



UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU

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

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET
MICROBIOLOGIE

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET CHIMIE
APPLIQUEES



THESE UNIQUE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR ES SCIENCES BIOLOGIQUES APPLIQUEES

Option : Biochimie et Chimie des Substances Naturelles

Présentée par

Martin KIENDREBEOGO

PHYTOCHIMIE ET PROPRIETES BIOLOGIQUES DE *STRIGA HERMONTHICA* (DEL) BENTH. (SCROPHULARIACEAE)

Soutenue le 29 Octobre 2005

devant le jury composé de

Président: **GUISSOU Innocent Pierre**, Professeur Titulaire
Université de Ouagadougou, Burkina Faso

Membres: **SAWADOGO Jérôme Germain**, Professeur Titulaire
Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecines Vétérinaires de Dakar, Sénégal

WOUESSIDJEWÉ Denis, Professeur Titulaire
Université Joseph Fourier de Grenoble, France

KOUDOU Jean, Maître de Conférence
Université de Bangui, Centrafrique

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

DEDICACES

*A mon Père KIENDREBEOGO OUAGABAMBA et à ma Mère
ILBOUDO NONGARIM,*

A mes frères Julien, Paulin, Nicolas, Roland et Patrick,

A ma très chère Amsatou TOURE,

A Monsieur et Madame Jean et Andrée ROUFINEAU,

*A tous ceux, amis et parents, qui d'une manière d'une autre auront
contribué à l'aboutissement de ce travail,*

Cette Thèse de Doctorat Unique est la vôtre !

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier de l'Agence Internationale à l'Energie Atomique (AIEA) pour son assistance matérielle et technique au Laboratoire de Biochimie et de Chimie Appliquées (LABIOCA) à travers le programme de coopération technique BKF 5002 et les bourses de formation BKF/01024R et BKF/03030P en entomologie et en HPLC dont j'ai bénéficié. Je remercie également la coopération Autrichienne pour la bourse de formation EZA-Project 894/03 en phytochimie.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biochimie et de Chimie Appliquées (LABIOCA) de l'UFR/ SVT de l'Université de Ouagadougou, au Laboratoire de Pharmacotechnie de la faculté de Pharmacie de L'Université Joseph Fourier de Grenoble ainsi qu'au laboratoire de Phytochimie de l'Institut de Botanique de l'Université de Vienne.

Cette thèse a été réalisée sous la direction scientifique du Professeur **Odile G. NACOULMA**. Professeur, je tiens particulièrement à vous exprimer toute ma gratitude pour avoir accepté de m'accueillir dans votre laboratoire, pour avoir guidé mes premiers pas dans la recherche tout en me laissant une grande autonomie d'initiative ainsi pour l'esprit d'équipe que vous avez su nous inculquer. Je vous remercie également pour avoir manifesté en notre endroit une disponibilité constante et une assistance multiforme sans faille tout au long de ses années. Merci Professeur pour la confiance que vous avez bien voulu placer en nous; j'espère ne vous avoir pas trop déçu!

J'adresse mes vifs remerciements:

Au Professeur **Innocent Pierre GUISSOU**, Chef du département de Médecine et Pharmacopée Traditionnelles (MEPHATRA) de L'IRSS/ CNRST et directeur du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de UFR/ SDS pour avoir accepté d'évaluer ce travail et de présider mon Jury de soutenance.

Au Professeur **Germain Jérôme SAWADOGO**, Chef de service de Physique et de Chimie Biologiques et Médicales de l'Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires (EISMV) de Dakar, pour avoir accepté d'évaluer ce travail en faisant partie du Jury.

Au Professeur **Denis WOUESSIDJEWÉ**, Directeur du Laboratoire de Pharmacotechnie de La Faculté de Pharmacie de L'Université Joseph Fourier de Grenoble, Expert auprès de l'agence Française du médicament et de l'Agence Internationale à L'Energie Atomique.

Je vous exprime toute ma gratitude pour l'accueil chaleureux que vous m'avez réservé lors de mon stage dans votre Laboratoire ainsi que pour toutes les facilités que vous m'avez accordé. Nous vous exprimons toute notre reconnaissance pour avoir accepté malgré vos nombreuses occupations, d'évaluer la valeur scientifique de ce travail et de siéger dans ce jury de thèse.

Au Professeur **Jean KOUDOU**, qui malgré ses multiples occupations a accepté de siéger dans notre jury de thèse.

Au Professeur **Luc CHOISNARD**, du Laboratoire de Pharmacotechnie de L'Université Joseph Fourier de Grenoble pour n'avoir ménagé aucun effort pour m'initier à l'Optimisation de séparations HPLC par la méthode du "Plan d'Expérience". Pour toute ta disponibilité et tes conseils très critiques tout au long du travail de paillasse et de rédaction de la publication sur le plan d'expérience ainsi que pour ta grande sympathie, Merci.

Au Professeur **Marie Geneviève DIJOUX-FRANCA**, du Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université Joseph Fourier de Grenoble, pour toute la disponibilité et la gentillesse quelle a manifesté en notre endroit ainsi que pour les facilités d'analyses RMN. Merci pour les critiques et les corrections apportées à nos manuscrits de publications scientifiques et de thèse..

Au **Professeur Annabelle GEZE**, du Laboratoire de Pharmacotechnie de l'Université Joseph Fourier de Grenoble pour toutes la disponibilité et la gentillesse en notre endroit lors de notre séjour à Grenoble.

Au Professeur **Harald GREGER**, du laboratoire de Phytochimie de L'Institut de Botanique de l'Université de Vienne pour voir accepté de nos recevoir dans son laboratoire et nous avoir initier aux techniques d'isolement bioguidé de métabolites secondaires biologiquement actifs et de chromatographie préparative moyenne pression en phase liquide MPLC.

Au Docteur **Brigitte BREM**, du laboratoire de Phytochimie de L'Institut de Botanique de l'Université de Vienne, pour toute sa disponibilité et sa gentillesse en notre endroit ainsi que pour l'aide inestimable qu'elle n'a cessé de nous apporter pour l'enrichissement de la bibliographie de notre thèse.

Au Professeur **Jeanne MILLOGO/ RASOLODIMBY**, pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre soutien ainsi que pour avoir accepté de corriger notre manuscrit.

Au Docteur **Boukary ZEBA**, pour son soutien et ses encouragements.

Au Professeur **Augustin BERE**, au Docteur **Monique OUATTARA** pour vos encouragements.

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

J'aimerais également remercier mes collègues du Laboratoire de Biochimie et de Chimie Appliquées pour leur contribution à travers les échanges de conseils et de suggestions. Dans le désordre: Charles, Aline, Wantinga, Adama, André, Sahabi, Amédé, Nongassida, fatoumata, Boniface, Patrice, Karim, Issouf. Parmi ces personnes, je tiens très particulièrement à remercier Charles Euloge LAMIEN et Aline MEDA pour leur agréable compagnie, leurs conseils et pour l'esprit d'équipe et la complicité qui a régné entre nous durant toutes ces années.

Je remercie également tous mes camarades et amis en année de Thèse de L'UFR/ SVT, ou ayant déjà soutenu leur Thèse pour leur franche collaboration. Je tiens particulièrement à citer Dr Marcel D. BENGALY, Maurice OUEDRAOGO, Dr Ali BAYANE, Roger BAYALA, Dr Paul W. SAWADOGO, Dr Ismaël BASSOLE, Dr Ali SAWADOGO, Amadé OUEDRAOGO, Paulin OUOBA, Constance NANA, Mme SOUGGOTI/ GUISSOU Laure pour leur agréable compagnie, leur aide et leur amitié manifestés tout au long de ce travail.

J'exprime mes sincères remerciements à Messieurs Justin NIKIEMA et Ladji SIDIBE pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de ce travail.

RESUME

Striga hermonthica (Del.) Benth Scrophulariaceae est une herbacée semi parasite du sorgho et du petit mil dont il réduit sensiblement les rendements de récolte. Le mil et le sorgho étant la base de l'alimentation humaine au sahel, *S. hermonthica* est considéré à juste titre comme un facteur d'insécurité alimentaire. La lutte contre le Striga s'inscrit dans cette logique. Toutefois, les usages traditionnels du Striga ainsi que les propriétés biologiques avérées d'autres espèces du genre *Striga* nous ont conduit à nous intéresser à la phytochimie et aux propriétés biologiques de cette plante parasite. L'objectif de cette étude est d'évaluer les potentialités de *Striga hermonthica* comme plante à usage thérapeutique et insecticide.

Les investigations phytochimiques ont permis de montrer que les polyphénols de *Striga hermonthica* sont principalement des flavonoïdes, des tanins et des hydroxyméthylantraquinones localisés respectivement au niveau du parenchyme cortical, du xylème et du parenchyme médullaire des tiges. Les flavonoïdes représentent les polyphénols majoritaires de la plante. L'approche du "plan d'expérience" a permis d'optimiser une méthode HPLC-DAD pour l'analyse des flavonoïdes de *S. hermonthica*. Le spectre UV des flavonoïdes analysés par HPLC-DAD révèle que sont uniquement des flavones. L'apigénine et la lutéoline ont été identifiés. Leur présence dans les extraits de *S. hermonthica* justifie les propriétés contraceptives, antihistaminiques et anti-inflammatoires qui lui sont attribuées. En outre, ils seraient potentiellement exploitables contre les bactéries et parasites chimio résistants.

Le criblage des propriétés biologiques de *Striga hermonthica* nous a permis de montrer que cette plante ne présente pas de risque de toxicité aigue en tradithérapie. Les propriétés antibactériennes, antifongiques et insecticides attribuées à la plante par les usages traditionnels ont été confirmés. *S. hermonthica* contient également des molécules antitumorales et antiradicalaires. L'activité antibactérienne du Striga est exclusivement Gram positif. Les propriétés antiradicalaire, larvicide et ovicide de *S. hermonthica* seraient potentiellement exploitables en terme de prévention contre les maladies liées au stress oxydatif de l'organisme et de conservation du niébé contre *Callosobruchus maculatus*.

Le fractionnement bioguidé nous a permis d'isoler trois flavones (lutéoline, dérivé de l'apigénine, dérivé méthoxylé de la lutéoline) et un terpène responsables d'une partie de l'activité antiradicalaire de *Striga hermonthica*. La lutéoline se révèle être la molécule antiradicalaire majoritaire isolée.

Mots clés: *Striga hermonthica*, Flavones, Iridoïdes, Toxicité aigue, Insecticide botanique
Antiradicalaire, Contraceptif, Antibactérien, Optimisation de séparation HPLC

ABSTRACT

Striga hermonthica (DEL.) Benth Scrophulariaceae is a semi parasitic weed of sorghum and millet, reducing the outputs of their harvest. As millet and sorghum are essential for human consumption in Sahelian countries, *S. hermonthica* is considered as a factor of food insecurity. The efforts to eradicate the Striga fall under this logic. However, traditional uses of Striga as well as proven biological properties of other species of the genus Striga motivate our interest in the phytochemistry and biological properties of this parasitic plant. This investigation aims to evaluate the potentialities of *S. hermonthica* as therapeutic and insecticidal plant.

Phytochemical investigations showed that the main polyphenols of *Striga hermonthica* are flavonoids, tanins and hydroxymethylantraquinones respectively localised in the cortical parenchyma, xylem and medullar parenchyma of the stems. The flavonoids constitute the majority of the polyphenolic compounds of *S. hermonthica*. The "experimental design" methodology made possible the optimization of an HPLC-DAD method for the qualitative analysis of the flavonoids from *S. hermonthica*. UV spectrum of flavonoids reveals their flavonic nature. Apigenin and luteolin were identified. Their occurrence in the extracts of *S. hermonthica* justifies the contraceptive, antihistaminic and anti-inflammatory properties allotted to the Striga. Moreover, apigenin and luteolin would be potentially exploitable against chemo resistant bacteria and parasites. The sifting of the biological properties of *Striga hermonthica* enabled us to show that this plant does not present any risk of acute toxicity in traditional therapy. The antibacterial, antifungal, and insecticidal properties allotted to the plant by traditional uses were confirmed through this study. *S. hermonthica* also contains antitumoral and scavenging compounds. The antibacterial activity of Striga is exclusively Gram positive. The scavenging, larvicide and ovicide properties of *S. hermonthica* would be potentially exploitable in preventing diseases related to the organism's oxidative stress and for the conservation of cowpea during storage against *Callosobruchus maculatus*.

Bioguided fractionation of the hydro acetone extract led to the isolation of three flavones (luteolin, 3'/ 4'-methoxy-luteolin derivative, apigenin derivative) and one terpenic compound as responsible for the scavenging activity of *Striga hermonthica*. Luteolin was the main and most potent scavenger isolated from this plant.

Key words: *Striga hermonthica*, Flavones, Iridoids, Acute toxicity, Botanical insecticides
Scavenger, Contraceptive, Antibacterial, HPLC experimental design

LISTE DES PUBLICATIONS

PUBLICATIONS EN RAPPORT AVEC LA THESE

M. KIENDREBEOGO, M. G. DIJOUX-FRANCA, C. E. LAMIEN, A. MEDA, D. WOUESSIDJEWÉ, O. G. NACOULMA (2005) Acute toxicity and antioxidant property of *Striga hermonthica* (Del.) Benth. (Scrophulariaceae). *African Journal of Biotechnology*, 4(9) 919-922.

M. KIENDREBEOGO, L. CHOISNARD, C. E. LAMIEN, A. MEDA, D. WOUESSIDJEWÉ, O. G. NACOULMA (2006) Experimental design optimization for screening relevant free phenolic acids from various preparations used in Burkina Faso folk medicine. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicine*, 3(1) 115-128.

M. KIENDREBEOGO, A. P. OUEDRAOGO, O. G. NACOULMA (2006) Activités insecticides de *Striga hermonthica* (Del.) Scrophulariaceae sur *Callosobruchus maculatus* (Fab.) (Coleoptera:Bruchidae). *Biotechnologie, Agronomie Société et Environnement*, 10(1) 17-23.

POSTER EN RAPPORT AVEC LA THESE

M. KIENDREBEOGO, O. G. NACOULMA. Conservation des denrées alimentaires par des extraits végétaux: cas du niébé lors du stockage, *International workshop, Small scale food industry for a healthy nutrition in West-Africa, 22-24 November 1999, Ouagadougou, Burkina Faso* (www.ftns.wau.nl/lmt/ouaga/docs/Kiendrebeogo.html)

AUTRE PUBLICATION

P. P. ABILA, **M. KIENDREBEOGO**, G. N. MUTIKA, A. G. PARKER, A. S. ROBINSON (2003) The effect of age on the mating competitiveness of male *Glossina fuscipes fuscipes* and *G. palpalis palpalis*, *Journal of Insect Science*, 3:13 (www.insectscience.org/3.13)

LISTE DES ABREVIATIONS

DAD:	Diode Array Detector (détecteur à barrettes d'iode)
UV/ Vis:	Ultraviolet/Visible
DE:	Dose efficace
DL:	Dose létale
CAR:	Concentration anti-radicalaire
CC:	Concentration cytotoxique
CCM:	Chromatographie sur Couche Mince
MPLC:	Medium Pressure Liquid Chromatographie
HPLC:	High Performance Liquid Chromatographie
RMN:	Résonance Magnétique nucléaire
MTT:	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
DMSO:	Diméthyl sulfoxyde
INT:	IodoNitrotetrazolium violet
ACHE:	Acetylcholinesterase
ATACI:	Acetylcholine iodide
DTNB:	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid
BSA:	Bovine serum albumine
DPPH:	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
Rf:	Référence frontale

TABLE DES MATIERES

DEDICACES	i
REMERCIEMENTS	ii
RESUME	v
ABSTRACT.....	vi
LISTE DES PUBLICATIONS	vii
LISTE DES ABREVIATIONS	viii
TABLE DES MATIERES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX ET CHROMATOGRAMMES	xii
LISTE DES PHOTOS ET FIGURES	xiv
INTRODUCTION	1

I^{ère} partie: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. PRESENTATION DU GENRE <i>STRIGA</i> Lour.	5
I.1.ESPECES HEMIPARASITES	5
I.2.PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES.....	6
I.3.ELEMENTS DE PHYTOCHIMIE	9
I.4.STRIGA HERMONTHICA (DEL) BENTH.....	13
II. COMPOSES POLYPHENOLIQUES DES PLANTES	18
II.1.GENERALITES	18
II.2.FLAVONOIDES.....	20
II.3.ACIDES PHENOLS.....	24
II.4.IMPORTANCE DES FLAVONOIDES ET ACIDES PHENOLS.....	26
III. SEPARATION DES COMPOSES POLYPHENOLIQUES.....	30
III.1. ANALYSE HPLC DES FLAVONOIDES ET ACIDES PHENOLS.....	30
III.2. OPTIMISATION DE METHODES HPLC	32

II^{ème} partie: MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL D' ETUDE.....	35
I.1.MATERIEL DE LABORATOIRE	35
I.2.MATERIELS BIOLOGIQUES	37
II. ETUDE PHYTOCHIMIQUE	40
II.1.TESTS GENERAUX DE CARACTERISATION.....	40
II.2.HISTOCHIMIE.....	40
II.3.DOSAGES DES COMPOSES PHENOLIQUES.....	41
II.4.ANALYSE CCM DES COMPOSES POLYPHENOLIQUES	44
II.5.OPTIMISATION DE LA SÉPARATION DES POLYPHENOLS	44
II.6.ANALYSE HPLC DES FLAVONOÏDES ET ACIDES PHENOLS.....	50
III. CRIBLAGE DES PROPRIETES BIOLOGIQUES	51
III.1. EXTRACTIONS	51
III.2. TOXICITE AIGUE	52
III.3. CYTOTOXICITE	53
III.4. ACTIVITES INSECTICIDES	54
III.5. INHIBITION DE L'ACETYLCHOLINESTERASE	57
III.6. ACTIVITES ANTIMICROBIENNES	59
III.7. ACTIVITE ANTIPLASMODIALE	61
III.8. ACTIVITE ANTIRADICALAIRE.....	63
IV. IDENTIFICATION DES MOLECULES ANTIRADICALAIRES	64
IV.1. ISOLEMENTS ET PURIFICATIONS	64
IV.2. ELUCIDATION STRUCTURALE DES MOLECULES ISOLEES.....	65

III^{ème} partie: RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. ETUDES PHYTOCHIMIQUES.....	66
I.1.RESULTATS	66
I.2.DISCUSSION	85
I.3.CONCLUSION PARTIELLE	88
II. CRIBLAGE DES PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES	89

II.1.TOXICITE AIGUË.....	89
II.2.CYTOTOXICITE	91
II.3.ACTIVITES INSECTICIDES	95
II.4.ACTIVITES ANTIMICROBIENNES	102
II.5.INHIBITION DE L'ACETYLCHOLINESTERASE	107
II.6.ACTIVITÉ ANTIRADICALAIRE DPPH'	111
II.7.ACTIVITÉ ANTIPLASMODIALE	114
II.8.CONCLUSION PARTIELLE	116
III. IDENTIFICATION DES MOLECULES ANTI RADICALAIRES	118
III.1. POLYPHENOLS ET ACTIVITE ANTIRADICALAIRE	118
III.2. ISOLEMENT DE MOLECULES ANTI RADICAUX DPPH' LIBRES	119
III.3. MOLECULES ANTIRADICALIRES IDENTIFIEES.....	123
III.4. CONCLUSION PARTIELLE	131
IV. POTENTIALITES BIOLOGIQUES DES FLAVONES IDENTIFIES	132
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	134
BIBLIOGRAPHIE	137
PUBLICATIONS EN RAPPORT AVEC LA THESE.....	158

LISTE DES TABLEAUX ET CHROMATOGRAMMES

Tableau 1: Propriétés pharmacologiques de quelques espèces du genre <i>Striga</i>	8
Tableau 2: Métabolites secondaires isolées et identifiées du genre <i>Striga</i>	9
Tableau 3: Matrice des essais	47
Tableau 4: Groupes phytochimiques caractérisés.....	66
Tableau 5: Teneur en polyphénols d'extraits de <i>Striga hermonthica</i>	71
Tableau 6: Teneur en polyphénols totaux non flavonoïdiques.....	72
Tableau 7: Domaine expérimental de l'étude	76
Tableau 8: Matrice des essais et des réponses (CRF).....	76
Tableau 9: Longueur d'onde caractéristique des flavonoïdes détectés	84
Tableau 10: Effet dose-réponse sur la mortalité des souris NMRI	89
Tableau 11: Effet dose-réponse sur la viabilité de cellules tumorales A549.....	92
Tableau 12: Concentration cytotoxique 50 sur cellules tumorales A549	93
Tableau 13: Mortalité cumulée des adultes de <i>Callosobruchus maculatus</i>	95
Tableau 14: Taux de mortalité des oeufs et larves de <i>Callosobruchus maculatus</i> et taux d'adultes de première génération émergeant des graines	96
Tableau 15: Efficacité ovicide et larvicide des extraits de <i>Striga hermonthica</i>	97
Tableau 16: Effets dose réponse sur les oeufs et larves de <i>Callosobruchus maculatus</i>	99
Tableau 17: Diamètre d'inhibition d'extraits de <i>Striga hermonthica</i>	103
Tableau 18: CMI de l'extrait chloroformique sur des bactéries gram positif	104
Tableau 19: Effet dose réponse de l'inhibition de l'acétylcholinestérase	109
Tableau 20: Activité anti-radicalaire DPPH' d'extraits de <i>Striga hermonthica</i>	111
Tableau 21: CAR ₅₀ des extraits de <i>Striga hermonthica</i> et de la quercétine.....	112

Tableau 22:	Activité antiplasmodique du macéré hydro méthanolique.....	114
Tableau 23:	Corrélation entre teneurs en polyphénols et activité antiradicalaire....	118
Tableau 24:	Données spectrales du composé Sh1 et de la lutéoline témoin.	126
Tableau 25:	RMN du proton ¹ H de Sh2.....	127
Tableau 26:	RMN du proton ¹ H de Sh3.....	130
Chromatogramme 1:	Extrait hydro acétone 80% de <i>S. hermonthica</i>	75
Chromatogramme 2:	HPLC des acides phénols de l'extrait méthanol aqueux 80%.....	81
Chromatogramme 3:	HPLC des flavonoïdes de la fraction hexane.....	82
Chromatogramme 4:	HPLC des flavonoïdes de la fraction chloroforme.....	83
Chromatogramme 5:	HPLC des flavonoïdes de la fraction acétate d'éthyle.....	83
Chromatogramme 6:	Mise en évidence de molécules antimicrobiennes.....	105
Chromatogramme 7:	Activité anti DPPH des fractions de l'extrait hydro acétone	119
Chromatogramme 8:	Activité anti DPPH des sous fractions acétate d'éthyle.....	120
Chromatogramme 9:	Activité anti DPPH des sous fractions hexane.....	120

LISTE DES PHOTOS ET FIGURES

Photo 1: Pied de <i>Striga hermonthica</i> (Del.) dans un champ de Sorgho	15
Photo 2: Coupes histochimiques de tiges de <i>Striga hermonthica</i>	68
Figure 1: Molécules stimulantes de la germination des graines de <i>Striga</i> sp.....	5
Figure 2: Flavones isolées de quelques espèces de <i>Striga</i>	12
Figure 3: Distribution géographique de <i>Striga hermonthica</i> [Mohamed, 1994]	14
Figure 4: Métabolites secondaires non flavonoïdique isolées de <i>Striga hermonthica</i> .	17
Figure 5: Glucides et métabolites secondaires	19
Figure 6: Polyphénols dérivant du 1-phénylpropane et de ses dérivés d'extension....	20
Figure 7: Structures de quelques classes de flavonoïdes.....	22
Figure 8: Biosynthèse des flavonoïdes	23
Figure 9: Structures de quelques acides phénols couramment rencontrés	24
Figure 10: Biosynthèse des acides phénols.....	25
Figure 11: Paramètres HPLC à optimiser	46
Figure 12: Courbe d'étalonnage de dosage des polyphénols totaux	69
Figure 13: Courbe d'étalonnage de dosage des tanins.....	70
Figure 14: Courbe d'étalonnage de dosage des flavonoïdes.....	70
Figure 15: Profil en polyphénols des extraits de <i>Striga hermonthica</i>	73
Figure 16: Loi de distribution normale des points expérimentaux	77
Figure 17: Coefficients de régression du modèle obtenus par RML	78
Figure 18: Variations du CRF en fonction des paramètres expérimentaux.....	79
Figure 19: Méthode HPLC optimisée.....	80
Figure 20: Viabilité de la lignée A549 en fonction de la concentration d'extraits.....	92
Figure 21: Activité enzymatique en présence de la fraction hexane	107

Figure 22: Activité enzymatique en présence de la fraction chloroforme	108
Figure 23: Activité enzymatique en présence de la fraction acétate d'éthyle	108
Figure 24: Spectre UV/visible des molécules anti-radicalaires isolées	122
Figure 25: Structure de la Lutéoline (Sh1)	124
Figure 26: Spectre de masse IEMS du composé Sh1 dans le CD ₃ OD	124
Figure 27: Spectre RMN ¹³ C du composé Sh1 dans le CD ₃ OD	125
Figure 28: Spectre RMN ¹ H du composé Sh1 dans le CD ₃ OD	125
Figure 29: Structure de Sh2	127
Figure 30: Spectre de masse IEMS de Sh2 dans le CD ₃ OD	128
Figure 31: Spectre RMN ¹ H de Sh2 dans le CD ₃ OD	128
Figure 32: Structure de Sh3	129
Figure 33: Spectre IEMS de Sh3 dans le CD ₃ OD	130
Figure 34: Spectre RMN ¹ H de Sh3 dans le CD ₃ OD	131

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Selon les estimations de l'OMS, 80% de la population des pays en voie de développement recourt presque exclusivement à la médecine traditionnelle pour ses besoins de santé primaire. Au Burkina Faso, la médecine traditionnelle est essentiellement basée sur l'utilisation des plantes médicinales. En outre, les métabolites secondaires isolées de plantes médicinales servent parfois de précurseurs et/ou de modèles pour la synthèse de molécules thérapeutiques destinées à la médecine moderne. Ainsi, en 1984, 25% des prescriptions médicales au USA et au Canada dérivait de substances naturelles de plantes [Farnsworth, 1984]. Les plantes médicinales sont également utilisées comme insecticides à base de plantes et de la même manière, leurs métabolites secondaires sont mis en œuvre pour la synthèse de molécules insecticides plus efficaces et "écologiquement désirables" [Clement, 1990]. L'étude de l'innocuité, de l'efficacité biologique et de la phytochimie des plantes médicinales s'avère donc primordiale pour la valorisation de la médecine traditionnelle autant que pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques [Farnsworth, 1994] et insecticides de nouvelle génération [Clement, 1990].

Dans ce cadre, les Scrophulariaceae constituent un immense réservoir de composés thérapeutiques nouveaux [Li et al., 1997]. Leur potentiel antibactérien notamment Gram positif [Fernandez et al., 1996], anti-inflammatoire [Fernandez et al., 1998; Garcia et al., 1996; Jia et al., 1999; Smit et al., 2000], antiparasitaire [Simonsen et al., 2001; Weniger et al., 2001], analgésique [Vohora et al., 1997] et hépatoprotecteur [Saraswat et al., 1999] a été démontré. Des propriétés inhibitrices de l' α polymérase de l'ADN des eucaryotes [Hayashi et al., 1997], inhibitrices de la xanthine oxydase [Sweeney et al., 2001; Kong et al., 2000; Owen et Johns, 1999] et antiradicalaires [Mantle et al., 2000; He et al., 2000] ont également été mises en évidence. Les radicaux

INTRODUCTION

libres étant impliqués dans l'étiologie de bon nombre de désordres métaboliques (hypertension, cancer, diabète, athérosclérose, rhumatisme, maladie d'Alzheimer, cardiopathies...) [Halliwell et Gutteridge, 1990], la recherche d'antioxydants d'origine végétale, flavonoïdes et acides phénols notamment, connus pour leur fort potentiel antiradicalaire [Nijveldt et al., 2001; HO, 1992] connaît un regain d'intérêt.

Ce regain d'intérêt a suscité le développement de techniques chromatographiques aptes à l'identification et à la quantification des acides phénols et flavonoïdes dans les extraits végétaux. La HPLC-DAD sur colonnes en phase inversée s'est révélée être une méthode de choix pour l'analyse des polyphénols des plantes [Robbins, 2003]. En dépit de la pléthore de méthodes HPLC décrites dans la littérature, il n'en existe aucune à notre connaissance qui permette la séparation de tous les acides phénols et flavonoïdes de mélanges complexes comme le sont les extraits végétaux. Il est par conséquent opportun d'adapter les méthodes HPLC de la littérature aux besoins spécifiques de chaque séparation et aux conditions matérielles du laboratoire. L'optimisation des méthodes HPLC par l'utilisation de plans d'expériences est particulièrement indiquée à cet effet.

Au Burkina Faso, la famille des Scrophulariaceae est surtout représentée par le genre *Striga*; *Striga hermonthica* (Del.) Benth Scrophulariaceae étant l'espèce la plus répandue et la plus nuisible. C'est une herbacée semi parasite des cultures de sorgho (*Sorghum bicolor*) et du petit mil (*Pennisetum americanum*). De toutes les espèces du genre *Striga* rencontrées au Burkina Faso, *S. hermonthica* est de loin la plus combattue. En effet, il réduit sensiblement le rendement des récoltes de petit mil et de sorgho [FAO, 1987] dans les pays sahéliers. Quand on sait que ces céréales constituent la base de l'alimentation humaine au sahel, l'on comprend aisément l'acharnement des populations locales, des politiques ainsi que de la communauté scientifique des pays concernés à s'engager résolument pour l'éradication du *Striga*.

INTRODUCTION

Aussi, l'essentiel des travaux portant sur *S. hermonthica* traitent-ils de sa biologie et des méthodes de lutte visant son élimination des écosystèmes.

La nuisance du *Striga* ainsi que les efforts pour son éradication en sont arrivés à minimiser voire à occulter l'intérêt que cette plante parasite pourrait éventuellement représenter si ses potentialités biologiques et phytochimiques étaient mieux connues et exploitées. En effet, *S. hermonthica* est exploité sur le plateau central du Burkina Faso pour ses vertus thérapeutiques en médecine traditionnelle. Il est utilisé dans le traitement des ictères, des dermatoses, du paludisme ou des chéloïdes mais également comme insecticide et antibactérien [Nacoulma, 1996]. De même, certaines espèces du genre *Striga*, également parasites, ont montré expérimentalement des propriétés contraceptives [Hiremath et al., 1990; Hiremath et al., 1994 et Hiremath et al., 1997], antihistaminiques [Harish et al., 2001], antimicrobiennes [Hiremath et al., 1997] et antiradicalaires [Badami et al., 2003]. La phytochimie des espèces du genre *Striga*, autres que *S. hermonthica*, est également assez bien connue, notamment pour ce qui concerne leur composition en flavonoïdes. En revanche, les caractéristiques phytochimiques ainsi que les propriétés biologiques de *S. hermonthica* ont été par contre moins investiguées.

Striga hermonthica est certes une plante parasite facteur d'insécurité alimentaire qui à ce titre doit être combattue. Toutefois, les propriétés qui lui sont attribuées dans les pratiques médicales et usages traditionnels, les activités biologiques avérées de Scrophulariaceae rapportées dans la littérature, ainsi que sa composition probable en molécules d'intérêt biologique et pharmacologique nous amènent à nous intéresser à sa phytochimie et à ses propriétés biologiques.

L'objectif général de ce travail est l'étude des polyphénols de *Striga hermonthica* et l'évaluation de ses potentialités comme plante à usage médicinale et insecticide.

INTRODUCTION

Plus spécifiquement ces études vont consister à:

1. Identifier les groupes de composés chimiques des extraits et doser les polyphénols.
2. Optimiser une méthode HPLC pour l'analyse des acides phénols et flavonoïdes.
3. Identifier les flavonoïdes des extraits de la plante.
4. Evaluer la toxicité aiguë et la cytotoxicité de l'extrait hydro méthanolique.
5. Evaluer les propriétés biologiques de différents extraits de la plante.
6. Isoler et identifier les molécules responsables de l'activité antiradicalaire.

Le document s'articulera autour de trois grandes parties.

La première partie est consacrée à la revue bibliographique dans laquelle plusieurs points sont traités. Les connaissances actualisées sur la phytochimie et les propriétés biologiques des espèces du genre *Striga* sont exposées avec un accent particulier sur les aspects ethnobotaniques de *Striga hermonthica*. La classification et la biosynthèse des acides phénols et flavonoïdes, ainsi que leur importance pour les systèmes biologiques sont discutés. Enfin, après une brève introduction sur les méthodes HPLC de séparation des acides phénols et flavonoïdes, l'approche dite du "plan d'expérience" est présentée comme outil d'optimisation permettant d'optimiser les conditions expérimentales pour une séparation chromatographique de qualité.

La deuxième partie du document traite des matériels et méthodes utilisés pour l'étude expérimentale. Les méthodes de criblage phytochimique et biologique, de dosage des polyphénols, d'isolement et d'identification des molécules antiradicalaires de *Striga hermonthica* sont décrites. L'optimisation de la méthode HPLC qui servira à l'analyse chromatographique des acides phénols et flavonoïdes est exposée.

La troisième partie est consacrée à l'analyse et à la discussion des résultats expérimentaux obtenus au cours de l'étude.

1^{ère} partie: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. PRESENTATION DU GENRE *STRIGA* Lour.

I.1. ESPECES HEMIPARASITES

Le genre *Striga* Lour. appartient à la famille des Scrophulariaceae qui comporte environ 250 genres pour 5000 espèces [Kamal et al., 1996]. Il regrouperait 41 espèces [Raynal-roques, 1996] (chiffre variable selon les auteurs). Les espèces du genre *Striga* sont des hémiparasites obligatoires. Ce sont des plantes annuelles qui, bien que pourvues de chlorophylle, ont néanmoins besoin d'une plante hôte pour compléter leur cycle de développement [Musselman, 1987]. La germination des graines de *Striga* sp. nécessite la sécrétion de médiateurs chimiques par les racines de la plante hôte [Parker et Riches, 1993]. Ce sont généralement des lactones sesquiterpéniques, les plus connus étant le strigol, l'alectrol, le sorgolactone et le dihydrosorgoleone (figure 1).

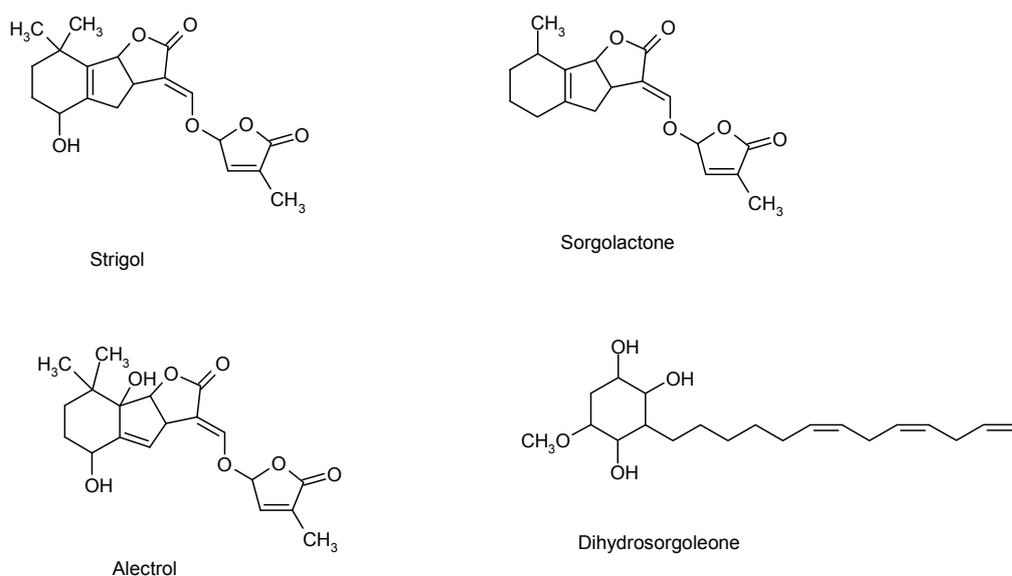


Figure 1: Structure de molécules stimulantes de la germination des graines de *Striga* sp.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE: Présentation du genre *Striga* Lour.

Le genre *Striga* est distribué partout en Afrique. Parmi les espèces identifiées, 11 au moins sont des parasites des cultures vivrières (céréales, légumineuses...) dont 5 constituent une menace économique sérieuse pour l'agriculture en Afrique [Raynal-roques, 1996; Parker et Riches, 1993; Ramaih et al., 1983]. Par ordre d'importance économique, nous citerons: *Striga hermonthica* (Del.) Benth., *Striga asiatica* (L.) Kuntze, *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke, *Striga aspera* (Willd.) Benth. et *Striga forbesii* Benth. *Striga gesnerioides* parasite uniquement les légumineuses comme le niébé, les autres espèces parasitant les céréales comme le sorgho, le mil, le maïs et le riz. La FAO estime que *Striga hermonthica* à lui seul fait perdre 40% des rendements céréaliers en Afrique, soit environ 7 milliards de dollar US par an. Le déficit céréalier et économique est encore plus important dans le sahel où les céréales constituent la base de l'alimentation humaine. De la dizaine d'espèces de *Striga* rencontrées au Burkina Faso, *Striga hermonthica* est la plus importante en terme de distribution et d'impact économique [Boussim, 2002].

I.2. PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES

Les espèces du genre *Striga* Lour. ont largement été étudiées pour leurs propriétés contraceptives. Des activités antimicrobiennes, antioxydantes, anti-protozoaires et anti-histaminiques ont également été rapportées (Tableau 1).

I.2.1. Contraceptif et abortif

Il a été montré que *Striga hermonthica* provoque des contractions du muscle lisse utérin de rattes, qui empêcheraient toute nidation en début de gestation. Cependant, les molécules responsables de l'activité contraceptive de *S. hermonthica* n'ont pas encore pas été à ce jour identifiées ni isolées. *S. asiatica* et *S. orobanchioides* présentent des

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE: Présentation du genre *Striga* Lour.

propriétés contraceptives et abortives. A dose contraceptive, *S. orobanchioides* exercerait un effet oestrogénique. En effet, chez le jeune rat mâle, *S. orobanchioides* provoque un effet anti androgénique ayant pour conséquences une réduction du nombre de spermatoocytes et de spermatides ainsi qu'une dégénérescence des cellules de Leidig. En ce qui concerne *S. asiatica* et *S. orobanchioides*, les activités contraceptives et abortives ont été expérimentalement attribuée à la lutéoline et à l'apigénine.

I.2.2. Antimicrobien

Plusieurs espèces du genre *Striga* ont montré des propriétés antimicrobiennes. Le champignon *Aspergillus niger*, les bactéries gram positif *Staphylococcus aureus* et gram négatif *Pseudomonas aeroginosas* et *Escherichia coli* sont sensibles à des extraits de *S. orobanchioides* et de *S. sulfurea*. L'extrait éthanolique de *S. hermonthica* a également montré des propriétés antibactériennes et antifongiques.

I.2.3. Antioxydant

Striga orobanchioides a montré expérimentalement une activité antiradicalaire DPPH^{*} (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) ainsi qu'une réduction de la production d'oxyde nitrique (responsable *in vivo* d'un stress oxydatif dommageable à l'organisme). L'activité antioxydante de *S. orobanchoides* se traduit par l'augmentation de la catalase hépatique.

I.2.4. Anti-histaminique

L'extrait éthanolique de *Striga orobanchioides* inhibe *in vitro* l'activité de l'histamine ainsi que la dégranulation des mastocytes *in vivo*. Cette plante serait donc active contre les allergies de type I. L'apigénine et la lutéoline seraient au moins en partie responsables de cette activité.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE: Présentation du genre *Striga* Lour.

I.2.5. Anti-protazoaire

L'extrait méthanolique de *S. hermonthica* a montré *in vitro* une faible activité antiplasmodique à l'encontre de la souche chimio résistante K1 de *Plasmodium falciparum*. *In vivo*, le même extrait inhibe la prolifération de *Plasmodium berghei* sur modèle animal.

Tableau 1: Propriétés pharmacologiques de quelques espèces du genre *Striga*

Propriétés pharmacologiques	<i>Striga</i> sp.	Références bibliographiques
Contraceptif Abortif	<i>Striga hermonthica</i>	Hiremath et al., 2000
	<i>Striga asiatica</i>	Hiremath et al., 1997
	<i>Striga orobanchioides</i>	Hiremath et al., 1994
	<i>Striga orobanchioides</i>	Hiremath et Rao, 1990
	<i>Striga orobanchioides</i>	Hiremath et al., 1990
Antioxydant	<i>Striga orobanchioides</i>	Choudhury et al., 1998 (a)
	<i>Striga orobanchioides</i>	Choudhury et al., 1998 (b)
Antimicrobien	<i>Striga orobanchioides</i>	Badami et al., 2003
	<i>Striga hermonthica</i>	Hussain et Deeni, 1991
	<i>Striga sulphurea</i>	Hiremath et al., 1997
	<i>Striga densiflora</i>	Hiremath et al., 1996
Anti-histaminique	<i>Striga orobanchioides</i>	Hiremath et al., 1996
Anti-protazoaire	<i>Striga orobanchioides</i>	Harish et al., 2001
	<i>Striga hermonthica</i>	Okpako et Ajaiyeoba, 2004

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE: Présentation du genre *Striga* Lour.

I.3. ELEMENTS DE PHYTOCHIMIE

La revue bibliographique sur la phytochimie des espèces du genre *Striga* Lour. est résumée dans le tableau 2.

Tableau 2: Métabolites secondaires isolées et identifiées du genre *Striga*

Molécules	<i>Striga</i> sp.	Références Bibliographiques
<u>FLAVONES</u>		
Apigénine Lutéoline	<i>Striga orobanchioides</i>	Hiremath et al., 2000
Apigénine 5-hydroxy-6,8-diméthoxyflavone 7,4'-O-diglucoside	<i>Striga hermonthica</i>	Choudhury et al., 2000 Khan et al., 1998
Scutellaréine Striga flavone Pectolinarigénine Striga flavone 7-O-Glc Striga flavone 7-O-Glc-Rha-Ac	<i>Striga passargei</i>	Aquil, 1995 Aquil et al., 1996
Salvigénine Pectolinarigénine Salvigénine 5-O-Gal-Glc-Ac Cirsimiaritin 5-O-Gal	<i>Striga aspera</i>	Aquil et al., 1994 Aquil et Khan, 1993

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE: Présentation du genre *Striga* Lour.

Tableau 2 suite: Métabolites secondaires isolées et identifiées du genre *Striga*

Molécules	<i>Striga</i> sp.	Références Bibliographiques
<u>FLAVONES</u>		
Lutéoline		
Apigénine		
Acacétine		Nakanishi et al., 1985
Chrysoériol	<i>Striga asiatica</i>	Hiremath et Hanumantharao, 1997
7-Méthyl ether acacétine		
7,4'-diméthyl ether scutellaréine		Ramesh et Yuvarajan, 1992
3',4'-diméthyl ether lutéoline		
7,3',4'-triméthyl ether lutéoline		
<u>ALCALOÏDES</u>		
Venoterpène	<i>Striga hermonthica</i>	Baoua et al., 1980
Alcaloïdes stéroïdiques	<i>Striga asiatica</i>	Aziz et Marziah, 1993
<u>IRIDOÏDES</u>		
Acide mussaénosidique	<i>Striga hermonthica</i>	Rank et al., 2004
Acide mussaénosidique	<i>Striga asiatica</i>	Rank et al., 2004
Isoaucubine	<i>Striga gesnerioides</i>	
<u>PHYTOSTÉROLS</u>		
Sitostérol	<i>Striga aspera</i>	Ramesh et Yuvarajan, 1992
	<i>Striga asiatica</i>	
	<i>Striga gesnerioides</i>	Rugutt et al., 1996
	<i>Striga hermonthica</i>	

Comme le montre le tableau 2, les investigations phytochimiques menées jusqu'à ce jour sur les espèces de *Striga* sp. ont essentiellement porté sur les flavonoïdes et accessoirement sur les iridoïdes, alcaloïdes et phytostérols.

I.3.1. Flavonoïdes

La bibliographie relative aux flavonoïdes du genre *Striga* fait uniquement état de l'isolement et de l'identification de flavones. Les flavones identifiées sont des dérivés méthyléther de la lutéoline, de l'apigénine et de la scutellaréine et sont rencontrées sous forme de génines ou d'hétérosides. La méthylation (mono, di ou triméthyléther) concerne préférentiellement les positions 3', 4', 5, 6 et 7. L'unité osidique, constituée de glucose de rhamnose ou de galactose, est branchée par une liaison O-hétéroside sur les carbones 5, 7 ou 4' de l'aglycone flavonique. La lutéoline, l'apigénine, l'acacétine, le chrysoeriol et la pectolinarigénine ne sont rencontrés que sous forme de génines libres ou méthoxylées. La salvigénine, la scutellaréine et le striga flavone quant à eux ont été isolés sous forme de génine libre mais aussi sous forme d'hétéroside. Par contre, la cirsimiaritin n'est rencontrée que sous sa forme hétérosidique. L'apigénine et le 5-hydroxy-6,8-diméthoxyflavone 7,4'-O-diglucoside ont été isolés de *S. hermonthica*. La figure 2 donne la structure des flavonoïdes (flavones) isolées de quelques espèces du genre *Striga*.

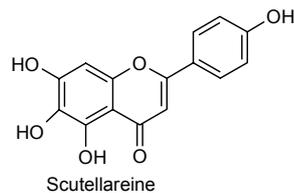
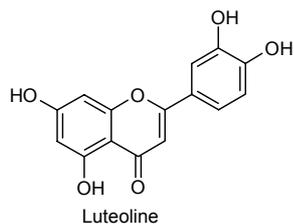
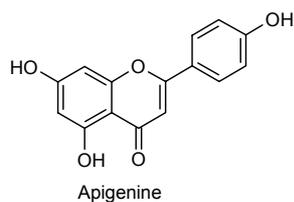
I.3.2. Iridoïdes

L'acide mussaenosidique est rencontré dans les extraits de *Striga hermonthica*, *S. asiatica* et de *S. gesnerioides*. Pour les 2 dernières espèces citées, la littérature signale aussi la présence de l'isoaucubine.

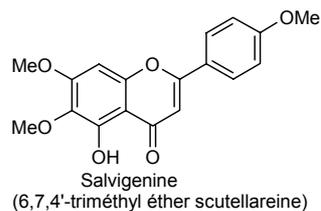
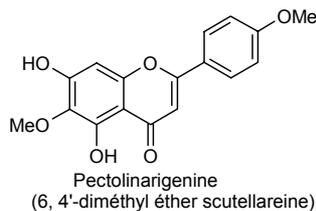
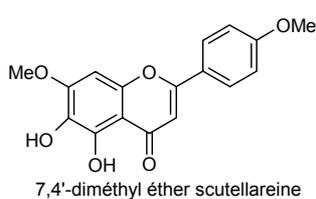
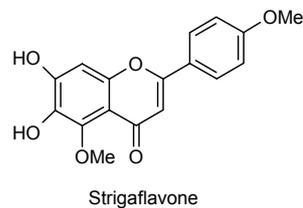
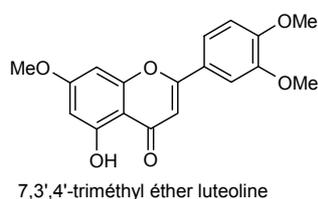
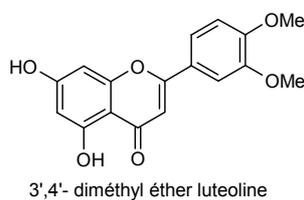
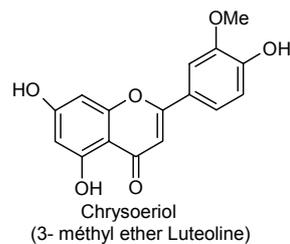
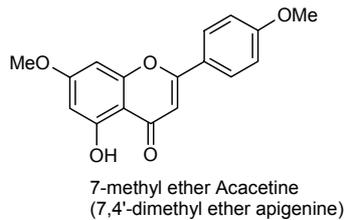
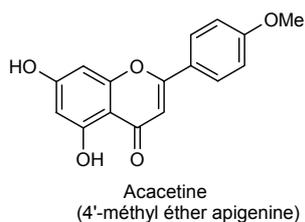
I.3.3. Alcaloïdes et Phytostérols

Des alcaloïdes stéroïdiques et pyridiniques (venoterpine) ont été respectivement isolés de *Striga asiatica* et de *S. hermonthica*. Le sitostérol a été identifié dans les parties aériennes de *S. asiatica* ainsi que dans les graines de *S. aspera*, *S. hermonthica* et de *S. gesnerioides*.

