docteur Issa OUATTARA, Assistant, pour ses suggestions et encouragements ;
- du Docteur Magloire BOUNGOU, Maître-assistant pour son soutien matériel et ses encouragements ;
- du Docteur Donatien KABORE, Chargé de recherche, DTA/IRSAT/CNRST pour sa contribution pour la réalisation de ce travail ;
- des rapporteurs (Pr Eloi PALE et Dr Polycarpe Pierre KAYODE) et le président du jury, Pr Alfred S. TRAORE, pour leur disponibilité et l'intérêt qu'ils portent à ce travail en acceptant de le juger ;
- des ami (e)s Dr Maruis SOMDA, Dr Checkna ZONGO, Dr Moussa ZONGO, Dr Balé BAYALA, Dr Marcel Daba BENGALY, Dr Moussa COMPAORE, Dr Nabelé OUATTARA, Dr Samson GUENNE, Dr Patrice ZERBO, Dr Esther HIEN, Ahmed FABRE, Pepin SOME, Roseline Bienvenue BAYILI, Alain OUEDRAOGO, Allassane OUEDRAOGO, Jean Baptiste OUALBEOGO, pour leurs encouragements.

Nous remercions également tous ceux qui d'une manière ou d'une autre ont contribué à la réalisation de ce travail.

ABREVIATIONS

Sigles	Significations
ABTS :	Radical cation 2, 2 azinobis-éthylbenzothiazoline-6-sulphonatele
DMSO :	Diméthyle sulfo-oxyde
DPPH :	Radical stable [2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl]
FAE Lag :	Fraction acétate d'éthyle de <i>Laggera aurita</i> L.
FAE Oci:	Fraction acétate d'éthyle d' <i>Ocimum americanum</i> L.
FAE :	Fraction acétate d'éthyle
FB Lag:	Fraction butanolique de <i>Laggera aurita</i> L.
FB Oci:	Fraction butanolique d' <i>Ocimum americanum</i> L.
FCR :	Réactif de Folin-ciocalteu
FDCM Lag :	Fraction dichlorométhane de <i>Laggera aurita</i> L.
FDCM Oci :	Fraction dichloromethane d' <i>Ocimum americanum</i> L.
FDCM :	Fraction dichlorométhane
FEP Lag :	Fraction éther de pétrole de <i>Laggera aurita</i> L.
FEP Oci :	Fraction éther de pétrole d' <i>Ocimum americanum</i> L.
FRAP :	Ferric reducing antioxydant power
GPX :	Glutathion peroxydases
INT:	Iodonitrotetrazolium
POX :	Peroxydases
PRX :	Péroxyredoxines
ROS:	Reactive Oxygen Species
SOD :	Superoxydes dismutases
Trolox :	Analogue de la vitamine E
UFC :	Unité Formatrice de Colonie

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	ii
ABREVIATIONS	iii
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
RESUME	x
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : BIBLIOGRAPHIE	6
I. Description du matériel végétal	7
I.1. <i>Laggera aurita</i> (L.f.) Berth. Ox C.B. Clark	7
I.1.1. Aspects Botaniques	7
I.1.2. Données phytochimiques	9
I.2. <i>Ocimum americanum</i> L	10
I.2.1. Aspect botanique	10
I.2.2. Données phytochimiques	12
II. Description des composés phénoliques	13
II.1. Définition des composés phénoliques	13
II.2. Structures et classification des composés phénoliques :	13
II.2.1. Structure et classification des acides phénoliques	14
II.2.1.1. Hydroxybenzoïques	14
II.2.1.2. Dérivés d'acides hydroxycinnamiques :	15
II.2.2. Structure et classification des flavonoïdes	16
II.2.2.1. Structures des flavonoïdes	16
II.2.2.2. Classification des flavonoïdes	16
II.2.3. Structures et classification des tanins	19
II.2.3.1. Tanins hydrolysables	19
II.2.3.2. Tanins condensés ou proanthocyanidols	20
II.3 Biosynthèse des composés phénoliques	22
II.3.1. Voie de l'acide shikimique	22
II.3.2. Voie du phénylpropanoïde	24
II.4. Propriétés biologiques des composés phénoliques	26
II.4.1. Propriétés biologiques des flavonoïdes	27
II.4.2 Propriétés biologiques des tanins	28
III. Antioxydants	29
III.1. Généralités	29
III.2. Antioxydants endogènes	30
III.3. Antioxydants exogènes	30
III.4. Mécanisme d'action	32
III.4.1. Mécanisme d'action des polyphénols contre les espèces réactives oxygénées (ROS)	32
III.4.2. Mécanisme d'action des flavonoïdes contre les ROS	32
III.4.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante	33
IV. Toxi-infections alimentaires	34
IV.1. Définition des toxi-infections alimentaires	34
IV.2. Manifestations cliniques	35

IV.3. Quelques exemples de souches responsables de gastro-entérites et toxi-infections alimentaires	36
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	39
I. Matériel	40
I.1. Matériel biologique.....	40
I.1.1. Matériel végétal	40
I.1.2. Souches bactériennes	40
I.2. Matériel de laboratoire.....	42
I.2.1. Solvants	42
I.2.2. Substances de référence	42
I.2.3. Réactifs	42
II. Méthodes	43
II.1. Etude phytochimique	43
II.1.1. Histochimie	43
II.1.2. Extractions.....	44
II.1.2.1. Macération hydroéthanolique	44
II.1.3. Tests généraux de caractérisation	47
II.1.4. Dosage des composés polyphénoliques	47
II.2. Evaluation des activités antioxydantes	50
II.2.1. Pouvoir réducteur par la méthode FRAP	51
II.2.2. Activité antiradicalaire par la méthode d'inhibition du radical DPPH	52
II.2.3. Activité antiradicalaire par la méthode d'inhibition du radical cation ABTS	53
II.3. Evaluation des activités antibactériennes	54
II.3.1. Milieux de culture	54
II.3.2. Préparations des solutions.....	54
II.3.3. Méthode de disques pour le test de sensibilité ou antibiogrammes	55
II.3.4. Méthode des micro-dilutions (Ellof, 1998 et NCCLS, 2001)	55
II.4. Evaluation de l'Indice de Fraction de la Concentration Inhibitrice (FIC-index) de la fraction riche en flavonoïdes.....	57
II.4. Analyse statistique	57
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	58
I. Résultats	59
I.1. Criblage phytochimique	59
I.1.1. Histochimie.....	59
I.1.2. Criblage des différents groupes chimiques	60
I.1.2.1. Rendement d'extraction	60
I.1.3. Teneurs en composés polyphénoliques	62
I.1.4. Chromatogramme des sous-fractions d'acétate d'éthyle	65
I.2. Discussion.....	66
II. Application des phénols totaux et flavonoïdes totaux dans l'activité antioxydante ..	67
II.1. Résultats	67
II.1.1. Evaluation du pouvoir réducteur (FRAP).....	67
II.1.2. Mesure au DPPH	71
II.1.3. Evaluation de la capacité antioxydante par la méthode ABTS.....	74
II.2. Discussion.....	76
III. ACTIVITES ANTI-BACTERIENNES	77
III. 1.1. Diamètre des zones d'inhibitions	77
III.1.2. Concentrations Minimales Inhibitrices et Concentrations Minimales Bactéricides.....	80

III.1.3. Pouvoir bactéricide et bactériostatique	83
III.1.4. Evaluation de l'Indice de Fraction de la Concentration Inhibitrice (<i>FIC – index</i>) de la fraction riche en flavonoïdes.....	85
III-2- Discussion	87
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	91
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	94
ANNEXES	118

LISTE DES FIGURES

Figure 1: <i>Laggera aurita</i> L., dans son milieu naturel à Gampela	9
Figure 2: <i>Ocimum americanum</i> L., dans son milieu naturel à Gampèla	11
Figure 3: Structure des hydroxybenzoïques.....	15
Figure 4: Structures des acides hydroxycinnamiques.....	15
Figure 5: Structure de base des flavonoïdes.....	16
Figure 6: Structures de tanin gallique (2) et de l'acide gallique (1).	20
Figure 7: Structures de l'acide ellagique (3) et de tanin ellagique (4)	20
Figure 8: Structure de base des tanins condensés	21
Figure 9: Structure monomères de base des tanins condensés: Epicatéchine (6) et Catéchine (7)	21
Figure 10: Structures des polyflavanes (DICKO et <i>al.</i> , 2006)	22
Figure 11: Biosynthèse des composés phénoliques par voie de shikimate (Portes, 2008).....	24
Figure 12: Biosynthèse des composés phénoliques par la voie de phénylalanine (Mouffok, 2011)	25
Figure 13: Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques	32
Figure 14: Sites de chélation des flavonoïdes (Quercétine).....	33
Figure 15: Schéma d'extraction et de fractionnement des extraits	46
Figure 16: Coupes histochimiques de tige de <i>Laggera aurita</i> L. ; A: structure tissulaire secondaire; B: tanins galliques sous épiderme; C: alcaloïdes dans le cylindre; D: flavonoïdes dans les tissus	59
Figure 17: Coupes histologiques de tige d' <i>Ocimum americanum</i> L. ; A: structure tissulaire secondaire ; B : tanins galliques sous épiderme ; C : alcaloïdes dans le cylindre ; D: flavonoïdes dans les tissus	60
Figure 18: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Dosage des polyphénols totaux).	62
Figure 19: Courbe d'étalonnage de la quercétine (Dosage des flavonoïdes totaux).	63
Figure 20: Teneurs en composés polyphénoliques de l'extrait et fractions d' <i>Ocimum americanum</i> L.	63
Figure 21: Teneur en composés polyphénoliques des extraits et fractions de <i>Laggera aurita</i> L.....	64
Figure 22: Chromatogramme des flavonoïdes d' <i>Ocimum americanum</i> L. et <i>Laggera aurita</i> L. ; A, B, C, D : sous fraction d' <i>Ocimum americanum</i> L. ; I ₂₋₁ , I ₂₋₂ , I ₂₋₃ , I ₂₋₄ : sous fraction de <i>Laggera aurita</i> L. ; Q :quercétine	66
Figure 23: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (FRAP).....	68
Figure 24: Activité antioxydante de fractions et extraits d' <i>Ocimum americanum</i> L.	69
Figure 25: Activité antioxydante de fractions et extraits de <i>Laggera aurita</i> L.	69
Figure 26: Corrélations entre le pouvoir réducteur du Fer et les teneurs en composés polyphénoliques d' <i>Ocimum americanum</i> L.....	70
Figure 27: Corrélations entre le pouvoir réducteur du Fer et les teneurs en composés polyphénoliques de <i>Laggera aurita</i> L.	71
Figure 28: courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (DPPH)	72
Figure 29: Corrélations entre l'activité antioxydante (DPPH) et les teneurs en composés polyphénoliques d' <i>Ocimum americanum</i> L.....	73
Figure 30: Corrélations entre l'activité antioxydante (DPPH) et les teneurs en composés polyphénoliques de <i>Laggera aurita</i> L.	73

Figure 31: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (ABTS).....	74
Figure 32: Corrélations entre l'activité antioxydante (ABTS) et les teneurs en composés polyphénoliques d' <i>Ocimum americanum</i> L.....	75
Figure 33: Corrélations entre l'activité antioxydante (ABTS) et les teneurs en composés polyphénoliques de <i>Laggera aurita</i> L.	75
Figure 34: Diamètres de zones d'inhibitions des fractions dichlorométhane, acétate d'éthyle d' <i>Ocimum americanum</i> L. et de la gentamicine sur les souches bactériennes d'origine alimentaire multi-résistantes	79
Figure 35: Diamètres de zones d'inhibitions des fractions dichlorométhane, acétate d'éthyle de <i>Laggera aurita</i> L. et de la gentamicine sur les souches bactériennes d'origine alimentaire multi-résistantes.	80

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Quelques classes des composés phénoliques	14
Tableau II: Principales classes de flavonoïdes	18
Tableau III: Activités biologiques de quelques composés phénoliques (Bruneton, 1999; Hennebelle, 2006)	27
Tableau IV: Liste des principaux radicaux libres	29
Tableau V: Noms scientifiques, code et origine des souches bactériennes (Kaboré et al., 2012)	41
Tableau VI: Masses d'extraits secs et rendements des extractions	61
Tableau VII: Principaux composés chimiques de deux plantes	62
Tableau VIII: Concentration Minimale Inhibitrice ($\mu\text{g/ml}$) de fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle d' <i>Ocimum americanum</i> L. et ses combinaisons à la gentamicine	80
Tableau IX: Concentration Minimale Inhibitrice ($\mu\text{g/ml}$) de fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle de <i>Laggera aurita</i> L., ses combinaisons à la gentamicine.	81
Tableau X: Concentration Minimale Bactéricide ($\mu\text{g/ml}$) de fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle d' <i>Ocimum americanum</i> L., ses combinaisons à la gentamicine.	82
Tableau XI: Concentration Minimale Bactéricide ($\mu\text{g/ml}$) de fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle de <i>Laggera aurita</i> L. et ses combinaisons à la gentamicine.	82
Tableau XII: Capacité bactericide et bactériostatique des fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle d' <i>Ocimum americanum</i> L.....	83
Tableau XIII: Capacité bactericide et bactériostatique des fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle de <i>Laggera aurita</i> L.	84
Tableau XIV: Combinaison fraction acétate d'éthyle d' <i>Ocimum americanum</i> L. + gentamicine in vitro sur 5 souches bactériennes alimentaires multi-résistantes.....	86
Tableau XV: Combinaison fraction acétate d'éthyle de <i>Laggera aurita</i> L. + gentamicine in vitro sur 5 souches bactériennes alimentaires multi résistantes	86

RESUME

Ocimum americanum L. (Lamiaceae) et *Laggera aurita* L. (Asteraceae) sont des plantes herbacées de la flore du Burkina Faso. Ces plantes sont traditionnellement utilisées dans le traitement des maladies infectieuses, de la fièvre et de la douleur. Les composés bioactifs de ces deux plantes ont été extraits par macération hydro-éthanolique puis dosés par des méthodes spectrophotométriques. Les propriétés antibactériennes des fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle de ces plantes ainsi que leur potentiel antioxydant ont été évalués. Trois méthodes à savoir : FRAP, DPPH et ABTS ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante.

Parmi les cinq fractions obtenues de chaque plante, seules les fractions acétate d'éthyle (FAE) et dichlorométhane (FDCM) ont présenté les plus fortes teneurs en composés phénoliques. Les teneurs en phénols totaux étaient de $63,81 \pm 0,12$ mg EAG/100 mg de matière sèche dans la fraction acétate d'éthyle et en flavonoïdes, de $10,72 \pm 0,06$ mg EQ/100 mg de matière sèche dans la fraction acétate d'éthyle pour *Ocimum americanum* L. Concernant *Laggera aurita* L., les teneurs en phénols totaux étaient de $62,12 \pm 0,68$ mg EAG/100 mg de matière sèche dans la fraction FAE et en flavonoïdes, de $10,56 \pm 0,29$ mg EQ/100 mg de matière sèche dans la fraction FDCM. Ces deux fractions ont également présenté la meilleure activité antioxydante et celles-ci est corrélée avec les teneurs en composés phénoliques.

De plus, les fractions FAE et FDCM d'*Ocimum americanum* L., présentaient la meilleure activité antibactérienne contre les bactéries Gram-positifs que des bactéries Gram-négatifs comparativement à la gentamicine. La fraction FAE combinée à la gentamicine a présenté les meilleures activités antibactériennes ayant un effet synergique ou additif. Les résultats indiquent aussi que les deux fractions bioactives de *Laggera aurita* L., étaient capables d'inhiber les bactéries Gram-positifs.

Ces résultats suggèrent que *Ocimum americanum* L. et *Laggera aurita* L., constituent une source importante de composés phénoliques et présenteraient un pouvoir antibactérien intéressant ; ce qui justifierait leurs utilisations traditionnelles dans le traitement des maladies gastro-entériques d'origines bactériennes.

Mots clés: polyphénols, antioxydant, bioactivité, antibactérien, gentamicine, *Laggera aurita* L., *Ocimum americanum* L.

SUMMARY

Ocimum americanum L., (Lamiaceae) and *Laggera aurita* L., (Asteraceae) are among herbal flora of Burkina Faso traditionally used in the treatment of infectious diseases, fever and pain. Bioactive compounds were screened from these plants. Antibacterial properties of several fractions of these plants were determined. In addition, the antioxidant potential of the extracts was evaluated using three separate assays. Among five separate fractions from the two plants, it appeared that ethyl acetate fraction (EAF) and dichloromethane fraction (DCMF) of *O. americanum* had the highest content of total phenolics. Levels of total phenolic compounds and flavonoids in EAF were 63.81 ± 0.12 mg GAE and 10.72 ± 0.06 mg QE, respectively. In correlation to levels of phenolic compounds, EAF presented the best antioxidant activity. The antibacterial activity of the tested fractions was correlated with their phenolic constituents. The EAF fraction had higher antibacterial activity than gentamicin. The fractions exhibited higher antibacterial activity against Gram positive bacteria such as *B. cereus* than Gram negative one such as *E. coli*. The EAF fraction displayed the best antimicrobial activities and presented synergistic or additive effect with gentamicin.

For *Laggera aurita* L., estimation of total phenolic and flavonoid contents revealed that EAF and DCMF had the highest phenolic and flavonoid contents with 62.12 ± 0.68 mg GAE and 10.56 ± 0.29 mg QE, respectively. These results indicated that most of the bioactive fractions from *Laggera aurita* L. were able to inhibit Gram-positive bacteria at level higher than Gram-negative bacteria. Among the samples tested for antioxidant activities, EAE and DCMF have the highest activities compared to other fractions.

In conclusion, these findings suggested that *Ocimum americanum* L. and *Laggera aurita* L. are not only an important source for antibacterial component, but also a potential source of antioxidants. So, these results may be useful in explaining their medicinal applications against gastro-entero diseases from bacterial origin.

Key words: polyphenols, antioxidant, bioactivity, antibacterial, gentamicin, *Laggera aurita* L., *Ocimum americanum* L.

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies d'origine alimentaire portent gravement atteinte à la santé des populations. Les cas de toxi-infections alimentaires sont très fréquents et malheureusement une très grande proportion de la population en est touchée. Les toxi-infections alimentaires constituent de ce fait un sérieux problème de santé publique. Ces infections d'origine alimentaire sont l'une des plus importantes causes de morbidité dans les pays en voie de développement.

Des millions de personnes tombent malades et un grand nombre d'entre elles décèdent après avoir ingéré des aliments impropres à la consommation (**OMS, 2000**). La diarrhée, un des symptômes des toxi-infections alimentaires, peut être mortelle chez certains patients tels que les enfants. En effet, près de sept millions d'enfants de moins de 5 ans meurent de diarrhées dans le monde, le plus souvent dans les pays du sud (**Buisson, 2001**).

En 2004, 80% des 1,5 millions d'enfants morts de diarrhée avaient moins de deux ans. Ces chiffres soulignent l'ampleur du problème et expliquent l'intérêt porté à la recherche des agents infectieux responsables de toxi-infections alimentaires.

La diarrhée d'une toxi-infection est en général le symptôme d'une infection intestinale pouvant être causée par divers micro-organismes tels que les bactéries. Cependant, force est de constater que de nos jours, la résistance aux antibiotiques constitue une menace croissante pour la santé publique dans le monde (**OMS, 1998**). Cette résistance très marquée, est observée aussi bien chez les bactéries Gram-positifs, que chez les bactéries Gram-négatifs et les Bactéries-Acido-Alcool-Résistantes « BAAR » (**Sanches et al., 1998**).

A cela, s'ajoute aussi la cherté des produits pharmaceutiques qui restent très peu accessibles à la grande majorité des populations des pays en voie de développement, et d'où leur recours à la phytothérapie.

En effet, selon les estimations de l'OMS, 80% de la population des pays en voie de développement ont recours presque exclusivement à la médecine traditionnelle pour leurs besoins de santé primaire. Au Burkina Faso, la médecine traditionnelle est essentiellement basée sur l'utilisation des plantes médicinales. En outre, les métabolites secondaires isolés des plantes médicinales servent parfois de précurseurs et/ou de modèles pour la synthèse de molécules thérapeutiques destinées à la médecine moderne.

Ce recours à la médecine traditionnelle pourrait s'expliquer tout d'abord par l'indigence de la majorité de la population car plus de 48% des Burkinabé vivaient sous le seuil de pauvreté (**INSD, 2003**). Cette pauvreté rend problématique l'accès aux médicaments modernes. La situation est même aggravée par l'insuffisance des infrastructures de la médecine moderne.

La seconde raison justifiant le recours à la médecine traditionnelle est sa grande affinité avec les conceptions ethno-psychologiques des populations.

Même lorsque l'obstacle de l'accès aux médicaments semble être levé, il se pose encore le problème récurrent, de plus en plus récurrent, d'efficacité thérapeutique de certaines molécules généralement issues de synthèse chimique industrielle, contre lesquels certains microorganismes ont développé de nombreux mécanismes de résistance.

Bien que l'on ait recours depuis longtemps à la médecine traditionnelle, il existe peu de preuves scientifiques de son innocuité et de son efficacité. Nombreux sont ceux qui y ont recours dans le cadre d'une auto-prise en charge, car une conception erronée et largement répandue fait du « naturel » le synonyme de « sans danger ». Du fait de l'absence de contrôle qualité et du manque d'information par les consommateurs, des cas d'utilisation erronée de préparations à base de plantes ont été signalés (**OMS, 2002**). Il est donc opportun d'effectuer des recherches pharmacologiques visant à identifier et à étudier l'efficacité des plantes utilisées en médecine traditionnelle et à contrôler leur innocuité, afin de permettre une utilisation plus rationnelle (**Fouché et al., 2000**).

Parmi les potentialités biologiques reconnues des plantes, l'activité antioxydante présente un intérêt de plus en plus grandissant à cause des rôles importants que jouent les composés antioxydants, retrouvés au niveau des plantes, dans le traitement et la prévention des maladies (**Cole et al., 2005 ; Boligon et al., 2009**).

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

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

La flore tropicale est très riche dans sa diversité. Selon l'OMS, environ six mille trois cent soixante dix sept (6377) espèces de plantes sont utilisées en Afrique tropicale, dont quatre mille (4000) sont des plantes médicinales. Aussi, 90% de la médecine traditionnelle en Afrique est à base de plantes. Au Burkina Faso, selon le Ministère de la Santé, deux mille (2000) espèces de plantes médicinales ont été déjà identifiées en 2004. Parmi ces plantes abondent les herbacées qui à première vue semblent être encombrantes et inutiles. De ces herbacées se retrouvent la famille des Asteraceae et celle des Lamiaceae. Ces herbes, dont *Ocimum americanum* L., et *Laggera aurita* L., sont arrachées en saison pluvieuse ou abandonnées dans les champs sans aucune attention particulière, sont pourtant connues chez certaines populations de la région du plateau central pour leurs vertus thérapeutiques, surtout dans la prise en charge des toxico-infections alimentaires, la fièvre, les vomissements, les coliques et diarrhées, l'inflammation de la rate, les mycoses, les tumeurs d'estomac et leur huile essentielle est reconnue pour ses propriétés antibactériennes, contre la douleur, la stomatite, l'asthme, la bronchite et la congestion nasale (**Nacoulma, 1996**).

Par ailleurs, *Laggera aurita* L., est utilisée au cours des rituels et dans la conservation des céréales. Au Cameroun et au Nigeria, cette plante est utilisée comme remède contre le paludisme pédiatrique (**Nacoulma, 1996 ; Njan et al., 2007 et Okhale et al., 2010**).

Aussi, certaines recherches nous rapportent diverses propriétés bioactives de *Laggera aurita* L., à savoir : des propriétés anti-inflammatoires, antivirales, antibactériennes et hépatoprotectrices (**Zhao et al., 2004 ; Wu et al., 2006 et Shi et al., 2007**).

Les analyses phytochimiques antérieures réalisées sur *Laggera aurita* L. et *Ocimum americanum* L., ont montré la présence d'un certain nombre de métabolites secondaires à savoir : des saponosides, des triterpéniques, des stéroïdes, des

sesquiterpénoïdes, des monoterpénoïdes et des flavonoïdes (**Weaver et al., 1991 ; Nacoulma, 1996 ; Roberto et al., 2003 et Yang et al., 2006**).

En dehors de l'identification de ces métabolites secondaires, très peu d'informations existent sur leur activité antimicrobienne. De plus, aucun travail n'a été réalisé sur une éventuelle corrélation entre les composés polyphénoliques, la capacité de piéger des radicaux libres et l'activité antibactérienne des extraits de *Laggera aurita* L. et d'*Ocimum americanum* L.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une contribution à une meilleure connaissance de la phytochimie et des activités biologiques dans l'optique d'établir une corrélation possible entre les phénols totaux, les flavonoïdes totaux et les activités biologiques des extraits de ces deux plantes.

Plus spécifiquement, ce travail vise à :

- déterminer les principaux groupes de composés chimiques des extraits et fractions de ces deux plantes ;
- d'identifier et quantifier les acides phénols et les flavonoïdes des extraits de ces deux plantes ;
- d'évaluer le potentiel antioxydant et le potentiel antibactérien qui permettront de confirmer ou d'infirmer le bien-fondé de l'exploitation de ces plantes dans la prise en charge traditionnelle des toxi-infections alimentaires.

Pour se faire, ce travail est structuré en trois parties :

- la première partie est une synthèse bibliographique relative aux différents aspects qui seront abordés dans le travail ;
- la deuxième partie est un répertoire de matériels et méthodes utilisés ;
- la troisième partie présente les résultats des travaux suivis d'une discussion de ces résultats à partir de laquelle se dégageront une conclusion générale et les perspectives.

CHAPITRE I : BIBLIOGRAPHIE

I. Description du matériel végétal

I.1. *Laggera aurita* (L.f.) Berth. Ox C.B. Clark

La famille Asteraceae ou Composeae avec ses quelques 1620 genres et plus de 23600 espèces est la plus grande famille de plantes à fleurs (**Stevens et al., 2001**). Cette famille est disséminée dans le monde entier à l'exception de l'Antarctique, mais elle est particulièrement diversifiée dans les régions tropicales et subtropicales d'Amérique du Nord, du Brésil, d'Afrique de l'Ouest, dans la région méditerranéenne, en Asie centrale et dans le sud-ouest de la Chine. La majorité des espèces des Asteraceae sont herbacées (**Rieseberg et al., 2003**).

I.1.1. Aspects Botaniques

I.1.1.1. Classification (Cronquist, A. 1988)

Règne : Végétal

Embranchement : Phanérogames

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Magnoliopsida Dicotyledones

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Asterales

Famille : Asteraceae

Genre : *Laggera*

Espèce : *Laggera aurita* L.

Synonymes (Kerharo, 1974 ; Nacoulma, 1996)

Blumea aurita (L.f.) DC. Var. *foliolosa* (D.C.) C.D. Adams

Blumea guineensis D.C.

Noms vernaculaires

Français : tabac de l'hyène

Mooré : Katre tabré

Bambara : boylé buti

I.1.1.2. Description et Habitat

Laggera aurita L., est une herbe annuelle ou bisannuelle, dressée, atteignant 1,5 mètre de hauteur, fortement parfumée, de couleur vert-clair, à poils glutineux. Ses feuilles sont alternes, irrégulièrement et largement échancrées sur les bords ; le limbe se prolongeant le long d'une tige ailée, pubescent, avec de nombreux poils blanchâtres, mous, glutineux, rendant la plante collante.

Laggera aurita L. fleurit de décembre à février et donne des fleurs de couleur rose ou violacée en capitules entourées de bractées vertes également glutineuses. Elle se reproduit par les graines (**Berhaut, 1954 ; Kerharo, 1974 ; Zutshi 1975**).

Laggera aurita L., est très répandue en Afrique tropicale, précisément dans les sols littoraux humides et plus ou moins saumâtres, dans les rizières en jachères et les sols marécageux (Figure 1).



Figure 1: *Laggera aurita* L., dans son milieu naturel à Gampela

I.1.2. Données phytochimiques

Les tiges feuillées de *Laggera aurita* L. contiennent des huiles essentielles, des stéroïdes, des alcaloïdes, des flavonoïdes. Les huiles essentielles renferment des sesquiterpènes; de δ -cadiène, de 2, 3-diMethoxy-*p*-cymène, de laggerol, de α -cadinol, de *m*-menth-6-èn-8-ol et de β -caryophyllène (Belanger, 1994 ; Kabera, 2005).

I.1.3. Utilisations courante (Nacoulma, 1996)

Différents organes de *Laggera aurita* L. sont utilisés en médecine traditionnelle et c'est ainsi que :

- ▶ les feuilles de *Laggera aurita* L. apportent la guérison des plaies, des ulcères phagédéniques, des contusions, des hémorragies et des ecchymoses. Elles sont également cicatrisantes, hémostatiques et antiseptiques ;
- ▶ les tiges feuillées sont utilisées pour le soin des Infections Sexuellement Transmissible (IST), des spasmes gastriques, des fièvres, des angines, des parasites intestinaux et urinaires ;

► les tiges feuillées sont également utilisées dans les maladies diarrhéiques.

I.2. *Ocimum americanum* L.

La famille des Lamiaceae ou Labiées est une importante famille de plantes dicotylédones, qui comprend environ 210 genres et près de 4000 espèces répandues dans le monde entier. *Ocimum americanum* L., est une plante originaire d'Afrique et d'Asie. Dans les régions méditerranéennes, le soleil rend ses arômes encore plus forts (Naghbi et al., 2005).

I.2.1. Aspect botanique

I.2.1.1. Classification (Cronsquit, 1988)

Règne : Végétal

Embranchement : Phanérogames

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Magnoliopsida Dicotyledones

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Ocimum*

Espèce : *Ocimum americanum* L.

Synonymes (Kerharo, 1974 et Nacoulma, 1996)

Ocimum canum SIMS

Noms vernaculaires

Mooré : Yulin-gou-raaga

Ile Rodrigues : petit bangélique (**Gurib-Fakim, 1994**)

Kikongo: mansiusiu ma nkento (**Arkininstall, 1979**)

I.2.1.2. Description et habitat

Plante très parfumée, à odeur poivrée, de dimensions variables, *Ocimum americanum* L. possède des tiges quadrangulaires pubescentes, ramifiées, de couleur vert-clair, lignifiées à la base.

Ocimum americanum L. est une plante annuelle, parfois vivace, aux feuilles et aux limbes lancéoles, cutanés aux deux extrémités entières ou légèrement denticulées. Ses épis terminaux faits de verticilles de fleurs blanches avec l'axe des épis; les pédoncules de fleurs et les calices longuement pubescents blanchâtres (Figure 2) (**Nacoulma, 1996**).



Figure 2: *Ocimum americanum* L., dans son milieu naturel à Gampèla

I.2.2. Données phytochimiques

Les tiges feuillées d'*Ocimum americanum* L. renferment les huiles essentielles, les polyphénols, les triterpénoïdes, les flavonoïdes, les stéroïdes, les saponosides triterpéniques et les traces d'alcaloïdes (**Nacoulma, 1996**).

I.2.3. Utilisations courantes

Différents organes d'*Ocimum americanum* L. sont utilisés en médecine traditionnelle, c'est ainsi que :

- ▶ les feuilles apportent la guérison des parasitoses cutanées, du paludisme, de la fièvre avec refroidissements des mains et des pieds, des vomissements, des coliques, de l'inflammation de la rate et de hoquet ; elles chassent également les moustiques ;
- ▶ les feuilles séchées prises en inhalation permettent de soigner les tumeurs d'estomac, les mycoses, les tumeurs des yeux et les polypes de nez ;
- ▶ les graines sont toniques, diurétiques et permettent d'extraire les objets dans l'œil ;
- ▶ les racines permettent de lutter contre les morsures de serpents ;
- ▶ le jus de feuilles mélangé au miel permet de guérir la fièvre ;
- ▶ Le thé des feuilles est utilisé comme complément alimentaire occasionnel (**Bossard, 1996**), contre les ballonnements et les troubles digestifs (**Gurib-Fakim, 1994**).

II. Description des composés phénoliques

II.1. Définition des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des dérivés non azotés dont le ou les cycles aromatiques sont issus de deux grandes voies métaboliques : la voie du shikimate et la voie de l'acétate (**Bruneton, 1999 et Lugasi et al., 2003**).

Cette double origine biosynthétique explique la diversité structurale des composés phénoliques ; elle s'amplifie également avec la présence simultanée du shikimate et de l'acétate conduisant à l'élaboration de composés mixtes (flavonoïdes, stilbène, xanthone, etc.). Plus de 8000 composés phénoliques ont été identifiés dans les plantes.

II.2. Structures et classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques renferment un noyau aromatique qui possède un ou plusieurs substituants hydroxylés. Ces derniers conduisent les composés phénoliques simples à se polymériser pour obtenir des phénols complexes ou polymérisés. Malgré la grande diversité structurale, ce groupe est connu sous le nom de polyphénol (**Keskas, 2011**).

Les composés phénoliques constituent un des groupes de substances les plus nombreux et largement distribués dans le règne des végétaux présents dans tous les organes de la plante (Tableau I).

Tableau I: Quelques classes des composés phénoliques

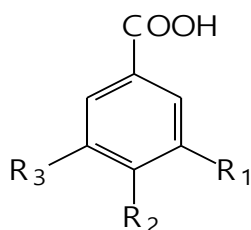
Classe	Squelette primaire
Phénols simples, benzoquinones	C ₆
Acide hydroxybenzoïque	C ₆ -C ₁
Acétophénonnes, acide phénylacétique	C ₆ -C ₂
Acide hydroxycinnamique, phénylpropanoïdes	C ₆ -C ₃
Flavonoïdes, isoflavonoïdes	C ₆ -C ₃ -C ₆
Lignanes, néolignanes	(C ₆ -C ₃) ₂
biflavonoïdes	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂
Tannins condensés (proanthocyanidines ou flavolans)	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

II.2.1. Structure et classification des acides phénoliques

La classe des acides phénoliques peut-être divisée en deux sous-classes.

II.2.1.1. Hydroxybenzoïques

Les hydroxybenzoïques comprennent plusieurs molécules et les plus fréquentes sont : L'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide syringique et l'acide *p*-hydroxybenzoïque. Ces composants possèdent une structure en C₆-C₁ en commun (**Kanoun, 2011**).



Acide vanillique: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$

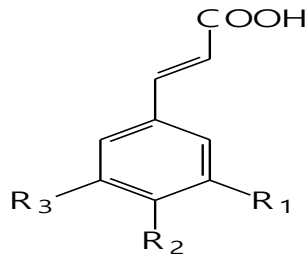
Acide para-hydroxybenzoïque: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$

Acide gallique: $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$

Figure 3: Structure des hydroxybenzoïques

II.2.1.2. Dérivés d'acides hydroxycinnamiques

Ces molécules possèdent un cycle aromatique avec 3 carbones en C6-C3 (dérivé d'acide cinnamique), par exemple : l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide p-coumarique, l'acide sinapique, etc. (**Bouayed, 2007**).



Acide cinnamique: $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$

Acide p-coumarique: $R_1 = R_3 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$

Acide férulique: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$

Acide caféique: $R_1 = R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$

Figure 4: Structures des acides hydroxycinnamiques

II.2.2. Structure et classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels du règne végétal, qui sont caractérisés par la présence d'une structure phénolique dans leur molécule, et même d'une structure flavone, ce qui les distingue des autres polyphénols (**Ghedira, 2005 ; Toufektsian et al., 2008**).

De nos jours plus plusieurs milliers de flavonoïdes ont été répertoriés et il en reste des milliers d'autres à découvrir car le squelette des flavonoïdes (Figure 5) peut être substitué par différents groupements comme des groupements hydroxy, méthoxy, méthyl, benzyl et isoprényl (**Beecher, 2003 ; Williams et al., 2004 ; Kueny-Stotz, 2008**).

II.2.2.1. Structures des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à 15 atomes de carbone constitués de deux cycles phényles, les cycles A et C, reliés par une chaîne à trois carbones (structure en C6-C3-C6). La chaîne en C3 entre les cycles A et C est communément cyclisée pour former le cycle B (**Bruneton, 1999**).

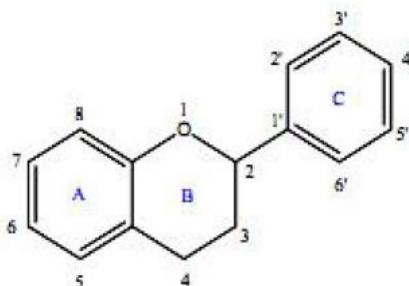


Figure 5: Structure de base des flavonoïdes

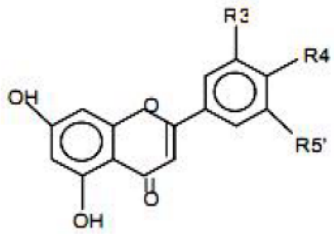
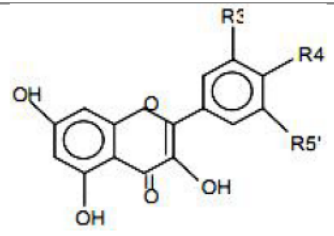
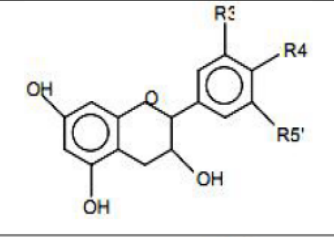
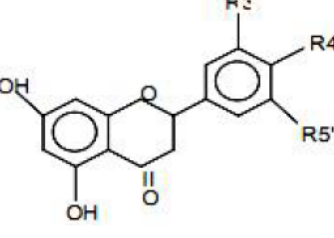
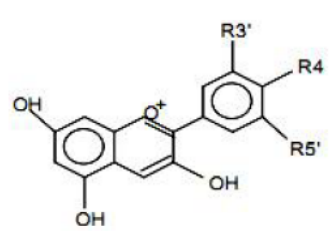
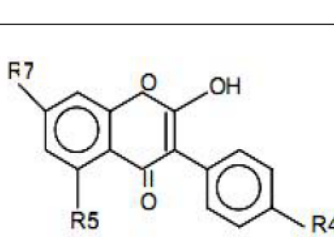
II.2.2.2. Classification des flavonoïdes

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules (**Harbone, 1988**) dont les plus importantes sont: les flavones, les flavonols, les flavanones, les isoflavones et les anthocyanidines.

Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous la forme libre (génine) ou sous la forme de glycoside (C ou O glycosylés). On les retrouve dans toutes les plantes

vasculaires où elles peuvent être localisées dans divers organes : racines, tiges, feuilles et fruits (**Bruneton, 1999**) (Tableau III).

Tableau II: Principales classes de flavonoïdes

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH ₃	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidzeine

II.2.3. Structures et classification des tanins

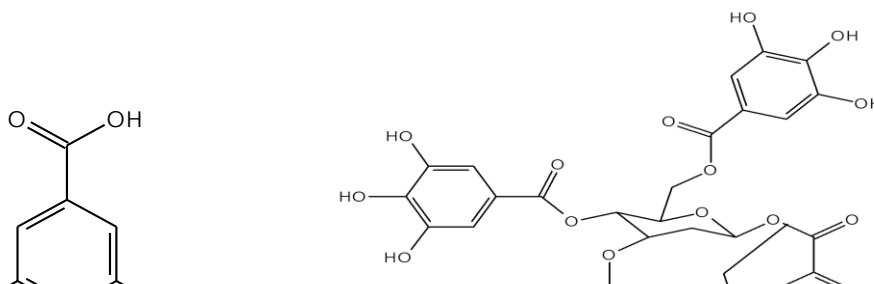
Les tanins sont le plus souvent des polymères d'acides phénols, hydrosolubles ou non hydrosolubles, de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 kD (polymères) ayant la propriété de tanner la peau c'est-à-dire de la rendre imputrescible (l'empêche de pourrir), propriété liée à leur aptitude à se combiner à des macromolécules (protéines). Ils peuvent aussi se lier à d'autres polymères tels que la cellulose ou les pectines donnant ainsi des hauts polymères astringents utilisés en thérapeutique comme pansement gastrique et intestinal (**Ribereau, 1968 ; Nongonierma, 1990**).

On distingue deux groupes de tanins par leur structure : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Bruneton, 2009**).

II.2.3.1. Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des molécules avec un noyau central possédant plusieurs groupements de carbohydrates (généralement le D-glucose). Les groupements hydroxyles de ces carbohydrates sont partiellement ou totalement estérifiés par des groupements phénoliques comme l'acide gallique (tanins galliques) ou par l'acide ellagique (tanins ellagiques). Les deux types de tanins hydrolysables :

- **Tanins galliques** : Les groupements phénoliques qui s'estérifient avec les hydroxyles du sucre sont constitués par des dimères ou des polymères de l'acide gallique. Chaque molécule de tanin gallique est souvent composée d'un ose (D-glucose) et de 6 à 9 groupements galloyls. Dans la nature, il existe un très grand nombre d'esters de glucose, de mono et disaccharides. Pour les vrais tanins, Il faut au moins que trois (3) des hydroxyles du sucre soient estérifiés par des groupements galloyls (Figure 6).



(1)

(2)

Figure 6: Structures de tanin gallique (2) et de l'acide gallique (1).

- **Tanins ellagiques** : C'est l'un des deux groupes des tanins hydrolysables. Ce sont des esters de l'acide hexahydroxydiphénique et du glucose (Figure 7). L'acide hexahydroxydiphénique se déshydrate spontanément en une forme lactone qui est l'acide ellagique. Leurs poids moléculaires varient entre 2000 et 5000.

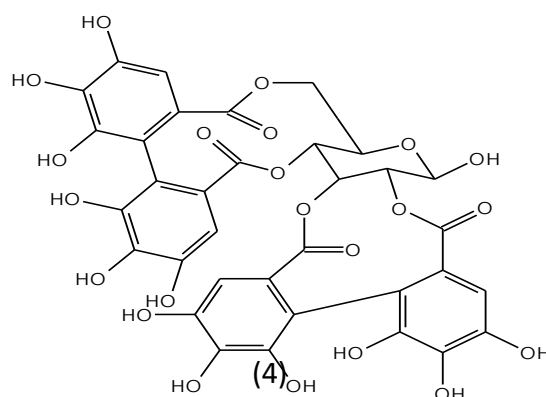
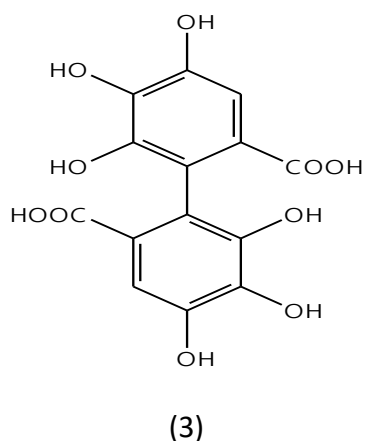


Figure 7: Structures de l'acide ellagique (3) et de tanin ellagique (4)

II.2.3.2. Tanins condensés ou proanthocyanidols

Les tanins condensés très peu dans nos extraits, sont tous dérivés de la polymérisation des flavonoïdes. Les flavonoïdes constituent un groupe de métabolite dont la structure est basée sur un noyau dérivé de la phénylalanine (B) et un noyau biosynthétisé (A) (Figure 8). Parmi les tanins condensés, on distingue les

proanthocyanidols et les pro-désoxyanthocyanidols. L'hydrolyse des premiers libère les flavan-ols et l'hydrolyse des seconds donne des 3-désoxyanthocyanidines.

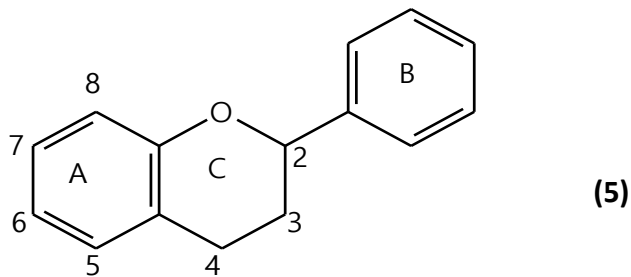


Figure 8: Structure de base des tanins condensés

Les tanins condensés les plus étudiés sont ceux qui sont formés à partir de la polymérisation des deux flavan-3-ols ((-)-épicatéchine et (+)-catéchine) (Figure 9), des proanthocyanidinols et des pro-3-désoxyanthocyanidines (Figure 10).

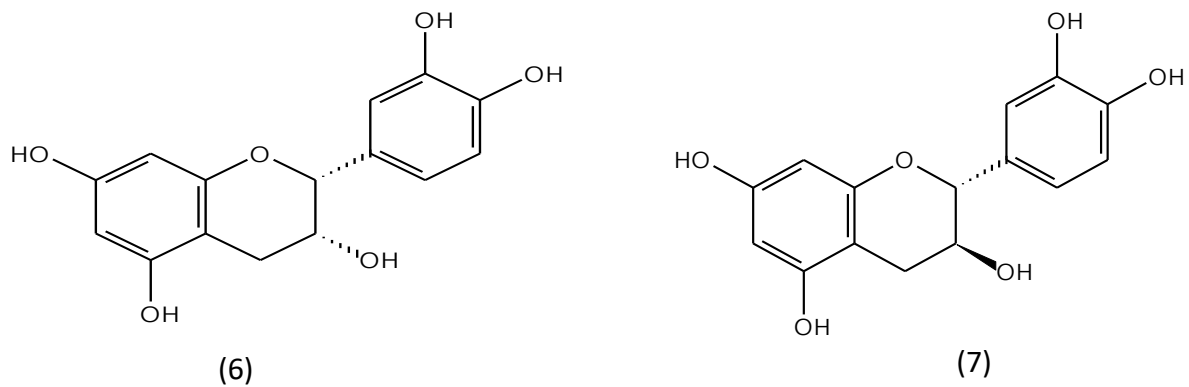
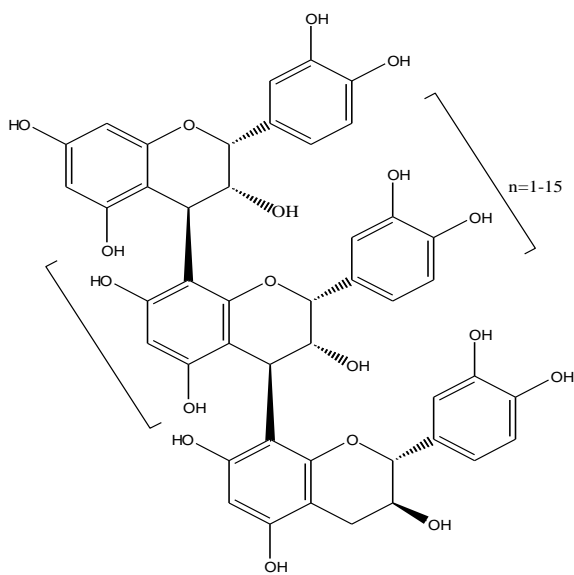
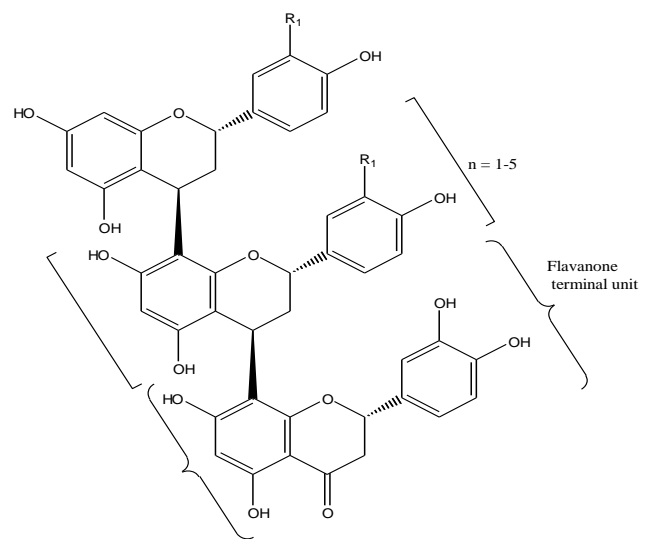


Figure 9: Structure monomères de base des tanins condensés: Epicatéchine (6) et Catéchine (7)



(8)

Proanthocyanidinols



(9)

Pro-3-désoxyanthocyanidines

R₁ = H, pro-apigeninidins

Figure 10: Structures des polyflavanes (DICKO et *al.*, 2006)

II.3 Biosynthèse des composés phénoliques

Les grandes lignes des voies de biosynthèse des principaux composés phénoliques sont maintenant bien connues. Les deux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) présents dans les protéines sont également à l'origine de la formation de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux. Ces composés sont issus par deux grandes voies métaboliques.