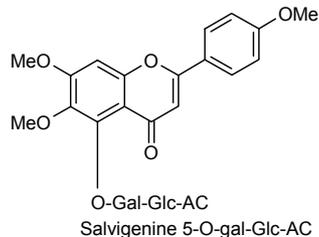
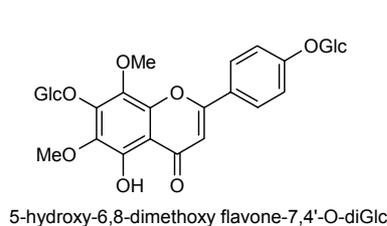
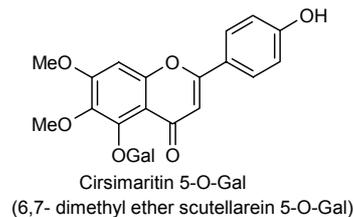
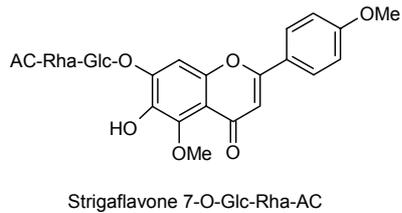
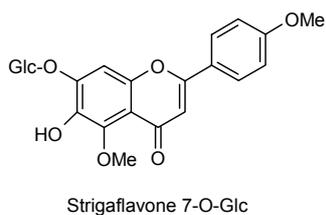
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE: Présentation du genre *Striga* Lour.



GENINES



GENINES METHYLEES



HETEROSIDES

Figure 2: Flavones isolées de quelques espèces de *Striga*

I.4. **STRIGA HERMONTHICA (DEL) BENTH.**

I.4.1. **Systématique**

Embranchement des Spermaphytes

Sous-embranchement des Angiospermes

Classe des Dicotylédones

Sous classe des Asteridae

Ordre des Scrophulariales

Famille des Scrophulariaceae

Genre: *Striga* Lour

Espèce: *Striga hermonthica* (DEL) Benth.

Synonyme : *Striga senegalensis* Benth.

Noms vernaculaires : Mooré : Waongo

Jula : Signin

I.4.1. **Distribution**

Striga hermonthica est rencontré partout au nord de l'Afrique tropicale (Figure 3). Il pousse sur les sols sableux et rudéraux. Les peuplements sauvages s'étendent des régions semi arides d'Ethiopie et du Soudan aux régions de savanes humides de l'Afrique de l'ouest et du bassin du lac Victoria à l'est. On les rencontre également au sud ouest de l'Arabie, au sud de l'Angola et de la Namibie [Musselman et al., 1991; Mohamed, 1994]. *Striga hermonthica* parasite principalement les racines des pieds de céréales au champ; notamment de Sorgho (*Sorghum caudatum*) et de petit mil (*Pennisetum americanum*). Cette espèce attaque également certaines graminées sur des terrains pauvres en jachère; nous citerons entre autres *Rottboelia cochinchinensis*, *Eleusine indica*, *Paspalum*

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE: Présentation du genre *Striga* Lour.

scrobiculatum, et *Cymbopogon* sp. Pour des raisons inconnues la persistance des pieds de *Striga hermonthica* sur les champs en jachère peuplés par les herbes sauvages sur cités ne dure que quelques années; excepté à certains endroits du Soudan et d'Ethiopie.

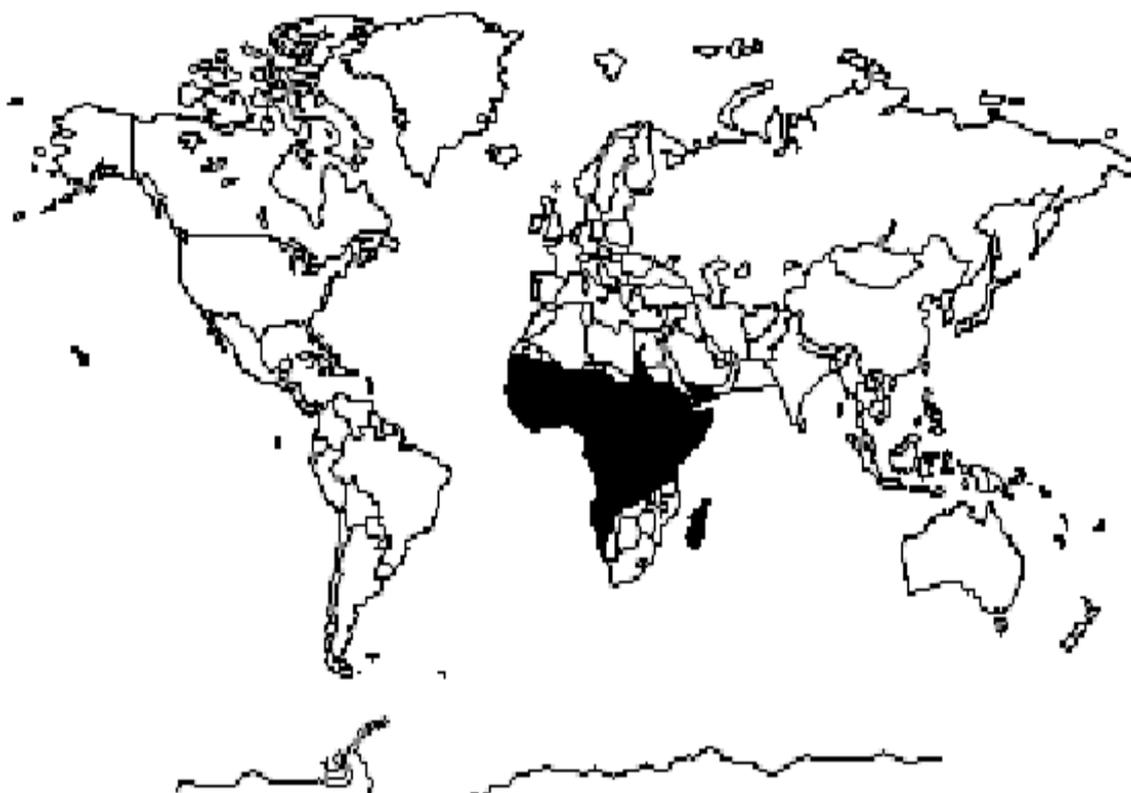


Figure 3: Distribution géographique de *Striga hermonthica* [Mohamed, 1994]

I.4.2. Description

Striga hermonthica (Del.) Benth. est une herbacée semi parasite poussant sur les racines de sorgho ou de petit mil (Photo 1). Elle a une hauteur moyenne de 30 à 40 cm qui peut atteindre, voire excéder 100 cm. Les tiges, de structure quadrangulaire et fibreuse

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE: Présentation du genre *Striga* Lour.

sont velues et robustes. Les feuilles sont simples, dressées, scabres, linéaires ou elliptiques. Leur taille est comprise entre 2,5 et 7,5 cm de long pour une largeur maximale de 2 cm. Les fleurs sont en grappes dressées; chaque grappe portant généralement 6 à 10 fleurs. Chaque fleur a un diamètre de 1 à 2 cm avec un calice de 4 à 5 côtés. La couleur des fleurs habituellement rose vif peut varier de rose rouge à rose claire. Des fleurs complètement blanches ont été observées [Mohamed, 1994]. On note une grande variabilité dans la plupart des caractères morphologiques sur cités. La multiplication de la plante se fait par graines.



Photo 1: Pied de *Striga hermonthica* (Del.) dans un champ de Sorgho

I.4.3. Lutte contre le *Striga*

Diverses techniques sont utilisées pour lutter contre *Striga hermonthica*. Des méthodes traditionnelles de lutte comme le recours aux herbicides et techniques culturales [Ouedraogo, 1992] sont couramment pratiquées. Des méthodes plus ou moins innovatrices de lutte biologique intégrée (entomologique et microbiologique,) sont également envisagées. Ainsi, *Smicronyx guineanus* Voss et *Smicronyx umbrinus* Hustache (Coleoptera: Curculionidae) seraient potentiellement utiles pour leur parasitisme envers *S. hermonthica* [Traoré et al., 1996]. De même *Fusarium nygamai*, un champignon parasite facultatif réduirait la germination des graines de *S. hermonthica* [Sauerborn, 1996].

I.4.4. Utilisation traditionnelle

Les tiges feuillées de *S. hermonthica* sont utilisées en ethnomédecine humaine sur le plateau central du Burkina Faso [Nacoulma, 1996]. En usage interne ou externe, il est indiqué dans les cas de lèpre, de dermatose, de chéloïdes, jaunisse, coliques, rétention placentaire, ballonnement intestinal et ulcère gastro duodéal. Il agirait également comme dépuratif, cholagogue, antifongique, antibactérien, antiseptique, spasmolytique, cicatrisant et vulnérable. *S. hermonthica* serait utilisée pour ses propriétés laxatives au Niger [Baoua, 1980], contre les empoisonnements et intoxications alimentaires au Ghana [Dalziel, 1937] et comme abortif en Afrique australe [Choudhury et al., 1998a, 1998b]. La plante entière est utilisée en ethnopharmacopée vétérinaire pour le traitement de bovins souffrant de météorisation [Tamboura et al., 1998]. En outre, *S. hermonthica* est utilisée par les populations rurales de l'état de Kano (Nigeria) comme insecticide pour préserver les récoltes [Abubakar et Abdurahaman, 1998]. L'utilisation comme insecticide ou insectifuge a été également rapportée par Kerharo [Kerharo et Adam, 1974].

I.4.5. Phytochimie

En plus de l'apigénine et de la 5-hydroxy-6,8-diméthoxy flavone-7,4'-O-diglucoside isolés de *Striga hermonthica* [Choudhury et al., 2000; Khan et al., 1998] les différents auteurs y signalent la présence du sitostérol [Rugutt et al., 1996], de la venoterpine [Baoua, 1980], des acide mussaenosidique et Shikimique [Rank et al., 2004] dont les structures sont représentées par la figure 4.

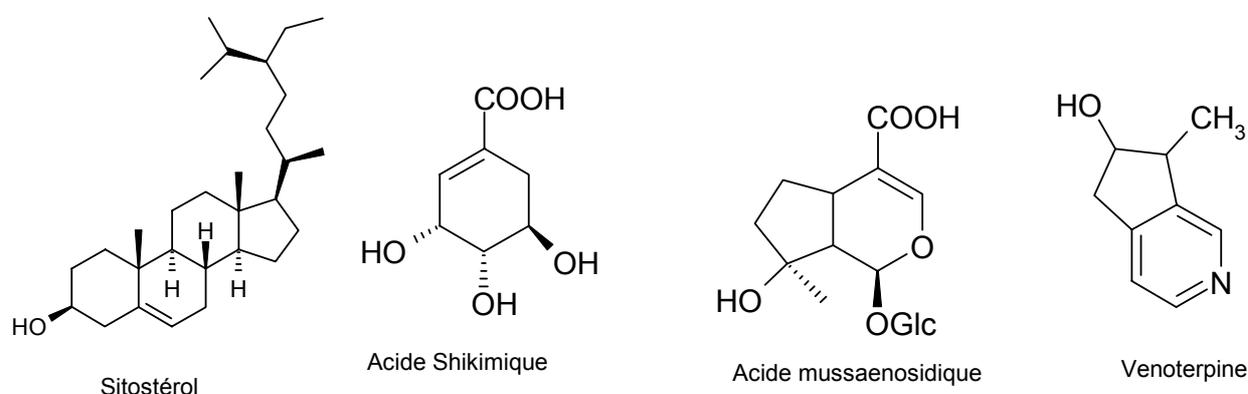


Figure 4: Métabolites secondaires non flavonoïdique isolées de *Striga hermonthica*

II. COMPOSES POLYPHENOLIQUES DES PLANTES

II.1. GENERALITES

La biosynthèse et l'accumulation des métabolites secondaires des plantes notamment des composés polyphénoliques est un processus endogène commandé par le développement de la plante [Macheix et al., 1990, Strack 1997]. Toutefois elle peut être réglée par des facteurs exogènes tels que la lumière, la température et les diverses agressions extérieures [Bennet et Wallsgrove 1994, Dixon et Paiva 1995]. Les travaux entrepris depuis 1968 à nos jours par Harborne et Collaborateurs, font référence à trois grandes voies de formation de métabolites secondaires d'origine végétale: la voie des polyphénols, la voie de l'azote et la voie des terpènes et stéroïdes. Elles dérivent toutes des produits du catabolisme des glucides (Figure 5). Ces voies de biosynthèse aboutissent respectivement aux composés phénoliques, aux alcaloïdes et aux composés terpéniques et stéroïdiques. Les polyphénols forment un vaste ensemble de métabolites secondaires largement répandu au niveau du règne végétal [Bruneton, 1993; Haslam, 1998]. Les voies de biosynthèse des polyphénols des plantes sont bien connues [Haddock et al., 1982, Harborne et Grayer, 1988, Macheix et al., 1990, Dixon et Paiva, 1995, Strack, 1997]. Les composés polyphénoliques sont définis selon un double critère chimique et bio synthétique comme étant des "dérivés non azotés dont le ou les cycles aromatiques sont principalement issus du métabolisme du shikimate ou/et d'un polyacétate" [Bruneton, 1993]. Cette définition exclut ainsi d'emblée de nombreux alcaloïdes et composés terpéniques possédant dans leur structure le groupement phénol libre ou fonctionnalisé. Au nombre des composés polyphénoliques des plantes, on retrouve les dérivés du 1-

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE: Composés polyphénoliques des plantes

phénylpropane et ses dérivés d'extension que sont les flavonoïdes "*lato sensus*", les acides phénols, quinones, coumarines et lignanes (figure 6).

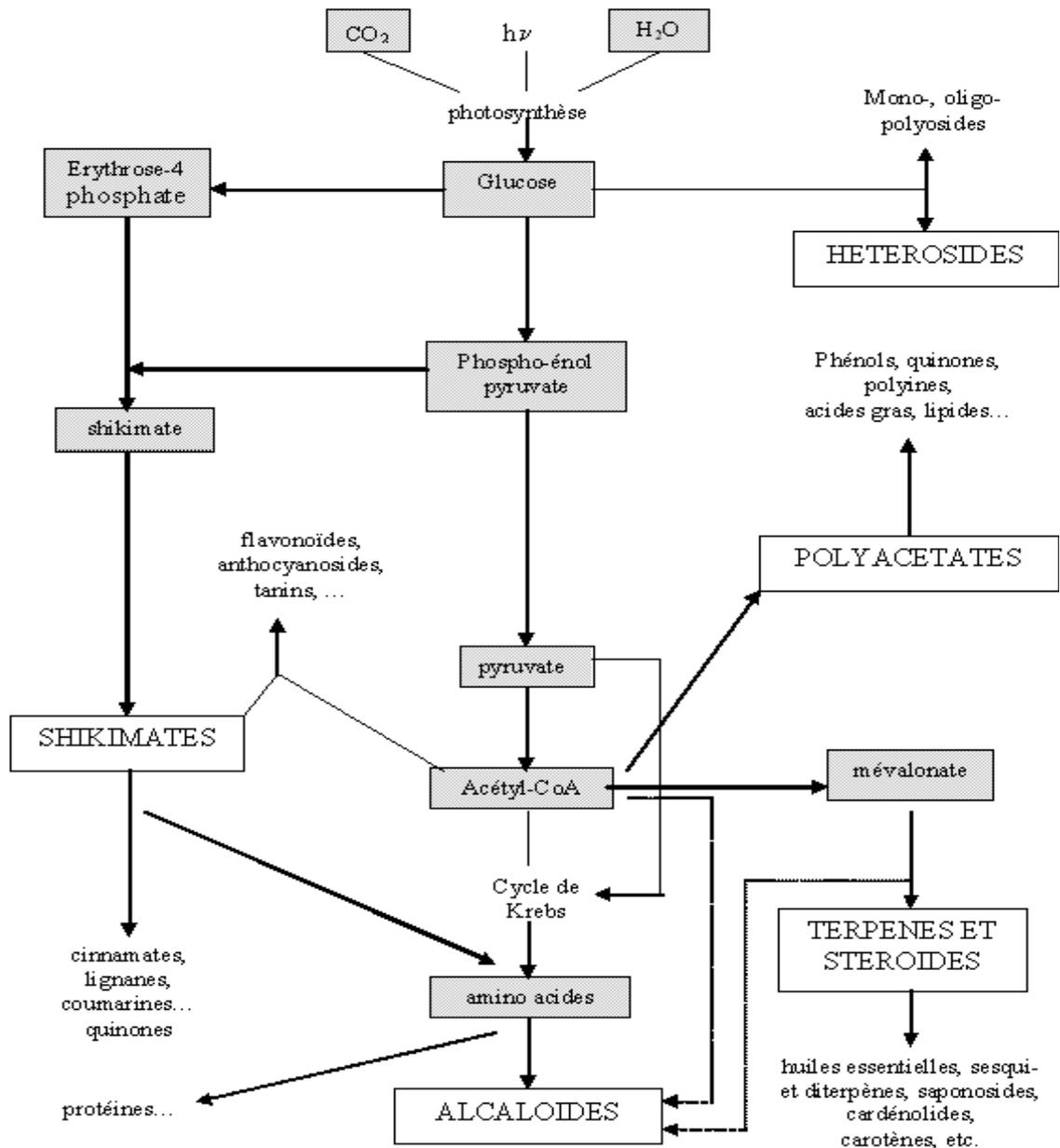


Figure 5: Glucides et métabolites secondaires [Bruneton, 1993]

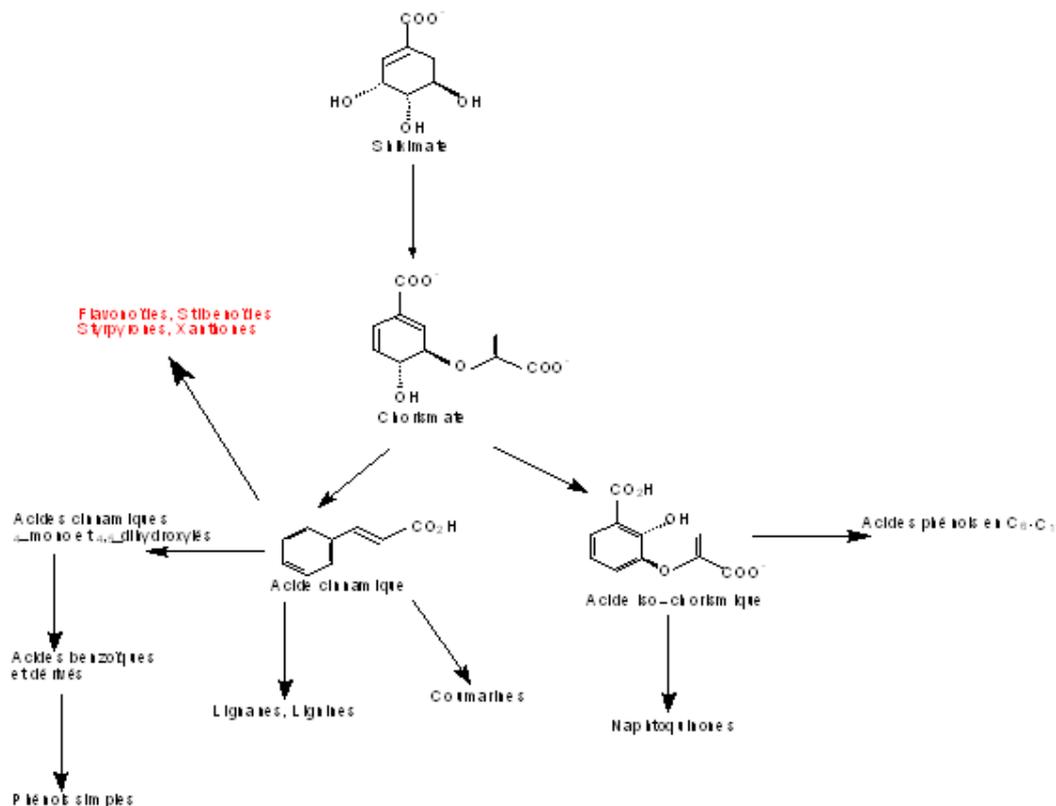


Figure 6: Polyphénols dérivant du 1-phénylpropane et de ses dérivés d'extension

II.2. FLAVONOÏDES

Plus de 4000 structures ont été décrites et ce nombre est sans cesse en constante augmentation [Middleton et al., 2000, Haslam 1998]; preuve de leur grande diversité structurale.

II.2.1. Structures et classification

Les flavonoïdes existent sous la forme d'aglycones ou d'hétérosides. Ils sont libres (groupements hydroxyles libres) ou méthylés. Des flavonoïdes isoprénylés ont également

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE: Composés polyphénoliques des plantes

été mis en évidence, leur distribution est cependant plus restreinte [Barron et Ibrahim, 1996]. Du fait de leur origine biosynthétique commune, les flavonoïdes possèdent le même élément structural de base à savoir un noyau benzo- γ -pyrone substitué en position 2 ou 3 par un groupement phényle [Di Carlo et al., 1999]. On parle aussi de squelette diphenylpyran (C6-C3-C6) c'est-à-dire deux noyaux benzénique (A et B) lié par un noyau hétérocyclique pyran ou pyrone (C) au milieu. La structure des différentes classes de flavonoïdes est donnée par la figure 7. On distingue les flavonoïdes "stricto sensu" (dérivés du 2-phényl benzo- γ -pyrone) des isoflavones (dérivés du 3-phényl benzo- γ -pyrone). Les flavonoïdes peuvent être regroupés selon le degré d'oxydation du cycle pyranique central [Bruneton, 1993] en:

- Anthocyanes (2-phénylbenzopyrilium)
- Flavones, flavonols, flavanones, dihydroflavonols et dérivés (2-phénylchromones)
- Flavanes, flavan-3-ols, flavan-3,4-diols (2-phénylchromanes)
- Chalcones et dihydrochalcones (cycle pyranique ouvert)
- Aurones (2-benzylidène coumarones)
- Isoflavonoïdes: isoflavones, isoflavanones (3-phénylchromanes)

II.2.2. Biosynthèse

La biosynthèse des flavonoïdes procède de la combinaison de deux voies métaboliques; celles du shikimate et de l'acypolymalonate. L'étape clé est la condensation enzymatique (chalcone synthétase) de 3 molécules de malonyl-CoA avec l'ester d'un acide hydroxycinanique et du Coenzyme A, généralement le p-coumaroylCoA. Cette étape conduit à la formation d'une chalcone, la 2', 4', 6', 4 tétrahydroxychalcone. Une cyclisation stéréospécifique du chalcone induite par la chalcone isomérase conduit à une flavanone

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE: Composés polyphénoliques des plantes

qui est ensuite transformée en flavone sous l'action de la flavone synthétase (figure 8). La chalcone peut également conduire aux aurones. La biosynthèse des flavanones semble être un carrefour à partir duquel se forment les autres classes de flavonoïdes. En effet, des réactions enzymatiques d'hydroxylation et de réductions sur la flavanone conduisent aux autres classes de flavonoïdes [Samuelsson, 1993]. La figure 8 schématise les relations existant entre les différentes classes de flavonoïdes au cours de leur biosynthèse.

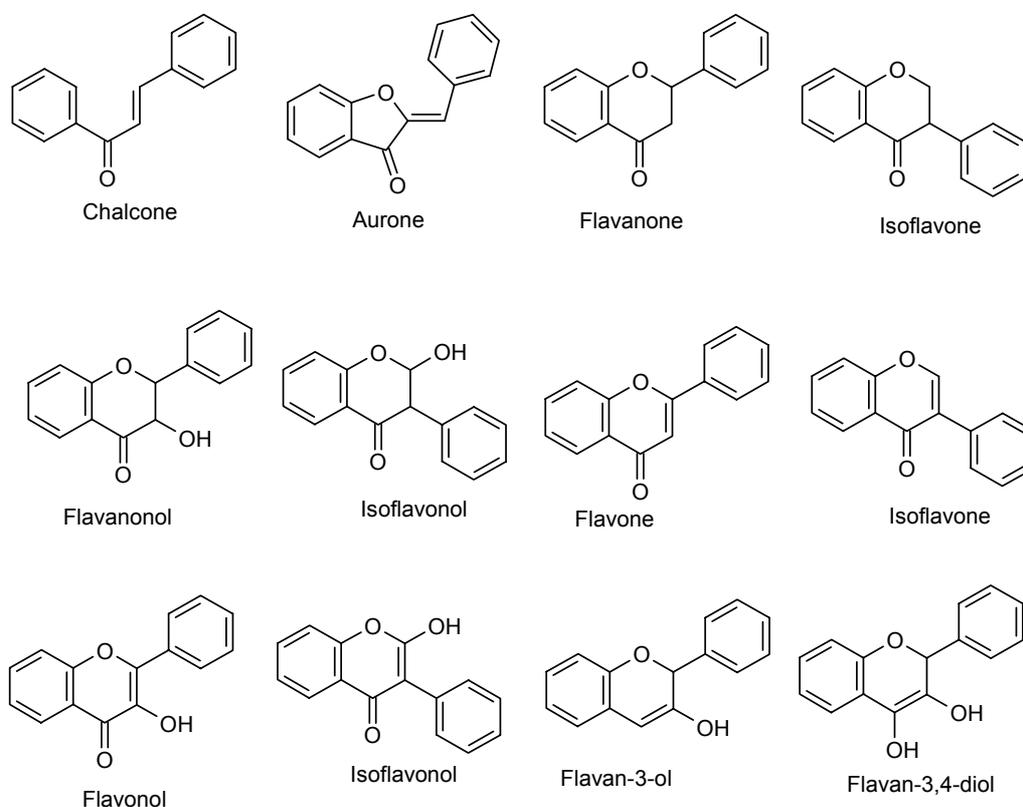


Figure 7: Structures de quelques classes de flavonoïdes

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE: Composés polyphénoliques des plantes

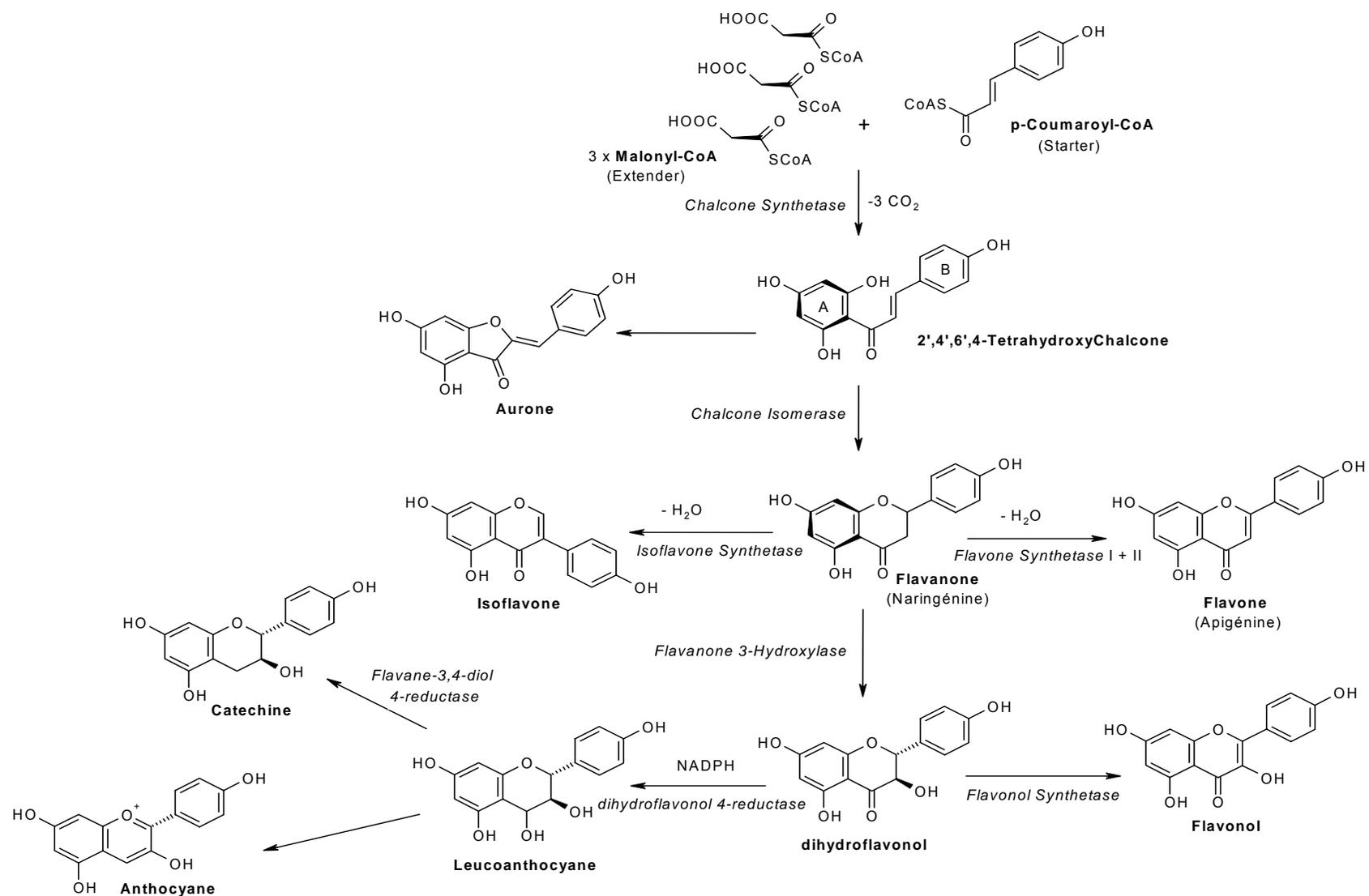


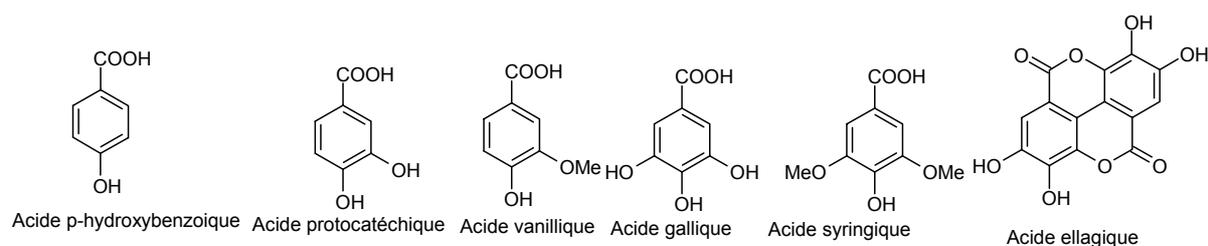
Figure 8: Biosynthèse des flavonoïdes

II.3. ACIDES PHENOLS

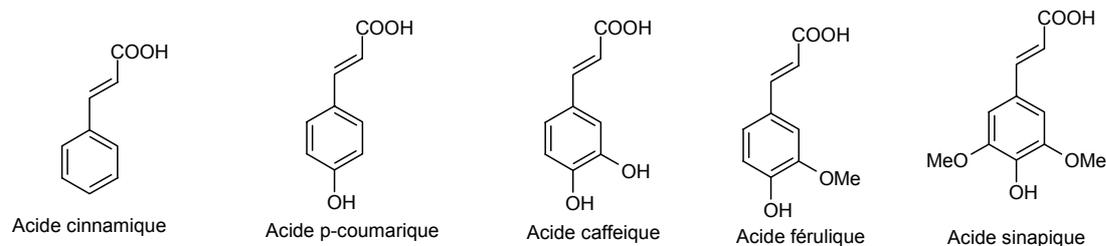
Les acides phénols connaissent une plus grande homogénéité structurale que les flavonoïdes.

II.3.1. Structures et classification

On distingue les acides hydroxycinnamiques (dérivés C₆-C₃) des acides hydroxybenzoïques (dérivés C₆-C₁). La diversité structurale des acides phénols est liée aux méthylations et hydroxylations du noyau aromatique [Macheix et al., 1990] comme le montre la figure 9. Les acides phénols existent aussi bien sous forme libre qu'estérifiée ou hétérosidique. Ils sont solubles ou insolubles liés à la lignine des parois cellulaires [Strack, 1997]. Les acides hydroxycinnamiques sont rarement rencontrés sous forme libre; on les retrouve plutôt sous la forme d'esters des acides quinique, tartrique et shikimique mais également d'ester ou d'éther du glucose [Shahidi et Nacz 1995].



Dérivés de l'acide hydroxybenzoïque



Dérivés de l'acide hydroxycinnamique

Figure 9: Structures de quelques acides phénols couramment rencontrés

II.3.2. Biosynthèse des acides phénols

La phénylalanine, produit de la voie du shikimate, est le précurseur commun de la plus part des acides phénols des plantes supérieures [Macheix et al. 1990; Strack, 1997]. La figure 10 résume les étapes clés de la biosynthèse des acides phénols. Il existerait au moins 2 voies conduisant aux acides hydroxybenzoïques. L'acide gallique par exemple dérive directement de la voie du shikimate quand les acides benzoïque et salicylique sont des produits de la dégradation des acides hydroxycinnamiques [Macheix et al. 1990, Strack, 1997].

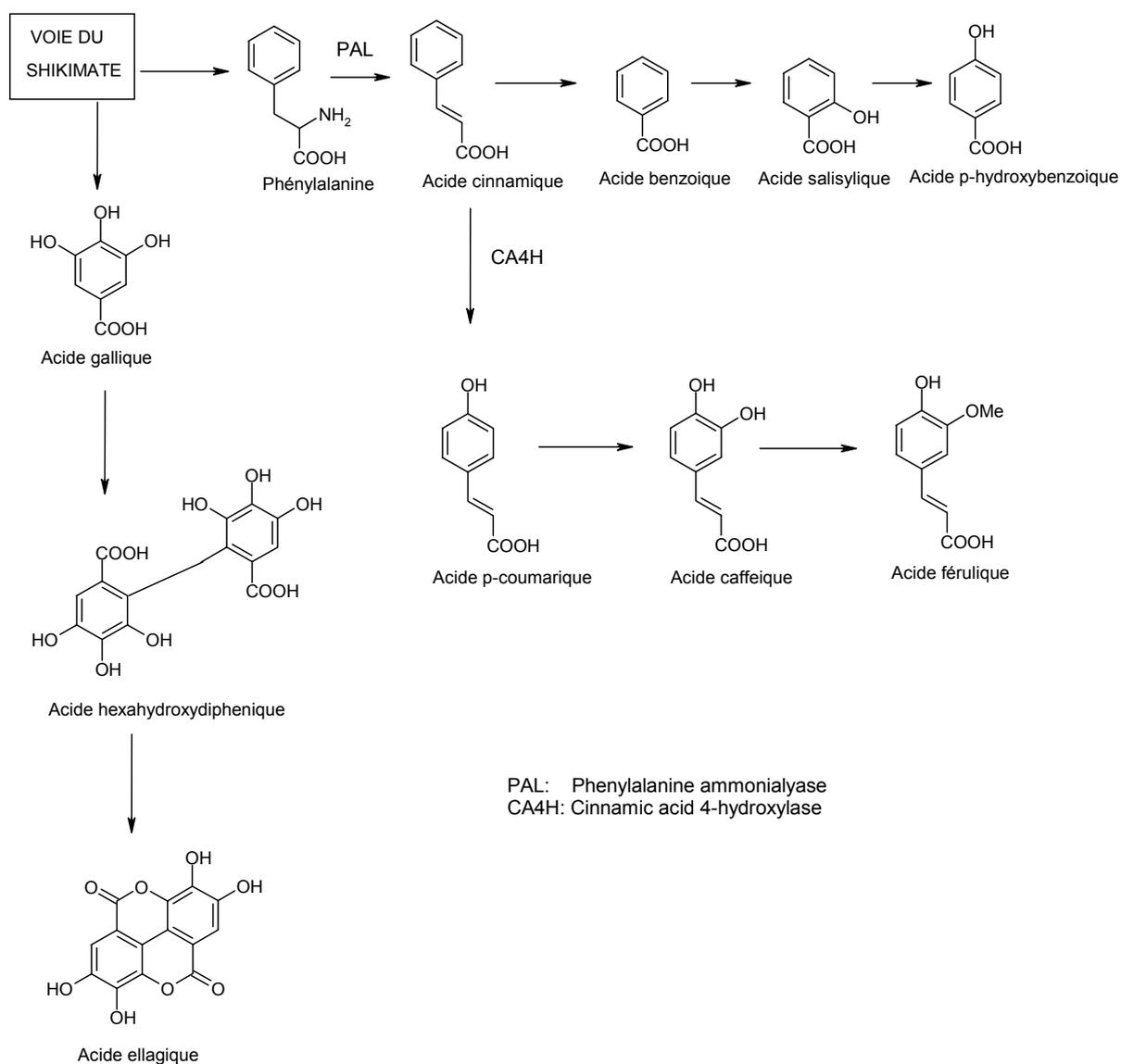


Figure 10: Biosynthèse des acides phénols [Häkkinen S., 2000]

II.4. IMPORTANCE DES FLAVONOÏDES ET ACIDES PHÉNOLS

Les métabolites secondaires des plantes constituent une source inestimable et variée pour la couverture des besoins de santé (humaine et animale) et de conservation des produits agricoles. Ce qui justifie leur importance comme alternative de choix aux molécules de synthèse écologiquement non désirables. Toutefois, "la raison d'être" première de ces molécules naturelles serait la satisfaction des besoins propres de la plante. Les flavonoïdes jouent ainsi un rôle très important sur la physiologie de la plante ainsi que sur les interactions entre la plante et les systèmes biotiques et abiotiques environnementaux. L'exploitation des composés polyphénoliques d'origine végétale par l'homme découle donc par mimétisme des propriétés biologiques mises en œuvre pour les besoins de la plante.

II.4.1. Effets sur la physiologie de la plante

Flavonoïdes et acides phénols interviennent *in situ* comme antioxydants, inhibiteurs d'enzymes, précurseurs de substances toxiques [McClure, 1986] et comme précurseurs dans la biosynthèse d'autres composés polyphénoliques [Hoffmann, 2003]. Les flavonoïdes sont également impliqués dans des phénomènes aussi variés que la photosensibilisation, les transferts d'énergie, le contrôle de la respiration, la photosynthèse, la morphogenèse ainsi que dans l'action des hormones et régulateurs de croissance des plantes [Smith et Banks, 1986]. Ils interviennent aussi comme écran protecteur contre les rayonnements U.V. [Bruneton, 1993; Shirley, 1996]. Les anthocyanes, une classe de flavonoïdes, sont des pigments non photosynthétiques responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des graines [Dong *et al.*, 2001; Winkel-Shirley, 2002; Jaakola *et al.*, 2002]. Les dérivés d'acides hydroxycinnamiques sont impliqués dans les processus de lignification et donc sur les propriétés physico-chimiques des parois cellulaires végétales [Hoffmann, 2003]. Les flavonoïdes et les

acides phénols semblent donc jouer un rôle important pour le développement normal, la croissance et les phénomènes de défense de la plante [Tamagnone et al., 1998; Cody et al., 1986].

II.4.2. Fonctions écologiques

Les flavonoïdes et les acides phénols assurent au niveau de la plante un rôle écologique certain. En effet, les flavonoïdes que sont les anthocyanes, flavones et flavonols en conférant les couleurs vives aux fleurs et aux fruits sont en partie responsable de l'attraction des insectes et oiseaux qui sont des vecteurs de pollinisation et de dispersion des graines végétales [Strack, 1997; Harborne, 1994]. De même, les polyphénols interviennent comme signaux moléculaires lors de la reconnaissance des légumineux par les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote [Strack, 1997].

II.4.3. Effets sur les systèmes biologiques extérieurs

Pour se protéger des microorganismes, insectes et animaux, la plante synthétise des métabolites secondaires dont les flavonoïdes et dans une moindre mesure les acides phénols. Les flavonoïdes possèdent une gamme variée d'activités biologiques dont des effets antiviraux, endocrine, inhibiteurs d'enzymes, immunomodulateurs, anti-inflammatoires, antioxydant ainsi que des effets sur les muscles lisses et sur la peroxydation des lipides [Middleton et al., 2000]. Les activités biologiques des acides phénols sont probablement représentés par leurs effets cytoprotecteur et inhibiteur de la carcinogenèse et la mutagenèse [Mukhtar et al., 1988; Lesca, 1983] ainsi que par leur fort potentiel d'accepteur de radicaux libres [HO, 1992].

Antioxydant: L'activité antioxydante est la propriété la mieux connue des flavonoïdes. Trois mécanismes "antioxydant" sont décrits [Bors et al., 1990; Cos et al., 1998; Kim et al., 1999; Nijveldt et al., 2001]. Les flavonoïdes agissent comme des composés antiradicalaires en piégeant les radicaux libres produits par l'organisme. Ce

mécanisme implique l'oxydation des radicaux libres par les flavonoïdes, donnant des espèces chimiques plus stables. Les flavonoïdes agissent également en inhibant la xanthine oxydase et/ou de l'oxyde nitrique synthétase. Ces enzymes catalysent respectivement la production d'acide urique et d'oxyde nitrique qui ont un fort potentiel oxydatif in vivo.

Anti-inflammatoire: Les propriétés anti-inflammatoires des flavonoïdes ont été démontrées aussi bien in vitro que sur modèle animal. Des mécanismes aussi divers tels que la modification du métabolisme de l'acide arachidonique, l'inhibition de la cyclooxygénase et/ou de la lipooxygénase sont impliqués [Di Carlo, 1999]. L'inhibition de la cyclooxygénase avec pour conséquence une augmentation du taux d'AMP cyclique intracellulaire apparaît comme étant le mécanisme majeur impliqué dans l'effet anti-agrégation plaquettaire des flavones apigénine, chrysin et phloretine. L'apigénine et la lutéoline inhibent chez le rat l'œdème induit par injection de "huile de ricin". L'effet serait dû à l'inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique, inhibition de la libération d'histamine ou au blocage de radicaux libres..

Inhibition d'enzymes: Les flavonoïdes sont connus pour leur énorme potentiel inhibiteur de nombreux systèmes enzymatiques impliqués dans les pathologies et les fonctions cellulaires les plus diverses. Ce potentiel leur confère des effets curatifs et préventifs. Sans être limitatif Middleton et collaborateurs (2000) en ont recensé un certain nombre: protéine kinase C, hyaluronidase, pyruvate et lactate kinase, phospholipase A₂, phospholipase C, ATPase, lipooxygénase, cyclooxygénase, phosphodiesterase nucléotidique cyclique, adénylate cyclase, transcriptase inverse, HIV-1 protéinase, HIV-1 intégrase, ornithine décarboxylase, histidine et DOPA décarboxylase, topoisomérase, glutathionone-S-transférase, époxyde hydrolase, xanthine oxydase, monoamine oxydase, hydroxystéroïde déshydrogénase, catechol-O-méthyltransférase, aldose réductase, aldéhyde et alcool déshydrogénase, amylase, ARN et ADN

polymérase, ADN ligase, ribonucléase, complexe enzymatique cytochrome P450, élastase, nitrique oxyde synthétase.

Anti-allergisant: Les flavonoïdes sont également connus pour leur effet anti-allergisant attribué en grande partie à l'inhibition de la libération par les mastocytes des médiateurs du processus allergique (histamine). Les flavonoïdes inhibent la phosphodiesterase et l'ATPase calcium-dépendant de l'AMP cyclique; ce qui a pour effet de réduire la libération d'histamine par les mastocytes et les cellules basophiles.

Modulation du fonctionnement des cellules inflammatoires: Les flavonoïdes affectent le fonctionnement des cellules inflammatoires (lymphocytes T et B, Natural killer, macrophages et monocytes, mastocytes, basophiles, neutrophiles, éosinophiles, plaquettes sanguines) et partant du système immunitaire [Middleton et al., 2000].

III. SEPARATION DES COMPOSES POLYPHENOLIQUES

La chromatographie, méthode d'analyse physico-chimique, sépare les constituants d'un mélange par entraînement au moyen d'une phase mobile le long d'une phase stationnaire, grâce à la partition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et à une force d'éluion (due à la phase mobile). La chromatographie liquide haute performance (HPLC), l'électrophorèse capillaire haute performance ainsi que la chromatographie sur couche mince (CCM) sont utilisées comme techniques d'analyse qualitative et quantitative des métabolites secondaires des plantes. Au cours des 20 dernières années, la HPLC sur colonnes en phase inversée s'est révélée être la méthode la plus employée pour l'analyse des polyphénols des plantes [Robbins, 2003].

III.1. ANALYSE HPLC DES FLAVONOÏDES ET ACIDES PHÉNOLS

La plus part des revues bibliographiques traitant de la séparation des polyphénols portent presque exclusivement sur les flavonoïdes; très peu sont axées sur les acides phénols [Robbins, 2003]. Parmi celles-ci, les travaux de Merken et Beecher (2000) et de Robbins (2003) font la synthèse des méthodes HPLC publiées respectivement entre 1989 et 1999 sur la séparation des flavonoïdes et entre 1982 et 2002 sur les acides phénols. Certaines tendances méthodologiques s'en dégagent.

Colonnes: Aussi bien que pour les flavonoïdes que pour les acides phénols, des colonnes en "phase inversée" (C18 essentiellement) de 100 à 300mm de long et de 2.1 à 5mm de diamètre interne (4.6mm le plus souvent) sont presque toujours utilisées. La colonne est préférentiellement thermostatée à la température ambiante ou légèrement

en dessus. Une pré colonne de même nature que la colonne est parfois utilisée pour les flavonoïdes mais rarement pour les acides phénols.

Eluant: L'éluant est généralement binaire (2 solvants A et B). Les éluants à base d'un solvant unique ou les mélanges tertiaires ou quaternaires sont moins fréquemment utilisés. L'éluant est composé d'une solution aqueuse et d'un solvant organique (méthanol ou acétonitrile, occasionnellement tétrahydrofurane, propanol, isopropanol, butanol ou acétate d'éthyle). Les acides acétique, phosphorique, perchlorique, formique, trifluoroacétique et les sels comme l'acétate d'ammonium sont les plus rencontrés dans la composition de la solution aqueuse; l'acidification permettant de réduire l'étalement des pics chromatographiques et de gagner en résolution. Pour la séparation des acides phénols, la solution aqueuse contient souvent un tampon phosphate ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$), citrate de sodium ou ammonium ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2/\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-$, NH_4^+). Dans certains cas, les solvants A et B sont des mélanges de solvants organiques et aqueux.

Elution: Les éluations en gradient sont préférés aux isocratiques. La durée de l'éluion est au maximum d'une heure pour les flavonoïdes et de 30 à 150 min pour les acides phénols avec une étape d'équilibration de la colonne entre deux essais. Le débit est fixé à 1 ou 1.5 ml/min pour les flavonoïdes et entre 0.15 et 1.8 ml/min pour les acides phénols (1 ml/min en moyenne). Le volume de l'échantillon à analyser est compris entre 1 et 100 μl en fonction de la sensibilité de la détection et de la richesse de l'extrait en flavonoïdes ou en acides phénols.

Détection: Les flavonoïdes et acides phénols absorbant dans l'UV (à cause de leurs noyaux phénoliques), leur détection est couramment assurée grâce un détecteur UV ou UV à barrette diode (DAD). Le DAD a l'avantage de permettre l'identification des composés sur la base à la fois de leur temps de rétention et le leur spectre UV/visible. En tenant compte des absorbances maximales des polyphénols (λ_{max}) certaines

longueurs d'ondes sont préférentiellement utilisées pour leur détection: Anthocyane: 502, 510, 520, 525nm; Catéchine: 210, 278, 280nm; Flavanone: 280, 290nm, Flavones et flavonols: 270, 280, 350, 365, 370nm, Isoflavones: 236, 260, 260, 280, acides phénols dérivés de l'acide benzoïque: 200-290nm, acides phénols dérivés de l'acide cinnamique: 270-360nm. Toutefois, la longueur d'onde de 254nm est la plus utilisée pour l'analyse des acides phénols. Les flavonoïdes et acides phénols sont également détectés par fluorescence. C'est le cas notamment des catéchines (excitation à 280nm, émission à 310nm), des isoflavones (excitation à 365nm, émission à 418nm) et des acides phénols (excitation à 278nm, émission à 360nm; excitation à 330nm, émission à 374nm). La spectroscopie de Masse est également utilisée comme méthode de détection en couplant la sortie de colonne HPLC à une interface MS. On obtient ainsi des systèmes HPLC-MS et HPLC-MS-MS.

III.2. OPTIMISATION DE METHODES HPLC

Optimiser une méthode HPLC consiste à définir les conditions expérimentales requises pour une séparation chromatographique de qualité dans un temps d'analyse raisonnable. La détermination des conditions optimales requiert la mise en œuvre d'essais préliminaires et consistera à trouver un compromis entre des objectifs qui à priori sont parfois contradictoires.

L'approche classique consiste pour l'analyste à déterminer grâce à son expérience les paramètres importants à étudier puis à faire varier indépendamment chaque facteur à la fois, les autres facteurs étant fixés. Cette démarche traditionnelle ne permet pas de prendre en compte les interactions entre facteurs, ce qui constitue une source majeure d'imprécision pour l'optimisation. Le nombre d'expériences requis et le caractère

hasardeux de la démarche la rendent coûteuse en terme de personnel, de matériel et de temps sans pour autant garantir la meilleure qualité de séparation.

Une démarche plus rationnelle qui prendrait en compte tous les facteurs expérimentaux à la fois faciliterait la gestion du temps et la maîtrise des coût avec l'assurance d'obtenir la meilleure qualité de séparation pour les facteurs étudiés. Différentes méthodes "scientifiques" d'optimisations sont ainsi décrites dans la littérature [Liang 1997, Noreen 1997]. La méthode à mettre en œuvre ainsi que la réponse expérimentale devant traduire la qualité de la séparation chromatographique doivent être judicieusement choisie pour tenir compte du problème d'optimisation à résoudre. Le choix du domaine expérimental est une étape critique de l'optimisation. L'optimisation peut être purement expérimentale ou couplée à une analyse numérique. Des outils statistiques et informatiques d'aides à la décision ont été introduits afin de faciliter l'analyse [Outinen et al. 1998, Pelander et al. 1999].

III.2.1. Optimisation par Plan d'expérience

L'optimisation par Plan d'expérience consiste à programmer une série d'expériences à réaliser. Pour ce faire, on commence par définir les facteurs expérimentaux à optimiser puis par des essais préliminaires à déterminer pour chacun des facteurs les valeurs maximale et minimale entre lesquelles ils varieront au cours de l'optimisation. Les expériences programmées sont réalisées dans un ordre aléatoire afin de s'affranchir de tout biais systématique. La programmation des expériences se fait selon un plan factoriel complet ou réduit, centré ou pas selon le cas. Pour k facteurs à optimiser, le plan factoriel complet comportera 2^k expériences. Il pourra être complété par $k-1$ expériences au centre du domaine expérimental et $2k$ essais aux points en étoile donnant un plan composite centré. Le nombre d'expériences à réaliser peut être réduit de k essais (rang k , $k+1$, $2(k+1)$ et $3(k+1)$) pour un plan factoriel

complet/composite centré réduit. Les expériences à réaliser sont données par la matrice des essais (tableau de k colonnes et n lignes; n étant le nombre d'expériences). Pour chaque essai, une réponse expérimentale est enregistrée. Un calcul matriciel permet par la suite de quantifier l'effet direct de chaque facteur ainsi que de leurs interactions sur la réponse expérimentale. Il est alors possible de modéliser ces résultats sous la forme de fonctions mathématiques ou graphiques reliant les réponses aux facteurs influents. Le modèle mathématique est ensuite utilisé pour déterminer les meilleures conditions expérimentales de l'analyse. La méthode simplex figure parmi les méthodes analytiques d'optimisation les plus couramment utilisées en chromatographie en phase liquide [Klein et Riviera, 2000]. Le simplex est une figure géométrique à $n+1$ cotés dans un espace à n dimensions; n étant le nombre de facteurs expérimentaux indépendants à optimiser. Pour un système constitué de deux paramètres à optimiser, le simplex est un triangle. Chaque sommet du simplex représente la réponse expérimentale mesurée pour des conditions expérimentales définies. L'algorithme du simplex permet par une série de mouvements logiques de s'éloigner des régions de faible réponse expérimentale vers les régions de réponse optimale.

II^{ème} partie: MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL D' ETUDE

I.1. MATERIEL DE LABORATOIRE

I.1.1. Solvants

Des solvants usuels (Hexane, éther de pétrole, chloroforme, dichlorométhane, acétate d'éthyle, acétone, acétonitrile, méthanol, éthanol et eau distillée) de grade HPLC et analyse sont utilisés. Les solvants de grade analyse sont utilisés pour les opérations d'extractions, de fractionnement liquide liquide, de CCM et de MPLC; les solvants de grade HPLC (ALDRICH HPLC grade) étant réservés aux analyses HPLC. Le tween 80 est utilisé comme émulsifiant.

I.1.2. Substances de référence

Acide phénols: Acides benzoïque, gallique, ferulique, caféique, vanillique, ellagique, cinnamique et hydroxycinnamique

Flavonoïdes: Lutéoline, apigénine, acacétine, chrysin, galangine, rhamnetine, kaempferol, quercitrinedihydrate, quercetinedihydrate, rutine, quercétine

Autres: acide tannique (tanin), apigénidine (anthocyanoside)

I.1.3. Réactifs et milieux de culture

- Milieu RPMI 1640 (GIBCO), sérum de bœuf fœtal, streptomycine, 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide (MTT), DMSO (diméthylsulfoxyde)

- Bouillon et gélose Mueller Hinton (Difco), INT (IodoNitrotétrazolium violet)

MATERIEL ET METHODES: Matériel d'étude

- Ache (Acetylcholinesterase), ATACI (acetylcholine iodide), DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, BSA (bovine serum albumine), tampon tris-HCl pH8, NaCl, MgCl₂,
- Colorant Giemsa, milieu RPMI 1640
- DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
- Réactif de Neu
- Carmino vert, acide acétique, NaOH, FeCl₃, NH₄OH

I.1.4. Appareillages

Balance analytique: ADVENTURER 310G

Evaporateur rotatif (BÜCHI R124) muni d'une pompe à vide

Extracteur complet de type Soxhlet

Hotte chimique et Hotte à flux laminaire vertical

HPLC DAD (HEWLET PACKARD 1090II)

Lampe UV 254/ 365 nm (SPECTROLINE ENF 260C/FE)

Lecteur de microplaques (TITRITEX Multiscan)

Lyophilisateur (TELSTAR Cryodos 50)

Microscope couplé à un appareil photo (OLYMPUS CH 30, OLYMPUS SC35 type12)

Spectrophotomètre (CECIL CE 2041)

Spectromètre RMN (BRUKER Avance 400)

Spectromètre de Masse (FINNIGAN MAT 900 S)

I.1.5. Consommables

Plaques CCM analytique et préparatif (Merck)

Loupe entomologique et pinces entomologiques

Papier filtre Whattman N° 1

Petite verrerie

I.2. MATERIELS BIOLOGIQUES

Un certain nombre de matériels biologiques ont été utilisés au cours de l'étude.

I.2.1. *Striga hermonthica*

La plante entière (racine + tige + feuille + fleurs) a été récoltée tout au long de l'étude durant les mois d'Août et Septembre, de 1999 à 2002, dans les champs de sorgho de la station expérimentale de l'IDR sis à Gampéla (25 Km à l'est de Ouagadougou). La plante récoltée a été formellement identifiée au Laboratoire d'Ecologie Végétale et de Botanique de l'Université de Ouagadougou. Le matériel végétal a été débarrassé de tout corps étranger et séché au laboratoire pendant 4 jours à une température d'environ 30°C à l'abri du soleil et sous ventilation. La plante séchée a été finement pulvérisée puis conditionnée dans des emballages plastiques avant d'être conservée à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

I.2.2. *Callosobruchus maculatus*

La bruche du niébé *Callosobruchus maculatus* (Fab.) (Coleoptera : Bruchidae) de la forme non volière a été utilisée à différents stades de son cycle de développement (adulte, œuf, larves) pour l'étude des propriétés insecticides. La colonie du laboratoire a été constituée à partir d'insectes ayant émergé de graines de niébé de la variété «Kamboincé local» récoltées à Gampéla. Dès leur émergence les adultes ont été introduits par couple dans des boîtes plastiques transparentes en présence de graines saines de niébé. Les insectes qui en émergent ont été soit utilisés dans les 12 heures qui suivaient leur émergence pour les tests biologiques, soit pour le maintien de la colonie.

I.2.3. *Vigna unguiculata*

Des graines de niébé exemptes d'infestation à *C. maculatus* et de pesticides ont été utilisées comme support pour la mise en évidence des activités insecticides. Les graines de *Vigna unguiculata* (Walp.) de la variété "Kamboincé local" ont été récoltées à Gampéla dans des champs n'ayant subi aucun traitement pesticide. Les graines apparemment saines sont mises à séjourner au congélateur pendant 8 jours pour les débarrasser toute infestation larvaire éventuelle [Sanon et Ouedraogo, 1998].

I.2.4. Souches microbiennes

Des souches de référence ont été utilisées pour l'étude des propriétés antimicrobiennes. Il s'agit des bactéries gram positif *Enterococcus faecalis* CIP 103907, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, *Bacillus cereus* LMG 13569, gram négatif *Salmonella enterica* CIP 105150, *Shigella dysenteriae* CIP 54.51, *Escherichia coli* CIP 105182 et de la levure *Saccharomyces cerevisiae* BMT 1333. Les souches sont maintenues dans un bouillon Mueller Hinton (Difco) et stockée à -50°C. Le repiquage se fait sur milieu solide Mueller Hinton. *Cladosporium herbarium* a été utilisé pour la CCM bioautographique. Elle est maintenue sur milieu malt agar.

I.2.5. Souches de *Plasmodium* sp.

La souche de *Plasmodium berghei* chloroquino sensitive utilisée pour les essais *in vitro* a été gracieusement offerte par le Professeur GUIGEMDE du Centre Muraz de Bobo-dioulasso. Elle est conservée *in vivo* au laboratoire par ré-infestation hebdomadaire de souris NMRI au moyen d'injections intra-péritonéales d'érythrocytes parasités [Carvalho et al., 1991]. Des souches sauvages chloroquino sensibles de *Plasmodium falciparum*, prélevées au centre médical Saint Camille chez des malades positifs à la goutte épaisse ont été utilisées pour les essais *in vivo*. Le sang est collecté

dans des tubes imprégnés de silicone. De retour au laboratoire, le sang est centrifugé à 2000 tours/min et le sérum éliminé. Le culot d'hématies est lavé 3 fois de suite avec du milieu RPMI 1640 glucosé (2g/l) contenant du bicarbonate de sodium (2.1g/l) HEPES (5.95g/l) supplémenté à 10% avec du sérum humain [Jensen et al., 1982]

I.2.6. Souris NMRI

Des souris femelles NMRI de 2 à 3 mois pesant 25 à 30 g ont été utilisées pour les tests de toxicité aiguë ainsi que pour l'activité anti-plasmodiale *in vivo*. Les souris ont été obtenues auprès du CIRDES (Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide). Ils sont stabulés au laboratoire à la température de 25°C à une photopériode 12:12. Les animaux ont accès à l'eau et à la nourriture (aliment du CIRDES) à volonté. Ils sont soumis à une diète complète 24 heures avant toute utilisation.

I.2.7. Lignée cellulaire

La lignée tumorale A549 de poumon humain a été gracieusement mise à notre disposition par Unibioscreen (Belgique). Les cellules sont cultivées dans des flacons de culture cellulaire contenant le milieu de culture RPMI 1640 (GIBCO) supplémenté à 10% de sérum de bœuf fœtal et 100µg/ml de streptomycine. La culture se fait dans une atmosphère saturée à 5% de CO₂ et à 37°C. Le milieu est renouvelé toutes les 48 heures. Les cellules sont collectées et centrifugées à 400 x g pendant 10 min. Le culot cellulaire est suspendu dans du milieu neuf et dilué de façon à obtenir une densité cellulaire de 10³ cellules/ml pour les essais de cytotoxicité.

II. ETUDE PHYTOCHIMIQUE

II.1. TESTS GENERAUX DE CARACTERISATION

Les tests généraux de caractérisation ont été réalisés sur les extraits à l'hexane, au chloroforme et au méthanol obtenus par extractions successives au Soxhlet. Les procédures décrites par CIULEI (1982) après ou avant hydrolyse chlorhydrique (HCl aqueux 2N pendant 1 heure) ont été utilisées pour la mise en évidence des différents groupes chimiques.

La réaction au FeCl_3 est mise en œuvre pour les tanins et polyphénols, le test de Shibata pour les flavonoïdes, le test de Bornsträger pour les anthraquinones, le test de Feiggl-Frehden pour les coumarines, le test de Liebermann/Buchard pour les triterpènes/ stéroïdes, le test de Carr-price pour les caroténoïdes, le test de Kedde pour les hétérosides cardiotoniques et le test de mousse pour les saponosides. Les pigments anthocyaniques sont mis en évidence par la méthode du différentiel de pH.

II.2. HISTOCHIMIE

Des coupes histochimiques transversales ont été réalisées sur des tiges fraîchement récoltées. Afin d'identifier les différents tissus végétaux (parenchymes, collenchyme, phloème, xylème, sclérenchyme), les coupes sont traitées au carmino vert après passage successifs dans de l'eau de javel et dans de l'acide acétique. Des réactifs plus ou moins spécifiques de certaines catégories de métabolites secondaires [Ciulei, 1982] permettent de les localiser dans les tissus identifiés. Flavones, tanins et hydroxyméthylantraquinones sont ainsi respectivement caractérisés par des solutions aqueuses de NaOH 5%, FeCl_3 3% et NH_4OH 5%. Les coupes ainsi traitées sont observées au microscope photonique.

II.3. DOSAGES DES COMPOSES PHENOLIQUES

II.3.1. Extraction des composés phénoliques

Dix grammes (10g) de poudre végétale sont extraits avec 100ml de solvant. Les extraits sont ensuite filtrés au moyen d'un filtre Büchner muni d'une pompe à vide; Les opérations d'extraction et de filtration sont répétées jusqu'à épuisement du marc résiduel en composés phénoliques (vérifié au moyen du réactif de Folin Ciocalteu). Les solvants et modes opératoires sont exposés ci-dessous.

Macéré hydro acétone 80%: La poudre végétale est extraite avec de l'acétone aqueux 80% pendant 1 heure à température ambiante (30°C) et sous agitation magnétique [Sereme et al., 1993]. Les filtrats sont délipidés avec de petites quantités d'éther de pétrole jusqu'à l'obtention d'une phase étherée incolore. L'acétone est évaporé sous vide partiel et la phase aqueuse résultante est lyophilisée.

Décoctés hydro méthanolique 80% et méthanolique: La plante est extraite au reflux pendant 30 min avec du méthanol aqueux 80% [Bandyopadhyay et al., 1990] et du méthanol 100% [Wagner et al., 1983]. Le méthanol est évaporé dans un évaporateur rotatif muni d'une pompe à vide. La phase aqueuse résiduelle est lyophilisée.

Décoctés hydro méthanolique 50% acide et hydro chlorhydrique acide: La poudre végétale est mise à bouillir pendant 30min avec du méthanol aqueux 50% pH2 et de l'acide chlorhydrique aqueux pH2 [Lescao et al., 1972; Marhuenda et Garcia, 1985]. Le méthanol est évaporé sous pression réduite et l'extrait aqueux lyophilisé. Le lyophilisat est dissout dans 50ml d'eau puis lavé avec 3 fois 100ml d'acétate d'éthyle après modifications successives du pH. Les fractions acétate d'éthyle obtenues sont rassemblées et évaporées à sec.

II.3.2. Dosages spectrophotométriques

Les lyophilisats et les fractions acétate d'éthyle sont solubilisés dans un volume bien précis d'acétone aqueux 50% puis convenablement dilués avec de l'eau distillée pour servir aux différents dosages spectrophotométriques.

Polyphénols totaux: Les polyphénols totaux sont estimés par la méthode de Singleton [Singleton et al., 1999] adaptée aux procédures de micro dilutions. Un volume de 100µl d'extrait à tester est mélangé à 500µl du réactif de Folin-Ciocalteu (0.2N) dans du méthanol. Après 5 min d'incubation, ajouter 400µl d'une solution aqueuse de carbonate de sodium (75g/l). Laisser la coloration se développer 2 heures durant puis lire l'absorbance à 760nm dans une cuve de 1 cm contre un blanc. L'acide gallique est utilisé comme standard pour l'établissement de la courbe étalon. Le blanc est constitué de 100µl d'eau, de 500µl du réactif de Folin Ciocalteu (0.2N) et de 400µl de carbonate de sodium aqueux 75g/l.

Polyphénols non flavonoïdiques: Les polyphénols totaux non flavonoïdiques sont estimés selon la méthode décrite par Singleton [Singleton et al., 1999] après précipitation des flavonoïdes au formaldéhyde. Pour ce faire, 5ml de HCl aqueux 50% et 5 ml de formaldéhyde aqueux (8mg/l) sont soigneusement mélangés à 10ml d'extrait à doser. Au bout de 24h à l'abri de la lumière et de l'air, le mélange est filtré et centrifugé. Les polyphénols non flavonoïdiques sont ensuite dosés selon la méthode précédemment décrite pour les polyphénols totaux.

Flavonoïdes totaux: Les flavonoïdes totaux sont dosés selon la méthode de Dowd adaptée par Vennat et collaborateurs telle que décrite par Arvouet-Grant (1994). Un volume de 5ml de $AlCl_3$ à 2% dans du méthanol est mélangé avec un volume égal d'extrait dilué dans du méthanol. L'absorbance est mesurée au bout de 10min à 415nm dans une cuve de 1cm contre un blanc. La quercétine est utilisée comme standard pour

l'établissement de la courbe étalon. Le blanc est constitué de 5ml d'extrait et de 5ml de méthanol.

Tanins: La méthode de référence de la Communauté Européenne pour le dosage des tanins (1984) a été utilisée. Un volume de 1ml d'extrait à doser est mélangé au vortex avec 5ml d'eau, 1ml de citrate d'ammonium ferrique (28% de fer; 3,5g/l) datant de 24 heures et 1ml d'ammoniaque (8g/l de NH₃). L'absorbance de la solution est mesurée à 525 nm au bout de 10 min contre un blanc (1ml d'extrait à doser + 6ml d'eau + 1ml d'ammoniaque). L'acide tannique est utilisé comme standard.

Anthocyanosides: La méthode du différentiel de pH à la longueur d'onde de 480nm est utilisée [Riberau-Gayon, 1968; Sereme et coll., 1993]. Un volume de 0.2ml d'extrait à doser est mélangé avec 5ml de tampon pH3.5 dans un tube à essai et avec 5ml d'une solution d'acide chlorhydrique pH0.6 dans un second tube. La différence d'absorbance est mesurée à 480nm aux pH de 0.6 et 3.5. Les solutions tampon et d'acide chlorhydrique sont utilisées comme blancs. La teneur en anthocyanoside dans la solution test (5ml de tampon + 2ml d'extrait) est exprimée en équivalent apigénidine selon l'équation:

$$[C]_{\text{solution}} \text{ (mg/ml)} = \Delta_{\text{absorbance}} \times 255 / \Delta \epsilon_{1\text{cm}, 480\text{nm}}$$

$$[C]_{\text{solution}} \text{ (mg/ml)} = \Delta_{\text{absorbance}} \times 66.99 \times 10^{-3}$$

$$[C]_{\text{solution}} \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \Delta_{\text{absorbance}} \times 66.99$$

La concentration des extraits est calculée selon la relation

$$[C]_{\text{extrait}} \text{ (}\mu\text{g/ml)} = ([C]_{\text{solution}} \times 5,2) / 0.2$$

Tous les dosages sont répétés 5 fois.

II.4. ANALYSE CCM DES COMPOSES POLYPHENOLIQUES

Les chromatographies sur couches minces de silice sont réalisées sur des plaques CCM Kieselgel 60F₂₅₄, 0.25mm (Merck). La migration s'effectue sur 10 cm dans une atmosphère saturée de vapeur de solvants. Le système Chloroforme/Méthanol 10/0.75 qui nous a donné la meilleure séparation est utilisée. Le chromatogramme est d'abord observé au visible, à l'UV 254nm et 365nm avant révélation avec de réactif de Neu.

II.5. OPTIMISATION DE LA SÉPARATION DES POLYPHENOLS

Un plan d'expérience est utilisé pour optimiser une méthode HPLC en vue de l'analyse des acides phénols et des flavonoïdes en général et en particulier de ceux de *Striga hermonthica*.

La méthode est optimisée sur un mélange d'acides phénols. En raison de leur grande similarité structurale et de leur polarité élevée, les acides phénols sont plus difficiles à séparer sur colonne en phase inverse que les flavonoïdes. Une méthode HPLC optimisée pour la séparation des acides phénols conviendrait donc à la séparation d'un plus grand nombre de flavonoïdes.

L'effet des facteurs expérimentaux susceptibles de modifier la séparation chromatographique est quantifié, leurs interactions sont calculées et celles qui sont influentes sont repérées. Il est alors possible de modéliser ces résultats sous la forme de fonctions analytiques ou graphiques reliant la réponse chromatographique aux facteurs influents. La modélisation mathématique est alors utilisée pour déterminer les meilleures conditions expérimentales de la séparation chromatographique.

II.5.1. Mélange d'acides phénols de référence

Un mélange mixte de 8 acides phénols est choisi arbitrairement pour optimiser la séparation chromatographique des polyphénols. Il s'agit des acides acide caféique, ferulic, cinnamic, hydrocinnamic, gallique, vanillique, ellagique et benzoïque. Ces acides en solutions méthanoliques sont mélangés afin de constituer une solution mixte contenant 100µg/ml de chacun des acides phénols. La solution mixte est filtrée sur millipore avant injection dans le chromatographe.

II.5.2. Paramètres à optimiser

La méthode HPLC de base sujette à optimisation (Figure 11) comporte 4 phases: une phase isocratique pour équilibrer la colonne suivie de 2 phases de gradients (I et II) qui se terminent par une phase isocratique de nettoyage de la colonne. Le solvant d'éluion est un mélange binaire d'acétonitrile et d'acide ortho phosphorique aqueux 0,01% à proportion variable. Les essais d'optimisation sont effectués sur colonne Kromasil C₁₈ à la température du laboratoire. Les chromatogrammes sont enregistrés aux longueurs d'onde de 210nm et 273nm. Les paramètres expérimentaux, variables quantitatives contrôlables à optimiser par le plan d'expérience sont:

- X1, la proportion d'acétonitrile pendant la première phase isocratique
- X2, la proportion d'acétonitrile à la fin du gradient I
- X3, la durée du gradient I
- X4, le débit d'éluion pendant la première phase isocratique et le gradient I

Le pourcentage d'acétonitrile à la fin du gradient II et lors de la phase terminale isocratique est fixé à 75% avec des durées respectives de 10 et 5min et un débit de 1ml/min.

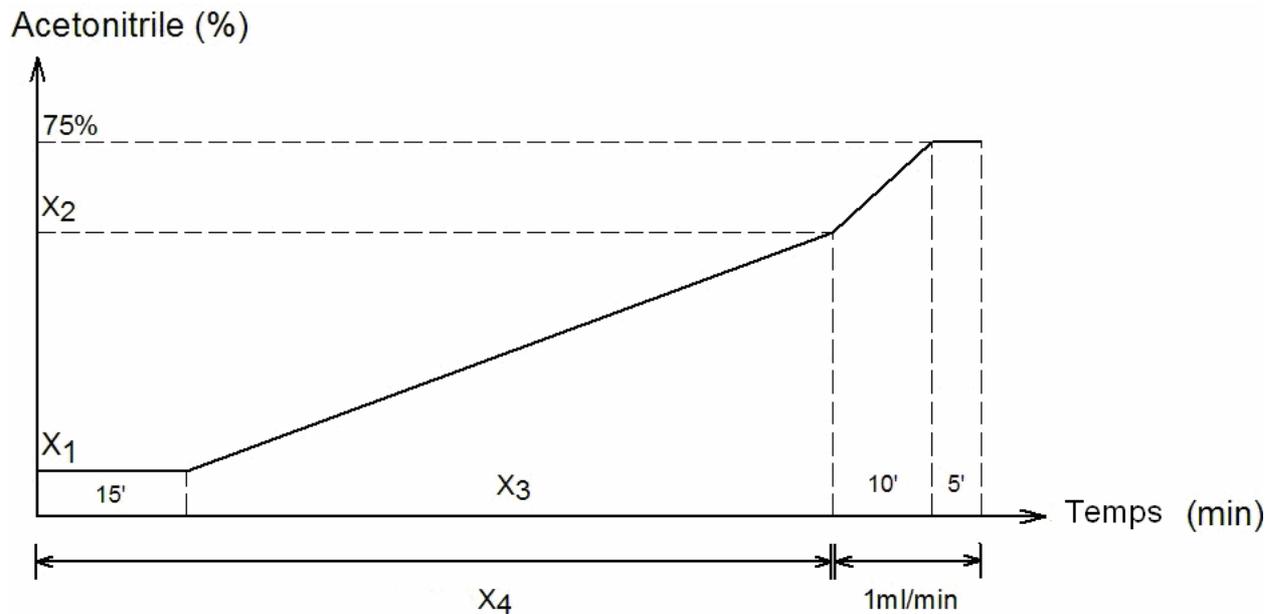


Figure 11: Paramètres HPLC à optimiser

II.5.3. Matrice des expériences

Un plan composite centré réduit avec $\alpha=\pm 1$ capable de supporter un modèle quadratique est choisi comme méthode d'optimisation. Pour chacun des paramètres à optimiser (X_1 , X_2 , X_3 et X_4), des essais préliminaires permettent de fixer deux niveaux extrêmes X_{\max} (+1) et X_{\min} (-1) correspondant aux limites d'un intervalle raisonnable de variation encadrant une valeur au centre (0). L'ensemble des niveaux X_{\max} et X_{\min} définis pour chaque facteur variable délimite le domaine expérimental de l'étude.

$$0 = \frac{X_{\min} + X_{\max}}{2}$$

La matrice des essais correspondant à un plan composite centré réduit avec $k=4$ facteurs variables comporte $k=4$ colonnes et 23 lignes; chaque ligne correspondant à une expérience programmée. La matrice des essais est donnée ci-après (tableau 3).

MATERIELS ET METHODES: Etude phytochimique

Tableau 3: Matrice des essais

Essais	Ordre	X1	X2	X3	X4	
1	1	-1	-1	-1	-1	Essais aux extrêmes
2	14	+1	-1	-1	-1	
3	22	-1	+1	-1	-1	
4	8	+1	-1	+1	-1	
5	18	-1	+1	+1	-1	
6	9	+1	+1	+1	-1	
7	15	-1	-1	-1	+1	
8	2	-1	+1	-1	+1	
9	6	+1	+1	-1	+1	
10	16	-1	-1	+1	+1	
11	20	+1	-1	+1	+1	
12	3	+1	+1	+1	+1	
13	10	-1	0	0	0	Points en étoile
14	17	+1	0	0	0	
15	19	0	-1	0	0	
16	21	0	+1	0	0	
17	7	0	0	-1	0	
18	4	0	0	+1	0	
19	5	0	0	0	-1	
20	11	0	0	0	+1	
21	12	0	0	0	0	Essais au centre
22	13	0	0	0	0	
23	23	0	0	0	0	

La matrice des essais est constituée de:

- 12 essais aux extrêmes; c'est-à-dire 2^k essais du plan factoriel complet diminués de k essais de rang k, k+1, 2(k+1) et 3(k+1) et construite selon l'algorithme de Yates avec les valeurs extrêmes -1 et +1 de chaque facteur variable.

- 8 (2k) essais aux points en étoile pour lesquelles chacun des paramètres prennent les valeurs -1 et +1 pendant que les autres prennent leur valeur au centre 0.
- 3 (k-1) essais au centre pour lesquelles tous les facteurs variables prennent leur valeur au centre 0.

Les 23 expériences du plan sont réalisées dans un ordre aléatoire afin de s'affranchir de tout biais systématique. Pour chaque expérience, le temps de rétention, la largeur à mi hauteur des pics détectés ainsi que le nombre total de pics sont enregistrés permettant de calculer le CRF de chaque essai.

II.5.4. Réponse chromatographique mesurée

La qualité de la séparation chromatographique est évaluée grâce au CRF [Karnka et al., 2002; Klein et Rivera, 2000]. Le CRF (Chromatographic Response Function) est une mesure globale de la qualité d'une séparation chromatographique tenant à la fois compte du temps d'analyse, du nombre de pics détectés ainsi que de la résolution entre pics adjacents. Le CRF est donné par la fonction mathématique:

$$CRF = \sum R_i + L^a - b|T_M - T_L| - C(T_0 - T_1)$$

L : Nombre de pics détectés

T_M : Durée maximale acceptable pour l'analyse chromatographique

T_L : Temps de rétention du dernier pic détecté

T_0 : Temps de rétention minimal acceptable pour le premier pic

T_1 : Temps de rétention du premier pic

Les valeurs des coefficients de pondération a, b, et c sont arbitrairement fixées selon l'importance que l'on attribue aux facteurs nombre de pics (L) et temps d'analyse dans le calcul du CRF. La résolution (R_i) entre 2 pics adjacents est calculée selon la relation:

$$R_i = 1,18 \times \frac{T_{i+1} - T_i}{\delta_{i+1} + \delta_i}$$

T : Temps de rétention des pics (minute)

δ : Largeur à mi hauteur des pics en équivalent minute

Toute valeur de R_i supérieure à 2 n'est pas prise en compte dans le calcul du CRF.

II.5.5. Modélisation et optimisation

Les résultats obtenus sont analysés à l'aide du logiciel de modélisation Modde 5.0. La méthode dite de Régression Multiple Linéaire (RML) permet de décrire la réponse expérimentale par une équation mathématique [Box et al., 1978] dont les coefficients sont estimés par calcul matriciel. Nous obtenons ainsi un modèle quadratique de la forme:

$$\eta = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{\substack{i,j=1 \\ i \neq j}}^k \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2$$

η : réponse modélisée

β_0 : constante

β_i : coefficient linéaire; effet direct des facteurs X_i sur le CRF

β_{ij} : coefficient quadratique; effet d'interaction des facteurs X_i et X_j sur le CRF

β_{ii} : coefficient quadratique; effet d'interaction carré des facteurs X_i sur le CRF

Le modèle mathématique initial, incluant tous les coefficients est affiné de façon interactive par élimination de certains des coefficients et estimation de la qualité statistique du modèle obtenu [Yin, 1996]. La probabilité P, estimée par le test de Student permet de juger de l'effet significatif ou non de chaque facteur de l'équation sur la réponse analytique. L'effet d'un facteur est significatif s'il entraîne des variations significativement différentes de l'incertitude propre de la réponse étudiée (CRF). L'efficacité du modèle, c'est-à-dire sa qualité statistique est appréciée par les critères que sont le coefficient de corrélation R^2 , le coefficient de détermination R^2_{adj} , le coefficient de prévision Q^2 et par une analyse de la variance (ANOVA) basée sur le test

de Fischer. Le modèle mathématique permet par extrapolation à l'aide de la méthode simplex de Nelder Mead [Nelder et Mead, 1965] de prédire les conditions expérimentales optimales pour une bonne séparation chromatographique.

II.6. ANALYSE HPLC DES FLAVONOÏDES ET ACIDES PHÉNOLS

Les conditions expérimentales définies par l'étude d'optimisation sont utilisées pour l'analyse qualitative des acides phénols et flavonoïdes des extraits de *Striga hermonthica*. La méthode optimisée pour la séparation des 8 acides phénols se révèle également très efficace pour la séparation de 11 flavonoïdes de références disponibles. L'identification des pics se fait par comparaison de leur temps de rétention et spectres UV/visibles avec ceux des substances de référence.

Acide phénols: Acides benzoïque, gallique, ferulique, caféique, vanillique, ellagique, cinnamique et hydroxycinnamique.

Flavonoïdes: Lutéoline, apigénine, acacétine, chrysin, galangine, rhamnétine, kaempferol, quercitrine, quercétine dihydrate, rutine, quercétine

Injecter 20µl d'une solution méthanolique de chaque substance de référence (100µg/ml) afin d'enregistrer les temps de rétentions et spectres UV/visibles qui constitueront notre banque de données. Les pics sont enregistrés à 210 et 273nm pour les acides phénols et à 280nm pour les flavonoïdes. Les fractions hexane, chloroforme et acétate d'éthyle de l'extrait hydro acétone aqueux 80% sont utilisés pour l'analyse des flavonoïdes. Les acides phénols sont déterminés sur l'extrait méthanolique 100%. Pour chaque analyse, 20µl sont injectés. Chaque essai est répété 3 fois.

III. CRIBLAGE DES PROPRIETES BIOLOGIQUES

III.1. EXTRACTIONS

Différents extraits sont testés en vue de mettre en évidence les potentialités biologiques de *Striga hermonthica*.

Macéré hydro méthanolique 70%: Une macération de 100g de plante dans 2,5 litres de méthanol aqueux 70% est réalisée durant 24 heures sous agitation magnétique à la température du laboratoire. Après filtration sous Büchner, le méthanol est évaporé dans un évaporateur rotatif muni d'une pompe à vide puis la phase aqueuse résiduelle est lyophilisée.

Macéré hydro acétone 80%: Une macération de 100g de plante dans 2,5 litres d'acétone aqueux 80% est réalisée durant 24 heures sous agitation magnétique à la température du laboratoire. Après filtration sous Büchner, l'acétone est évaporé puis la phase phase aqueuse résiduelle est lyophilisée.

Extrait acétone 100%: La poudre végétale (100g) est extraite au Soxhlet avec de l'acétone durant 6 heures à la température de 65°C. L'extrait est filtré sous Büchner, concentré sous pression réduite à l'évaporateur rotatif puis évaporé à sec sous un courant d'air.

Décocté aqueux: Une décoction de 250g de poudre de *S. hermonthica* est réalisée dans 2,5 litres d'eau distillée pendant 3 heures. L'extrait est filtré sur papier filtre Whatman n°1 et lyophilisé.

Extraits acides phénols totaux: La méthode de Lescao [Lescao et al., 1972] modifiée par Marhuenda et Garcia (1985) est utilisée. Des décoctions de 10g de poudre végétale dans 200ml d'eau acidifiée pH2 et de méthanol aqueux pH2 (par ajout d'acide chlorhydrique) sont réalisées pendant 30min. Les extraits sont filtrés, le méthanol est évaporé et les phases aqueuses lyophilisées. Les lyophilisats sont dissout dans 50ml

d'eau puis lavés avec 3 fois 100ml d'acétate d'éthyle après modifications successives du pH. Les fractions acétate d'éthyle sont évaporées à sec dans un évaporateur rotatif sous vide partiel. Les fractions acétate d'éthyle des décoctés aqueux acide et hydro méthanolique acide constituent les extraits "acides phénols totaux" de *Striga hermonthica*.

III.2. TOXICITE AIGUE

L'étude de la toxicité de *Striga hermonthica* est réalisée avec le lyophilisat du macéré hydro méthanolique censé regrouper la plus part des métabolites secondaires extractibles par les solvants usuels en tradithérapie (eau, mélange eau-alcool).

La toxicité aiguë est évaluée selon l'échelle de valeur de toxicité de Hodge et Sterner [Hodge et Sterner, 1943]. Elle servira de base dans notre étude pour déterminer la dose maximale d'extrait hydro méthanolique de *S. hermonthica* à ne pas dépasser pour les usages thérapeutiques. Le test de Lietchfiel-Wilcoxon [Lietchfiel et Wilcoxon, 1949] est utilisé à cet effet pour la validation du test par la détermination des doses létales d'extrait provoquant au sein de la population animale expérimentale une mortalité cumulée de 1% (DL₁), 5% (DL₅), 50% (DL₅₀), 95% (DL₉₅) et 99% (DL₉₉).

L'extrait hydro méthanolique lyophilisé (5g) est dissout dans 10 ml d'une solution aqueuse de tween 80 à 0.1%. Les concentrations à tester sont obtenues par dilution de la solution mère ainsi constituée. Les concentrations sont déterminées en fonction du poids corporel des souris de façon à obtenir des doses de traitement comprises entre 1500 et 2300 mg/kg. Un pré test a permis de retenir la fourchette de doses testées. La toxicité aigue est évaluée au bout de 24 heures sur 7 lots de 5 souris de poids homogène (25 à 30g) dont 1 lot témoin qui ne reçoit que le solvant de dilution (solution aqueuse à 0.1% de tween 80). Un volume de 0.2ml d'extrait test est injecté par voie intraperitonéale à chaque animal puis le taux de mortalité dans chaque lot est

enregistré au bout de 24 heures. Les signes apparents de toxicité (comportements inhabituels) sont également enregistrés. Chaque essai est répété 3 fois. La DL_{50} (Dose létale 50), la DL_5 (Dose létale 5) et la DL_{95} (Dose létale 95) sont estimées à partir de la droite de régression log-probit du pourcentage de mortalité en fonction du logarithme népérien de la dose d'extrait administrée [Carvalho et al., 1999]. Les rapports DL_{50}/DL_5 et DL_{95}/DL_{50} ainsi que l'indice de sécurité (IS) DL_{95}/DL_5 sont évalués.

III.3. CYTOTOXICITE

L'extrait hydro méthanolique est fractionné sur une colonne de gel de silice avec les éluants hexane/ acétone 8:2, hexane/ acétone 5:5, acétone, acétone/ méthanol 8:2 et méthanol. L'extrait brut ainsi que les 4 fractions collectées sont utilisés pour l'évaluation de la cytotoxicité sur les cellules tumorales A549 de poumon humain.

La cytotoxicité est évaluée selon la méthode enzymatique au MTT décrit par Weniger et al. (2001). Les extraits à tester sont solubilisés dans solution aqueuse à 0.01% de tween 80 et stérilisés avant toute utilisation par filtration à travers un filtre millipore 0.2 μ m. Le milieu RPMI 1640 (GIBCO) supplémenté à 10% de sérum de veau foetal et 100 μ g/ml de streptomycine est utilisé comme milieu de culture cellulaire. Dans chacun des 96 puits d'une plaque de microtitration à fond plat, introduire 200 μ l d'une suspension cellulaire à 10 cellules/ μ l et incuber les cellules dans un incubateur à CO₂ (5% de CO₂, température de 37°C). Au bout de 48 heures, remplacer le milieu de culture par du milieu neuf contenant l'extrait à tester à différentes concentrations (0.05 à 100 μ g/ml). Les cellules sont mises à incuber en présence des extraits dans les mêmes conditions que précédemment décrites. Les puits contrôles ne contiennent pas d'extrait végétal. Après 48h d'incubation, le surnageant est éliminé et remplacé par 200 μ l d'une solution de MTT à 1mg/ml dans du milieu RPMI. La solution de MTT est remplacée au bout de 4h d'incubation par 200 μ l de DMSO afin de convenablement dissoudre les

cristaux bleus de formazan formés. La densité optique est mesurée à 570nm avec un lecteur de plaques Elisa. Chaque essai est répété 5 fois. La cytotoxicité est exprimée en pourcentage de réduction de la croissance cellulaire par rapport au contrôle.

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \left(\frac{\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_{\text{test}}}{\text{Abs}_{\text{contrôle}}} \right) \times 100$$

La concentration cytotoxique 50 (CC₅₀) c'est-à-dire réduisant la viabilité cellulaire de 50% est calculée à partir de la courbe dose réponse (cytotoxicité en fonction de la concentration d'extrait).

III.4. ACTIVITES INSECTICIDES

Le criblage des propriétés insecticides porte sur l'extrait acétone et ses fractions. Il s'agit ici d'étudier la toxicité des extraits de *S. hermonthica* sur les différents stades de développement (adulte, œuf et larves) de *Callosobruchus maculatus* (bruche du niébé) afin d'évaluer son potentiel comme insecticide à base de plantes pour la conservation du niébé lors du stockage.

L'extrait brut acétone (3g) est dissout dans 50ml d'éther de pétrole puis extrait 3 fois avec 75ml de méthanol aqueux 50%. La phase éther de pétrole résiduelle est évaporée à sec puis chromatographiée (500mg) sur colonne de gel de silice (30g) avec le solvant hexane/ acétate d'éthyle (3/2), des fractions de 5 ml chacune sont collectées. Les fractions 24 à 32 sont rassemblées, concentrées puis soumises à un deuxième fractionnement chromatographique avec l'éluant Chloroforme/ acétate d'éthyle (5/1) afin d'en isoler une fraction triterpénique. La fraction triterpénique isolée, la phase éther de pétrole ainsi que l'extrait acétone brut utilisés pour les essais biologiques sont dissous dans le solvant acétone/méthanol (1/1) [Mbata et Eppendu, 1992]. Le témoin est constitué du solvant acétone/méthanol (1/1) uniquement.

III.4.1. Dispositif d'étude

Le dispositif d'étude est constitué de 20g de graines saines de niébé dans une boîte de Pétri de 9cm de diamètre. Les graines sont uniformément imprégnées avec 1ml de l'extrait à tester puis séchées durant 45mn sous un courant d'air afin d'évaporer le solvant de dilution [Adebayo et Gbolade, 1994].

III.4.2. Mortalité des adultes de *Callosobruchus maculatus*

Les essais sont réalisés avec 1ml d'extrait brut à des concentrations de 100mg/ml et 200mg/ml; soit respectivement des doses de 100 et 200 mg d'extrait pour 20g de niébé (0.5% et 0.1% w/w). Cinq (5) couples de *C. maculatus* venant d'émerger sont introduits dans le dispositif d'étude, le taux de mortalité est enregistré toutes les 24 heures [Adebayo et Gbolade, 1994].

III.4.3. Activités ovicide, larvicide et impact sur le taux d'émergence

Pour la mise en évidence des activités ovicide et larvicide, nous utilisons (1ml) l'extrait acétone à 100mg/ml, la phase éther de pétrole à 80mg/ml et la fraction isolée à 4mg/ml. Les doses d'imprégnation étant respectivement de 0.5%, 0.4% et 0.2% w/w. Pour la détermination des DL₅₀ et DL₉₀, 1ml de chaque concentration (200, 150, 100, 75, 50mg/ml d'extrait brut; 160, 120, 80, 40, 20mg/ml de la fraction éther de pétrole et 4, 3, 2, 1.5, 1 mg/ml de la fraction isolée) sont mises en oeuvre pour 20g de niébé, donnant 5 doses d'essai par extrait test (tableau 4). Chaque essai est répété 3 fois. Dans chaque boîte de Petri, laisser les insectes adultes pondre 30 à 40 œufs sur les graines imprégnées avec l'extrait à tester. Une semaine après la ponte, compter à l'aide d'une loupe les œufs éclos et non éclos. Dès les premières émergences (3^{ème} ou 4^{ème} semaine) retirer les adultes au fur et à mesure qu'ils apparaissent jusqu'à arrêt total

MATERIELS ET METHODES: Criblage des propriétés biologiques

(absence de toute émergence sur une période de deux semaines) des émergences [Mbata et Eppendu, 1992). Les taux de mortalité des œufs et des larves ainsi que le taux d'émergence sont calculés comme suit:

$$\text{Taux de mortalité des oeufs} = \frac{\text{nombre d'oeufs pondus} - \text{nombre d'oeufs éclos}}{\text{nombre d'oeufs pondus}} \times 100$$

$$\text{Taux de mortalité des larves} = \frac{\text{nombre d'oeufs éclos} - \text{nombre d'adultes émergeant}}{\text{nombre d'oeufs éclos}} \times 100$$

$$\text{Taux d'adultes émergeant} = \frac{\text{nombre d'adultes émergeant}}{\text{nombre d'oeufs pondus}} \times 100$$

Les différentes activités insecticides sont exprimées en efficacité insecticide selon la formule d'ABBOTT [MORETTTI et al., 1998] qui donne en pourcentage les valeurs corrigées de la mortalité en fonction des mortalités des échantillons traités et celle du témoin. La correction permettant de minimiser la mortalité naturelle observée dans nos conditions expérimentales.

$$\% \text{ efficacité} = \frac{\text{Mortalité échantillon test} - \text{Mortalité témoin}}{100 - \text{Mortalité témoin}} \times 100$$

III.4.4. Traitement statistique des données

Les analyses statistiques sont effectuées avec le logiciel GraphPad Prism version 2.01. Les données sont soumises à une analyse de la variance (ANOVA), les moyennes (\pm SD) sont comparées grâce au test de comparaisons multiples de Newman-Keuls [Sanon et Ouedraogo, 1998]. Les valeurs de P inférieures à 0.05 sont considérées comme significatives. Les DL₅₀ et DL₉₀ sont calculées à partir des droites de régression log-probit

$$Y = a + \text{Log}(X)$$

Y : Valeur Probit correspondant à l'effet insecticide

X : dose d'extrait test

III.5. INHIBITION DE L'ACÉTYLCHOLINESTERASE

L'acétylcholinestérase est une des cibles enzymatiques des molécules neurotoxiques utilisées comme insecticides ou dans les traitements symptomatiques de la maladie d'Alzheimer. L'inhibition de l'acétylcholinestérase par les extraits de *S. hermonthica* nous permettrait de caractériser le mécanisme d'action des propriétés insecticides de la plante et d'en déduire son potentiel d'utilisation dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

La procédure expérimentale d'Ellman telle que décrite par Rhee et collaborateurs (2001) est utilisée. Les fractions hexane, chloroforme et acétate d'éthyle de l'extrait acétone sont testées sur l'acétylcholinestérase. Chaque essai est effectué 3 fois.

Solutions tampon

Le tampon Tris-HCl 50mM pH8 est constitué de 6.05g de TRIS (hydroxyméthyl aminométhane) dissout dans 900ml d'eau milliQ auquel est ajouté 27.14ml d'une solution d'acide chlorhydrique 1N. Le pH de la solution est ajusté à 8 et son volume complété à 1000ml.

Le tampon Tris-HCl 50mM pH8, 0.1% BSA est constitué de 500mg de BSA (albumine de sérum bovin) dissout dans 500ml de tampon Tris-HCl 50mM pH8.

Le tampon Tris-HCl 50mM pH8, 0.1M NaCl, 0.02M MgCl₂ est préparé à partir de 1 litre de tampon Tris-HCl 50mM pH8 dans lequel sont solubilisés 5.85g de NaCl et 4.06g de MgCl₂.

Enzyme et réactifs

La solution enzymatique est préparée en solubilisant l'acétylcholinestérase commercial dans du tampon Tris-HCl 50mM pH8 pour constituer une solution mère de 1000U/ml. La solution mère est diluée dans du tampon Tris-HCl 50mM pH8 0.1% BSA,

MATERIELS ET METHODES: Criblage des propriétés biologiques

pour donner une solution de 0.22U/ml d'acétylcholinestérase qui servira aux essais *in vitro*. Les solutions enzymatiques sont conservées à -20°C .

Le substrat est constituée de 15mM de ATCI (Acetylthiocholine iodide) dans de l'eau millipure.

Le réactif d'Ellman est constituée de 3mM de DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) dans du tampon Tris-HCl 50mM pH8, 0.1M NaCl, 0.02M MgCl_2 .

Extraits tests

Les fractions hexane, chloroforme et acétate d'éthyle de l'extrait acétone brut sont dissout dans du tampon Tris-HCl 50mM pH8.à 10% de méthanol à raison de 3mg/ml. Des concentrations tests de 2 à 0.0625mg/ml sont préparées par dilution avec du tampon Tris-HCl 50mM pH8. Le contrôle est constitué de méthanol à 10% dans du tampon Tris-HCl 50mM pH8.