II.3.1. Voie de l'acide shikimique

Elle conduit à la formation du précurseur immédiat des phénols par désamination de la phénylalanine. La séquence biosynthétique qui suit, dénommée séquence des phénylpropanoïdes, permet la formation des principaux acides hydroxycinnamiques. Les

formes actives de ces derniers avec la coenzyme A permettent d'accéder aux principales classes des composés phénoliques. Notons quelques transformations :

- vers les acides de la série benzoïque (acides gallique, protocatéchique) par β -oxydation. L'acide gallique lui-même, par combinaison avec des sucres simples, conduit aux tanins hydrolysables (tanins galliques et ellagiques) ;
- vers les esters de type chlorogénique par estérification avec un acide alcool (acide quinique, acide shikimique) ;
- vers les coumarines, par cyclisation interne des molécules suivie de modifications complémentaires (glycosilations, prénylations) ;
- vers les lignines par réduction, formation des monolignols puis polymérisation oxydative initiée dans la paroi cellulaire par les peroxydases et les lactases.

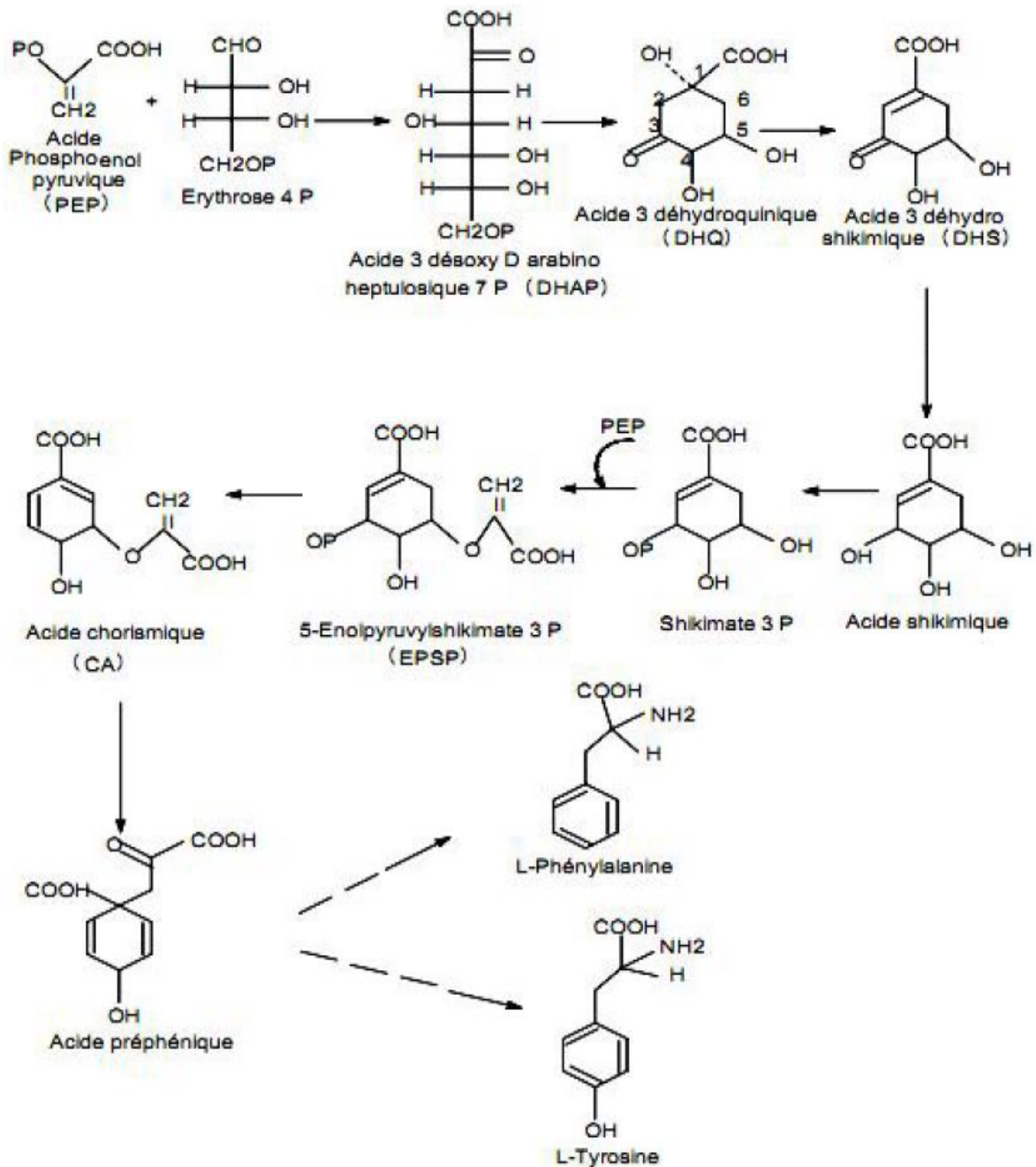


Figure 11: Biosynthèse des composés phénoliques par voie de shikimate (Portes, 2008)

II.3.2. Voie du phénylpropanoïde

La voie du phénylpropanoïde commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de la lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose (Portes, 2008).

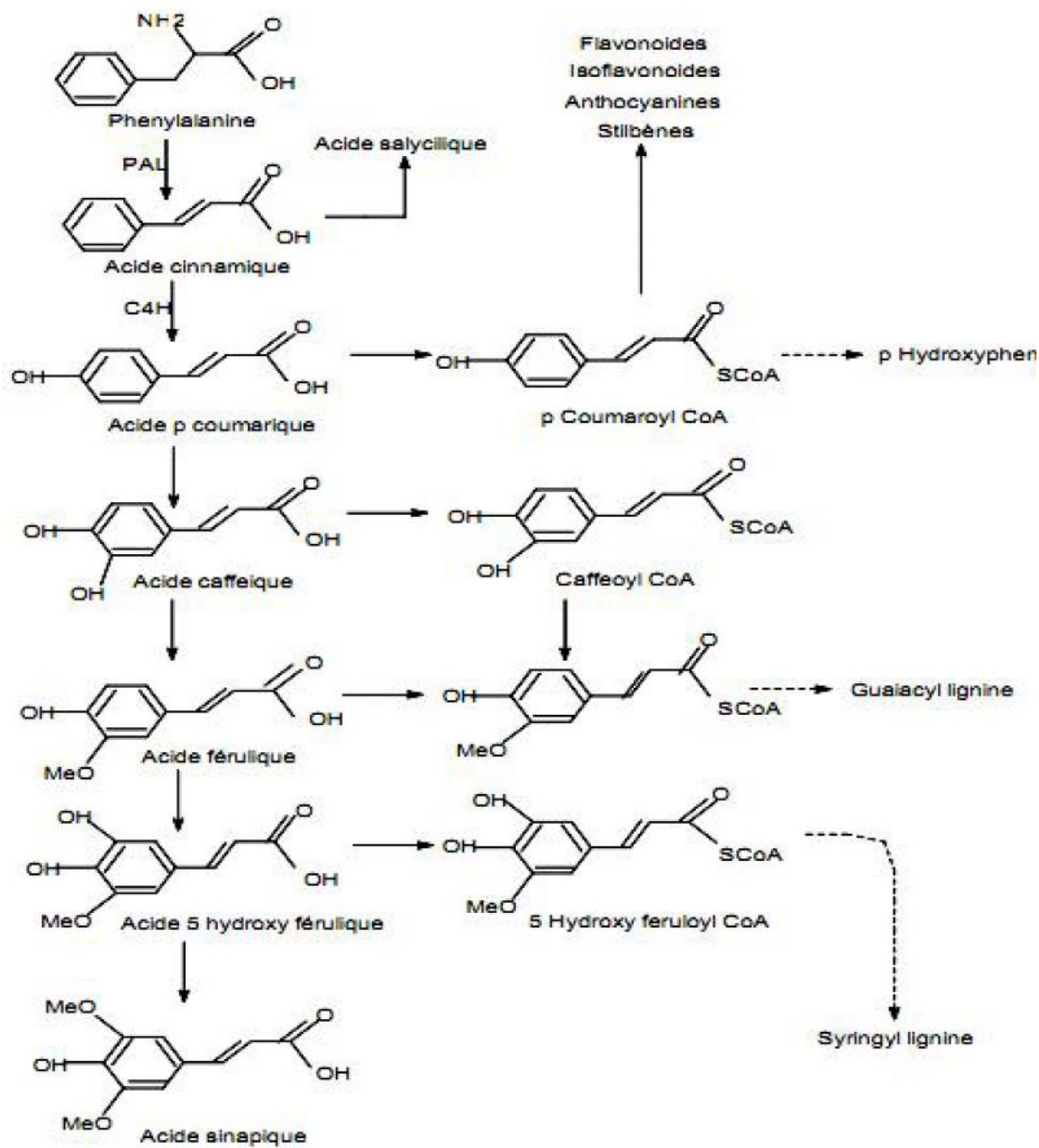


Figure 12: Biosynthèse des composés phénoliques par la voie de phénylalanine (Mouffok, 2011)

II.4. Propriétés biologiques des composés phénoliques

Les polyphénols ont une multitude d'activités biologiques dépendant de leur structure chimique. Ils constituent une importante famille d'antioxydants dans le règne végétal. Contrairement aux antioxydants synthétiques comme le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT), les polyphénols n'ont pas de nuisance avérée sur la santé humaine (**Bounatirou *et al.*, 2007**). Les polyphénols ont également un rôle dans le contrôle de la croissance et le développement des plantes en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance. Ils permettent aux végétaux de se défendre contre les rayons ultraviolets. Certains d'entre eux jouent le rôle de phytoalexines comme les isoflavonols permettant de lutter contre les infections causées par les champignons, ou par les bactéries (**Makoi *et al.*, 2007**).

Les pigments non azotés sont impliqués dans le processus de pollinisation : ils attirent l'attention des insectes pollinisateurs, ou servent au contraire à dessiner les formes pour éloigner les prédateurs. D'autres sont des inhibiteurs d'enzymes et interviennent dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies (**Bruneton, 1999**).

Les polyphénols sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additifs, colorants, arômes ou agents de conservation (**Bruneton, 1999**) (Tableau III).

Tableau III: Activités biologiques de quelques composés phénoliques (Bruneton, 1999; Hennebelle, 2006)

Composés phénoliques		Activités biologiques
Acides phénols	Acide caféique	Antibactérienne
	Acide salicylique	Antioxydante, anti-aggrégeant plaquettaire
Tanins	Tanin gallique	Effet stabilisant sur le collagène, antioxydant, antidiarrhéique, effet
	proanthocyanidine	antiseptique, effet vasoconstricteur
Flavonoïdes	Lutéoléine	
	Catéchine	Antioxydante,
	Hespéridine	antimicrobienne,
	Quercétine	anticarcinogène
	naringénine	

II.4.1. Propriétés biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont suscité l'intérêt scientifique depuis plusieurs décennies. D'abord à cause de leur importance dans la physiologie des plantes et de leurs rôles dans la pigmentation, mais aussi parce qu'ils sont impliqués dans la croissance et la reproduction des plantes (**Manach et al., 2004**). Ils ont également pour fonction de protéger ces dernières contre les agents pathogènes d'origine virale ou bactérienne, les prédateurs comme les insectes (**Bravo, 1998**).

Plus particulièrement, les flavonoïdes sont impliqués, chez les plantes, dans le transport d'électrons lors de la photosynthèse et ils jouent un rôle de protection contre les effets néfastes des rayons ultraviolets en agissant comme antioxydants (**Havsteen, 2002**).

Les flavonoïdes parviennent à capturer les espèces réactives de l'oxygène associées au stress oxydatif, les empêchant ainsi de créer des dommages cellulaires. En effet, ils sont capables d'inactiver et de stabiliser les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif. Ils inhibent aussi l'oxydation des LDL et, de ce fait, peuvent prévenir l'athérosclérose et diminuer les risques de maladies cardiovasculaires (**Tu et al.,**

2007). Les flavonoïdes sont capables d'exercer en plus des propriétés antioxydantes, des propriétés anti-inflammatoires, antiallergiques et anti-ulcérogènes (**Di Carlo et al., 1999**).

Certains flavonoïdes ont également démontré un potentiel d'agent vasodilatateur (**Woodman et Chan, 2004**). Ils ont été surnommés les «modificateurs naturels des réponses biologiques» (**Middleton et al., 2000**). D'autres études *in vitro* ont ensuite montré que les flavonoïdes peuvent moduler l'activité d'une grande variété d'enzymes impliquées dans des voies importantes qui régulent la division et la prolifération cellulaire, l'agrégation des plaquettes, la détoxification, l'inflammation et la réponse immunitaire (**Middleton et al., 2000**), ils sont donc capables de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires.

Plusieurs études épidémiologiques ainsi que des études réalisées dans différentes lignées cellulaires ont démontré le potentiel antitumoral et anticancéreux des flavonoïdes (**Birt et al., 2001 ; Yang et al., 2001 ; Ramos, 2007**).

II.4.2 Propriétés biologiques des tanins

Les tanins sont des métabolites secondaires des plantes, leur conférant une protection contre les prédateurs (herbivores et insectes). La propriété astringente des tanins est à la base d'autres propriétés (vulnéraire, antidiarrhéique) ; elle permet la cicatrisation, l'imperméabilisation de la peau et des muqueuses, favorise la vasoconstriction des petits vaisseaux (**Paolini et al., 2003**). En outre, les tanins ont un très grand pouvoir antibactérien (**Bassene et al., 1995 ; Baba Moussa, 1998 ; Kolodziej, 1999**), antiviral (**Nonaka et al., 1990 ; Pousset et al., 1993 ; Hong et al., 2000**), anti-inflammatoire (**Mota et al., 1985**) et une activité antimutagène (**Kaur et al., 2000**). Les plantes riches en tanins sont utilisées dans les cas de rhume, de maux de gorge, les problèmes de sécrétions trop importantes, les infections internes ou externes, blessures, coupures et brûlures (**Bruneton, 1999**).

III. Antioxydants

III.1. Généralités

Les antioxydants apparaissent de nos jours comme les clés de la longévité et des substances pour combattre les maladies modernes. Ce sont des éléments protecteurs qui agissent comme capteurs de radicaux libres (Tableau IV).

Ces derniers sont produits quotidiennement par l'organisme; ce sont des composés très réactifs comportant un électron célibataire et nécessaire à des mécanismes vitaux (**Bartosz, 2003**) mais, ils deviennent nocifs pour l'organisme lorsqu'ils sont en excès et peuvent induire certains dommages au niveau de la structure des protéines, des lipides (**Pourrut, 2008**), des acides nucléiques (**Favier, 2003**) en entraînant un stress oxydatif qui contribue aux processus de vieillissement cellulaire accéléré et au développement de pathologies humaines telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers, l'artériosclérose.

Des systèmes de défense permettent de prévenir la formation radicalaire ou de limiter les lésions d'oxydation résultantes. Ces systèmes peuvent être endogènes ou exogènes, d'origine nutritionnelle.

Tableau IV: Liste des principaux radicaux libres

Radical	Formule
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Hydroxyle	OH^{\cdot}
Peroxyle	ROO^{\cdot}
Hydroperoxydes	$ROOH$
Alcoxyles	RO^{\cdot}
Oxygène singulet	$1/2O_2$
Oxyde nitrique	NO^{\cdot}

III.2. Antioxydants endogènes

Ce sont des enzymes (Superoxyde dismutase, Catalase et Glutathion peroxydase) ou de simples protéines antioxydantes (glutathion) élaborées par notre organisme avec l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge (**Mika et al., 2004**).

Les superoxydes dismutases (SOD) : ce sont des métallo-enzymes présentes dans monde du vivant. Elles catalysent la dismutation de deux anions superoxydes en dioxygène et peroxyde d'hydrogène (**Arora et al., 2002**).

Les catalases (CAT) : ce sont des enzymes majoritairement peroxysomales qui catalysent la dismutation du peroxyde d'hydrogène (**Arora et al., 2002**).

Les peroxydases (POX): ce sont une large famille multigénique d'enzymes hémiques qui catalysent la réduction d'un substrat donneur d'hydrogène (AH) en utilisant de nombreux co-substrats tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) comme donneurs d'électrons.

Les peroxyredoxines (PRX) ou thiorédoxines peroxydases ; ce sont des oxydases non hémiques contenant un résidu cystéine au niveau de leur site catalytique. Les PRX sont des éléments essentiels du système de détoxification des espèces réactives de l'oxygène.

Les glutathion peroxydases (GPX) : Elles agissent en synergie avec la SOD car leur rôle est d'accélérer la dismutation du H₂O₂ en H₂O et O₂.

III.3. Antioxydants exogènes

Les antioxydants exogènes sont présents dans l'alimentation ; on peut citer les vitamines A, C, E et les composés phénoliques ; en particulier les flavonoïdes, ainsi que les cofacteurs des enzymes impliquées dans les systèmes antioxydants endogènes comme le sélénium, le zinc et le manganèse.

Ces antioxydants nutritionnels sont indispensables mais leur action est limitée jusqu'à ce qu'ils soient régénérés.

La vitamine E : le principal antioxydant nutritionnel est la vitamine E, liposoluble, puissant antioxydant mais qui peut avoir des effets délétères à très fortes doses. Elle agit principalement par le transfert direct d'atomes d'hydrogène et permet d'inhiber la lipoperoxydation dans les cellules (**Njus et al., 1991 et Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

L'acide ascorbique ou vitamine C : la vitamine C est l'antioxydant hydrosoluble majeur, réagit rapidement avec l'anion superoxyde et l'oxygène singulet, ou encore avec le peroxyde d'hydrogène. Elle est indispensable par sa capacité à réduire d'autres antioxydants oxydés comme la vitamine E ou les caroténoïdes (**Benbrook, 2005 et Pourrut, 2008**).

Les caroténoïdes : ce sont des pigments végétaux lipophiles formant une famille de plus de 600 molécules notamment le lycopène et le 2-carotène, précurseurs de la vitamine A (**Marc et al., 2004**).

Le rôle biologique des caroténoïdes est, entre autres, complémentaire de celui de la vitamine E, elle-même régénérée par la vitamine C, d'où l'intérêt de consommer une alimentation équilibrée, riche en fruits et légumes variés pour bénéficier des nombreux effets de synergie entre micronutriments (**Miller et al., 1996**).

Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition comme le fer le cuivre ou par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène comme la xanthine oxydase (**Lahouel et al., 2006**).

Les tanins: les tanins peuvent donner des protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto-oxydation des lipides.

Le sélénium : il neutralise les métaux toxiques en particulier le plomb et le mercure. Il aurait aussi une action préventive sur certains cancers.

III.4. Mécanisme d'action

III.4.1. Mécanisme d'action des polyphénols contre les espèces réactives oxygénées (ROS)

Le processus d'oxydation est de type radicalaire : les antioxydants vont intervenir comme "capteurs" de radicaux libres. Les antioxydants de type phénolique réagissent selon un mécanisme proposé dès 1976 par **Sherwin** : l'antioxydant cède formellement un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de proton (**Nkhili, 2009**).

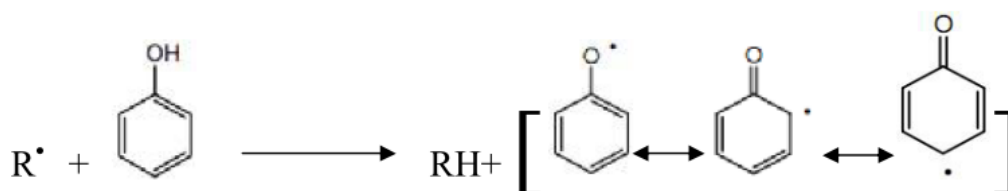


Figure 13: Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques

III.4.2. Mécanisme d'action des flavonoïdes contre les ROS

L'activité antioxydante des flavonoïdes peut prendre plusieurs formes dans la régulation du stress oxydant, vis-à-vis les effets délétères des radicaux libres. Ces composants peuvent intervenir en captant directement les radicaux libres, ou inhibant les enzymes responsables de la génération des ROS, ou en captant les cations métalliques (**Nkhili, 2009**).

III.4.2.1. Capture directe des radicaux libres

La structure chimique des flavonoïdes leur confère la capacité de fixer directement les radicaux libres « effet antiradicalaire ». Les flavonoïdes peuvent piéger le radical superoxyde hydroxyle, alkoxy et peroxy, par transfert d'hydrogène.



FL : représente le flavonoïde

R : représente le radical libre.

Le radical flavonoxy (FL-O•) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable. La capacité antiradicalaire des flavonoïdes dépend principalement de leurs structures (**Muanda, 2010**).

III.4.2.2. Capture des cations métalliques

Les ions métalliques présents dans notre organisme, comme le fer ou le cuivre, peuvent donner naissance à des radicaux hydroxyles très réactifs.

Les flavonoïdes sont connus par leur capacité à former des complexes stables avec les ions métalliques et sont alors capables d'inhiber la réaction de Fenton et ainsi empêcher la production des ROS, pour cette raison sont considérés comme de bons chélateurs.

On peut résumer les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques :

- un noyau catéchol sur le cycle B, les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C.
- les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C.

La quercétine est la plus active des flavonoïdes (**Ferhat, 2009**).

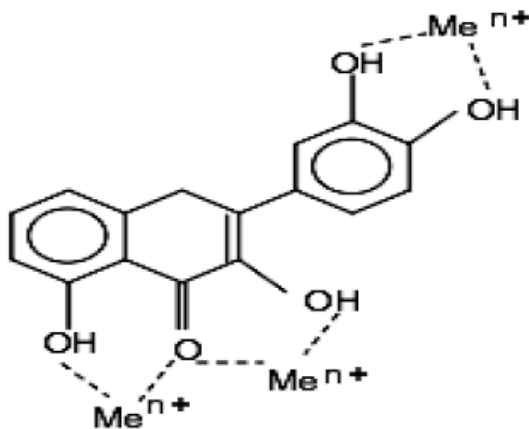


Figure 14: Sites de chélation des flavonoïdes (Quercétine)

III.4.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Les méthodes d'évaluation du caractère antioxydant sont nombreuses et peuvent être qualitatives ou quantitatives. Les méthodes qualitatives, utilisées pour repérer

l'activité antioxydante de composés, sont relativement peu nombreuses et font intervenir en général, la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'agents antioxydants. Une des méthodes les plus utilisées pour la détection d'antioxydants est la chromatographie sur couche mince (CCM), qui donne naissance à des réactions colorées en présence de tels composés (**Li et al., 1999**).

En ce qui concerne l'évaluation quantitative de l'activité antioxydante, beaucoup de méthodes peuvent être appliquées pour estimer directement l'activité antioxydante dont les principales sont :

- évaluation de produits résultant de l'oxydation : l'évaluation des peroxydes et le dosage d'hydroperoxydes ;
- évaluation de l'aptitude du composé à piéger des radicaux libres: la capacité du produit à piéger les radicaux libres implique la création de radicaux ;

On peut citer :

- ✓ les méthodes DPPH (2,2-diphényl-picrylhydrazyl) (**Koleva et al., 2002**), ABTS (2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonate)) (**Villano et al., 2004**).
- ✓ des méthodes électrochimiques ont été développées pour la mesure de l'activité antioxydante des fluides biologiques (**Ziyatdenova et al., 2005**) :
- la méthode voltamétrique cyclique qui est utilisée pour quantifier les antioxydants de faible poids moléculaire dans le plasma et la mesure de la capacité antioxydante totale du plasma ;
- évaluation de la capacité réductrice des composés par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power) (**Thaipong et al., 2006**).

IV. Toxi-infections alimentaires

IV.1. Définition des toxi-infections alimentaires

Une toxi-infection alimentaire (en langage courant, une intoxication alimentaire) est une maladie, souvent infectieuse et accidentelle, contractée à la suite de l'ingestion de nourriture ou de boisson contaminée par des agents pathogènes qu'il s'agisse de bactéries, virus ou parasites.

Pour les maladies d'origine alimentaire provoquées par l'ingestion de produits non comestibles ou toxiques (médicaments), métaux lourds, champignons vénéneux,

composés chimiques ou autres poisons, on parle seulement d'intoxication alimentaire. Une intoxication alimentaire peut aussi être le résultat d'une trop grande absorption d'un aliment.

Une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est une maladie infectieuse à déclaration obligatoire (MDO) qui a lieu lorsqu'il existe « au moins deux cas groupés, avec des manifestations similaires dues à une contamination par un micro-organisme (bactéries en général) ou une toxine ». Les plus grandes toxi-infections alimentaires collectives sont des « crises alimentaires ».

Les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) : elles sont dues aux salmonelles (*S. typhimurium* étant le sérotype le plus souvent isolé), à des *Escherichia coli*, à des *Clostridium perfringens*, aux rotavirus et aux toxines préformées dans l'aliment par *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*. Elles se caractérisent par une gastro-entérite atteignant plusieurs personnes simultanément (**Aubry, 2013**).

IV.2. Manifestations cliniques

Les symptômes classiques des toxi-infections alimentaires sont les nausées, les vomissements, les crampes abdominales, des diarrhées, les fièvres associées aux céphalées. Les diarrhées sont fébriles dans environ la moitié des cas et s'accompagnent de nausées, de vomissements et de douleurs abdominales dans environ 80 % des cas. La présence de glaires dans les selles est notée dans 10 % des cas et celle de sang dans 1% des cas.

D'autres signes cliniques s'ajoutent selon l'agent causal responsable de toxi-infection alimentaire (**Plantaz, 2005**).

La période d'incubation est variable en fonction du microorganisme pathogène. C'est le délai entre l'absorption de l'aliment contaminé et l'apparition de la symptomatologie. Elle dépend de la multiplication de l'agent infectieux et de sa capacité à attaquer la paroi intestinale, de la sécrétion ou non d'une toxine (entérotoxine).

La plupart des toxi-infections alimentaires sont bénignes et ne durent que quelques jours. Cependant, des conséquences peuvent être plus graves en particulier chez les personnes âgées où les infections à *Salmonelles* sont plus susceptibles d'entraîner une bactériémie et augmentent le risque d'une issue fatale, les femmes enceintes, les enfants

et ceux dont le système immunitaire est affaibli. La déshydratation accompagnée de pertes hydro-électrolytiques importantes peut conduire aux troubles liés à la déplétion potassique, jusqu'au collapsus hypovolémique. Des complications peuvent survenir et provoquer des séquelles (septicémie, méningo-encéphalite, avortement spontané), et parfois le décès (**Paniss et al., 2003**).

IV.3. Quelques exemples de souches responsables de gastro-entérites et toxi-infections alimentaires

Il est important d'avoir une vue essentiellement sur les différents agents bactériens susceptibles de provoquer une toxi-infection alimentaire, leur réservoir et leur symptomatologie.

Yersinia enterocolitica est une bactérie Gram-négatif qui se développe bien au froid (+4°C) et peut donc être à l'origine de toxi-infections alimentaires même lorsque les conditions de réfrigération et de chaîne du froid ont été correctement respectées.

Leur réservoir est surtout représenté par les animaux d'élevages. Les aliments contaminés sont variés. On peut citer : porc, volailles, eau, fromage au lait (**Farber, 1998**). Leur durée d'incubation est de 3 à 7 jours.

Cliniquement, la symptomatologie varie avec l'âge : diarrhée fébrile chez le jeune enfant, elle peut être accompagnée chez l'adulte d'érythème noueux, d'arthrite ou de foyers osseux. L'infection est caractérisée par une forte mortalité.

Bacillus cereus est un bacille Gram-positif, sécrétant une toxine thermostable provoque des toxi-infections.

Leur réservoir est ubiquitaire. Les aliments contaminés sont souvent du riz, de la purée ou des légumes germés (soja), des viandes, les laits. Deux entérotoxines ont été identifiées : une thermostable émétisante, (plutôt responsable de vomissements) formée pendant la sporulation et une thermolabile (responsable de diarrhée).

La durée d'incubation est de 1 à 6 heures lorsque les vomissements prédominent, ou bien de 6 à 16 heures lorsqu'il s'agit de diarrhée.

Cliniquement, 2 ordres de manifestations peuvent être observés : l'une proche de l'intoxication staphylococcique, l'autre proche de l'intoxication par *C. perfringens*.

Escherichia coli est une bactérie Gram-négatif de la famille des Enterbacteriaceae qui peuvent causer des gastro-entérites.

Leur réservoir est principalement représenté par la viande hachée crue ou mal cuite, le lait cru et la contamination fécale de légumes.

Il est responsable d'une diarrhée très liquide et est rencontré surtout en pays tropical et atteint les voyageurs. Il est transmis par l'eau. Les enfants autochtones quant à eux sont contaminés surtout de façon interhumaine.

Listeria monocytogenes est un bacille à Gram positif ubiquiste et environnemental, résistant et pouvant se multiplier à basse température (réfrigérateur). Après colonisation temporaire du tube digestif à partir d'aliments fortement contaminés, comme certains fromages à pâte molle à base de lait non pasteurisé, il peut gagner le système nerveux central par voie hématogène.

La listériose peut se manifester sous forme sporadique ou épidémique. La listériose de l'adulte est typiquement à symptomatologie neuro-méningée (méningite, voire rhombencéphalite avec syndrome méningé). Plusieurs épisodes épidémiques ont été identifiés en France en 1993, en 1995 et en 1997. La listériose de la femme enceinte survient avec contamination fœtale par voie sanguine transplacentaire ou transmembraneuse à partir du liquide amniotique infecté par des abcès placentaires. Elle est difficile à dépister, voire asymptomatique, et révélée par ses conséquences obstétricales. En l'absence de traitement, les conséquences sont redoutables pour l'enfant (avortements précoces surtout du 2^e trimestre, accouchements prématurés, seulement 20 % de naissances à terme). Les principes du traitement comprennent l'administration d'une pénicilline A (amoxicilline) et de cotrimoxazole, voire un aminoside dans les formes sévères.

Les *Salmonella* non typhiques sont les bactéries Gram-négatifs les plus fréquemment en cause dans les toxi-infections alimentaires. La dose infectante doit être supérieure aux capacités de défense du tube digestif, et on admet que la dose minimale infectante est généralement supérieure ou égale à 10⁵ bactéries.

Leur réservoir est très large et s'étend à tout le monde animal. Les aliments les plus fréquemment mis en cause sont les œufs (*S. enteritidis*), la viande, plus particulièrement

la volaille, et les produits laitiers. L'aliment contaminant doit être consommé cru ou peu cuit. La durée d'incubation est de 12 à 36 heures.

Cliniquement, les salmonelloses se manifestent par une diarrhée fébrile accompagnée de vomissements et de douleurs abdominales. Elles peuvent entraîner des bactériémies et se compliquer de septicémies ou de localisations secondaires extra-digestives qui font la gravité de la maladie. Les signes vont durer spontanément 2 à 3 jours pour disparaître rapidement. Le diagnostic sera confirmé par la coproculture qui identifiera la souche (**Chingu et al., 1995 et Amat-Rose, 1997**).

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

I.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué par les tiges feuillées de *Laggera aurita* L. et *Ocimum americanum* L., récoltées à Gampela à 25 Km de Ouagadougou pendant la période allant de septembre à décembre 2011. Les plantes ont été identifiées au Laboratoire d'Ecologie Végétale et de Botanique de l'Université de Ouagadougou. Des spécimens authentifiés des différentes plantes ont été déposés à l'herbier de l'Université de Ouagadougou. Les parties utiles des plantes ont été séchées au laboratoire sous ventilation artificielle à l'abri du soleil et de la poussière. Les tiges feuillées des différentes plantes ont été ensuite réduites en poudre qui servira pour les différentes extractions. Une autre partie du matériel végétal frais a été conservé au laboratoire pour faire l'objet de coupes histochimiques.

I.1.2. Souches bactériennes

Dix souches bactériennes provenant d'une collection de cultures de l'Université de Copenhague ont été utilisées pour évaluer le potentiel antibactérien des extraits et fractions de deux plantes. Le tableau V indique les noms scientifiques de bactéries, leur code et l'origine de chacune d'entre-elles.

Tableau V: Noms scientifiques, code et origine des souches bactériennes (Kaboré *et al.*, 2012)

Nom scientifique	Code	Origine
<i>Bacillus cereus</i> MADM 1291	Bc1	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Listeria monocytogenes</i> 057	Lm1	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	Lm2	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Salmonella infantis</i> SKN 557	Si	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Salmonella oranienburg</i> SKN 1157	So	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Salmonella nigeria</i> SKN 1160	Sn	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Salmonella typhimurium</i> SKN 533	St1	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Escherichia. coli</i> 81 nr. 149 SKN 541	Ec	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Yersinia enterocolitica</i> 6A28 SKN 599	Ye1	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Bacillus cereus</i> NVH391-98	Kd	Collection de culture de l'Université de Copenhague

I.2. Matériel de laboratoire

I.2.1. Solvants

Les solvants organiques de grades analytiques ont été utilisés pour ce travail : ethanol, méthanol, dichlorométhane, acétate d'éthyle, butanol, ether de pétrole (Labosi, Paris, France).

I.2.2. Substances de référence

Les substances de références suivantes ont été utilisées : Acide gallique, quercétine, Trolox, acide ascorbique, gentamicine (Sigma-Aldrich).

I.2.3. Réactifs

Les réactifs ci-contre cités ont fait l'objet de cette étude : Acide chlorhydrique concentré, acide formique, acide acétique, anhydride acétique, acide phosphotungstique, acide trichloracétique, acide sulfurique, acide formique, ammoniacque liquide, Bleu de méthyle, carbonate de sodium, diméthylsulfoxyde, 2,2 diphényl-1-picryl hydrazyl (DPPH), potassium hexacyanoferrate [$K_3Fe(CN)_6$], persulfate potassium, ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate), Tournure de magnésium, Réactif de Folin Ciocalteu (FCR), NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 sont de Sigma-aldrich chemie, Steinheim, Germany. Les réactifs lugol, le Carmino-vert, hypochlorite de sodium ($NaClO$), trichlorure d'aluminium, hydroxyde de sodium, réactif de Neu, gélose Müller Hinton, chlorure de baryum, chlorure de sodium, Iodonitrotetrazolium (INT) sont de Fluka Chemie, Switzerland.

II. Méthodes

II.1. Etude phytochimique

II.1.1. Histochimie

II.1.1.1. Double coloration au carmino-vert pour l'identification des tissus

Les coupes ont été trempées dans l'hypochlorite de sodium pendant 15 à 20 mn (afin de détruire le contenu cellulaire), puis rincées 3 fois à l'eau distillée. Ensuite, elles ont été trempées dans l'acide acétique à 20 % pendant 5 mn afin d'éliminer le résidu d'eau de javel qui pourrait détruire le Carmino-vert. Après rinçage, les coupes sont trempées dans le Carmino-vert de Mirande pendant 5 mn et rincées à l'eau distillée puis observées entre lame et lamelle dans une goutte de glycérine aux objectifs X10 ou X40. C'est ainsi que :

- Les cellules qui gardent leur paroi pecto-cellulosique sont colorées en rose ; ce sont : le parenchyme en rose pâle, le phloème en rose vif et le collenchyme en rose violacé.
- Les cellules à paroi lignifiée sont colorées en vert comme le xylème, le sclérenchyme en vert-bleu et le suber en vert-jaunâtre.

II.1.1.2. Détection des métabolites secondaires

► Détection des alcaloïdes

Le lugol en présence des alcaloïdes donne un précipité brun dans les vacuoles de cellules.

► Détection des tanins

Les coupes ont été montées avec une goutte du trichlorure de fer (FeCl_3) à 3 % entre lame et lamelle pour l'observation. La présence d'un précipité noirâtre dans les vacuoles indique que la plante renferme des tanins.

► Détection des flavonoïdes

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

II.1.2. Extractions

II.1.2.1. Macération hydroéthanolique

Cinquante grammes (50 g) de poudre des tiges feuillées de *Laggera aurita* L. et *Ocimum americanum* L. sont soumis à une extraction sous agitation magnétique à la température ambiante du laboratoire pendant 24 heures avec 1000 ml d'un mélange éthanol-eau (80:20). Après macération, l'extrait a été filtré sur du papier filtre Wattman n°1 et concentré sous pression réduite au rotavapor.

Une partie de la solution aqueuse est lyophilisée et l'autre, fractionnée avec des solvants organiques non miscibles de polarité croissante.

II.1.2.2. Fractionnement des macérés hydroéthanoliques

Les phases aqueuses sont soumises à une série de partage, liquide-liquide avec des solvants organiques non miscibles de polarité croissante.

- 50 ml des macérés hydroéthanoliques sont extraits avec 2 x 50 ml d'éther de pétrole. Les solutions d'éther de pétrole sont rassemblées puis concentrées sous pression réduite. Les concentrés obtenus sont séchés et les résidus ainsi obtenus constituent les fractions éther de pétrole (FEP);
- Les phases aqueuses épuisées à l'éther de pétrole sont de nouveau extraites mais avec du dichlorométhane comme solvant. Les solutions sont rassemblées, concentrées et séchées pour donner les fractions dichlorométhanes (FDCM);
- Les phases aqueuses issues de deux premiers traitements sont extraites avec 2 x 50 ml d'acétate d'éthyle. Les solutions acétate d'éthyle sont rassemblées puis traitées comme précédemment pour donner les fractions acétate d'éthyle (FAE);

➤ Les phases aqueuses issues des trois traitements précédents sont extraites avec du butanol-1 (2 x 50 ml). Les solutions butanol-1 sont rassemblées, concentrées et séchées à la température ambiante pour donner les fractions butanoliques (FB) (Figure 15).

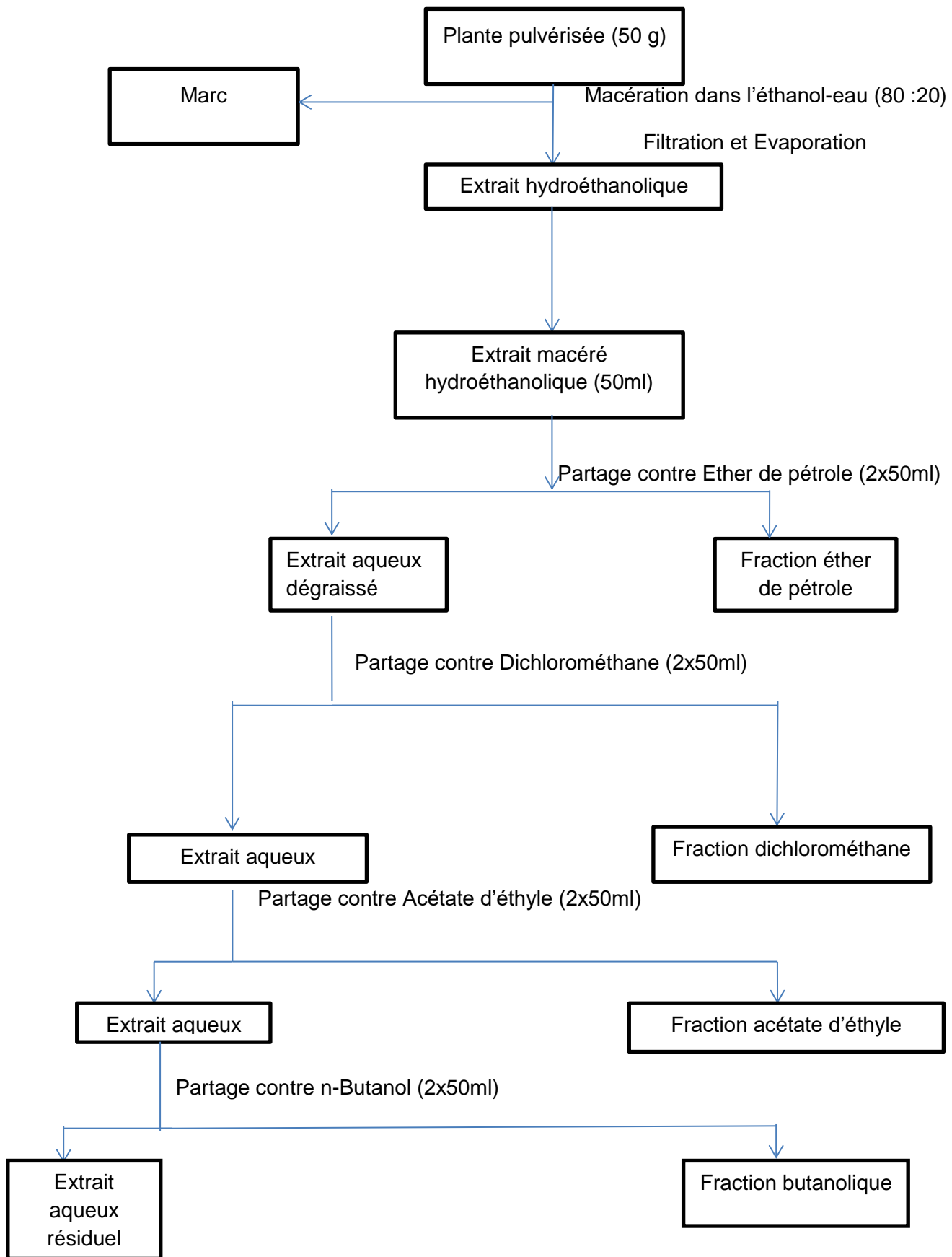


Figure 15: Schéma d'extraction et de fractionnement des extraits

II.1.3. Tests généraux de caractérisation

Les tests généraux de caractérisation ont permis de révéler la présence des principaux composés chimiques présents dans les extraits des deux plantes.

Ces tests ont été réalisés sur les extraits hydroéthanoliques des deux plantes obtenus par macération. Les procédures décrites par **Ciulei (1982)** ont été utilisées pour la mise en évidence de ces différentes familles de molécules; c'est ainsi que :

- Le test du trichlorure de fer a révélé la présence des tanins;
- Le test de Shibata a permis d'identifier des flavonoïdes ;
- Le test de Bornträger a révélé la présence des anthraquinones ;
- Le test de Feiggl-Frehden a permis d'identifier les coumarines ;
- Le test de Liebermann/Buchard a révélé la présence des triterpènes et des stéroïdes libres ;
- Le test de Keller-Kiliani, pour les cardénolides ;
- Le test de mousse, pour les saponosides ;
- Et le test de Dragendorff, pour la détection des alcaloïdes basiques et sels d'alcaloïdes.

II.1.4. Dosage des composés polyphénoliques

II.1.4.1. Dosage des phénols totaux

Les polyphénols totaux des extraits ont été déterminés par la méthode décrite par **Lamien-Meda et al. (2008)**. Les extraits sont dissous dans du méthanol pur pour avoir une concentration de 10 mg/ml, puis dilués au 1/100 dans l'eau distillée. Un volume de 0,5 ml de la solution diluée a été alors mélangé à 2,5 ml du réactif de Folin-ciocalteu à 0,2 N et incubé pendant 5 min. Une solution (2 ml) de carbonate de sodium à 75 g/l dans l'eau distillée est ensuite ajoutée et le mélange incubé pendant 2 heures. A la fin de l'incubation, les densités optiques sont lues à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre CECIL 2041 Séries.

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

$$C = \frac{c \cdot D \cdot 10}{m} \cdot 100$$

C = mg Equivalent acide gallique dans 100 mg

c = concentration de l'échantillon lue (mgAG/l) sur la courbe étalon

D = la dilution de l'extrait utilisé

m = masse de l'échantillon

II.1.4.2. Dosage de flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes totaux ont été déterminés par la méthode de **Dowd**. Un volume de 0,75 ml de AlCl_3 à 2% dans du méthanol pur est mélangé avec un volume égal d'extrait à 1 mg/ml dans le méthanol. Les densités optiques sont lues après 10 min à 415 nm à l'aide d'un spectrophotomètre CECIL 2041 Séries.

La quercétine (0-100 mg/L) a servi comme standard pour l'élaboration de la courbe d'étalonnage. Un mélange de 0,75 ml d'extrait et de 5 ml de méthanol sans AlCl_3 a servi de blanc. Au total, trois (3) analyses sont effectuées pour chaque extrait et le résultat donné est une moyenne des trois lectures. Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent quercétine pour 1 g d'extrait sec (mg EQ/g).

$$C = \frac{c \cdot D \cdot 10}{m} \cdot 100$$

C = mg Equivalent quercétine dans 100 mg

c = concentration de l'échantillon lue (mg EQ/l)

D = la dilution, **m** = masse de l'échantillon

II.1.5. Chromatographie liquide sur colonne des fractions d'acétate éthylique

La chromatographie liquide sur colonne est une technique de séparation et d'identification des substances d'un extrait. Cette méthode est basée sur la fixation des substances à séparer au sommet de la phase stationnaire puis, le déplacement sélectif de celles-ci. Chacun des constituants se déplacera à une vitesse qui lui est propre et ce, par addition régulière et de façon continue de l'éluant de gradients variables.

Une prise d'essai d'environ 500 mg d'une fraction d'acétate d'éthyle de chaque plante a été placée sur une phase stationnaire (silicagel G60, 35-70 mesh ; Merck) contenu dans une colonne (28 g de gel pour 30 cm longueur de colonne) selon le rapport 50 g d'absorbant pour 1 gramme d'extrait. Effectuer une élution avec une phase mobile composée d'un mélange d'acétate d'éthyle-méthanol à des gradients croissants (Acétate d'éthyle 100% ; Acétate d'éthyle/Méthanol 8/2 ; Acétate d'éthyle/Méthanol 5/5 et Méthanol 100%) suivant 1 goutte toutes les 5 secondes (KINI, 2008).

II.1.6. Chromatographie sur couche mince (CCM)

L'analyse chromatographique sur couche mince des différentes sous-fractions obtenues vise à séparer et établir le profil en constituants flavonoïdes de chaque fraction acétate d'éthyle. Les fractions qui présenteraient le même profil seront regroupées.

Une prise d'essai d'environ 100 mg de chaque sous-fraction a été déposée sur une plaque CCM de 0,2 mm d'épaisseur. Le solvant d'élution est un mélange de solvant composé d'acétate d'éthyle-acide formique-eau dans les proportions (6-1-1 ; v/v/v).

La révélation du chromatogramme a été effectuée par le réactif de Neu et l'observation, sous la lame UV_{366nm} et un flavonoïde de référence, la quercétine a été utilisée

(Bladt, 1996).