Procédure

Dans les 96 puits des plaques de microtitration, mélanger 25 μl de substrat (ATCI), 125 μl du réactif d'Ellman (DTNB), 50 μl de tampon Tris-HCl 50mM pH8 0.1% BSA et 25 μl d'extrait à tester. L'absorbance est mesurée à 405nm toutes les 20 secondes pendant 2 minutes. La réaction enzymatique est initiée par ajout de 25 μl d'acétylcholinestérase. L'absorbance est suivie toutes les 20 secondes pendant encore 2 minutes. La vitesse d'hydrolyse du substrat, exprimée en variation d'absorbance par seconde, est calculée. Toute augmentation d'absorbance due à l'hydrolyse spontanée du substrat est soustraite de la cinétique obtenue après ajout de l'enzyme. Le pourcentage d'inhibition de l'acétylcholinestérase par les extraits de *Striga hermonthica* est calculé par rapport au contrôle selon les relations:

$$V_{\text{hydrolyse}} = \frac{\Delta DO_{405\text{nm}}}{\Delta t}$$
$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{V_{\text{hydrolyse control}} - V_{\text{hydrolyse test}}}{V_{\text{hydrolyse control}}} \times 100$$

III.6. ACTIVITES ANTIMICROBIENNES

Les fractions hexane, chloroformique et méthanolique de l'extrait acétone sont criblées pour leurs activités antibactériennes (gram positif et gram négatif) et antifongiques. Les extraits tests sont solubilisés dans de l'acétone aqueux 50% et stérilisés par filtration à travers un filtre millipore 0,2µm.

III.6.1. Test présomptif

La méthode de diffusion [Rabe et van Stadten, 1997] sur milieu solide Muller Hinton est utilisée pour mettre en évidence l'activité antibactérienne sur les souches choisies. La gélose solide estensemencée par inondation avec 3ml de la dilution 10^{-3} (10^6 ufc/ml) d'une suspension bactérienne de 24 heures, l'excès d'inoculum étant éliminé.

Des disques stériles de papier whatman n°1 de 5mm de diamètre préalablement imprégnés de 10µl d'extrait test (50, 100, 200 et 500µg/ml) sont déposés sur la géloseensemencée. Les boîtes de pétri sont incubées à 37°C pendant 24 heures au bout desquelles le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré. Les extraits induisant des zones d'inhibition ≥ 3 mm autour du disque sont considérés comme antibactériens [Schulz et al., 1995]. Chaque essai est réalisé 3 fois.

III.6.2. Concentration minimale Inhibitrice

La méthode de micro dilution dans des plaques à 96 puits avec le para-IodoNitrotétrazolium violet (INT) comme indicateur de croissance bactérienne est utilisée pour la détermination des CMI des extraits antibactériens [Eloff, 1998]. Dans les plaques de microtitration, procéder à des doubles dilutions des extraits tests avec de l'eau distillée stérile, de façon à obtenir 100µl d'extrait par puit. Un volume de 100µl de la dilution 10 d'une suspension bactérienne de 24 heures est introduit dans chaque puit.. La plaque est incubée à 37°C pendant 24 heures, puis 50µl d'une solution aqueuse d'INT à 0.2 mg/ml est ajoutée dans chaque puit. Après 30 min d'incubation à 37°C, les puits dans lesquels la croissance bactérienne a eu lieu sont signalés par une coloration rouge/rose tandis que les puits ayant connu une inhibition de la croissance bactérienne ont une coloration claire. La CMI correspond à la plus petite concentration d'extrait inhibant la croissance bactérienne. Le control négatif est constitué du milieu de culture stérile et d'acétone aqueux sans extrait végétal. Chaque essai est répété 3 fois.

III.6.3. Chromatographie sur Couche Mince bio autographique

Les fractions hexane, chloroforme et acétate d'éthyle de l'extrait hydro acétone 80% sont chromatographiées sur colonne ouverte de gel de silice avec des mélanges à proportions variables d'hexane, d'acétate d'éthyle et de méthanol. Les fractions collectées sont ensuite chromatographiées sur couche mince avec le mélange hexane/éther diéthylique 70/30. La plaque chromatographique est séchée sous courant d'air pour éliminer toute trace de solvant avant d'être pulvérisée avec une suspension de spores de *Cladosporium herbarum* dans du malt agar. La plaque est ensuite incubée pendant 72 heures à l'obscurité et en atmosphère humide. Les spots clairs sur un fond sombre sont indicateurs de composés antimicrobiens [Pacher et al., 2001].

III.7. ACTIVITE ANTIPLASMODIALE

Le lyophilisat du macéré hydro méthanolique 70% est utilisé pour évaluer l'activité antiplasmodique *in vivo* et *in vitro*. Il est dissout dans une solution aqueuse à 0.01% de Tween 80. La solution est ensuite stérilisée par filtration à travers un filtre millipore 0.2µm. La solution mère est diluée dans de l'eau distillée pour constituer les extraits à tester.

III.7.1. Etude in vitro

L'activité antiplasmodique *in vitro* est évaluée tel qu'initialement décrit par Jensen et collaborateurs (1982). Une suspension de 100µl de globules rouges parasités par *Plasmodium falciparum* (1% de parasitémie) est mélangée avec 100µl de milieu de culture (RPMI 1640, glucose 2g/l, bicarbonate de sodium 2.1g/l, HEPES 5.95g/l, sérum humain 10%) contenant l'extrait hydro alcoolique à différentes concentrations. Le mélange est incubé dans un dessiccateur à 37°C dans une atmosphère de bougie. Chaque essai est répété 3 fois. La parasitémie de chaque puit est évaluée au microscope après 48 heures d'incubation [Gasquet et al., 1993]. Les frottis minces sont fixés au méthanol, séchés puis colorés au Giemsa. La lecture se fait à l'objectif x 100. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la parasitémie par rapport au témoin. La droite de régression log-probit du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait permet de calculer la CI_{50} (Concentration inhibitrice 50). La sensibilité de la souche sauvage vis-à-vis de la quinine et de la chloroquine a été évaluée de la même manière.

III.7.2. Etude in vivo

Le test suppressif schizonticide de 4 jours tel que décrit par Peters (1975) est utilisé sur 6 lots de 5 souris femelles dont 1 lot témoin. A J0, on inocule par voie intra péritonéale $1.5 \cdot 10^7$ érythrocytes parasités par *Plasmodium berghei* à chaque souris au travers d'une injection de 0.2ml de sang infesté. Les animaux ont été au préalable soumis à une diète complète de 24 heures. Deux heures après l'infestation les souris reçoivent leur premier traitement. Ce dernier consiste à administrer par voie intra péritonéale une dose d'extrait fractionnée en deux injections de 0.2 ml à 12 heures d'intervalle. Le traitement se poursuit à J1, J2 et J3. A J4, on évalue la parasitémie des souris grâce à un frottis mince du sang prélevé au niveau de la queue. Les lames sont fixées au méthanol, séchées puis colorées au Giemsa. Les globules rouges parasités par des trophozoïdes sont dénombrés à l'objectif x 100 sur 10 champs représentatifs du frottis. La parasitémie ainsi que le pourcentage de réduction de la parasitémie sont calculés selon les relations:

$$\text{Parasitémie} = \frac{\text{hématies parasités} \times 8 \cdot 10^6}{\text{nombre de champs lus} \times 527}$$

$$\text{Réduction de la parasitémie (\%)} = \frac{\text{Parasitémie test} - \text{Parasitémie témoin}}{\text{Parasitémie témoin}} \times 100$$

$8 \cdot 10^6$: nombre moyen de globules rouges par mm^3 de sang chez la souris

527 : nombre moyen de globules rouges par champ microscopique à l'objectif x 100

La DE_{50} (Dose efficace 50) est déterminée à partir de la droite de régression log-probit pourcentage de réduction de la parasitémie en fonction du logarithme décimal de la dose d'extrait administré. Le KD (logarithme décimal de la concentration correspondant la 50% d'activité) est ensuite déterminé afin d'estimer la puissance d'effet ($1/KD$) de l'extrait testé.

III.8. ACTIVITE ANTIRADICALAIRE

L'activité antiradicalaire des extraits végétaux traduit leur aptitude à piéger les radicaux libres de l'organisme. L'activité antiradicalaire est évaluée sur le décocté aqueux, les macérés hydro méthanolique et hydro acétone 80% ainsi que sur les extraits "acide phénols totaux". Les extraits sont solubilisés dans du méthanol pour donner des concentrations tests de 400 à 10µg/ml. La méthode spectrophotométrique au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) décrite par Velazquez et collaborateurs (2003) est utilisée.

Introduire 1,5 ml d'une solution méthanolique de DPPH à 20mg/l dans des tubes à essais contenant au préalable 0,75 ml d'extraits à tester. Après 15 min d'incubation, lire la densité optique à 517 nm contre un témoin ne contenant pas d'extrait végétal. Chaque essai est réalisé en triple. L'activité antiradicalaire des extraits est exprimée en pourcentage de DPPH réduit. La quercétine est utilisée comme substance de référence.

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = \left(1 - \frac{DO_{\text{échantillon}}}{DO_{\text{témoin}}} \right) \times 100$$

La concentration d'extrait réduisant 50% du DPPH (CAR₅₀) est obtenue à partir de la droite de régression log-probit de l'activité antiradicalaire en fonction du logarithme népérien de la concentration d'extrait.

IV. IDENTIFICATION DES MOLECULES ANTIRADICALAIRES

IV.1. ISOLEMENTS ET PURIFICATIONS

Dissoudre 36g d'extrait acétone aqueux 80% dans de l'eau. Partitionner avec de l'hexane, du chloroforme puis de l'acétate d'éthyle. Chromatographier 1g de fraction hexane et acétate d'éthyle sur une colonne de gel de silice (50g de silicagel 60) avec 100ml d'éluants dans l'ordre de polarité croissante. Les éluants utilisés sont: Hexane/ acétate d'éthyle/ méthanol 100/0/0, 95/5/0, 90/10/0, 75/25/0, 50/50, 0/100/0, 0/90/10 et 0/50/50. Des fractions de 50ml sont collectées, concentrées à sec puis soumises à une CCM bio autographique pour mettre en évidence les fractions antiradicalaires (révélation avec DPPH 2% méthanolique).

Les sous fractions 5.2 et 6.1 acétate d'éthyle sont rassemblées (122mg) puis chromatographiées par MPLC sur une colonne reverse phase (RP18, Licroprep, merck 25-40 μ m) muni d'un détecteur UV/visible. L'éluant est constitué de méthanol et d'ammonium aqueux (100mg/ml) et la détection effectuée à 254nm. L'élution est composé de 1l de Méthanol/ Ammonium aqueux 30/70, 2l de Méthanol/ Ammonium aqueux 40/60, 2l de Méthanol/ Ammonium aqueux 50/50, 3l de Méthanol/ Ammonium aqueux 70/30 et 3l de méthanol 100%.

Les fractions XX à XXIII sont collectées, le méthanol est évaporé sous pression réduite et la phase aqueuse lavée avec de l'acétate d'éthyle pour extraire les molécules antioxydantes.

On obtient une fraction de 46.9mg (antioxydante) qui est successivement chromatographiée sur couche mince de silice avec les éluants dichlorométhane/ Méthanol 19/1, dichlorométhane/ Méthanol 11/1 et dichlorométhane/ Méthanol 13/1 à la recherche de composés antiradicalaires.

Les sous fractions 3.2 et 4.1 (134mg) hexane sont également chromatographiées sur couche mince de silice avec les éluants dichlorométhane/ Méthanol 11/1 et hexane/ éther diéthylique 70/30 à la recherche de composés antiradicalaires.

IV.2. ELUCIDATION STRUCTURALE DES MOLECULES ISOLEES

Des méthodes physico-chimiques sont utilisées pour l'élucidation structurale.

IV.2.1. Spectres de Masse (MS)

Les spectres de masse ont été enregistrés en mode positif par un spectromètre quadripôle (FINNIGAN) utilisé en impact électronique (EI, énergie e^- 70 eV). Les composés en solution ont été vaporisés dans la source par une augmentation linéaire de la température de la sonde porte échantillons de 50 à 300°C en 1 minute. Les températures de la source et des quadripôles étaient respectivement de 70°C et 150°C.

IV.2.2. Spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ont été mesurés à 400 MHz (^1H) et 100 MHz (^{13}C) avec un spectromètre Avance 400 (BRUKER). Les spectres du proton ^1H et du ^{13}C ont été enregistrés à l'aide de séquences impulsionnelles spécifiques fournies par BRUCKER. Les échantillons ont été au préalable dissous dans du méthanol deutéré CD_3OD . Les déplacements chimiques δ ont été exprimés en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane (TMS) utilisé comme référence interne.

III^{ème} partie: RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. ETUDES PHYTOCHIMIQUES

I.1. RESULTATS

I.1.1. Groupes chimiques caractérisés

Les résultats du criblage phytochimique effectué sur les extraits à l'hexane, au chloroforme et au méthanol (extractions successives au Soxhlet) de *Striga hermonthica* sont consignés dans le tableau 4.

Tableau 4: Groupes phytochimiques caractérisés

Groupes chimiques		Solvant d'extraction			
		hexane	chloroforme	méthanol	
				non hydrolysé	hydrolysé
Phénoliques	Composés				
	Aglycone flavonoïdique	-	+	++	+
	Coumarines	-	-	-	-
	Aglycone anthracénoside	-	-	-	+
	Tanins	n.d	n.d	-	-
	Anthocyanes	n.d	n.d	n.d	-
terpéniques	Composés				
	Triterpènes/ stéroïdes	++	-	++	++
	Caroténoïdes	-	-	n.d	-
	Saponosides	n.d	n.d	++	n.d
	Génine d'hétérosides cardiotonique	n.d	n.d	n.d	-

(-) négatif, (+) positif, (++) très positif, (n.d) non déterminé

RESULTATS ET DISCUSSIONS: Etudes phytochimiques de *Striga hermonthica*

Les tests en tube ont mis en évidence la présence de flavonoïdes et d'anthracenosides dans les extraits de *S. hermonthica*. Les flavonoïdes sont présents sous forme de génines peu polaires dans l'extrait chloroformique et polaires dans l'extrait méthanolique ainsi que sous la forme d'hétérosides (extrait méthanolique). Les tests appliqués n'ont pas révélés de coumarines, de tanins ou d'anthocyanes. Les flavonoïdes, notamment sous la forme de génines, constituent donc l'essentiel des composés polyphénoliques mis en évidence.

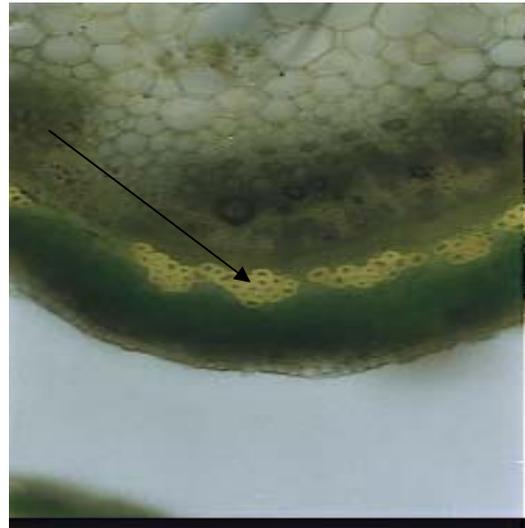
Pour ce qui concerne les composés terpéniques, nous n'avons détecté que des triterpénoïdes. Ils se présentent sous la forme de saponosides (hétérosides triterpéniques ou stéroïdiques) et de génines libres (triterpènes et/ou stéroïdes). Les caroténoïdes et les hétérosides cardiotoniques n'ont pas été détectés lors des criblages phytochimiques.

I.1.2. Histochimie

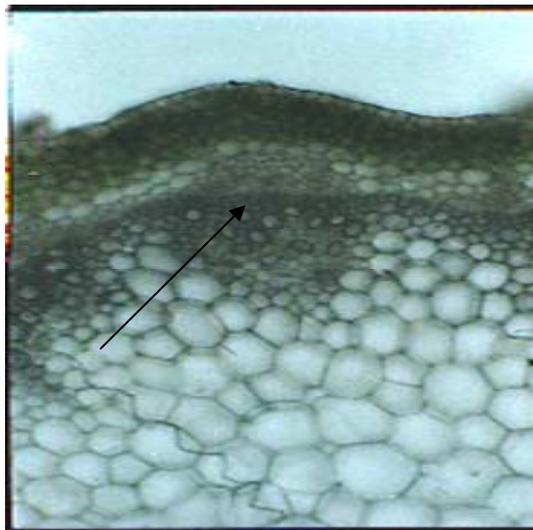
Les coupes histochimiques (Photo 2) permettent de localiser *in situ* certaines classes de composés polyphénoliques initialement mis en évidence par les tests généraux de caractérisation. Les tissus constitutifs de la tige sont identifiés suite à la coloration au carmino vert (Photo 2a). Les flavones, jaune en présence de NaOH 5% (Photo 2b), sont localisés au niveau du parenchyme cortical des tiges de *S. hermonthica*. Les colorations bleu en présence de FeCl₃ 3% et rouge violacée en présence de NH₄OH 5% caractérisent respectivement les tanins au niveau du xylème (Photo 2c) et des hydroxyméthylantraquinones dans le parenchyme médullaire (Photo 2d) des tiges de *Striga hermonthica* [Ciulei, 1982].



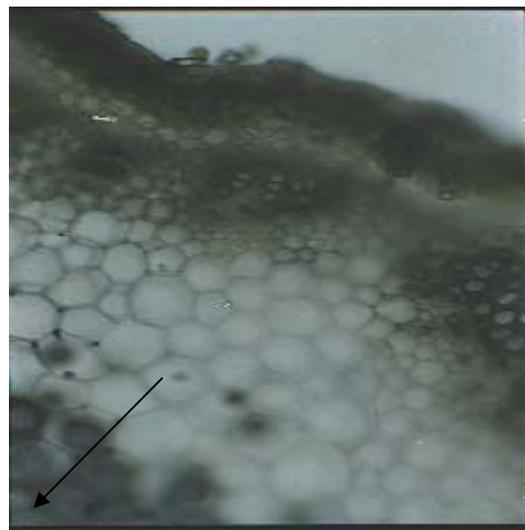
(a): coloration au carmino vert



(b): coloration à la soude 5%



(c): coloration au FeCl₃



(d): Coloration à l'ammoniaque 5%

- Photo 2:** Coupes histochimiques de tiges de *Striga hermonthica*, localisant:
- (a): Les différents tissus de la tige
 - (b): Les flavones dans le parenchyme cortical
 - (c): Les tanins dans le xylème
 - (d): Les hydroxyméthylantraquinones dans le parenchyme médullaire

I.1.3. Teneur en composés polyphénoliques

Le dosage spectrophotométrique des polyphénols porte sur les polyphénols totaux, les flavonoïdes, tanins et anthocyanosides de *Striga hermonthica*. Sur la base de courbes étalons établies pour chaque type de dosage (figures 12, 13, 14) les concentrations ($\mu\text{g/ml}$) en composés polyphénoliques des extraits de *S. hermonthica* sont calculées. Les résultats en équivalents acide gallique, acide tannique, quercétine ou apigénidine selon le cas sont exprimés en $\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ d'extrait sec (tableau 5) pour les besoins d'interprétation.

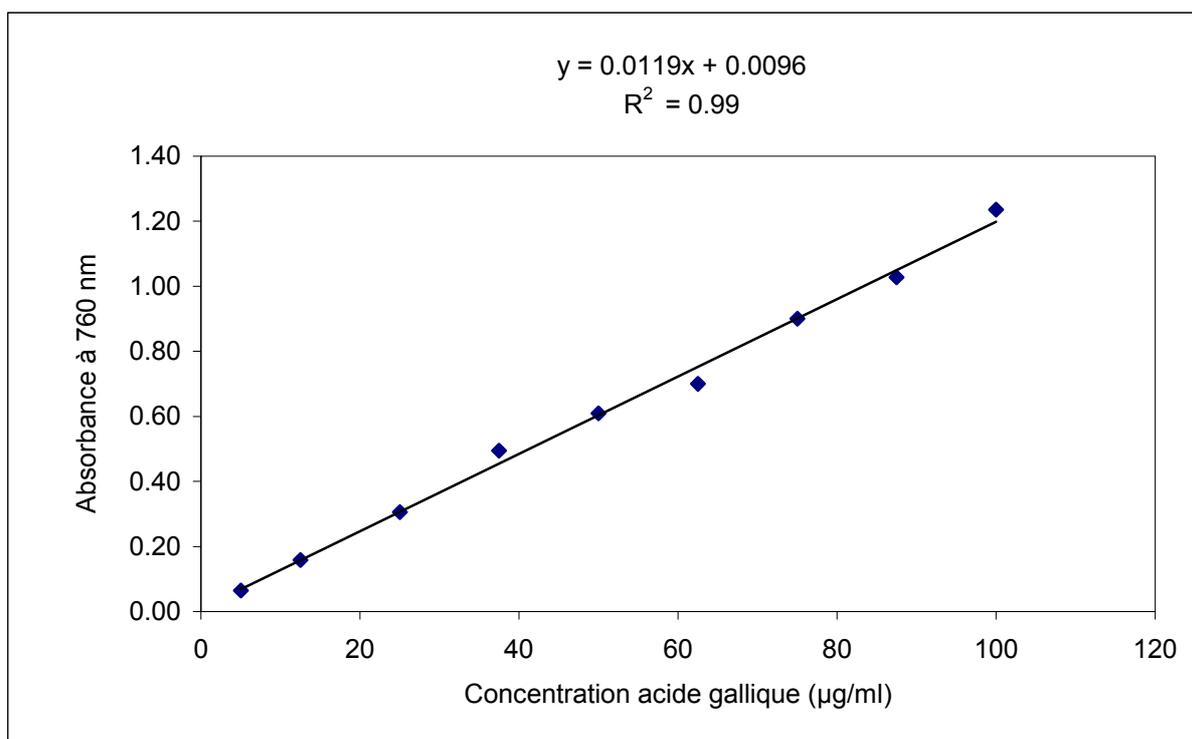


Figure 12: Courbe d'étalonnage de dosage des polyphénols totaux

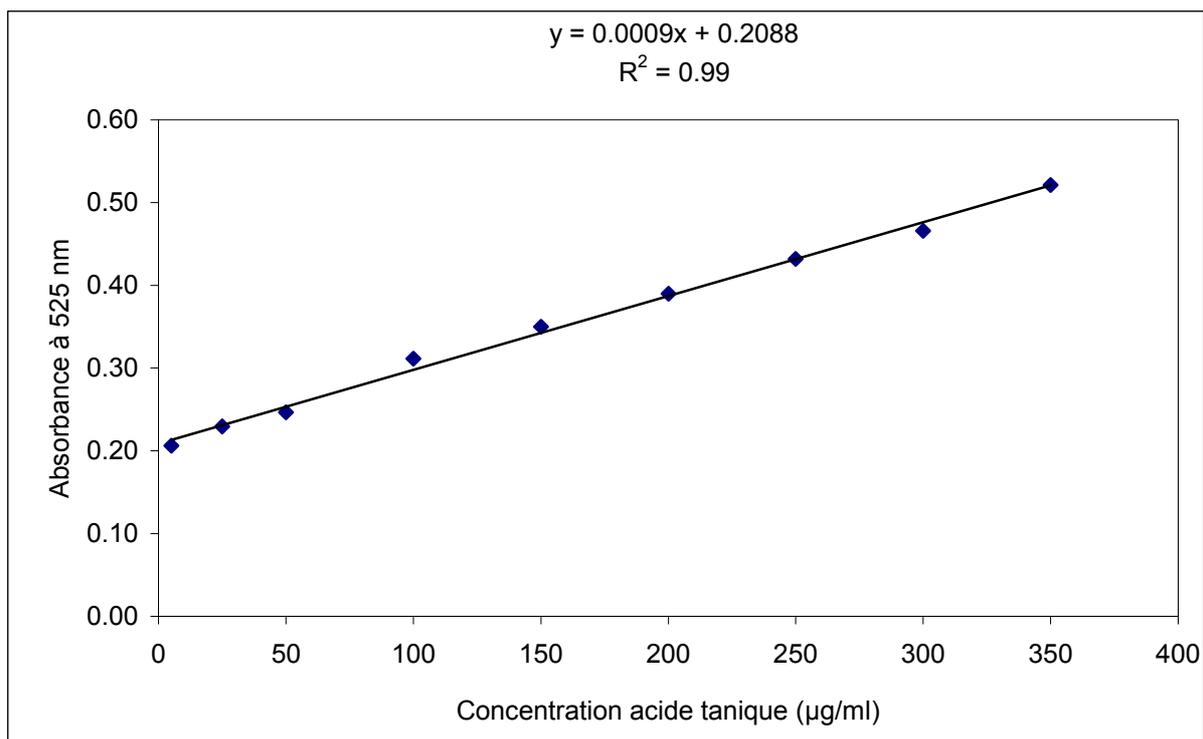


Figure 13: Courbe d'étalonnage de dosage des tanins

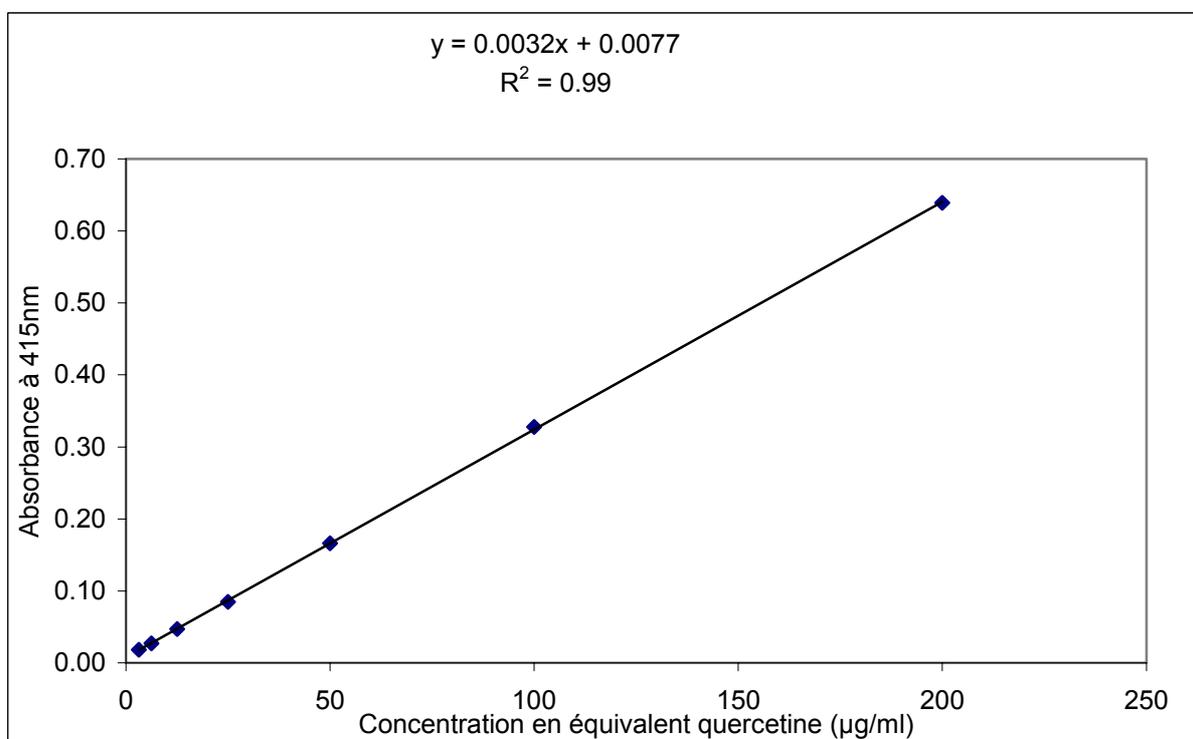


Figure 14: Courbe d'étalonnage de dosage des flavonoïdes

RESULTATS ET DISCUSSIONS: Etudes phytochimiques de *Striga hermonthica*

Tableau 5: Teneur en polyphénols d'extraits de *Striga hermonthica*

Extraits	**R%	Teneur en polyphénols ($\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ d'extrait)			
		*PPhénol ttx	Flavonoïdes	Tanins	Anthocyanoside
Acétone aqueux	6,10	$3,64 \pm 0,06$	$4,07 \pm 0,11$	$2,28 \pm 0,13$	$0,14 \pm 0,01$
<i>H₂O/acétone aqueux</i>	0,87	$20,70 \pm 0,10$	$1,97 \pm 0,01$	$11,19 \pm 0,43$	$0,32 \pm 0,07$
MeOH 100%	9,40	$1,98 \pm 0,05$	$1,74 \pm 0,03$	$0,93 \pm 0,07$	$0,45 \pm 0,05$
MeOH 80%	12,54	$3,00 \pm 0,07$	$1,16 \pm 0,04$	$1,12 \pm 0,13$	$0,52 \pm 0,07$
MeOH 50%pH2	18,00	$2,99 \pm 0,08$	$0,74 \pm 0,01$	$0,00 \pm 0,00$	$0,62 \pm 0,02$
<i>EtOAc/MeOH 50%PH2</i>	3,24	$9,58 \pm 0,14$	$5,14 \pm 0,05$	$0,00 \pm 0,00$	$0,91 \pm 0,18$
HCl aqueux pH2	16,10	$1,98 \pm 0,05$	$0,31 \pm 0,03$	$0,95 \pm 0,07$	$0,06 \pm 0,02$
<i>EtOAc/H₂O pH2</i>	3,22	$3,46 \pm 0,05$	$9,18 \pm 0,11$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$

(Moyenne \pm déviation standard de 5 essais)

* PPhénol ttx: Polyphénols totaux

**R%: Rendement d'extraction matière sèche

En terme de rendement d'extraction matière sèche, les solvants acides (MeOH 50% pH2 et HCl aqueux pH2) donnent les meilleurs résultats (18.00% et 16.10% respectivement) suivis du méthanol aqueux et du méthanol 100% (12.54% et 9.40% respectivement). L'acétone aqueux 80% donne le rendement d'extraction matière sèche le plus faible (6.10%) mais semble toutefois être le meilleur solvant d'extraction des polyphénols totaux de *Striga hermonthica* (3.64 $\mu\text{g}/100\mu\text{g}$). L'extraction au méthanol 100% et à l'acide chlorhydrique aqueux pH2 donnent les teneurs en polyphénols totaux les plus faibles (1.98 $\mu\text{g}/100\text{mg}$). L'acétone 80% aqueux donne également les teneurs en flavonoïdes et en tanins les plus élevées (respectivement 4.07% et 2.28%).

La somme des teneurs en anthocyane, tanins et flavonoïdes est supérieure à celle des polyphénols totaux dans les extraits acétone aqueux 80%, méthanolique 100% et la

RESULTATS ET DISCUSSIONS: Etudes phytochimiques de *Striga hermonthica*

fraction acétate d'éthyle de l'extrait aqueux acide (tableau 5). Ce constat, à priori troublant s'expliquerait par la réactivité du réactif de Folin Ciocalteu. En effet, ce réactif ne réagirait que sur les groupements hydroxyles libres des polyphénols; les hydroxyles fonctionnalisés ne réagissant pas [Singleton et al., 1999].

La teneur en flavonoïdes dépasse même celle des polyphénols totaux dosés dans l'extrait hydro acétone 80% et la fraction acétate d'éthyle de l'extrait aqueux acide. La quantification des flavonoïdes serait donc sous évaluée lors du dosage des polyphénols totaux très probablement du fait de la présence de flavonoïdes à groupements hydroxyles fonctionnalisés. *Striga hermonthica* contiendrait donc très probablement des flavonoïdes méthylés comme ceux mis en évidence par divers auteurs dans certaines espèces de *Striga* [Aquil, 1995; Aquil et al., 1996].

Tableau 6: Teneur en polyphénols totaux non flavonoïdiques

Extraits	Teneur en polyphénols ($\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ d'extrait)			
	*PPhénols n. F	Tanins	Anthocyanosides	Autres
Acétone aqueux	$2,26 \pm 0,14$	$2,28 \pm 0,13$	$0,14 \pm 0,01$	$0,00 \pm 0,00$
$H_2O/$ acétone aqueux	$1,97 \pm 0,20$	$11,19 \pm 0,43$	$0,32 \pm 0,07$	$0,00 \pm 0,00$
MeOH 100%	$2,03 \pm 0,09$	$0,93 \pm 0,07$	$0,45 \pm 0,05$	$0,66 \pm 0,14$
MeOH 80%	$1,73 \pm 0,09$	$1,12 \pm 0,13$	$0,52 \pm 0,07$	$0,16 \pm 0,09$
MeOH 50%pH2	$1,60 \pm 0,04$	$0,00 \pm 0,00$	$0,62 \pm 0,02$	$1,06 \pm 0,06$
$EtOAc/MeOH$	$5,14 \pm 0,14$	$0,00 \pm 0,00$	$0,91 \pm 0,18$	$4,13 \pm 0,14$
HCl aqueux pH2	$1,69 \pm 0,04$	$0,95 \pm 0,07$	$0,06 \pm 0,02$	$0,68 \pm 0,09$
$EtOAc/H_2O$ pH2	$9,18 \pm 0,14$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$3,48 \pm 0,05$

(Moyennes de 5 essais \pm SD)

* Polyphénols n. F: Polyphénols totaux non flavonoïdiques

RESULTATS ET DISCUSSIONS: Etudes phytochimiques de *Striga hermonthica*

Le dosage des polyphénols totaux non flavonoïdiques permet (par soustraction des teneurs en tanins et anthocyanes) d'estimer la teneur en polyphénols autres que les flavonoïdes, tanins et anthocyanosides (tableau 6). Les polyphénols autres que les flavonoïdes, tanins et anthocyanosides regrouperaient éventuellement les acides phénols et les quinones (naphtoquinone, anthraquinone, benzoquinone).

La figure 15 donne une idée de l'abondance en flavonoïdes, tanins, anthocyanosides et autres polyphénols dans les différents extraits de *Striga hermonthica*.

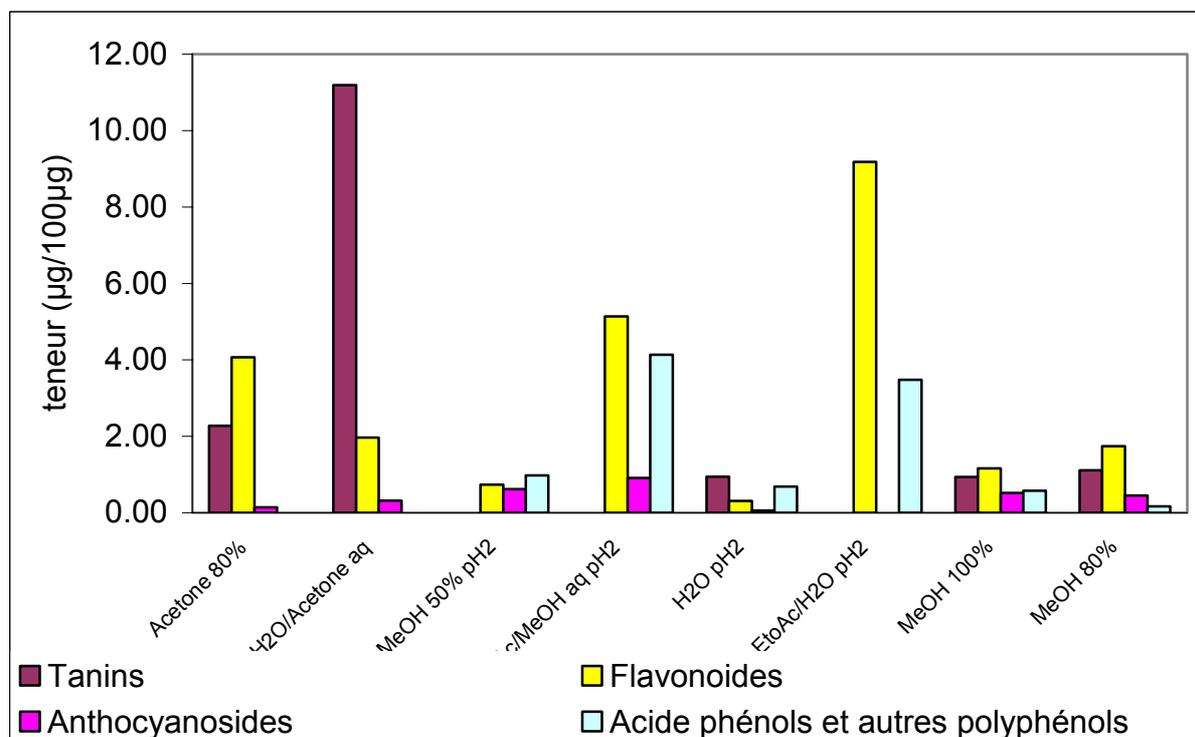


Figure 15: Profil en polyphénols des extraits de *Striga hermonthica*

De tous les polyphénols dosés, les flavonoïdes se révèlent être les plus abondants dans les extraits acétone aqueux, méthanol, méthanol aqueux et les fractions acétate d'éthyle des extraits acide. L'acétone 80% aqueux qui donne le rendement d'extraction matière sèche le plus faible serait le meilleur solvant d'extraction

RESULTATS ET DISCUSSIONS: Etudes phytochimiques de *Striga hermonthica*

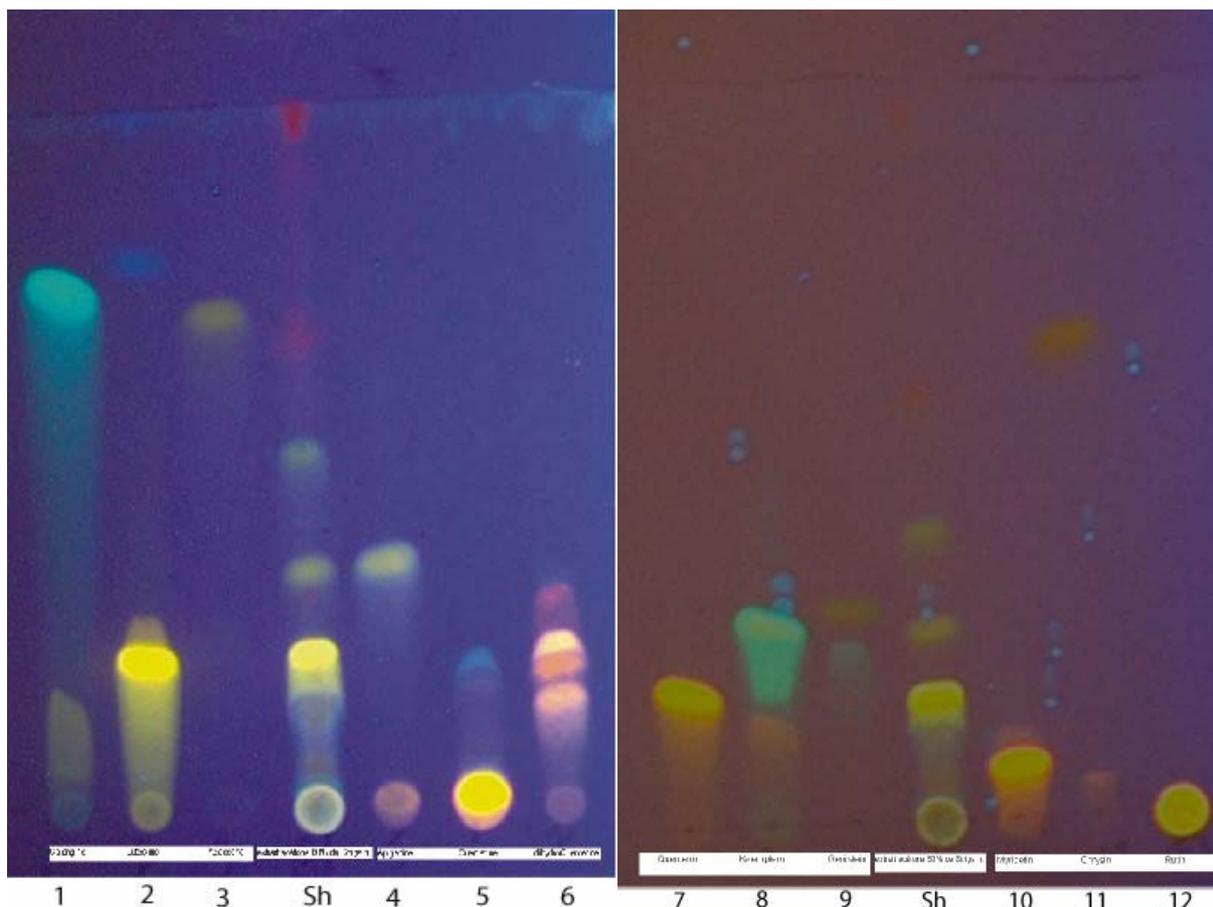
des polyphénols totaux de *Striga hermonthica* particulièrement des flavonoïdes et tanins. Ce solvant n'extrait toutefois pas les acides phénols (libres ou non) et autres polyphénols de la plante. Les acides phénols et autres polyphénols de *Striga hermonthica* sont extraits par les autres solvants utilisés, le maximum d'extraction étant obtenu avec le méthanol aqueux acide. Cet extrait présente également la plus forte teneur en anthocyanosides.

Dans la suite de ce travail, nous nous intéresserons particulièrement aux flavonoïdes et dans une moindre mesure aux acides phénols de *Striga hermonthica*. L'extrait acétone 80% aqueux servira à l'étude qualitative des flavonoïdes et l'extrait méthanolique aqueux à celle des acides phénols.

I.1.4. Analyse CCM des flavonoïdes

Les chromatogrammes révèlent 3 spots jaunes bien distincts correspondant aux flavonoïdes majoritaires de l'extrait acétone aqueux 80% de *Striga hermonthica*. Nous observons également une traînée jaune qui dénote de l'existence de flavonoïdes minoritaires que le système chromatographique n'a pas pu séparer.

La comparaison des r_f et des couleurs des spots correspondant aux flavonoïdes majoritaires de *Striga hermonthica* avec ceux des flavonoïdes de référence utilisés nous permet de supposer que l'extrait acétone aqueux 80% contient de l'apigénine mais également la lutéoline et/ou de la quercitrine. En effet, lutéoline et quercitrine en plus d'avoir les mêmes r_f dans nos conditions expérimentales présentent la même coloration. Nous n'avons par contre pas réussi à identifier le troisième flavonoïde majoritaire qui ne correspond à aucune des substances de références utilisées, ni aucun des flavonoïdes minoritaires. Les chromatogrammes montrent également de légers spots bleus caractéristiques des acides phénols.



Chromatogramme 1: Extrait hydro acétone 80% de *S. hermonthica*

Eluant: Chloroforme/Méthanol 10/0,75, Révélateur : réactif de Neu

- (1) Galangine, (2) Lutéoline, (3) Acacetine, (4) Apigénine, (5) Quercétine,
(6): Dihydroquercétine, (7) Quercitrine, (8) Kaempferol, (9) Génistéine
(10) Myricétine, (11) Chryisine, (12) Rutine, (Sh) extrait de *S. hermonthica*

L'analyse CCM n'a pas permis d'identifier formellement la lutéoline et/ ou la quercitrine dans l'extrait acétone 80% aqueux de *S. hermonthica*. De même, elle ne permet pas de séparer les flavonoïdes minoritaires qui se présentent sous forme de traînée. Une méthode HPLC-DAD optimisée pour la séparation des polyphénols permettrait de pouvoir distinguer la lutéoline de la quercitrine, de séparer et de préciser la nature des flavonoïdes minoritaires et du troisième flavonoïde majoritaire à défaut de pouvoir les identifier (absence de flavonoïdes de référence indiqués).

RESULTATS ET DISCUSSIONS: Etudes phytochimiques de *Striga hermonthica*

I.1.5. Optimisation de la séparation des polyphénols

Des essais préliminaires ont permis de fixer les valeurs extrêmes maximale et minimale constituant le domaine expérimental de l'étude (tableau 7).

Tableau 7: Domaine expérimental de l'étude

Paramètres expérimentaux	X _{min}	X ₀	X _{max}
X ₁ : Proportion initiale d'acétonitrile (% v/v)	1	3	5
X ₂ : Proportion finale d'acétonitrile (% v/v)	40	55	70
X ₃ : Durée du gradient (min)	40	45	50
X ₄ : Débit d'élution (ml.min ⁻¹)	1	1.5	2

Tableau 8: Matrice des essais et des réponses (CRF)

Expérience	Rang	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	CRF
1	1	-1	-1	-1	-1	53,7367
2	14	+1	-1	-1	-1	27,2283
3	22	-1	+1	-1	-1	51,3441
4	8	+1	-1	+1	-1	21,6544
5	18	-1	+1	+1	-1	54,0935
6	9	+1	+1	+1	-1	36,1383
7	15	-1	-1	-1	+1	66,9711
8	2	-1	+1	-1	+1	27,8605
9	6	+1	+1	-1	+1	12,3068
10	16	-1	-1	+1	+1	68,515
11	20	+1	-1	+1	+1	52,1348
12	3	+1	+1	+1	+1	27,3733
13	10	-1	0	0	0	51,2591
14	17	+1	0	0	0	21,638
15	19	0	-1	0	0	68,9428
16	21	0	+1	0	0	43,7657
17	7	0	0	-1	0	32,6095
18	4	0	0	+1	0	50,7937
19	5	0	0	0	-1	54,4539
20	11	0	0	0	+1	59,1288
21	12	0	0	0	0	48,6639
22	13	0	0	0	0	48,5918
23	23	0	0	0	0	48,8198

RESULTATS ET DISCUSSIONS: Etudes phytochimiques de *Striga hermonthica*

Les 23 expériences programmées par la matrice des essais permettent de calculer les réponses expérimentales correspondantes (tableau 8). La matrice des réponses ne montre aucune réponse aberrante selon la loi de distribution normale (figure 16).

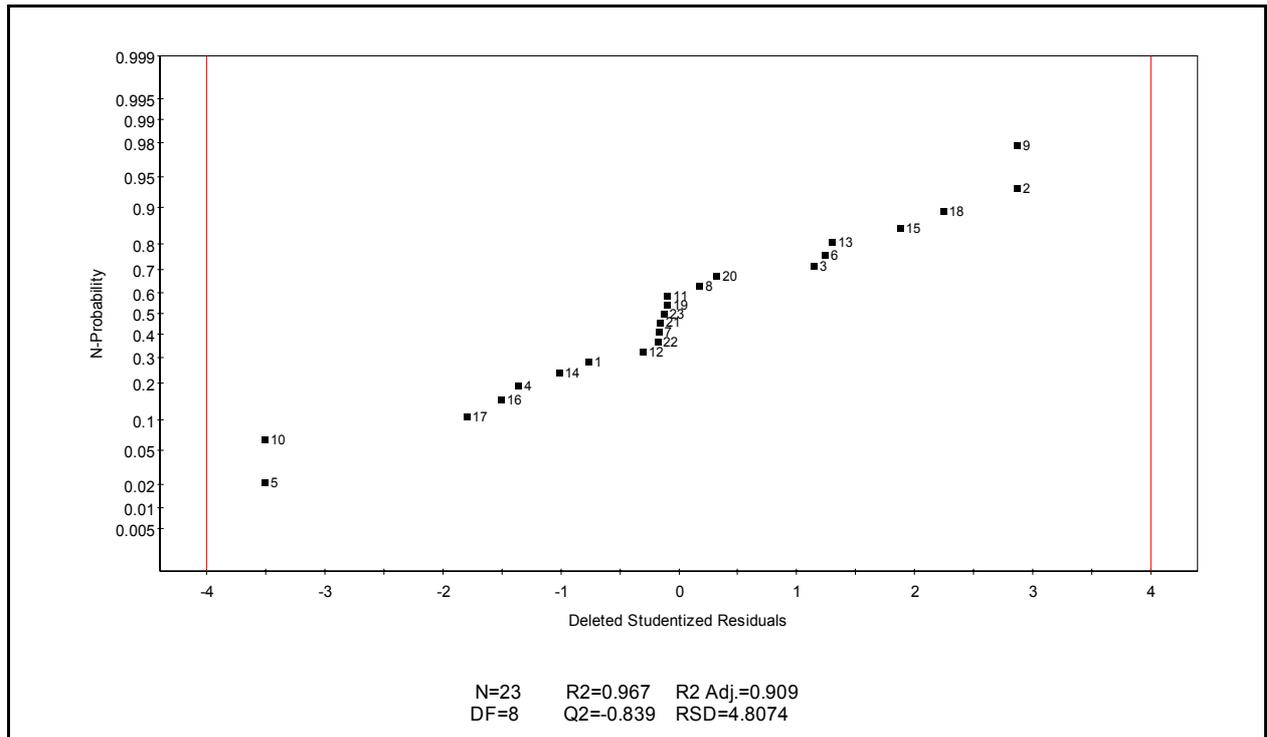


Figure 16: Loi de distribution normale des points expérimentaux

La régression multiple linéaire (RML) permet de modéliser le CRF par l'équation 1:

$$\text{Equation 1: } \eta = 49.45 - 11.15X_1 - 7.69X_2 + 3.56X_3 + 1.61X_4 - 13.38X_1^2 + 6.52X_2^2 - 8.13X_3^2 + 6.95X_4^2 \\ + 1.08X_1X_2 + 0.78X_1X_3 + 2.17X_1X_4 + 2.82X_2X_3 - 8.34X_2X_4 + 1.82X_3X_4$$

La figure 17 présente les coefficients de régression du modèle ainsi que leurs incertitudes à 90% d'intervalle de confiance. Toutefois ce modèle n'est pas satisfaisant en ce sens qu'il ne présente pas un bon pouvoir de prédiction; le coefficient de prédiction étant inférieure à 0.5 ($Q^2 = -0.84$).

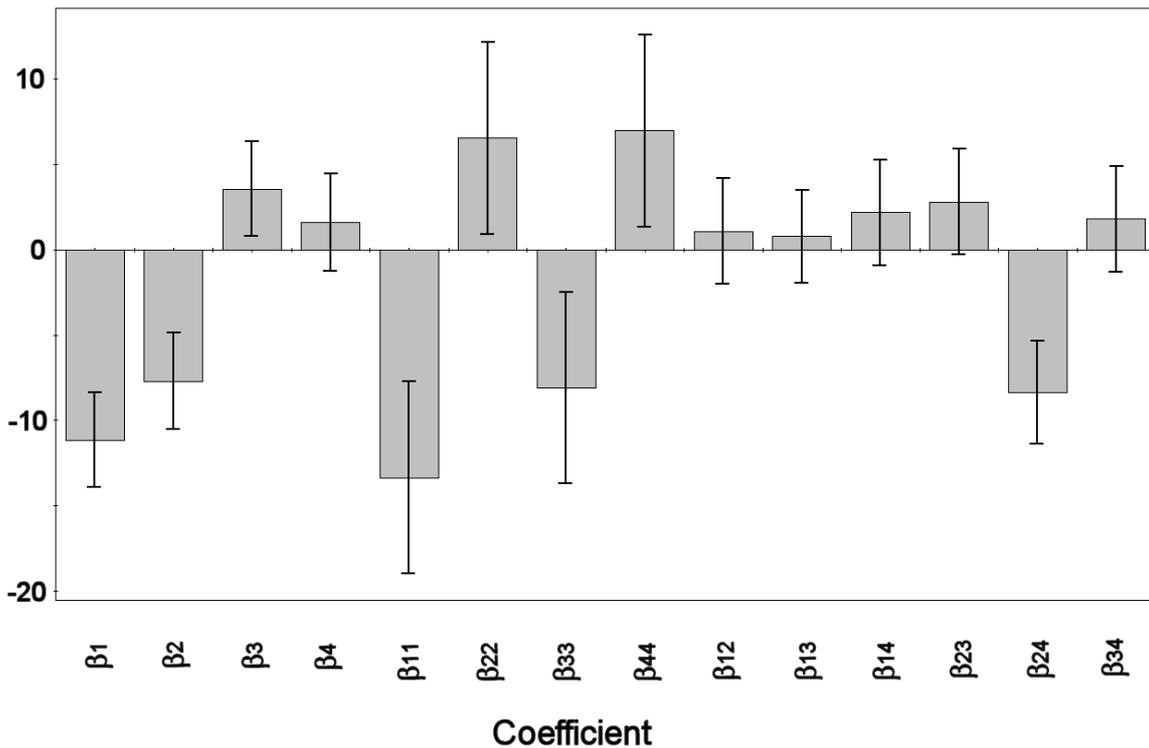


Figure 17: Coefficients de régression du modèle obtenus par RML

Afin d'améliorer le pouvoir de prédiction du model initial, les coefficients non significatifs sont éliminés avec pour objectif d'améliorer autant que possible la qualité statistique du modèle. Le meilleur modèle empirique est donné par la relation 2:

$$\text{Equation 2: } \eta = 49.40 - 11.15X_1 - 8.46X_2 + 3.56X_3 + 2.07X_4 - 13.30X_1^2 + 6.60X_2^2 - 8.05X_3^2 + 7.03X_4^2 + 3.04X_1X_4 + 3.33X_2X_3 - 8.35X_2X_4$$

Les coefficients de corrélation $R^2=0.959$ et de détermination $R^2_{adj}=0.918$ révèlent une bonne modélisation du CRF par la régression multiple linéaire. En outre le modèle possède un bon pouvoir de prédiction $Q^2=0.773$. L'analyse de la variance (ANOVA) indique que la probabilité de la régression du modèle est significatif ($p=0.000 \ll 0.05$); cependant la probabilité d'observer un défaut d'ajustement est également significatif ($p=0.001 \ll 0.05$). Toutefois, ce léger défaut d'ajustement ne nuit en rien à la validité du modèle car Q^2 est supérieure à 0.5 [Eriksson et al., 2000]. Le model mathématique obtenu est donc statistiquement satisfaisant pour décrire le CRF dans le domaine

RESULTATS ET DISCUSSIONS: Etudes phytochimiques de *Striga hermonthica*

expérimental défini. Il servira donc à la prédiction de meilleures conditions expérimentales pour l'analyse chromatographique des composés phénoliques de *Striga hermonthica*. La figure 18 représente l'influence de quelques effets d'interaction des facteurs expérimentaux sur le CRF.

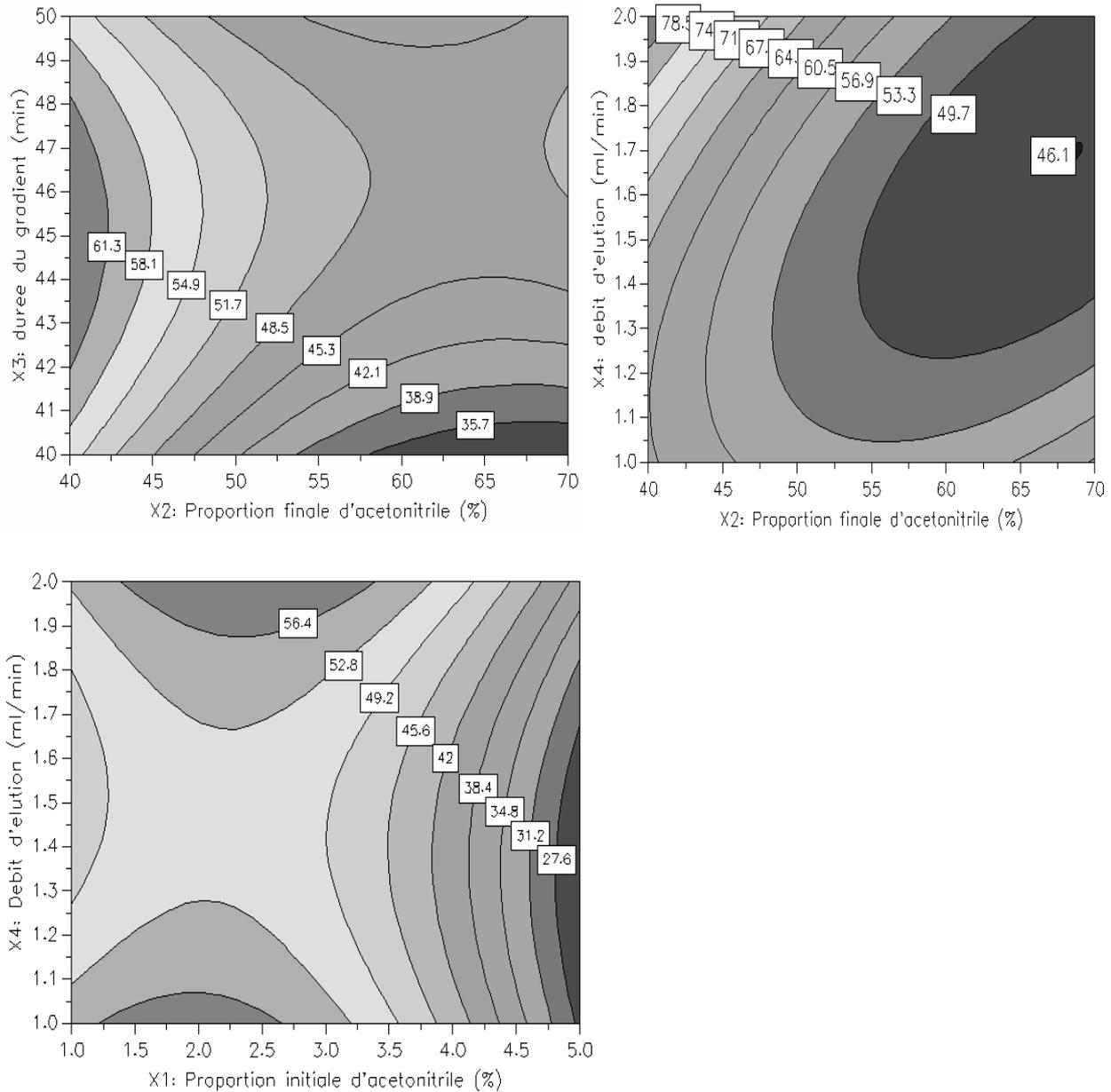


Figure 18: Variations du CRF en fonction des paramètres expérimentaux

RESULTATS ET DISCUSSIONS: Etudes phytochimiques de *Striga hermonthica*

Comme illustré (figure 18), le CRF est maximisé dans les conditions expérimentales suivantes: proportion finale d'acétonitrile (X_2) minimisée, proportion initiale d'acétonitrile (X_1) autour de 2%, durée du gradient (X_3) d'environ 45min et débit de la pompe (X_4) maximisée. Afin de déterminer de façon plus précise la valeur optimale des facteurs expérimentaux, la méthode simplex de Nelder Mead est utilisée pour la prédiction. Elle présente l'avantage sur la méthode graphique d'optimiser le CRF en utilisant tous les facteurs en même temps. Nous fixons arbitrairement à 76 la valeur du CRF souhaitable afin de prédire les conditions expérimentales optimales. La séparation chromatographique optimale est illustrée par la figure 19. Le pourcentage d'acétonitrile en début (X_1) et en fin de gradient (X_2) sont respectivement fixés à 2% et 43%, la durée du gradient (X_3) à 45min et le débit de la pompe (X_4) à 2ml/min.

Acétonitrile (%)

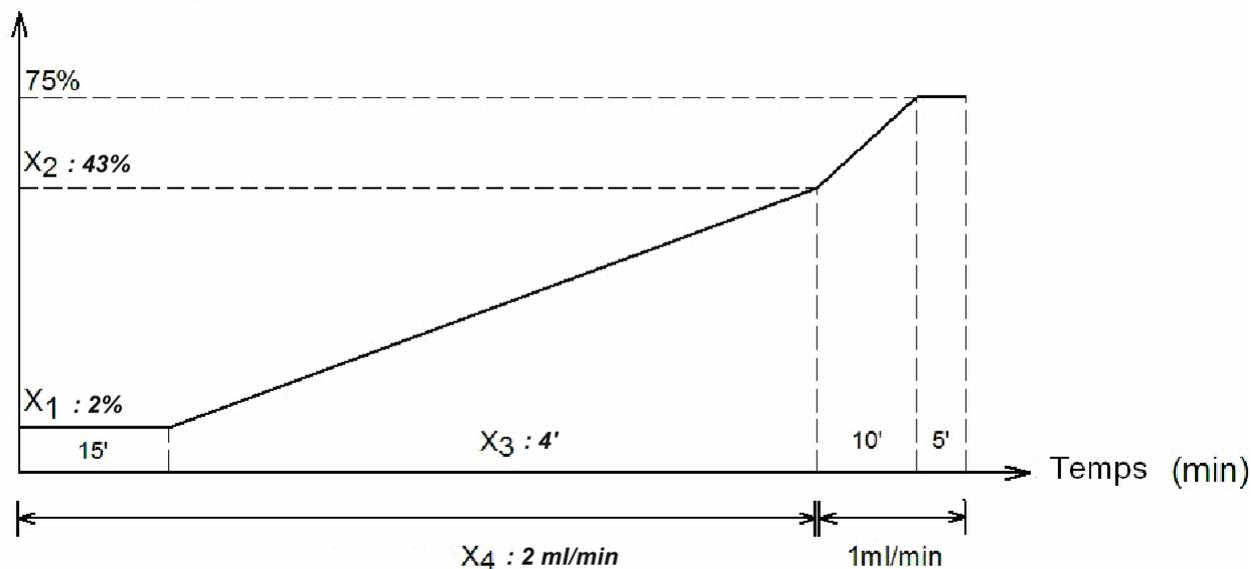
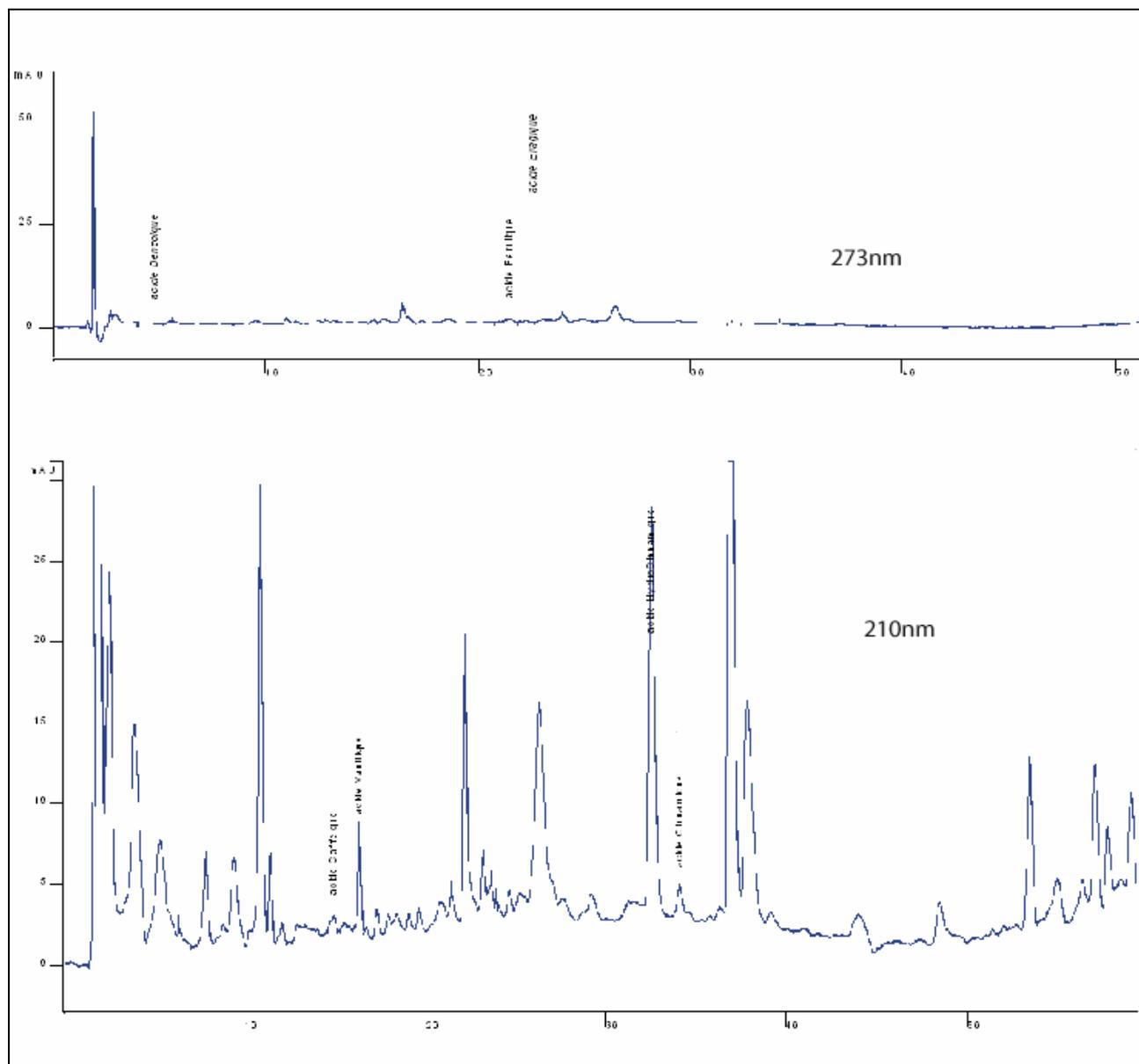


Figure 19: Méthode HPLC optimisée

Appliquée à la séparation du mélange artificiel de 8 acides phénols de référence, cette méthode chromatographique donne un CRF expérimental de 68.6 conforme à 99% au CRF théorique prédit. Elle sera donc utilisée pour l'analyse HPLC des acides phénols et flavonoïdes des extraits de *Striga hermonthica*.

I.1.6. Analyse HPLC des acides phénols et des flavonoïdes

Les chromatogrammes de l'extrait méthanol aqueux 80% à 210 et 273nm sont donnés ci après (chromatogramme 2).



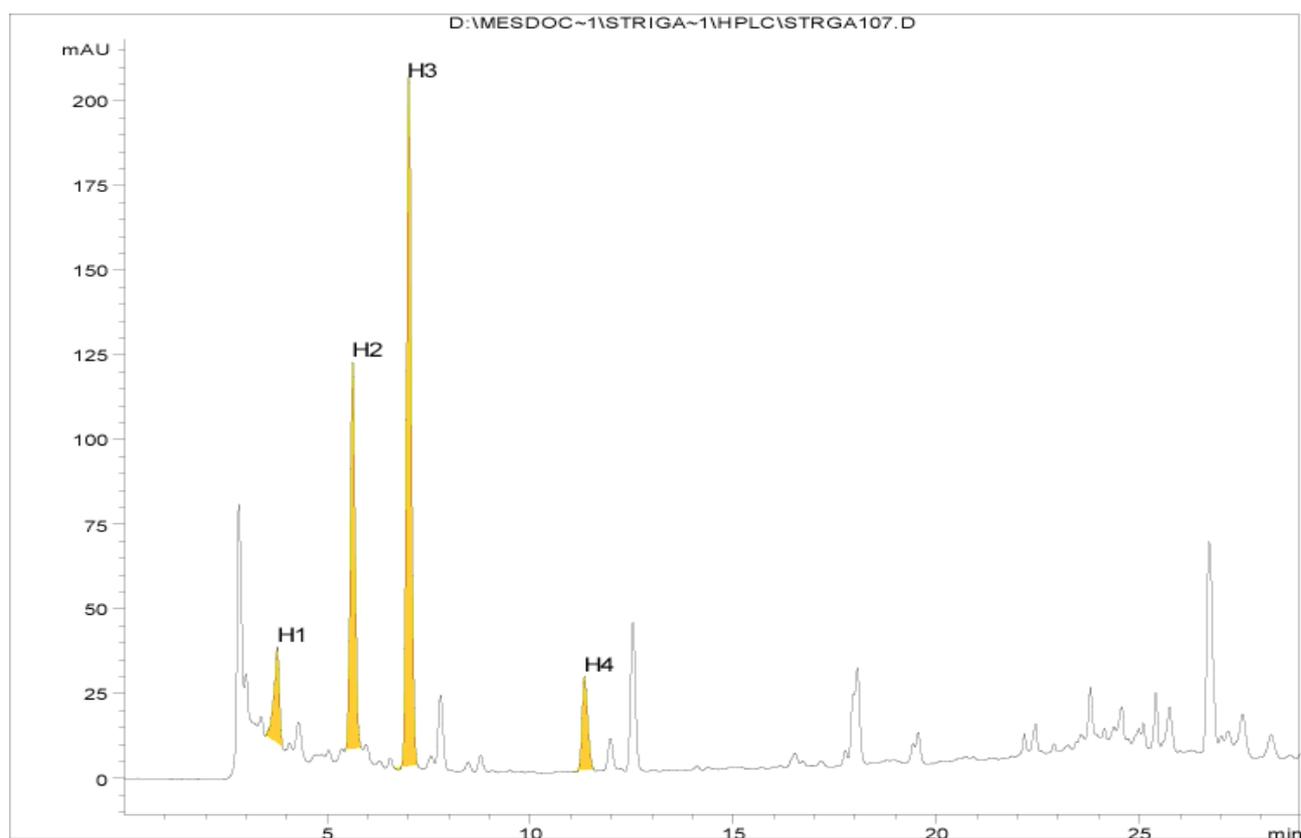
Chromatogramme 2: HPLC des acides phénols de l'extrait méthanol aqueux 80%

En nous basant uniquement sur les temps de rétention, l'extrait contiendrait les acides phénols que sont les acides ellagique, férulique, cinnamique, hydroxycinnamique, vanillique et caféique. Toutefois, la comparaison des spectres

RESULTATS ET DISCUSSIONS: Etudes phytochimiques de *Striga hermonthica*

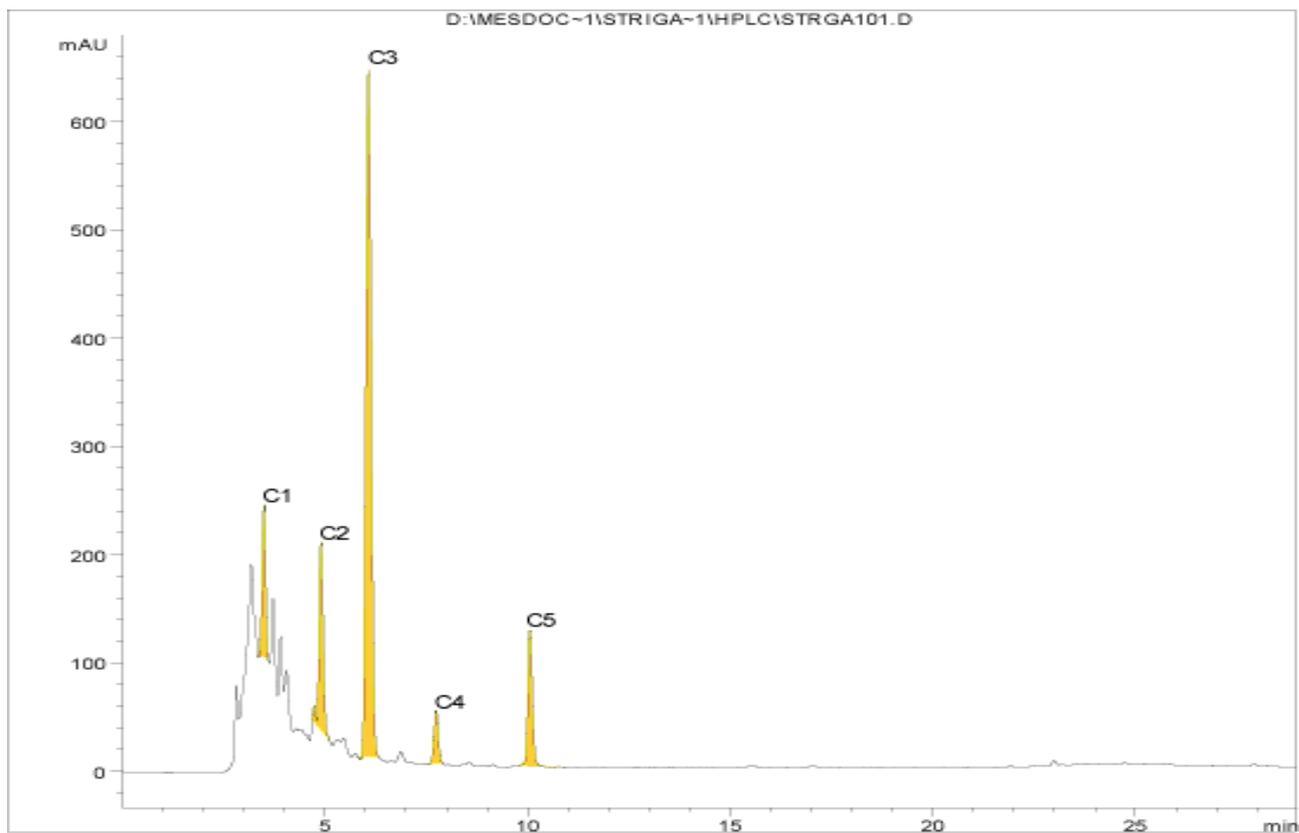
UV/visible des pics avec ceux des substances de référence ne permet pas de confirmer la présence de ces acides phénols. L'extrait hydro méthanolique 80% de *Striga hermonthica* ne contient donc aucun des acides phénols de référence (acides benzoïque, gallique, ferulique, caféique, vanillique, ellagique, cinnamique et hydroxycinnamique) de notre étude.

La méthode HPLC optimisée est également utilisée pour l'analyse chromatographique des fractions hexane, chloroforme et acétate d'éthyle de l'extrait hydro acétone 80%. Les pics à spectre UV/visible caractéristique des flavonoïdes sont identifiés (chromatogrammes 3, 4, 5).

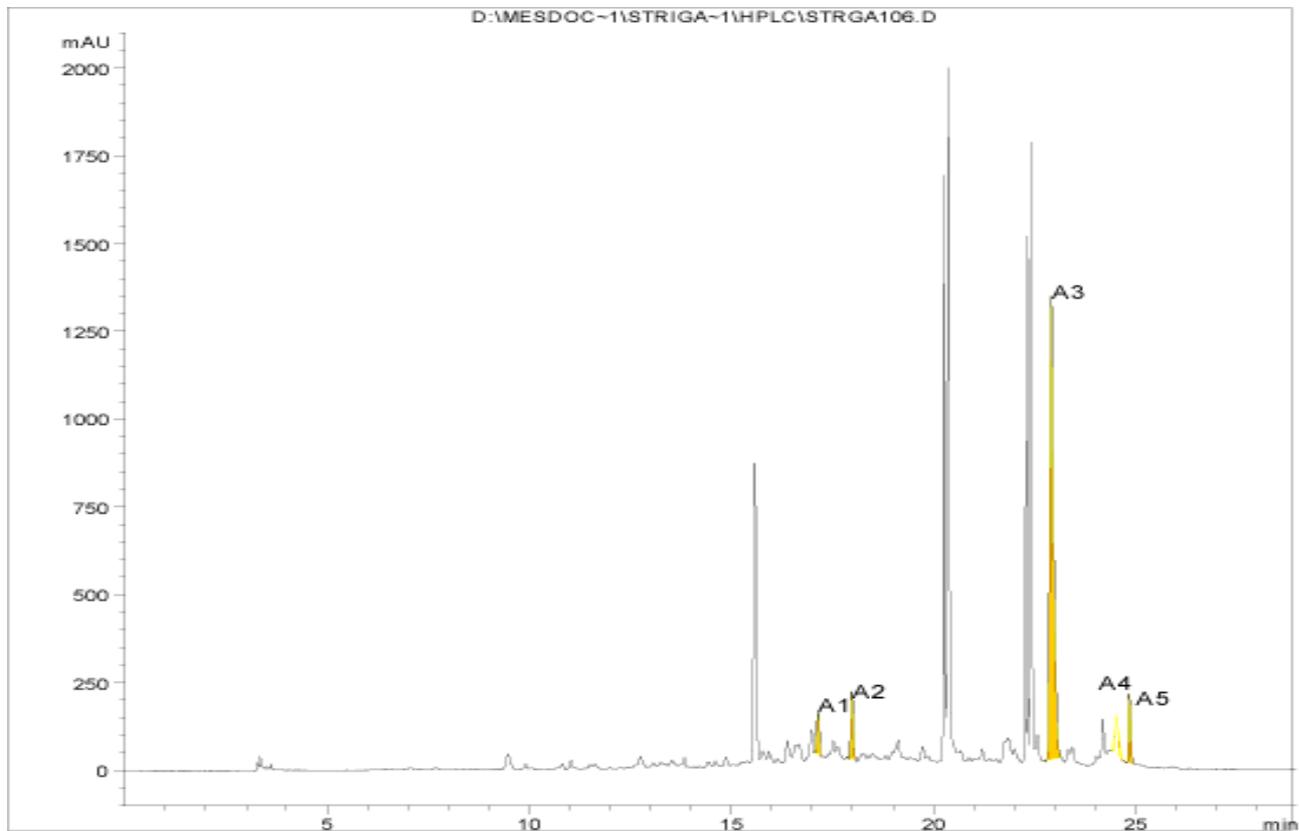


Chromatogramme 3: HPLC des flavonoïdes de la fraction hexane

RESULTATS ET DISCUSSIONS: Etudes phytochimiques de *Striga hermonthica*



Chromatogramme 4: HPLC des flavonoïdes de la fraction chloroforme



Chromatogramme 5: HPLC des flavonoïdes de la fraction acétate d'éthyle

RESULTATS ET DISCUSSIONS: Etudes phytochimiques de *Striga hermonthica*

Les longueurs d'onde d'absorbance maximale des spectres UV/visible de flavonoïdes détectés dans les fractions hexane, chloroforme et acétate d'éthyle sont consignées dans le tableau 9.

Tableau 9: Longueur d'onde caractéristique des flavonoïdes détectés

Pics	tr (min)	λ_{\max} (nm) Bande II	λ_{\max} (nm) Bande I
H1	3.770	268	338, 344
H2	5.633	254, 292sh	350
H3	7.015	266	342
H4	11.338	220, 268	336
C1	3.506	268	326
C2	4.910	254	350
C3	6.080	266	340
C4	7.745	250, 268	342
C5	10.059	268	334
A1	17.143	266	338
A2	17.993	266	334
A3	22.910	250, 266	344, 348
A4	24.509	248, 268	340
A5	24.842	268	326

sh: épaulement

La comparaison de ces données avec celles de la littérature nous permet de penser que les 14 flavonoïdes détectés dans les fractions hexane, chloroforme et acétate d'éthyle de *S. hermonthica* sont essentiellement des flavones et/ou des flavonols. Le spectre UV/visible des flavonoïdes est caractérisé par la longueur d'onde maximale d'absorbance des cycles B (bande I) et A (bande II) [Rice-Evans et al., 1996]. Flavones et flavonols sont caractérisés par une bande I dans la région 320-385nm et une bande II dans l'intervalle 250-285nm; la bande I des flavones étant toujours plus

RESULTATS ET DISCUSSIONS: Etudes phytochimiques de *Striga hermonthica*

courte de 20 à 30nm par rapport à celle de flavonols équivalents. Les flavanones et dihydroflavonols par contre ont leur maximum (bande II) entre 270-285nm et seulement un épaulement pour la bande I. Les anthocyanes sont caractérisés par une bande I entre 450-560nm et une bande II dans l'intervalle 240-280nm. L'augmentation du nombre de groupements hydroxyles induit un déplacement des λ_{\max} vers la droite (effet bathochrome); glycosylations et O-méthylations induisant un effet hypsochrome (déplacement des λ_{\max} vers la gauche).

La comparaison des spectres UV/visibles et des temps de rétention des flavonoïdes de *S. hermonthica* avec ceux de quelques flavonoïdes de référence disponible (Lutéoline, apigénine, acacétine, chrysin, galangine, rhamnétine, kaempferol, quercitrine, quercétine dihydrate, rutine, quercétine) nous permet d'identifier les pics C₅ et A₃ comme étant respectivement l'apigénine et la lutéoline. Pour les autres pics de flavonoïdes, les valeurs de λ_{\max} correspondant à la bande I nous donnent à supposer que ce sont des flavones. En effet, ces valeurs sont toutes comprises dans la partie gauche de l'intervalle 320-385nm.

I.2. DISCUSSION

Les tests classiques de caractérisation phytochimique en tube tels que décrit par Ciulei (1982) nous ont permis de mettre en évidence un certain nombre de composés polyphénoliques de *Striga hermonthica*. Ainsi, des génines et des hétérosides flavonoïdiques ainsi que des anthracenosides ont été détectés. En plus des polyphénols, des composés terpéniques (caroténoïdes, saponosides et triterpènes/stéroïdes) ont également été caractérisés. Le criblage phytochimique n'a pas permis de détecter des hétérosides cardiotoniques. Leur présence aurait impliqué un risque de toxicité en médecine traditionnelle lié à la cardiotoxicité des hétérosides cardiotoniques.

RESULTATS ET DISCUSSIONS: Etudes phytochimiques de *Striga hermonthica*

Les composés polyphénoliques ont par la suite été localisés par histochimie dans les tissus de la tige de *Striga hermonthica*. Ainsi, les flavonoïdes (essentiellement des flavones) sont localisés dans le parenchyme cortical, les tanins dans le xylème tandis que les anthraquinones (hydroxyméthylés) se retrouvent plutôt au niveau du parenchyme médullaire des tiges de *Striga hermonthica*.

Au niveau du parenchyme cortical, les flavones protégeraient les pieds de *Striga* contre les rayonnements UV [Bruneton, 1993; Shirley, 1996]. Le caractère hydrolysable ou non hydrolysable des tanins n'a pas été établi, toutefois l'absence d'acide gallique dans l'extrait méthanolique 80% aqueux nous permet d'affirmer que ce sont essentiellement des tanins catéchiques. Les anthocyanosides n'ont pu être détectés par le test classique de caractérisation probablement du fait de sa sensibilité limitée. En effet, le dosage spectrophotométrique donne des teneurs relativement faibles. Les anthocyanosides seraient spécifiquement et exclusivement localisés dans les cellules épidermiques des pétales des fleurs [Harborne et Grayer, 1988] de *S. hermonthica* dont ils assurent la coloration rose.

Le dosage spectrophotométrique révèle la présence de composés polyphénoliques autres que les tannins, flavonoïdes et anthocyanosides dosés. Au nombre de ceux-ci on retrouve des hydroxyméthylantraquinones mis en évidence par histochimie. Le dosage spectrophotométrique permet de mettre en évidence des flavonoïdes libres (Hydroxyles libres) et méthoxylés (Hydroxyles méthylés) dans les extraits de *Striga hermonthica*. Ce constat est parfaitement en accord avec la littérature qui fait état de la présence de l'apigénine et de la 5-hydroxy-6,8-diméthoxyflavone 7,4'-O-diglucoside dans *S. hermonthica* [Choudhury et al., 2000; Khan et al., 1998].

La macération de la poudre de *Striga hermonthica* dans de l'acétone aqueux 80% donne les meilleurs rendements en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins. Cette procédure n'est pas adaptée à l'extraction des polyphénols autres que les

RESULTATS ET DISCUSSIONS: Etudes phytochimiques de *Striga hermonthica*

flavonoïdes, tanins et anthocyanosides. L'extraction au méthanol à chaud extrait par contre ces autres polyphénols au nombre desquels on peut compter les hydroxyméthylantraquinones et éventuellement des acides phénols.

L'optimisation par "Plan d'expérience" nous a permis de mettre au point une méthode HPLC-DAD de séparation des polyphénols. Optimisée sur un mélange de 8 acides phénols de structure chimique très proche (acides benzoïque, gallique, ferulique, caféique, vanillique, ellagique, cinnamique et hydroxycinnamique) cette méthode s'est révélée efficace pour la séparation d'un mélange de 12 flavonoïdes de référence disponibles au laboratoire (lutéoline, apigénine, acacétine, chrysin, galangine, rhamnétine, kaempferol, quercitrine, quercétine dihydrate, rutine, quercétine).

La méthode HPLC-DAD optimisée a permis la séparation de 14 flavonoïdes de l'extrait acétone aqueux 80%. Les spectres UV/visible de ces flavonoïdes permet de préciser leur nature. Les spectres enregistrés sont caractéristiques des flavones et des flavonols. En effet, leurs spectres UV/visible, présentent 2 régions d'absorbance maximales entre 320-385nm (bande I) et 250-285nm (bande II). Toutefois, selon les données bibliographiques disponibles sur les flavonoïdes isolées d'autres espèces du genre *Striga* et selon les valeurs de λ_{\max} de la bande I des spectres UV/Vis ces flavonoïdes seraient des flavones. En effet, tous les flavonoïdes isolés à ce jour des espèces du genre *Striga* sont des flavones [Nakanishi et al., 1985; Ramesh et yuvarajan, 1992; Aquil et Khan, 1993; Aquil et al., 1994; Aquil, 1995; Aquil et al., 1996; Hiremath et Hanumantharao, 1997; Khan et al., 1998; Choudhury et al., 2000; Hiremath et al., 2000].

Parmi les flavones séparés dans l'extrait acétone 80% aqueux, nous avons identifié l'apigénine et la lutéoline par comparaison de leur temps de rétention et de leur spectre UV/visible avec ceux des flavonoïdes de référence disponibles. L'apigénine a déjà été identifiée dans les extraits de *S. hermonthica* [Choudhury et al., 2000]

cependant, ce serait la première fois, à notre connaissance que la lutéoline serait identifiée dans cette plante.

L'analyse HPLC-DAD de l'extrait méthanolique de *S. hermonthica* n'a permis de mettre en évidence aucun des 8 acides phénols de référence utilisés dans cette étude. L'acide shikimique (acide organique) a été mis en évidence dans un extrait éthanolique de *S. hermonthica* [Rank et al., 2004]. La voie du shikimate conduisant à la biosynthèse des acides phénols [Häkkinen, 2000], nous pouvons penser qu'il pourrait exister des acides phénols dans *Striga hermonthica* autres que ceux utilisés comme substances de référence. Les acides phénols pourraient également exister sous la forme d'esters.

I.3. CONCLUSION PARTIELLE

Les polyphénols de *Striga hermonthica* sont pour l'essentiel constitués de flavones, de tanins et d'hydroxyméthylantraquinones localisés respectivement au niveau du parenchyme cortical, du xylème et du parenchyme médullaire des tiges. Les flavones de *S. hermonthica* existent sous la forme de génines libres (groupements hydroxyles libres), de génines fonctionnalisés (groupements hydroxyles fonctionnalisés) et d'hétérosides.

La procédure HPLC-DAD optimisée a permis de mettre en évidence 14 flavones dans les fractions hexane, chloroforme et acétate d'éthyle de l'extrait acétone 80% aqueux de *Striga hermonthica*. En outre, deux flavones, en l'occurrence la lutéoline et l'apigénine ont été identifiés. Aucun des 8 acides phénols de référence utilisés dans l'étude n'a été mis en évidence dans l'extrait méthanolique.

II. CRIBLAGE DES PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

II.1. TOXICITE AIGUË

II.1.1. Résultats

La toxicité aiguë du macéré hydro méthanolique de *Striga hermonthica* est évaluée sur souris NMRI au bout de 24 heures d'administration par voie intra péritonéale. Le tableau 10 indique les taux de mortalités correspondant aux doses administrées. L'équation de la droite de régression donnant la mortalité animale en fonction du logarithme de la dose d'extrait y est indiquée ainsi que les valeurs de DL₁, DL₅, DL₅₀, DL₉₅ et DL₉₉ calculées.

Tableau 10: Effet dose-réponse sur la mortalité des souris NMRI

Dose (mg/kg/j)	Mortalité (%)
1550	20.00 ± 0.00
1650	40.00 ± 16.33
1750	53.33 ± 9.33
1850	66.67 ± 9.33
2150	86.67 ± 9.33
2300	93.33 ± 9.33
$Y = 178.89\ln(x) - 1286.4, R^2 = 0.96$	
DL ₁ : 1331 ± 74 mg/kg/j	DL ₅₀ : 1753 ± 44 mg/kg/j
	DL ₉₅ : 2259 ± 8 mg/kg/j
DL ₅ : 1361 ± 73 mg/kg/j	DL ₉₉ : 2310 ± 14 mg/kg/j
(Moyenne ± déviation standard de 3 essais, 5 animaux par lot)	

RESULTATS ET DISCUSSIONS: Propriétés biologiques de *Striga hermonthica*

Il existe une bonne corrélation ($R^2 = 0.96$) entre les taux de mortalité enregistrés et les doses d'extrait administrées. L'équation de la droite de régression peut donc être utilisée. Cette dernière nous permet d'estimer la DL_{50} de l'extrait hydro méthanolique de *S. hermonthica* à 1753 ± 44 mg/kg. La dose maximale d'extrait à ne pas dépasser pour éviter tout risque de mortalité animale est d'environ 1331 mg/kg tandis qu'une dose approximative de 2310 mg/kg entraîne une mortalité quasi certaine. Les rapports DL_{50}/DL_5 et DL_{95}/DL_{50} sont égales (1.3), attestant de la régularité de la pente de la droite de régression. Le rapport DL_{95}/DL_5 indique un indice de sécurité étroit de 1.7.

II.1.2. Discussion

L'étude de la toxicité aiguë nous a permis de fixer à 1331mg/kg le seuil maximum d'administration à ne pas dépasser afin d'éviter tout risque de mortalité immédiate. En accord avec l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner, nous pouvons considérer que l'extrait hydro méthanolique de *Striga hermonthica* est faiblement toxique par voie intra péritonéale sur souris NMRI [Hodge et Sterner, 1943]. En effet, la valeur de la DL_{50} (1750 mg/kg) est comprise dans l'intervalle 500-5000 mg/kg. L'extrait hydro méthanolique de *S. hermonthica* est moins toxique que celui de *S. orobanchioides* (DL_{50} 1029mg/kg) [Harish et al., 2001] qui est utilisé comme contraceptif, anti-histaminique et antioxydant [Harish et al., 2001; Badami et al., 2003]. La faible toxicité aiguë sur souris NMRI est également applicable à l'homme toujours selon l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1943).

Évaluée dans les mêmes conditions, la DL_{50} serait généralement plus faible par voie intra péritonéale, que par voie orale (l'extrait serait généralement plus toxique par voie intra péritonéale que par voie orale). Sur le plateau central du Burkina Faso, *Striga hermonthica* est utilisé le plus souvent par voie orale ou cutanée [Nacoulma, 1996].

RESULTATS ET DISCUSSIONS: Propriétés biologiques de *Striga hermonthica*

Seuls les métabolites secondaires susceptibles de traverser la barrière gastro-intestinale ou la peau après ou sans modification sont à même de gagner le milieu intérieur. Ces formes d'administration présenteraient ainsi moins de risque potentiel en terme de toxicité aiguë que la voie intra péritonéale.

Striga hermonthica ne présenterait que très peu de risque de toxicité aiguë par voie orale ou cutanée chez l'Homme. Ce résultat est corroboré par l'absence d'indication de toxicité aigue ou de dose maximale d'utilisation liée à l'utilisation traditionnelle de la plante [Nacoulma, 1996]. La faible valeur de l'indice de sécurité (1.7) impose toutefois une utilisation délicate en thérapeutique si les doses actives se situaient au niveau des doses toxiques.. Cet aspect est atténué par le caractère faiblement toxique de l'extrait quand on sait qu'il faut environ 1.3g d'extrait par kilogramme de poids corporel pour présenter un risque de mortalité; soit 75g d'extrait sec pour un individu de 50kg, ce qui est énorme.

Les résultats de l'étude permettent de comprendre l'inexistence de toxicité immédiate de *Striga hermonthica* dans les conditions traditionnelles d'utilisation thérapeutique.

II.2. CYTOTOXICITE

II.2.1. Résultats

La cytotoxicité du macéré hydro méthanolique de *Striga hermonthica* est évaluée sur des cellules tumorales A549 de poumon humain. Les taux de viabilité cellulaire enregistrés à différentes concentrations de l'extrait hydro méthanolique brut et de ses fractions sont consignés dans le tableau 11.

RESULTATS ET DISCUSSIONS: Propriétés biologiques de *Striga hermonthica*

Tableau 11: Effet dose-réponse sur la viabilité de cellules tumorales A549

[C] (µg/ml)	Extrait brut	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3	Fraction 4	Fraction 5
0,05	90,5 ± 3,9	95,8 ± 7	103,4 ± 4,5	92,3 ± 4,8	97,0 ± 2,8	95,3 ± 4,6
0,1	88,3 ± 4	98,8 ± 5,8	105,1 ± 6,7	97,1 ± 3,2	99,7 ± 2,3	98,9 ± 4,7
0,5	89,5 ± 3,2	94,7 ± 5,2	95 ± 6	86,5 ± 5,1	93,5 ± 3,1	92,2 ± 4,4
1	90,3 ± 3,6	96,6 ± 5,3	101,6 ± 4,2	100,4 ± 5,3	99,2 ± 5,4	107,7 ± 4,8
5	91 ± 3,4	78,6 ± 5,2	99,5 ± 4,6	89,9 ± 4,9	93,1 ± 2,8	102,2 ± 1,8
10	92,6 ± 2,1	68,5 ± 5,5	100,4 ± 5,4	95,9 ± 6,3	99,7 ± 2,8	108,2 ± 5,0
50	80,4 ± 4,5	22,7 ± 7,2	23,1 ± 7,7	24,9 ± 5,7	91,3 ± 2,9	107,3 ± 4,3
100	74,8 ± 4,5	3,8 ± 1	2,9 ± 0,5	7,4 ± 2,5	72,8 ± 6,7	119,9 ± 6,6

(Moyenne ± déviation standard de 5 essais)

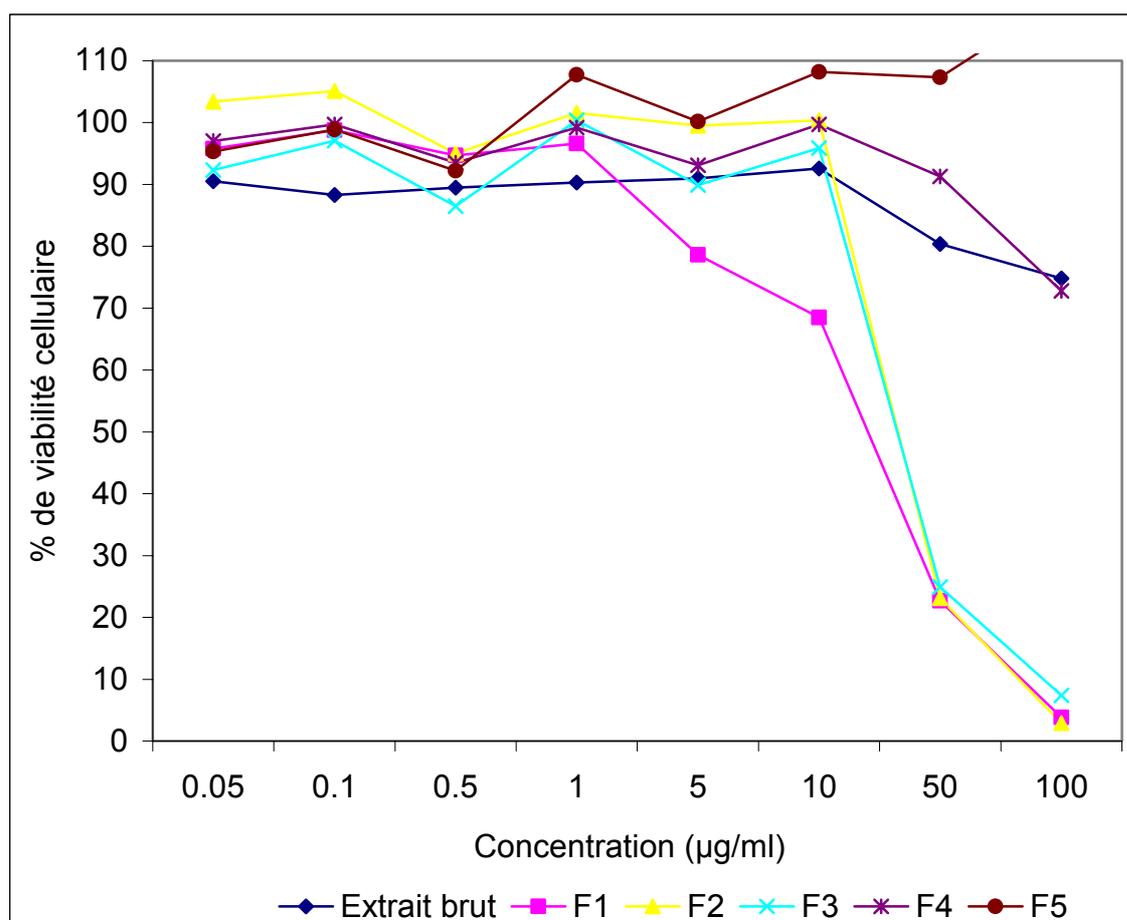


Figure 20: Viabilité de la lignée A549 en fonction de la concentration d'extraits

RESULTATS ET DISCUSSIONS: Propriétés biologiques de *Striga hermonthica*

La courbe donnant le pourcentage de viabilité cellulaire en fonction de la concentration d'extraits (figure 20) permet de déterminer les CC_{50} (tableau 12) de chaque extrait et fractions.