II.2. Evaluation des activités antioxydantes

II.2.1. Pouvoir réducteur par la méthode FRAP

La méthode FRAP (Ferric reducing antioxidant power) est basée sur l'habilité des extraits à réduire l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}). La capacité totale en antioxydant de chaque extrait de plante a été déterminée par la méthode de **Hinneburg et al. (2006)**.

Ainsi 1 ml d'une solution aqueuse de chaque extrait (10 mg/ml diluée au 100^{ème} pour obtenir 0,1 mg/ml) a été mélangé avec 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M; pH 6,6) et 2,5 ml de la solution aqueuse (1%) d'hexacyanoferrate de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$]. Après 30 mn d'incubation à 50°C ; 2,5 ml d'acide trichloracétique (10%) ont été ajoutés. Le mélange a ensuite été centrifugé à 3000 tr/min pendant 10 min. 2,5 ml du surnageant ont ensuite été mélangés au même volume d'eau et 0,5 ml d'une solution aqueuse fraîchement préparée de FeCl_3 (0,1%) a été ajoutée. Les absorbances ont été lues à 700 nm contre une courbe d'étalonnage obtenue à partir de l'acide ascorbique (0-100 mg/L). Le pouvoir réducteur a été exprimé en équivalent acide ascorbique (EAA) (mmol acide ascorbique/g d'extrait sec).

La concentration en composés réducteurs (antioxydants) dans l'extrait est exprimée en mmol Equivalent Acide Ascorbique (EAA)/g d'extrait sec selon la formule suivante :

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

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

c = concentration de l'échantillon lue

D = facteur de dilution de la solution mère d'extrait

Ci = concentration de la solution mère d'extrait

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

II.2.2. Activité antiradicalaire par la méthode d'inhibition du radical DPPH

L'activité antiradicalaire des extraits végétaux traduit leur aptitude à piéger les radicaux libres de l'organisme. L'activité antiradicalaire est évaluée sur les macérés hydroéthanoliques de deux plantes et leurs fractions. Les extraits sont solubilisés dans du méthanol pour obtenir des concentrations mères de 10 mg/ml.

Cette concentration est diluée au 100^{ème} pour le test. La méthode spectrophotométrique au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) décrite par **Velazquez et al. (2003)** est utilisée avec quelques modifications. Introduire 1,5 ml d'une solution méthanolique de DPPH à 20 mg/l dans des tubes à essais contenant au préalable 0,75 ml d'extraits à tester. Un témoin ne contenant pas d'extrait végétal est aussi préparé. Les absorbances ont été lues à 517 nm contre une courbe d'étalonnage obtenue à partir de l'acide ascorbique (0-200 mg/L). Chaque essai est réalisé en triple. Le pouvoir antiradicalaire a été exprimé en équivalents acide ascorbique (EAA) (mmol acide ascorbique/g d'extrait sec). La concentration en composés réducteurs (antioxydants) dans l'extrait est exprimée en mmol Equivalent Acide Ascorbique (EAA)/g d'extrait sec selon la formule suivante :

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

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

c = concentration de l'échantillon lue

D = facteur de dilution de la solution mère d'extrait

Ci = concentration de la solution mère d'extrait

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

II.2.3. Activité antiradicalaire par la méthode d'inhibition du radical cation ABTS

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

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

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

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

c = concentration de l'échantillon lue

D = facteur de dilution de la solution mère d'extrait

Ci = concentration de la solution mère d'extrait

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

II.3. Evaluation des activités antibactériennes

II.3.1. Milieux de culture

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

II.3.2. Préparations des solutions

II.3.2.1. Solution de Mac Farland 0.5

Le Mac Farland 0,5 est obtenu en mélangeant 0,5 ml de la solution de chlorure de baryum hydraté ($\text{BaCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (1,17g seront dissouts dans 100 ml d'eau distillée) et 99,9 ml d'acide chlorhydrique (H_2SO_4) à 1%.

II.3.2.2. Extraits de plantes

Les lyophilisats à solvant organiques (fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle) ont été dissous dans du DMSO 10% pour obtenir une concentration finale de 10 mg/ml, tandis que les disques de diffusion de la gentamicine ont été à 25 µg.

II.3.2.3 Suspension mère bactérienne

La solution mère bactérienne a été préparée en prélevant un fragment de colonie de chacune des souches à l'aide d'une pipette pasteur à bout flambé ; elles ont été ensuite inoculées dans un bouillon M.H stérile contenu dans une série de tubes à vice stérilisés en fonction des souches bactériennes données. La solution a été homogénéisée et incubée à l'étuve à la température de 37°C et à 44°C pour les souches bactériennes thermorésistantes pendant au moins 18 h.

II.3.2.4. Inoculum bactérien

L'inoculum bactérien a été préparé en prélevant un aliquote de la suspension mère bactérienne, qu'il faut ensuite introduit dans un autre tube à vice stérilisé contenant un liquide physiologique de NaCl à 0,9 g/l. La solution a été comparée à la turbidité de la solution de Mac Farland. Lorsque les deux solutions ont été identiques alors l'inoculum contient 10^6 UFC par ml (**Ezoubeiri et al., 2005**).

II.3.3. Méthode de disques pour le test de sensibilité ou antibiogrammes

La gélose Muller Hinton (MH) a été coulée dans des boîtes de Pétri (54 mm). Ces boîtes ont été ensuite séchées sous une hotte à flux laminaire. Un volume de 0,2 ml de l'inoculum bactérien a été prélevé à l'aide d'une seringue puis coulé dans chaque boîte de Pétri. L'inoculum a été ensemencé par étalement à l'aide d'une pipette pasteur.

Des disques de papier Whatman n°1 de 6 mm de diamètre, stériles, préalablement imprégnés avec 10 μ l de chaque extrait de plante, ont été déposés sur la gélose inoculée, ainsi que les disques de gentamicine à 25 μ g. Le même volume de DMSO à 10% a été utilisé afin de vérifier l'effet du DMSO sur les souches bactériennes utilisées. Les boîtes de Pétri ont été incubées à l'étuve pendant 24 h à la température de 37°C et à 44°C pour les bactéries thermorésistantes.

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant, à l'aide d'une règle transparente, le diamètre de la zone d'inhibition induite par les extraits de plantes ou l'antibiotiques de référence, la gentamicine. Les extraits de deux plantes ou l'antibiotique ayant induit une zone d'inhibition ≥ 3 mm autour du disque ont été considérés comme ayant une activité antibactérienne. Chaque test a été réalisé 3 fois (**Rabe et van Stadten., 1997**).

II.3.4. Méthode des micro-dilutions (Ellof, 1998 et NCCLS, 2001)

II.3.4.1. Détermination de CMI

La concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la concentration minimale d'extrait pour laquelle on n'observe pas de croissance bactérienne. Les

suspensions bactériennes ont été diluées avec du bouillon et distribuées dans les plaques à 96 puits stériles contenant une gamme de concentrations variant de 1000 µg/ml à 15,625 µg/ml de fraction seule ou de gentamicine ou encore de la combinaison fraction + gentamicine. Pour chaque colonne de la plaque, chaque puit reçoit un volume de 100 µl de bouillon MH, 100 µl d'extrait seul de chaque plante ou de gentamicine ou encore de combinaison fraction + gentamicine, au 1^{er} puit suivi d'une dilution en cascade. Un volume de 10 µl de l'inoculum bactérien et 50 µl d'INT à 0,2 mg/ml ont été ajoutés à chaque puit. L'expérience est répétée 3 fois pour chaque souche bactérienne.

La CMI a été déterminée après 18 h d'incubation à 37°C et à 44°C pour les bactéries thermorésistantes ; la coloration rose ou rouge indique la croissance et claire indique une inhibition (**Konaté *et al.*, 2012 ; NCCLS, 2001**).

II.3.4.2. Détermination de la CMB

La concentration minimale bactéricide est définie comme étant la concentration minimale qui tue 99,99 % de l'inoculum de départ. La CMB a été déterminée en prélevant 10 µl de suspension dans chaque puit sans croissance visible. Cette suspension a été ensemencée dans la gélose nutritive.

L'incubation a été faite à 37 °C pendant 24 heures au bout desquelles le comptage des colonies a été réalisé. La détermination de la CMB a été effectuée après celle de la CMI et avec les puits de concentrations supérieures ou égales à celle de la CMI. Pour la CMB, 99,9% de microorganismes ont été détruits et il en reste que 0,01% de microorganismes c'est-à-dire 100 UFC poussées sur chaque boîte de Pétri (**Konaté *et al.*, 2012 ; NCCLS, 2001**).

II.3.4.3. Détermination du pouvoir bactéricide ou bactériostatique (Berche *et al.*, 1988).

L'activité antibactérienne des extraits a été appréciée en tenant compte du rapport CMB/CMI. Ainsi l'effet a été qualifié de :

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

II.4. Evaluation de l'Indice de Fraction de la Concentration Inhibitrice (FIC-index) de la fraction riche en flavonoïdes

L'évaluation de l'Indice de Fraction de la Concentration Inhibitrice (FIC-index) de la meilleure fraction bioactive en combinaison avec la gentamicine contre les souches bactériennes multi-résistantes a été réalisée par la méthode de micro-dilution. Le milieu de culture Muller Hinton a été utilisé. Huit dilutions en cascades de deux fractions riches en flavonoïdes (fraction dichlorométhane et fraction acétate d'éthyle) ont été préparées comme décrites précédemment, pour obtenir des concentrations allant 1000 µg/ml à 15,625 µg/ml.

Une série de dilutions successives de gentamicine a également été préparée dans les mêmes conditions que les fractions riches en flavonoïdes. Les concentrations préparées correspondaient à 1; 1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32; 1/64.

Pour chaque colonne de la plaque, chaque puit reçoit un volume de 100 µl de bouillon MH, 100 µl d'extrait seul de chaque plante ou de gentamicine ou encore de combinaison fraction riche en flavonoïdes + gentamicine au 1^{er} puit, suivi d'une dilution en cascade auxquelles ont été ajoutés 10 µl de l'inoculum bactérien et 50 µl d'INT à 0,2 mg/ml.

Les plaques ont été couvertes et incubées à 37 ° C pendant 24 h. Tous les tests ont été effectués en triple exemplaire et l'activité bactérienne a été exprimée comme la moyenne des inhibitions produites.

II.4. Analyse statistique

Les données ont été analysées et traitées, au moyen de LogicielsXLSAT version 7.

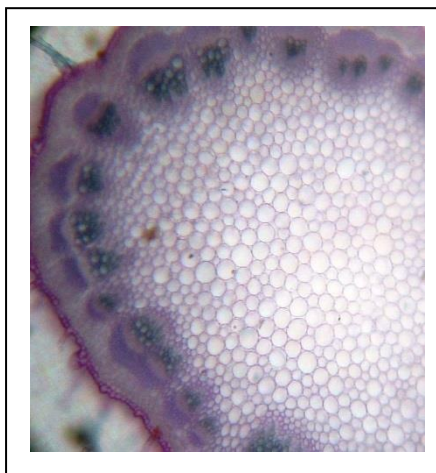
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

I. Résultats

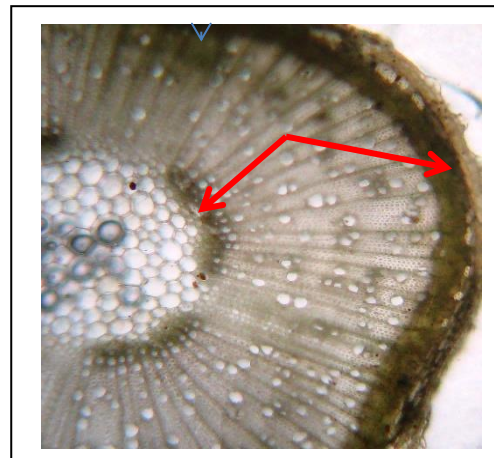
I.1. Criblage phytochimique

I.1.1. Histochimie

Les coupes fines dans les organes frais de *Laggera aurita* et d'*Ocimum americanum* L. ont été effectuées puis colorées aux réactifs spécifiques (Ciulei, 1982). Les coupes histochimiques de tige de *Laggera aurita* L (Figure 16) et *Ocimum americanum* L. (Figure 17) sont données ci-dessous. Les différentes colorations obtenues indiquent la présence des métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les tanins et les alcaloïdes.



(A) Coloration au carmino vert



(B) : coloration au FeCl3 (3%)

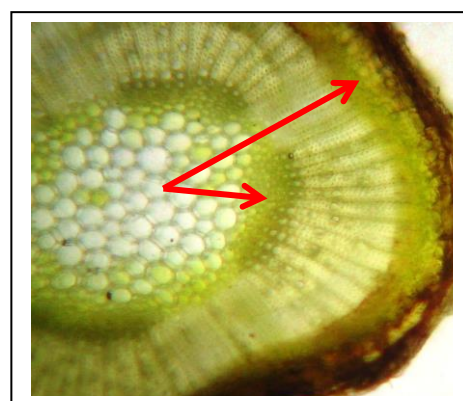
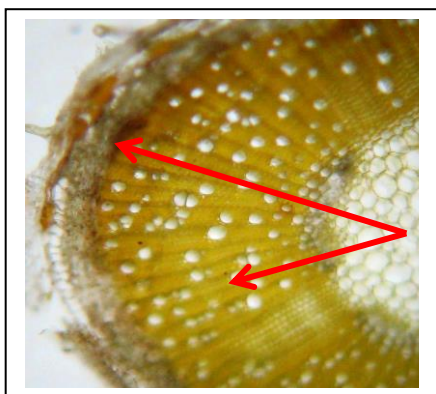
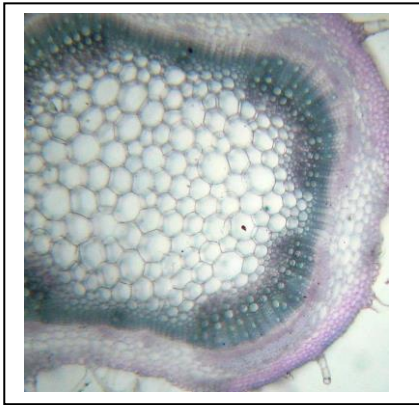
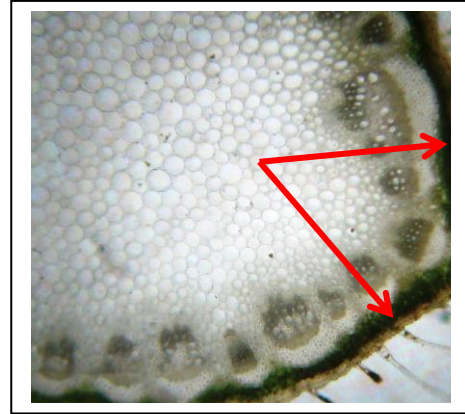


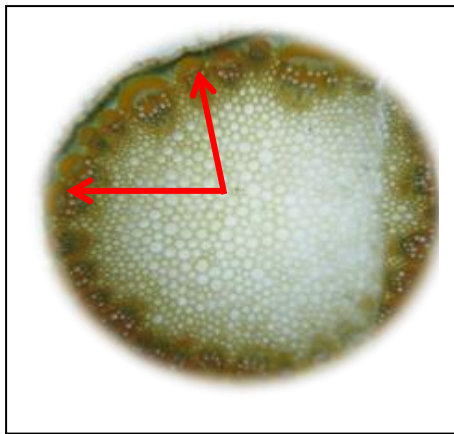
Figure 16: Coupes histochimiques de tige de *Laggera aurita* L. ; A: structure tissulaire secondaire; B: tanins galliques sous épiderme; C: alcaloïdes dans le cylindre; D: flavonoïdes dans les tissus



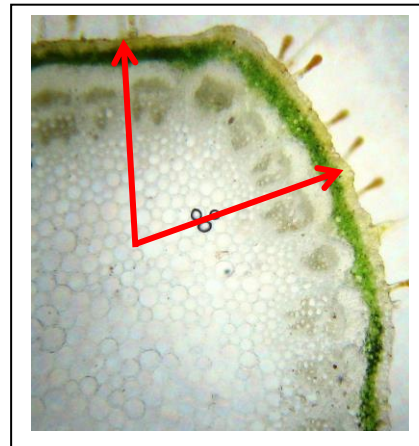
A: Coloration au carmino vert



B: coloration au FeCl₃ (3%)



C: coloration au lugol



D: coloration au NaOH

Figure 17: Coupes histologiques de tige d'*Ocimum americanum* L. ; A: structure tissulaire secondaire ; B : tanins galliques sous épiderme ; C : alcaloïdes dans le cylindre ; D: flavonoïdes dans les tissus

I.1.2.Criblage des différents groupes chimiques

I.1.2.1.Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction de poudres de ces deux plantes dans le mélange éthanol-eau en macération pendant 24 heures, a donné les résultats consignés dans le tableau VI.

Tableau VI: Masses d'extraits secs et rendements des extractions

Matériel végétal sec	<i>Laggera aurita</i> L.	<i>Ocimum americanum</i> L.
Prise d'essai (g)	50	50
Masse extraits secs (g)	4,168	6,859
Rendement (%)	8,33	13,71

De ces résultats, nous notons que *Ocimum americanum* L. présente un rendement d'extraction de 13,71% contre 8,33% pour *Laggera aurita* L., *Ocimum americanum* L. a donc le meilleur rendement d'extraction.

I.1.2.2. Criblage phytochimique

Les tests de caractérisation des différentes familles de molécules réalisés sur les extraits hydroéthanoliques ont donné les résultats consignés dans le tableau VII. Ces tests montrent l'absence des coumarines, des anthraquinones et des cardenolides dans les deux plantes ; une faible présence des stéroïdes/triterpènes dans les extraits hydroéthanoliques d'*Ocimum americanum* L. et des alcaloïdes dans les deux plantes. Par contre les extraits hydroéthanoliques de *Laggera aurita* et d'*Ocimum americanum* L. présentent une forte présence des tanins, des polyphénols et des flavonoïdes ; seul *Laggera aurita* L. contient en outre les stéroïdes et les triterpènes.

Il existe donc plusieurs composés polyphénoliques dans les tiges feuillées de *Laggera aurita* L. et *Ocimum americanum* L. (Tableau VII). Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par des coupes histochimiques précédemment.

Tableau VII: Principaux composés chimiques de deux plantes

Espèces	<i>Laggeta aurita</i> (L.F)	<i>Ocimum americanum</i> L.
	Berth.	var.
Tanins	+	+
Flavonoïdes	+	+
Anthraquinones	-	-
Triterpènes/Stéroïdes	+	+/-
Coumarines	-	-
Alcaloïdes	+	-/+
Saponosides	+	+
Cardenolides	-	-

+ : Présence +/- : Faible - : Absence

I.1.3. Teneurs en composés polyphénoliques

Le dosage des composés polyphénoliques, notamment les polyphénols totaux et les flavonoïdes totaux a été basé sur des réactions de complexation avec les composés recherchés, donnant des complexes absorbant à une longueur d'onde précise permettant de quantifier le complexe résultant.

Les résultats des dosages de ces deux composés polyphénoliques d'*Ocimum americanum* L. sont représentés par la figure 20. Ces dosages ont été effectués contre des courbes étalons d'acide gallique et de quercétine (Figures 18 et 19).

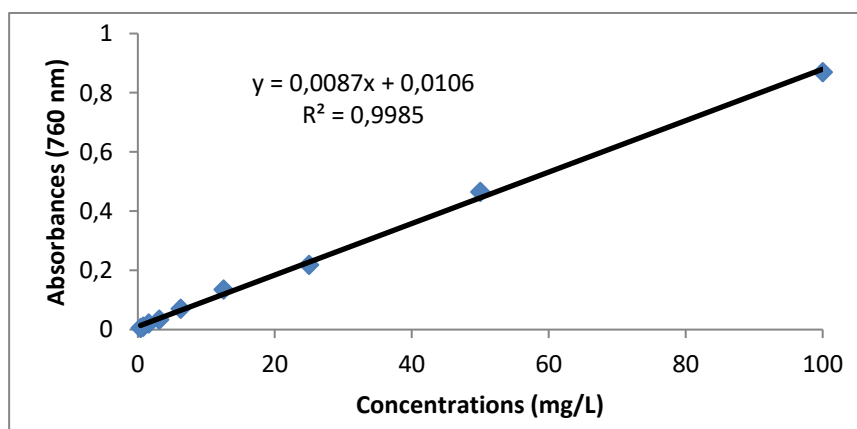


Figure 18: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Dosage des polyphénols totaux).

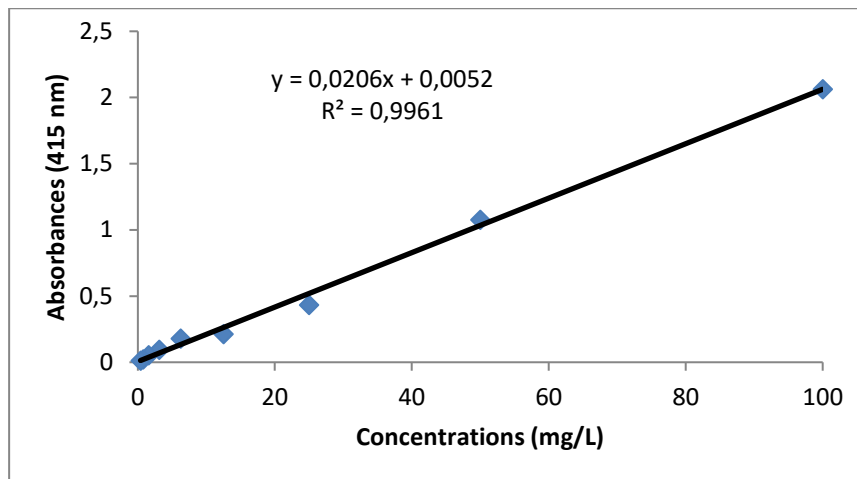


Figure 19: Courbe d'étalonnage de la quercétine (Dosage des flavonoïdes totaux).

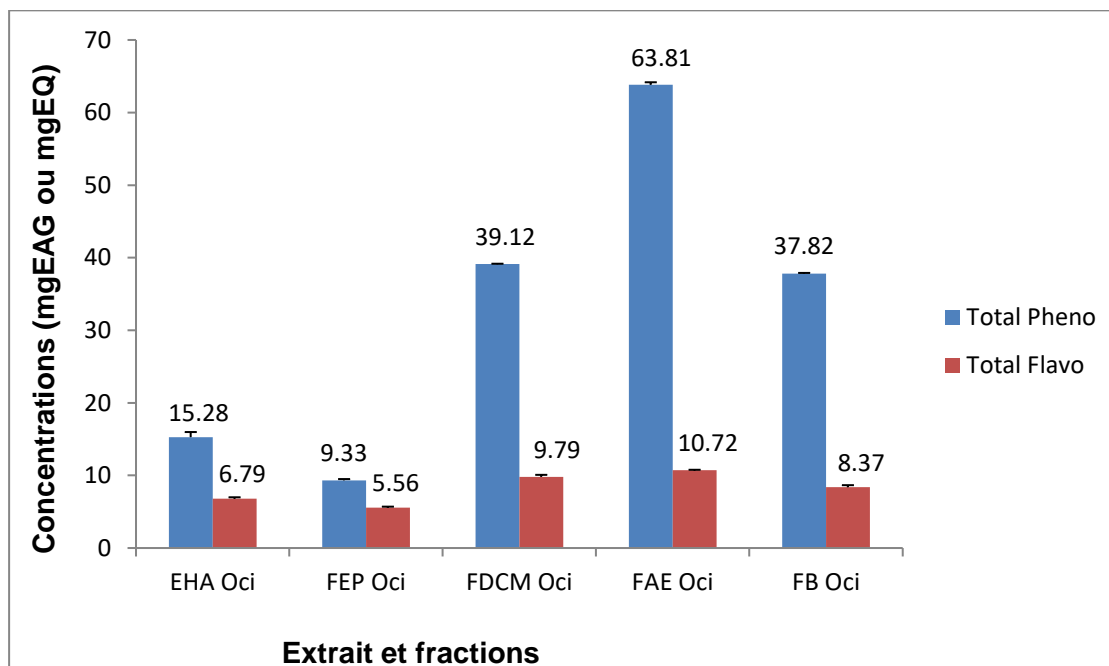


Figure 20: Teneurs en composés polyphénoliques de l'extrait et fractions d'*Ocimum americanum* L.

Nos résultats ont montré que les teneurs en phénols totaux de nos extraits et fractions varient considérablement. La contenance en phénols totaux varie de $63,81 \pm 0,12$ mg EAG/100 mg à $9,33 \pm 0,17$ mg EAG/100 mg.

La plus forte teneur en phénols totaux est détectée dans FAE avec une valeur de $63,81 \pm 0,12$ mg EAG/100 mg, suivi de FDCM à $39,12 \pm 0,05$ mg EAG/100 mg et la plus faible teneur est observée dans la FEP, à $9,33 \pm 0,17$ mg EAG/100 mg.

Quant aux flavonoïdes totaux, leur teneur varie de $10,72 \pm 0,06$ mg EQ/100 mg à $5,56 \pm 0,14$ mg EQ/100 mg. La plus forte teneur est obtenue dans la FAE avec une valeur de $10,72 \pm 0,06$ mg EQ/100 mg, suivi de la FDCM, à $9,79 \pm 0,29$ mg EQ/100 mg. La plus faible teneur est obtenue dans la FEP : $5,56 \pm 0,14$ mg EQ/100 mg.

Nous notons que les extraits hydroéthanoliques ne contiennent pas assez de composés polyphénoliques, par contre seules les FAE et FDCM en contiennent en quantité importante.

Les résultats des dosages de phénols totaux et flavonoïdes totaux de *Laggera aurita* L. sont indiqués dans la figure 21. Les courbes étalons d'acide gallique et de quercétine ont été utilisées comme standards.

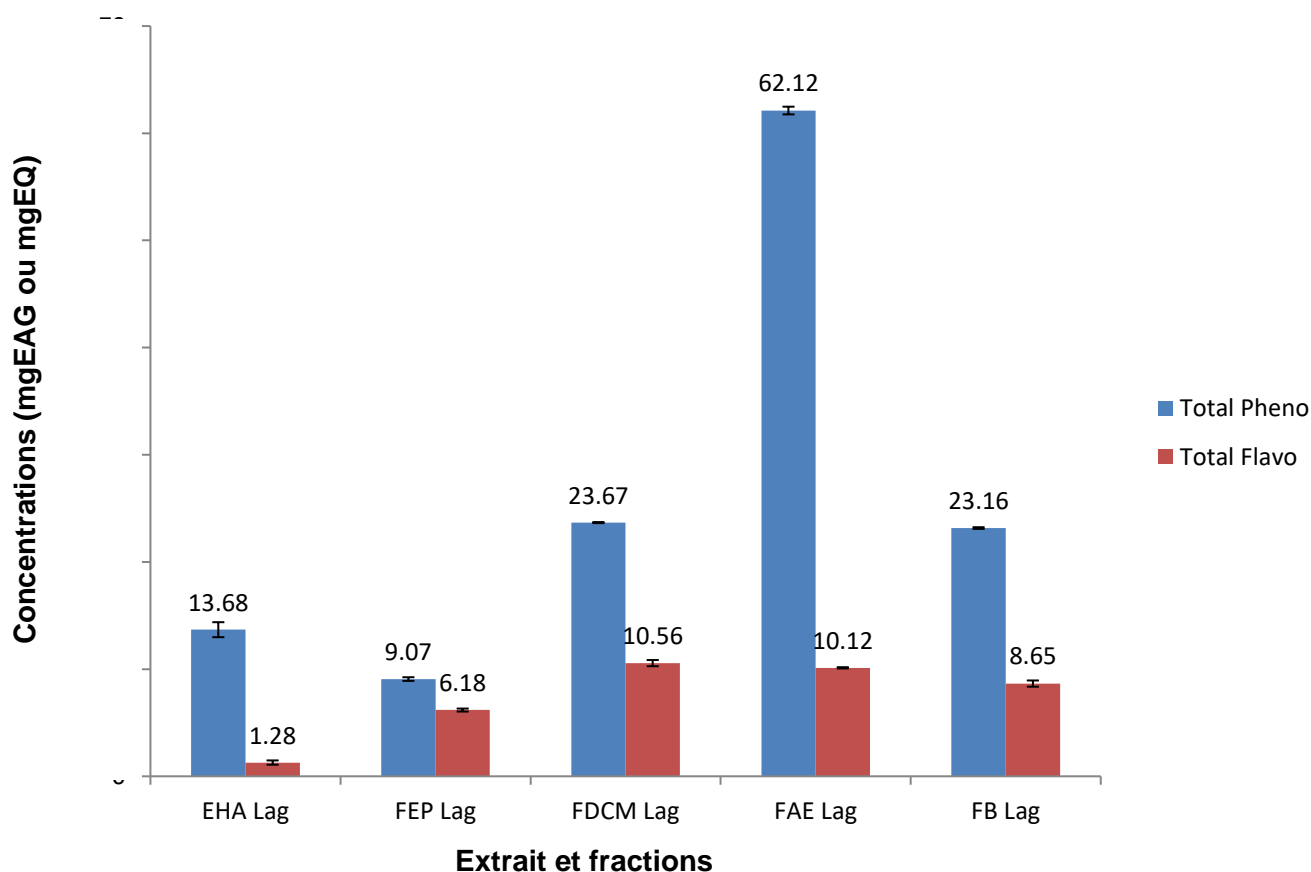


Figure 21: Teneur en composés polyphénoliques des extraits et fractions de *Laggera aurita* L.

Les teneurs en polyphénols totaux de *Laggera aurita* L. d'extraits et des fractions varie de $62,12 \pm 0,68$ mg EAG/100 mg à $9,07 \pm 0,17$ mg EAG/100 mg. La plus forte teneur en

composés phénoliques totaux est détectée dans la FAE avec une valeur de $62,12 \pm 0,68$ mg EAG/100 mg, suivi de la FDCM, à $23,67 \pm 0,05$ mg EAG/100 mg.

La teneur en composés phénoliques totaux la plus faible est obtenue dans FEP, avec une valeur de $9,07 \pm 0,17$ mg EAG/100 mg.

La teneur en flavonoïdes totaux d'extrait et des fractions de *Laggera aurita* L., varie entre $10,56 \pm 0,29$ mg EQ/100 mg et $1,28 \pm 0,20$ mg EQ/100 mg. La plus forte teneur en flavonoïdes totaux est détectée dans la FDCM, dont la valeur est de $10,56 \pm 0,29$ mg EQ/100 mg, suivie de la FAE dont la valeur est de $10,12 \pm 0,06$ mg EQ/100 mg. La plus faible teneur en flavonoïdes totaux est obtenue dans FEP avec une valeur de $1,28 \pm 0,14$ mg EQ/100 mg.

La FAE et la FDCM sont donc les meilleures fractions en composés polyphénoliques alors que les fractions ether de pétrole, en contiennent en faible teneur.

I.1.4. Chromatogramme des sous-fractions d'acétate d'éthyle

Le chromatogramme de sous-fractions d'acétate d'éthyle obtenu par chromatographie sur colonne a donné les résultats suivants :

- pour l'espèce *Ocimum americanum* L., les sous-fractions A montrent trois taches (vert, bleu et jaune), B, trois taches (vert, bleu et jaune), C et D, deux taches (vert et jaune) ;
- pour l'espèce *Laggera aurita* L., les sous-fractions I₂₋₁ présentent trois taches (vert et 2 bleu), I₂₋₂, deux taches (vert et bleu), I₂₋₃ et I₂₋₄, une tache.

Les sous-fractions A et B contiendraient donc de la quercétine (Figure 22).



A B C D Q I₂₋₁ I₂₋₂ I₂₋₃ I₂₋₄

Figure 22: Chromatogramme des flavonoïdes d'*Ocimum americanum* L. et *Laggera aurita* L. ; A, B, C, D : sous fraction d'*Ocimum americanum* L. ; I₂₋₁, I₂₋₂, I₂₋₃, I₂₋₄ : sous fraction de *Laggera aurita* L. ; Q : quercétine

I.2. Discussion

Les analyses phytochimiques d'*Ocimum americanum* L. et de *Laggera aurita* L. ont montré la présence des tanins, des flavonoïdes, des triterpènes/stéroïdes, des alcaloïdes et des saponosides ; ces résultats sont conformes à ceux obtenus par **Weaver et al. (1991)**, **Nacoulma (1996)**, **Roberto (2003)**, **Yang et al. (2006)**.

Les dosages quantitatifs des extraits et fractions de ces deux plantes ont montré des teneurs importantes en flavonoïdes et en phénols totaux, particulièrement dans les fractions acétate d'éthyle d'*Ocimum americanum* L. et dans la fraction dichlorométhane de *Laggera aurita* L..

Cette abondance en composés polyphénoliques dans nos extraits et fractions pourrait justifier l'utilisation en médecine traditionnelle de:

- *Ocimum americanum* L., dans le traitement de troubles de digestifs (**Gurib-Fakim, 1994**), infections urinaires, nephretiques, des diarrhées (**Wome, 1985**) ; ulcère de Buruli (**Yemoa A.L., 2008**). ;
- *Laggera aurita* L., dans le traitement de constipation, de dysentéries, des ulcères phagédéniques par les populations mossi et les IST (**Burkill, 1985 et Nacoulma, 1996**).

Les composés polyphénoliques quantifiés dans ces deux plantes sont des métabolites secondaires synthétisés pendant leur développement (**Pridham, 1960 et Harborne 1993**), mais aussi comme réponse aux conditions de stress tels que les infections. Les polyphénols peuvent intervenir également dans l'absorption et la neutralisation des radicaux libres, l'oxygène singlet et la décomposition des peroxydes (**Conte et al., 2003**). Les polyphénols ont des effets protecteurs sur le processus dégénératif du cerveau (**Conte et al., 2003**) et des propriétés anti-inflammatoires (**Subbaramaiah et al., 1998**).

En outre, les flavonoïdes sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes, vasculoprotectrices, antihépatotoxiques, anti-allergiques, anti-inflammatoires,

antiulcéreuses et même antitumorales significatives (**Ghedira, 2005**). Les flavonoïdes possèdent également des propriétés antimicrobiennes (**Cushnie et al., 2005**).

Les stéroïdes, les triterpènes et les saponosides présentent des activités anti-inflammatoires (**Bruneton, 1993; Lompo et al., 1998**). Il en est de même pour les activités antioxydante (**Liu et al., 2010**) et cytotoxique (**Simon et al., 2003**).

II. Application des phénols totaux et flavonoïdes totaux dans l'activité antioxydante

De nos jours, les antioxydants peuvent s'avérer bénéfiques pour l'organisme. L'activité des composés polyphénoliques attire notre attention du fait de leur rôle potentiel dans la prévention des maladies humaines. L'évaluation de l'activité antioxydante est basée sur la détermination de produits résultant de l'oxydation ou, au contraire, mesurant l'efficacité d'une substance à piéger des radicaux, souvent en donnant une forme H[•] (**Marc et al., 2004**). Des études récentes ont montré qu'il peut y avoir des différences dans la détermination de l'activité antioxydante d'un produit selon la méthode antioxydante utilisée (**Schlesier et al., 2002 ; Nsimba et al., 2008**). Ainsi pour évaluer l'activité anti-oxydante de nos extraits hydroéthanoliques et des fractions de deux plantes, nous avons utilisé trois méthodes: DPPH, ABTS et FRAP. Ces méthodes conduisent aux résultats ci-dessous.

II.1. Résultats

II.1.1. Evaluation du pouvoir réducteur (FRAP).

L'activité antioxydante d'un extrait évaluée par la méthode FRAP se traduit par sa capacité à réduire les ions ferriques (Fe³⁺) en ions ferreux (Fe²⁺) impliquant un transfert d'électrons de la part des composants antioxydants présents dans l'extrait.

La mesure FRAP est utilisée dans cette étude pour évaluer l'activité antioxydante des extraits et fractions de nos deux plantes à travers leur capacité de réduire les ions ferriques en ions ferreux. Cette mesure est évaluée en fonction de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (Figure 23).

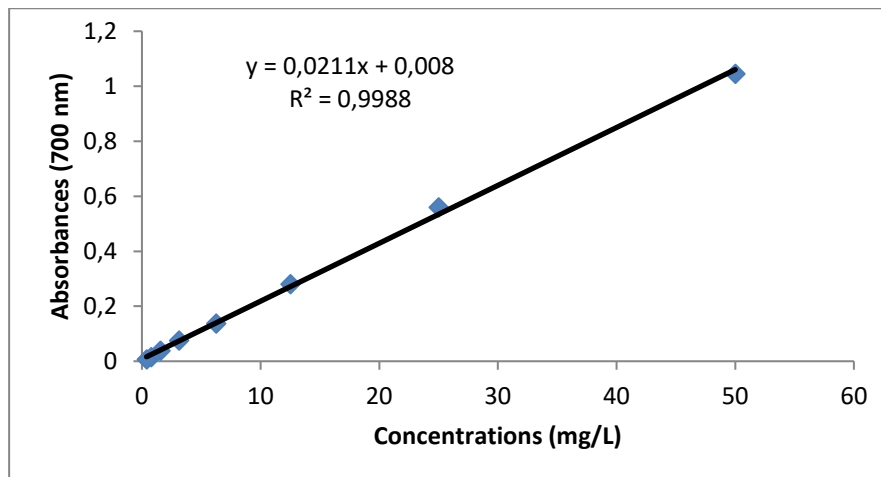


Figure 23: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (FRAP)

Le pouvoir réducteur des extraits hydroéthanoliques de deux plantes a donné les résultats suivants: $3,09 \pm 0,05$ mmol EAA/g d'extrait pour *Ocimum americanum* L. et $1,22 \pm 0,057$ mmol EAA/g d'extrait pour *Laggera aurita* L.

Nous notons que les extraits hydroéthanoliques d'*Ocimum americanum* L., ont donné les meilleurs résultats comparativement à la valeur du contrôle (Trolox) qui a donné $7,46 \pm 3,38$ mmol EAA/g d'extrait.

Le pouvoir réducteur de l'extrait hydroéthanolique d'*Ocimum americanum* L. a donné les résultats suivants: $3,09 \pm 0,05$ mmol EAA/g d'extrait, comparativement à la valeur du contrôle (le Trolox) qui a donné $7,46 \pm 3,38$ mmol EAA/g d'extrait.

Quant au pouvoir reducteur des fractions d'*Ocimum americanum* L., les résultats varient de $0,83 \pm 0,11$ mmol EAA/g d'extrait à $6,54 \pm 0,09$ mmol EAA/g d'extrait. La plus forte valeur a été obtenue avec la fraction acétate d'éthyle suivie de la fraction butanolique et la plus faible valeur a été obtenue avec la fraction éther de pétrole. Le contrôle (Trolox) a donné $7,46 \pm 3,38$ mmol EAA/g d'extrait (Figure 24).

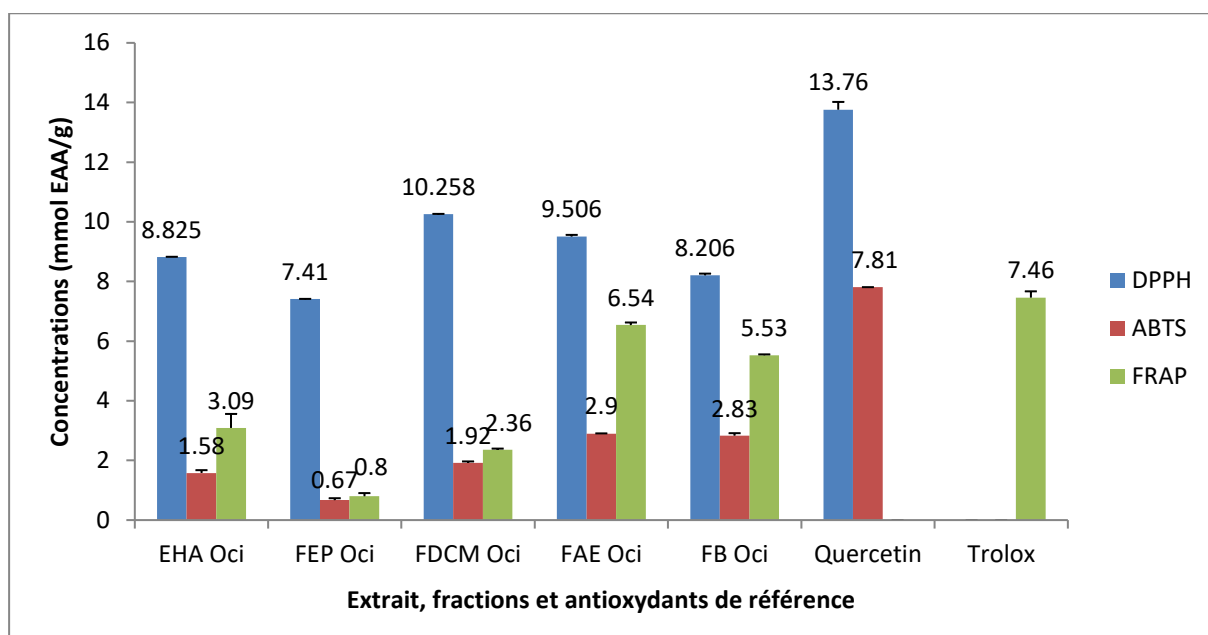


Figure 24: Activité antioxydante de fractions et extraits d'*Ocimum americanum* L.

Le pouvoir réducteur de l'extrait hydroéthanolique de *Laggera aurita* L. a donné $1,22 \pm 0,057$ mmol EAA/g d'extrait. Ses fractions ont donné les résultats qui varient de $1,22 \pm 0,057$ mmol EAA/g d'extrait à $5,99 \pm 0,029$ mmol EAA/g d'extrait. La plus forte valeur a été obtenue avec la fraction acétate d'éthyle suivie de la fraction éther de pétrole et la plus faible valeur a été obtenue avec la fraction dichlorométhane. Le contrôle (Trolox) a donné $7,46 \pm 3,38$ mmol EAA/g d'extrait (Figure 25).

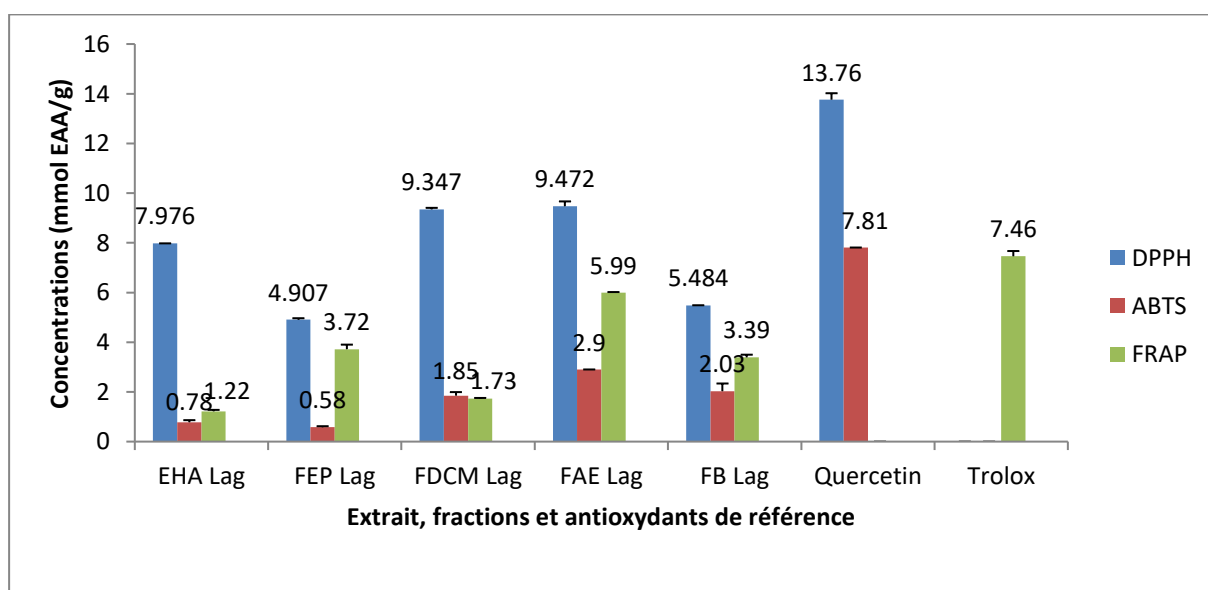


Figure 25: Activité antioxydante de fractions et extraits de *Laggera aurita* L.

Nous constatons ainsi que les extraits hydroéthanoliques et les fractions d'*Ocimum americanum* L. ont donné les meilleures activités antioxydantes par la méthode FRAP comparativement à la valeur du contrôle trolox.

Cependant le pouvoir réducteur des extraits et fractions reste faible comparativement à celui du Trolox qui est un composé pur.

Les études corrélatives entre les phénols totaux et les flavonoïdes totaux dosés dans l'extrait et fractions d'*Ocimum americanum* L. et le pouvoir réducteur du fer ont montré de bonnes corrélations : $r^2 = 0,853$ pour les phénols totaux et $r^2 = 0,713$ pour les flavonoïdes. (Figure 26)

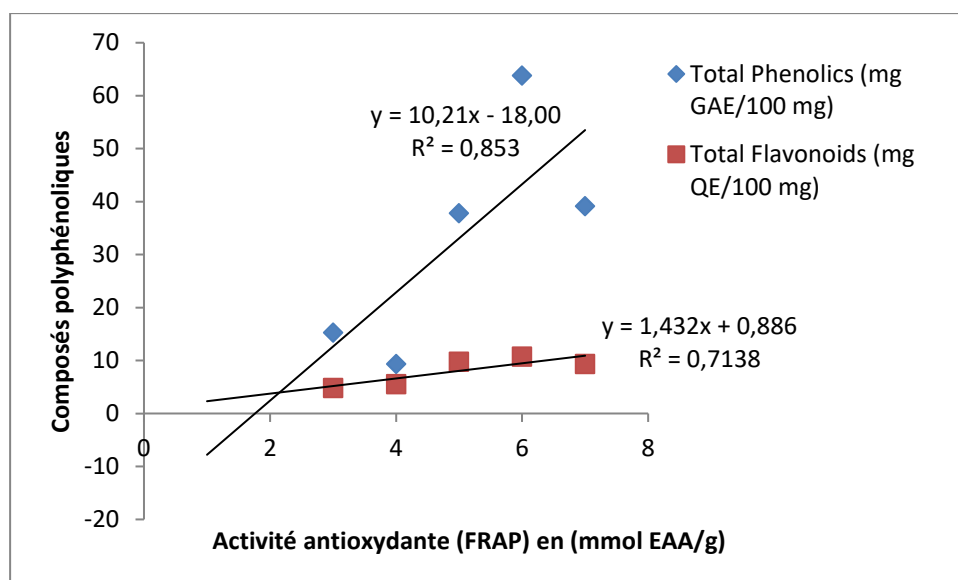


Figure 26: Corrélations entre le pouvoir réducteur du Fer et les teneurs en composés polyphénoliques d'*Ocimum americanum* L.