Tableau 12: Concentration cytotoxique 50 sur cellules tumorales A549

Extraits de <i>S. hermonthica</i>	CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Extrait brut hydro méthanolique	> 100
Fraction 1: hexane/ acétone 8/2	26
Fraction 2: hexane/ acétone 5/5	36
Fraction 3: acétone	36
Fraction 4: acétone/ méthanol 8/2	> 100
Fraction 5: méthanol	> 100

Pour tous les extraits testés, le taux de viabilité cellulaire est quasi constant entre 0.05 $\mu\text{g/ml}$ et 10 $\mu\text{g/ml}$. A partir de 10 $\mu\text{g/ml}$, le taux de cellules viables chute fortement sous l'effet des fractions F1, F2 et F3 pour pratiquement s'annuler à 100 $\mu\text{g/ml}$. L'extrait brut et la fraction F4 n'entraînent qu'une faible mortalité cellulaire pendant que la fraction F5 n'induit aucune mortalité cellulaire entre 10 $\mu\text{g/ml}$ et 100 $\mu\text{g/ml}$.

Les fractions F1 (hexane/ acétone 8:2), F2 (hexane/ acétone 5:5) et F3 (acétone) exercent une activité cytotoxique notable sur la souche A549. La fraction F1 est la plus active ($CC_{50} = 26\mu\text{g/ml}$), les fractions F2 et F3 présentant la même cytotoxicité.

L'extrait hydro méthanolique de *Striga hermonthica* contient donc des métabolites secondaires (Fractions F1, F2 et F3) toxiques sur les cellules tumorales A549.

II.2.2. Discussion

L'extrait hydro méthanolique de *Striga hermonthica* ne présente pas de cytotoxicité observable sur les cellules tumorales A549 humaines dans la gamme de concentration testée. En effet, la CC_{50} de l'extrait hydro méthanolique n'a pu être déterminée ($> 100\mu\text{g/ml}$). Toutefois, quelques fractions de l'extrait montrent une activité cytotoxique notable (CC_{50} de 26 et $36\mu\text{mg/ml}$).

L'extrait hydro méthanolique contiendrait donc des molécules cytotoxiques (en elles même ou par effet de synergie) présentes cependant en concentration insuffisante pour conférer à l'extrait brut une cytotoxicité observable. Le potentiel antitumoral de *Striga hermonthica* pourrait éventuellement être mieux exploité à travers d'autres types d'extraits moins polaires qui concentreraient d'avantage les molécules cytotoxiques.

Striga hermonthica, comme toutes les Scrophulariaceae serait riche en iridoïdes [Bruneton, 1993]. Les iridoïdes interviennent comme cytotoxines dans le système de défense de la plante contre les herbivores et autres prédateurs [Alder et al., 1995]. L'acide mussaeosidique, glucoside d'iridoïde, à été mis en évidence à très faible teneur (1.2 mg/g d'extrait sec) dans l'extrait hydro méthanolique de *Striga hermonthica* [Rank et al., 2004]. Bien que les formes glucosidiques d'iridoïdes ne soient pas toxiques (ou le soient faiblement), la rupture de la liaison osidique par une β -glucosidase (*in situ* dans la plante) libère un aglycone toxique [Konno et al., 1999]. La cytotoxicité des aglycones d'iridoïdes résulte d'une réaction de Schiff avec les protéines [Kim et al., 2000].

Le séchage du matériel végétal avant extraction hydro méthanolique garantirait l'intégrité des glucosides d'iridoïdes de *Striga hermonthica*, justifiant la faible cytotoxicité de l'extrait. Une extraction sur du matériel frais permettrait d'accroître le potentiel antitumoral du *Striga* par l'augmentation de la teneur en aglycones d'iridoïdes.

II.3. ACTIVITES INSECTICIDES

II.3.1. Résultats

Les taux de mortalité des adultes, larves et œufs de *Callosobruchus maculatus* ainsi que le taux d'adultes émergeant de graines traitées par l'extrait acétone de *Striga hermonthica*, les fractions éther de pétrole et triterpénique sont consignés dans les tableaux 13 et 14.

Bien que les doses utilisées pour l'étude de l'activité insecticide de l'extrait brut sur les bruches adultes soient du simple au double (0.5 et 1% w/w soit 100 et 200mg d'extrait pour 20g de niébé), nous enregistrons les mêmes taux de mortalité qui, toutefois diffèrent du témoin pendant les 96 premières heures (Tableau 13). Parce que la durée de vie des adultes de *C. maculatus* est de 5 à 7 jours dans les conditions optimales [Bal, 1992], nous n'avons tenu compte que des 96 premières heures pour l'interprétation des résultats. L'extrait acétone n'exerce donc qu'une faible activité insecticide sur la forme adulte de *Callosobruchus maculatus*.

Tableau 13: Mortalité cumulée des adultes de *Callosobruchus maculatus*

Dose d'extrait	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
Témoin*	0	0 ^a	1 ^a	3 ^a	6 ^a	8 ^a	10 ^a
0.5 % (w/w)**	0	2 ^b	4 ^b	5 ^b	9 ^b	9 ^a	10 ^a
1 % (w/w)**	0	3 ^b	4 ^b	5 ^b	9 ^b	10 ^a	10 ^a

(Moyennes de 3 essais)

* 20g de niébé traité uniquement avec 1 ml de solvant

** Pourcentage massique d'extrait par rapport aux graines traitées

^{a,b,c} Les moyennes de la même colonne suivies de lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Newman-keuls (P<0.05)

RESULTATS ET DISCUSSIONS: Propriétés biologiques de *Striga hermonthica*

Tableau 14: Taux de mortalité des oeufs et larves de *Callosobruchus maculatus* et taux d'adultes de première génération émergeant des graines

<u>Taux (%)</u>	<u>Extraits de <i>Striga hermonthica</i></u>			
	<u>Témoin*</u>	<u>Extrait brut</u> 0.5 % (w/w)**	<u>Fraction Ep</u> 0.4 % (w/w)**	<u>Fraction isolée</u> 0.02 % (w/w)**
Mortalité des œufs	7 ± 4 ^a	51 ± 3 ^b	55 ± 5 ^b	75 ± 4 ^c
Mortalité des larves	27 ± 6 ^a	29 ± 2 ^a	80 ± 3 ^b	31 ± 3 ^a
Adultes émergeant	68 ± 7 ^a	35 ± 3 ^b	9 ± 2 ^c	17 ± 2 ^d

(Moyenne ± déviation standard de 3 essais)

* 20g de niébé traité uniquement avec 1 ml de solvant

** Pourcentage massique d'extrait par rapport aux graines traitées

^{a,b,c}: Les moyennes de la même ligne suivies de lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Newman-Keuls (P<0.05)

Le tableau 14 montre, pour tous les extraits testés, un impact significatif sur le taux de mortalité des oeufs de *C. maculatus*. Aux doses testées, 51% des œufs traités avec l'extrait acétone, 55% des œufs traités par la fraction éther de pétrole et 75% de ceux traités avec la fraction triterpénique ne parviennent pas à éclosion contre seulement 7% des œufs témoins. Les œufs non éclos dans les lots traités demeurent translucides comme ceux des lots témoins mais diffèrent de par leur aspect desséché contrairement aux témoins. En accord avec la littérature [HO, et al. 1995], le dessèchement des œufs traités permet de conclure que les extraits testés seraient tous doués de propriété ovicide.

Le taux de mortalité des larves n'est pas significativement différent du lot témoin (27%) pour ce qui concerne l'extrait acétone (29%) et la fraction triterpénique (31%). Contrairement à ces extraits, la fraction éther pétrole de l'extrait brut présente un taux de mortalité larvaire de 80% (tableau 14). Seule la fraction éther de pétrole serait douée

RESULTATS ET DISCUSSIONS: Propriétés biologiques de *Striga hermonthica*

de propriété larvicide notable; notons néanmoins que l'émergence des adultes au niveau des graines traitées avec l'extrait brut débute avec un retard de 3 jours par rapport au témoin. L'imprégnation des graines avec les différents extraits tests a pour impact global de réduire le taux d'adultes qui émergent des graines à la première génération; soient 35% d'émergence pour l'extrait acétone, 9% pour la fraction éther de pétrole et 17% pour la fraction triterpénique contre 68% pour le lot témoin (tableau 17). Ce résultat serait la conséquence directe des taux de mortalité constatés sur les larves et/ou œufs.

Le tableau 15 récapitule les effets ovicides et larvicides des extraits testés. La fraction éther de pétrole présente le plus large spectre d'effets insecticides. Elle exerce ainsi un effet larvicide de 72% en plus de l'effet ovicide de 51% lorsqu'elle est utilisée à la dose de 0.4% w/w (80mg pour 20g de niébé). L'extrait acétone et la fraction triterpénique induisent des effets ovicides de 48% et 73% aux doses respectives de 0.5 et 0.02% w/w (100mg et 4mg pour 20g de niébé).

Tableau 15: Efficacité ovicide et larvicide des extraits de *Striga hermonthica*

<u>Efficacité (%)</u>	<u>Extraits de <i>Striga hermonthica</i></u>		
	<u>Extrait brut</u>	<u>Fraction Ep</u>	<u>Fraction isolée</u>
	0.5 % (w/w)**	0.4 % (w/w)**	0.02 % (w/w)**
Ovicide	48 ± 3 ^a	51 ± 5 ^a	73 ± 4 ^b
Larvicide	3 ± 3 ^a	72 ± 4 ^b	6 ± 4 ^a

(Moyennes ± SD de 3 essais)

^{a,b} : Les moyennes de la même ligne suivies de lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Newman-Keuls (P<0.05)

** Pourcentage massique d'extrait par rapport aux graines traitées

RESULTATS ET DISCUSSIONS: Propriétés biologiques de *Striga hermonthica*

Le tableau 16 donne une idée de l'efficacité des différents extraits au travers de leur DL₅₀ et DL₉₀ sur les oeufs et les larves de *C. maculatus*. L'évolution de ces valeurs pour ce qui concerne l'activité ovicide traduit bien la concentration des molécules ovicides au cours du fractionnement. Ainsi la DL₅₀ de la fraction triterpénique isolée est environ 40 fois plus faible que celle de l'extrait brut (3 contre 128 mg/20g). La phase éther de pétrole présente le plus large spectre d'activités insecticides. Des DL₅₀ de 97 et 69 mg/20g de niébé sont respectivement obtenues pour les activités ovicides et larvicides.

RESULTATS ET DISCUSSIONS: Propriétés biologiques de *Striga hermonthica*

Tableau 16: Effets dose réponse sur les oeufs et larves de *Callosobruchus maculatus*

Extrait brut acétone			Fraction éther de pétrole			Fraction isolée		
Dose*	%Ovicide	% Larvicide	Dose*	% Ovicide	% Larvicide	Dose*	% Ovicide	% Larvicide
200	77 ± 2	n.s	160	82 ± 3	100 ± 0	4	73 ± 4	n.s
150	58 ± 2	n.s	120	73 ± 3	90 ± 3	3	65 ± 2	n.s
100	48 ± 3	n.s	80	51 ± 5	72 ± 4	2	40 ± 1	n.s
75	28 ± 3	n.s	40	10 ± 1	53 ± 3	1,5	30 ± 2	n.s
50	10 ± 3	n.s	20	n.s	5 ± 3	1	10 ± 1	n.s
$Y_{\text{ovicide}} = 0.2379 + 1.0367 \text{Log}[\text{Dose}] , R^2 = 0.92$			$Y_{\text{ovicide}} = 0.0907 + 1.1732 \text{Log}[\text{Dose}] , R^2 = 0.93$ $Y_{\text{larvicide}} = 0.5876 + 0.9971 \text{Log}[\text{Dose}] , R^2 = 0.90$			$Y_{\text{ovicide}} = 1.9892 + 1.0542 \text{Log}[\text{Dose}] , R^2 = 0.93$		
DL50	128	ind.	DL50	97	69	DL50	3	ind.
DL90	205	ind.	DL90	147	113	DL90	4	ind.

(Moyenne ± SD de 3 essais)

*Dose de traitement exprimée en masse d'extrait (mg) imprégnant 20g de graines de niébé

Y: Equation de la droite de régression log-probit

II.3.2. Discussion

L'extrait acétone de *Striga hermonthica* est très faiblement biocide sur les adultes de *Callosobruchus maculatus*; ce qui ne justifie pas son utilisation comme insecticide contre la forme adulte de la bruche du niébé.

Par contre, cet extrait pourrait avantageusement être utilisé pour ses propriétés ovicides. En effet, les résultats préliminaires obtenus à la dose de 0.5% w/w révèlent un effet ovicide de 48% avec pour impact une réduction de moitié du niveau d'infestation larvaire des graines et également du taux d'adultes qui en émergent à la première génération.

Le retard constaté dans le début des émergences serait éventuellement la conséquence de molécules larvicides présentes à une concentration sublétale sur les larves. Aucun effet larvicide n'est constaté au niveau des lots traités avec l'extrait brut. La fraction éther de pétrole présente néanmoins une activité larvicide notable.

Dans des travaux similaires [Mwangi et Mukiyama, 1989] il a été démontré qu'à forte concentration, l'extrait aqueux de *Melia volkensii* (Meliaceae) a un effet larvicide tandis qu'à faible teneur on n'observe qu'une inhibition partielle sur les larves de *Aedes aegypti* L. Toutefois dans nos conditions expérimentales (fraction éther de pétrole représentant 74% de l'extrait brut et les doses essayées de 0.4 et 0.5% w/w respectivement) le partage liquide/liquide ne concentrerait pas suffisamment les molécules larvicides dans la fraction éther de pétrole pour qu'elle se révèle larvicide. Par contre le fractionnement de l'extrait acétone entre l'éther de pétrole et le méthanol aqueux 50% aurait pu entraîner une modification de la molécule native (dépourvue initialement d'activité larvicide) pour donner un produit dérivé doué de propriété larvicide marquée. En effet, certains métabolites secondaires sont connus pour leur instabilité dans l'eau ou de méthanol. Les naphthoquinones (quinone) par exemple sont

RESULTATS ET DISCUSSION: Propriétés biologiques de *Striga hermonthica*

méthoxylés en présence de méthanol; de même les bidesmosides (saponosides à deux unités oligosidiques) sont facilement hydrolysés en milieu aqueux [Bruneton, 1993]. L'hédérasaponine C par exemple (bidesmoside inactif) est hydrolysé en α -hédérine, molécule fortement antibiotique [Bruneton, 1993]. En l'état actuel de nos investigations, nous ne saurions préciser ni la nature de la modification éventuellement survenue (méthanolyse, hydrolyse, méthylation, polymérisation...) ni la nature de la molécule modifiée encore moins celle du produit dérivé.

Ainsi, la fraction éther de pétrole constitue l'extrait le plus indiqué de par son spectre d'activités insecticides. Elle présente en effet, le double avantage tout comme l'huile de *Cassia occidentalis* [Lienard et al., 1993] d'exercer à la fois des effets ovicide (51%) et larvicide (72%) assez significatifs à la dose de 0.4% w/w. De ce double effet, ne résulte que seulement 9% d'adultes qui émergent des graines au bout de la première génération. Quand on sait que ce sont exclusivement les larves de *C. maculatus* qui sont responsables de la perforation des graines de niébé et donc de leur destruction durant le stockage, on peut apprécier positivement l'impact d'un tel traitement sur la conservation des récoltes de niébé; tout facteur limitant la dynamique de prolifération de la bruche du niébé dans les stocks ayant un effet positif sur le degré de conservation des graines. Dans cet ordre d'idée, l'extrait méthanolique de *Piper guineense* permettait de préserver les graines de niébé grâce à une activité ovicide de 100% contre les œufs de *C. maculatus* [Mbata et Eppendu 1992]. De même, un traitement à base d'huile extraite de graines d'*Azadirachta indica* A. juss. (Meliaceae) à raison de 3ml d'huile par kg de niébé, a permis en laboratoire de réduire à moins de 4% le taux de destruction des graines au bout de 3 mois de stockage [Ivbijaro et Agbaje, 1986]. Ce traitement réduisait le taux d'adultes émergeant à 2% des œufs pondus.

Même si le niveau de protection exercé par la fraction éther de pétrole de *S. hermonthica* est inférieur à ceux induit par *Piper guineense* et *Azadirachta Indica*, les

activités ovicide et larvicide enregistrées pourraient néanmoins être avantageusement exploitées pour préserver les graines de niébé lors du stockage. L'utilisation traditionnelle de *Striga hermonthica* comme insecticide botanique pour préserver les récoltes [Kerharo et Adam, 1974; Abubakar et Abdurahaman, 1998] est ainsi confirmée par cette étude.

Les iridoïdes conféreraient à *Striga hermonthica* comme à la majorité des Scrophulariaceae leur potentiel protecteur des graines contre les insectes du stockage [Rank et al., 2004]. Les effets larvicides et ovicides de *Striga hermonthica* à l'encontre de *Callosobruchus maculatus* constitueraient un cadre de valorisation. En effet, la bruche du niébé est la principale contrainte entomologique à la culture et au stockage du niébé [Adebayo et Gbolade, 1994; Bal, 1992].

L'utilisation de *Striga hermonthica* comme insecticide botanique constituerait une réponse "écologiquement désirable" à la problématique de la protection des stocks de niébé contre *Callosobruchus maculatus*.

II.4. ACTIVITES ANTIMICROBIENNES

II.4.1. Résultats

L'activité antimicrobienne de *Striga hermonthica* est évaluée sur des bactéries Gram positif, Gram négatif ainsi que sur la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les fractions hexane, chloroformique et méthanolique de l'extrait acétone sont testés. Le tableau 17 donne les diamètres d'inhibition mesurés.

RESULTATS ET DISCUSSION: Propriétés biologiques de *Striga hermonthica*

Tableau 17: Diamètre d'inhibition d'extraits de *Striga hermonthica*

Extraits (mg/ml)	Hexane		Chloroforme		Méthanol	
	<u>100</u>	<u>75</u>	<u>100</u>	<u>75</u>	<u>100</u>	<u>75</u>
Bactéries Gram positif						
<i>Enterococcus faecalis.</i>	-	-	10	8	7	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	13	11	7	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	16	13	10	8
Bactéries Gram négatif						
<i>Salmonella enterica</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Shighella dysenteria</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
Levure						
<i>Saccharomyces cerevisae</i>	-	-	13	12	8	6

(Moyenne de 3 essais incluant le diamètre du papier filtre (5 mm))

(-) : Aucune zone d'inhibition observée

Les fractions chloroformique et méthanolique de *S. hermonthica* inhibent la croissance des souches *Enterococcus faecalis* CIP 103907, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, *Bacillus cereus* LMG 13569 et *Saccharomyces cerevisae* BMT 1333 mais ne présentent aucune activité notable sur les bactéries gram négatif de l'étude. Ces deux fractions seraient douées de propriétés antibactériennes spécifiquement gram positif et antifongique. En tenant compte des diamètres d'inhibition mesurés, *Bacillus cereus* LMG 13569 serait la souche la plus sensible. La fraction à l'hexane ne montre aucune activité antimicrobienne. L'activité antibactérienne de la fraction chloroformique, mesurée par la technique de micro dilution permet d'obtenir des valeurs de CMI comprises dans l'intervalle [780-1560µg/ml] pour *Bacillus cereus* et [1560-3130µg/ml]

RESULTATS ET DISCUSSION: Propriétés biologiques de *Striga hermonthica*

pour *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* et *Saccharomyces cerevisiae* (tableau 18).

Tableau 18: CMI de l'extrait chloroformique sur des bactéries gram positif

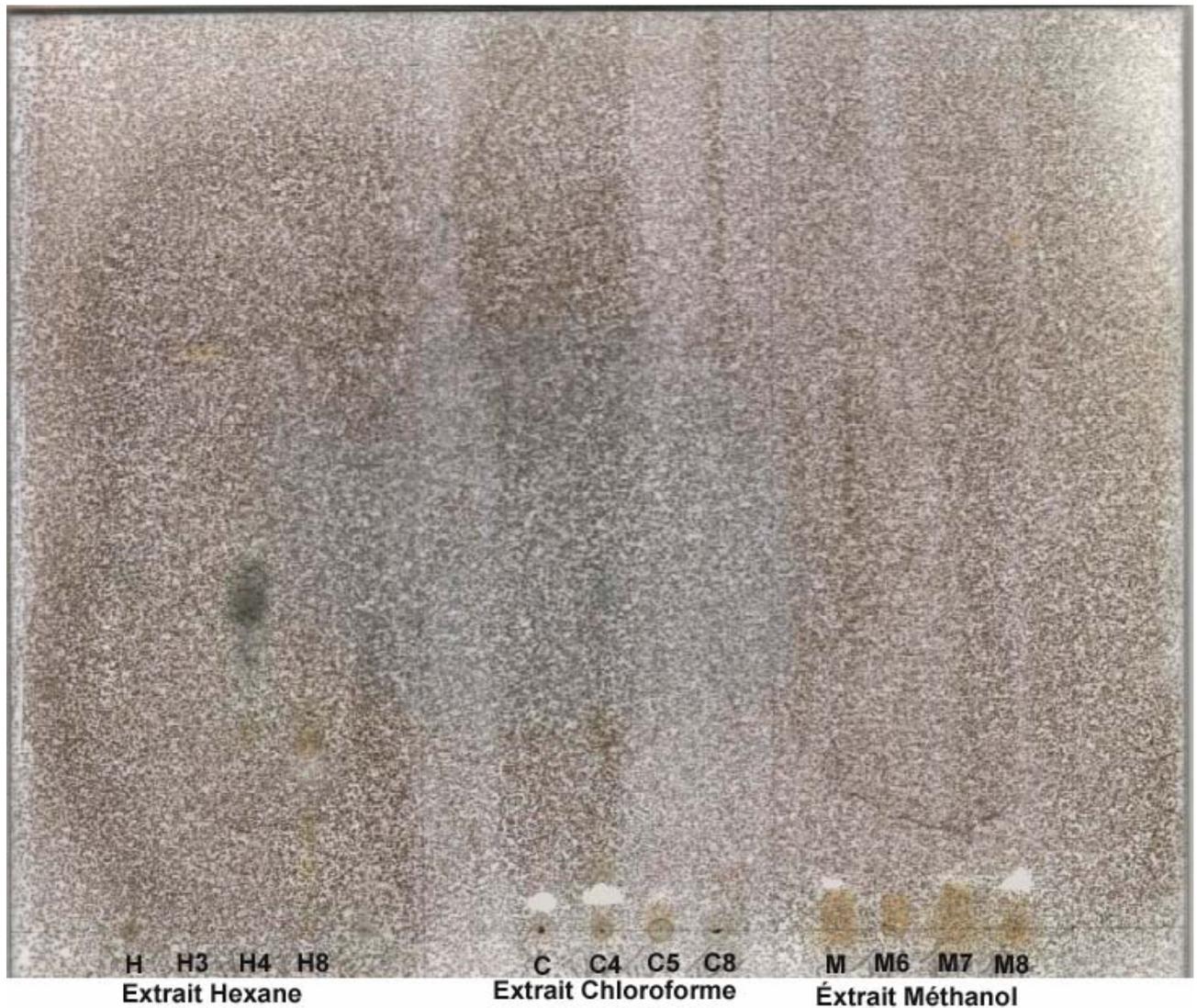
Microorganismes	Extrait chloroformique ($\mu\text{g/ml}$)			
	6250	3130	1560	780
<i>Enterococcus faecalis</i> .	-	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	+	+

(Moyenne de 3 observations)

(+) Croissance microbienne

(-) Pas de croissance microbienne

Une chromatographie sur couche mince (CCM) bio autographique montre des zones claires sur fond sombre (Chromatogramme 9), dénotant la présence de molécule(s) antimicrobienne(s) dans les extraits chloroformique et méthanolique. Les molécules antimicrobiennes sont détectées respectivement dans les sous fractions 4 et 8 des fractions chloroformique et méthanolique. Ainsi, malgré des valeurs de CMI assez élevées (faible activité), la présence de molécules antimicrobiennes est effective dans les fractions chloroformique et méthanolique de l'extrait acétone de *S. hermonthica*.



Chromatogramme 6: Mise en évidence de molécules antimicrobiennes

II.4.2. Discussion

Striga hermonthica est doué de propriétés antibactériennes spécifiquement Gram positif et antifongique, l'extrait chloroformique étant le plus actif. Ceci est en accord avec les travaux de Hussain et Deeni (1991) qui les premiers ont mis en évidence les propriétés antimicrobiennes de *S. hermonthica*. L'activité antimicrobienne mise en évidence confirmerait l'utilisation thérapeutique de *Striga hermonthica* dans des cas de dermatoses et autres infections microbiennes [Nacoulma, 1996].

RESULTATS ET DISCUSSION: Propriétés biologiques de *Striga hermonthica*

Certaines Scrophulariaceae ont précédemment été mis en évidence pour leur activité antibactérienne spécifiquement gram positif [Fernandez et al., 1996; Fernandez et al., 1998]. Dans le cas de *Scrophularia frutescens* et de *Scrophularia sambucifolia* l'activité serait imputable à des acides phénols libres (acides férulique, isovanillique, caféique, procatechique, syringique, p-hydroxybenzoïque, p-coumarique, gentisique). *Striga sulfurea*, *S. densiflora* et *S. orobanchioides* sont doués de propriétés antibactériennes et antifongiques [Hiremath et al., 1996; Hiremath et al., 1997].

Pour *Striga hermonthica* l'activité n'incomberait pas aux acides phénols libres. En effet, l'extrait méthanolique de *Striga hermonthica* qui serait le plus riche en acides phénols est beaucoup moins actif que l'extrait chloroformique. Le mode d'extraction (au soxhlet avec les solvants hexane, chloroforme puis méthanol) concentre les polyphénols par ordre de polarité croissante dans le chloroforme et le méthanol; les acides phénols se retrouvant dans le méthanol. La teneur en acide phénols y serait inférieure à 0.66% (teneur en polyphénols autre que flavonoïdes, tanins et anthocyanes) et nulle pour l'extrait chloroformique essentiellement constitué d'aglycones de flavonoïdes (les acides phénols non estérifiés sont moins extractibles par le chloroforme que par l'acétone dont l'extrait a une teneur en acide phénols nulle). De plus aucun des acides phénols de référence (acide caféique, férulique, cinnamique, hydrocinnamique, gallique, vanillique, ellagique et benzoïque) à notre disposition pour l'analyse HPLC n'a été détecté dans les extraits de *S. hermonthica*.

L'activité antimicrobienne de *Striga hermonthica* pourrait être imputée aux iridoïdes connus pour leurs propriétés microbicides [Rank et al., 2004]. Les propriétés antibactériennes du verbacoside (hétéroside d'iridoïde) contre *Staphylococcus aureus* est le fait de l'inhibition de l'incorporation de la Leucine dans la biosynthèse des protéines bactériennes [Avila et al., 1999].

RESULTATS ET DISCUSSION: Propriétés biologiques de *Striga hermonthica*

Les flavonoïdes, notamment la lutéoline expliqueraient également l'activité antibactérienne [Xi - Xu et Lee 2001] de *Striga hermonthica*.

II.5. INHIBITION DE L'ACETYLCHOLINESTERASE

II.5.1. Résultats

Les fractions hexane, chloroforme et acétate d'éthyle de l'extrait hydro acétone 80% de *Striga hermonthica* ont été évaluées pour leur activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase. Les figures 21, 22 et 23 nous permettent de comparer l'activité enzymatique en présence de différentes concentrations d'extraits par rapport à un control négatif (absence d'extrait).

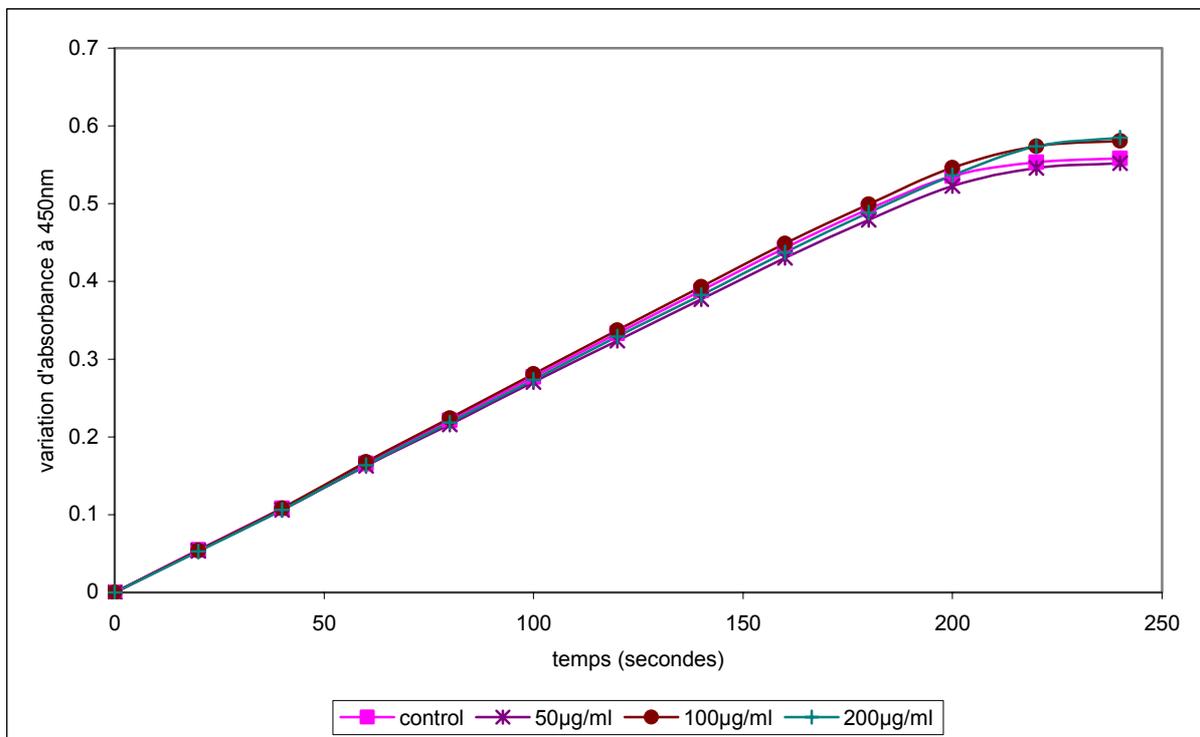


Figure 21: Activité enzymatique en présence de la fraction hexane

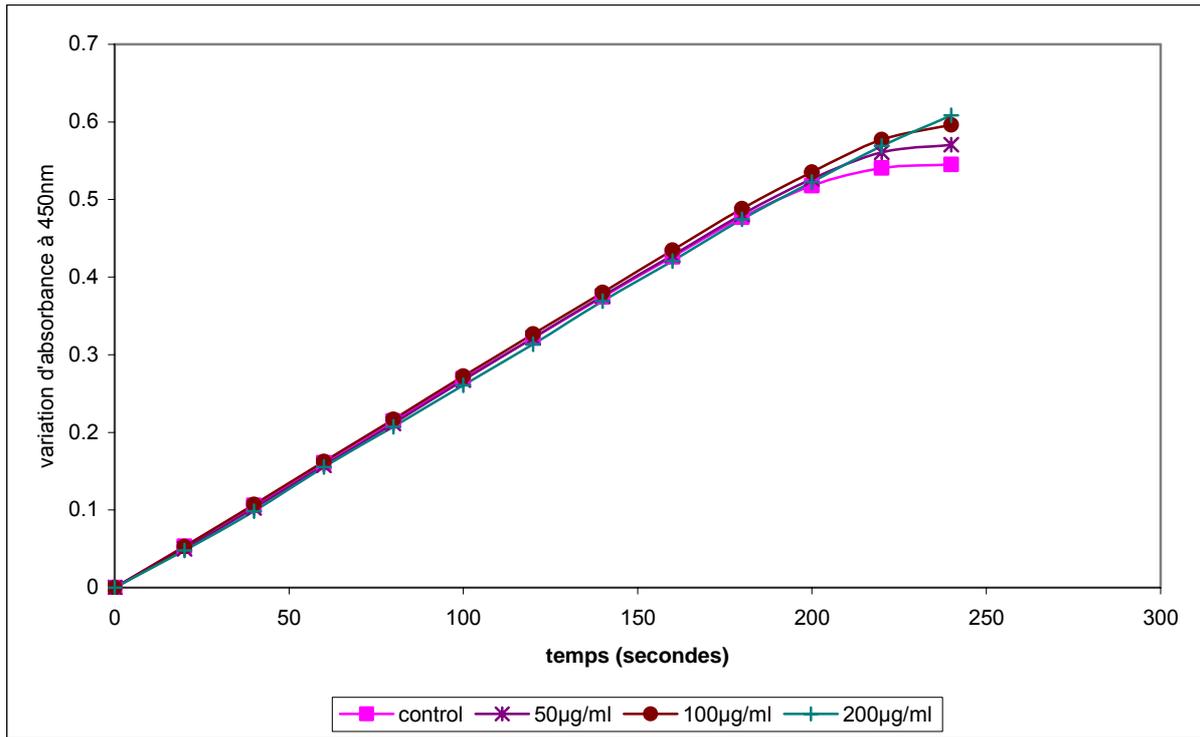


Figure 22: Activité enzymatique en présence de la fraction chloroforme

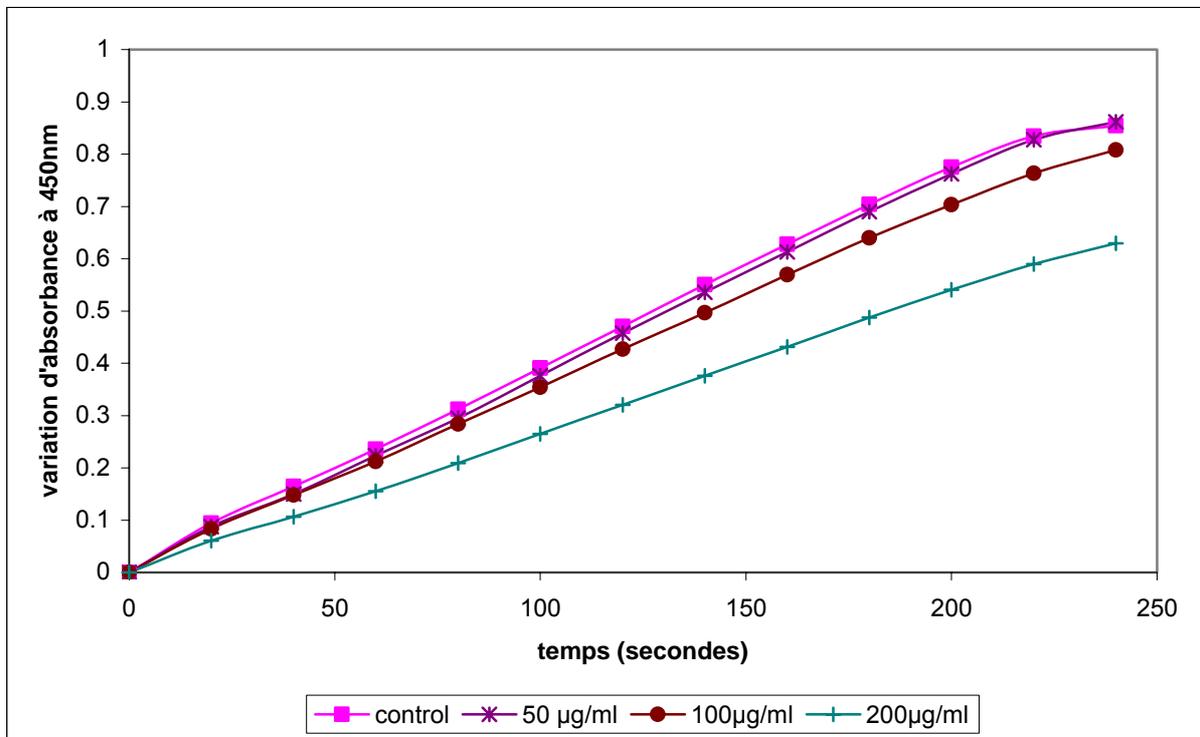


Figure 23: Activité enzymatique en présence de la fraction acétate d'éthyle

RESULTATS ET DISCUSSION: Propriétés biologiques de *Striga hermonthica*

Les fractions hexane et chloroforme ne présentent aucune activité inhibitrice notable aux doses testées (50 - 200µg/ml). En effet, l'activité enzymatique en l'absence d'extrait (control) est quasi identique à celle des concentrations testées (figures 21 et 22). La figure 23 montre que l'activité enzymatique décroît d'autant plus que la concentration de la fraction acétate d'éthyle augmente. La fraction acétate d'éthyle serait douée de propriété inhibitrice de l'acétylcholinestérase avec une CI_{50} estimée à 335.5 µg/ml quand la galanthamine montre une CI_{50} d'environ 0.73µg/ml (tableau 19).

Tableau 19: Effet dose réponse de l'inhibition de l'acétylcholinestérase

Concentration (µg/ml)	% Inhibition	
	Fraction acétate d'éthyle	Galanthamine
50	4.12 ± 2.76	100
100	10.44 ± 4.04	Ind.
200	32.86 ± 1.00	Ind.
300	54.05 ± 2.15	Ind.
350	73.55 ± 1.75	Ind.
CI_{50} (µg/ml)		
	335.5 ± 4.60	0.73 ± 0.02

(Moyenne de 3 essais ± déviation standard)

II.5.2. Discussion

La fraction acétate d'éthyle de l'extrait acétone 80% aqueux inhibe faiblement l'acétylcholinestérase avec une CI_{50} de 335µg/ml. La nature de l'inhibition (compétitive ou non compétitive) n'a par contre pas été élucidée. Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase seraient moyennement polaires car extrait par l'acétate d'éthyle et non par l'hexane et le chloroforme lors du partage liquide liquide.

RESULTATS ET DISCUSSION: Propriétés biologiques de *Striga hermonthica*

L'extrait acétone 80% aqueux de *Striga hermonthica* contiendrait donc des molécules inhibitrices de l'acétylcholinestérase mais à une faible concentration qui justifierait la faible activité insecticide observée sur la forme adulte de *Callosobruchus maculatus*. Cette toxicité s'exercerait par contact, les insectes adultes ne se nourrissant pas des graines de niébé imprégnées d'extrait. Les molécules inhibitrices de l'acétylcholinestérase seraient par contre sans effet sur la forme larvaire de la bruche du niébé. En effet, l'extrait acétone 80% aqueux ne présente pas d'activité larvicide. Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase pourraient avoir été inactivés lors de leur ingestion par les larves du premier stade; les insectes étant souvent pourvus de mécanismes de détoxifications des xénobiotiques. La faible surface de contact entre les larves (1^{er} stade) et la graine n'exposerait pas l'insecte à une dose d'extrait suffisante pour induire une inhibition enzymatique mortelle. La forte activité larvicide de la fraction éther de pétrole n'est par contre pas liée à une inhibition de l'acétylcholinestérase. En effet, les molécules inhibitrices de l'acétylcholinestérase étant moyennement polaires ne sont pas extraites par l'éther de pétrole.

Les alcaloïdes sont généralement connus pour leurs propriétés inhibitrices de l'acétylcholinestérase [Khalid et al., 2004]. Les alcaloïdes de *Striga hermonthica*, notamment la venoterpine [Baoua et al., 1980] pourraient être à l'origine de cette activité.

Les molécules inhibitrices de l'acétylcholinestérase pourraient être une source de valorisation de *Striga hermonthica*. En effet, l'une des approches les plus porteuses d'espoir dans le traitement de certaines maladies neuro-dégénératives telle que la maladie d'Alzheimer consiste à augmenter le taux d'acétylcholine du cerveau par le moyen d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase [Enz et al., 2003].

II.6. ACTIVITÉ ANTIRADICALAIRE DPPH[•]

II.6.1. Résultats

L'évaluation des propriétés anti-oxydantes d'extraits de *Striga hermonthica* par la mesure de activité antiradicalaire DPPH[•] a permis de dresser le tableau 20 ci-après.

Tableau 20: Activité anti-radicalaire DPPH[•] d'extraits de *Striga hermonthica*

Extraits (µg/ml)	Activité anti-radicalaire (%)				
	25,00	50,00	66,67	100,00	133,33
Acétone aqueux	14,44 ± 0,55	31,07 ± 2,12	34,41 ± 0,90	50,07 ± 2,14	70,22 ± 2,97
H ₂ O/ Acétone aqueux	19,15 ± 0,72	58,18 ± 2,23	80,55 ± 3,48	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
MeOH aqueux	13,28 ± 2,87	32,07 ± 2,20	38,21 ± 3,63	60,64 ± 3,39	79,03 ± 2,15
Décocté aqueux	7,31 ± 0,39	18,96 ± 1,09	24,87 ± 1,06	38,71 ± 1,49	49,14 ± 0,39
EtoAc/MeOH 50% pH2	21,42 ± 0,40	43,89 ± 0,73	56,53 ± 1,40	70,45 ± 2,62	79,17 ± 2,62
EtoAc/ H ₂ O pH2	11,04 ± 3,39	18,16 ± 2,95	18,78 ± 3,49	37,71 ± 3,51	46,49 ± 1,45
	<u>1,67</u>	<u>3,33</u>	<u>8,33</u>	<u>16,67</u>	<u>33,33</u>
Quercetine	27,3 ± 2,86	54,1 ± 1,79	95,02 ± 0,93	<i>nd.</i>	<i>nd.</i>

(Valeur moyenne de 5 essais ± Déviation standard)

L'activité antiradicalaire DPPH[•] des extraits de *S. hermonthica* est dose dépendante. En effet, les solution de DPPH[•] sont d'autant plus décolorées qu'elles sont concentrées en extraits végétaux. Les équations des droites de régression permettent de calculer la CAR₅₀ (concentration piégeant 50% des radicaux libres DPPH[•]) de chaque extrait ainsi que celle de la quercetine. Les valeurs de CAR₅₀ sont consignées dans le tableau 21.

RESULTATS ET DISCUSSION: Propriétés biologiques de *Striga hermonthica*

Tableau 21: CAR₅₀ (µg/ml) des extraits de *Striga hermonthica* et de la quercetine

Extraits	Equation de la droite de régression	R ²	CAR ₅₀ ± SD
Acétone 80% aqueux	Y= 0.50x + 2.32	0.99	95.27 ± 2.30
H ₂ O/ Acétone aqueux	Y= 1.29x – 6.86	0.98	44.09 ± 0.80
MeOH 80% aqueux	Y= 0.57x + 2.40	0.99	83.27 ± 2.35
Décocté aqueux	Y= 0.40x – 1.99	0.99	131.77 ± 2.26
EtOAc/ MeOH 50%PH ₂	Y= 0.56x + 11.67	0.95	68.86 ± 1.61
EtOAc / H ₂ O pH ₂	Y= 0.35x + 0.42	0.97	143.33 ± 6.31
Quercetine	Y= 9.87x + 14.54	0.98	3.60 ± 0.08

(Valeur moyenne de 5 essais ± Déviation standard)

Tous les extraits testés sont doués de propriété antiradicalaire DPPH'. La fraction aqueuse résultant de l'extrait hydro acétone de *S. hermonthica* présente la plus forte activité anti-radicalaire DPPH' (44.09 ± 0.8µg/ml) contre 68.86 ± 1.61µg/ml pour la fraction acétate d'éthyle de l'extrait hydro méthanolique acide et 3,60 ± 0.08µg/ml pour la quercetine. Les extraits hydro méthanolique et hydro acétone présentent des CAR₅₀ peu différentes (83.27 ± 2.35 µg/ml et 95.27 ± 2.30 µg/ml); de même que le décocté aqueux et la fraction acétate d'éthyle de l'extrait aqueux acide (131.77 ± 2.26 µg/ml et 143.33 ± 6.31 µg/ml).

II.6.2. Discussion

L'étude de l'activité antiradicalaire montre que les extraits de *Striga hermonthica* sont doués de propriétés antioxydantes. Le décocté aqueux présente la plus faible activité (CAR₅₀=143µg/ml). Le meilleur résultat est obtenue avec la fraction aqueuse de l'extrait hydro acétone (CAR₅₀= 44µg/ml). Les extraits hydro méthanolique et hydro

RESULTATS ET DISCUSSION: Propriétés biologiques de *Striga hermonthica*

acétone donnent des valeurs intermédiaires (83 et 95µg/ml respectivement). Comparée à l'extrait éthanolique de *Striga orobanchioides* qui donne une CAR_{50} de 18µg/ml avec le test au DPPH [Badami et al., 2003] *S. hermonthica* aurait un potentiel antioxydant moyen.

Le DPPH est une molécule produisant des radicaux libres DPPH^{*} stables [Koleva et al., 2002]. L'aptitude d'un système à piéger les radicaux DPPH^{*} libres traduit sa capacité à inhiber la peroxydation des lipides [Nijdveltd et al., 2001]. *Striga hermonthica* pourrait donc être utilisé pour piéger les radicaux libres de l'organisme et inhiber ainsi la peroxydation des lipides membranaires.

Les radicaux libres sont des sous-produits métaboliques du processus oxydatif normal de toutes cellules ou de facteurs exogènes tels que l'alcool et les fumées de cigarettes. Ce sont des espèces chimiques fortement réactives et potentiellement préjudiciables à la santé. Les cellules s'en protègent grâce à une variété d'enzymes (catalase, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase) ou de substances chimiques (vitamine C, glutathion, vitamine E) endogènes piègeurs de radicaux libres [Halliwell et Gutteridge, 1990].

Lors d'un stress oxydatif (déséquilibre entre la production de radicaux libres et leur élimination) les radicaux libres non piégés induisent des dommages aux tissus. Ils sont par conséquent impliqués dans l'étiologie d'un grand nombre de pathologies. On cite entre autres: l'arthrite, l'asthme, les rhumatismes, les néphrites, les cancers, l'athérosclérose, le diabète sucré, les lésions inflammatoires, les maladies immunosuppressives, les désordres métaboliques et la maladie d'Alzheimer [Harman, 1993; Tiwari, 2004].

Striga hermonthica présente un potentiel antiradicalaire qui lui permettrait de jouer un rôle bénéfique en terme d'action préventive très importante pour la santé humaine et animale [Sabu et Kuttan, 2002].

RESULTATS ET DISCUSSION: Propriétés biologiques de *Striga hermonthica*

L'activité antiradicalaire de *Striga hermonthica* serait au moins partiellement justifiée par la présence des tannins et flavonoïdes mis en évidence par l'étude phytochimique. Les flavones que sont la lutéoline, la 7-isoprényl apigénine et la 3' ou 4'-méthoxy-7-isoprényl lutéoline sont les antioxydants majeurs de l'extrait hydro acétone de *Striga hermonthica*. En effet, les tanins et les flavonoïdes ont démontré leurs potentialités d'activités antioxydant [Yokozawa et al., 1988; Bors et al., 1990].

II.7. ACTIVITÉ ANTIPLASMODIALE

II.7.1. Résultats

Le macéré hydro méthanolique est évalué *in vivo* et *in vitro* pour ses propriétés antiplasmodiales sur des souches de *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium berghei*. Les résultats sont consignés dans le tableau 22 ci contre.

Tableau 22: Activité antiplasmodique du macéré hydro méthanolique

Activité <i>in vivo</i> sur <i>Plasmodium f.</i>		Activité <i>in vitro</i> sur <i>Plasmodium b.</i>	
Dose (mg/kg/j)	Inhibition (%)	[C] (µg/ml)	Inhibition (%)
700	80.45 ± 3.40	2500	100.00 ± 0.00
600	73.56 ± 5.29	500	60.45 ± 4.57
500	64.27 ± 3.69	100	20.22 ± 2.83
250	54.80 ± 2.99	20	4.24 ± 0.74
125	11.43 ± 5.25	4	0.01 ± 0.01
Y= 36.60Ln(x) -159.11 R ² = 0.93		Y= 15.12Ln(x) - 36.22 R ² = 0.90	
DE₅₀: 303.03 ± 17.78mg/kg/j		CI₅₀: 226.57 ± 25.16µg/ml	

(Valeur moyenne de 3 essais ± Déviation standard)

RESULTATS ET DISCUSSION: Propriétés biologiques de *Striga hermonthica*

Les droites de régression donnant le pourcentage d'inhibition en fonction du logarithme décimal de la dose ou de la concentration d'extrait ont un bon coefficient de corrélation (0.93 et 0.90 respectivement pour les activités *in vivo* et *in vitro*).