Les études corrélatives entre les composés phénoliques (phénols totaux et les flavonoïdes) dosés dans l'extrait hydroéthanolique et fractions de *Laggera aurita* L. et le pouvoir réducteur du fer ont montré de faibles corrélations : $r^2 = 0,704$ pour les phénoliques totaux et $r^2 = 0,686$ pour les flavonoïdes. (Figure 27)

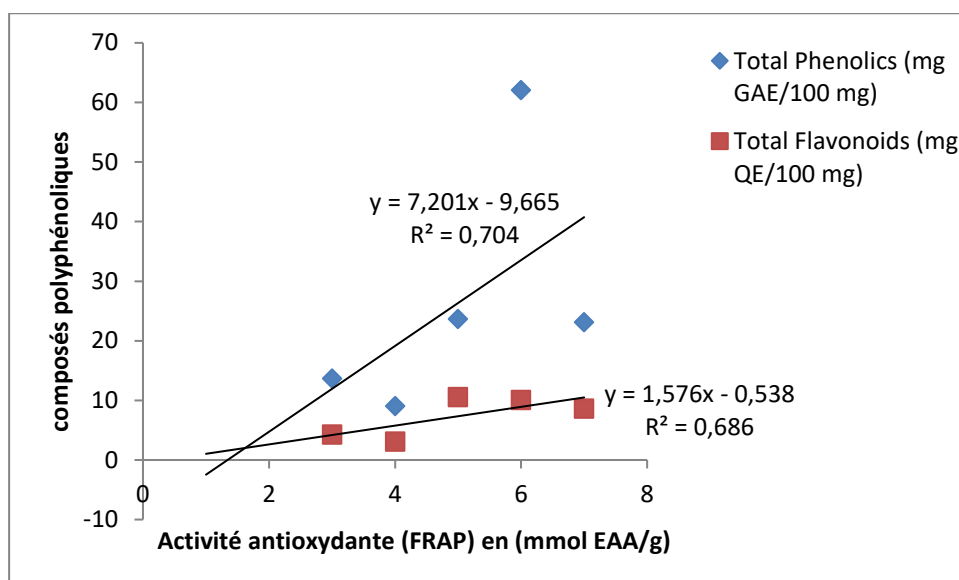


Figure 27: Corrélations entre le pouvoir réducteur du Fer et les teneurs en composés polyphénoliques de *Laggera aurita* L.

II.1.2. Mesure au DPPH

Le DPPH (1,1 diphényl 2 picryl Hydrazil) est un radical libre stable de couleur violette intense. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant, violet, à 517 nm, due à une combinaison des radicaux DPPH.

Lorsqu'une solution de DPPH est mélangée avec une substance qui peut donner un hydrogène, alors cette réaction donne lieu à la forme réduite de couleur jaune pâle résiduelle du groupement picryl encore présent.

Cette méthode a été utilisée pour évaluer le pouvoir antiradicalaire des extraits et fractions de nos deux plantes. Les activités sont déterminées par rapport à une courbe étalon de quercétine et une courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (Figure 28).

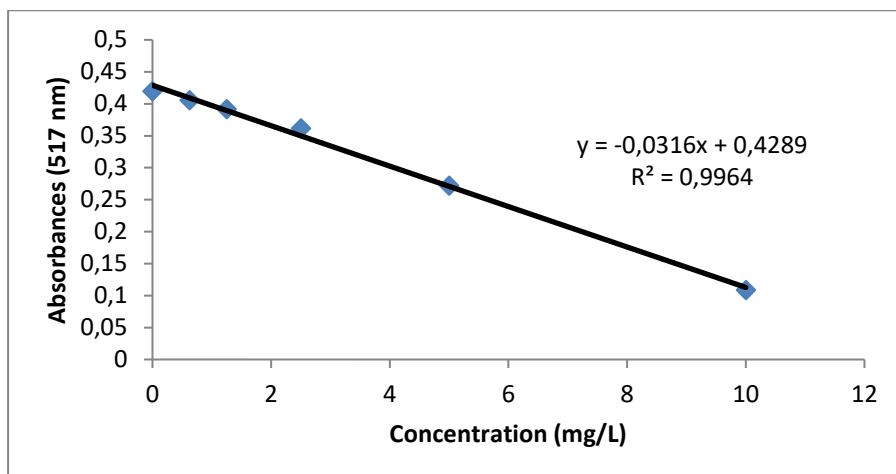


Figure 28: courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (DPPH)

Les résultats des extraits et fractions de ces deux plantes sont consignés dans les figures 24 et 25.

Le pouvoir antiradicalaire des extraits hydroéthanoliques de nos deux plantes varie entre $7,976 \pm 0,01$ mmol EAA/g à $8,825 \pm 0,01$ mmol EAA/g. La plus forte activité a été une fois de plus présentée par *Ocimum americanum* L. et la plus faible par *Laggera aurita* L..

Pour le pouvoir antiradicalaire des fractions d'*Ocimum americanum* L., les résultats varient de $10,258 \pm 0,01$ mmol EAA/g à $7,41 \pm 0,01$ mmol EAA/g.

La plus forte valeur a été obtenue par la fraction dichlorométhane, suivie de la fraction acétate d'éthyle et la plus faible par la fraction éther de pétrole.

Le pouvoir antiradicalaire de *Laggera aurita* L. varie de $4,907 \pm 0,0587$ mmol EAA/g à $9,472 \pm 0,194$ mmol EAA/g. La plus forte valeur a été obtenue par la fraction acétate d'éthyle, suivie de la fraction dichlorométhane et la plus faible, par la fraction éther de pétrole.

Nous notons donc que les fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle de nos deux plantes présentent les meilleures activités antiradicalaires comparativement au composé de référence, la quercétine ($13,76 \pm 0,26$ mmol EAA/g) (Figure 24 et Figure 25).

Les études corrélatives entre les phénols totaux et les flavonoïdes totaux dosés dans l'extrait hydroéthanolique et fractions d'*Ocimum americanum* L. et le pouvoir

antiradicalaire a montré une bonne corrélation : $r^2 = 0,826$ pour les phénols totaux et $r^2 = 0,764$ pour les flavonoïdes totaux. (Figure 29).

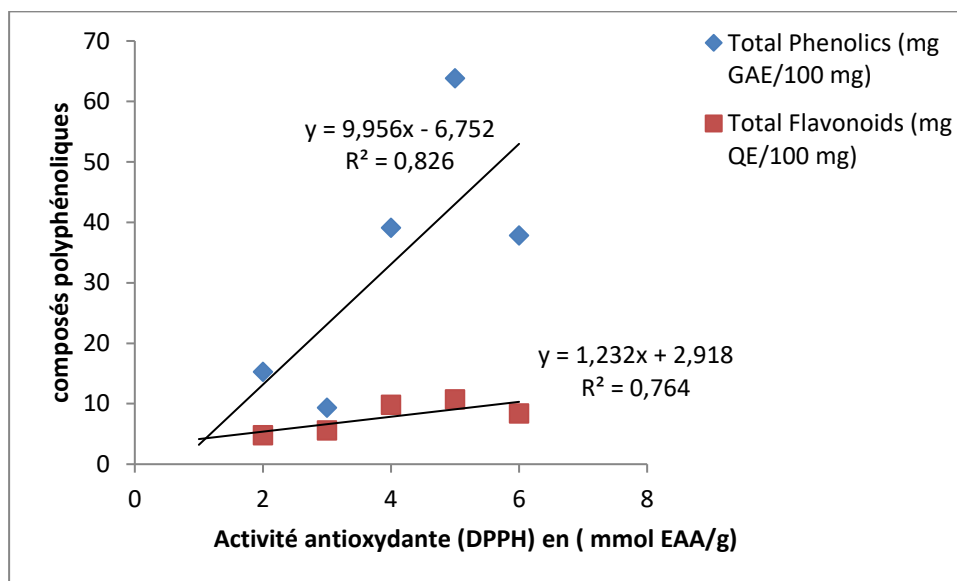


Figure 29: Corrélations entre l'activité antioxydante (DPPH) et les teneurs en composés polyphénoliques d'*Ocimum americanum* L.

Quant à l'espèce *Laggera aurita* L., cette corrélation est faible ($r^2 = 0,695$) pour les phénoliques totaux et pour les flavonoïdes totaux ($r^2 = 0,726$) (Figure 30).

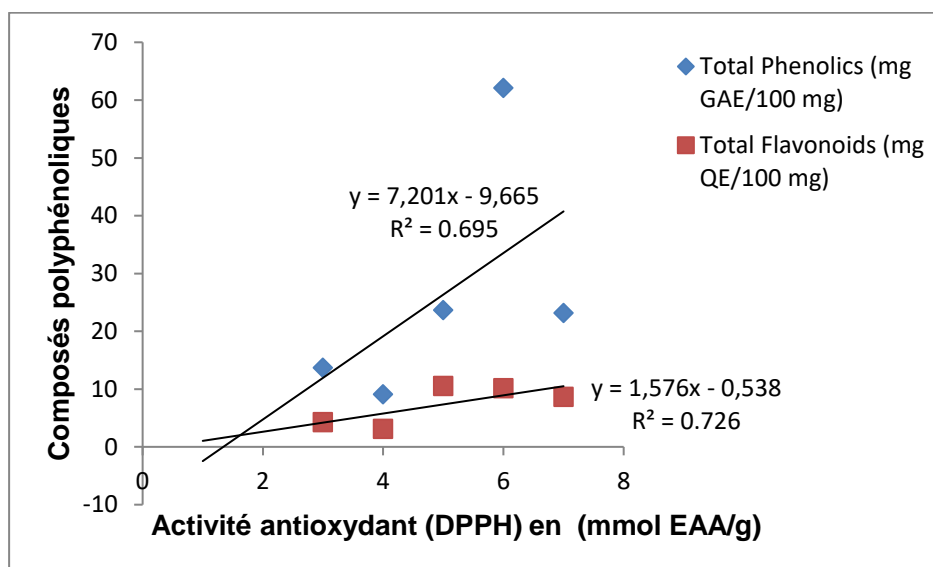


Figure 30: Corrélations entre l'activité antioxydante (DPPH) et les teneurs en composés polyphénoliques de *Laggera aurita* L.

II.1.3. Evaluation de la capacité antioxydante par la méthode ABTS.

La méthode ABTS est basée sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{•+} de coloration bleu-vert en le transformant en ABTS⁺ incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant. Nous avons utilisé cette méthodologie pour la mesure par ABTS des extraits et fractions de nos deux plantes.

Les activités sont évaluées par rapport à une courbe d'étalonnage d'acide ascorbique (figure 31).

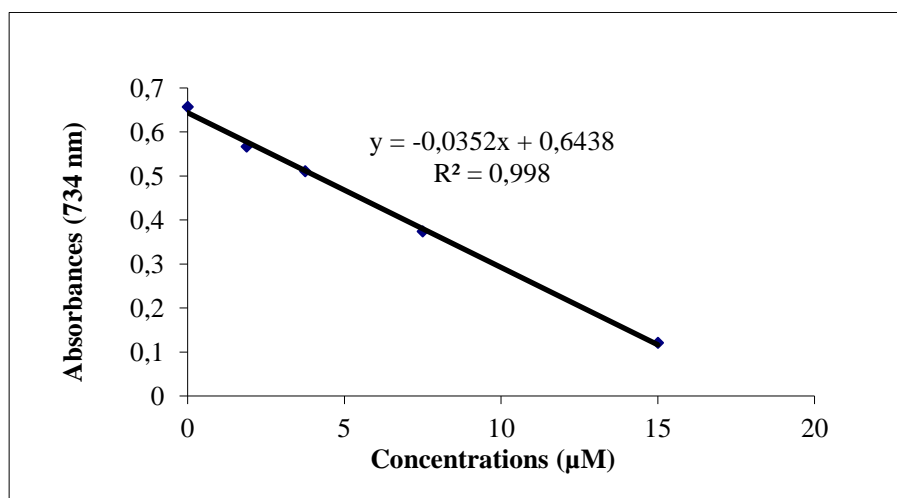


Figure 31: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (ABTS)

Les résultats obtenus sont consignés dans les figures 24 et 25 ci-dessus.

La capacité antioxydante des extraits hydroéthanoliques de nos deux plantes varie de $0,780 \pm 0,083$ mmol EAA/g à $1,58 \pm 0,10$ mmol EAA/g.

Au regard de ces résultats, nous constatons que l'extrait hydroéthanolique d'*Ocimum americanum* L. présente toujours la meilleure capacité antioxydante.

Comparativement aux méthodes précédentes, nous nous rendons compte que les extraits de nos deux plantes présentent une faible capacité antioxydante.

Pour *Ocimum americanum* L. et *Laggera aurita* L., les fractions acétate d'éthyle ont la meilleure capacité, suivie des fractions butanoliques et les fractions éther de pétrole présentent la plus faible capacité antioxydante. Ces valeurs sont comparées à celle du composé de référence, la quercétine ($7,81 \pm 0,21$ mmol EAA g⁻¹).

Les études corrélatives entre les phénols totaux et les flavonoïdes totaux dosés dans l'extrait hydroéthanolique et fractions d'*Ocimum americanum* L. et le pouvoir antiradicalaire a montré une bonne corrélation : $r^2 = 0,884$ pour les phénols totaux et $r^2 = 0,726$ pour les flavonoïdes totaux (Figure 32).

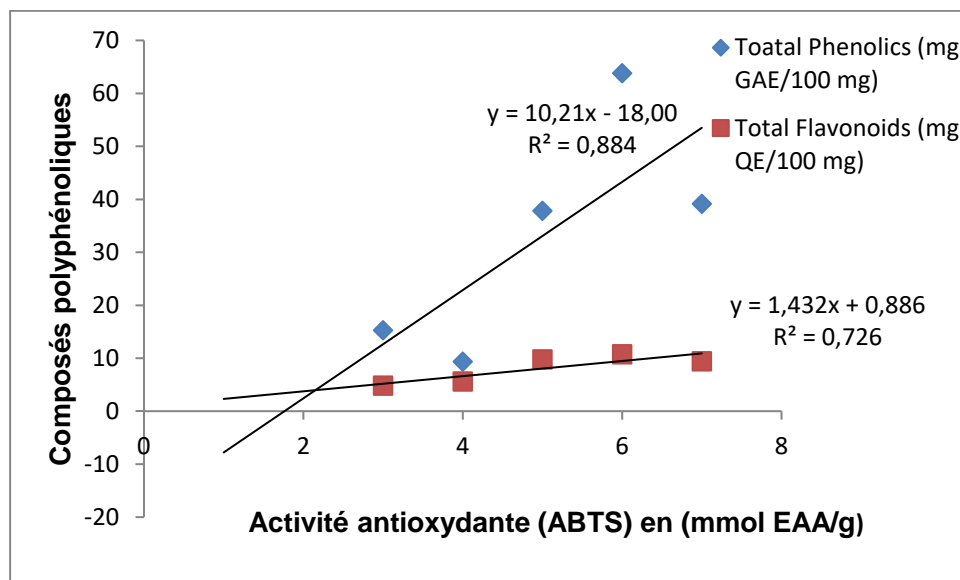


Figure 32: Corrélations entre l'activité antioxydante (ABTS) et les teneurs en composés polyphénoliques d'*Ocimum americanum* L.

Quant à l'espèce *Laggera aurita* L., cette corrélation est faible : $r^2 = 0,696$ les phénoliques totaux et $r^2 = 0,567$ pour les flavonoïdes totaux (Figure 33).

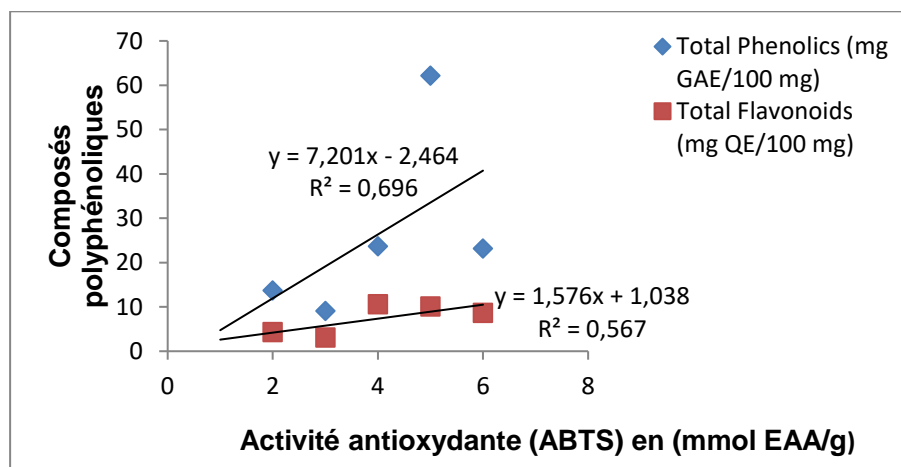


Figure 33: Corrélations entre l'activité antioxydante (ABTS) et les teneurs en composés polyphénoliques de *Laggera aurita* L.

II.2. Discussion

Les trois méthodes utilisées pour la mesure des activités antioxydantes de nos extraits et fractions ont permis une meilleure appréciation de nos résultats.

Au regard des différentes méthodes antioxydantes utilisées, nous pouvons noter qu'il existe un lien entre les composés polyphénoliques et les activités antioxydantes. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par d'autres auteurs (**Anna et al., 2003; Negro et al., 2003; Remandeeep et al., 2005**).

Les composés polyphénoliques ont une part importante dans l'activité antioxydante des plantes. En effet, les composés polyphénoliques tels que les flavonoïdes et les acides phénols sont considérés comme étant les constituants majeurs contribuant à la capacité antioxydante des plantes (**Chung et al., 1998**). Des études ont montré que l'activité antioxydante des extraits de plante est bien corrélée avec leur teneur en composés polyphénoliques (**Velioglu et al., 1998 ; Cai et al., 2004; Djerridane et al., 2006; Li et al., 2008**).

Selon les courbes de corrélations (Figures 26, 27, 29, 30, 32, 33), on pourrait dire que les activités antioxydantes de nos deux plantes seraient surtout dues à l'activité des phénols totaux. En effet, des études ont montré de telles corrélations entre phénols totaux et les activités antioxydantes (**Dibala et al., 2014**).

Mais il convient aussi de noter que l'activité des flavonoïdes pourrait être aussi masquée par d'autres composés polyphénoliques. C'est ce qui justifierait leurs faibles corrélations entre la capacité antioxydante et les composés polyphénoliques.

Aussi, dans la même logique, nous remarquons cependant une bonne corrélation entre le pouvoir réducteur et les composés polyphénoliques (Figures 26 et 27). En effet, selon **Miliauskas et al. (2004)**, les composés phénoliques contribuent au pouvoir réducteur du fer.

En outre, selon **Kahkonen et al. (1999)**, les phénols de végétaux constituent un groupe important de composés qui agissent comme antioxydants primaires ou piègeurs de radicaux libres en raison de leurs groupes hydroxyles qui contribuent directement à l'action antioxydante (**Diplock et al., 1997**). Les composés phénoliques sont des

donneurs d'hydrogène efficaces, ce qui les rend de bons antioxydants (**Rice-Evans et al., 1997**).

Par ailleurs, l'activité antioxydante des composés phénoliques est principalement due à leurs propriétés redox qui jouent un rôle important en tant que piègeurs de radicaux libres des agents réducteurs.

Enfin, les composés polyphénoliques pourraient jouer un rôle important dans la stabilisation de l'oxydation des lipides ; ils sont aussi associés aux activités antioxydantes et peuvent contribuer directement au processus antioxydatif (**Duh et al., 1999**). Les composés polyphénoliques possèdent diverses activités biologiques comme les activités anti-inflammatoires, anti-carcinogéniques et anti-athéroscléroses. Ces activités pourraient être reliées à leur activité antioxydante (**Chung et al., 1998**). Pour **Tanaka et al. (1998)**, la prise quotidienne d'au moins 1 g de composés polyphénoliques dans un régime riche en fruits et en légumes présenterait des effets inhibiteurs sur la mutagenèse et la carcinogenèse dans l'organisme. Nos résultats montrent effectivement l'intérêt de l'utilisation de nos extraits dans le traitement de maladies gastro-entériques.

III. ACTIVITES ANTI-BACTERIENNES

III. 1.1. Diamètre des zones d'inhibitions

Dans la présente étude, dix souches bactériennes à savoir *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella infantis*, *salmonella oranienburg*, *Salmonella nigeria*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus* MADM 1291, *Bacillus cereus* NYH 391-98, *Listeria monocytogènes* 057, *Listeria monocytogènes* Scott A, constituées des bactéries Gram négatifs (6), des bactéries Gram-positifs (4), un antibiotique classique, la gentamicine ont été utilisés.

Les tests de sensibilité de ces dix souches bactériennes vis à vis des fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle permettent de déterminer les diamètres de zones d'inhibitions.

Pour l'espèce *Ocimum americanum* L., la sensibilité des souches bactériennes varie en fonction de la nature de la fraction.

Bacillus cereus NYH 391-98 (Kd), *Yersinia enterocolitica* (Ye) et *Bacillus cereus* MADM 1291 (Bc) ayant respectivement les valeurs de diamètres de zones d'inhibitions $17,5 \pm 1,41$ mm, $17,5 \pm 0,7$ mm et $16,5 \pm 0,7$ mm, sont les souches bactériennes les plus sensibles à la fraction dichlorométhane.

Yersinia enterocolitica (Ye), *Listeria monocytogenes* Scott A (Lm2), *Listeria monocytogenes* 057 (Lm1), *Bacillus cereus* NYH 391-98 (Kd) et *Bacillus cereus* MADM 1291 (Bc) ayant respectivement pour valeur de diamètre de zones d'inhibitions $20 \pm 1,41$ mm, $20 \pm 1,41$ mm, $18,5 \pm 1,41$ mm, $18,5 \pm 0,71$ mm et $18 \pm 0,71$ mm, sont les souches bactériennes les plus sensibles à la fraction acétate d'éthyle.

Les souches bactériennes *Salmonella typhimurium*, *Salmonella infantis*, *Salmonella nigeria*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* Scott A et *Yersinia enterocolitica* résistent à la gentamicine (Figure 34).

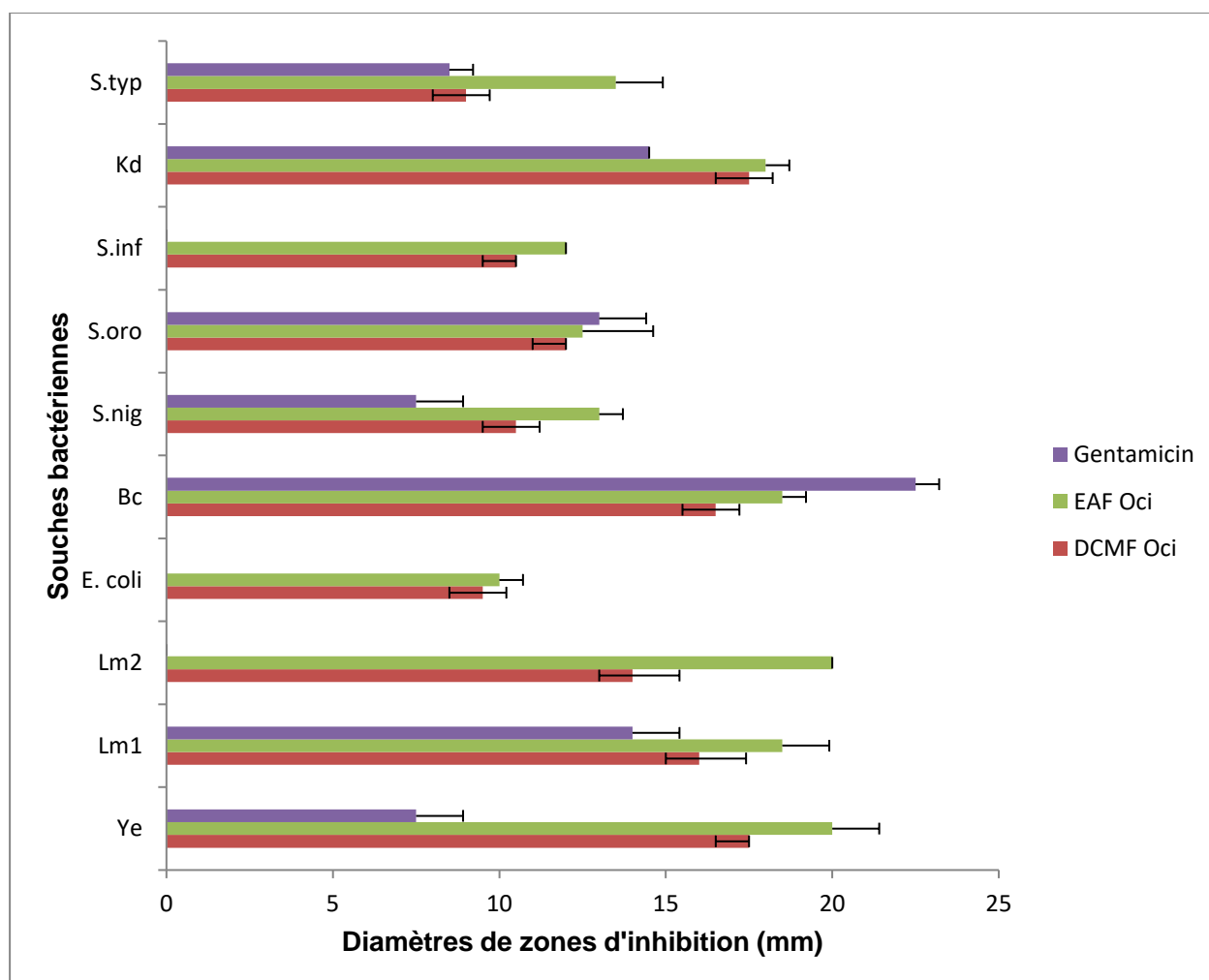


Figure 34: Diamètres de zones d'inhibitions des fractions dichlorométhane, acétate d'éthyle d'*Ocimum americanum* L. et de la gentamicine sur les souches bactériennes d'origine alimentaire multi-résistantes

Pour l'espèce *Laggera aurita* L., la sensibilité des souches bactériennes est également fonction de la fraction utilisée ; les souches bactériennes les plus sensibles à la fraction dichlorométhane sont *Listeria monocytogenes* 057, *Bacillus cereus* MADM 1291, *Yersinia enterocolitica* et *Bacillus cereus* NYH 391-98 avec respectivement les diamètres de zones d'inhibitions $17\pm 0,47$ mm, $13,5\pm 1,3$ mm, $13\pm 1,28$ mm et $12,5\pm 0,71$ mm. Celles ayant une sensibilité à la fraction acétate d'éthyle sont *Bacillus cereus* MADM 1291, *Yersinia enterocolitica* et *Bacillus cereus* NYH 391-98 avec respectivement les valeurs de diamètres de zones d'inhibition $20\pm 0,33$ mm, $18\pm 1,28$ mm et $16,5 \pm 0,71$ mm.

Les souches bactériennes *Listeria monocytogenes* Scott A, *Escherichia coli* et *Salmonella nigeria* sont résistantes à la gentamicine (Figure 35).

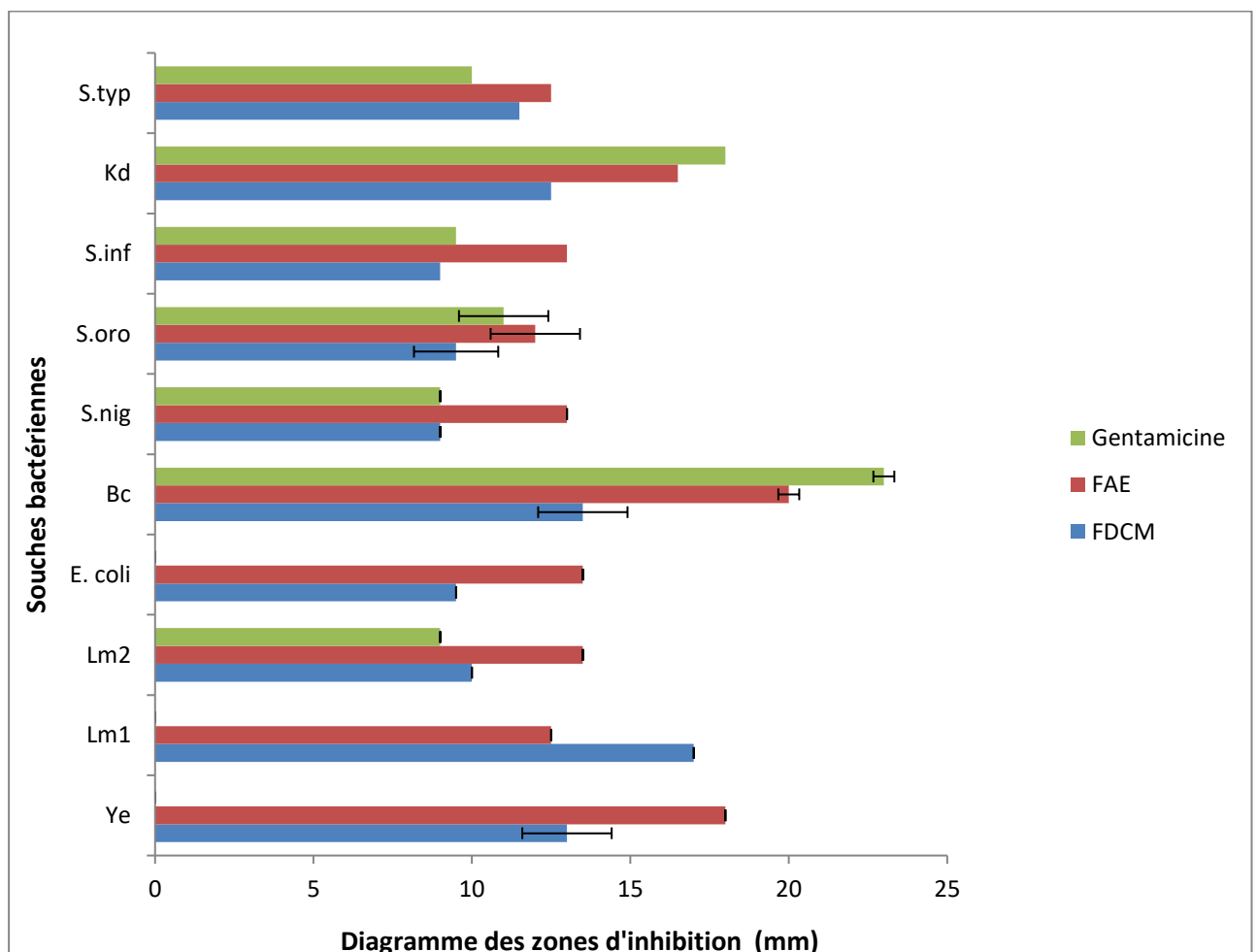


Figure 35: Diamètres de zones d'inhibitions des fractions dichlorométhane, acétate d'éthyle de *Laggera aurita* L. et de la gentamicine sur les souches bactériennes d'origine alimentaire multi-résistantes

III.1.2. Concentrations Minimales Inhibitrices et Concentrations Minimales Bactéricides

Les Concentrations Minimales Inhibitrices des fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle d'*Ocimum americanum* L. et de *Laggera aurita* L. sont consignées dans les tableaux VIII et IX.

Pour l'espèce *Ocimum americanum* L., les valeurs de CMI des fractions varient de 31,25 µg/ml à 500 µg/ml. La meilleure Concentration Minimale Inhibitrice a été obtenue avec la fraction acétate d'éthyle combinée à la gentamicine, suivie de la fraction dichlorométhane combinée à la gentamicine.

Les valeurs de Concentration Minimale Inhibitrice les plus élevées ont été observées avec la gentamicine seule et la fraction dichlorométhane (Tableau VIII).

Tableau VIII: Concentration Minimale Inhibitrice (µg/ml) de fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle d'*Ocimum americanum* L. et ses combinaisons à la gentamicine

	S.typ	Lm 2	S.oro	S. nig	Ye
Gentamicine	500	250	125	500	500
FDCM seule	500	250	250	500	500
FAE seule	250	125	125	250	250
FDCM+Gentamicine	125	62,5	125	125	250
FAE + Gentamicine	62,5	31,25	31,25	125	125

Pour l'espèce *Laggera aurita* L., les valeurs de Concentration Minimale Inhibitrice des fractions varient de 31,25 µg/ml à 500 µg/ml. La meilleure Concentration Minimale Inhibitrice a été obtenue avec la fraction acétate d'éthyle combinée à la gentamicine sur

les souches bactériennes *Salmonella typhimurium* et *Salmonella oranienburg*, suivi de la combinaison fraction dichlorométhane + gentamicine (Tableau IX).

Tableau IX: Concentration Minimale Inhibitrice ($\mu\text{g/ml}$) de fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle de *Laggera aurita* L., ses combinaisons à la gentamicine.

	Lm2	S.typ	S.oro	S.inf	S.nig
Gentamicine	500	250	250	500	500
FDCM seule	250	125	125	250	250
FAE seule	250	125	125	125	125
FDCM+Gentamicine	125	62,5	62,5	62,5	125
FAE+Gentamicine	125	31,5	31,25	62,5	62,5

Les résultats de la Concentration Minimale Bactéricide d'*Ocimum americanum* L. et *Laggera aurita* L. sont représentés dans les tableaux X et XI.

La Concentration Minimale Bactéricide de la fraction dichlorométhane et de la fraction acétate d'éthyle d'*Ocimum americanum* L., varie de 62,5 $\mu\text{g/ml}$ à $>1000\mu\text{g/ml}$. La fraction acétate d'éthyle combinée à la gentamicine a présenté les meilleures valeurs de Concentration Minimale Bactéricide sur les souches bactériennes, *Listeria monocytogenes* 057 et *Salmonella oranienburg* (Tableau X).

Tableau X: Concentration Minimale Bactéricide ($\mu\text{g/ml}$) de fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle d'*Ocimum americanum* L., ses combinaisons à la gentamicine.

	S.typ	Lm2	S.oro	S.nig	Ye
FDCM seule	>1000	1000	1000	>1000	>1000
FAE seule	1000	250	500	1000	1000
FDCM+Gentamicine	250	125	250	500	1000
FAE+Gentamicine	125	62,5	62,5	250	250

La Concentration Minimale Bactéricide des fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle varie de 62,5 $\mu\text{g/ml}$ à >100 $\mu\text{g/ml}$ en fonction de la souche bactérienne alimentaire multi-résistance. Les fractions acétate d'éthyle combinées à la gentamicine ont présenté les meilleures valeurs de Concentration Minimale Bactéricide, suivies de fractions dichlorométhane combinées à la gentamicine. Les fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle ont présenté les valeurs de Concentrations Minimales Bactéricides les plus élevées (Tableau XI).

Tableau XI: Concentration Minimale Bactéricide ($\mu\text{g/ml}$) de fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle de *Laggera aurita* L. et ses combinaisons à la gentamicine.

	LM2	S.typ	S.oro	S.inf	S.nig
FDCM seule	>1000	500	500	1000	>1000
FAE seule	1000	500	500	500	500
FDCM+Gentamicine	500	125	125	250	500
FAE+Gentamicine	250	62,5	62,5	125	125

III.1.3. Pouvoir bactéricide et bactériostatique

L'effet bactéricide et bactériostatique ont été déterminés en utilisant le rapport CMB/CMI.

Pour l'espèce *Ocimum americanum* L., la combinaison acétate d'éthyle + gentamicine présente un effet bactéricide sur *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Salmonella oranienburg*, *Salmonella nigeria* et *Yersinia enterocolitica*. Parcontre, la fraction dichlorométhane présente un effet bactériostatique sur *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Salmonella oranienburg*, *Salmonella nigeria* et *Yersinia enterocolitica*.

La combinaison dichlorométhane + gentamicine présente un effet bactéricide sur les *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogènes* Scott A et *Salmonella oranienburg* et un effet bacteriostatique sur *Salmonella nigeria* et *Yersinia enterocolitica* (Tableau XII).

Tableau XII: Capacité bactericide et bactériostatique des fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle d'*Ocimum americanum* L.

	S.typ	Lm2	S.oro	S.nig	Ye
FDCM seule	-	-	-	-	-
FAE seule	-	+	+	-	-
FDCM+Gentamicine	+	+	+	-	-
FAE+Gentamicine	+	+	+	+	+

+: effet bactéricide (CMB/CIM = 1 ou 2) -: effet bactériostatique (CMB/CMI = 4 ou 16).

Pour l'espèce *Laggera aurita* L., la combinaison de la fraction acétate d'éthyle + gentamicine a un effet bactéricide sur *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Salmonella oranienburg*, *Salmonella infantis*, *Salmonella nigeria*. Parcontre les fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle présentent un effet bactériostatique. La combinaison de la fraction dichlorométhane + gentamycine présente un effet bactéricide sur *Salmonella typhimurium* et *Salmonella oranienburg* et un effet bactériostatique sur *Listeria monocytogenes* Scott A, *Salmonella infantis* et *Salmonella nigeria* (Tableau XIII).

Tableau XIII: Capacité bactericide et bactériostatique des fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle de *Laggera aurita* L.

	LM2	S.typ	S.oro	S.inf	S.nig
FDCM seule	-	-	-	-	-
FAE seule	-	-	-	-	-
FDCM+Gentamicine	-	+	+	-	-
FAE+Gentamicine	+	+	+	+	+

+: effet bactéricide (CMB/CIM = 1 ou 2) –: effet bactériostatique (CMB/CMI = 4 ou 16).

Qu'ils s'agissent des fractions combinées d'*Ocimum americanum* L. et *Laggera aurita* L., l'effet bactéricide est donc prépondérant sur toutes les souches bactériennes multi-résistantes d'origine alimentaire ; nous notons cependant un effet bactériostatique lorsque les fractions sont prises seules.

III.1.4. Evaluation de l'Indice de Fraction de la Concentration Inhibitrice (*FIC – index*) de la fraction riche en flavonoïdes

L'indice de Fraction de la Concentration Inhibitrice (*FIC – index*) exprime le degré de synergie pour l'association de la fraction riche en flavonoïdes et la gentamicine en mesurant pour chaque fraction la réduction de sa CMI lorsqu'elle est associée à la gentamicine.

$$FIC_{index} = \frac{CMI \text{ fract. riche en flavo associée à la gentam.}}{CMI \text{ de la fraction riche en flavo.}} + \frac{CMI \text{ de la genta. associée à la frac. riche en flavo}}{CMI \text{ de la genta.}}$$

$$FIC_a = \frac{CMI \text{ de la fraction acétate d'éthyle associée à la gentamicine.}}{CMI \text{ de la fraction d'acétate d'éthyle}}$$

$$FIC_a = \frac{CMI \text{ de la fraction acétate d'éthyle associée à la Gentamicine}}{CMI \text{ de la fraction acétate d'éthyle.}}$$

$$FIC_b = \frac{CMI \text{ de la fraction acétate d'éthyle associée à la Gentamicine}}{CMI \text{ de la Gentamicine.}}$$

$$\text{et } FICI = FIC_a + FIC_b,$$

a = fraction riche en flavonoïdes ; b = Gentamicine.

F.I.C. index a été interprétée comme suit:

- Un effet synergique lorsque $FICI \leq 0,5$;
- Un effet additif ou indifférent lorsque $0,5 < FICI < 1$;

- Et un effet antagoniste lorsque $FICI > 1$.

La fraction riche en flavonoïdes est la fraction acétate d'éthyle.

Pour l'espèce *Ocimum americanum* L., le calcul des Indices de Fraction de la Concentration Inhibitrice démontrent un effet synergique sur deux souches (Lm2 et S. oro) et un effet additionnel sur trois autres souches (S.typ, S nig et Ye) (Tableau XIV).

Tableau VII: Combinaison fraction acétate d'éthyle de *Ocimum americanum* L. + gentamicine in vitro sur 5 souches bactériennes alimentaires multi-résistantes

	S.typ	Lm2	S.oro	S.nig	Ye
FICa	0,250	0,250	0,250	0,500	0,500
FICb	0,125	0,125	0,250	0,250	0,250
FICI	0,375	0,375	0,500	0,750	0,750
Effet	Additif	Synergique	Synergique	Additif	Additif

Pour l'espèce *Laggera aurita* L., les indices de Fraction de la Concentration Inhibitrice ($FIC - index$) révèlent un effet additionnel sur trois souches (Lm2, S.inf et S. nig) et un effet synergique sur deux autres souches (S.typ et S.oro) (Tableau XV).

Tableau XV: Combinaison fraction acétate d'éthyle de *Laggera aurita* L. + gentamicine in vitro sur 5 souches bactériennes alimentaires multi résistantes

	LM2	S.typ	S.oro	S.inf	S.nig
FICa	0,50	0,250	0,50	0,50	0,50
FICb	0,250	0,125	0,125	0,125	0,125
FICI	0,750	0,375	0,375	0,625	0,625
Effet	Additif	Synergique	Synergique	Additif	Additif

III-2- Discussion

Au regard de nos résultats nous pouvons dire que les fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle riches en composés polyphénoliques ont une activité antibactérienne sur neuf souches bactériennes multi-résistantes d'origine alimentaire utilisées pour cette étude (**Dibala et al., 2014**).

En effet, les études antérieures ont montré que les composés polyphénoliques induisent une inhibition bactérienne sur un spectre très large de microorganismes. Les phénols totaux, les flavonoïdes totaux étant les constituants majeurs de plantes possèdent des activités antioxydante (**Karou et al., 2005 ; Annagowda et al., 2010**) et antibactérienne (**Igbinosa et al., 2009**). De plus, Les phénols totaux sont bien connus comme étant des métabolites secondaires ayant les propriétés antiseptiques (**Shah et al., 2005**). D'autres métabolites secondaires rencontrés dans nos deux espèces, à savoir les composés terpéniques, les tanins et les flavonoïdes sont également connus pour leur activité antibactérienne (**Cowan et al., 1999 ; Machado et al., 2002**).

L'activité antibactérienne des flavonoïdes est due à leur capacité à former des complexes avec les protéines extra-membranaires solubles de la paroi cellulaire bactérienne alors que celle des tanins est liée à leur capacité d'inactiver les sites d'adhésions des enzymes ou des protéines de l'enveloppe cellulaire bactérienne. (**Cowan et al., 1999**). En outre les tanins peuvent réaliser des polymérisations lors des réactions d'oxydations, ce qui pourrait avoir des effets de toxicité des souches microbiennes. (**Gibbons et al., 2003 ; Scalbert et al., 1991 ; Shan et al., 2007**).

En effet, le mécanisme de toxicité des polyphénols contre les souches microbiennes pourrait s'expliquer par l'action des enzymes hydrolytiques telles que les protéases et les carbohydrases.

Les résultats montrent également que des fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle d'*Ocimum americanum* L. et de *Laggera aurita* L. sont capables d'inhiber les bactéries Gram-positifs telles que *Bacillus cereus* (Kd), *Bacillus cereus* (Bc), *Listeria monocytogenes* (Lm2) et *Listeria monocytogenes* (Lm1). Par contre les bactéries Gram-négatifs (*Escherichia coli*, *Salmonella nigeria*, *Salmonella typhimurium*) résistent aux fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle de nos deux plantes et à la Gentamicine.

Ces résultats sont confirmés par les études antérieures (**Cowan et al., 1999 ; Kelmanson et al., 2000 ; Zongo et al., 2010**) montrant que les bactéries Gram-positifs présentent une meilleure sensibilité vis-à-vis des composés phénoliques de plantes.

La résistance des bactéries Gram-négatifs aux fractions acétate d'éthyle et dichlorométhane de nos deux plantes pourrait être liée à la surface hydrophile de la membrane extérieure, riche en molécules de lipopolysaccharide (LPS), présentant une barrière à la pénétration de nombreuses molécules d'antibiotiques. Cette surface est également associée aux enzymes dans l'espace périplasme, qui sont capable de décomposer les molécules introduites et d'empêcher l'accumulation des extraits organiques sur les cellules cibles (**Reynalds et al., 1996 ; Gao et al., 1999 ; Nostro et al., 2000 ; Bezic et al., 2003 et Lopez et al., 2005**).

Cette membrane externe empêche certains médicaments et des antibiotiques à pénétrer à l'intérieure de la cellule, ce qui explique la raison pour laquelle les bactéries Gram négatifs sont généralement plus résistantes aux antibiotiques que les bactéries Gram-positifs. La sensibilité la plus élevée de *Bacillus cereus* peut être due à cette structure de la paroi cellulaire externe de la bactérie (**Nikaido et al., 1996 et Zaika et al., 1998**).

Nous constatons également que les fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle de nos deux plantes sont plus sensibles à certaines souches bactériennes que la Gentamicine, médicament standard. Selon une étude (**Tomas-Barberan et al., 1990**), un degré probable de lipophilie due aux interactions entre les constituants de la membrane et l'agencement des extraits pourrait être responsable de l'activité antibactérienne la plus élevée que celle du médicament standard utilisé, la gentamicine.

Cette étude a montré un lien entre la concentration de composés phénoliques dans les fractions et leur activité antibactérienne. Nos résultats corroborent avec ceux de **Shan et al., 2007**.

E. coli a été la souche bactérienne non sensible aux fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle de nos deux plantes.

La synergie de la fraction acétate d'éthyle et la Gentamicine a été vérifiée pour deux souches sur 5 souches testées. Dans les trois autres souches, nous avons noté un effet additif.

L'association de la fraction acétate d'éthyle et la Gentamicine est donc favorable. Elle pourra être envisagée pour répondre aux problèmes de résistances qui apparaissent pour d'autres familles d'antibiotiques.

Donc les souches bactériennes testées positives justifient l'usage traditionnel de ces deux plantes et confirme leur activité thérapeutique anti-diarrhéique: *Salmonella*, *Escherichia coli* et *Bacillus* sont des germes très souvent impliqués dans les toxi-infections alimentaires.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La présente étude a porté sur deux espèces, *Laggera aurita* L. et *Ocimum americanum* L. qui appartiennent respectivement à la famille des Asteraceae et à celle des Lamiaceae, deux familles les plus importantes dans la flore Burkinabé. Elle a permis de mettre en évidence à travers un criblage phytochimique, la présence des tanins, des flavonoïdes, des alcaloïdes, des stéroïdes/triterpènes et des saponosides dans les deux plantes.

Le dosage des phénols totaux et des flavonoïdes totaux des extraits et fractions de ces de ces plantes a révélé des teneurs considérables dans les extraits hydro-éthanoliques et des fortes teneurs dans les fractions acétate d'éthyle et dichlorométhane. Les extraits et fractions d'*Ocimum americanum* L. contiennent les teneurs les plus élevées en composés polyphénoliques par rapport à ceux de *Laggera aurita* L..

L'étude de l'activité antioxydante des extraits et fractions des deux plantes a montré que tous les extraits et fractions possèdent un pouvoir antioxydant considérable. Les fractions dichlorométhane et acétate d'éthyle présentent une forte activité antioxydante comparativement aux autres extraits. De plus l'activité antioxydante des deux plantes est bien corrélée avec leur teneur en composés phénoliques. Les composés phénoliques seraient essentiellement responsables de l'activité antioxydante des extraits et fractions obtenues à partir de ces plantes.

Les composés polyphénoliques particulièrement abondants dans les fractions acétate d'éthyle et dichlorométhane des plantes seraient responsables des propriétés antioxydantes, justifiant ainsi leur utilisation traditionnelle au Burkina Faso. Cette partie de l'étude montre l'intérêt qu'attachent les tradipraticiens sur les deux plantes dans le traitement de maladies gastro-entériques.

En ce qui concerne le pouvoir antibactérien des fractions des deux plantes et de leurs combinaisons avec la Gentamicine sur les bactéries multi-résistantes d'origine alimentaire, les données obtenues montrent que les souches bactériennes : *Salmonella typhimurium*, *Salmonella nigeria* et *Salmonella oranienburg* sont résistantes à la Gentamicine seule. Mais les associations fractions dichlorométhane-Gentamicine d'une part et fractions acétate d'éthyle-Gentamicine d'autre part présentent une meilleure activité antibactérienne.