Le macéré hydro méthanolique 80% de *S. hermonthica* montre une faible activité antiplasmodique dose dépendante sur les deux modèles testés. La DE₅₀ de l'extrait est estimé à 303 mg/kg/j *in vivo* sur la souche de *Plasmodium berghei* chloroquino sensitive et la CI₅₀ *in vitro* à environ 226.57µg/ml sur des souches sauvages de *P. falciparum*.

II.7.2. Discussion

L'extrait hydro méthanolique 80% de *Striga hermonthica* est doué de propriétés antiparasitaires et notamment antiplasmodiale. Le test suppressif de 4 jours *in vivo* prouve une activité schizonticide sur la souche de *Plasmodium berghei* chloroquino sensible (DE₅₀ de 303mg/kg/j). De même une inhibition de la croissance parasitaire est observée *in vitro* sur des souches sauvages de *P. falciparum* (CI₅₀ 226µg/ml).

Ces valeurs sont relativement faibles si on les compare à celles d'autres espèces reconnues pour leurs propriétés antiplasmodiales. Dans des travaux similaires, l'activité antiplasmodiale de *S. hermonthica* a été démontrée [Okpako et Ajaiyeoba, 2004]. Cet auteur indique qu'*in vitro*, *S. hermonthica* inhibait la croissance de la souche K1 de *Plasmodium falciparum* multi résistante avec une CI₅₀ de 274.8µg/ml. *In vivo*, une activité schizonticide est également enregistrée (68.5% d'inhibition à la dose de 400mg/kg/j) sur la souche ANKA P1 de *Plasmodium berghei* chloroquino sensible, contre 70% de réduction de la parasitémie pour la chloroquine à 10mg/kg/j.

L'intensité de l'activité antiplasmodiale *in vivo* de l'extrait hydro méthanolique de *S. hermonthica* ne justifie pas son utilisation comme traitement curatif des accès palustres. Toutefois, l'activité étant observée *in vitro* sur une souche multi résistante, les

molécules antiplasmodiales de *S. hermonthica* pourraient s'avérer intéressantes. En effet, la recherche de substances naturelles de plantes contre le paludisme s'oriente vers des molécules capables de surmonter les mécanismes de résistance des parasites. *Striga hermonthica* constitue donc une source de molécules antiplasmodiales potentiellement exploitables.

II.8. CONCLUSION PARTIELLE

Le criblage des propriétés biologiques des extraits de *Striga hermonthica* a permis de mettre en évidence un certain nombre de propriétés biologiques.

Les fractions apolaires de l'extrait hydro acétone 80% montrent des propriétés larvicide et ovicide (fraction éther de pétrole), inhibitrice de l'acétylcholinestérase (fraction acétate d'éthyle), antibactérienne gram positif et antifongique (fraction chloroformique). L'extrait hydro acétone 80% brut démontre une faible activité insecticide sur les adultes de *Callosobruchus maculatus* mais présente des propriétés larvicides et ovicides plus intéressantes. Le macéré hydro méthanolique 80% présente une très faible toxicité aigue sur souris NMRI ainsi qu'une faible activité antiplasmodique. L'extrait brut ne présente pas de toxicité observable sur des cellules tumorales A549; par contre quelques unes de ses fractions sont cytotoxiques. L'extrait contient donc des molécules antitumorales mais à une faible concentration. *S. hermonthica* montre également une activité antioxydante grâce à des propriétés antiradicalaires DPPH'.

Pour l'ensemble des activités biologiques mises en évidence, les effets s'échelonnent de moyens à faibles. Les effets les plus importants sont enregistrés pour les propriétés antiradicalaires, larvicides et ovicides. L'activité antiplasmodiale mise en évidence semble très intéressante en ce sens que les molécules antiplasmodiales de *S. hermonthica* pourraient être exploitées dans des cas de chloroquino-résistance.

RESULTATS ET DISCUSSION: Propriétés biologiques de *Striga hermonthica*

Pour des raisons de commodité de mise en œuvre, nous n'avons isolé que les molécules anti radicalaires de *Striga hermonthica*.

III. IDENTIFICATION DES MOLECULES ANTI RADICALAIRES

III.1. POLYPHENOLS ET ACTIVITE ANTIRADICALAIRE

Le tableau 23 donne les coefficients de corrélation existant entre la teneur en polyphénols (polyphénols totaux, flavonoïdes totaux, flavonoïdes libres, tanins) et l'activité antiradicalaire des extraits de *Striga hermonthica*.

Tableau 23: Corrélation entre teneurs en polyphénols et activité antiradicalaire

Extraits	CAR50	Teneur en polyphénols (µg/100µg d'extrait)			
		PPhénol ttx	Flavo ttx	Flavo libre	Tanins
Acétone 80% aqueux	95.27	3.64	30.08	1.38	2.28
<i>H₂O/acétone aqueux</i>	44.09	20.70	27.04	9.95	11.19
MeOH 80%	83.42	3.00	11.68	1.28	1.12
<i>EtOAc/MeOH 50%PH2</i>	44.09	20.70	27.04	9.95	0.00
<i>EtOAc/MeOH pH2</i>	68.86	9.58	32.87	4.54	0.00
Corrélation CAR50/ polyphénols		-0.76	-0.65	-0.85	-0.67

Il existe une corrélation ($R = -0.76$) entre la teneur en polyphénols totaux et l'activité antiradicalaire des extraits testés. En effet, plus la teneur en polyphénols totaux d'un extrait est élevée, plus cet extrait se montre apte à piéger les radicaux libres de DPPH' en solution (plus la CAR50 est faible). Les polyphénols totaux de *S. hermonthica*, au nombre desquels figurent les tanins et les flavonoïdes totaux, sont donc responsables au moins en partie de l'activité antiradicalaire mis en évidence dans les différents extraits testés.

RESULTATS ET DISCUSSION: Molécules antiradicalaires de *Striga hermonthica*

La meilleure corrélation est observée avec les flavonoïdes libres c'est-à-dire ceux possédant des groupements hydroxyles non fonctionnalisés. Les flavonoïdes libres seraient donc responsables de l'essentiel de l'activité antiradicalaire de *Striga hermonthica*.

III.2. ISOLEMENT DE MOLECULES ANTI RADICAUX DPPH^{*} LIBRES

L'extrait acétone aqueux 80% est choisi pour l'isolement des composés anti radicaux libres. Il est préféré à l'extrait hydro méthanolique 80% pour sa teneur en flavonoïdes totaux. Une chromatographie autobiographique sur couche mince de l'extrait hydro acétone 80% de *Striga hermonthica* révèle la présence de molécules antiradicalaires dans les fractions hexane, chloroforme et acétate d'éthyle (chromatogramme 6).

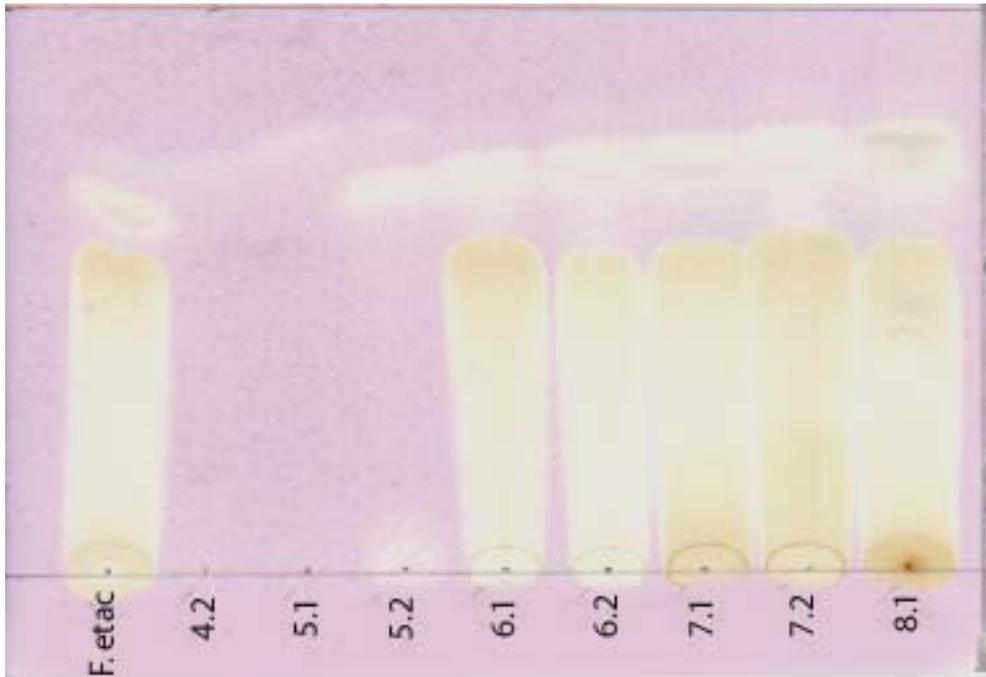


Chromatogramme 7: Activité anti DPPH des fractions de l'extrait hydro acétone

Eluant: Dichlorométhane/Méthanol (13/1)

Révéléteur: DPPH 2% méthanolique

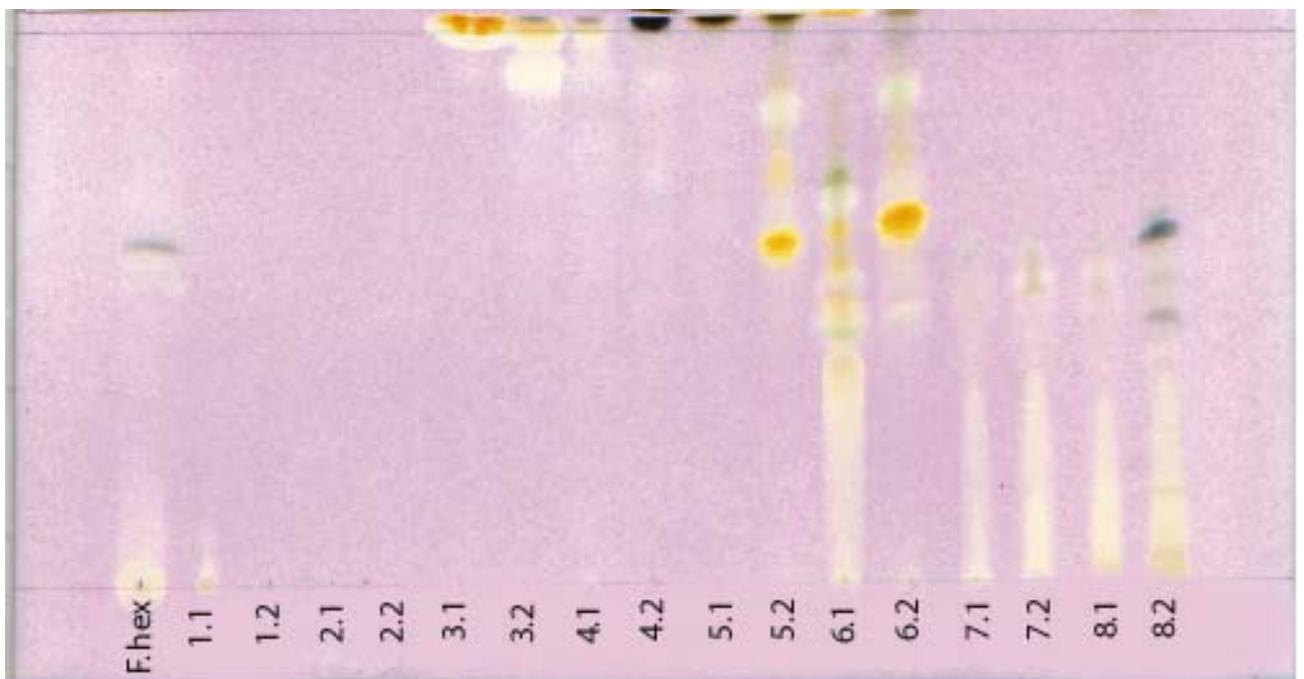
RESULTATS ET DISCUSSION: Molécules antiradicalaires de *Striga hermonthica*



Chromatogramme 8: Activité anti DPPH des sous fractions acétate d'éthyle

Eluant: dichlorométhane/méthanol (11/1)

Révélateur: DPPH 2% méthanolique



Chromatogramme 9: Activité anti DPPH des sous fractions hexane

Eluant: dichlorométhane/méthanol (11/1)

Révélateur: DPPH 2% méthanolique

RESULTATS ET DISCUSSION: Molécules antiradicalaires de *Striga hermonthica*

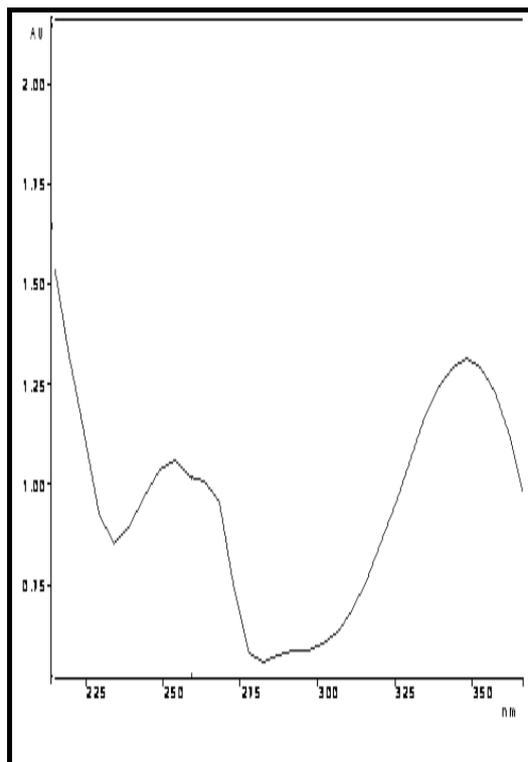
Les fractions acétate d'éthyle et hexane sont chromatographiées sur colonne ouverte de gel de silice. Les sous fractions 5.2 et 6.1 acétate d'éthyle (chromatogramme 7), 3.2 et 4.1 hexane (chromatogramme 8) sont combinées, eu égard à leur chromatogrammes (CCM et HPLC). Elles sont chromatographiées par MPLC et les fractions MPLC sont purifiées par chromatographie préparative sur couche mince de silice.

Quatre molécules antiradicalaires sont ainsi isolées. Sh₁ (3.6mg), Sh₂ (1.8mg) et Sh₃ (2mg) sont obtenus de 122mg du mélange des sous fractions 5.2 et 6.1 acétate d'éthyle; Sh₄ (1.4mg) de 134mg du mélange des sous fractions 3.2 et 4.1 hexane. La pureté des molécules isolées est confirmée par analyse HPLC-DAD. Les spectres UV/visible des molécules isolées (figure 24) permettent de poser des hypothèses quand à leur appartenance aux divers groupes de métabolites secondaires de plantes.

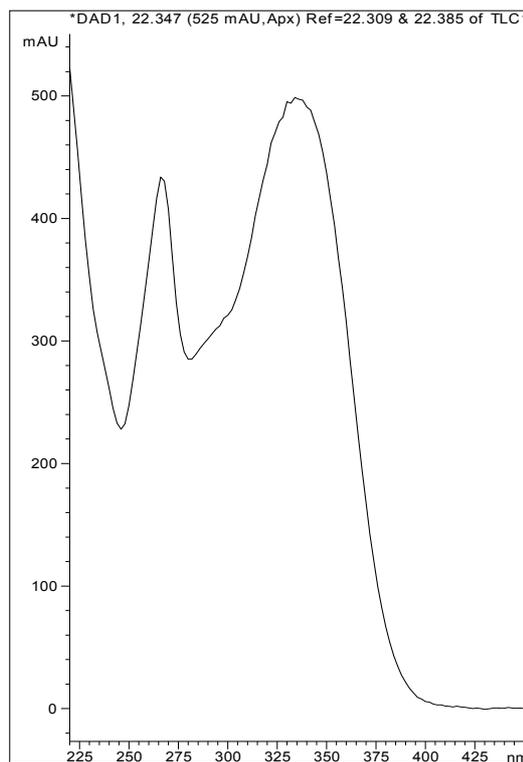
Sh₁, Sh₂ et Sh₃ ont des spectres caractéristiques des flavonoïdes et plus précisément des flavones et flavonols. En effet, ils présentent 2 régions d'absorbances maximums, la première dans l'intervalle 250-285nm et la seconde dans la région 320-385nm. Sh₁, Sh₂ et Sh₃ seraient donc des flavones et/ ou des flavonols.

Sh₄ ne présente pas de spectre UV/visible caractéristique. Du fait de son caractère apolaire, Sh₄ serait un composé de nature terpénique ou stéroïdique. Cette hypothèse est confirmée par une CCM avec révélation au réactif de Liebermann Buchard (spot violacé).

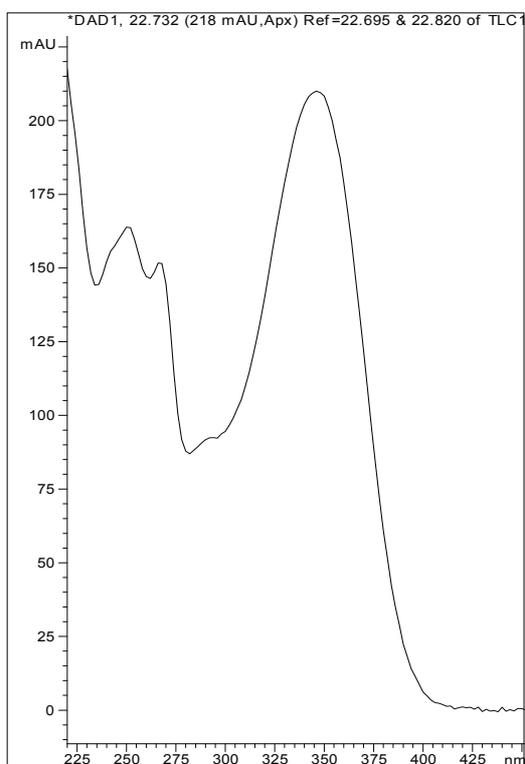
RESULTATS ET DISCUSSION: Molécules antiradicalaires de *Striga hermonthica*



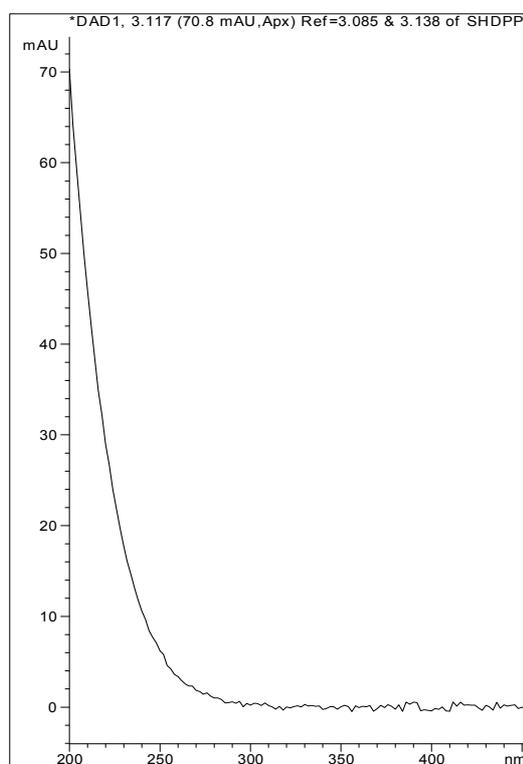
Spectre UV/ Vis du composé Sh1



Spectre UV/ Vis du composé Sh2



Spectre UV/ Vis du composé Sh3



Spectre UV/ Vis du composé Sh4

Figure 24: Spectre UV/visible des molécules anti-radicalaires isolées

III.3. MOLECULES ANTIRADICALIRES IDENTIFIEES

Les spectres de masse en impact électronique (IEMS), RMN du proton ^1H et éventuellement du carbone ^{13}C sont utilisés pour élucider la structure des flavonoïdes isolés de *Striga hermonthica*. L'exploitation des données spectrales est conduite sur le squelette carboné de base des flavonoïdes.

III.3.1. Elucidation structurale du composé Sh1

Le spectre de masse obtenu donne un ion moléculaire parent à 286 m/z [M^+] (figure 26) correspondant à une masse molaire de 286 g.mol $^{-1}$ pour Sh1. Les spectres RMN du carbone ^{13}C (figure 27) et du proton ^1H (figure 28) indiquent la présence de 15 atomes de carbones et de 6 protons aromatiques. Nous attribuons ainsi à Sh1 la formule brute de $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$ avec un degré d'insaturation de 11; 2 noyaux aromatiques constituant sa structure, il faut encore 3 insaturations pour compléter le nombre d'insaturations. Le spectre RMN ^{13}C donne des informations complémentaires quant à la nature oléfinique de la liaison 2,3 (C-3 singulet δ_{C} 102.44) caractérisant les flavones non substitués en position C-2' et C-6'. Le singulet à 122.26 ppm (C-4a) traduit l'absence de méthoxyle sur le noyau A; de même le signal à 182.45 ppm (singulet, C-4) implique la présence d'un hydroxyle en C-5 [Harborne, 1994]. Sh1 serait donc une flavone non méthoxylée, car il n'existe par ailleurs aucun carbone vers 53 ppm. Le spectre RMN ^1H permet en outre de préciser la position des 6 protons aromatiques. Les signaux à 6.14 et 6.37 ppm (d $J= 2$ Hz) correspondent à 2 protons aromatiques, situés en *mé*ta l'un de l'autre, sur le noyau A. Le doublet à 6.84 ($J= 8$ Hz), le doublet de doublets à 7.32 ppm ($J= 2; 8$ Hz) et le doublet à 7.31 ppm ($J= 2$ Hz) appartiennent au noyau B. Le proton correspondant au singulet à δ_{H} 6.48 porté par le cycle C est également caractéristique des flavones. Nous en déduisons la structure du composé

RESULTATS ET DISCUSSION: Molécules antiradicalaires de *Striga hermonthica*

Sh1 que nous identifions comme la lutéoline ou 5,7,3',4' tétrahydroxy flavone (figure 25).

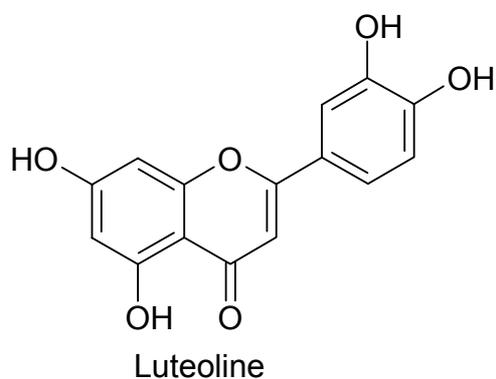


Figure 25: Structure de la Lutéoline (Sh1)

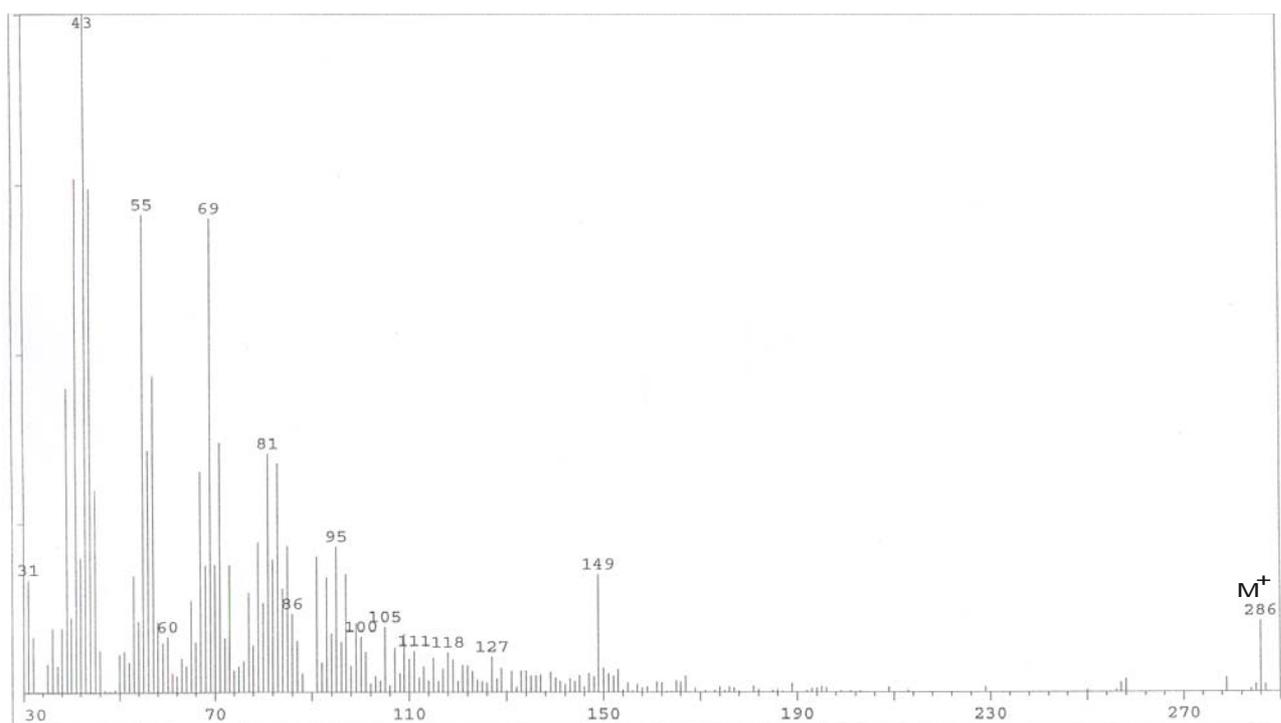


Figure 26: Spectre de masse IEMS du composé Sh1 dans le CD₃OD

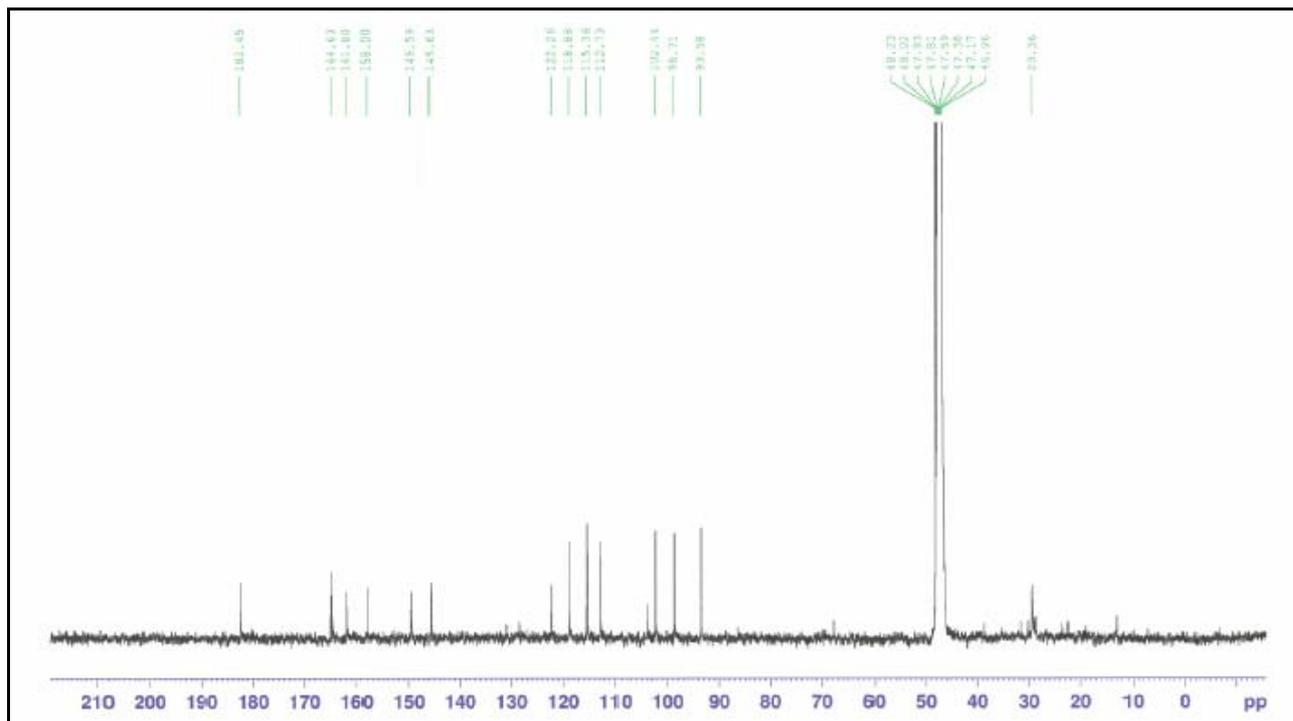


Figure 27: Spectre RMN ^{13}C du composé Sh1 dans le CD_3OD

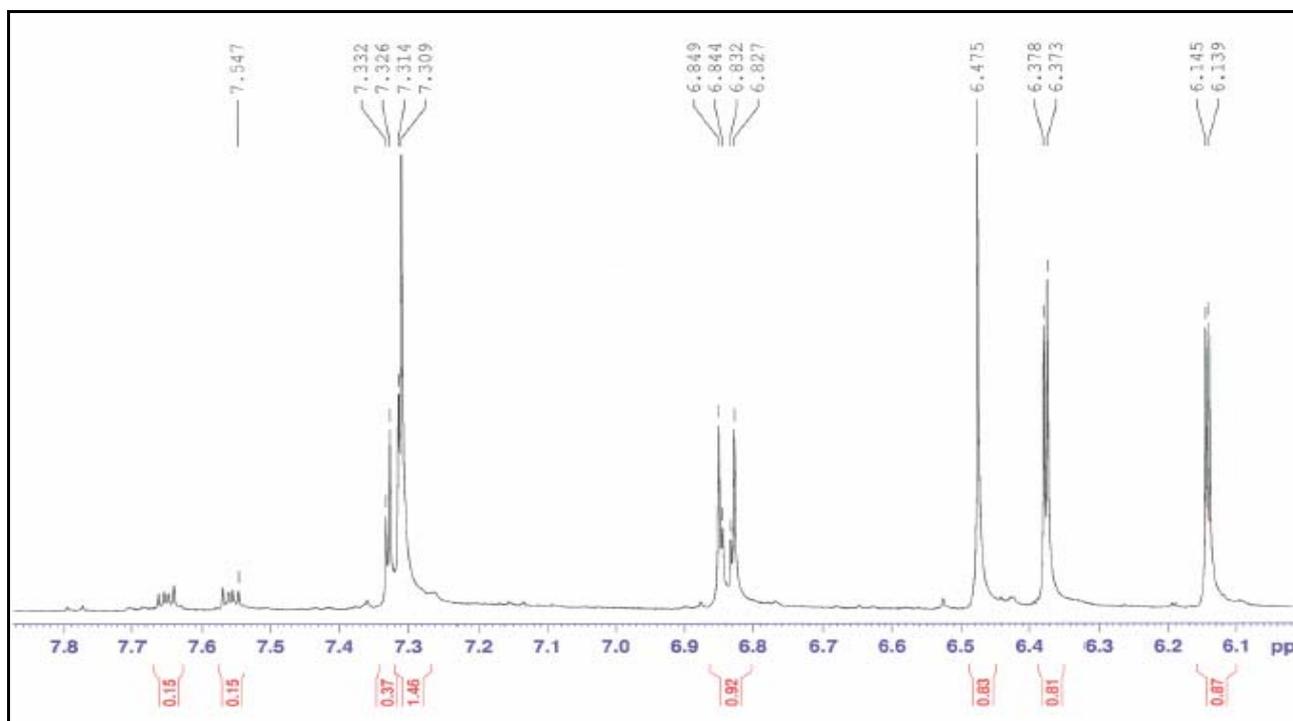


Figure 28: Spectre RMN ^1H du composé Sh1 dans le CD_3OD

RESULTATS ET DISCUSSION: Molécules antiradicalaires de *Striga hermonthica*

Les expériences bidimensionnelles, hétéronucléaires, HMQC et HMBC ont permis d'attribuer précisément les carbones et les protons, et ainsi de confirmer l'identité de Sh1. La comparaison des données RMN du proton ^1H et du ^{13}C du composé Sh1 avec ceux de la littérature [Nissler et al., 2004] nous permet de confirmer l'identité du composé Sh1 comme étant effectivement la lutéoline (tableau 24).

Tableau 24: Données spectrales du composé Sh1 et de la lutéoline témoin.

Positions	RMN ^1H (δ_{H} ppm) ^a		RMN ^{13}C (δ_{C} ppm) ^b	
	Composé A	Lutéoline	Composé A	Lutéoline
2	-		164.63	164.4
3	6.48 (s)	6.65	102.44	103.3
4	-		182.45	182.1
4a	-		122.26	122.0
5	-		161.80	161.9
6	6.14 (d, 2)	6.18	98.71	99.3
7	-		164.90	164.5
8	6.37 (d, 2)	6.43	93.58	94.3
9	-		158.00	157.7
1'	-		103.90	104.2
2'	7.31 (d, 2)	7.38	112.73	113.8
3'	-		145.63	146.2
4'	-		149.59	150.1
5'	6.84 (d, 8)	6.88	115.36	116.5
6'	7.32 (dd, 2, 8)	7.40	118.88	119.4

^a 400 MHz, CD_3OD . ^b 125 MHz, CD_3OD .

III.3.2. Elucidation structurale du composé Sh2

L'ion moléculaire parent est situé à 393 m/z [M^+] (figure 30); le flavonoïde Sh2 aurait ainsi une masse molaire d'environ 393 g mol^{-1} . Le spectre RMN ^1H de Sh2 (figure 31) montre 5 signaux intéressants correspondant à 7 protons aromatiques.

- Deux doublets à 6.18 et 5.99 ppm, correspondant à deux protons en *mé*ta l'un de l'autre sur le noyau A

RESULTATS ET DISCUSSION: Molécules antiradicalaires de *Striga hermonthica*

- Un singulet à 6.38 ppm caractérisant un proton éthylénique du noyau C
- Deux doublets à 6.83 et 7.75 ppm relatifs à 4 protons aromatiques du noyau B en position ortho les uns par rapport aux autres.

Le proton éthylénique à 6.38 ppm est la preuve que le flavonoïde Sh2 est un flavone. Les déplacements chimiques et leurs constantes de couplage permettent de localiser les protons détectés sur le squelette de base des flavones (tableau 25). Les données spectrales nous amènent à formuler l'hypothèse selon laquelle Sh2 serait un dérivé non méthylé de l'apigénine. En outre, la masse molaire de Sh2 comparée à celle de l'apigénine nous laisse penser qu'il comporterait un groupement fonctionnel branché sur une des fonctions hydroxyles, probablement sur l'hydroxyle en position 7 donnant la structure hypothétique illustrée par la figure 29. Sh2 est donc un dérivé de l'apigénine.

Tableau 25: RMN du proton ^1H de Sh2

Positions	RMN ^1H		
	δ_{H} ppm	Couplage	Protons
3	6.38	s	1H
6	5.99	d (J meta)	1H
8	6.18	d (J meta)	1H
2', 6'	7.75	d (J ortho)	2H
3', 5'	6.83	d (J ortho)	2H

s: singulet d: doublet J ortho: type de couplage

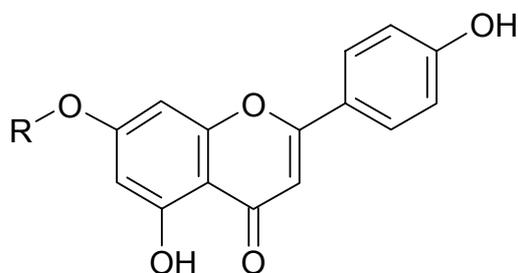


Figure 29: Structure de Sh2

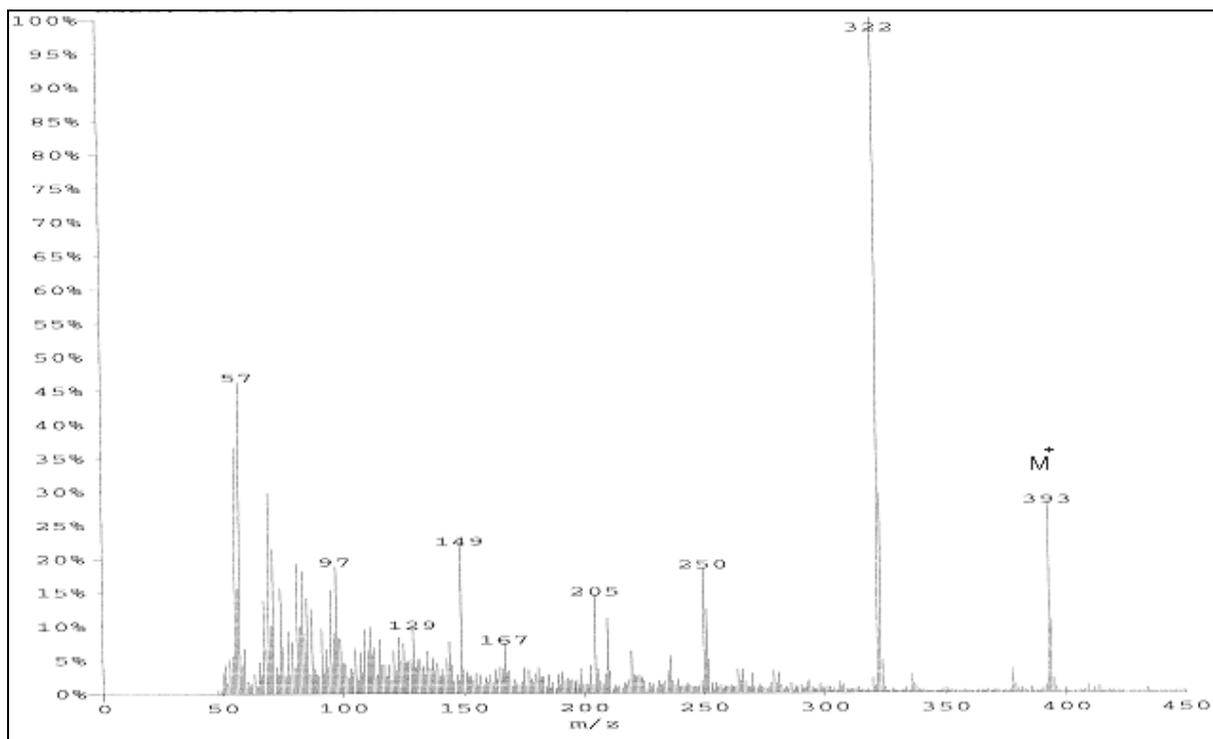


Figure 30: Spectre de masse IEMS de Sh2 dans le CD₃OD

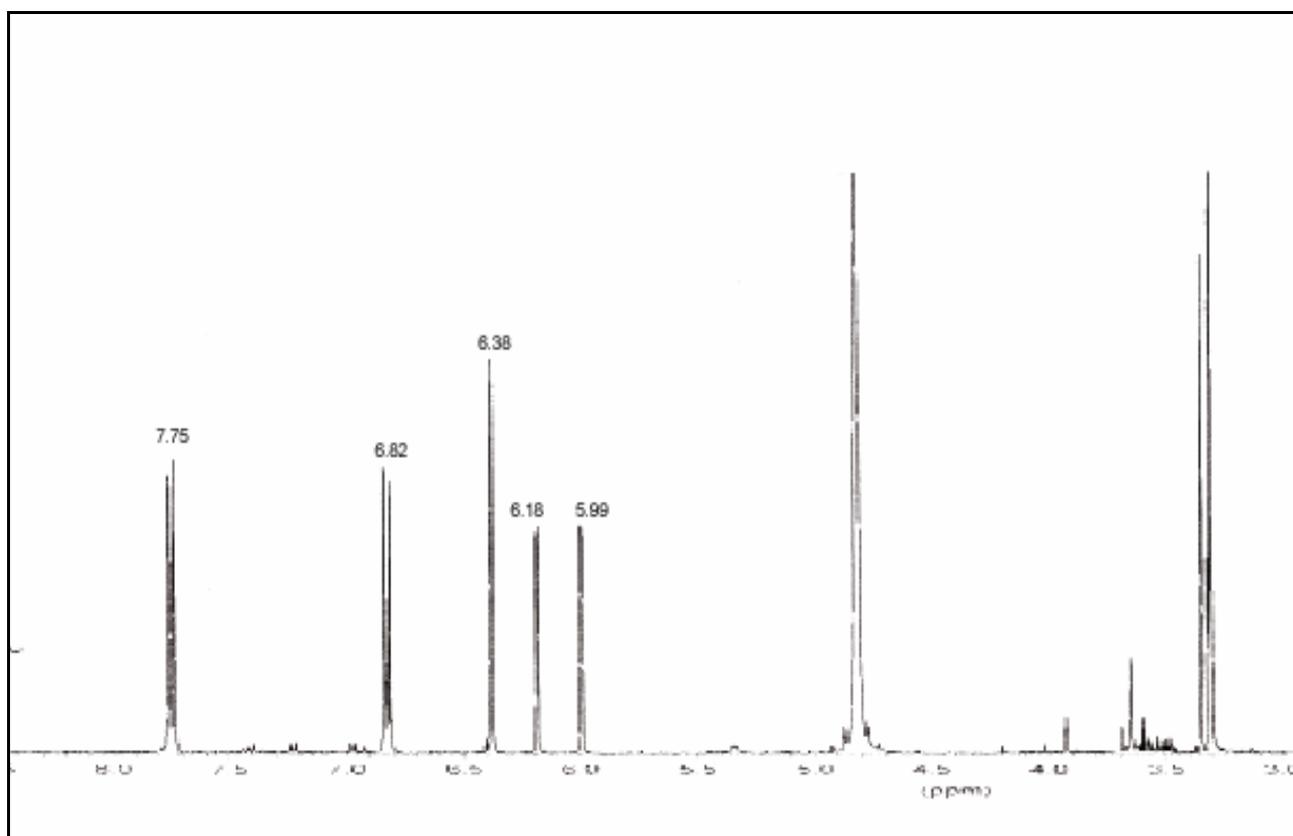


Figure 31: Spectre RMN ¹H de Sh2 dans le CD₃OD

III.3.3. Elucidation structurale du composé Sh3

L'ion moléculaire à 364 m/z (figure 33) nous permet d'attribuer à Sh₃ la masse molaire de 364 g mol⁻¹ qui ne serait composé que de carbone, hydrogène et oxygène. La RMN du proton ¹H (figure 34) montre 6 protons aromatiques et 3 protons méthoxy.

- Deux doublets à 5.96 et 6.16 ppm attribués à 2 protons aromatique A en position méta l'un par rapport à l'autre.
- Un singulet à 6.32 ppm caractérisant le proton éthylénique du noyau C
- Trois signaux relatifs aux 3 protons aromatiques B, à 6.73, 7.32 ppm en position para l'un par rapport à l'autre et 7.38 ppm en position ortho et méta par rapport aux deux autres
- Un singulet à 3.80 ppm relatif aux 3 protons d'un méthoxyle.

Le singulet à 6.32 ppm ainsi que les protons du groupe méthoxyle (3.80 ppm) prouvent que Sh₃ est un flavone méthoxylée. Les déplacements chimiques et leurs constantes de couplage permettent de localiser les protons détectés sur le squelette de base des flavones (tableau 26). Les données spectrales nous amènent à formuler l'hypothèse selon laquelle Sh₃ serait un dérivé méthoxylé de la lutéoline. En outre, la masse molaire de Sh₃ comparée à celle de la lutéoline nous laisse penser qu'il comporterait un groupement fonctionnel branché sur une des fonctions hydroxyles, probablement sur l'hydroxyle en position 7 donnant la structure hypothétique illustrée par la figure 32. Sh₃ serait donc un dérivé du 3' ou 4'-méthoxyl-Lutéoline

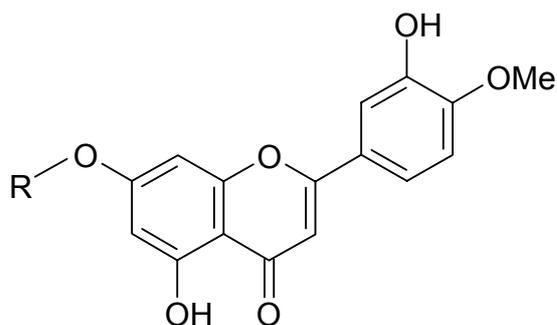


Figure 32: Structure de Sh3

RESULTATS ET DISCUSSION: Molécules antiradicalaires de *Striga hermonthica*

Tableau 26: RMN du proton ^1H de Sh3

Positions	RMN ^1H		
	δ_{H} ppm	Couplage	Protons
3	6.32	s	1H
6	5.96	s	1H
8	6.16	s	1H
2'	7.31	s	1H
3' ou 4'	3.80		(méthoxy) 3H
5'	6.73	d (J ortho)	1H
6'	7.38	d (J méta)	1H

s: singulet d: doublet J méta/ortho: type de couplage

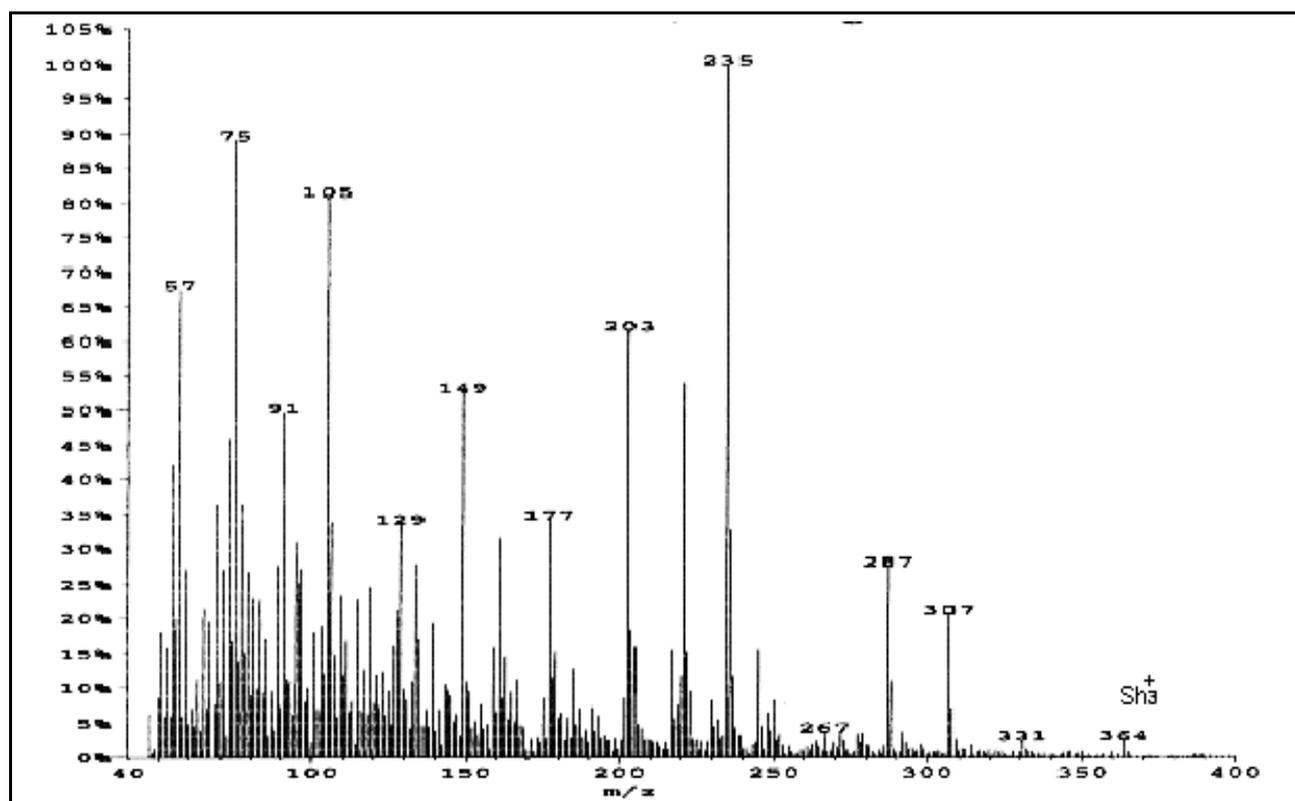


Figure 33: Spectre EIMS de Sh3 dans le CD_3OD

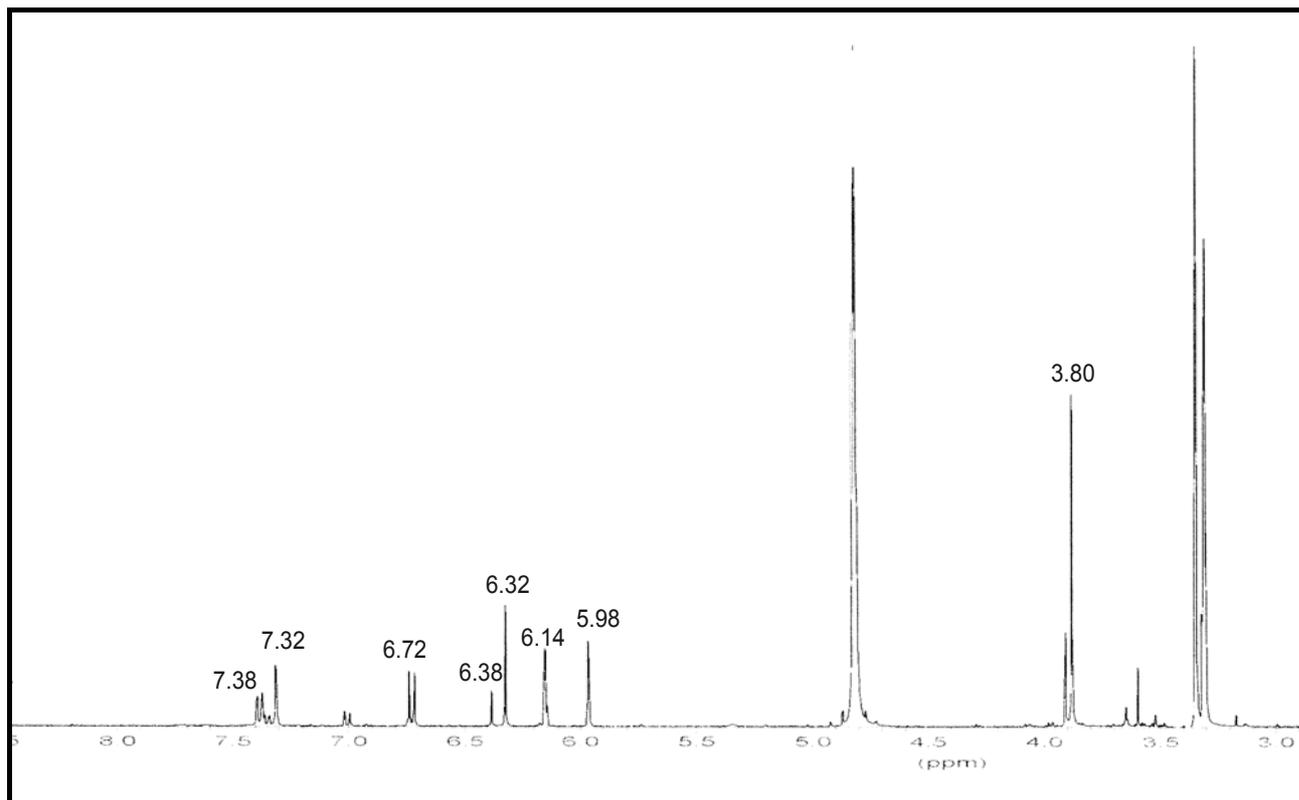


Figure 34: Spectre RMN 1H de Sh3 dans le CD3OD

III.4. CONCLUSION PARTIELLE

L'activité antiradicalaire de l'extrait acétone 80% aqueux de *Striga hermonthica* est au moins en partie due aux polyphénols et plus particulièrement aux flavonoïdes.

Le fractionnement bio guidé des fractions acétate d'éthyle et hexane de l'extrait acétone 80% aqueux a permis d'isoler 4 molécules piégeurs de radicaux libres dont 1 flavone entièrement identifiée et 2 flavones partiellement identifiées. Les données spectrales (RMN ^1H , RMN ^{13}C et MS) permettent d'identifier les flavones isolées comme étant la lutéoline (Sh1), un dérivé de la 3' ou 4'-méthoxy lutéoline (Sh2) et un dérivé de l'apigénine (Sh3).

La lutéoline se trouve être la molécule anti radicalaire majeure de l'extrait acétone 80% aqueux de *Striga hermonthica*.

IV. POTENTIALITES BIOLOGIQUES DES FLAVONES IDENTIFIES

Les flavones que nous avons identifiés justifient certaines des propriétés biologiques de *Striga hermonthica* et lui confèrent un certain nombre de potentialités biologiques non évoquées par les utilisations traditionnelles.

Les flavones isolées de *Striga hermonthica* sont responsables au moins en partie des propriétés antioxydantes notamment antiradicalaires mises en évidence. La lutéoline est la plus antiradicalaire DPPH^{*} (CAR50= 17.78 µM) des molécules isolées. En effet, les flavones sont d'autant plus antiradicalaires qu'ils possèdent de groupements hydroxyles libres. Ainsi, les flavones 3'4'-dihydroxyl, 5,6-dihydroxyl et 5,6,7 trihydroxyl libres sont les plus antiradicalaires des flavones [Yokozawa et al., 1998].

L'activité antioxydante de la lutéoline s'exprime aussi à travers l'inhibition de la xanthine oxydase. La lutéoline et l'apigénine sont anti-inflammatoires. Elles inhibent la production d'oxyde nitrique (NO.) responsable *in vivo* de certains phénomènes inflammatoires [Kim et al., 1999]. *Striga hermonthica* posséderait donc des propriétés anti-inflammatoires.

Apigénine et lutéoline sont également connus pour leurs propriétés antihistaminiques [Harish et al., 2001, Ueda et al., 2002]. En effet, ils inhibent la libération de l'histamine par les cellules basophiles et de la β -glucuronidase par les cellules neutrophiles, occasionnant ainsi *in vivo* des effets anti allergiques [Cheong et al., 1998]. Tout comme *Striga orobanchioides* [Harish et al., 2001], *Striga hermonthica* serait exploitable pour ses vertus antihistaminiques *in vivo*.

La lutéoline et l'apigénine de par leurs activités antiandrogénique et oestrogénique confèrent à *Striga orobanchioides*, *S. asiatica* et à *S. lutea* des propriétés contraceptives [Hiremath et al., 1990; Chaing et al., 1994; Hiremath et al., 1994 et Hiremath et al.,

1997]. Ils empêchent la nidation au cours des premiers jours de la gestation [Hiremath et Rao., 1990; Hiremath et al., 2000]. *Striga hermonthica* est traditionnellement utilisé en Afrique de l'Est pour ses propriétés contraceptives. La lutéoline et l'apigénine justifieraient donc les propriétés contraceptives de *Striga hermonthica* antérieurement mises en évidence sur modèle animal par Choudhury et collaborateurs (1998a, 1998b).

La lutéoline et apigénine inhibent la migration de cellules tumorales [Fotsis et al., 1997], exercent des effets cardiotoniques [Itoigawa et al., 1999] et sont douées de propriétés cytoprotectrices et antilipopéroxydatives sur les cellules cardiaques. La lutéoline inhibe la production d'antigènes spécifiques de la prostate par les cellules cancéreuses prostatiques, jouant ainsi un rôle préventif sur le cancer de la prostate [Zand et al., 2002].

La lutéoline est également une molécule antibactérienne efficace contre les bactéries chimio-résistantes (souche méthylcilline résistante de *Staphylococcus aureus*) [Xi - Xu et Lee 2001]. L'apigénine possède des propriétés antiparasitaires à l'encontre des souches chloroquino sensible (poW) et chloroquino résistante (Dd2) de *Plasmodium falciparum* [Köhler et al., 2002].

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

La recherche sur les substances naturelles à partir des plantes participe à l'effort national de mise en place d'une pharmacopée locale; la pratique de la médecine traditionnelle ayant été rendue légale au Burkina Faso par la loi n° 23/ ADP du 19 Mai 1994. *Striga hermonthica* est présentée comme une plante indésirable, justifiant les nombreuses tentatives pour son éradication.

Cependant, à l'issue la conduite de criblages biologiques et phytochimiques systématiques, il apparaît souvent intéressant d'examiner les potentialités des plantes étiquetées comme nuisibles. Les données ethnobotaniques du genre *Striga* nous ont donc conduit à nous intéresser à *Striga hermonthica* dans l'objectif de conforter son utilisation thérapeutique et par là même de diminuer la hargne de ses combattants. Nous ne visons toutefois pas à travers cette étude à encourager la prolifération de *Striga hermonthica* dans les champs mais plutôt à tirer partie de ses potentialités phytochimiques et biologiques pour compenser un temps soit peu sa nuisance.

Au terme des études phytochimiques, nous retiendrons que:

- Les composés polyphénoliques de *Striga hermonthica* sont principalement constitués de flavonoïdes, de tanins et d'hydroxyméthylantraquinones; les flavonoïdes étant les polyphénols majoritaires de la plante.
- L'approche du "plan d'expérience" a permis d'optimiser une méthode HPLC pour l'analyse des acides phénols et flavonoïdes de *Striga hermonthica*. Cette méthode devrait servir à terme de méthode standard d'analyse HPLC-DAD des polyphénols au sein de notre laboratoire.
- Les flavonoïdes de *S. hermonthica* sont essentiellement constitués de flavones localisés au niveau du parenchyme cortical des tiges. Ces flavones existent sous la forme de génines ainsi que d'hétérosides libres et fonctionnalisés (méthoxylation, isoprénylation, etc...).

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

- Quatre flavones, à savoir l'apigénine, la lutéoline, un dérivé de l'apigénine, et un dérivé du 3' ou 4' méthoxyl lutéoline ont été identifiés. A notre connaissance, ce serait la première fois que la lutéoline, et les dérivés de l'apigénine et du méthoxyl lutéoline auraient été isolés de *Striga hermonthica*.

La mise en évidence de l'apigénine et de la lutéoline nous a permis de déduire qu'à l'instar des autres espèces du genre *Striga*, *Striga hermonthica* posséderait également des propriétés antihistaminiques, anti-inflammatoires, contraceptives et abortives. Des précautions d'utilisation sont donc à observer chez la femme gravide.

Le criblage des propriétés biologique du *Striga* nous a permis de:

- Montrer que dans les conditions traditionnelles d'utilisation thérapeutique, *Striga hermonthica* ne présente pas de toxicité aiguë.
- Confirmer expérimentalement les propriétés antibactériennes (exclusivement Gram positif), antifongiques et insecticides attribuées à *Striga hermonthica* par les usages traditionnels sur le plateau central du Burkina Faso. Ainsi, les potentialités ovicide et larvicide de *Striga hermonthica* pourraient être exploitées en vue de son utilisation comme insecticide botanique pour la conservation des récoltes.
- Mettre en évidence le potentiel antiradicalaire de *Striga hermonthica* et d'en isoler des flavones (lutéoline, 7-isoprényl apigénine et 3' ou 4' méthoxy-7-isoprényl lutéoline) responsables de l'essentiel de l'activité antioxydante. En piégeant les radicaux libres dans l'organisme ces molécules confèrent à *S. hermonthica* un effet bénéfique contre la survenue et l'aggravation de pathologies liées au stress oxydatif.
- Montrer que *Striga hermonthica* n'exerce pas des niveaux d'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase, anti tumorale et antiplasmodiale suffisants pour justifier l'utilisation thérapeutique des extraits bruts de la plante par les populations. Il n'en

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

demeure pas moins que *S. hermonthica* renferme, certes à faible teneur, des molécules douées de propriétés antitumorales, inhibitrices de l'acétylcholinestérase et antiplasmodiales.

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

- Evaluer la toxicité chronique de *Striga hermonthica*.
- Isoler et identifier les molécules ovicide et larvicide afin de déterminer leur cible biochimique (mode d'action) et évaluer leur aptitude à résister aux mécanismes de détoxification de souches d'insectes résistantes aux insecticides.
- Etudier la phytochimie et les propriétés biologiques des iridoïdes de *Striga hermonthica*. En effet, la littérature leur attribue certaines des propriétés biologiques des Scrophulariaceae.
- Isoler et identifier la dizaine de flavones (non identifiés) mis en évidence par HPLC-DAD afin d'évaluer leurs propriétés biologiques.
- Développer un système de culture de cellules de *Striga hermonthica* en vue de produire les métabolites secondaires de la plante les plus intéressants.

BIBLIOGRAPHIE

1. **ABUBAKAR M. S., ABDURAHMAN E. M. (1998)** Useful plants in traditional control of insect pests. *Journal of herbs species and medicinal plants*, 6(2) 49-54.
2. **ADEBAYO T. A., GBOLADE A. A. (1994)**. Protection of stored cowpea from *Callosobruchus maculatus* using plant product. *Insects Science and its Applications*, 15(2) 185-189.
3. **ALDER L. S., SCHMITT J., BOWERS M. D. (1995)** Genetic variation in defensive chemistry in *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae) and its effect on the specialist herbivore *Junonia coenia* (Nymphalidae). *Oecologia*, 101, 75–85.
4. **AQIL M. (1995)** Flavonoïds from *Striga passargei*. *Ultra Scientist of Physical Sciences*, 7(1) 105-107.
5. **AQIL M., BABAYO Y. BOBBOI A., L. (1996)** Flavone glycosides from *Striga passargei*. *Ultra Scientist of Physical Sciences*, 8(2) 247-250.
6. **AQIL M., KHAN I. Z (1993)** Cirsimiaritin 5-galactoside from *Striga aspera*. *Scientist of Physical Sciences*, 5(1) 95-97.
7. **AQIL M., KHAN I. Z., YAKAKA A. K., RAHMAN F. A (1994)** A new flavone glycoside from *Striga aspera*. *Scientist of Physical Sciences*, 6(1) 131-132.
8. **ARVOUET-GRANT A., VENNAT B., POURRAT A., LEGRET P. (1994)** Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 49(6) 462-468.
9. **AVILA J. G., DE LIVERANTJ. G., MARTINEZ A., MARTINEZ G., MUNOZ J. L., ARCNIEGAS A., DE VIVAR A. R. (1999)** Mode of action of *Buddleja cordata* verbacoside against *staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 66, 75-78.

BIBLIOGRAPHIE

10. **AZIZ A., MARZIAH M. (1993)** Production of steroidal compounds in *Striga asiatica*. *Applications of Plant In Vitro Technology, Proceedings of the International Symposium, Serdang, Malay.*, Nov. 16-18, 175-177.
11. **BADAMI S., GUPTA M. K., SUREST B. (2003)** Antioxydant activity of the ethanolic extract of *Striga orobanchioides*. *Journal of Ethnopharmacology*, 85(2-3) 227-230.
12. **BAL A. B. (1992)** Les principaux insectes du niébé dans le sahel et leur contrôle. In John Libey-Eurotext (eds) *Lutte intégrée contre les ennemis des cultures vivrières dans le sahel*. Cilss, Institut du Sahel séminaires et colloques, Mali 4-9 janvier 1990.
13. **BAOUA M., BESSIERE J. M., PUCCI B., RIGAUD J. P. (1980)** Alcaloïdes de *Striga hermonthica*. *Phytochemistry*, 19, 718.
14. **BARRON D., IBRAHIM R. K. (1996)** Isoprenylated flavonoids, a survey. *Phytochemistry*, 43(5) 921-982.
15. **BENNET R. C., WALLSGROVE R. M. (1994)** Secondary metabolites in plant defence mechanisms, Tansley Review No 72. *New Phytologist*, 127, 617-633.
16. **BINNS A., CHEN R. H., WOOD H. N.; LYNN, D. G. (1987)**. Cell division promoting activity of naturally occurring dehydrodiconiferyl glucosides: do cell wall components control cell division? *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 84, 980-984.
17. **BORS W., HESTER W., MICHEL C., SARAN M. (1990)** Flavonoids as antioxydants: determination of radical scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, 186, 343-355.
18. **BOUSSIM I. J. (2002)** Les phanérogames parasites du Burkina Faso: Inventaire, taxonomie, écologie et quelques aspects de leur biologie. Cas

BIBLIOGRAPHIE

- particulier des Loranthaceae parasites du karité. Thèse de doctorat d'état ès Sciences naturelles. Université de Ouagadougou. 306 pages.
19. **BOX G. E. P., HUNTER W. G., HUNTER J. S. (1978)** Statistics for experiment: an introduction to design, data analysis, and model building. John Wiley & Sons: New York.
 20. **BRANDYOPADHYAY C., NARAYAN V. S. VARIYAR P. S. (1990)** Phenolics of green pepper berries (*Piper nigrum* L.). *Journal of. Agriculture and Food Chemistry*, 38, 1696-1699.
 21. **BRUNETON J. (1993)** Pharmacognosie: Phytochimie Plantes médicinales, 2^{ème} édition, Techniques et Documentation-Lavoisier, Paris pp.915.
 22. **CARVALHO J. C. T., SERTIE J. A. A., BARBOSA M. V. J., PATRICIO K. C. M., CAPUTO L. R. G., SARTIO S. J., FERREIRA L. P., BASTOS J. K. (1999)** Antiinflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. *Journal of Ethnopharmacology*, 64, 127-133.
 23. **CARVALHO L. H., BRANDAO M. G. L., FILHO S. D., LOPES J. L., KRETTLI A. U. (1991)** Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied in vivo in *Plasmodium berghei* infected mice and in vitro against *Plasmodium falciparum* in culture. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 24,1113-1123.
 24. **CHAING H. S. MERINO-CHAVEZ G., YANG L. L., WANG F. N., HAFEZ E. S. (1994)** Medicinal plants: conception/contraception. *Advances in contraceptive delivery systems*, 10(3-4) 355-365.
 25. **CHEONG H., RYU S. Y., OAK M. H., CHEORI S. H. YOO G. S., KIM K. M. (1998)** Studies of structure activity relationship of flavonoids for the anti allergic actions. *Archives of the pharmacology research*, 21, 478-480.

BIBLIOGRAPHIE

26. **CHOUDHURY M. K., MARTING Z. G., AGBAJI A. S., NOK A. J., MUKHOPADYAY S. (2000)** Chemical investigation of the flowers of *Striga senegalensis*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62(5) 396-397.
27. **CHOUDHURY M. K., PHILLIPS A. L., MUSTAPHA A. (1998a)** Pharmacological studies of *Striga senegalensis* (Scrophulariaceae) as an abortifacient. *Phytotherapy Research*, 12(2) 141-143.
28. **CHOUDHURY M. K., SANI U. M., MUSTAPHA A. (1998b)** Antifertility activity of the flowers of *Striga senegalensis* (Scrophulariaceae). *Phytotherapy Research*, 12(3) 207-208.
29. **CIULEI I. (1982)** Practical manuals on the industrial utilisation of medicinal and aromatic plants: I. Methodology for analysis of vegetable drugs. Ministry of chemical industry, Bucharest, ROMANIA, 67 pp.
30. **CLEMENT J. L. (1990)** Les substances naturelles insecticides des plantes: rôle et utilisation dans la lutte contre les ravageurs des cultures. *Bois et forêt des tropiques*, 224, 34-38.
31. **CODY V., MIDDLETON E., HARBORNE J. B. (1986)** Plant flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, pharmacological and structure-activity relationship, New York, Alan. Liss. Inc
32. **COS P., YING L., CALOMME M. (1998)** Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, 61, 71-76.
33. **DALZIEL J M: (1937)** The useful plants of west tropical Africa. The Crown Agents for the Colonies, 4, Millbank, Westminster, London, S.W.1, 612 pp.
34. **DI CARLO G., MASCOLO N., IZZO A. A., CAPASSO F. (1999)** Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, 65(4) 337-353.

BIBLIOGRAPHIE

35. **DIXON R.A., PAIVA N.L. (1995)** Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant-Cell*, 7, 1085–1097.
36. **DONG X., BRAUN E. L.; GROTEWOLD, E. (2001)** Functional conservation of plant secondary metabolic enzymes revealed by complementation of Arabidopsis flavonoid mutants with maize genes. *Plant Physiology*, 127, 46-57.
37. **ELAZQUEZ E. V., TOURNIER H. A., BUSCHIAZZO P. M. D., SAAVEDRA G., SCHINELLA G. R. (2003)** Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*, 74, 91-94.
38. **ELOFF J. N. (1998)** A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, 64, 711-713.
39. **ENZ A., AMSTUTZ R., BODDEKE H., GMELIN G., MALONOWSKY J. (1993)** Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer's disease. *Progress in Brain Research*, 98, 431-445.
40. **ERIKSSON L., JOHANSSON E., KETTANEH-WOLD N., WIKSTRÖN C., WOLD S. (2000)** Design of experiments, principles and applications, Umetrics Academy.
41. **FAO (1987)** Programme de coopération FAO/CILSS-PLI. Conclusions et recommandations du projet Rome: FAO.
42. **FARNSWORTH N. O. (1984)** The role of medicinal plants in drug development. In: Krogsgaard-Larsen P., Kristensen S. B., Kofod H., (Eds.), Natural products and drug development. Balliere, Tindall and Cox, London 8-98.
43. **FARNSWORTH N. R. (1994)** Ethnopharmacology and drug development. In: Prance, G. T. (Ed.), Ethnobotany and the search for new drugs. Wiley, Chichester (Ciba Foundation symposium 185) 42-59.

BIBLIOGRAPHIE

44. **FERNANDEZ M. A., GARCIA M. D., SAENZ M. T. (1996)** Antibacterial activity of the phenolic acids fractions of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*, 53, 11-14.
45. **FERNANDEZ M. A., GARCIA M. D., SAENZ M. T. (1998)** Anti-inflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from *Scrophularia frutescens*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50 (10) 1183-1186.
46. **FOTSIS T., PEPPER M. S., ATKAS E. (1997)** Flavonoids: dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Research*, 57, 2916–2921.
47. **GARCIA D., FERNANDEZ A., SAENZ T., AHUMADA C. (1996)** Antiinflammatory effects of different extracts and harpagoside isolated from *Scrophularia frutescens* L. *Farmaco*, 51(6) 443-446.
48. **GASQUET M., DELMAS F., TIMON-DAVID P. (1993)** Evaluation in vitro and in vivo of a traditional antimalarial, "Malarial 5". *Fitoterapia*, 64(5) 423-426.
49. **HADDOCK E. A., GUPTA R. K., AL-SHAFI S. M. K., LAYDEN K., HASLAM E., MAGNOLATO D. (1982)** The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in plants: biogenetic and molecular taxonomic considerations. *Phytochemistry*, 21, 1049–1062.
50. **HÄKKINEN S. (2000)** Flavonols and phenolic acids in berries and berry products. Doctoral dissertation, Kuopio University, Finland, 92 pp.
51. **HALLIWELL B., GUTTERIDGE J. M. C. (1990)** Role of free radicals and catalytic metals ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1-85.
52. **HARBORNE J. B., GRAYER R. J. (1988)** The flavonoids. in *Advances in research since 1980*. Harborne J. B. ed., Chapman & Hall, London, 921 pp.

BIBLIOGRAPHIE

53. **HARBORNE J.B. (1994)** The flavonoids. *In Advances in research since 1986*. HARborne J. B. ed., Chapman and Hall, London.
54. **HARISH M.S., NAGUR M., BADAMI S. (2001)** Antihistaminic and mast cell stabilizing activity of *Striga orobanchioides*. *Journal of Ethnopharmacology*, 76, 197-200.
55. **HARMAN D. (1993)** Free radical theory of ageing: a hypothesis on the pathogenesis of senile dementia of the alzheimer type. *Age*, 16, 23-30.
56. **HASLAM, E. (1998)** Practical polyphenolics: From structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge University Press, New York, NY.
57. **HAYASHI T., KASAHARA K., SANKAWA U. (1997)** Efficient production of biologically active diterpenoids by leaf organ culture of *Scoparia dulcis*. *Phytochemistry*, 46(3) 517-520
58. **HE Z. D., LAU K. M., XU H. X., LI P. C., BUT P. P. H. (2000)** Antioxydant activity of phenylethanoid glycosides from *Brandisia hancei*. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 483-486
59. **HIREMATH S. P., BADAMI S., HUNASAGATTA S. K., PATIL S. B. (2000)** Antifertility and hormonal properties of flavones of *Striga orobanchioides*. *European Journal of Pharmacology*, 391(1/2) 193-197
60. **HIREMATH S. P., BADAMI S., SWAMI H. K. S., LONDONKAR R. L. (1994)** Antifertility activity of *Striga orobanchioides*. *Biology and Pharmacology Bulletin*, 17(8)9 1029-1031
61. **HIREMATH S. P., BADAMI S., SWAMI H. K. S., PATIL S. B., LONDONKAR R. L. (1997)** Antiandrogenic effect of *Striga orobanchioides*. *Journal of Ethnopharmacology*, 56, 55-60

BIBLIOGRAPHIE

62. **HIREMATH S. P., BADAMI S., SWAMY H. K. S (1996)** Flavones from *Striga orobanchioides*. *Indian Drugs*, 33(5) 232-236
63. **HIREMATH S. P., HANUMANTHARAO S. (1997)** Flavones from *Striga lutea*. *Journal of the Indian Chemical Society*, 74(5) 429
64. **HIREMATH S. P., RAO S. H. (1990)** Antifertility efficacy of the plant *Striga lutea* (Scrophulariaceae) on rats. *Contraception*, 42(4) 467-477
65. **HIREMATH S. P., RAO S. H., JAIN P. K., SEMBULINGAM K. (1990)** Antifertility activity of *Striga lutea*- part I. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 34(1) 23-25
66. **HIREMATH S. P., RURESH K., BADAMI S. (1997)** Antimicrobial activity of various extracts of *Striga sulphurea* and *Hemidesmus indicus*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 59(3) 145-147
67. **HIREMATH S. P., SWAMY H. K. S., BADAMI S., MEENA S. (1996)** Antibacterial and antifungal activities of *Striga densiflora* and *Striga orobanchioides*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58(1) 174-176
68. **HO S. H., LEE L. S., TONG Y. (1995)** Effect of non polar extract of clove flower buds on some life stage of *Tribolium castaneum*. *Integrated Pest Control*, 37(4).112-113.
69. **HO C.T. (1992)** Phenolic compounds in food: An overview. In: *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II. Antioxidants and Cancer Prevention*. (Ho C. T., Lee D. Y., Huang M. T. Eds) ACS Symposium series 507, ACS, Washington, DC. p. 8-34
70. **HODGE H. C., STERNER J. H. (1943)** Determination of substances acute toxicity by DL₅₀. *American Industrial Hygien Association*, 10, 93
71. **HOFFMANN L. (2003)** Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3- O-méthyltransférerase (CCoAOMT)

BIBLIOGRAPHIE

- avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA: shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, 288pp.
72. **HUSSAIN H. S., DEENI Y. Y. (1991)** Plants in Kano ethnomedicine; screening for antimicrobial activity and alkaloids. *International Journal of Pharmacognosy*, 29(1) 51-56
73. **ING Q. D., ZHONG L. L., LI Y. (2002)** Non glycosidic iridoids from *Cymbaria mongolica*. *Phytochemistry*, 59(5) 537-542
74. **ITOIGAWA M., TAKEYA K., ITO CHIHIRO., FURUKAWA H. (1999)** Structure activity relationship of cardiotoxic flavonoids in guinea pig papillary muscle. *Journal of Ethnopharmacology*, 65, 267-272
75. **IVBIJARO M. F., AGBAJE M.(1986)**. Insecticidal activities of *Piper guineense* Schum and Thonn, and *Capsicum* species on the cowpea bruchids *Callosobruchus maculatus* (F.). *Insec. Science and its Application*, 7, 521-524
76. **JAAKOLA L., MAATTA K., PIRTTILA A. M., TORRONEN R., KARENLAMPI S.; HOHTOLA, A. (2002)** Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiology*, 130, 729-39.
77. **JENSEN J. B., BOLAND M. T., HAYES M. (1982)** *Plasmodium falciparum* : rapid assay for in vitro inhibition due to human serum from residents of malaria areas. *Experimental Parasitology*, 54, 416-424
78. **JIA Q., HONG M. F., MINTER D. (1999)** Pikuroside: a novel iridoid from *Picrorhiza kurroa*. *Journal of Natural Product*, 62(6) 901-903
79. **KAMAL I. M., MUSSELMAN L. J., AIGBOKHAN E. I., BERNER D. K. (1996)** Evolution and taxonomy of agronomically important *Striga* species. In *Advances in parasitic plant research*, collection 36, p. 53-73, (MONERO T., CUBERO J. I.,

BIBLIOGRAPHIE

- BERNER D., JOEL D., MUSSELMAN L. J., PARKER C. eds.) Sixth International Parasitic Weeds Symposium, April 16-17-18, 1996, Junta de Andalucia, Espagne, 929 pp.
80. **KARNKA R., RAYANAKORN M., WATANESK S., VANNASORN Y. (2002)** Optimization of High-Performance Liquid Chromatographic Parameters for the Determination of Capsaicinoid Compounds Using the Simplex Method. *Analytical Science*, 18(6), 661-665.
81. **KERHARO J., ADAM J. G. (1974)** La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques, Eds. Vigot frères, Paris, 1011 pp
82. **KHALID A., ZAHEER-UL-HAQ, ANJUM S., KHAN M. R., ATTA-UR-RAHMAN., CHOUDHARY M. I. (2004)** Kinetics and structure-activity relationship studies on pregnane-type steroidal alkaloids that inhibit cholinesterases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 12 () xx-yy
83. **KHAN I. Z.; AQIL M.; KOLO B. (1998)** 5-Hydroxy-6,8-dimethoxyflavone 7,4'-O-diglucoside from *Striga hermonthica* (DEL) Benth., *Ultra Scientist of Physical Sciences*, 10(2) 278-280
84. **KIM D. H., KIM B. R., KIM J. Y., JEONG Y. C. (2000)** Mechanism of covalent adducts formation of aucubin to proteins. *Toxicology Letters*, 114, 181–188.
85. **KIM H K., CHEON B. S., KIM Y. H., KIM S. Y., KIM H. P. (1999)** Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure activity relationships. *Biochemical Pharmacology*, 58, 759-765
86. **KLEIN E. S., RIVIERA S. L. (2000)** A review of criteria functions and response surface methodology for the optimization of analytical scale HPLC separations. *Journal of Liquid Chromatography.& Related Technology*, 23(14), 2097–2121

BIBLIOGRAPHIE

87. **KÖHLER I., JENETT-SIEMS K., SIEMS K., HERNANDEZ M. A., IBARRA R. A., BERENDSOHN W. G., BIENZLE U., EICH E. (2002)** *In vitro* Antiplasmodial Investigation of Medicinal Plants from El Salvador, *Z. Naturforsch.* 57c, 277-281
88. **KOLEVA I. I., VAN BEEK T. A., LINSEN J. P. H., DE GROOT A., EVSTATIEVA L. N. (2002)** Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, 13, 8-17
89. **KONG L. D., CAI Y., HUANG W. W., CHENG C. H. K., TAN R. X. (2000)** Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout. *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 199-207
90. **KONNO K., HIARAYAMA C., YASUI H., NAKAMURA M. (1999)** Enzymatic activation of oleuropein: a protein crosslinker used as chemical defense in the privet tree. Proceedings of the Cytotoxic constituents of *Alectra and Striga spp.* National Academy of Sciences of the United States of America 96, 9159–9164.
91. **LESCA P. (1983)** Protective effects of ellagic acid and other plant phenols on benzo(a)pyrene induced neoplasia in mice. *Carcinogenesis*, 4, 1651–1653.
92. **LESCAO F., FAUGUERAS G. PARIS R. (1972)** Sur divers constituants phénoliques (acides phénols, flavonoids) de *Osyris alba*. *Plantes médicinales et phytothérapie*, 24(3) 152-157
93. **LI J., CHEN X., YIN G. (1997)** Investigation on new resources of medicinal plant Scrophulariaceae in Sichuan province. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 22(6) 329-331
94. **LIANG H. R. (1997)** Phytochemical and electrophoretic characterization and quantitative structure migration relationships of flavonoids from *Epimedium*. Thesis, University of Helsinki, Cosmoprint, Helsinki, pp. 55

BIBLIOGRAPHIE

95. **LIENARD V., SECK D., LOGNAY V. (1993)** Biological activity of *Cassia occidentalis* L. against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored product research*, 29(4) 311-318
96. **LIETCHFIEL J. T., WILCOXON F. A. (1949)** A simplified method of evaluating dose effect experiments. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 95, 99-113
97. **LIN Q. S. (1977)** The chemistry of Chinese herb constituents. Scientific Press, Beijing, pp. 601
98. **MACHEIX J. J., FLEURIET A., BILLOT J. (1990)** Fruit phenolics. Boca Raton, USA: CRC Press
99. **MANTLE D., EDDEB F., PICKERING A. T. (2000)** Comparison of relative antioxydant activities of British medicinal plant species in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 47-51
100. **MARHUENDA E., GARCIA M. D. (1985)** Mise en évidence des sommités fleuries d'*Ononis natrix* L. Identification de l'acide ferulique. *Plantes médicinales et phytothérapie*, 21(2) 153-159
101. **MBATA G. N., EPPENDU O. T. (1992)** The insectidal action of four botanicals against three storage beetles. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.*, 57(3A) 723-733
102. **M'BOOB S. S. (1986)** A regional programme for West and Central Africa. In Proceedings of the FAO/OAU All-African Consultation on *Striga* control. 20-24 October, 1986, Maroua, Cameroon
103. **McCLURE JW (1986)** Physiology of flavonoids in plants, in *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships* (Cody V, Middleton E and Harborne JB eds) pp 77–85, Alan R. Liss, Inc., New York.

BIBLIOGRAPHIE

104. **MERKEN H. M., BEECHER G. R. (2000)** Measurement of food flavonoids by liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3) 577-599
105. **METHODE DE REFERENCE POUR LE DOSAGE DES TANINS (1984)** *Journal officiel des Communautés Européennes*, L197, 18-20
106. **MIDDLETON E., KANDASWAMI C., THEOHARIDES T. C. (2000)** The effect of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52, 673-751
107. **MOHAMED K. I. (1994)** Biosystematics and diversification in the genus *Striga* Lour. (Scrophulariaceae) in Africa. PhD thesis. Norfolk: Old Dominion University
108. **MORETTI M.D.L., BAZZONI E., GIOVANNI SANNA PASSINO, ROMOLO PROTA (1998)** Antifeedant Effects of Some Essential Oils on *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera, Tephritidae). *Journal of Essential Oil Research*, 10, 405-412.
109. **MUKHTAR H., DAS M., KHAN W. A., WANG Z. Y., BLIK D. P., BICKERS D. R. (1988)** Exceptional activity of tannic acid among naturally occurring plant phenols in protecting against 7,12-dimethylbenz(a) anthracene-, benzo(a)pyrene-, 3-methylcholantrene- and N-methyl-Nnitroso urea-induced skin tumorigenesis in mice. *Cancer Research*, 48, 2361–2365.
110. **MUSSELMAN L. J. (1987)** Taxonomy of witchweeds. In *Parasitic weeds in agriculture volume I: Striga*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, U.S.A. 317 pp.
111. **MUSSELMAN L. J., BHARATHALASKMI S. B., KNEPPER D. A., MOHAMED K. I., WHITE C. I. (1991)** Recent research on the biology of *Striga asiatica*, *S. gesnerioides* and *S. hermonthica*. In: S.K. Kim, ed. *Combating Striga in Africa*. Proceedings, International Workshop, Ibadan, Nigeria, 1988. IITA, Ibadan, 31-41

BIBLIOGRAPHIE

112. **MWANGI R. W., MUKIAMA T K. (1989)** Studies of insecticidal and growth-regulating activity in extracts of *Melia volkensii* (Gurke), an indigenous tree in Kenya. *East African Agriculture and Forestry Journal*, 54(3) p. 165-171.
113. **NACOULMA O. G. (1996)** Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles au Burkina-Faso : cas du plateau central ; thèse d'état Université de Ouagadougou, Burkina-Faso, Tome I, 320 pp, Tome II, 261 pp
114. **NAKANISHI T., OGAKI J., INADA A., MURATA H., NISHI M., LINUMA M., YONEDA K. (1985)** Flavonoids of *Striga asiatica*. *Journal of Natural Product*, 48(3) 491-493
115. **NELDER J. A., MEAD R. (1965)** A simplex method for function minimization. *Computer Journal*, 7, 308-313.
116. **NIJVELDT R. J., VAN NOOD E., VAN HOORN D. E. C., BOELENS P. G., VAN NORREN K., VAN LEEUWEN P. A. M. (2001)** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 418-425
117. **NISHIZUKA Y. (1995)** Protein kinase and lipid signaling for sustained cellular responses. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 9, 484-496.
118. **NISSLER L., GEBHARD R., BERGER S. (2004)** Flavonoid binding to a multi drug-resistance transporter protein: an STD-NMR study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379 (7/8) 1045-1049
119. **NOREEN Y. (1997)** Separation and bioassay in identification of cyclooxygenase inhibitors from plants, with emphasis on flavonoids. Thesis, Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Pharmacy 173, Uppsala. pp. 55

BIBLIOGRAPHIE

120. **OKPAKO L. C., AJAIYEGBA E. O. (2004)** In vitro and in vivo antimalarial studies of *Striga hermonthica* and *Tapinathus sessilifolius* extracts. *African Journal of Medical and Medicinal Science*, 33(1) 73-75
121. **ORGANISATION DE L'UNITE AFRICAINE/ CSTR (1988)** Pharmacopée Africaine: méthodes générales d'analyses vol.2, 1^{ère} édition Lagos-Nigeria pp. 264
122. **OUEDRAOGO O. (1992)** Stratégies de lutte contre *Striga hermonthica* au Burkina Faso in "La lutte intégrée contre les ennemis des cultures vivrières dans le sahel. 2^{ème} séminaire sur la lutte intégrée contre les ennemis des cultures vivrières dans le sahel, Bamako, Mali, 4-9 Janvier 1990". Ed. John libbey Eurotext, Paris, pp. 155-158
123. **OUTINEN K., VUORELA H., HILTUNEN R. (1996)** Optimization of HPLC separation by computer assisted optimization methods. Comparison of three methods. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 4, 199–210.
124. **OWEN P. L., JOHNS T. (1999)** Xanthine oxydase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*, 64, 149-160
125. **PACHER T., BACHER M., HOFER O., GREGER H. (2001)** Stress induced carbazole phytoalexins in *Glycosmis* species. *Phytochemistry*, 58, 129-135
126. **PARKER C., RICHES C. R. (1993)** Parasitic Weeds of the World: Biology and Control. Wallingford UK.: CAB International
127. **PELANDER A., SUMMANEN J., YRJÖNEN T., HAARIO H., OJANPERÄ I., VUORELA H. (1999)** Optimization of separation in TLC using desirability functions and mixture designs according to " PRISMA". *Journal of Planar Chromatography*, 12, 365-372

BIBLIOGRAPHIE

128. **PETERS W. PORTUS J. H. ROBINSON B. L. (1975)** The chemotherapy of rodent malaria. XXII: the value of drug resistant strains of *Plasmodium berghei* in screening for blood schizontocidal activity. *Annals of tropical Medicine and Parasitology*, 69, 155-171.
129. **PSOTOVA J., CHLOPCIKOVA S., MIKETOVA P., HRBAC J., SIMANEK V. (2004)** Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. Part III. Apigenin, Baicalin, Kaempferol, Luteolin and Quercetin. *Phytotherapy research*, 18, 516-521.
130. **RABE T., VAN STADEN J. (1997)** Antibacterial activity of south African plant used for medicinal purpose. *Journal of Ethnopharmacology*, 56(1) 81-87.
131. **RAMAIIH K. V., PARKER C., VASUDEVA RAO M. J., MUSSELMAN L. J. (1983)** *Striga* identification and control handbook. Information Bulletin No. 15. Patancheru, A. P., India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics
132. **RAMESH P., YUVARAJAN C. R. (1992)** Flavonoids of *Striga lutea*. *Indian Journal of Heterocyclic Chemistry*, 1(5) 259-260.
133. **RANK C., RASMUSSEN L. S., JENSEN R. S., PIERCE S., PRESS M. C., SHOLES J. D. (2004)** Cytotoxic constituents of *Alectra* and *Striga* species. *Weed Research*, 44(4) 265-270
134. **RAYNAL-ROQUES A. (1996)** A hypothetic history of *Striga*: A preliminary draft. In: M.T. Moreno and J.I. Cubero, eds. *Advances in Parasitic Plant Research*. Proceedings of the Sixth International Symposium on Parasitic Plants. Cordoba, Spain, 105-11
135. **RECIO M. C., GINER R. M., MANEZ S., RIOS J. L. (1994)** Considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents. *Planta Medica*, 60 (3) 232-234.

BIBLIOGRAPHIE

136. **RHEE I. K., VAN DE MEENT M., INGKANINAN K., VERPOORTE R. (2001)** Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*, 915, 217–223
137. **RIBEREAU-GAYON P. (1968)** *Composés Phénoliques des végétaux*. Dunod, Paris p.57
138. **RICE-EVANS C. A., MILLER N. J., PAGANGA G. (1996)** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7) 933-956
139. **ROBBINS R. J (2003)** Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51(10) 2866-2887
140. **RUGUTT J. K., RUGUTT J. K., IRANI R. J., FISCHER N. H., BERNER D. K., McCARLEY T. D. (1996)** GC/MS Evaluation of Compounds in Dry and Conditioned Striga Species Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(12) 3977-3982
141. **SABU M. C., KUTTAN R. (2002)** Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxydant property. *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 155-160
142. **SAMUELSSON G. (1993)** Drugs of natural origin. Textbook of pharmacognosy. Swedish pharmaceutical press editor
143. **SANON A., OUEDRAOGO A. P. (1998)** Etude de variation des paramètres démographiques de *Callosobruchus maculatus* (F.) et de ses parasitoïdes, *Dinarmus basalis* (Rond.) et *Eupelmus vuilletti* (Crawf), sur le niébé dans une perspective de lutte biologique. *Insect Science and its Applications*, 18(3) 241-250.

BIBLIOGRAPHIE

144. **SANTOS W. R., BERNADO R. R., PEÇANHA L. M. T. (1997)** Haemolytic activities of plant saponins and adjuvants. Effect of *Periandra mediterranea* saponin on the humoral response to the FML antigen of *Leishmania dovani*, *Vaccine*, 15(9) 1024-1029.
145. **SARASWAT B., VISEN P. K. S., PATNAIK G. K., DHAWAN B.N. (1999)** Ex vivo and in vivo investigations of Picroliv from *Picrorhiza kurroa* in an alcohol intoxication model in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 66, 263-269
146. **SAUERBORN J., DÖRR I., ABBASCHER A., THOMAS H., KROSCHEL J. (1996)** Electron microscopic analysis of the penetration process of *Fusarium nygamai*, a hyperparasite of *Striga hermonthica*. *Biological Control*, 7(1) 53-59.
147. **SCHULZ B., SUCHER J., AUST H. J., KROHN K., LUDWIG K., JONES P. J., DÖRING D. (1995)** Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species. *Mycological Research*, 99, 1007-1015.
148. **SEREME A., KOUDA-BONAFOS M. NACRO M. (1993)** Phenolic compounds in *Sorghum caudatum* tissues during plant development. *Biomass and Bioenergy*, 4(1) 69-71.
149. **SHAHIDI F., NACZK M. (1995)** Food phenolics. Sources, Chemistry, Effects, Applications. Lancaster, USA, Technomic Publishing Company, Inc.
150. **SHIRLEY B. (1996)** Flavonoid biosynthesis: "new" functions for an "old" pathway. *Trends in Plant Science*, 1, 377-382.
151. **SIMONSEN H. T., NORDSKJOLD J. B., SMITT U. W., NYMAN U., PALPU P., JOSHI P., VARUGHESE G. (2001)** In vitro screening of Indian medicinal plants for antiplasmodial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 74, 195-204.
152. **SINGLETON V. L., ORTHOFER R. LAMUELA-RAVENTOS R. M. (1999)** Analysis of total phenols and others oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.

BIBLIOGRAPHIE

153. **SINHA S., MEHROTRA J., JAISWAL A. K., DHAWAN B. N. (1998)** Picroliv, the iridoid glycoside fraction of *Picrorhiza kurroa*, selectively augments human T cell response to mycobacterial protein antigens. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 20 (4) 579-588.
154. **SMIT H. F., KROES B. H., VAN DEN BERG A. A. J., VAN DER WAL D., VAN DEN WORM E., BEUKELMAN C. J., VAN DJICK H., LABADIE R. P. (2000)** Immunomodulatory and anti-inflammatory activity of *Picrorhiza scrophulariiflora*. *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 101-109.
155. **SMITH D. A.; BANKS S. W. (1986)** Formation and biological properties of isoflavonoid phytoalexins, in *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships* (Cody V, Middleton E and Harborne JB eds) pp 113–124, Alan R. Liss, Inc., New York.
156. **STRACK D. (1997)** Phenolic metabolism. In *Plant Biochemistry* (Dey P. M., Harborne J. B. eds.) London, UK, Academic Press, pp. 387–416
157. **SWEENEY A. P., WYLLIE S. G., SHALLIKER J. L., MARKHAM J. L. (2001)** Xanthine oxydase inhibitory activity of selected Australian native plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 75, 273-277.
158. **TAMAGNONE L., MERIDA A., STACEY N., PLASKITT K., PARR A., CHANG C.-F., LYNN D., DOW J. M., ROBERTS K.;MARTIN C. (1998)** Inhibition of phenolic acid metabolism results in precocious cell death and altered cell morphology in leaves of transgenic tobacco plants. *Plant Cell*, 10, 1801-1816.
159. **TAMBOURA H. H., KABORE H., YAMEOGO S. M. (1998)** Médecine et pharmacopée vétérinaires traditionnelles dans la province du Passoré. *Revue de Médecine et de Pharmcopée Africaine*, 11/12, 99-118

BIBLIOGRAPHIE

160. **TEUTONICO R. A., DUDLEY M. W., ORR J. D., LYNN D. G.; BINNS A. (1991)** Activity and accumulation of cell division-promoting phenolics in tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 97, 288-297.
161. **TIWARI A. K. (2004)** Antioxdants: new generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders. *Current Science*, 86(8) 1092-1102.
162. **TRAORE D., VINCENT C., STEWART R. K. (1996)** Association and synchrony of *Smicronyx guineanus* Voss, *S. umbrinus* Hustache (Coleoptera: Curculionidae), and the parasitic weed *Striga hermonthica* (Del.) Benth. *Biological Control*, 7(3) 307-315.
163. **UEDA H., YAMAZAKI C., YAMAZAKI M. (2002)** Luteolin as an anti inflammatory and anti allergic constituent of *Perilla frutescens*. *Biologiactal and Pharmacological Bulletin*, 25(9) 1197-1202.
164. **VELASKEZ E, TOURNIER H. A., MORDUJOVICHOLE B. P., SAAVEDRA G., SCINELLA G.R. (2003)** Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*, 74, 91-97
165. **VOHORA S. B., KHANNA T., ATHAR M. (1997)** Analgésic activity of bacosine, a new triterpene isolated from *Bacopa monnieri*. *Fitoterapia*, 68(4) 361-365
166. **WAGNER H., BLADT S., ZGAINSKI E. M. (1983)** Drogenanalyse, Springer Verlag, Berlin, pp. 163-165
167. **WENIGER B., ROBLEDO S., ARANGO G. J., DEHARO E., ARAGÓN R., MUNOZ V., CALLAPA J., LOBSTEIN A., ANTON R. (2001)** Antiprotozoal activities of Colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 78, 193-200.
168. **WINKEL-SHIRLEY B. (2002)** Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 218-223.
169. **XI-XU H., LEE S. F. (2001)** Activity of plant flavonoids against antibiotic resistant bacteria. *Phytotherapy research*, 15, 39-43.

BIBLIOGRAPHIE

170. **YIN Y., CARTER C. W. Jr. (1996)** Incomplete factorial and response surface methods in experimental design: yield optimization of tRNA^{Trp} from in vitro T7 RNA Polymerase transcription. *Nucleic Acids Research*, 24(7), 1279-1286.
171. **YOKOZAWA T., CHEN C. P., DONG E., TANAKA T., NONAKA G. I; NISHIOKA I. (1998)** Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochemical Pharmacology*, 56, 213-222
172. **ZAND R. S. R., JENKINS D. J. A., BROWN T. J., DIAMANDIS E. P. (2002)** Flavonoids can block PSA production by breast and prostate cancer cell lines. *Clinica Chimica Acta*, 317, 17-26

PUBLICATIONS EN RAPPORT AVEC LA THESE