Certaines souches bactériennes présentent une résistance à la gentamicine, pouvant intervenir par le biais d'un ensemble de mécanismes non exclusifs (mutation de la cible de l'antibiotique, modification de l'antibiotique et réduction de la perméabilité membranaire). Cela constitue un handicap pour le traitement des maladies. Cette partie de l'étude démontre l'intérêt du recours à une association synergique. Ces deux plantes présentent une activité antibactérienne, pouvant effectivement justifier leurs utilisations traditionnelles dans le traitement de maladies gastro-entériques.

Les deux espèces sont donc riches en métabolites secondaires, notamment les composés phénoliques qui peuvent être extraits pour lutter contre les bactéries responsables des toxi-infections alimentaires. Le présent travail devra cependant être poursuivi en vue de purifier et caractériser les composés phénoliques responsables des activités biologiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abeer M., Haj A. and Sanaa O. Y. (2007).** Anti-microbial Activity of *Acacia nilotica* extracts against some bacteria isolated from clinical specimens. *Res. J. Med. Plant.*, 1: 25-28.
- AHVONEN P. (1972).** Human yersiniosis in Finland: II. Clinical features. *Ann. Clin. Res.*, 4: 39-48.
- Al-Fatimi M., Wurster M., Schroder G. and Lindequist U. (2007).** Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *J. Ethnopharmacol.*, 111: 657-666.
- Alho H. and Leinonen J. (1999).** Total antioxidant activity measured by chemiluminescence method. *Methods Enzymol.*, 299: 3-15.
- Ali Mohamed Kaoua, Valerie Mahiou-Leddet, Sébastien Hutter, Sidi Ainouddine, Said Hassani, Ibrahim Yahaya, Nadine Azas and Evelyne Ollivier (2007).** Antimalarial activity of crude extracts from nine African medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 74-83.
- Aluko B.T., Oloyede O.I. and Afolayan A.J. (2013).** Polyphenolic contents and free radical scavenging potential of Extracts from leaves of *Ocimum americanum* L. *Pakistan Journal of Biological Science*, 16: 22-30.
- Amat-Rose J. M. (1997).** Dynamiques porteuses de risque en Europe, *Letter de l'infectiologue*, 12: 326-327.
- Aneta W., Jan O. and Renata C. (2007).** Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food. Chem.*, 105: 940-949.
- Anna M.N., Riitta P.P., Marjukka A. and O.C. Kirsi-Marja (2003).** Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food. chem.*, 81: 485-493.

- Annagowda H.V., Ween Nee C., Mordi M.N., Ramanathan S. and Mansor S.M. (2010).** Evaluation of phenolic content and antioxidant property of hydrolysed extracts of *Terminalia catappa* L. leaf. *Asian J. Plant Sci.*, 9: 479-485.
- Arkininstall, W. (1979).** Medicinal and useful plants collected in the manianga district of the Republic of Zaïre *Revue de recherche scientifique. Sp Institut de Recherche scientifique.*
- Arora A., Sairam R. and Srivastava G. (2002).** Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 82: 1227-1238.
- Aubry P. (2013).** Diarrhée infectieuse, Actualité. *Med. Trop.*
- Baba Moussa F., Akpagana K. and Bouchet P. (1998).** Comparaison de l'activité antifongique des feuilles et écorces de tronc de *Pteleopsis suberosa* G. don (Combretaceae). *Acta botanica gallica*, 145: 223-288.
- Bachi B.B. and Rothrer S. (2002).** Factors influencing methicillin resistance in Staphylococci. *Arch. Microbiol.*, 178: 165–171.
- Bartosz G. (2003).** Generation of reactive oxygen species in biological systems, *Comments on Toxicology*, 9: 5-21.
- Bassene E., Mahamat B., Lo M., Boye C.S. and Faye B. (1995).** Comparaison de l'activité antibactérienne de trois Combretaceae: *C. micranthum*, *Guiera senegalensis* et *Terminalia avicennioïdes*. *Fitoterapia*, 66: 86-87.
- Beecher G. R. (2003).** Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake, *J. Nutri.*, 133: 3248-3254.
- Belanger A. and al. (1994).** Compositions chimiques d'huiles essentielles de plantes aromatiques du Burkina Faso, *Rivista Italiana, Gennaio 95, n° spéciale.*

- Benbrook C.M. (2005).** Accroître la teneur en antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques. Rapport sur des connaissances scientifiques. The organic Center for Education and Promotion, 45.
- Berche P., Gaillard J.L. and Simonet M. (1988).** In nosocomial infections caused by bacteria and their prevention in bacteriology edited by, *Flammarion Medicine Sciences*, 57: 64-71.
- Berhaut J. (1954).** Flore du Sénégal. Brousse et jardin, éd. Clairamque Dakar, 170.
- Bezic N.M., Dinkic S.V. and Radonic A. (2003).** Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* L. essential oil. *Phytother. Res.*, 17: 1037-1040.
- Birt D.F., Hendrich S. and Wang W. (2001).** Dietary agents in cancer prevention: Flavonoids and isoflavonoids, *Pharmacol. Ther.*, 90: 157-177.
- Bladt, Sabine (1996).** Plant drug analysis: A thin layer chromatography Atlas. second edition Springer-Verlag Munich.
- Bossard E. (1996).** Quelques notes sur l'alimentation et les apports nutritionnels occultes en Angola. Garcia de Orta., Sér. Bot., Lisboa, 13: 7-41.
- Bouayed J.(2007).** *Etude de la corrélation anxiété / statut oxydatif des granulocytes chez la souris et évaluation des effets antioxydants / neuroactifs des polyphénols extraits de Prunus domestica L. Prunus domestica L.* Thèse de doctorat, Université de Paul Verlaine-Metz. pp. 10 -74.
- Boudjellal K. (2009).** Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Elaeagnus angustifolia* L. Mémoire de Magister Université de Batna. Pp. 9-30.

- Bounatirou S., Smiti S., Miguel M.G., Faleiro L., Rejeb M.N., Neffati M., Costa M.M., Figueiredo L., Barroso J.G. and Pedro L.G. (2007).** Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oil isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff, *Food Chemistry*, 105: 146-155.
- Braca A., Sortino C., Politi M., Morelli I. and Mendez J. (2002).** Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*, *J. Ethnopharmacol.*, 79: 379-381.
- Bravo L. (1998).** Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, 56: 317-333.
- Bruneton J. (2009).** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Techniques et Documentation. 4ème Ed. Lavoisier. Paris, pp. 443-444.
- Bruneton J. (1999).** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Techniques et Documentation. 3ème Ed. Lavoisier. Paris, pp. 199-388.
- Bruneton J. (1993).** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Techniques et Documentation. 2ème Ed. Lavoisier. Paris, pp. 274-285.
- Buisson Y. (2001).** Les diarrhées, un problème de santé publique. *Med. Trop.*, 61 p. 205-209.
- Burkill H.M. (1985).** The useful plants of West/Tropical Africa. Royal Botanic Gardens Kew, 1: 452-453:481.
- Butkhup L. and Samappito S. (2011).** In vitro free radical scavenging and antimicrobial activity of some selected thai medicinal plants. *Res. J. Med. Plant.*, 5: 254-265.

Cakir A., Mavi A., Yilddirim A., Duru M.E., Harmandar M. and Kazaz C. (2003).

Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fraction. *J. Ethiopharmacol.*, 87: 73-83.

Chingu S. and Brandt L.J. (1995). *Escherichia coli* 0157: H7 infection in humans.

Am. Intern. Medic., 123: 698-713.

Ciulei I. (1982). Practical manuals on the industrial utilization of chemical and

aromatic plants. Methodology for analysis of vegetable drugs Ed. ministry of chemical industry, Bucharest; pp: 67.

Cowan M.M. (1999). Plants products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*;

12: 564-582.

Cragg G.M., Newman D.J. and Snader K.M. (1997). Natural products in drug

discovery and development, *J Nat Prod.*, 60: 52-60.

Cronquist A. (1988). The evolution and classification of flowering plants,

Sd édition NYBG.555 p.

Sai D.K.S. and Babu A.V.S. (2011). Antioxidant and Antimicrobial Activity of

Ocimum americanum. PHARMANEST - *An International Journal of Advances In Pharmaceutical Sciences*, 2: 211-218.

Daniel M. (2006). Medicinal Plants. Chemistry and Properties. *Science Publishers*,

USA, pp: 1-9.

Dibala I.C., Konaté K., Diao M., Ouédraogo M. and Dicko H.M. (2014).

Phytoconstituents analysis, antioxidant capacity and antimicrobial properties of extracts from *Laggera aurita* L. (Asteraceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6: 172-178.

- Di Carlo G., Mascojo N., Izzo A.A. and Capasso F. (1999).** Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sci.*, 65: 337-53.
- DICKO, Mamoudou. H., GRUPPEN, H., TRAORE, A. S.; van BERKEL, W. J. H. and VORAGEN, A. G. J. (2006).** Review: phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 1: 20-37.
- Diplock A.T (1997)** Will the good fairies please prove to us that vitamin E lessens human degenerative disease. *Free Radic. Res.*, 27: 511-532.
- Donatien Kaboré, Hagrétou Sawadogo-Lingani, Mamoudou H. Dicko, Bréhima Diawara and Mogens Jakobsen (2012).** Acid resistance, bile tolerance and antimicrobial properties of dominant lactic acid bacteria isolated from traditional “maari” baobab seeds fermented condiment, *African Journal of Biotechnology* , 11: 1197-1206
- Duh P.D., Tu Y.Y.and G.C. Yen (1999)** Antioxidative activity of water extracts of Hamg jyr (*Chrysanthemum morifolium*), *Lebnesmittel-Wissenschaft Technol.*, 32: 269-277.
- Farnsworth N R, Akelere O., Bingel A.S., Soejarto D.D. and Guo Z. (1985).** Medicinal plants in therapy. *WHO Bull*, 63: 965-981.
- Farrukl, A., I. Ahmad and Z. Mehmood (2006)** Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used Indian medicinal plant. *Turk. J. Biol.*, 30: 177-183.
- Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, *Actualité chimique*, pp: 108-115.
- Farber J. M. (1998).** The presence of *Listeria* spp in raw milk, *Ca. J. Microbiol.*, 34:95-100.

- Ferhat M. and Lahouaou I. Kadi.A. (2009).** Recherche de substances bioactives de l'espèce *Centaurea microcarpa* Coss et Dur. Mémoire de DES Université de M'SILA. Pp.17-31.
- Fouché G.P., Marquet A. et Hambuckers A. (2000).** Les plantes médicinales: de la plante au médicament. Exposition temporaire de 19.09 au 30.09.2000. http://www.memoireonline.com/01/13/6764/m_Contribution
- Gao X., Ohlander M., Jeppsson N., Bjork L. and Trajkovski V. (2000).** Changes in antioxidant effects and their relationships to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation, *J. Agric. Food. Chem.*, 48: 1485-1490.
- Ghedira K. (2005).** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois thérapeutiques, *Phytothérapie*, 3: 162-169.
- Gibbons S. (2003).** An overview of plant extracts as potential therapeutics. *Expert Opin. Therapeutic Patent*, 13: 489-497.
- Gill N.S., Bajwa J., Sharma P., Dhiman K. and Sood S. (2011).** Evaluation of antioxidant and antiulcer activity of traditionally consumed Cucumis melo seeds, *J. Pharmacol. Toxicol.*, 6: 82-89.
- GUINKO S. (1988).** Connaissance des arbres et arbustes du Burkina Faso par les langues vernaculaires, Université de Ouagadougou. <http://www.jardinsdumonde.org/fr/ressources-en-ligne/documents>
- Gurib-Fakim, Ameenah et Joseph Guého (1994).** Plantes médicinales de l'île Rodrigues Stanley, Rose-Hill. Editions de l'océan indien-Université de Maurice (Réduit), 580 p.
- Harborne J.B. (1988).** The flavonoids, advances in research since 1980. Ed. Chappman et Hall. London.

- Havsteen B. H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacol. Therapeutics*, 96: 67-202.
- Hennebelle T. (2006).** *Investigation chimique et chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants. Marrubium peregrinum, Ballota laredana, Ballota Pseudodictamnus (Lamiacées) et Lippia alba (Verbenacées).* Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat Chimie Organique et Macromoléculaire. Université des Sciences et Technologique de Lille, Lille 1. Ecole Doctorale Sciences de la Matière du rayonnement et de l'Environnement France.
- Hinnebourg I., Damien Dorman H.J. and Hiltunen R. (2006).** Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices, *Food Chemistry*, 97: 122-129.
- Hoffman D.L. (1987).** The Herb User's Guide. Thomson Publishing Group, Wellingborough, London.
- Hong X.Y., Wan M., Dong H., But P.P.H. and Foo L.Y. (2000).** Inhibitory activity of flavonoids and tannins against HIV-1 protease, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23: 1072-1076.
- Hooper D.C. (2001).** Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg. Infect. Dis.*, 7: 337-341.
- Igbinosa O.O., Igbinosa E.O. and Aiyegoro O.A. (2009).** Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from *Jatropha curcas* (Linn). *Afr. J. Pharm. Pharm. Pharmacol.*, 3: 58-62.
- Kabera J., Koumaglo K. H., Ntezurubanza L., Ingabire M.G. et Kamagaju L. (2005).** Caractérisation des huiles essentielles d'*Hyptis spicigera* Lam., *Pluchea ovalis* (Pers.) DC. et *Laggera aurita* (L.F.) Benth. Ex. C.B. Clarke, plantes aromatiques du tropicales, *In série Sciences exactes, naturelles et appliquées, Etudes Rwandaise* 10 : 7-18.

- Kahkonen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.P., Pihlaja K., Kujala T.S. and Heinonen M.(1999).** Antioxidant activity of plant extract containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 447: 3954-3962.
- Kanoun K. (2011).** Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine) Mémoire de Magister Université de Tlemcen. pp. 26-49.
- Karou D, Dicko H.M, J. Simporé J. and Traoré A.S. (2005)** Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *Afr. J. Biotechnol.*, 4: 823-828.
- Kaur, S.J., Grover, I.S. and Kumar, S. (2000).** Modulatory effects of tannin fraction isolated from *Terminalia arjuna* on the genotoxicity of mutagens in *Salmonella typhimurium*. *Food and Chemical Toxicology*, 38: 1113-1119.
- Kelmanson J. E., Jager A.K. and van Staden Zulu J. (2000).** Medicinal plants with antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.*, 69: 241-246.
- Kerharo J. (1974).** Pharmacopée Sénégalaise traditionnelles: plantes médicinales et toxiques, édition vigot frères Paris, 224 p.
- Keskas N. (2011).** Effet scavenger des radicaux oxygénés et inhibiteur de la xanthine Oxydoreductase des extraits de *Cachrys libanotis* .L Mémoire de Master Université de SETIF p18 -31.
- Kiessoun Konaté, Jacques François Mavoungou, Alexis Nicaise Lepengué, Raïssa R.R. Aworet-Samseny, Adama Hilou, Alain Souza, Mamoudou H. Dicko and Bertrand M'Batchi (2012).** Antibacterial activity against β - lactamase producing Methicillin and Ampicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination *BMC, Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 11:18 doi:10.1186/1476-0711-11-18.

- Kini Félix (2008).** *Etude phytochimique des feuilles de Odontonema strictum (Nees) kuntze, acclimatée au Burkina Faso.* Thèse Doctorat ès-Sciences physiques, Université de Ouagadougou ; 117 p.
- Koehler-Ramonatxo C. (2006).** Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases, *Nutrition Clinique et Métabolique*, 20: 165-177.
- Koleva I.I., van Beek T.A., Linssen J.P.H., de Groot A. and Evstatieva L.N. (2002).** Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study of three testing methods. *Phytochemical Analysis*, 13: 8-17.
- Konaté K., Hilou A., Mavoungou J.F., Lepengué A.L., Souza A., Barro N., Datté J.Y., M'Batchi B. and Nacoulma O.G. (2012)** Antimicrobial activity of polyphenol-rich fractions from *Sida alba* L. (Malvaceae) Against cotrimoxazol-resistant bacteria strains, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 11:5. doi:10.1186/1476-0711-11-5.
- Kueny-Stotz M. (2008)** *Contribution à la chimie des flavonoïdes : élaboration de squelettes flavylium sophistiqués, nouvelle voie d'accès aux flavan-3-ols et aux proanthocyanidines.* Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat en Chimie organique, Université Louis Pasteur-Strasbourg, France.
- Kumar G.S., Jayaveera K.N., Kumar C.K.A., Sanjay U.P. and Swamy B.M.V. (2007).** Antimicrobial effects of Indian medicinal plants against acne-inducing bacteria. *Tropical J. Pharmaceutical Res.*, 6:717-723.
- Kumarasamy Y., Cox P.J., Jaspars M., Nahar L. and Sarker S.D. (2002).** Screening seeds of Scottish plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.*, 83: 73-77.
- Lahouel, M., Amedah, S., Zellagui, A., Touil, A., Rhouati, S., Benayache, F., Leghouchi, E. and Bousseboua H. (2006).** The interaction of new plant flavonoids with rat liver mitochondria: relation between the anti and prooxydant effect and flavonoids concentration. *Thérapie*, 61: 347-355.

Lamien-Meda A., Lamien C.E., Compaoré M.M.Y., Meda R.N.T., Kiendrebeogo, M., Zeba B., Millogo J.F. and Nacoulma O.G. (2008). Polyphenol content and

antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso.

Molecules, 13: 581-594.

Li P., Anu H., Jari S., Teijo Y. and Heikki V. (1999). TLC method for evaluation of

free radical scavenging activity of rapeseed meal by video scanning technology, *Chemistry and Nutrition*, 10: 123-187.

Lopez P., Sanchez C. and Batlle Nerin C. (2005). Solid and vapor-phase

antimicrobial activities of six essential oils. Susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *J. Agr. Food Chem.*, 53: 6939-6946.

Lugasi A., Hovari J., Sagi K.V. and Biro L. (2003). The role of antioxidant

phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta. Biologica Szegediensis*, 1(4): 119-125.

Maamri S. (2008). Etude de *pistacia atlantica* de deux régions de sud algérien :

dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens. Mémoire de Magister Université de BOUMERDES. pp.10-57.

Machado T.D., Leal I.C.R., Maral A.C.F.A., dosSantos K.R.N., daSiva M.G. and Kuster R.M. (2002). Antimicrobial ellagic tannin of *Punica granatum* fruits. *J. Brazilian*

Chem. Soc., 13: 606-610.

Makoi J.H.J.R. and Ndakidemi P.A. (2007). Biological, ecological and agronomic

significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the

symbiotic legumes, *African Journal of Biotechnology*, 6: 1358-1368.

Manabendra Dutta Choudhury, Meenakshi Bawari and Shyamali Singha L. (2010).

Some Antipyretic Ethno-medicinal Plants of Manipuri community of Barak

Valley, Assam, India *Ethnobotanical Leaflets* 14: 21-28.

Manach C., WilJiamson G., Morand C., Scalbert A., Remesy C. (2005).

Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. 1. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81: 230-242.

Marc F., Davin A., Deglène-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M. and Fritsch P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments

Médecines Sciences, 20: 458-464.

Mathew S. and Abraham T.E. (2006) In vitro antioxidant activity and scavenging

effect of *Cinnamomum verum* leaf assayed by different methodologies. *Food. Chem. Toxicol.*, 44:198-206.

Meenakshi S., Gnanambigai D.M., Mozhi S.T., Arumugam M. and Balasubramanian T. (2009). Total flavonoid and in vitro antioxidant activity of two

seaweeds of rameshwaram coast. *Global J. Pharmacol.*, 3: 59-62.

Meziti A. (2007). Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L

étude in vitro et in vivo, Mémoire de Magister Université de Batna, pp. 30-67.

Middleton E., Kandaswami C. and Theoharides T.C. (2000). The effects of plant

flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacol. Rev.*, 52: 673-751.

Mika A., Minibayeva F., Beckett R. and Lüthje S. (2004). Possible functions of

extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species, *Phytochemistry Reviews*, 3: 173-193.

Miliauskas G., Venskutonis P.R. and van Beek T.A. (2004) Screening of radical

scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.*, 85: 231-237.

Miller N-J., Sampson J., Candeias L.P., Bramley P.M. and Rice-Evans C.A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 384: 240-242.

Modi A.J., Khadabadi S.S., Deore S.L. and Kade M.S. (2010). Antioxidant effects

of leaves of *Clerodendrum infortunatum* (Linn.), *Int. J. Pharmaceut. Sci. Res.*,1: 67-72.

Mota R., Thomas G., Barbosa and Filho J.M. (1985). Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 13: 289-300.

Mouffok, S. (2011). Etude des métabolites secondaires de *Centaurea pubescens* ssp. *omphalotricha* (Asteraceae) Mémoire de Magister Université de Batna. pp.125-134.

Muanda F.N. (2010). *Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques.* Thèse de doctorat. Université Paul Verlaine-Metz.

Nacoulma O. G. (1996). *Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles au Burkina Faso: cas du plateau central. Tomes I et II.* Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences Naturelles.

Naghbi F., Mosaddegh M., Motamed S-M, Ghorbani A. (2005). Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2: 63-79.

Nair R. and Chanda S. (2006). Activity of some medicinal plants against certain pathogenic bacterial strains. *Indian J. Pharmacol.*, 38: 142-144.

Nasar-Abbas S.M. and Halkman A.K. (2004). Antimicrobial effect of water extract of sumac (*Rhus coriaria* L.) on the growth of some food borne bacteria including pathogens. *Int. J. Food Microbio.*, 97: 63-69.

NCCLS-National Committee for Clinical Laboratory Standards (2001).

Performance standard for anti-microbial susceptibility testing: eleventh informational supplement. Document M100-S11. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Wayne, PA, USA.

Negro C.L., Tommasi and Miceli A. (2003). Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts, *Bioresour. Technol.*, 87:41-44.

Nikaido H. (1996). Outer Membrane. In: Neidhardt, F.C. (Ed.), *Echerichia coli* and *Salmonelle typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. American Sociatety for Microbiology Press. Washington, D.C., pp: 29-47.

Njan Nlôga A.M., Saotoing P., Tchouankeu J.C. and Messi J. (2007). Effect of essential oils of six local plants used insecticide on adults of *Anopheles gambiae*, giles 1902, *J. Entomol*, 6: 444-450.

Njus D. and Kelley P.M. (1991). Vitamins C and E donate single hydrogen atoms in vivo, *FEBS. Letters*, 284: 147-151.

Nkhili E. (2009). *Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant.* Thèse de doctorat Université de MARRAKECH. 187-193.

Nonaka G.I., Nishioka I., Nishi-Zawa A., Yamagishi T., Kashiwada Y., Dutschman G.E., Bodner A.J., Kilkuskie R.E., Cheng Y.C. and Lee K.H. (1990).

Inhibitory effects of tannins on HIV reverse trasceiptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells, *Journal of Natural Products*, 53(3): 587-595.

Nongoniema rita. (1990). *Contribution à l'étude biosystématique chimique et pharmacologique de terminalia macroptera quili et perr (combretaceae R. BR.) du Burkina Faso et du Sénégal,* thèse doct. Université Cheik anta Diop de Dakar.

Nostro A., Germano M.P., D'Angelo V., Marino A. and Cannatelli M.A. (2000).

Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett. Applied Microbiol.*, 30: 379–384.

Nsimba R.Y., Kikuzaki H. and Konishi Y. (2008). Antioxidant activity of various extracts and fractions of *chenopodium quinoa* and *Amaranthus* SSp. Seeds, *Food chem.*, 106: 760-766.

Nuri Andarwulan, Ratna Batari, Diny Agustini Sandrasari , Bradley Bolling and Hanny Wijaya (2010). Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food Chemistry*, 121: 1231-1235.

Okhale S.E., Odiniya E.O. and Kunle O.F. (2010). Preliminary phytochemical and pharmacognostical investigation of pediatrics antimalarial *Laggera pterodonta* (DC) Sch. Bip Asteraceae of Nigerian Origin, *Ethnobot.Leaf*, 14: 457-66.

OMS. (2004). WHO data July 2004, Geographic pattern of hepatitis B prevalence, Department of immunization, Vaccines and Biologicals (HVB), Geneva Switzerland. 200. Lesmana LA, Leung NWY, 2006. Hepatitis B: overview of the burden of disease in the Asia-Pacific region. *Liver International*; 26: 3-10.

OMS. (2000) Sécurité sanitaire des aliments et santé : une stratégie pour la région Africaine de l’OMS. http://www.who.int/topics/food_safety/fr/

Panisset J. C., Dewailly E., Doucet-Leduc H. (2003). Contamination alimentaire, In : Environnement et santé publique, fondement et pratiques, pp. 369-395.

Paolini V., Dorchies Ph. and Hoste H. (2003). Effet des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvre, *Alter. Agri.*, pp. 17-19.

Paton A., Harley R.M. and Harley M.M. (1999). *Ocimum* an overview of

relationships and classification. In: Holm, Y., Hiltunen, R. (Eds.), Basil, the genus *Ocimum*. *Medicinal and Aromatic Plants Industrial Profiles*. Harwood Academic, Amsterdam, pp. 1–38.

Plantaz D. (2005). Diarrhée aigüe du nourrisson in Corpus médical de la faculté de médecine de Grenoble, consultable sur le site de l'enseignement de la fac de méd de grenoble.

Portes E. (2008). *Synthèse et Etudes deTétrahydrocurcuminoïdes :*

Propriétés Photochimiques et Antioxydantes, Applications à la Préservation de Matériaux d'Origine Naturelle. Thèse de doctorat Université Bordeaux I. pp. 44-46.

Pourrut B. (2008). *Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, Vicia faba.* Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat à l'université de Toulouse spécialité : Ecotoxicologie. France.

Pousset J.L., Rey JP., Levesque J., Corsaget P., Galen FX. (1993).

Hepatitis B surface antigen (HBs Ag) inactivation and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition in vitro by *Combretum glutinosum* perr. (Combretaceae), extracts. *Phytotherapy Research*, 7: 101-102.

Prior R.L. and Cao G. (2000). Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables, Diet and health implications, *Hortic. Sci.*, 35: 588-592.

Rabe T., Mullholland D. and van Staden J. (2002) Isolation and identification of antibacterial compounds from *Vernonia colorata* leaves, *J. Ethnopharmacol.* , 80: 91-94.

Rahman A., M.A.K., Parvez T., Parvin D.K., Paul and M.A., Sattar M.A. (2004).

Antimicrobial activity of three bioactive compound from the stem bark of *Piper chaba* hunter, *Bioscie. Res.*, 1: 16-20.

Ramandeep K.T. and Geoffrey P.S. (2005). Antioxidant activity in different fraction

oftomatoes, Food Res. Int., 38: 487-494.

Ramos S. (2007). Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways to cancer
Chemoprevention. *J. Nutr. Biochem.*,18: 427-442.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. and Rice-Evans C. (1999).
Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization
assay, *Free Radical Biology and Medicinal*, 26: 1231-1237.

Reynolds J.E.F (1996). Martindale the Extract Harmacopoeia. 31st Edn., Royal
Pharmaceutical Society of Great Britain, London.

Ribereau-Gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux, 1 vol., éd.
Paris Dunod, pp. 254.

Rice-Evans C.A., Miller N. and Paganga G. (1997). Antioxidant properties of
phenolic compounds, *Trends Plant Sci.*, 2: 152-159.

**Rieseberg L. H., Raymond O., Rosenthal D.M., Lai Z., Livingstone K., Nakazato T.,
Durphy J.L., Schwarzbach A.E., Donovan L.A. and LexerC.(2003).** Major
ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization, *Science*
301: 1211-1216.

Roberto F., Vieira, Renée J., Grayer and Alan Paton J. (2003). Chemical profiling
of *Ocimum americanum* using external flavonoids, *Phytochemistry*, 63:
555–567.

Rosato A., De Laurentis N.V.N., Armenise D. and Millilo M.A. (2007).Antibacterial
effect of some essential oils administered alone or in combination with
Norfloxacin. *Phytomedicine*, 14: 727–732.

Sati S.C., Sati N., Rawat U. and Sati O.P.(2010). Medicinal plants as a source of

antioxidants. *Res. J. Phytochem.*, 4: 213-224.

Scalbert A. (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883.

Scalbert A., Morand C., Manach C. and Remesy C. (2002).

Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed. Pharmacother.*, 56(6): 276-282.

Schlesier K., Harwat M., Bohm V. and Bitch R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in Vitro methods. *Free radical Res*, 36: 177-187.

Shah P.M. (2005). The need for new therapeutic agents. What is in the pipeline? *Clin. Microbiol. Infect.*, 11: 36-42.

Shan B., Cai Y.Z., Brooks J.D. and Corke H. (2007). The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int. J. Food Microbiol.*, 117: 112-119.

Shanmugasundaram S. (2005). Complementary and alternative therapies in palliative care. A transition from modern medicine to traditional medicine in India, *J. Cancer Pain Symptom Palliation*, 1: 25-29.

Shi S., Huang K., Zhang Y., Zhao Y. and Du Q. (2007) Purification and identification of antiviral components from *Laggera pterodonta* by high-speed counter-current chromatography. *J. chromatogr. B. Analytical technologies in the biomed. Life. Sci.*, 859: 119-124.

Spencer J.P., Abd-el-Mohsen M.M. and Rice-Evans C. (2004). Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Arch. Biochem. Biophys.*, 423: 148-166.

Tanaka M.C., W., Kuie W., Nagashima Y. and Taguchi T. (1988). Application of

antioxidative Maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products. *Bull. Jap. Soc. Scientific Fisheries*, 54: 1409-1414.

Stevens P. F. (2001). Angiosperm Phylogeny Website. Version 8, June 2007

[and more or less continuously updated since].
<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. (Accessed March 27, 2008).

Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L. and Byrne H. D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating

antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food composition and analysis*, 19: 669-675.

Tomas-Barberan F E., Iniesta-Sanmartin F., Tomas-Lorente and A. Rumbero A. (1990). Antimicrobial phenolic compounds from three Spanish *Helichrysum* species.

Phytochemistry, 29:1093-1095.

Toufektsian M.C., De Lorgeril M., Nagy N., Salen P., Donati M.B., Giordano L., Mock H.P., Peterek S., Matros A., Petroni K., Pilu R., Rotilio D., Tonelli C., De Leiris, Boucher J. F. and Martin C. (2008). Chronic dietary intake of plant-derived

anthocyanins protects the rat heart against ischemia-reperfusion injury. *Journal of Nutrition*, 138: 747-752.

Treben M. (1998). Health Through God's Pharmacy. 2ndEdn., Ennsthaler Publisher, Australia, pp. 260-264.

Tsa R. And Deng Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 812: 85-99.

Tu Y.C., Lian T.W., Yen J.H., Chen Z.T., Wu M.J. (2007).

Antiatherogenic effects of kaempferol and rhamnocitrin. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 9969-9976.

Villano D., Fernández-Pachón M. S., Troncoso A. M. and García-Parrilla (2004).

The antioxidant activity of wines determined by the ABTS method: influence of sample dilution and time, *Talanta*, 64: 501-509.

Weaver D.K., Dunkel F.V., Ntezurubanza L., Jackson L.L. and Stock D.T. (1991).

The efficiency of linalool, a major component of freshlymilled *Ocimum canum* Sims (Lamiaceae), for protection against postharvest damage by certain stored product Coleoptera. *Journal of Stored Products Research*, 27: 213–220.

Williams C.A. and Grayer R.J. (2004). Anthocyanins and other flavonoids,

Nat. Prod. Rep., 21: 539-573.

Wolfe E.F., Klepser M.E., Pfaller M.A. (1997). Antifungal dynamics of amphotericin

B and fluconazole in combination against *Candida albicans*, effect of exposure time. *Pharmacotherapy*, 17: 189–189.

Wome B. (1985). *Recherches ethnopharmacognosiques sur les plantes médicinales*

utilisées en médecine traditionnelle à Kisangani (Haut-Zaïre). Thèse de doctorat, Université libre de Bruxelles, Fac. Sc., pp. 561.

Woodman O.L. and Chan ECh. (2004). Bioavailability and bioefficacy of

polyphenols in humans.II. *Review of 93 intervention studies*, *Am. J. Clin. Nutr.*, 81: 243-255.

Wu Y., Wang F., Zheng Q., Lu L., Yao H., Zhou C., Wu X. and Zhao Y. (2006).

Hepatoprotective effect of total flavonoids from *Laggera alata* against carbon tetrachloride-induced injury in primary cultured neonatal rat hepatocytes and in rats with hepatic damage, *J. Biomed. Sci*, 13: 569-578.

Xiao Y., Zheng Q., Zhang Q., Sun H., Guéritte F. and Zhao Y. (2003). Eudesmane

derivatives from *Laggera pterodonta*. *Fitoterapia*, 74: 459-463.

Yang G.Z., Li Y.F., Yu X. and Mei Z.N. (2006). Terpenoids and flavonoids from

Laggera pterodonta, *Yao. Xue.Xue. Bao*, 42: 511-515.

Yang C.S, Landau J.M., Huang M.T., Newmark H.L. (2001). Inhibition of

carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *J. Annu. Rev. Nutr.*, 21: 381-406.

Yemoa A.L., Gbenou J.D., Johnson R.C., Djego J.G., Zinsou C.S., Moudachirou M., Quetin-Leclercq J., Bigot A., Portaels F. (2008).

Identification et étude phytochimique de plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli au Bénin. Bulletin de la Société Française d'Ethnopharmacologie et de la Société Européenne d'Ethnopharmacologie. Numéro 42, pp. 50–57.

Zaika I.I. (1988) Spices and herbs-their antimicrobial activity and its determination.

J. Food Safety, 9: 97-118.

Zakaria M. (1991) Isolation and characterization of active compounds from

medicinal plants. *Asia Pac. J. Pharmacol.*, 6: 158-220.

Zhao Y., Reanmongkol W., Bouking P. and Zhang R. (2004). Acute toxicity and

antinociceptive effect of *Laggetera pterodonta* (DC) Benth Aqueous extract, *Nat. Prod. Res. Dev.*, 17: 457-459.

Ziyatdinova G., Gilâmetdinova D. and Budnikov G. (2005). Reactions of

superoxide anion radical with antioxidants and their use in voltammetry. *Journal of Analytical Chemistry*, 60: 49-52.

Zongo C., Savadogo A., Ouattara L., Bassole I.H.N. and Ouattara C.A.T. (2010).

Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of *Ampelocissus grantii* (Baker) Planch. (Vitaceae): A medicinal plant from Burkina Faso. *Int. J. Pharmacol.*, 6: 880-887.

Zutshi S. K. and al. (1975) Chemical investigation of the essential oil of

Laggetera aurita. *Current Science* 16: 571-572.

Articles tirés de la Thèse

1. **Dibala I.C.**, Konaté K., Diao M., Ouédraogo M. and Dicko H.M. (2014). Phytoconstituents analysis, antioxydant capacity and antimicrobial properties of extracts from *Laggera aurita* L. (Asteraceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (7):172-178.
2. **Dibala I. C.**, Konaté K., Diao M., Ouédraogo M. and Dicko H.M. (2016). Chemical composition, antioxydant and antibacterial properties of extracts from *Ocimum americanum* L., against multi-resistant food bacteria. *Word Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5 (12):1549-1567.
3. **Dibala I. C.**, Konaté K., Diao M., Ouédraogo M. and Dicko H.M. (2016). Evaluation of correlation between chemical, Free radical scavenging capacity and Antibacterial properties of extracts from *Laggera aurita* L. (Asteraceae). Non soumis.

Autres articles

1. Mamouna DIAO, Brice N'cho Ayékoué, **C. I. Dibala**, Soumaïla Dabonné, Mamoudou H. DICKO (2014). Purification and Characterization of Sweet Potato (*Ipomoea Batatas*) Peroxidase. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 22 (2): 3419-3432.
2. Konaté K., Zerbo P., Ouédraogo M, **C. I. Dibala**, Adama H., Sytar O, Brestic M, and Barro N. (2013). Anti-nociceptive properties in rodents and the possibility of using polyphenol-rich fractions from *Sida urens* L. (Malvaceae) against of dental caries bacteria. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 12:14. doi: 10.1186/1476-0711-12-14.
3. K. Konaté, A. Souza, Kassi Yomalan Thérèse, **C. I. Dibala**, Nicolas Barro, J. Millogo Rasolodimby and O. G. Nacoulma (2011). Phytochemical composition, Antioxidant and Anti-inflammatory potential of bioactive fractions from extracts of three medicinal plants traditionally used to treat liver diseases in Burkina Faso. *International Journal of Phytomedicine*, 3:406-415.
4. K. Konaté, M. Ouédraogo, M.B. Ouattara, **C. I. Dibala**, J. F. Mavoungou, A.N. Lepengué, A. Souza, B.M. Batchi and O.G. Nacoulma (2012). Hepatoprotective Activity of Aqueous Acetone Extract from *Cienfuegosia digitata* Cav. (Malvaceae) Against Alcohol Hepatotoxicity in Albinos Wistar Rats. *Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology*, 4(12): 1637-1641, 2012
5. M. Ouédraogo, F L. Da, A. Fabré, K. Konaté, **C. I. Dibala**, Carreyre, S. Thibaudeau, J.-M. Coustard, C. Vandebrouck, J. Bescond and R. G. Belemtougri (2013). Evaluation of the Bronchorelaxant, Genotoxic, and Antigenotoxic Effects of *Cassia alata* L: Evidence-Based. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 162651, 11 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162651>

ANNEXES

ARTICLE I

Dibala I.C., Konaté K., Diao M., Ouédraogo M. and Dicko H.M. (2014). Phytoconstituents analysis, antioxydant capacity and antimicrobial properties of extracts from *Laggera aurita* L. (Asteraceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (7):172-178.

PHYTOCONSTITUENTS ANALYSIS, ANTIOXIDANT CAPACITY AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF EXTRACTS FROM *LAGGERA AURITA* L. (ASTERACEAE)

CRÉPIN I.DIBALA*¹, KIESSOUN KONATÉ², MAMOUNATA DIAO¹, MAURICE OUÉDRAOGO³ AND MAMOUDOU H.DICKO¹

¹Laboratory of Food Biochemistry, Enzymology, Biotechnology and Bioinformatic, University of Ouagadougou, 03 P.O.Box: 848 Ouagadougou 03, Burkina Faso. ²Unit of Formation in Sciences Applied and Technological (UFR/SAT) and Institute of Sciences of the Environment and the Rural Development (ISEDR), Polytechnic University of Dédougou, Burkina Faso. ³Laboratory of Animal Physiology, University of Ouagadougou, 09 PO Box: 848 Ouagadougou 09, Burkina Faso.
Email: mehekiessoum@yahoo.fr

Received: 20 Sep 2013 Revised and Accepted: 28 Oct 2014

ABSTRACT

Objective: This research was designed to evaluate the polyphenolic content, antibacterial potency and antioxidant activity of extract and fractions from *Laggera aurita* L. (Asteraceae), a medicinal herbaceous from Burkina Faso.

Methods: Folin ciocalteu and AlCl₃ methods respectively were used for polyphenol contents. The antioxidant activities of the samples were evaluated by various in vitro assays like ferrous reducing antioxidant assay (FRAP), Total reducing power, 2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging and ABTS radical cation decolorization assays. *In vitro* antibacterial capacity of bioactive fractions were investigated by agar disc diffusion, micro-well dilution (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) assay and at least the effect of the best bioactive fraction (EAF) from *Laggera aurita* L. (Asteraceae) and in combination with gentamycin against food bacterial strains multi-resistant was evaluated.

Results: Estimation of Total phenolic and flavonoids contents revealed that EAF and DCMF have the highest phenolic and flavonoid contents 62.12±0.68mgGAE and 10.56±0.29mgQE respectively. These results indicated that most of the bioactive fractions from *Laggera aurita* L. were able to inhibit Gram-positive bacteria as compared to Gram-negative bacteria. Among the samples tested for antioxidant activities, EAF and DCMF have the highest activities compared to other fractions.

Conclusion: These findings suggested that *Laggera aurita* L. is not only an important source for antibacterial component, but also a potential source of antioxidants. So, these results may be useful in explaining the medicinal applications of *Laggera aurita* L.

Keywords: *Laggera aurita* L., Bioactive fractions, Polyphenol compounds, Antioxidant and Antimicrobial properties.

INTRODUCTION

The use of plants in the management and treatment of diseases started with life. It has been observed that many plants do indeed have medicinal value and extracts from these plants have been used to make modern drugs [1]. According to WHO, more than 80% of the world's population relies on plant based herbal medicines for their primary health care needs [2]. Also, Plants contain phytochemicals with various bioactivities, including, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities. Currently, about 25% of the active component was identified from plants that are used as prescribed medicines [3].

In effect, indigenous plants are reservoirs of various metabolites and provide unlimited source of important chemicals that have diverse biological properties. In recent years, there is an increase in drug resistant strains of human pathogenic bacteria all over the world. One way to prevent antibiotic resistance of pathogen species is to use new compounds that are not based on existing synthetic antimicrobial agents [4]. Systematic screening of plants may result in the discovery of novel effective compounds which would tackle the problem of drug resistance.

The overproduction of reactive oxygen species like hydroxyl radical, superoxide anion radical, hydrogen peroxide radical can contribute to oxidative stress [5]. Oxidative damage of proteins, DNA and lipid is associated with chronic degenerative diseases including diabetes, hypertension, coronary heart disease, cancer etc [6]. Most of the reactive oxygen species are scavenged by endogenous defense systems. But these systems may not be completely efficient requiring them to depend on exogenous antioxidants from natural sources. Presently, there has been an amplified interest worldwide to identify antioxidant compounds which are pharmacologically effective or have low or no side effects for use in preventive medicine and the food industry [7]. Generally antioxidants have been identified as major health beneficial compounds reported from varieties of medicinal plants and are sources for alternative medicine [8].

Laggera aurita L. belongs to the family of Asteraceae is an annual herbaceous which found growing as weeds in Nigeria and spread throughout the sub-Saharan Africa [9]. In Burkina Faso, ethnobotanical investigations in the central region of Burkina Faso have shown that this Lamiaceae is used frequently and widely in traditional medicine to treat various kinds of diseases such as malaria, fever, pain, stomatitis, astmatic, bronchitis and nasal congestion and has also antibacterial activity [10]. Although this specie has been reported to be of significant ethnomedicinal use in Asia country like China, there is little or no ethno-use reported in Africa, except in Cameroon where it has been reported for use in cereal grains preservation and in Nigeria as remedy for pediatric malaria [11, 12]. The Asian researchers have also done a lot of work and have reported various bioactive properties of these plants [12]. Anti-inflammatory, antiviral, antibacterial and hepatoprotective properties have been reported in literature [13, 14, 15]. Phytochemical analysis showed the presence of a number of sesquiterpenoids, monoterpenoids and some flavonoids with some bioactivity have been isolated [16, 17]. However, no report has been made on the possible correlation study between polyphenol compounds, free radical scavenging capacity and antibacterial of extracts from *Laggera aurita* L. (Asteraceae). Considering the above, this work was aimed at studying the possible correlation study between polyphenol compounds, free radical scavenging capacity and antibacterial of extracts from *Laggera aurita* L. (Asteraceae).

MATERIALS AND METHODS

Materials

Chemicals and reagents

The Folin-ciocalteu reagent, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, sodium carbonate, aluminium trichloride, gallic acid and quercetin were purchased from Sigma-aldrich chemie, Steinheim, Germany.

2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH), trichloroacetic acid, and solvents used were from Fluka Chemie, Switzerland. Potassium hexacyanoferrate [K₃Fe(CN)₆] was from Prolabo and ascorbic acid was from Labosi, Paris, France. All chemicals used were of analytical grade. Authentic standard, such as Gentamycin (25 µg) was purchased from Alkom Laboratories LTD. INT (p-iodonitrotetrazolium chloride) was purchased from sigma-Aldrich chemie (Steinheim, Germany).

Plant materials

Laggera aurita L. (Astereceae) was collected in September 2011 in Gampela, 25 Km east of Ouagadougou, capital of Burkina Faso. The plant was identified in the Laboratory of Biology and Ecology, University of Ouagadougou, where a voucher specimen was deposited.

Bacterial strains and antibiotics

Ten references of food bacterial strains (Gram-positive and Gram-negative) were tested: Kd = *Bacillus cereus* MADM 1561, Bc = *Bacillus cereus* MADM 1291, Lm1 = *Listeria monocytogenes* 057, Lm 2 = *Listeria monocytogenes* Scott A, S. inf = *Salmonelle infantis* SKN 557, S.oro = *Salmonella oranienburg* SKN 1157, S.nig = *Salmonella Nigeria* SKN 1160, S.typ = *Salmonella typhimurium* SKN 533, Ec = *Escherichia coli* 81 nr. 148 SKN 541, Ye = *Yersinia enterocolitica* 6A28 SKN 599. All bacterial strains come from Culture Collection of Department of Food Science, Food Microbiology in Copenhagen University, Denmark [18].

Methods

Preparation of extract

The collected plants materials were dried at room temperature and crushed into a fine powder. Fifty grams (50g) of powdered plant material were extracted with 80% aqueous ethanol (500 ml) in ratio 1/10 (w/v) for 24 h under mechanic agitation (SM 25 shaker, Edmund BÜHLER, Germany) at room temperature. After filtration, ethanol was removed under reduced pressure in a rotary evaporator (BÜCHI, Rotavapor R-200, Switzzeland) at approximately 40°C and freeze-dried by Telstar Cryodos 50 freeze-dryer. These ones were filtered and freeze-dried. The extract residues were weighed before packed in waterproof plastic flasks and stored at 4°C until use. The yields of different crude extract were calculated and expressed as grams of extract residues/100 g of dried plant materials.

Fractionation

Fifty grams (50g) of powdered plant material were extracted with 80% aqueous ethanol (500 ml) in 1/10 ratio (w/v) for 24 h under mechanic agitation (SM 25 shaker, Edmund BÜHLER, Germany) at room temperature. After filtration, ethanol was removed under reduced pressure in a rotary evaporator (BÜCHI, Rotavapor R-200, Switzzeland) at approximately 40°C. The aqueous extracts were subjected to sequential liquid-liquid extraction with oil ether, dichloromethane, ethyl acetate and n-butanol. Each fraction was then collected and concentrated to dryness under reduced pressure to obtain oil ether fraction (OEF), dichloromethane fraction (DCMF), ethyl acetate fraction (EAF) and n-butanol fraction (n-BF). The different fractions were freeze-dried by Telstar Cryodos 50 freeze-dryer. The fraction residues were packed in waterproof plastic flasks and stored at 4°C until use.

Polyphenols determination of extract and fractions from *Laggera aurita* L. (Astereceae)

Total phenolic content

Total polyphenols were determined by Folin-Ciocalteu method as described by [19]. Aliquots (125 µl) of solution from extract or each fraction in methanol (10 mg/ml) were mixed with 625 µl Folin-Ciocalteu reagent (0.2 N). After 5 min, 500 µl of aqueous Na₂CO₃ (75 g/l) were added and the mixture was vortexed. After 2 h of incubation in the dark at room temperature, the absorbencies were measured at 760 nm against a blank (0.5 ml Folin-Ciocalteu reagent + 1 ml Na₂CO₃) on a UV/visible light spectrophotometer (CECIL CE 2041, CECIL Instruments, England). The experiments were carried out in triplicate. A standard calibration curve was plotted using gallic acid (Y = 0.0289x - 0.0036; R² = 0.9998). The results were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE)/100 mg of extract or fractions.

Total flavonoid content

The total flavonoids were estimated according to the Dowd method as adapted by [19]. 0.5 ml of methanolic AlCl₃ (2%, w/v) were mixed with 0.5 ml of extract or each fraction solution (0.1 mg/ml). After 10 min, the absorbencies were measured at 415 nm against a blank (mixture of 0.5 ml extract solutions and 0.5 ml methanol) on a UV/visible light spectrophotometer (CECIL CE 2041, CECIL Instruments, England) and compared to a quercetin calibration curve (Y = 0.0289x - 0.0036; R² = 0.9998). The data obtained were the means of three determinations. The amounts of flavonoids in plant extracts were expressed as mg of quercetin equivalents (QE)/100 mg of extract or fractions.

In vitro antioxidant activity of extract and fractions from *Laggera aurita* L. (Astereceae)

DPPH radical method

Radical scavenging activity of extract or each fraction against stable DPPH (2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Fluka) was determined with a UV/visible light spectrophotometer (CECIL CE 2041, CECIL Instruments, England) at 517 nm as described by [19]. Extract solutions were prepared by dissolving 10 mg of dry extract in 10 ml of methanol. The samples were homogenized in an ultrasonic bath. 0.5 ml of aliquots which were prepared at different concentrations from each sample of extract was mixed with 1 ml of methanolic DPPH solution (20 mg/ml). After 15 min in the dark at room temperature, the decrease in absorption was measured. All experiments were performed in triplicate and expressed in mmol Ascorbic Acid Equivalent per g of extract or fraction (Y = -16.815x + 6.8373; R² = 0.9976). Quercetin was used as positive control.

ABTS radical cation decolorization assay

For ABTS radical cation decolorization assay, the procedure followed the method of [19]. ABTS was dissolved in water to a 7mM concentration. ABTS radical cation (ABTS⁺) was produced by reacting ABTS stock solution with 2.45mM potassium persulfate (final concentration) and allowing the mixture to stand in the dark at room temperature for 12 h before use. This mixture was diluted with ethanol to give an absorbency of 0.7 ± 0.02 units at 734 nm using a UV/visible light spectrophotometer (CECIL CE 2041, CECIL Instruments, England). For our study, we used 10 µL of the diluted sample (1 mgmL⁻¹ in methanol) which was allowed to react with 990 µL of fresh ABTS⁺ solution and the absorbance was taken 6 min exactly after initial mixing. Ascorbic acid was used as standard (Y = -0.0342x + 0.634; R² = 0.9996) and the capacity of free radical scavenging was expressed as mmol Ascorbic Acid Equivalent per g of extract or fraction. Quercetin, a reference compound was used as positive control.

Iron (III) to iron (II) reduction activity (FRAP)

The FRAP assay was performed according to [20]. 0.5 mL of extract or each fraction (1 mgmL⁻¹) was mixed with 1.25 mL of phosphate buffer (0.2M, pH 6.6) and 1.25 mL of aqueous potassium hexacyanoferrate [K₃Fe(CN)₆] solution (1%). After 30 min incubation at 50°C, 1.25 mL of trichloroacetic acid (10%) was added and the mixture was centrifuged at 2000 × g for 10 min. Then, the upper layer solution (0.625 mL) was mixed with distilled water (0.625mL) and a freshly prepared FeCl₃ solution (0.125mL, 0.1%). Absorbencies were read at 700 nm on a UV/visible light spectrophotometer (CECIL CE 2041, CECIL Instruments, England) and Ascorbic acid was used to produce the calibration curve (Y = 0.008x - 0.0081; R² = 0.9999). The iron (III) reducing activity determination was performed in triplicate and expressed in mmol Ascorbic Acid Equivalent per g of extract or fractions. Troloc, a reference compound was used as positive control.

In vitro antibacterial activity of the bioactive fractions (DCMF and EAF) from *Laggera aurita* L. (Astereceae)

Preparation of inocula

The susceptibility tests were performed by Mueller Hinton agar-well diffusion method [21]. The bacterial strains grown on nutrient agar

at 37 °C for 18 h were suspended in a saline solution (0.9 %, w/v) NaCl and adjusted to a turbidity of 0.5 Mac Farland standard (10⁸ CFU/ml). To obtain the inocula, these suspensions were diluted 100 times in Muller Hinton broth to give 10⁶ colony forming units (CFU)/ml.

Preparation of discs

The stock solutions of extract or each fraction were dissolved in 10 % dimethylsulfoxide (DMSO) in water at a final concentration of 10 mg/ml. The stock solutions of extracts were sterilized by filtration through 0.22 µm sterilizing Millipore express filter. The sterile discs (6 mm) were impregnated with 10 µL of the sterile solution of extract or each fraction. Negative controls were prepared using discs impregnated with 10 % DMSO in water and commercially available antibiotic diffusion discs (gentamycin 25 µg from Alkom Laboratories LTD) were used as positive reference standards for all bacterial strains [21].

Disc-diffusion assay

Petri plates (9 cm) were prepared with 20 ml of a base layer of molten Mueller Hinton agar (DIFCO, Becton Dickinson, USA). Each Petri plate was inoculated with 15 µl of each bacterial suspension (10⁶ CFU/ml). After drying in a sterile hood, 6 mm diameter discs soaked with 10 µl of the different extract solution dilutions were placed on the agar. Discs containing gentamycin (25 µg) were used as positive controls and 10 % DMSO was used as a negative control. The plates were incubated for 24 h at 37 °C. The diameters of the inhibition zones were evaluated in millimeters. The extract inducing inhibition zone ≥ 3 mm around disc were considered as antibacterial. All tests were performed in triplicate and the bacterial activity was expressed as the mean of inhibition diameters (mm) produced [21].

Minimum inhibitory concentration (MIC)

Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution method in culture broth as recommended by [21, 22]. Eight serial two-fold dilutions of extracts or conventional antibiotic (gentamycin) were prepared as described before, to obtain final concentration range of 1000 µg/ml to 15.625 µg/ml. The last wells (n^o8) served as sterility controls (contained broth only) or negative control (broth + inoculums). The 96-well micro-plates (NUNC, Denmark) containing 100 µL of Mueller Hinton (MH) broth were used. For each bacteria strain, three columns of eight wells to the micro-plate were used. Each well has getting: the culture medium + extracts or gentamycin + inoculum (10 µl of inocula) and INT (50 µl; 0.2 mg/ml for 30 min). The plates were covered and incubated at 37°C for 24 h. All tests were performed in triplicate and the bacterial activity was expressed as the mean of inhibitions produced. Viable microorganisms reduced the yellow dye to a pink colour. The MIC was defined as the lowest concentration of substance of extracts at which no colony was observed after incubation. So, the MIC was defined as the lowest concentration where no change was observed, indicating no growth of microorganism.

Minimal bactericidal concentration (MBC)

Minimum bactericidal concentration (MBC) was recorded as a lowest extract concentration killing 99.9% of the bacterial inocula after 24 h incubation at 37°C. Each experiment was repeated at least three times. MBC values were determined by removing 100 µl of bacterial suspension from subculture demonstrating no visible growth and inoculating nutrient agar plates. Plates were incubated at 37°C for a total period of 24 h. The MBC is determined with the wells whose the concentrations are ≥ MIC [21, 23]. The MBC were determined in Mueller Hinton (MH) agar (DIFCO, Becton Dickinson, USA) medium.

Evaluation of bactericidal and bacteriostatic capacity

The action of an antibacterial on the bacterial strains can be characterized with two parameters such as Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum bactericidal concentration (MBC). According to the ratio MBC/MIC, we appreciated antibacterial activity. If the ratio MBC/MIC = 1 or 2, the effect was considered as bactericidal but if the ratio MBC/MIC = 4 or 16, the effect was defined as bacteriostatic [23].

Evaluation of the fractional inhibitory concentration index of the best bioactive fraction (ethyl acetate rich-flavonoid fractions) in combination with gentamycin against food bacterial strains multi-resistants

The Muller Hinton agar dilution method was used to evaluate the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) of flavonoid-rich fractions from *Laggera aurita* L. (Astereceae) and the tested antimicrobial standards as reported earlier [21, 22]. Eight serial two-fold dilutions of flavonoid-rich fractions were prepared as described before, to obtain final concentration range of 1000 µg/ml to 15.625 µg/ml. A series of two-fold serial dilutions of gentamycin was also prepared in the same conditions as flavonoid-rich fractions. In this way, all antibacterial standards dilutions were mixed with the appropriate concentration of flavonoid-rich fractions thus obtaining a series of the combinations of conventional antibiotics and flavonoid-rich fractions. The concentrations prepared corresponded to 1;1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32; 1/64; of MIC values. The 96-well micro-plate (NUNC, Denmark) containing 100µL of Mueller Hinton (MH) broth were used. For each bacteria strain, three columns of eight wells to the micro-plate were used. Each well has getting: the culture medium + combination of flavonoid-rich fractions with gentamycin + inoculum (10 µl of inocula) and INT (50 µl; 0.2 mg/ml for 30 min). The plates were covered and incubated at 37 °C for 24 h. All tests were performed in triplicate and the bacterial activity was expressed as the mean of inhibitions produced. Viable microorganisms reduced the yellow dye to a pink colour. Inhibition of bacterial growth was judged by rose or yellow colour. The analysis of the combination of flavonoid-rich fractions and gentamycin was obtained by calculating the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) as follows: FICI = (MIC of the combination of flavonoid-rich fractions with gentamycin /MICa alone) + (MIC of the combination of flavonoid-rich fractions with gentamycin /MICb alone), where MICa (Minimal Inhibitory Concentration of flavonoid-rich fractions from *Laggera aurita* L. and MICb (Minimal Inhibitory Concentration of gentamycin). The FICI was interpreted as follows: (1) a synergistic effect when FICI ≤ 0.5; (2) an additive or indifferent effect when FICI >0.5 and <1 and (3) an antagonistic effect when FICI >1. This study was carried out following [24].

Statistical analysis

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

RESULTS

Polyphenol content

The total phenolics content per 100 mg of *laggera aurita* L. extract and fractions ranged from 62.12±0.68mgGAE to 9.07±0.17mgGAE. The highest content of total phenolics was detected in EAF with 62.12±0.68mgGAE following by DCMF with 23.67±0.05mgGAE. The lowest total phenolics were obtained in OEF with respectively 9.07±0.17mgGAE.

The total flavonoids content per 100 mg of *Laggera aurita* L. extract and fractions ranged from 10.56±0.29mgQE to 1.28±0.20mgQE. The highest content of total flavonoids in *Laggera aurita* L. was detected in DCMF with 10.56±0.29mgQE following by EAF with 10.12±0.06mgQE. The lowest total flavonoids were obtained in OEF with respectively 1.28±0.14mgQE. The results are recorded in the (Figure 1)

Antioxidant activity

The measures of antioxidant activity were obtained using three described methods. Results are consigned in the (Figure 2). The reduction capacity of DPPH radicals was determined by the decrease of the absorbance induced by antioxidant at 517 nm, which is induced by antioxidant. The values of different concentrations varied respectively from (9.472 ± 0.1941 mmol AAE/g extract to 4.907± 0.0587 mmol AAE/g extract). From these result, the strongest DPPH activity was obtained by EAF with 9.472 ± 0.1941

mmol AAE/g extract followed by DCMF with 9.347 ± 0.0602 mmol AAE/g extract. The lowest activity was obtained by OEF with 4.907 ± 0.0587 mmol AAE/g extract. Control compound gave 13.76 ± 0.26 mmol AAE/g extract for Quercetin.

For ABTS assay, the following were values obtained respectively 0.78 ± 0.083 mmol AAE/g extract for EHA, 0.58 ± 0.04 mmol AAE/g extract for OEF, 2.03 ± 0.308 mmol AAE/g extract for DCMF, 2.9 ± 0.003 mgAGE/100mg extracts for EAF and 1.85 ± 1.43 GAE/100 mg extract for BF. From these result, the strongest ABTS activity was obtained by EAF with 2.9 ± 0.003 mmol AAE/g extract followed by DCMF with 2.03 ± 0.308 mmol AAE/g extract. The lowest activity was obtained by OEF with 0.58 ± 0.04 mg GAE/100 mg extract. The reference compound is Quercetin 7.81 ± 0.21 mmol AAE/g extract.

For FRAP radical cation decolorization assay, the different values were respectively, 1.22 ± 0.057 mmol AAE/g extract for EHA, 1.73 ± 0.026 mmol AAE/g extract for OEF, 5.99 ± 0.029 mgGAE/100mg extracts for DCM, 3.72 ± 0.182 mgGAE/100mg extracts for EAF, 3.39 ± 0.108 mg GAE/100 mg extract for BF. From these result, the strongest FRAP activity was obtained by DCMF with 5.99 ± 0.029 mmol AAE/g extract followed by EAF with 3.72 ± 0.182 mgGAE/100mg extracts. The lowest activity was obtained by OEF with 0.67 ± 0.06 mg GAE/100 mg extract. Control compound gave 7.46 ± 3.38 mmol AAE/g extract for Trolox.

Antibacterial capacity

In this present study, ten bacteria strain (Gram-negative and Gram-positive bacteria) were used. The antibacterial assays were performed by the broth micro dilution methods; so that they could be qualified and quantified by inhibition zone diameters, MIC and MBC and Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI). One noticed that the susceptibility of the bacteria to the polyphenol compounds alone and in combination with conventional antibiotic (gentamycin) varied according to microorganism. As for the micro-well dilution assay (MIC) and Minimum bactericidal concentration (MBC) of polyphenol compounds alone and in combination, result varied according to the microorganism (Table 1 and Table 2). The MIC values were ranged from $500 \mu\text{g/ml}$ to $31.25 \mu\text{g/ml}$ and for the MBC values were ranged from $1000 \mu\text{g/ml}$ to $62.5 \mu\text{g/ml}$. The bactericidal and bacteriostatic effect of polyphenol compounds alone and their combination with conventional antibiotics was determined using the ratio MBC/MIC (Table 3). At last, with regard to FICI, our results indicate synergistic and additive effects between polyphenol compounds (flavonoid-rich fractions) and the conventional antibacterial (Table 4). One noticed that ethyl acetate fraction presented the best antibacterial activity than gentamycin.

DISCUSSION

Medicinal plants are an important source of antioxidants [25] and natural antioxidants increase the antioxidant capacity of the plasma and reduce the risk of certain diseases such as cancer, heart diseases and stroke [26]. The secondary metabolites like phenolics and flavonoids from plants have been reported to be potent free radical scavengers. They are found in all parts of plants such as leaves, fruits, seeds, roots and bark [27]. There are many synthetic antioxidants in use. It is reported, however, they have several side effects, such risk of liver damage and carcinogenesis [28]. There is a need for more effective, less toxic and cost effective antioxidants. Medicinal plants appear to have these desired comparative advantages, hence the growing interest in natural antioxidants from plants.

The phytochemical screening revealed in this research the presence of polyphenol content, steroids and triterpenes. The presence of the metabolites in our extracts has already been reported by [10]. The results showed that EAF following DCMF presented the highest amount of polyphenol content than the other fractions. The abundance of these fractions in polyphenols may explain the traditionally use of this Asteraceae in the treatment of bacterial infections. Because polyphenols are important antibacterial activity [29]. The abundance of two fraction extracts in polyphenol content should also explained antioxidant activity results. In effect, it is well known that, total phenolics constitute one of the major groups of compounds antioxidants [30]. Also, Phenols are very important

plant constituents because of their scavenging ability due to their hydroxyl groups. The phenolic compounds may contribute directly to antioxidative action [31]. It is known that polyphenolic compounds have inhibitory effects on mutagenesis and carcinogenesis in humans when ingested up to 1 g daily from a diet rich in fruits and vegetables [32]. Phenolic compounds from plants are known to be good natural antioxidants. The interests of phenolics are increasing in the food industry because they retard oxidative degradation of lipids and thereby improve the quality and nutritional value of food [33].

About the antioxidants properties, three methods were used for a best appreciation of our results; because a recent study demonstrates that there are differences between the test systems for the determination of the antioxidants properties [34, 35]. As a matter of fact, it is interesting to evaluate at last two or more methods. Analysis of our results shows a relationship between polyphenol content and antioxidants properties as [36, 37, 38] showed linear. These findings are in accordance with the earlier reports on total phenolic and antioxidant activity in relationship extracts [39].

Moreover, plants have been model source of medicines as they are a reservoir of chemical agents with therapeutic properties. They provide a good source of anti-infective agents, for example emetine, quinine and berberine which still remain to be highly effective instruments in the fight against microbial infections. Various publications have documented the antimicrobial activity of plant extracts [40, 41, 42]. The results obtained in this study indicate a considerable difference in antibacterial activity with extracts. The bacteriostatic and bactericidal activity could be ascribed to the presence of polyphenolic compounds. In effect, some previous studies showed that polyphenolic compounds cause inhibition of a wide range of microorganisms. Phenol is well known as a chemical antiseptic [43]. In addition, Phenolic and terpenic antimicrobial activities are well documented [44]. Polyphenols, such as tannins and flavonoids, are important antibacterial activity [45]. The antimicrobial activity of flavonoids is due to their ability to complex with extracellular and soluble protein and to complex with bacterial cell wall while that of tannins may be related to their ability to inactivate microbial adhesions, enzymes and cell envelop proteins [46].

The results indicated that most of the extracts were able to inhibit Gram-positive bacteria as compared to Gram-negative bacteria. This is further confirmed by the previous studies by [47, 48] that describe the high sensibility of Gram-positive bacteria towards plant extracts and their component. Certain authors as [49] reported that Gram-negative bacteria are more resistant to the plant-based organic extracts because the hydrophilic cell wall structure of Gram-negative is constituted essentially of a lipopolysaccharide (LPS) that blocks the penetration of hydrophobic oil and avoids the accumulation of organic extracts in target cell membrane [50]. This is the reason why Gram positive bacteria were found to be more sensitive to various extracts.

One notice that extracts are more sensible on certain bacteria strains than standard drug (gentamycin). According a study [51], a probable degree of lipophilicity might be responsible for the extracts being higher in activity than standard drugs used lipophilicity toxicity is due to the interactions with the membrane constituents and their arrangement. Considering the above, Gram-positive bacteria should be more susceptible since they have only an outer peptidoclycans layer which is not an effective permeability barrier as reported by [52]. But in this study, we found contradicting results. *Bacillus cereus* some Gram-positive has developed resistance to the β -lactam antibiotics due to the production of chromosomal or plasmid mediated β -lactamases or by producing penicillin binding proteins (PBPs). All the *Staphylococcus aureus* strains have from PBPs (PBP1 to PBP4), but MRSA express a special PBP (PBP2 or PBP2a) from the mec A gene PBP2a takes over the biosynthetic function of normal PBPs in the presence of inhibitory concentration of β -lactams because PBP2 has a decreased binding affinity to β -lactams [53]. This has resulted in the development of multidrug resistance against β -lactam and other antibiotics. In addition, the polysaccharide capsular material in some of the pathogenic microorganism is responsible for virulence and antimicrobial resistance [54].

Table 1: Minimum Inhibitory Concentration ($\mu\text{g/ml}$) of bioactive fractions (DCMF and EAF) from *Laggera aurita* L

	LM2	S.typ	S.oro	S.inf	S.nig
Gen	500	250	250	500	500
DCMF alone	250	125	125	250	250
EAF alone	250	125	125	125	125
DCMF + Gen	125	62.5	62.5	62.5	125
EAF + Gen	125	31.25	31.25	62.5	62.5

The results are the means of number of the colonies \pm standard deviations.

Table 2: Minimum bactericidal Concentration ($\mu\text{g/ml}$) of bioactive fractions (DCMF and EAF) from *Laggera aurita* L

	LM2	S.typ	S.oro	S.inf	S.nig
DCMF alone	>1000	500	500	1000	>1000
EAF alone	1000	500	500	500	500
DCMF + Gen	500	125	125	250	500
EAF + Gen	250	62.5	62.5	125	125

The results are the means of number of the colonies \pm standard deviations.

Table 3: Bacteriocidal/Bacteriostatic capacity of bioactive fractions (DCMF and EAF) from *Laggera aurita* L

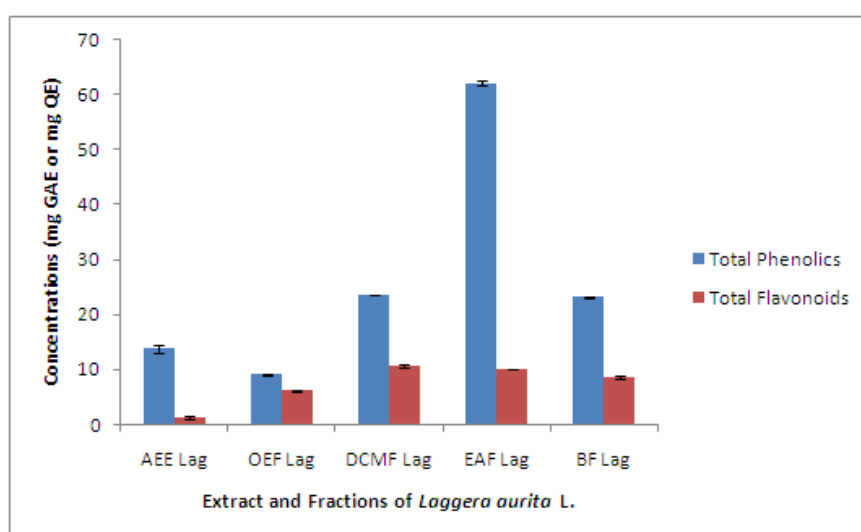
	LM2	S.typ	S.oro	S.inf	S.nig
DCMF alone	-	-	-	-	-
EAF alone	-	-	-	-	-
DCMF + Gen	-	+	+	-	-
EAF + Gen	+	+	+	+	+

The results are the means of number of the colonies \pm standard deviations., +: bacteriocidal effect (MBC/MIC = 1 or 2) -: bacteriostatic effect (MBC/MIC = 4 or 16).

Table 4: Fractional Inhibitory Concentration index (FICI) of the best bioactive fraction (flavonoid-rich fractions) in combination with gentamycin against Food Bacterial strains Multi-resistants.

	LM2	S.typ	S.oro	S. inf	S.nig
FICa	0.50	0.250	0.250	0.50	0.50
FICb	0.250	0.125	0.125	0.125	0.125
FICI	0.750	0.375	0.375	0.625	0.625
Effect	Addi	Syner	Syner	Addi	Addi

FICa = MIC of the combination/MICa alone; FICb = MIC of the combination/MICb alone and FICI = FICa + FICb, a = Flavonid-rich fractions; b = gentamycin. The FICI was interpreted as follows: (1) a synergistic effect when FICI ≤ 0.5 ; (2) an additive effect when FICI > 0.5 and < 1 and (3) an antagonistic effect when FICI > 1 . Syner = Synergetic, Addi= Additive, Gen = gentamycin

**Fig. 1: Polyphenol content of extract and fractions from *Laggera aurita* L.**

AEE Lag: Aqueous ethanolic extract of *Laggera aurita*, **OEF Lag:** Oil ether extract of *Laggera aurita*, **DCMF Lag:** Dchloromethane fraction of *Laggera aurita*, **EAF Lag:** ethyl acetate fraction of *Laggera aurita*, **BF Lag:** buthanolic fraction of *Laggera aurita*.

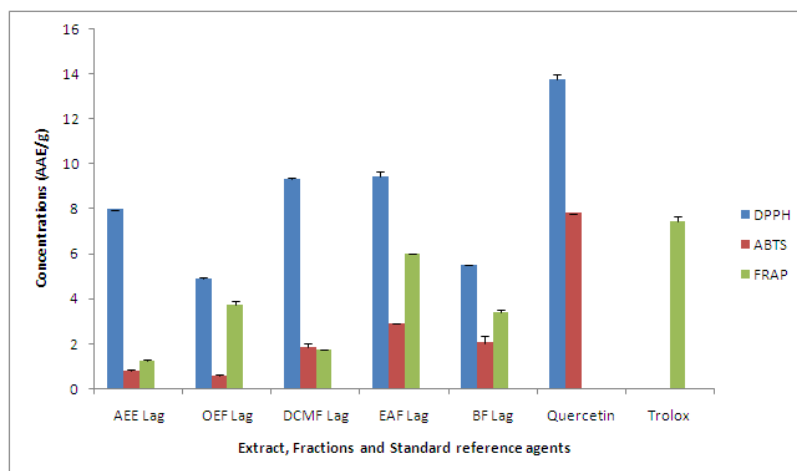


Fig. 2: Antioxidant activity of extract and fractions from *Laggera aurita* L.

AEE Lag: Aqueous ethanolic extract of *Laggera aurita*, **OEE Lag:** Oil ether extract of *Laggera aurita*, **DCMF Lag:** Dchloromethane fraction of *Laggera aurita*, **EAF Lag:** ethyl acetate fraction of *Laggera aurita*, **BF Lag:** buthanolic fraction of *Laggera aurita*.

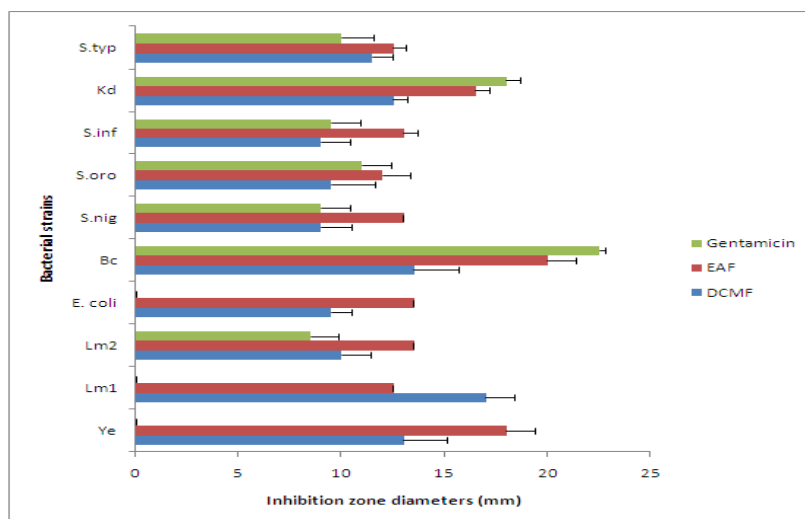


Fig. 3: Inhibition Zone Diameters (mm) of extract and fractions from *Laggera aurita* L. and conventional antibiotics (Penicillin and gentamycin).

CONCLUSION

This study on this Asteraceae confirms that *Laggera aurita* L. is a good candidate for antibacterial and antioxidant uses. Thus, which many explain the traditional basis of using this herbaceous in the treatment of various bacterial infections in Burkina Faso. Further pharmacological investigations are required to identify the active constituents of the plant extracts responsible for the antioxidant and antibacterial effects.

CONFLICT OF INTERESTS

Declared None

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr Moussa Compaoré, Prof. Martin Tiendrébéogo and Prof. Nicolas Barro from Biochemistry Department of the University of Ouagadougou for their different contributions in this study.

REFERENCES

- Treben, M: Health Through God's Pharmacy. 2nd Edn., Ennsthaler Publisher, Australia 1998, pp:260-264.
- Shanmugasundaram, S: Complementary and alternative therapies in palliative care. A transition from modern medicine to traditional medicine in India. J. Cancer Pain Symptom Palliation 2005, 1:25-29.
- Gill, N.S., J. Bajwa, P. Sharma, K. Dhiman and S. Sood: Evaluation of antioxidant and antiulcer activity of traditionally consumed Cucumis melo seeds. J. Pharmacol. Toxicol 2011, 6:82-89.
- Shah, P. M: The need for new therapeutic agents. What is in the pipeline? Clin. Microbiol. Infect 2005, 11:36-42.
- Braca, A., C. Sortino, M. Politi, I. Morelli and J. Mendez: Antioxidant activity of flavonoids from Licania licaniaeflora. J. Ethnopharmacol 2002, 79:379-381.
- Modi, A.J., S.S. Khadabadi, S. L. Deore and M.S. Kbd: Antioxidant effects of leaves of Clerodendrum infortunatum (Linn.). Int. J. Pharmaceut. Sci. Res 2010, 1:67-72.
- Sati, S.C., N. Sati, U. Rawat and O.P. Sati: Medicinal plants as a source of antioxidants. Res. J. Phytochem 2010, 4:213-224.
- Daniel, M: Medicinal Plants. Chemistry and Properties. Science Publishers, USA 2006, pp:1-9.
- Burkill HM: The useful plants of West/Tropical Africa. Royal Botanic Gardens Kew 1985, 1:452-453:481.
- Nacoulma OG: Medicinal plants and their traditional uses in Burkina Faso. PhD Thesis. University of Ouagadougou, Biochemistry-microbiology department 1996.
- Njan Nlôga AM, Saotoing P, Tchouankeu JC, Messi J: Effect of Essential Oils of Six Local Plants Used Insecticide on Adults of *Anopheles gambiae*, Giles 1902, J. Entomol 2007, 4(6):444-450.

12. Okhale SE, Odiniya EO, Kunle OF: Preliminary Phytochemical and Pharmacognostical Investigation of Pediatrics Antimalarial *Laggera pterodonta* (DC) Sch. Bip.: Asteraceae of Nigerian Origin, Ethnobot. Leaf 2010, 14:457-66, 2010.
13. Zhao Y, Reanmongkol W, Bouking P, Zhang R: Acute toxicity and antinoceptive effect of *Laggera pterodonta* (DC) Benth Aqueous extract. Nat. Prod. Res. Dev 2004, 17(4):457-459.
14. Shi S, Huang K, Zhang Y, Zhao Y, Du Q: Purification and identification of antiviral components from *Laggera pterodonta* by high-speed counter-current chromatography. J. chromatogr. B. Analytical technologies in the biomed. Life. Sci 2007, 859 (1):119-124.
15. Wu Y, Wang F, Zheng Q, Lu L, Yao H, Zhou C, Wu X, Zhao Y: Hepatoprotective effect of total flavonoids from *Laggera alata* against carbon tetrachloride-induced injury in primary cultured neonatal rat hepatocytes and in rats with hepatic damage. J. Biomed. Sci 2006, 13:569-578.
16. Yang GZ, Li YF, Yu X, Mei ZN: Terpenoids and flavonoids from *Laggera pterodonta*, Yao. Xue. Xue. Bao 2006, 42(5):511-515.
17. Xiao Y, Zheng Q, Zhang Q, Sun H, Guéritte F, Zhao Y: Eudesmane derivatives from *Laggera pterodonta*. Fitoterapia 2003, 74(5):459-463.
18. Donatien Kaboré, Hagrétou Sawadogo-Lingani, Mamoudou H. Dicko, Bréhima Diawara and Mogens Jakobsen: Acid resistance, bile tolerance and antimicrobial properties of dominant lactic acid bacteria isolated from traditional "maari" baobab seeds fermented condiment. African Journal of Biotechnology 2012, 11(5):1197-1206
19. Lamien-Meda A., C.E. Lamien, M.M.Y. Compaoré, R.T.N. Meda, M. Kiendrebeogo, B. Zeba, J.F. Millogo and O.G. Nacoulma: Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. Molecules 2008, 13:581-594.
20. Hinnebourg, I., Damien Dorman, H. J., Hiltunen, R.: Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. Food Chemistry 2006, 97:122-129.
21. Konaté K, Hilou A, Mavoungou JF, Lepengué AL, Souza A, Barro N, Datté JY, M'Batchi B and Nacoulma OG: Antimicrobial activity of polyphenol-rich fractions from *Sida alba* L. (Malvaceae) Against cotrimoxazol-resistant bacteria strains. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 2012, 11:5. doi:10.1186/1476-0711-11-5.
22. NCCLS-National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standard for anti-microbial susceptibility testing: eleventh informational supplement. Document M100-S11. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Wayne, PA, USA 2001.
23. Berche P, Gaillard JL, Simonet M: In Nosocomial Infections Caused by Bacteria and Their Prevention in Bacteriology Edited by: Flammarion Medicine Sciences 1988, 64-71.
24. Kiessoun Konaté, Jacques François Mavoungou, Alexis Nicaise Lepengué, Raïssa RR Aworet-Samseny, Adama Hilou, Alain Souza, Mamoudou H Dicko and Bertrand M'Batchi: Antibacterial activity against β -lactamase producing Methicillin and Ampicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination BMC, Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 2012, 11:18 doi:10.1186/1476-0711-11-18.
25. Rice-Evans, C.A., N. Miller and G. Paganga: Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci 1997, 2:152-159.
26. Prior, R.L. and G. Cao: Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables. Diet and health implications. Hort. Sci 2000, 35:588-592.
27. Mathew, S. and T. E. Abraham. In vitro antioxidant activity and scavenging effect of Cinnamomum verum leaf assayed by different methodologies. Food. Chem. Toxicol 2006, 44:198-206.
28. Meenakshi, S., D.M. Gnanambigai, S.T. Mozhi, M. Arumugam and T. Balasubramanian: Total flavonoid and in vitro antioxidant activity of two seaweeds of rameshwaram coast. Global J. Pharmacol 2009, 3:59-62.
29. Machado, T.D., I.C.R. Leal, A.C.F.A. Maral, K.R.N. dos Santos, M.G. da Siva and R.M. Kuster: Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. J. Brazilian Chem. Soc 2002, 13:606-610.
30. Cakir, A., A. Mavi, A. Yildirim, M.E. Duru, M. Harmandar and C. Kazaz: Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fractionation. J. Ethnopharmacol 2003, 87:73-83.
31. Duh, P.D., Y.Y. Tu and G.C. Yen: Antioxidative activity of water extracts of Hamg jyr (Chrysanthemum morifolium). Lebensmittel-Wissenschaft Technol 1999, 32:269-277.
32. Tanaka, M., C., W. Kuie, Y. Nagashima and T. Taguchi: Application of antioxidative Maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products. Bull. Jap. Soc. Scientific Fisheries 1988, 54:1409-1414.
33. Aneta, W., O. Jan and C. Renata: Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chem 2007, 105:940-949.
34. Schlesier, K., M. Harwat, V. Bohm and R. Bitch: Assessment of antioxidant activity by using different in Vitro methods. Free radical Res 2002, 36:177-187.
35. Nsimba, R.Y., H. Kikuzaki and Y. Konishi: Antioxidant activity of various extracts and fractions of chenopodium quinoa and Amaranthus Ssp. Seeds. Food chem 2008, 106:760-766.
36. Anna, M.N., P.P. Riitta, A. Marjukka and O.C. Kirsijärvi: Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. Food chem 2003, 81:485-493.
37. Negro, C.L. Tommasi and A. Miceli: Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. Bioresour. Technol 2003, 87:41-44.
38. Ramandeep, K.T. and P.S. Geoffrey: Antioxidant activity in different fraction of tomatoes. Food Res. Int 2005, 38:487-494.
39. Gao, X., M. Ohlander, N. Jeppsson, L. Björk and V. Trajkovski: Changes in antioxidant effects and their relationships to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. J. Agric. Food Chem 2000, 48:1485-1490.
40. Hoffman, D.L.: The Herb User's Guide. Thomson Publishing Group, Wellingborough, London 1987.
41. Nasar-Abbas, S.M. and A.K. Halkman: Antimicrobial effect of water extract of sumac (*Rhus coriaria* L.) on the growth of some food borne bacteria including pathogens. Int. J. Food Microbio 2004, 97:63-69.
42. Rahman, A., M.A.K. Parvez, T. Parvin, D.K. Paul and M.A. Sattar: Antimicrobial activity of three bioactive compounds from the stem bark of Piper chaba hunter. Bioscience Res 2004, 1:16-20.
43. Abeer M, Haj A, Sanaa OY: Anti-microbial Activity of Acacia nilotica Extracts Against Some Bacteria Isolated from Clinical Specimens. Res J Med Plant 2007, 1(1):25-28.
44. Rabe T, Mullholland D, van Staden J: Isolation and identification of antibacterial compounds from *Vernonia colorata* leaves. J. Ethnopharmacol 2002, 80:91-94.
45. Machado TD, Leal ICR, Amaral ACF, dos Santos KRN, da Siva MG, Kuster RM: Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. J Braz Chem Soc 2002, 13:606-610.
46. Cowan MM. Plants products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 1999;12:564-582.
47. Kelmanson, J. E., A. K. Jager and J. van Staden: Zulu medicinal plants with antimicrobial activity. J. Ethnopharmacol 2000, 69:241-246.
48. Zongo, C., A. Savadogo, L. Ouattara, I.H.N. Bassole and C.A.T. Ouattara: Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of *Ampelocissus grantii* (Baker) Planch. (Vitaceae): A medicinal plant from Burkina Faso. Int. J. Pharmacol 2010, 6:880-887.
49. Reynolds, J.E.F.: Martindale the Extract Pharmacopoeia. 31st Edn., Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, London 1996.
50. Bezic, N.M., S.V. Dinkic and A. Radonic: Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* L. essential oil. Phytother. Res 2003, 17:1037-1040.
51. Tomas-Barberan, F., E. Iniesta-Sanmartin, F. Tomas-Lorente and A. Rumbero: Antimicrobial phenolic compounds from three Spanish *Helichrysum* species. Phytochemistry; 29:1093-1095.
52. Nostro, A, Germano MP, D'Angelo V, Marino A, Cannatelli MA: Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Lett. Applied Microbiol 2000, 30:379-384.
53. Bachi BB, Rotherer S: Factors influencing methicillin resistance in *Staphylococci*. Arch Microbiol 2002, 178:165-171.
54. Hooper DC: Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. Emerg Infect Dis 2001, 7:337-341.

ARTICLE II

Dibala I. C., Konaté K., Diao M., Ouédraogo M. and Dicko H.M. (2016). Chemical composition, antioxydant and antibacterial properties of extracts from *Ocimum americanum* L., against multi-resistant food bacteria. *Word Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5 (12): 1549-1567.



CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF EXTRACTS FROM *OCIMUM AMERICANUM* L. AGAINST MULTI-RESISTANT FOOD BACTERIA

Crépin I. Dibala¹, Kiessoun Konaté^{2,3}, Mamounata Diao¹, Maurice Ouedraogo⁴
Mamoudou H. Dicko^{1*}

¹Laboratoire de Biochimie Alimentaire, Enzymologie, Biotechnologie Industrielle et Bio-Informatique, Université de Ouagadougou, 03 BP 848, Ouagadougou 03, Burkina Faso.

²Unité de Formation en Sciences Appliquées et Technologique (UFR/SAT) et Institut de Sciences de l'Environnement et de Développement Rural (ISEDR), Université Polytechnique de Dédougou, Burkina Faso.

³Laboratoire de Biochimie et Chimie Appliquées (LABIOCA), UFR/SVT, Université de Ouagadougou, 09 BP 848 Ouagadougou 09, Burkina Faso.

⁴Laboratoire de Physiologie Animale, Université de Ouagadougou, 09 BP 848 Ouagadougou 09, Burkina Faso.

Article Received on
18 Oct. 2016,

Revised on 08 Nov. 2016,
Accepted on 29 Nov. 2016

DOI: 10.20959/wjpps201612-8239

*Corresponding Author

Mamoudou H. Dicko

Laboratoire de Biochimie
Alimentaire, Enzymologie,
Biotechnologie Industrielle
et Bio-Informatique,
Université de Ouagadougou,
03 BP 848, Ouagadougou
03, Burkina Faso.

ABSTRACT

Ocimum americanum L. (Lamiaceae) is among herbal flora of Burkina Faso used traditionally in the treatment of infectious diseases, fever and pain. Bioactive compounds were screened from this plant. Antibacterial properties of several fractions of this plant were determined. In addition, the antioxidant potential of the extracts was evaluated using three separate assays. Among five separate fractions, it appeared that ethyl acetate fraction (EAF) and dichloromethane fraction (DCMF) had the highest content of total phenolics. Levels of total phenolic compounds and flavonoids in EAF were 63.81 ± 0.12 mg GAE and 10.72 ± 0.06 mg QE, respectively. In correlation to levels of phenolic compounds, EAF presented the best antioxidant activity. The antibacterial activity of the tested fractions was correlated with their phenolic constituents. The EAF fraction had higher antibacterial activity than gentamicin. The fractions exhibited higher antibacterial.

activity against Gram positive bacteria such as *B. cereus* than Gram negative one such as *E. coli*. The EAF fraction displayed the best antimicrobial activities and presented synergistic or additive effect with gentamicin. Specific extraction and fractionation of *O. americanum* leaves yielded useful drug against gastro-enteritis pathologies caused by Gram-negative bacteria.

KEYWORDS: Polyphenols, Antioxidant, antibacterial, Gentamicin, *Ocimum americanum*.

INTRODUCTION

Nowadays the degree of infectious diseases and related problems are increasing in Africa with severe effects. Nevertheless, herbal plants are an important source of new chemical substances with potential therapeutic uses. Several hundred of pure chemical substances extracted from higher plants are used in medicine throughout the world.^[1]

The increase interest on plant medicines in today's world is from the belief that green medicine is safe and dependable, compared with costly synthetic drugs that have adverse effects.^[2]

Until now, plant materials have remained an important resource for combating illnesses, including infectious diseases and many of these plants have been investigated for drugs or templates for the development of new therapeutic agents.^[3] Screening for medicinal plants that are more potent and efficient antibiotic agents have accelerated in recent years. In Burkina Faso, most medicinal plants are traditionally used for several purposes.

For instance, in Burkina Faso leaves of *Ocimum americanum* L. (Lamiaceae) have been used as an insecticide for the protection against postharvest insect damage especially that caused by bruchid beetles.^[4] Ethnobotanical investigations in the central region of Burkina Faso have shown that this plant is frequently used in traditional medicine to treat various kinds of diseases such as malaria, fever, pain, stomatitis, astmatic, bronchitis, nasal congestion and the plant has also antibacterial activity.^[5] Phytochemical analysis of the leafy stick of the plant has mainly revealed the presence of saponosides, steroids and polyphenol compounds.^[5,6]

It has been established that oxidative stress is among the major causative factors in more than hundred diseases such as malaria, acquired immunodeficiency syndrome, heart disease stroke, arteriosclerosis, diabetes and cancer.^[7] Many studies evidenced that medicinal plants

with high content of antioxidants can be effective in prevention of free radical formation by scavenging, thus playing an important role in the prevention of these diseases.^[8,9]

Bioactive compounds found in medicinal plants belong to various chemical classes including terpenes, alkaloids, coumarins, phenolic compounds, etc. Some of these compounds have anti cancer, antioxidant and antimicrobial activities.^[10] Thus, there is a permanent need to discover new antimicrobial compounds because of the increase in the incidence of new and re-emerging infectious diseases and resistance to current antibiotics. Interesting results of antibiotics from plant provide the ground for further experimentation on a vast number of plants.^[11] Previous screening of bioactive compounds was carried out on *Ocimum americanum* L..^[12,13,14] However, no study was performed on antioxidant and antibacterial activities of its dichloromethane and ethyl acetate rich-phenolic compounds fractions and their antimicrobial alone and in combination with reference antibiotics. This novel screening may provide a scientific basis for the traditional use of this plant for the cure of gastro-enteritis.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents: Quercetin and iodonitrotetrazolium chloride (INT) were from Sigma-aldrich (Germany). 2, 2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH), trichloroacetic acid, ascorbic acid were from Fluka (Switzerland). Potassium hexacyanoferrate and phosphate buffer were from Prolabo (France). Gentamicin was from Alkom Laboratories LTD. Mueller Hinton agar was from DIFCO (USA). All chemicals were of analytical grade.

Plant materials: *Ocimum Americana* L. (Lamiaceae) was collected in september 2011 in Gampela (geographical coordinates: 12° 25' 51" North, 1° 22' 18" West), 25 Km east of Ouagadougou, Burkina Faso. The plant was identified in the laboratory of biology and ecology, University of Ouagadougou, where a voucher specimen was deposited.

Bacterial strains and antibiotics

Ten references of food bacterial strains (Gram-positive and Gram-negative) were tested: Kd = *Bacillus cereus* MADM 1561, Bc = *Bacillus cereus* MADM 1291, Lm1= *Listeria monocytogenes* 057, Lm 2 = *Listeria monocytogenes* Scott A, S. inf = *Salmonelle infantis* SKN 557, S.oro = *Salmonella oranienburg* SKN 1157, S.nig= *Salmonella nigeria* SKN 1160, S.typ= *Salmonella typhimurium* SKN 533, Ec = *Escherichia coli* 81 nr. 148 SKN 541,

Ye = *Yersinia enterocolitica* 6A28 SKN 599. All bacterial strains were obtained from culture collection as previously described.^[15]

Fractionation

Powdered plant materials (50 g) were extracted with 500 ml aqueous ethanol (AEE), 80% (v/v) for 24 h under mechanic agitation (SM 25 shaker, Edmund BÜHLER, Germany) at room temperature (20-22°C). After filtration, ethanol was removed under reduced pressure in a rotary evaporator (BÜCHI, Rotavapor R-200, Switzerland) at 40°C. The aqueous extracts were subjected to sequential liquid-liquid extraction with oil ether (OEF), dichloromethane (DCMF), ethyl acetate (EAF) and n-butanol (BF). Each fraction was then collected and concentrated to dryness under reduced pressure. The different fractions were freeze-dried by Telstar Cryodos 50 freeze-dryer. The fraction residues were packed in waterproof plastic flasks and stored at -30°C until use.

Qualitative determination of bioactive chemical compounds

The procedures described by Ciulei^[16] were used for the qualitative detection of the following chemical compounds:

- The reaction to FeCl₃ for polyphenols,
- The test of Shibata for flavonoids,
- The test of Feiggl-Frehden for coumarins,
- The test of Liebermann/Buchard for the triterpens/steroids,
- The test of Keller-Kiliani for the cardenolides,
- The foam test for the saponosides,
- The test of Dragendorff for alkaloids.

Quantitative determination of polyphenol compounds

Total phenolic content

Total phenolic compounds were determined by Folin-Ciocalteu method as previously described.^[17] Aliquots (125 µl) of solution from extract and each fraction (dichloromethane and ethyl acetate fractions) in methanol (10 mg/ml) were mixed with 625 µl Folin-Ciocalteu reagent (0.2 N). After 5 min, 500 µl of aqueous Na₂CO₃ (75 g/l) were added and the mixture was vortexed. After 2 h of incubation in the dark at room temperature, the absorbance were read at 760 nm against controls on a spectrophotometer (CECIL CE 2041, CECIL Instruments, England). All experiments were carried out in triplicate. A standard calibration curve plotted using gallic acid yielded the equation: $Y = 0.0289x - 0.0036$; $R^2 = 0.9998$, where

Y is the absorbance and x the concentration of total phenolics. The results were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE)/100 mg of extract or fractions.

Total flavonoid content

Total flavonoids were determined by Dowd method as previously modified.^[17] A standard calibration curve plotted using quercetin yielded the equation: $Y = 0.0289x - 0.0036$; $R^2 = 0.9998$, where Y is the absorbance and x the concentration of flavonoids. The data obtained were the means of three determinations. The amounts of flavonoids in plant extracts were expressed as mg of quercetin equivalents (QE)/100 mg of extract or fractions.

Determination of in vitro antioxidant activity

DPPH radical method

Free radical scavenging activity of each fraction (dichloromethane and ethyl acetate fractions) was determined by the 2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method^[17] using a spectrophotometer (CECIL CE 2041, CECIL Instruments, England). Fractions were prepared by dissolving 10 mg of dry extract in 10 ml of methanol. The samples were homogenized in an ultrasonic bath. 0.5 ml of aliquots which were prepared at different concentrations from each sample of fraction was mixed with 1 ml of methanolic DPPH solution (20 mg/ml). After 15 min in the dark at room temperature, the decrease of absorbance was read at 517 nm. All experiments were performed in triplicate. A standard calibration curve plotted using ascorbic acid, yielded the equation: $Y = -16.815x + 6.8373$; $R^2 = 0.9976$, where Y is the absorbance and x ascorbic acid equivalent per g of fraction.

ABTS radical cation decolorization assay

For ABTS radical cation decolorization assay, the procedure was performed as previously described.^[17] The decrease on absorbance was read at 734 nm. A standard calibration curve plotted using ascorbic acid, yielded the equation: $Y = -0.0342x + 0.634$; $R^2 = 0.9996$, where Y is the absorbance and x ascorbic acid equivalent per g of fraction.

Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

The FRAP assay was performed as previously described.^[17] 0.5 mL of each fraction (1 mg/mL) was mixed with 1.25 mL of phosphate buffer (0.2M, pH 6.6) and 1.25 mL of aqueous 1% (w/v) potassium hexacyanoferrate [$K_3Fe(CN)_6$] solution. After 30 min incubation at 50°C, 1.25 mL of 10% (w/v) trichloroacetic acid was added and the mixture was centrifuged at 2000 g for 10 min. Then, the upper layer solution (0.625 mL) was mixed with 0.625 mL

distilled water and a freshly prepared 0.125 mL of 0.1% (w/v) FeCl₃ solution. Absorbances were read at 700 nm on spectrophotometer (CECIL CE 2041, CECIL Instruments, England). A standard calibration curve plotted using ascorbic acid, yielded the equation: $Y = 0.008x - 0.0081$; $R^2 = 0.9999$, where Y is the absorbance and x ascorbic acid equivalent per g of fraction.

Determination of in vitro antibacterial activity of dichloromethane and ethyl acetate fractions

Preparation of inocula

The susceptibility tests were performed by Mueller Hinton agar-well diffusion method.^[18] Bacterial strains grown on nutrient agar at 37°C for 18 h were suspended in 0.9 % (w/v) NaCl solution and adjusted to a turbidity of 0.5 Mac Farland standard, 10⁸ colony forming units per milliliter (CFU/ml). To obtain the inocula, these suspensions were diluted 100 times in Muller Hinton broth to give 10⁶ CFU/ml.

Preparation of discs

The stock solutions of each fraction were dissolved in 10% (v/v) dimethylsulfoxide (DMSO) in water at a final concentration of 10 mg/ml.

Stock solutions of fractions were sterilized by filtration through 0.22 µm Millipore membrane. Sterile discs (6 mm) were impregnated with 10 µL of the sterile solution of each fraction. Negative controls were prepared using discs impregnated with 10% (v/v) DMSO in water and positive control prepared using diffusion discs containing gentamicin for all bacterial strains.^[18]

Disc-diffusion assay

Petri plates (9 cm) were prepared with 20 ml of a base layer of molten agar. Each Petri plate was inoculated with 15 µl of each bacterial suspension (10⁶ CFU/ml). After drying in a sterile hood, 6 mm diameter discs soaked with 10 µl of the different fraction solution dilutions were placed on the agar. Discs containing gentamicin (25 µg) were used as positive controls and 10% DMSO was used as a negative control. The plates were incubated at 37°C, for 24 h. The diameters of the inhibition zones were measured in millimeters. The fraction inducing inhibition zone higher than 3 mm around disc were considered as antibacterial. All tests were performed in triplicate and the bacterial activity was expressed as the mean of inhibition diameters.^[18]

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution method in culture broth as previously described.^[18,19] Eight serial two-fold dilutions of fractions or gentamicin were prepared as described before, to obtain final concentration range of 1000 to 15.625 µg/ml. Microtiter-plates of 96-wells (NUNC, Denmark) containing 100 µL, each of Mueller Hinton (MH) broth were used. For each bacteria strain, three columns of eight wells were used. Each well contained: culture medium + fractions or gentamicin + inoculum (10 µl of inocula) and INT (50 µl; 0.2 mg/ml for 30 min). The plates were covered and incubated at 37°C for 24 h. All tests were performed in triplicate and the bacterial activity was expressed as the mean of observed inhibitions. Viable bacteria reduced the yellow dye to a pink colour. The MIC was defined as the lowest concentration of substance of extracts at which no colony was observed after incubation. The MIC was defined as the lowest concentration where no change was observed, indicating no growth of bacteria.

Determination of minimal bactericidal concentration (MBC)

Minimum bactericidal concentration (MBC) was recorded as a lowest fraction concentration killing 99.9% of the bacterial inocula after 24 h incubation at 37°C. Each experiment was repeated at least three times. MBC values were determined by removing 100 µl of bacterial suspension from subculture demonstrating no visible growth and inoculating nutrient agar plates. Plates were incubated at 37°C for a total period of 24 h. The MBC is determined with the wells whose the concentrations are higher than MIC.^[18,19] The MBC were determined in molten agar medium.

Evaluation of bactericidal and bacteriostatic capacity

The action of an antibacterial on the bacterial strains was characterized with two parameters such as minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The ratio MBC/MIC, was used to evaluate antibacterial activity.

If the ratio $MBC/MIC = 1$ or 2 , the effect is considered as bactericidal but if the ratio $MBC/MIC = 4$ or 16 , the effect was defined as bacteriostatic.^[18,20]

Evaluation of the fractional inhibitory concentration index (FICI)

The Muller Hinton agar dilution method was used to evaluate the fractional inhibitory concentration index (FICI) of flavonoid-rich fractions and the tested anti-microbial standards as reported earlier.^[21] Eight serial two-fold dilutions of flavonoid-rich fractions were prepared

as described before, to obtain final concentration range of 1000 µg/ml to 15.6 µg/ml. A series of two-fold serial dilutions of gentamicin was also prepared in the same conditions as flavonoid-rich fractions. In this way, all antibacterial standards dilutions were mixed with the appropriate concentration of flavonoid-rich fractions obtaining a series of the combinations of conventional antibiotics and flavonoid-rich fractions. The concentrations prepared corresponded to 1; 1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32; 1/64; of MIC values. The 96-well micro-plate (NUNC, Denmark) containing 100 µL of Mueller Hinton (MH) broth was used. For each bacteria strain, three columns of eight wells of the micro-plate were used. Each well has contained: the culture medium + combination of flavonoid-rich fractions with Gentamicin + inoculum (10 µl of inocula) and INT (50 µl; 0.2 mg/ml for 30 min). The plates were covered and incubated at 37°C for 24 h.

All tests were performed in triplicate and the bacterial activity was expressed as the mean of inhibitions produced. Viable microorganisms reduced the yellow dye to a pink colour. Inhibition of bacterial growth was judged by rose or yellow colour. The analysis of the combination of flavonoid-rich fractions and gentamicin was obtained by calculating FICI^[20] as follows: $FICI = MIC_a (MIC \text{ of the combination of flavonoid-rich fractions with Gentamicin} / MIC \text{ a alone}) + MIC_b (MIC \text{ of the combination of flavonoid-rich fractions with Gentamicin} / MIC_b \text{ alone})$, where MIC_a referred to MIC of flavonoid-rich fractions from *Ocimum americanum* and MIC_b referred to MIC from gentamicin.

The FICI was interpreted as follows: an synergistic effect when $FICI \leq 0.5$; an additive or indifferent effect when $0.5 < FICI < 1$ and an antagonistic effect when $FICI > 1$.

Statistical analysis: The data were expressed as mean \pm standard deviation (SD) of three determinations. Statistical analysis with ANOVA test with a statistical significance level set at $P < 0.05$ and linear regression was carried out using XLSTAT 7.1.

RESULTS AND DISCUSSION

Ocimum americanum L., leave fractions were separated as aqueous ethanolic extract (AEE), oil ether fraction (OEF), dichloromethane fraction (DCMF), ethyl acetate fraction (EAF) and n-butanol fraction (BF). The following chemical groups in the fractions were qualitatively detected in the fractions: total phenolics, flavonoids, triterpenes/steroids, coumarins, alkaloids, saponosids, and cardenolides and results are indicated in Table 1.

It appeared that only EAF and DCMF fractions contained significant levels of phenolic compounds. EAF and DCMF fractions were rich in phenol acids and flavonoids, respectively. The total phenolics content of per 100 mg of *Ocimum americanum* L., ranged from 33 ± 0.17 mg GAE to 63.81 ± 0.12 mg GAE in fractions. The highest content of total phenolics in *Ocimum americanum* was detected in EAF (63.81 mg GAE/100 mg). The lowest total phenolics were obtained in OEF 9.33 ± 0.17 mg GAE. The flavonoids content per 100 mg of *Ocimum americanum* L., fractions ranged from 5.56 ± 0.14 to 10.72 ± 0.06 mg QE (Figure 1). The highest content of flavonoids in was found in EAF (10.72 ± 0.06 mg QE/100 mg). In accordance with our results, it appears that sufficient amount of phenolic and flavonoid contents in different species of *Ocimum* have been also reported by several authors.^[22,23]

Antioxidant activities monitored using three different methods are displayed (Figure 2). For the DPPH method of evaluation of antioxidant activities, the values of different concentrations varied from 9.51 ± 0.06 to 10.26 ± 0.01 mmol AAE/g of fraction. The strongest DPPH activity (10.26 ± 0.01 mmol AAE/g) was obtained in the DCMF fraction. For the FRAP assay, the antioxidant activities were ranging from 2.36 ± 0.04 to 6.54 ± 0.09 mmol AAE/g. The strongest FRAP activity was obtained with EAF fraction. For ABTS radical cation decolorization assay, the different values were ranging from 1.92 ± 0.05 to 2.9 ± 0.01 mmol AAE/g. The best antioxidant activity using the ABTS assay was in EAF fraction. These results confirm those obtained by^[24] with EAF fraction *Laggera aurita* L., about antioxidant activity. In contrast to the previous research concerning antioxidant activity of *O. americanum*, our study showed a good antioxidant potential.^[25] Compared to our results, these findings showed that the methanolic extract of this herbaceous successively presented: 23.8 ± 1.3 $\mu\text{mol TE/g}$ (for DPPH), 1.94 ± 0.05 $\mu\text{mol TE/g}$ (for ABTS) and 47.9 ± 0.7 $\mu\text{mol TE/g}$ (for Ferric reducing).

Ten bacteria strains, including Gram-negative and positive-bacteria were used. The antibacterial assays were performed by broth micro dilution methods; for both qualitative and quantitative assays. Measures of inhibition zone diameters allowed to determine MIC and MBC and FICs and results are indicated in Tables 2 and 3. The susceptibility of the bacteria to phenolic compounds alone and in combination with conventional antibiotic (gentamicin) varied according to microorganisms. These results are compared with those obtained by.^[21,24] The MIC values were ranging from 500 $\mu\text{g/ml}$ to 31.25 $\mu\text{g/ml}$ and MBC values were ranging from 1000 $\mu\text{g/ml}$ to 62.5 $\mu\text{g/ml}$. The bactericidal and bacteriostatic effect of polyphenol

compounds alone and their combination with conventional antibiotics was calculated using the ratio MBC/MIC and results are in Table 4. With respect to FICI, results indicate synergistic and additive effects between polyphenol compounds (flavonoid-rich fractions) and gentamicin. This section is in Table 5. Our findings presented the same conclusions obtained by^[19] about this section.

According to this previous research, there is a synergistic effect between bioactive constituents and the conventional antibacterial^[21,24] as reported by the conclusion of this research. Combination antibiotic therapy has been studied to promote the effective use of antibiotics in increasing in vivo activity of antibiotics, in preventing the spread of drug-resistant strains, and in minimizing toxicity.^[26,27] The synergistic effect of gentamicin results in a reduction of the MIC/MBC for all bacteria (Table 4). A recent study about synergistic effect conduct by^[20], presented the same conclusion as our research. In effect, these results indicate a synergistic effect between bioactive constituents and the antimicrobial references.^[20] Unlike to our results about antibacterial activity, a recent study indicated that the ethyl acetate extract showed the lowest activity against the test organisms.^[28] Moreover, DCMF and EAF fractions exhibited antibacterial activity against all tested bacterial strains. The Gram-positive bacteria *B. cereus* was the most sensitive; while the Gram-negative one *E. coli* was the most resistant. This suggested that the antibacterial activity of the tested fractions was closely associated with their phenolic contents (Figure 3). Extracts from *Ocimum americanum* displayed bactericidal activity and showed good antibacterial activity as compared with that of a standard antibiotic such as gentamicin. Fractionations showed that alcohols are better solvents for the extraction of phenols and flavonoids from *Ocimum americanum* than ethers. Our previous findings on this plant revealed that it has high concentrations of phenolics compounds which have been reported to have potent antibacterial activities.^[29]

Phenolic acids and flavonoids are generally better extracted using mixture of alcohols/water.^[30] Fractions exhibited antioxidant activities in correlation with their phenolic content. Earlier studies have also shown correlations between polyphenol content and antioxidant activities.^[31] There was a significant correlation between levels of phenolic compounds in the extracts and their antibacterial activity. Polyphenols, such as tannins and flavonoids, are well-known to have antibacterial activities.^[32] Other findings also showed that phenols and flavonoids highly contribute to the antioxidant activity and antimicrobial

activity^[33,34] of plant extracts. The mechanism of toxicity of polyphenol against microbes could be explained by the inhibition of hydrolytic enzymes or other interactions with structural and transport proteins.^[35] In addition phenolic compounds can polymerize or yield quinones during oxidation reactions and these products could have toxicity effect against bacterial strains.^[36] Plant phenolic compounds are a major group of compounds acting as primary antioxidants due to their hydroxyl groups which contribute directly to the antioxidative action.^[37] Phenolic compounds are prominent hydrogen donors, making them good antioxidants.^[38] Moreover, the antioxidant activity of phenolic compounds is mainly due to their redox properties which play an important role as free radical scavengers, reducing agents, quenchers of singlet oxygen and chelators of pro-oxidant metals.^[39] As usually observed for most antibiotics, the antibacterial activity of *O. americanum* was most efficient against the Gram-positive bacteria than Gram-negative ones. Among the ten bacteria tested, *B. cereus* was the most sensitive to the extracts, while *E. coli* was the most resistant. *E. coli* is generally resistant to most plant extracts.^[40] These could be due to several possible reasons, in which the distinctive feature of Gram-negative bacteria is the presence of a double membrane surrounding the bacterial cell. Although, all bacteria have an inner cell membrane, Gram-negative bacteria have a unique outer membrane. Gram-negative bacteria possess an outer membrane and unique periplasm space not found in Gram-positive ones.^[41] This outer membrane excludes certain drugs and antibiotics from penetrating the cell, partially accounting for the reason why Gram-negative bacteria are generally more resistant to antibiotics than other Gram-positive bacteria. The highest sensitivity of *B. cereus* may be due to its cell wall structure and outer membrane.^[42] Thus as previously found of several foodborne bacterial,^[43] Gram-positive bacteria are more sensitive to *O. americanum* extracts than Gram-negative bacteria. The resistance of Gram-negative bacteria towards antibacterial substances is related to the hydrophilic surface of their outer membrane which is rich in lipopolysaccharide molecules, presenting a barrier to the penetration of numerous antibiotic molecules and is also associated with the enzymes in periplasm space, which are capable of breaking down the molecules introduced from outside.^[44] Indeed, synergy research in phytomedicine has established itself as a new key activity in recent years. It is one main aim of this research to find a scientific rational for the therapeutic superiority of herbal drugs derived from traditional medicine as compared with single constituents thereof. Synergy effects of the mixture of bioactive constituents and their byproducts contained in plant extracts are claimed to be responsible for the improved effectiveness of many extracts and conventional antimicrobial drugs.^[21]

Table 1: Qualitative analysis of extract and fractions

Compounds	AEE	OEF	DCMF	EAF	BF
Total phenolics	+	-	++	+/-	+/-
Flavonoids	+	-	+/-	++	+/-
Triterpenes/steroids	+/-	-	+/-	+/-	+/-
Coumarins	-	-	-	-	-
Alcaloids	+/-	-	-	-	-
Saponosides	+	+/-	+/-	+/-	++
Cardenolides	-	-	-	-	-

Symbols stand for abundant = ++, presence =+, weak =+/- and absence = -

Aqueous Ethanolic Extract is AEE; Oil Ether Fraction is OEF; Dichloromethane Fraction is DCMF; Ethyl Acetate Fraction is EAF; n-Butanol Fraction is BF.

Table 2: MIC values of *Ocimum americanum* fractions alone and in combination against multi-resistants food bacterial strains.

	S. typ	Lm2	S. oro	S. nig	Ye
Gen	500	250	125	500	500
DCMF alone	500	250	250	500	500
EAF alone	250	125	125	250	250
DCMF + Gen	125	63	125	125	250
EAF + Gen	63	31	31	125	125

Gentamicin is Gen, Dichloromethane Fraction is DCMF; Ethyl Acetate Fraction is EAF, *Salmonella typhimurium* SKN 533 is S. typ, *Listeria monocytogenes* Scott A is Lm2, *Salmonella oranienburg* SKN 1157 is S. oro, *Salmonella nigeria* SKN 1160 is S. Nig and *Yersinia enterocolitica* 6A28 SKN 599 is Ye.

Table 3: MBC values of *ocimum americanum* fractions alone and in combination against multi-resistants food bacterial strains.

	S. typ	Lm2	S.oro	S. nig	Ye
DCMF alone	>1000	1000	1000	>1000	>1000
EAF alone	1000	250	500	1000	1000
DCMF + Gen	250	125	250	500	1000
EAF + Gen	125	63	63	250	250

Dichloromethane Fraction is DCMF; Ethyl Acetate Fraction is EAF, Gentamicin is Gen. *Salmonella typhimurium* SKN 533 is S. typ, *Listeria monocytogenes* Scott A is Lm2, *Salmonella oranienburg* SKN 1157 is S. oro, *Salmonella nigeria* SKN 1160 is S. Nig and *Yersinia enterocolitica* 6A28 SKN 599 is Ye.

Table 4: Bacteriocidal/Bacteriostatic capacity of fractions of *O. americanum* alone or in combination with gentamicin

	S. typ	Lm2	S. oro	S. nig	Ye
DCMF alone	-	-	-	-	-
EAF alone	-	+	+	-	-
DCMF + Gen	+	+	+	-	-
EAF + Gen	+	+	+	+	+

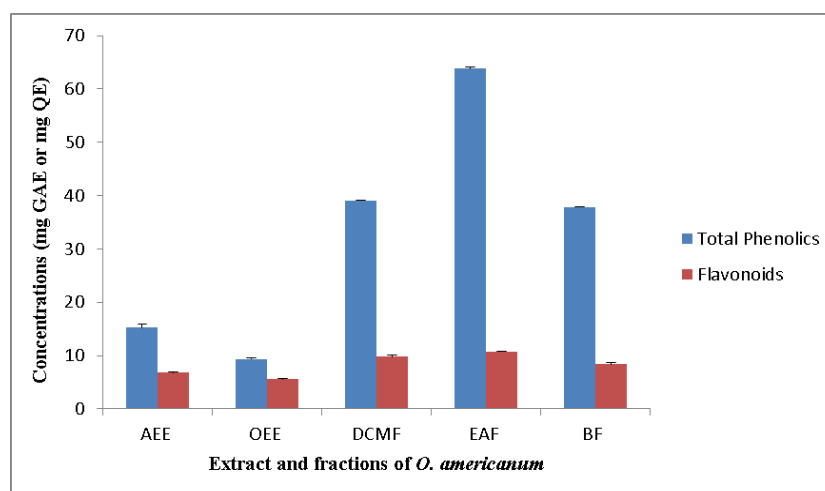
Gentamicin is Gen, Dichloromethane Fraction is DCMF; Ethyl Acetate Fraction is EAF. bacteriocidal effect (MBC/MIC = 1 or 2) = +; bacteriostatic effect (MBC/MIC = 4 or 16) =. *Salmonella typhimurium* SKN 533 is *S. typ*, *Listeria monocytogenes* Scott A is Lm2, *Salmonella oranienburg* SKN 1157 is *S. oro*, *Salmonella nigeria* SKN 1160 is *S. nig* and *Yersinia enterocolitica* 6A28 SKN 599 is *Ye*.

Table 5: Fractional Inhibitory Concentration (FICI) in combination with gentamicin against food bacterial strains multi-resistants.

	S. typ	Lm2	S.oro	S. nig	Ye
FICa	0.250	0.250	0.250	0.50	0.50
FICb	0.125	0.125	0.25	0.25	0.25
FICI	0.375	0.375	0.50	0.75	0.75
Effect	Syner	Syner	Syner	Addi	Addi

FICa = MIC of the combination/MICa alone; FICb = MIC of the combination/MICb alone and FICI = FICa + FICb, a = Flavonoid-rich fractions; b = Gentamicin.

Salmonella typhimurium SKN 533 is *S. typ*, *Listeria monocytogenes* Scott A is Lm2, *Salmonella oranienburg* SKN 1157 is *S. oro*, *Salmonella nigeria* SKN 1160 is *S. nig* and *Yersinia enterocolitica* 6A28 SKN 599 is *Ye*.

**Figure 1: Polyphenol content of extract and fractions from *Ocimum americanum* L.**

Aqueous Ethanolic Extract is AEE; Oil Ether Fraction is OEF; Dichloromethane Fraction is DCMF; Ethyl Acetate Fraction is EAF; n-Butanol Fraction is BF. Vertical bars indicate the average standard error for each experiment.

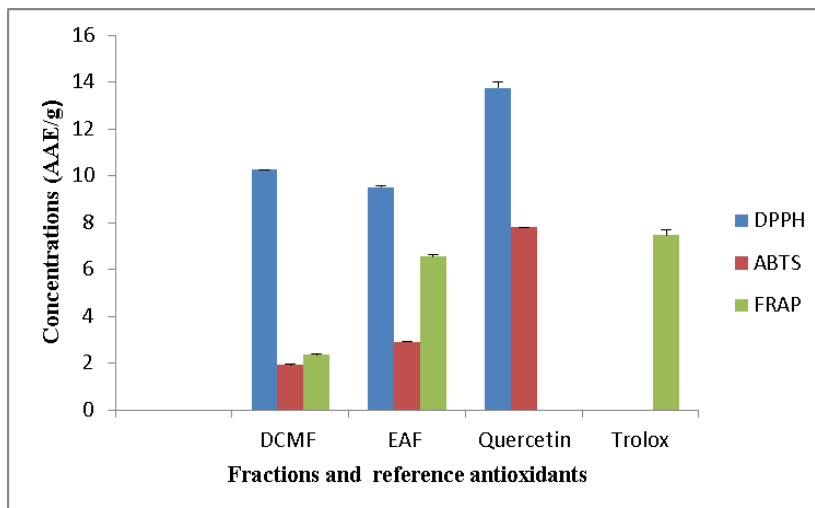


Figure 2: Antioxydant activity of bioactive fractions from *Ocimum americanum* L. and reference compounds.

Dichloromethane Fraction is DCMF; Ethyl Acetate Fraction is EAF; n-Butanol Fraction is BF. Vertical bars indicate the average standard error for each experiment.

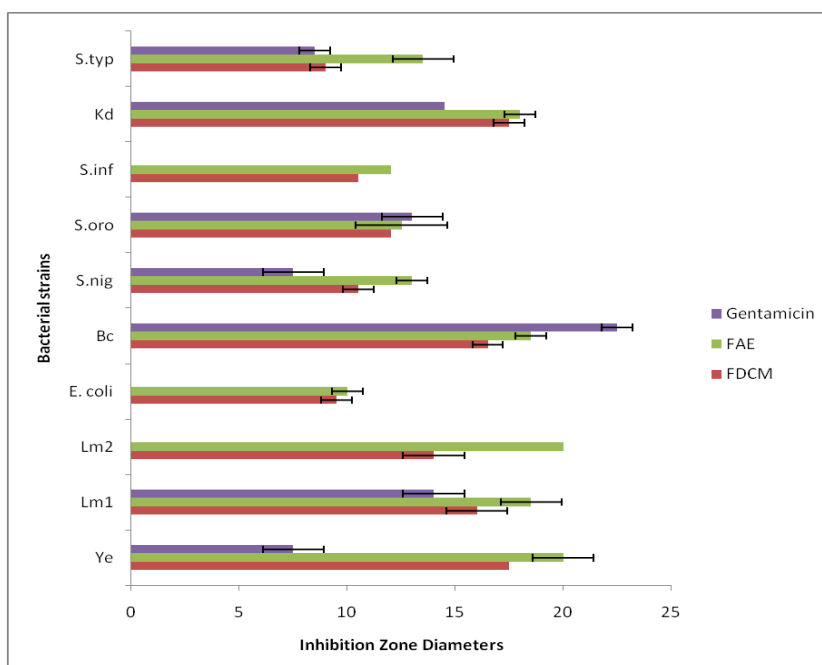


Figure 3: Inhibition zone diameters of fractions (dichloromethane and ethyl acetate fractions) from *Ocimum americanum* L. with conventional antibiotic (gentamicin) against food bacterial strains multi-resistant.

Bacillus cereus MADM 1291 = Bc, *Bacillus cereus* MADM 1561 =Kd, *Listeria monocytogenes* 057=Lm1, *Listeria monocytogenes* Scott A = Lm2, *Salmonella infantis* SKN 557 =S. inf, *Salmonella oranienburg* SKN 1157=S. oro, *Salmonella nigeria* SKN 1160 =S. nig, *Salmonella typhimurium* SKN 533 = S. typ, *Escherichia coli* 81 nr. 148 SKN 541 =E. coli, *Yersinia enterocolitica* 6A28 SKN 599 =Ye. Vertical bars indicate the average standard error for each experiment.

CONCLUSION

The results of present study supports the traditional usage of *Ocimum americanum* L. and suggests that this herbaceous possess compounds with high antibacterial properties that can be used as antibacterial agents in developing new drugs for the therapy of infectious diseases caused by pathogenic bacteria. Moreover, based on the results of this study, flavonoid compounds of the plant should be analyzed further because of their potential as a source of broad spectrum antimicrobial compounds which can be use for treating infectious diseases caused by multi-resistant bacteria. Ultimately, the use of polyphenolic compounds in synergistic combination with antibiotics may become an effective alternative treatment strategy for antibiotic resistant bacteria. Our results illustrate that flavonoid compounds may have multiple mechanisms of antibacterial activity, which can synergize the bactericidal activity of various antibiotics.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors think Dr Moussa Compaoré, Dr Martin Kiendrébéogo and Prof. Nicolas Barro from Biochemistry Department of the University of Ouagadougou for facilitating this study.

REFERENCES

1. Farnsworth NR., Akelere O, Bingel AS, Soejarto DD and Guo Z. Medicinal plants in therapy. WHO Bull, 1985; 63: 965-981.
2. Nair R and Chanda S. Activity of some medicinal plants against certain pathogenic bacterial strains. Indian J Pharmacol, 2006; 38(2): 142-144.
3. Kumarasamy Y, Cox PJ, Jaspars M, Nahar L and Sarker SD. Screening seeds of Scottish plants for antibacterial activity. J Ethnopharmacol, 2002; 83: 73-77.
4. Paton A, Harley RM and Harley MM. *Ocimum* an overview of relationships and classification. In: Holm, Y. and Hiltunen, R., Eds., Medicinal and Aromatic Plants- Industrial Profiles, Harwood Academic, Amsterdam 1999; 1-38.

5. Weaver DK, Dunkel FV, Ntezurubanza L, Jackson LL and Stock DT. The efficiency of linalool, a major component of freshlymilled *Ocimum canum* Sims (Lamiaceae), for protection against postharvest damage by certain stored product Coleoptera. *Journal of Stored Products Research*, 1991; 27: 213–220.
6. Nacoulma OG. Medicinal plants and their traditional uses in Burkina Faso. Doctoratd'Etat (Ph.D.Thesis), University of Ouagadougou, 1996; 328.
7. Roberto FV, Renée JG and Alan JP. Chemical profiling of *Ocimum americanum* using external flavonoids. *Phytochemistry*, 2003; 63: 555–567.
8. Farrukl A, Ahmad I and Mehmood Z. Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used Indian medicinal plant. *Turk J Biol*, 2006; 30: 177-183.
9. Al-Fatimi M, Wurster M, Schroder G and Lindequist U. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *J Ethnopharmacol*, 2007; 111: 657-666.
10. Victor M Navarro-Garcia, Patricia Alvarez-Fitz, Tannia A Rodriguez-Flores and David O Salinas-Sanchez. Antibacterial Activity of Some Compounds Isolated from *Aristolochiabrevipes* and One derivative of 9-methoxytariacuripyron, Against Multiresistant Methicillin- Susceptible *Staphylococcus aureus* (MR-MSSA). *International Journal of Pharmacology*, 2015; 11(1): 62-66.
11. Kumar GS, Jayaveera KN, Kumar CKA, Sanjay UP and Swamy BMV. Antimicrobial effects of Indian medicinal plants against acne-inducing bacteria. *Tropical J. Pharmaceutical Res*, 2007; 6: 717-723.
12. Andarwulan N, Batari R, AgustiniSandrasari D, Bolling B and Wijaya H. Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food Chemistry*, 2010; 121: 1231-1235.
13. Koteswar Sarma DS and Suresh Babu AV. Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Ocimum Americanum*. *PHARMANEST. An International Journal of Advances In Pharmaceutical Sciences*, 2011; 2: 211-218.
14. Kaboré D, Sawadogo-Lingani H, Dicko MH, DiawaraB and Jakobsen M. Acid resistance, bile tolerance and antimicrobial properties of dominant lactic acid bacteria isolated from traditional “maari” baobab seeds fermented condiment. *African Journal of Biotechnology*, 2012; 11(5): 1197-1206.
15. Ciulei I. Pratical manuals on the industrial utilization of chemical and aromatic plants. *Methodology for analysis of vegetable drugs* Ed. ministry of chemicalindustry, Bucharest, 1982; 67.

16. Lamien-Meda A, Lamien CE, Compaoré MMY, Meda RTN, Kiendrebeogo M, Zeba B, Millogo JF and Nacoulma OG. Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. *Molecules*, 2008; 13: 581-594.
17. Hinnebourg I, Damien Dorman HJ and Hiltunen R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*, 2006; 97: 122-129.
18. Konaté K, Hilou A, Mavougou JF, Lepengué AL, Souza A, Barro N, Datté JY, M'Batchi B and Nacoulma OG. Antimicrobial activity of polyphenol-rich fractions from *Sidaalba L.* (Malvaceae) Against cotrimoxazol-resistant bacteria strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2012; 11: 5. doi:10.1186/1476-0711-11-5.
19. NCCLS-National (2001). Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standard for anti-microbial susceptibility testing: eleventh informational supplement. Document M100-S11. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Wayne, PA, USA.
20. Konaté K, Mavougou JF, Lepengué AN, Aworet-Samseny RRR, Hilou A, Souza A, Dicko MH and M'Batchi B. Antibacterial activity against β - lactamase producing methicillin and ampicillin-resistants *Staphylococcus aureus*: fractional Inhibitory concentration index (FICI) determination. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2012; 11: 18 doi:10.1186/1476-0711-11-18.
21. Rosato A, De Laurentis NVN, Armenise D and Millilo MA. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine*, 2007; 14: 727-732.
22. Salwaan C, Gupta V and Sharma K. Antioxidant activity and total phenolic compounds *Ocimum sanctum*. *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*, 2012; 2: 340-347.
23. Uyoh EA., Chukwurah P. A, David IA and Bassey AA. Evaluation of antioxidant capacity of two *Ocimum* species consumed locally as spices in Nigeria as a justification for increased domestication. *American Journal of Plant Sciences*, 2013; 4: 221-229.
24. Crépin I Dibala, Kiessoun Konaté, Mamounata Diao, Maurice Ouédraogo and Mamoudou H Dicko, Phytoconstituents analysis, antioxidant capacity and antimicrobial properties of extracts from *Laggera aurita L.* (asteraceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2014; 6(7): 0975-1491.
25. Nuri Andarwulan, Ratna Batari, Diny Agustini Sandrasari, Bradley Balling and Hanny Wijaya. Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food Chemistry*, 2010; 121: 1231-1235.

26. Climo MW, Patron RL and Archer GL. Combinations of vancomycin and beta-lactams are synergistic against staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999; 43: 1747–1753.
27. Cudic M, Lockett CV, Johnson DE and Otvos LJr. In vitro and in vivo activity of an antibacterial peptide analog against uropathogens. *Peptides*, 2003; 24: 807–820.
28. Bukola Tola Aluko and Omotade Ibidun Oloyede. In vitro antibacterial activity of extracts from leaves of *Ocimum americanum* L. against some pathogenic microorganisms. *World Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences* 2016; 5(3): 01-07.
29. Aluko BT and Oloyed OI. Antioxidative potential of aqueous extract of *Ocimum americanum* L. leaves: an in vitro and in vivo evaluation. *Int. J. Biol. Food Vet. Agric. Eng.*, 2015; 2: 131-136.
30. Wolfe EF, Klepser ME and Pfaller MA. Antifungal dynamics of amphotericin B and fluconazole in combination against *Candida albicans*, effect of exposure time. *Pharmacotherapy*, 1997; 17: 189–189.
31. Tsa R and Deng Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004; 812: 85-99.
32. Miliuskas G, Venskutonis PR and van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem*, 2004; 85: 231-237.
33. Shan B, Cai YZ, Brooks JD and Corke H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int J Food Microbiol*, 2007; 117: 112-119.
34. Karou D, Dicko MH, Simpore J and Traoré AS. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *Afr J Biotechnol*, 2005; 4(8): 823-828.
35. Igbinsosa OO, Igbinsosa EO and Aiyegoro OA. Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from *Jatropha curcas* (Linn). *Afr J Pharm Pharmacol*, 2009; 3: 58-62.
36. Gibbons S. An overview of plant extracts as potential therapeutics. *Expert Opin. Therapeutic Patent*, 2003; 13: 489-497.
37. Kahkonen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS and Heinonen M. Antioxidant activity of plant extract containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem*, 1999; 447: 3954-3962.
38. Diplock AT. Will the good fairies please prove to us that vitamin E lessens human degenerative disease. *Free Radic Res*, 1997; 27: 511-532.

39. Rice-Evans CA, Miller N and Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*, 1997; 2: 152-159.
40. Butkhup L and Samappito S. In vitro free radical scavenging and antimicrobial activity of some selected thai medicinal plants. *Res J Med Plant*, 2011; 5: 254-265.
41. Zakaria M. Isolation and characterization of active compounds from medicinal plants. *Asia Pac J Pharmacol*, 1991; 6: 158-220.
42. Nikaido H. Outer Membrane. In: Neidhardt, F.C. (Ed.), *Echerichia coli and Salmonelleythymirum: Cellular and Molecular Biology*. American Sociatety for Microbiology Press Washington, D.C., 1996; 29-47.
43. Zaika II. Spices and herbs-their antimicrobial activity and its determination. *J Food Safety*, 1988; 9: 97-118.
44. Lopez P, Sanchez C, Batlle Nerin C. Solidand vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils. Susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *J Agr Food Chem*, 2005; 53: 6939-6946.

ARTICLE III

Dibala I. C., Konaté K., Diao M., Ouédraogo M. and Dicko H.M. (2016). Evaluation of the correlation between chemical, Free radical scavenging capacity and Antibacterial properties of extracts from *Laggera aurita* L. (Asteraceae).

**Evaluation of correlation between chemical, free radical scavenging capacity and
Antibacterial properties of extracts from *Laggera aurita* L. (Asteraceae).**

Crépin I. Dibala^{1*}, Mamounata Diao¹, Maurice Ouédraogo², Kiessoun Konaté³ and Mamoudou H. Dicko¹

¹Laboratory of Food Biochemistry, Enzymology, Industrial Biotechnology and Bioinformatics,
University Ouaga I -r Joseph Ki-Zerbo Ouagadougou, 03 P.O.Box: 848, Ouagadougou 03,
Burkina Faso

²Laboratory of Biochemistry and Applied Chemistry, University of Ouagadougou, 09 P.O.Box:
848, Ouagadougou 09, Burkina Faso

³Laboratory of Animal Physiology, University of Ouagadougou, 09 P.O.Box: 848 Ouagadougou
09, Burkina Faso.

*** Corresponding author**

Ms I. Crépin Dibala, Ph.D student, University of Ouagadougou, Laboratory of Food Biochemistry, Enzymology, Biotechnology and Bioinformatic, 03 P.O.Box: 848, Ouagadougou 03, Burkina Faso.

Phone: 0022670141596/78814236

E-mail: dibalacrepin@yahoo.fr

Abstract:

Objective: This research was designed to evaluate the polyphenolic content, antibacterial potency and antioxidant activity of extract and fractions from *Laggera aurita* L. (Asteraceae), a medicinal herbaceous from Burkina Faso. **Methods:** Total phenolic content was estimated by Folin Ciocalteu and AlCl_3 methods. The antibacterial potency was investigated by agar disc diffusion, micro-well dilution (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) assay against ten bacteria. The antioxidant activities of the samples were evaluated by various in vitro assays like ferrous reducing antioxidant assay (FRAP), Total reducing power, 2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging and ABTS radical cation decolorization assays. **Results:** Estimation of Total phenolic and flavonoids contents revealed that EAF and DCMF have the highest phenolic and flavonoid contents $62.12 \pm 0.68 \text{ mgGAE}$ and $10.56 \pm 0.29 \text{ mgQE}$ respectively. These results indicated that most of the extracts were able to inhibit Gram-positive bacteria as compared to Gram-negative bacteria. Among the samples tested for antioxidant activities, EAE and DCMF have the highest activities compared to other fractions. These results showed that there were correlations ($R^2 = 0.527-0.984$) between phenolic content, antioxidant activity and antibacterial capacity. **Conclusion:** These findings suggested that *Laggera aurita* L. is an important source for antibacterial component, and also a potential source of phenolic antioxidants. These results may be useful in explaining the medicinal applications of *Laggera aurita* L.

Key words: polyphenol content, Antioxidant and antibacterial activities, *Laggera aurita* L. extract and fractions.

Acknowledgements

The authors thank Dr Moussa Compaoré, Dr. Martin Kiendrébéogo and Prof. Nicolas Barro from Biochemistry Department of the University of Ouagadougou for their different contributions in this research.

1. Introduction

The use of plants in the management and treatment of diseases started with life. It has been observed that many plants do indeed have medicinal value and extracts from these plants have been used to make modern drugs^[1]. According to WHO, more than 80% of the world's population relies on plant based herbal medicines for their primary health care needs^[2]. Also, Plants contain phytochemicals with various bioactivities, including, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities. Currently, about 25% of the active component was identified from plants that are used as prescribed medicines^[3].

In effect, indigenous plants are reservoirs of various metabolites and provide unlimited source of important chemicals that have diverse biological properties. There is an increase in drug resistant strains of human pathogenic bacteria all over the world. One way to prevent antibiotic resistance of pathogen species is to use new compounds that are not based on existing synthetic antimicrobial agents^[4]. Systematic screening of plants may result in the discovery of novel effective compounds which would tackle the problem of drug resistance.

The overproduction of reactive oxygen species like hydroxyl radical, superoxide anion radical, hydrogen peroxide radical can contribute to oxidative stress^[5]. Oxidative damage of proteins, DNA and lipid is associated with chronic degenerative diseases including diabetes, hypertension, coronary heart disease, cancer etc^[6]. Most of the reactive oxygen species are scavenged by endogenous defense systems. But these systems may not be completely efficient requiring them to depend on exogenous antioxidants from natural sources. Presently, there has been an amplified interest worldwide to identify antioxidant compounds which are pharmacologically effective or have low or no side effects for use in preventive medicine and the food industry^[7]. Generally antioxidants have been identified as major health beneficial

compounds reported from varieties of medicinal plants and are sources for alternative medicine^[8].

Laggera aurita L. belongs to the family of Asteraceae is an annual herbaceous which found growing as weeds in Burkina Faso and spread throughout the sub-Saharan Africa^[9]. In Burkina Faso, ethnobotanical investigations in the central region of Burkina Faso have shown that this Asteraceae is used frequently and widely in traditional medicine to treat various kinds of diseases such as malaria, fever, pain, stomatitis, asthmatic, bronchitis and nasal congestion and has also antibacterial activity^[10]. Although this specie has been reported to be of significant ethnomedicinal use in Asia country like China, there is little or no ethno-use reported in Africa, except in Cameroon where it has been reported for use in cereal grains preservation and in Nigeria as remedy for pediatric malaria^[11, 12]. The Asian researchers have also done a lot of work and have reported various bioactive properties of these plants. Anti-inflammatory, antiviral, antibacterial and hepatoprotective properties^[13, 14, 15]. Phytochemical analysis showed the presence of a number of sesquiterpenoids, monoterpenoids and some flavonoids with some bioactivity have been isolated^[16, 17]. However, no report has been made on the possible correlation study between polyphenol compounds, free radical scavenging capacity and antibacterial of extracts from *Laggera aurita* L. (Asteraceae). Considering the above, this work was aimed at studying the possible correlation study between polyphenol compounds, free radical scavenging capacity and antibacterial of extracts from *Laggera aurita* L. (Asteraceae).

2. Materials and methods

2.1. Materials

2.1.1. Chemicals and reagents:

The Folin-ciocalteu reagent, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, sodium carbonate, aluminium trichloride, gallic acid and quercetin were purchased from Sigma-aldrich chemie, Steinheim, Germany. 2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH), trichloroacetic acid, and solvents used were from Fluka Chemie, Switzerland. Potassium hexacyanoferrate [K₃Fe(CN)₆] was from Prolabo and ascorbic acid was from Labosi, Paris, France. All chemicals used were of analytical grade. Authentic standards, such as Penicillin (25 µg) were purchased from Alkom Laboratories LTD. INT (p-iodonitrotetrazolium chloride) was purchased from sigma-Aldrich chemie (Steinheim, Germany).

2.1.2. Plant materials:

Laggera aurita L. (Asteraceae) was collected in September 2011 in Gampela, 25 Km east of Ouagadougou, capital of Burkina Faso. The plant was identified in the Laboratory of Biology and Ecology, University of Ouagadougou, where a voucher specimen was deposited.

2.1.3. Bacterial strains and antibiotics

Ten reference strains bacteria (Gram-positive and Gram-negative) were tested: Kd = *Bacillus cereus*, Bc= *Bacillus cereus* MADM 1291, Lm1= *Listeria monocytogenes* 057, Lm 2 = *Listeria monocytogenes* Scott A, S. inf= *Salmonelle infantis* SKN 557, S.oro = *Salmonella oranienburg* SKN 1157, S.nig= *Salmonella Nigeria* SKN 1160, S.typ= *Salmonella typhimurium* SKN 533, Ec= *Escherichia coli* 81 nr. 148 SKN 541, Ye= *Yersinia enterocolitica* 6A28 SKN 599.

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of extracts:

The collected plants materials were dried at room temperature and crushed into a fine powder. Fifty grams (50g) of powdered plant material were extracted with 80% aqueous ethanol (500 ml) in ratio 1/10 (w/v) for 24 h under mechanic agitation (SM 25 shaker, Edmund BÜHLER, Germany) at room temperature. After filtration, ethanol was removed under reduced pressure in a rotary evaporator (BÜCHI, Rotavapor R-200, Switzeland) at approximately 40°C and freeze-dried by Telstar Cryodos 50 freeze-dryer. These ones were filtered and freeze-dried. The extract residues were weighed before packed in waterproof plastic flasks and stored at 4°C until use. The yields of different crude extract were calculated and expressed as grams of extract residues/100 g of dried plant materials.

2.2.2. Fractionation

Fifty grams (50g) of powdered plant material were extracted with 80% aqueous ethanol (500 ml) in 1/10 ratio (w/v) for 24 h under mechanic agitation (SM 25 shaker, Edmund BÜHLER, Germany) at room temperature. After filtration, ethanol was removed under reduced pressure in a rotary evaporator (BÜCHI, Rotavapor R-200, Switzeland) at approximately 40°C. The aqueous extracts were subjected to sequential liquid-liquid extraction with oil ether, dichloromethane, ethyl acetate and n-butanol. Each fraction was then collected and concentrated to dryness under reduced pressure to obtain oil ether fraction (OEF), dichloromethane fraction (DCMF), ethyl acetate fraction (EAF) and n-butanol fraction (n-BF). The different fractions were freeze-dried by Telstar Cryodos 50 freeze-dryer. The fraction residues were packed in waterproof plastic flasks and stored at 4°C until use.

2.2.3. Polyphenols determination

2.2.3.1. Total phenolic content:

Total polyphenols were determined by Folin-Ciocalteu method as described by^[18]. Aliquots (125 μ l) of solution from extract or each fraction in methanol (10 mg/ml) were mixed with 625 μ l Folin-Ciocalteu reagent (0.2 N). After 5 min, 500 μ l of aqueous Na_2CO_3 (75 g/l) were added and the mixture was vortexed. After 2 h of incubation in the dark at room temperature, the absorbencies were measured at 760 nm against a blank (0.5 ml Folin-Ciocalteu reagent + 1 ml Na_2CO_3) on a UV/visible light spectrophotometer (CECIL CE 2041, CECIL Instruments, England). The experiments were carried out in triplicate. A standard calibration curve was plotted using gallic acid ($Y = 0.0289x - 0.0036$; $R^2 = 0.9998$). The results were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE)/100 mg of extract or fractions.

2.2.3.2. Total flavonoid content:

The total flavonoids were estimated according to the Dowd method as adapted by^[18]. 0.5 ml of methanolic AlCl_3 (2%, w/v) were mixed with 0.5 ml of extract or each fraction solution (0.1 mg/ml). After 10 min, the absorbencies were measured at 415 nm against a blank (mixture of 0.5 ml extract solutions and 0.5 ml methanol) on a UV/visible light spectrophotometer (CECIL CE 2041, CECIL Instruments, England) and compared to a quercetin calibration curve ($Y = 0.0289x - 0.0036$; $R^2 = 0.9998$). The data obtained were the means of three determinations. The amounts of flavonoids in plant extracts were expressed as mg of quercetin equivalents (QE)/100 mg of extract or fractions.

2.2.3.3. *In vitro* antioxidant activity determination

2.2.3.3.1. DPPH radical method:

Radical scavenging activity of extract or each fraction against stable DPPH(2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Fluka) was determined with a UV/visible light spectrophotometer (CECIL CE 2041, CECIL Instruments, England) at 517 nm as described by^[18]. Extract solutions were prepared by dissolving 10 mg of dry extract in 10 ml of methanol. The samples were homogenized in an ultrasonic bath. 0.5 ml of aliquots which were prepared at different concentrations from each sample of extract was mixed with 1 ml of methanolic DPPH solution (20 mg/ml). After 15 min in the dark at room temperature, the decrease in absorption was measured. All experiments were performed in triplicate and expressed in mmol Ascorbic Acid Equivalent per g of extract or fraction ($Y = -16.815x + 6.8373$; $R^2 = 0.9976$). Quercetin was used as positive control.

2.2.3.3.2. ABTS radical cation decolorization assay:

For ABTS radical cation decolorization assay, the procedure followed the method of^[18]. ABTS was dissolved in water to a 7mM concentration. ABTS radical cation ($ABTS^{+\cdot}$) was produced by reacting ABTS stock solution with 2.45mM potassium persulfate (final concentration) and allowing the mixture to stand in the dark at room temperature for 12 h before use. This mixture was diluted with ethanol to give an absorbency of 0.7 ± 0.02 units at 734 nm using a UV/visible light spectrophotometer (CECIL CE 2041, CECIL Instruments, England). For our study, we used 10 μ L of the diluted sample (1 mg mL^{-1} in methanol) which was allowed to react with 990 μ L of fresh $ABTS^{+\cdot}$ solution and the absorbance was taken 6 min exactly after initial mixing. Ascorbic acid was used as standard ($Y = -0.0342x + 0.634$; $R^2 = 0.9996$) and the capacity of free radical scavenging was expressed as mmol Ascorbic Acid Equivalent per g of extract or fraction. Quercetin, a reference compound was used as positive control.

2.2.3.3.3. Iron (III) to iron (II) reduction activity (FRAP):

The FRAP assay was performed according to^[19]. 0.5 mL of extract or each fraction (1 mgmL⁻¹) was mixed with 1.25 mL of phosphate buffer (0.2M, pH 6.6) and 1.25 mL of aqueous potassium hexacyanoferrate [K₃Fe(CN)₆] solution (1%). After 30 min incubation at 50°C, 1.25 mL of trichloroacetic acid (10%) was added and the mixture was centrifuged at 2000 × g for 10 min. Then, the upper layer solution (0.625 mL) was mixed with distilled water (0.625mL) and a freshly prepared FeCl₃ solution (0.125mL, 0.1%). Absorbencies were read at 700 nm on a UV/visible light spectrophotometer (CECIL CE 2041, CECIL Instruments, England) and Ascorbic acid was used to produce the calibration curve (Y= 0.008x-0.0081; R² = 0.9999). The iron (III) reducing activity determination was performed in triplicate and expressed in mmol Ascorbic Acid Equivalent per g of extract or fractions. Troloc, a reference compound was used as positive control.

2.2.4. *In vitro* antibacterial activity

2.2.4.1. Preparation of inocula

The susceptibility tests were performed by Mueller Hinton agar-well diffusion method^[20].

The bacterial strains grown on nutrient agar at 37 °C for 18 h were suspended in a saline solution (0.9 %, w/v) NaCl and adjusted to a turbidity of 0.5 Mac Farland standard (10⁸ CFU/ml). To obtain the inocula, these suspensions were diluted 100 times in Muller Hinton broth to give 10⁶ colony forming units (CFU)/ml.

2.2.4.2. Preparation of discs

The stock solutions of extract or each fraction were dissolved in 10 % dimethylsulfoxide (DMSO) in water at a final concentration of 10 mg/ml. The stock solutions of extracts were sterilized by filtration through 0.22 µm sterilizing Millipore express filter. The sterile discs (6 mm) were impregnated with 10 µL of the sterile solution of extract or each fraction. Negative controls were prepared using discs impregnated with 10 % DMSO in water and commercially

available antibiotic diffusion discs (Penicillin 25 µg from Alkom Laboratories LTD) were used as positive reference standards for all bacterial strains^[20].

2.2.4.3. Disc-diffusion assay

Petri plates (9 cm) were prepared with 20 ml of a base layer of molten Mueller Hinton agar (DIFCO, Becton Dickinson, USA). Each Petri plate was inoculated with 15 µl of each bacterial suspension (10^6 CFU/ml). After drying in a sterile hood, 6 mm diameter discs soaked with 10 µl of the different extract solution dilutions were placed on the agar. Discs containing Penicillin (25 µg) were used as positive controls and 10 % DMSO was used as a negative control. The plates were incubated for 24 h at 37 °C. The diameters of the inhibition zones were evaluated in millimeters. The extract inducing inhibition zone ≥ 3 mm around disc were considered as antibacterial. All tests were performed in triplicate and the bacterial activity was expressed as the mean of inhibition diameters (mm) produced^[20].

2.2.4.4. Minimum inhibitory concentration (MIC)

Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution method in culture broth as recommended by^[20, 21]. Eight serial two-fold dilutions of extracts or conventional antibiotic (Penicillin) were prepared as described before, to obtain final concentration range of 10 mg/ml to 0.156 µg/ml. The last wells (n°8) served as sterility controls (contained broth only) or negative control (broth + inoculums). The 96-well micro-plates (NUNC, Danemark) containing 100 µL of Mueller Hinton (MH) broth were used. For each bacteria strain, three columns of eight wells to the micro-plate were used. Each well has getting: the culture medium + extracts or Gentamycin or Penicillin + inoculum (10 µl of inocula) and INT (50 µl; 0.2 mg/ml for 30 min). The plates were covered and incubated at 37°C for 24 h. All tests were performed in triplicate and the bacterial activity was expressed as the mean of inhibitions produced. Viable microorganisms reduced the yellow dye to a pink colour. The MIC was defined as the lowest concentration of substance of extracts at which no colony was observed after incubation. So, the

MIC was defined as the lowest concentration where no change was observed, indicating no growth of microorganism.

2.2.4.5. Minimal bactericidal concentration (MBC)

Minimum bactericidal concentration (MBC) was recorded as a lowest extract concentration killing 99.9% of the bacterial inocula after 24 h incubation at 37°C. Each experiment was repeated at least three times. MBC values were determined by removing 100 µl of bacterial suspension from subculture demonstrating no visible growth and inoculating nutrient agar plates. Plates were incubated at 37°C for a total period of 24 h. The MBC is determined with the wells whose the concentrations are \geq MIC^[20, 22]. The MBC were determined in Mueller Hinton (MH) agar (DIFCO, Becton Dickinson, USA) medium.

2.2.4.6. Evaluation of bactericidal and bacteriostatic capacity

The action of an antibacterial on the bacterial strains can be characterized with two parameters such as Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum bactericidal concentration (MBC). According to the ratio MBC/MIC, we appreciated antibacterial activity. If the ratio MBC/MIC = 1 or 2, the effect was considered as bactericidal but if the ratio MBC/MIC = 4 or 16, the effect was defined as bacteriostatic^[20].

2.2.5. Statistical analysis:

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

3. Results

3.1. Polyphenol content:

The total phenolics content per 100 mg of *laggera aurita*L. extract and fractions ranged from 62.12 ± 0.68 mgGAE to 9.07 ± 0.17 mgGAE. The highest content of total phenolics was detected in EAF with 62.12 ± 0.68 mgGAE following by DCMF with 23.67 ± 0.05 mgGAE. The lowest total phenolics were obtained in OEF with respectively 9.07 ± 0.17 mgGAE.

The total flavonoids content per 100 mg of *Laggera aurita*L. extract and fractions ranged from 10.56 ± 0.29 mgQE to 1.28 ± 0.20 mgQE. The highest content of total flavonoids in *Laggera aurita* was detected in DCMF with 10.56 ± 0.29 mgQE following by EAF with 10.12 ± 0.06 mgQE. The lowest total flavonoids were obtained in OEF with respectively 1.28 ± 0.14 mgQE. The results are recorded in the (Figure 1)

3.2. Antioxidant activity:

The measures of antioxidant activity were obtained using three described methods. Results are consigned in the (Figure 2). The reduction capacity of DPPH radicals was determined by the decrease of the absorbance induced by antioxidant at 517 nm, which is induced by antioxidant. The values of different concentrations varied respectively from (9.472 ± 0.1941 mmol AAE/g extract to 4.907 ± 0.0587 mmol AAE/g extract). From these result, the strongest DPPH activity was obtained by EAF with 9.472 ± 0.1941 mmol AAE/g extract followed by DCMF with 9.347 ± 0.0602 mmol AAE/g extract. The lowest activity was obtained by OEF with 4.907 ± 0.0587 mmol AAE/g extract. Control compound gave 13.76 ± 0.26 mmol AAE/g extract for Quercetin.

For ABTS assay, the following were values obtained respectively 0.78 ± 0.083 mmol AAE/g extract for EHA, 0.58 ± 0.04 mmol AAE/g extract for OEF, 2.03 ± 0.308 mmol AAE/g extract for DCMF, 2.9 ± 0.003 mgAGE/100mg extracts for EAF and 1.85 ± 1.43 GAE/100 mg extract for BF. From these result, the strongest ABTS activity was obtained by EAF with 2.9 ± 0.003 mmol AAE/g extract followed by DCMF with 2.03 ± 0.308 mmol AAE/g extract.

The lowest activity was obtained by OEF with 0.58 ± 0.04 mg GAE/100 mg extract. The reference compound is Quercetin 7.81 ± 0.21 mmol AAE/g extract.

For FRAP radical cation decolorization assay, the different values were respectively, 1.22 ± 0.057 mmol AAE/g extract for EHA, 1.73 ± 0.026 mmol AAE/g extract for OEF, 5.99 ± 0.029 mgGAE/100mg extracts for DCM, 3.72 ± 0.182 mgGAE/100mg extracts for EAF, 3.39 ± 0.108 mg GAE/100 mg extract for BF. From these result, the strongest FRAP activity was obtained by DCMF with 5.99 ± 0.029 mmol AAE/g extract followed by EAF with 3.72 ± 0.182 mgGAE/100mg extracts. The lowest activity was obtained by OEF with 0.67 ± 0.06 mg GAE/100 mg extract. Control compound gave 7.46 ± 3.38 mmol AAE/g extract for Trolox.

3.3. Antibacterial capacity

In this present study, ten bacteria strain (Gram-negative and Gram-positive bacteria) were used. The antibacterial assays were performed by the agar-well diffusion and the broth micro dilution methods; so that they could be qualified and quantified by inhibition zone diameters, MIC and MBC. One noticed that the susceptibility of the bacteria to the extracts on the basis of inhibition zone diameters varied according to the microorganism, the results are reported in Figure 3. There is a significant variation in the diameters of inhibition zone values (DIZ) of extracts (Figure 3).

As for the micro-well dilution assay (MIC) and Minimum bactericidal concentration (MBC) of extracts, result varied according to the microorganism (Table 1 and Table 2). The MIC values were ranged from 10 mg/ml to $0.625 \mu\text{g/ml}$ and for the MBC values were ranged from >10 mg/ml to $2.5 \mu\text{g/ml}$. The bactericidal and bacteriostatic effect of extracts was determined using the ratio MBC/MIC (Table 3).

3.4. Correlation between polyphenol compounds, antioxidant and antibacterial activities:

The relationships between polyphenol compounds and antibacterial activity of the different extracts were computed (Fig. 4a, 4b and 4c). The R^2 values were ranged between 0.596 to 0.984.

The correlations between polyphenol compounds and antioxidant capacity are shown (Fig. 5a, 5b and 5c). The R^2 values were ranged between 0.726 to 0.567.

4. Discussion

Medicinal plants are an important source of antioxidants^[23] (Rice-Evans, 2004) and natural antioxidants increase the antioxidant capacity of the plasma and reduce the risk of certain diseases such as cancer, heart diseases and stroke^[24]. The secondary metabolites like phenolics and flavonoids from plants have been reported to be potent free radical scavengers. They are found in all parts of plants such as leaves, fruits, seeds, roots and bark^[25]. There are many synthetic antioxidants in use. It is reported, however, they have several side effects, such as risk of liver damage and carcinogenesis^[26]. There is a need for more effective, less toxic and cost effective antioxidants. Medicinal plants appear to have these desired comparative advantages, hence the growing interest in natural antioxidants from plants.

The phytochemical screening revealed in this research the presence of polyphenol content, steroids and triterpenes. The presence of the metabolites in our extracts has already been reported by^[10]. The results showed that EAF following DCMF presented the highest amount of polyphenol content than the other fractions. The abundance of these fractions in polyphenols may explain the traditional use of this Asteraceae in the treatment of bacterial infections. Because polyphenols are important for antibacterial activity^[27]. The abundance of two fraction extracts in polyphenol content should also explain antioxidant activity results. In effect, it is well known that, total phenolics constitute one of the major groups of compounds antioxidants^[28]. Also, Phenols are very important plant constituents because of their scavenging

ability due to their hydroxyl groups. The phenolic compounds may contribute directly to antioxidative action^[29]. It is known that polyphenolic compounds have inhibitory effects on mutagenesis and carcinogenesis in humans when ingested up to 1 g daily from a diet rich in fruits and vegetables^[30]. Phenolic compounds from plants are known to be good natural antioxidants. The interests of phenolics are increasing in the food industry because they retard oxidative degradation of lipids and thereby improve the quality and nutritional value of food^[31].

About the antioxidants properties, three methods were used for a best appreciation of our results; because a recent study demonstrates that there are differences between the test systems for the determination of the antioxidants properties^[32, 33]. As a matter of fact, it is interesting to evaluate at last two or more methods. Analysis of our results shows a relationship between polyphenol content and antioxidants properties as^[34,35,36] showed linear. These findings are in accordance with the earlier reports on total phenolic and antioxidant activity in roseship extracts^[37].

Moreover, plants have been model source of medicines as they are a reservoir of chemical agents with therapeutic properties. They provide a good source of anti-infective agents, for example emetine, quinine and berberine which still remain to be highly effective instruments in the fight against microbial infections. Various publications have documented the antimicrobial activity of plant extracts^[38,39,40]. The results obtained in this study indicate a considerable difference in antibacterial activity with extracts. The bacteriostatic and bactericidal activity could be ascribed to the presence of polyphenol compounds. In effect, some previous studies showed that polyphenolic compounds cause inhibition of a widerange of microorganisms. Phenol is well known as achemical antiseptic^[41]. In addition, Phenolic and terpenicantimicrobial activities are well documented^[42]. Polyphenols, such as tannins and flavonoids, are importantantibacterial activity^[43]. The antimicrobial activityof flavonoids is due to their ability to complex withextracellular and soluble protein and to complex withbacterial cell wall while that

of tannins may be related to their ability to inactivate microbial adhesions, enzymes and cell envelope proteins^[44].

The results indicated that most of the extracts were able to inhibit Gram-positive bacteria as compared to Gram-negative bacteria. This is further confirmed by the previous studies by^[45,46] that describe the high sensibility of Gram-positive bacteria towards plant extracts and their component. Certain authors^[47] reported that Gram-negative bacteria are more resistant to the plant-based organic extracts because the hydrophilic cell wall structure of Gram-negative is constituted essentially of a lipopolysaccharide (LPS) that blocks the penetration of hydrophobic oil and avoids the accumulation of organic extracts in target cell membrane^[48]. This is the reason why Gram positive bacteria were found to be more sensitive to various extracts.

One notice that extracts are more sensible on certain bacteria strains those standard drugs (Gentamycin and penicillin). According a study^[49], a probable degree of lipophilicity might be responsible for the extracts being higher in activity than standard drugs used lipophilicity toxicity is due to the interactions with the membrane constituents and their arrangement. Considering the above, Gram-positive bacteria should be more susceptible since they have only an outer peptidoclycan layer which is not an effective permeability barrier as reported by^[50]. But in this study, we found contradicting results. *Bacillus cereus* some Gram-positive has developed resistance to the β -lactam antibiotics due to the production of chromosomal or plasmid mediated β -lactamases or by producing penicillin binding proteins (PBPs). All the *Staphylococcus aureus* strains have from PBPs (PBP1 to PBP4), but MRSA express a special PBP (PBP2 or PBP2a) from the *mec A* gene PBP2a takes over the biosynthetic function of normal PBPs in the presence of inhibitory concentration of β -lactams because PBP2 has a decreased binding affinity to β -lactams^[51]. This has resulted in the development of multidrug resistance against β -lactam and other antibiotics. In addition, the polysaccharide capsular material in some of the pathogenic microorganism is responsible for virulence and antimicrobial resistance^[52].

Conclusion

This study on this Asteraceae confirms that *Laggera aurita* L. is a good candidate for antibacterial and antioxidant uses. Thus, which many explain the traditional basis of using this herbaceous in the treatment of various bacterial infections in Burkina Faso. Further pharmacological investigations are required to identify the active constituents of the plant extracts responsible for the antioxidant and antibacterial effects.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest

References

- [1] Treben, M. Health Through God's Pharmacy. 2nd Edn., Ennsthaler Publisher, Australia 1998; pp: 260-264.
- [2] Shanmugasundaram, S. Complementary and alternative therapies in palliative care. A transition from modern medicine to traditional medicine in India. J. Cancer Pain Symptom Palliation 2005; 1:25-29.
- [3] Gill, N.S., J. Bajwa, P. Sharma, K. Dhiman and S. Sood. Evaluation of antioxidant and antiulcer activity of traditionally consumed Cucumis melo seeds. J. Pharmacol. Toxicol 2011; 6: 82-89.
- [4] Shah, P. M. The need for new therapeutic agents. What is in the pipeline? Clin. Microbiol. Infect 2005; 11: 36-42.

- [5] Braca, A., C. Sortino, M. Politi, I. Morelli and J. Mendez. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *J. Ethnopharmacol* 2002; 79: 379-381.
- [6] Modi, A.J., S.S. Khadabadi, S. L. Deore and M.S. Kbd. Antioxidant effects of leaves of *Clerodendrum infortunatum* (Linn.) . *Int. J. Pharmaceut. Sci. Res* 2010; 1: 67-72.
- [7] Sati, S.C., N. Sati, U. Rawat and O.P. Sati. Medicinal plants as a source of antioxidants. *Res. J. Phytochem* 2010; 4: 213-224.
- [8] Daniel, M. Medicinal Plants. Chemistry and Properties. Science Publishers, USA 2006; pp: 1-9.
- [9] Burkill HM. The useful plants of West/Tropical Africa. Royal Botanic Gardens Kew 1985 ; 1: 452-453:481.
- [10] Nacoulma OG. Medicinal plants and their traditional uses in Burkina Faso. PhD Thesis. University of Ouagadougou, Biochemistry-microbiology department 1996.
- [11] Njan Nlôga AM, Saotoing P, Tchouankeu JC, Messi J. Effect of Essential Oils of Six Local Plants Used Insecticide on Adults of *Anopheles gambiae*, Giles 1902, *J. Entomol* 2007; 4(6): 444-450.
- [12] Okhale SE, Odiniya EO. Kunle OF. Preliminary Phytochemical and Pharmacognostical Investigation of Pediatrics Antimalarial *Laggera pterodonta* (DC) Sch. Bip.: Asteraceae of Nigerian Origin, *Ethnobot. Leaf* 2010; 14: 457-66, 2010.
- [13] Zhao Y, Reanmongkol W, Bouking P, Zhang R. Acute toxicity and antinociceptive effect of *Laggera pterodonta* (DC) Benth Aqueous extract. *Nat. Prod. Res. Dev* 2004; 17(4): 457-459.
- [14] Shi S, Huang K, Zhang Y, Zhao Y, Du Q. Purification and identification of antiviral components from *Laggera pterodonta* by high-speed counter-current chromatography. *J. chromatogr. B. Analytical technologies in the biomed. Life. Sci* 2007 ; 859 (1): 119-124.

- [15] Wu Y, Wang F, Zheng Q, Lu L, Yao H, Zhou C, Wu X, Zhao Y. Hepatoprotective effect of total flavonoids from *Laggera alata* against carbon tetrachloride-induced injury in primary cultured neonatal rat hepatocytes and in rats with hepatic damage. *J. Biomed. Sci* 2006; 13:569-578.
- [16] Yang GZ, Li YF, Yu X, Mei ZN. Terpenoids and flavonoids from *Laggera pterodonta*, *Yao.Xue.Xue. Bao* 2006; 42(5): 511-515.
- [17] Xiao Y, Zheng Q, Zhang Q, Sun H, Guéritte F, Zhao Y. Eudesmane derivatives from *Laggera pterodonta*. *Fitoterapia* 2003 ; 74(5):459-463.
- [18] Lamien-Meda A., C.E.Lamien, M.M.Y.Compaoré, R.T.N.Meda, M.Kiendrebeogo, B.Zeba, J.F.Millogo and O.G.Nacoulma. Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. *Molecules* 2008; 13:581-594.
- [19] Hinnebourg, I., Damien Dorman, H. J., Hiltunen, R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry* 2006;97:122-129.
- [20] Konaté K, Hilou A, Mavoungou JF, Lepengué AL, Souza A, Barro N, Datté JY, M'Batchi Band Nacoulma OG. Antimicrobial activity of polyphenol-rich fractions from *Sida alba* L. (Malvaceae) Against cotrimoxazol-resistant bacteria strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2012; 11:5. doi:10.1186/1476-0711-11-5.
- [21] NCCLS-National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standard for anti-microbial susceptibility testing: eleventh informational supplement. Document M100-S11. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Wayne, PA, USA 2001.
- [22] Berche P, Gaillard JL, Simonet M. In Nosocomial Infections Caused by Bacteria and Their Prevention in Bacteriology Edited by: Flammarion Medicine Sciences 1988; 64-71.
- [23] Rice-Evans, C.A., N. Miller and G. Paganga. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 1997; 2: 152-159.

- [24] Prior, R.L. and G. Cao. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables. Diet and health implications. *Hortic. Sci* 2000; 35: 588-592.
- [25] Mathew, S. and T. E. Abraham. In vitro antioxidant activity and scavenging effect of *Cinnamomum verum* leaf assayed by different methodologies. *Food. Chem. Toxicol* 2006; 44:198-206.
- [26] Meenakshi, S., D.M. Gnanambigai, S.T. Mozhi, M. Arumugam and T. Balasubramanian. Total flavonoid and in vitro antioxidant activity of two seaweeds of rameshwaram coast. *Global J. Pharmacol* 2009; 3: 59-62.
- [27] Machado, T.D., I.C.R. Leal, A.C.F.A Maral, K.R.N. dosSantos, M.G. daSiva and R.M. Kuster. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. *J. Brazilian Chem. Soc* 2002; 13: 606-610.
- [28] Cakir, A., A. Mavi, A. Yilddirim, M.E. Duru, M. Harmandar and C. Kazaz. Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fractionation. *J. Ethiopharmacol* 2003; 87: 73-83.
- [29] Duh, P.D., Y.Y. Tu and G.C. Yen. Antioxidative activity of water extracts of Hamg jzur (*Chrysanthemum morifolium*). *Lebnesmittel-Wissenschaft Technol* 1999; 32: 269-277.
- [30] Tanaka, M., C., W. Kuie, Y. Nagashima and T. Taguchi. Application of antioxidative Maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products. *Bull. Jap. Soc. Scientific Fisheries* 1988; 54: 1409-1414.
- [31] Aneta, W., O. Jan and C. Renata. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem* 2007; 105: 940-949.
- [32] Schlesier, K., M. Harwat, V. Bohm and R. Bitch. Assessment of antioxidant activity by using different in Vitro methods. *Free radical Res* 2002; 36:177-187.
- [33] Nsimba, R.Y., H. Kikuzaki and Y. Konishi. Antioxidant activity of various extracts and fractions of chenopodium quinoa and *Amaranthus* SSp. Seeds. *Food chem.* 2008; 106:760-766.

- [34] Anna, M.N., P.P. Riitta, A. Marjukka and O.C. Kirsi-Marja. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food chem.* 2003; 81:485-493.
- [35] Negro, C.L. Tommasi and A. Miceli. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresour. Technol* 2003; 87 :41-44.
- [36] Ramandeep, K.T. and P.S. Geoffrey. Antioxidant activity in different fraction of *tomatoes*. *Food Res. Int* 2005; 38:487-494.
- [37] Gao, X., M. Ohlander, N. Jeppsson, L. Bjork and V. Trajkovski. Changes in antioxidant effects and their relationships to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *J. Agric. Food Chem* 2000; 48: 1485-1490.
- [38] Hoffman, D.L. *The Herb User's Guide*. Thomsonius Publishing Group, Wellingborough, London 1987.
- [39] Nasar-Abbas, S.M. and A.K. Halkman. Antimicrobial effect of water extract of sumac (*Rhus coriaria* L.) on the growth of some food borne bacteria including pathogens. *Int. J. Food Microbio*; 2004; 97: 63-69.
- [40] Rahman, A., M.A.K. Parvez, T. Parvin, D.K. Paul and M.A. Sattar. Antimicrobial activity of three bioactive compound from the stem bark of *Piper chaba* hunter. *Bioscie. Res* 2004; 1: 16-20.
- [41] Abeer M, Haj A, Sanaa OY. Anti-microbial Activity of *Acacia nilotica* Extracts Against Some Bacteria Isolated from Clinical Specimens. *Res J Med Plant* 2007; 1(1):25-28.
- [42] Rabe T, Mullholland D, van Staden J. Isolation and identification of antibacterial compounds from *Vernonia colorata* leaves. *J. Ethnopharmacol* 2002; 80:91-94.

- [43] Machado TD, Leal ICR, Amaral ACF, dos Santos KRN, da Siva MG, Kuster RM. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. J Braz Chem Soc 2002; 13:606-610.
- [44] Cowan MM. Plants products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 1999 ; 12:564-582.
- [45] Kelmanson, J. E., A. K. Jager and J. van STaden. Zulu medicinal plants with antimicrobial activity. J. Ethnopharmacol 2000; 69: 241-246.
- [46] Zongo, C., A. Savadogo, L. Ouattara, I.H.N. Bassole and C.A.T. Ouattara. Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of *Ampelocissus grantii* (Baker) Planch. (Vitaceae): A medicinal plant from Burkina Faso. Int. J. Pharmacol 2010; 6: 880-887.
- [47] Reynolds, J.E.F. Martindale the Extract Pharmacopoeia. 31st Edn., Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, London 1996.
- [48] Bezic, N.M., S.V. Dinkic and A. Radonic. Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* L. essential oil. Phytother. Res 2003; 17: 1037-1040.
- [49] Tomas-Barberan, F., E. Iniesta-Sanmartin, F. Tomas-Lorente and A. Rumbero. Antimicrobial phenolic compounds from three Spanish *Helichrysum* species. Phytochemistry; 29: 1093-1095.
- [50] Nostro A, Germano MP, D'Angelo V, Marino A, Cannatelli MA. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Lett. Applied Microbiol 2000; 30:379-384.
- [51]. Bachi BB, Rothrer S. Factors influencing methicillin resistance in Staphylococci. Arch Microbiol 2002; 178:165-171.
- [52]. Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. Emerg Infect Dis 2001; 7:337-341.

Table 1: Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of extract and Fractions from *Laggera aurita*

LM2	Bc	S.typ	S.oro	S.inf	E. coli	Kd	S.nig	Ye	Lm 1
-----	----	-------	-------	-------	---------	----	-------	----	------

EHA	10	5	10	5	2.5	10	5	10	5	10
FEP	10	5	1.25	5	2.5	10	2.5	5	2.5	10
FDM	10	1.25	0.625	1.25	1.25	5	5	5	2.5	5
FAE	10	1.25	10	1.25	2.5	5	5	5	2.5	5
FB	2.5	2.5	5	2.5	1.25	5	2.5	5	5	5

The results are the means of number of the colonies \pm standard deviations

Table 2: Minimum bactericidal concentration (MBC) of extract and Fractions from *Lagdera aurita*.

	BC	S.typ	S.inf	S. oro	Lm2	E. coli	Kd	S. nig	ye	Lm 1
EHA	10	>10	10	>10	>10	>10	10	>10	10	>10
FEP	10	5	10	>10	>10	>10	5	10	5	>10
FDCM	2.5	5	>10	>10	>10	10	10	10	5	10
FAE	2.5	10	>10	10	>10	10	10	10	5	10
FB	5	10	5	10	10	10	5	10	10	10

The results are the means of number of the colonies \pm standard deviations.

Table 3: Bacteriocidal/Bacteriostatic capacity of *Laggenre aurita*

	Bc	S.typ	S.inf	S.oro	Lm2	E. coli	Kd	S. nig	ye	Lm 1
EHA	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
FEP	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
FDCM	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
FAE	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+

FB + + - - - + + + + +

The results are the means of number of the colonies \pm standard deviations.

+: bactericidal effect (MBC/MIC = 1 or 2) -: bacteriostatic effect (MBC/MIC = 4 or 16).

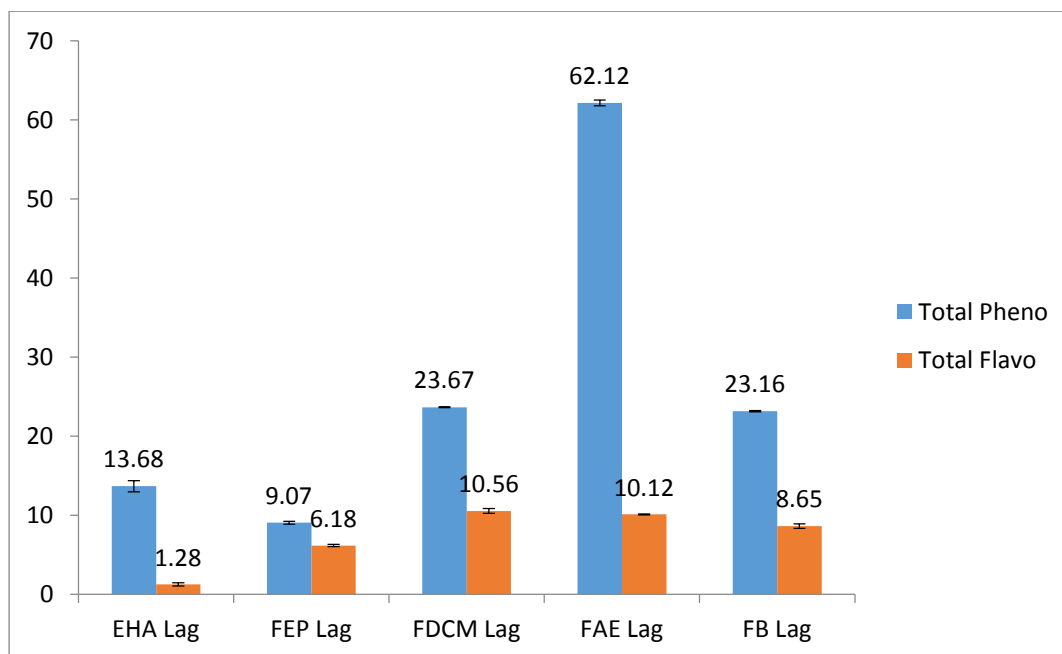


Figure 1: Polyphenol content of extract and fractions from *Laggera aurita* L.

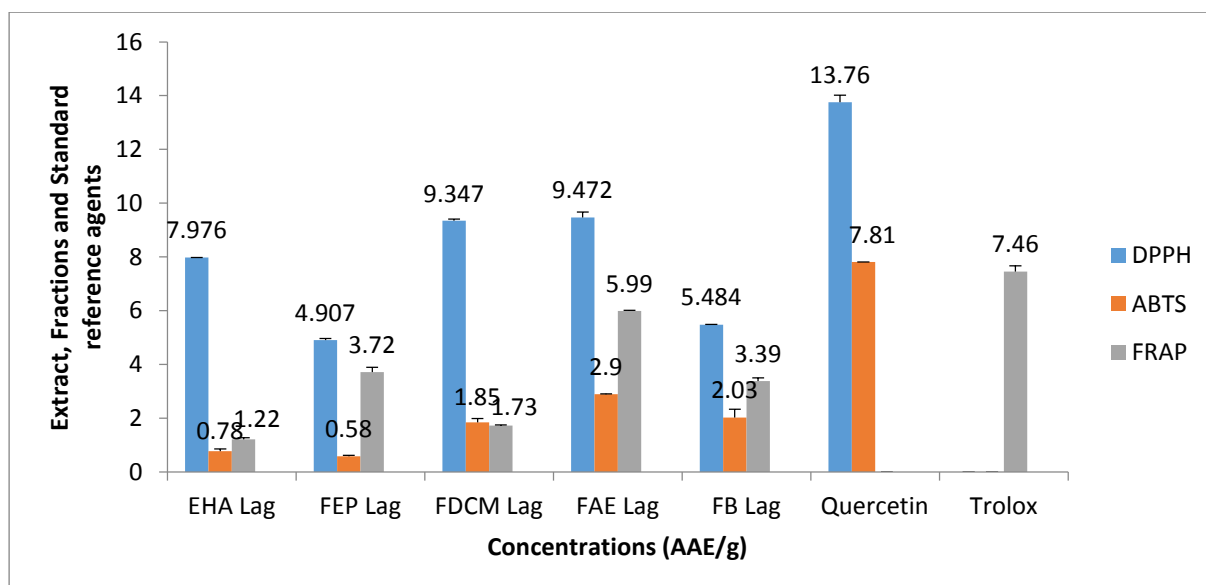


Figure 2: Antioxidant activity of extract and fractions from *Laggera aurita* L.

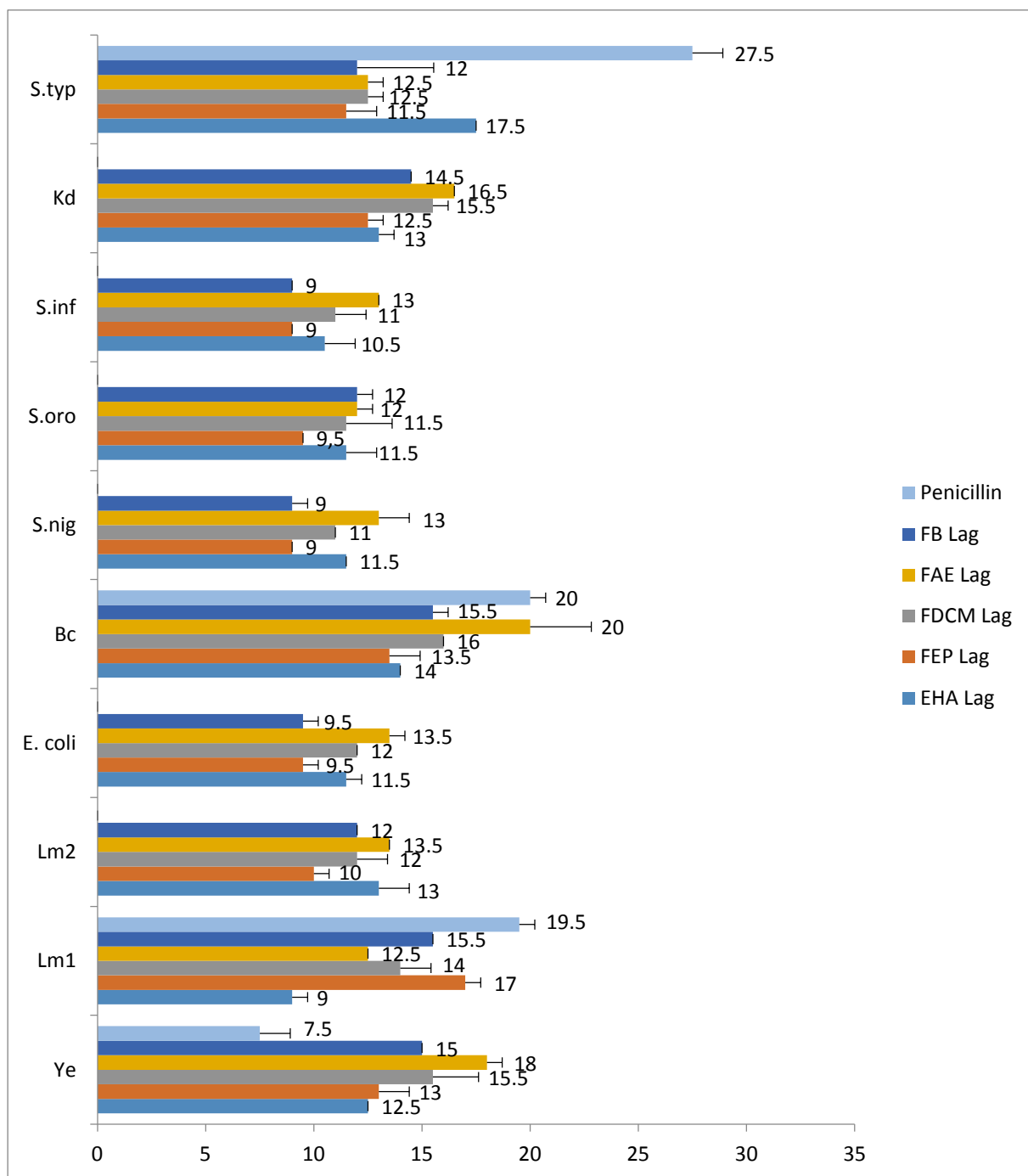


Figure 3: Inhibition Zone Diameters of extract and fractions from *Laggera aurita* L. and conventional antibiotics (Penicillin and Gentamycin).

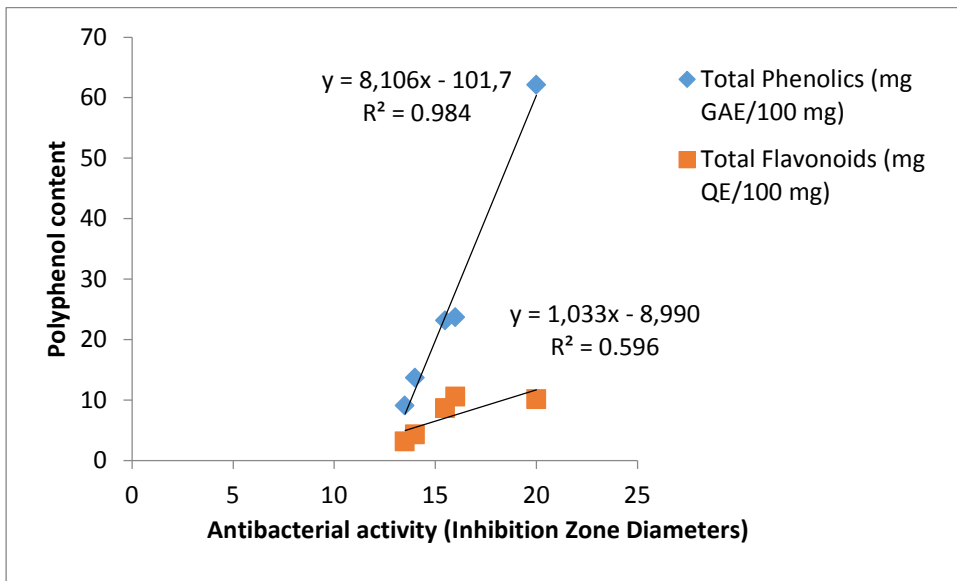


Figure 4a: Correlation between Polyphenol content and antibacterial activity (Bc= *Bacillus cereus* strains)

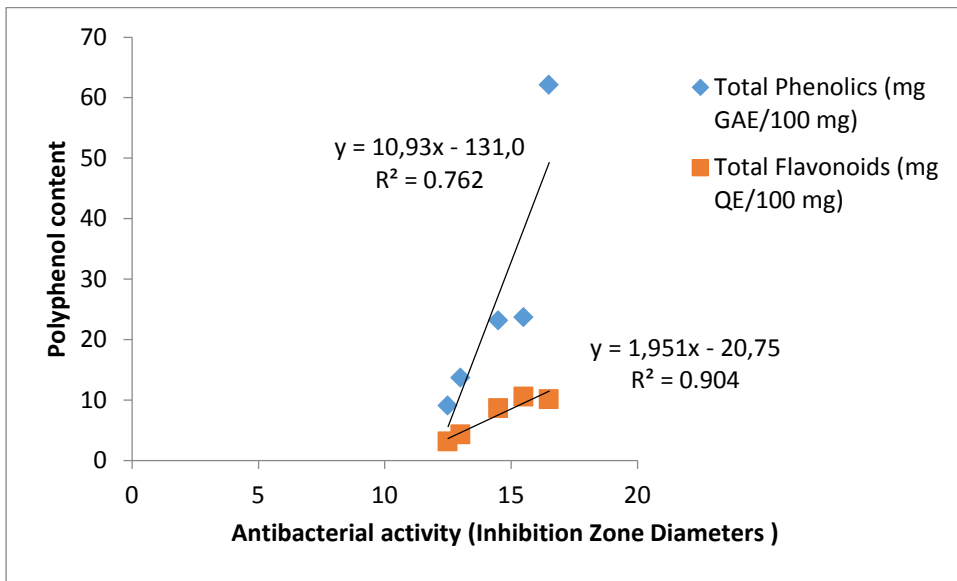


Figure 4b: Correlation between polyphenol content and antibacterial activity (Kd = *Bacillus cereus* strains)

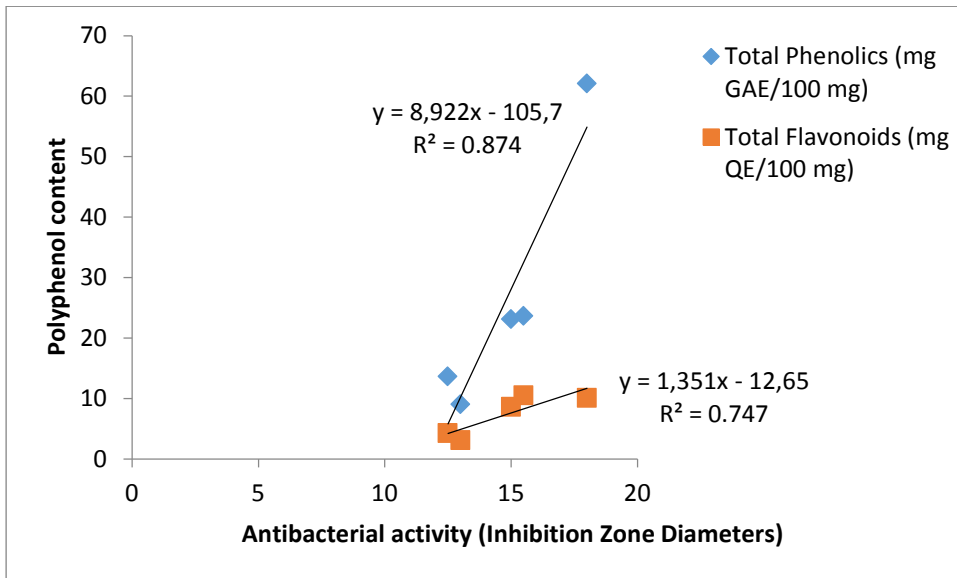


Figure 4c: Correlation between polyphenol content and antibacterial activity (Ye= *Yersinia enterocolitica* 6A28 SKN 599)

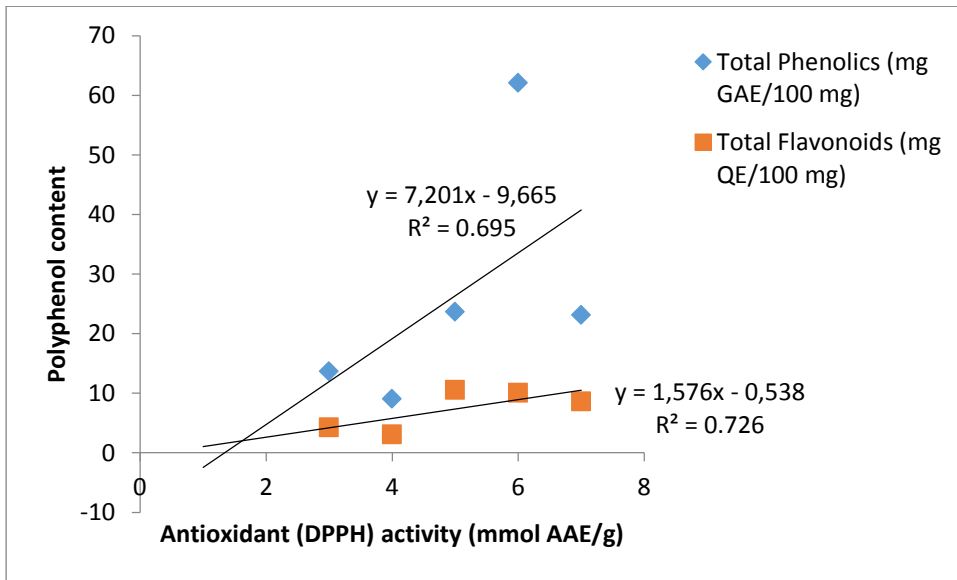


Figure 5a: Correlation between polyphenol content and antioxidant activity (DPPH method)

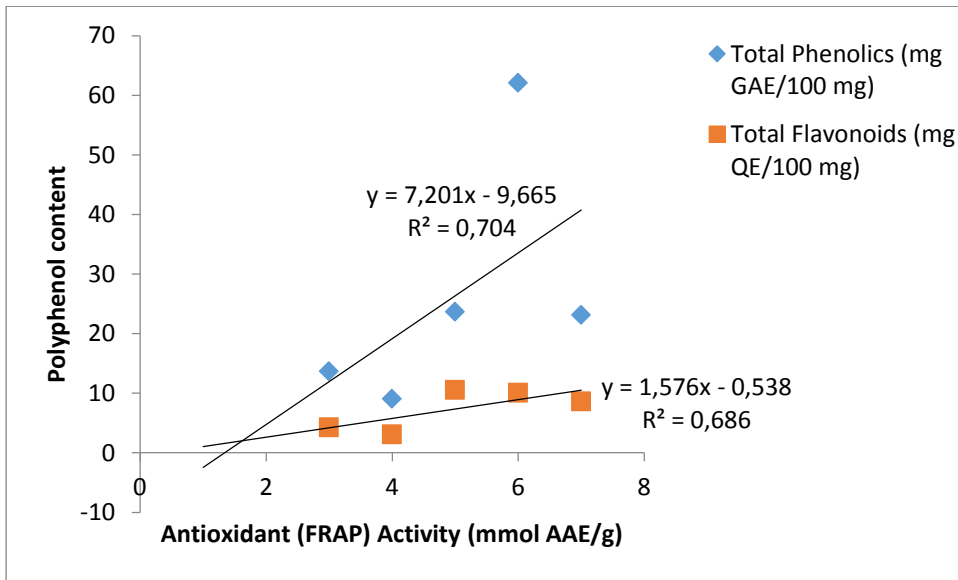


Figure 5b: Correlation between polyphenol content and antioxidant activity (FRAP method)

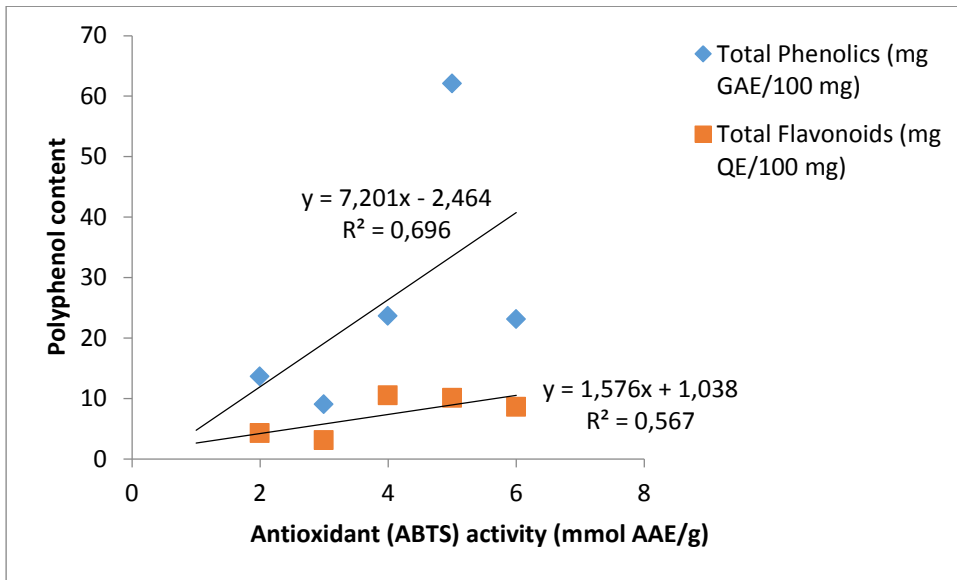


Figure 5c: Correlation between polyphenol content and antioxidant activity (ABTS method)