



Université de Ouagadougou

Ecole Doctorale de la Santé



Université Claude Bernard Lyon1

Ecole Doctorale 341

THESE UNIQUE EN COTUTELLE

Doctorat *es* Sciences d'Application Pharmaceutique

Option : Pharmacologie Appliquée

Par

OUEDRAOGO Noufou

**ETUDES PHYTOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE
DES METABOLITES SECONDAIRES DE
PTEROCARPUS ERINACEUS POIR.
(FABACEAE)**

Soutenu le 14 Juin 2012

Devant le jury :

Présidente du jury :

Pr Odile G. NACOULMA : Biochimie/Université de Ouagadougou

Membres du jury :

Pr Jean-Baptiste NIKIEMA : Pharmacognosie/Université de Ouagadougou

Pr Jean KOUDOU : Chimie organique-Phytochimie/CAMES

**Pr Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA : Pharmacognosie/Université Claude
Bernard Lyon 1**

Pr José CHULIA : Pharmacognosie/Université de Limoges

Pr Innocent P. GUISSOU : Pharmacologie/Université de Ouagadougou

DEDICACE

Je dédie ce travail

A mon papa et mes mamans.

A mes frères, sœurs et toute ma famille.

A mes amis.

*Et à tous ceux, qui d'une manière ou d'une autre ont
contribué à l'aboutissement de ce travail.*

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce à l'appui financier de l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) et à l'appui technique du département de la Médecine-Pharmacopée Traditionnelles/Pharmacie de l'Institut de Recherche en Science de la Santé (MEPHATRA-PH/IRSS).

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance :

Au Professeur Innocent Pierre GUISSOU

Directeur de l'école doctorale de la santé et coordonnateur de la formation doctorale en pharmacologie et toxicologie appliquées à l'UFR/SDS à l'université de Ouagadougou, notre directeur de thèse. Malgré vos multiples occupations, vous avez accepté de nous recevoir dans votre équipe de recherche et de guider nos premiers pas dans le monde de la recherche. Nous tenons à vous remercier pour la disponibilité, les conseils, l'encadrement et la confiance que vous aviez placée en nous tout au long de ces années de coopération. Votre rigueur scientifique et votre souci pour un travail bien fait nous ont séduits lors de notre formation.

Au Professeur Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA

Responsable du laboratoire de botanique, pharmacognosie et phytothérapie à la Faculté de pharmacie de Lyon 1(ISPB), notre directrice de thèse. Nous tenons à vous remercier pour nous avoir accueillis dans votre laboratoire, nous avoir fait confiance. Votre générosité et vos conseils nous ont encouragés tout au long de ce travail. Un grand merci pour l'intérêt que vous aviez accordé à ce travail. Nous avons été touchés par vos qualités scientifiques et humaines, votre simplicité et votre disponibilité.

Au Professeur Jean KOUDOU

Directeur des programmes du Conseil Africain et Malgache pour l'Enseignement Supérieur (CAMES) à Ouagadougou, codirecteur de thèse. Nous tenons à vous remercier pour votre disponibilité, vos conseils, votre soutien moral et votre encadrement durant ce temps malgré vos nombreuses occupations et vos lourdes responsabilités. Nous avons admiré vos qualités scientifiques et humaines au cours de nos travaux.

Au Docteur Anne-Emmanuelle HAY

Maitre de conférences au laboratoire de botanique, pharmacognosie et phytothérapie de la Faculté de pharmacie de Lyon 1(ISPB), codirectrice de thèse. Nous vous remercions pour nous avoir guidés constamment dans notre travail, nous avoir aidés par votre expérience et vos précieux conseils. Merci pour votre amour du travail bien fait, votre sympathie, votre esprit d'ouverture, votre constante disponibilité et votre assistance multiforme sans faille tout

au long de ce travail. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de notre sincère gratitude et notre profond respect.

A nos maîtres et juges

- **Professeur Odile G. NACOULMA**, vous nous faites l'honneur pour avoir accepté d'évaluer ce travail et de présider ce jury malgré votre emploi du temps chargé
- **Professeur Jean-Baptiste NIKIEMA**, pour votre disponibilité et pour avoir fait partir de ce jury malgré vos multiples occupations
- **Professeur José CHULIA**, pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail

Nous tenons à exprimer toute notre gratitude :

Au Professeur G. COMTE, directeur du Centre d'Etude des Substances Naturelles (CESN) et son équipe (Université de Lyon 1), pour nous avoir ouvert les portes de son laboratoire pour la réalisation des tests antioxydants et les analyses en CLHP.

Au Dr Irène GARCIA, du département de Pathologie et d'immunologie, CMU, Université de Genève, Suisse, pour la réalisation des tests sur la formation de TNF et NO de cultures cellulaires de macrophages.

A Mme Monique LUSSIGNOL pour nous avoir initiés en méthodologie de fractionnement, isolement et identification en phytochimie.

A Mme Christine BAYET pour la qualité du traitement des données des spectres RMN.

Au Dr S. MICHALET, Mme CARRIER Michèle, Mr S. ACHARD et tout le personnel du laboratoire de botanique, pharmacognosie et phytothérapie à l'ISPB pour leurs conseils, leur soutien et leurs encouragements.

Au Dr M. LOMPO, Directeur adjoint de l'IRSS, pour la qualité de son encadrement lors des travaux de pharmacologie.

Aux maîtres de recherche Dr S. OUEDRAOGO, Dr F. KINI, Dr H. MILLOGO pour leurs nombreux conseils, leur soutien moral et leur aide scientifique et technique.

Au Dr R. W. SAWADOGO et Dr A. TIBIRI pour leur disponibilité, leur esprit d'équipe et leur qualité d'encadrement lors des traitements des données pharmacologiques.

A Dr N. SOME, Dr Y. OUEDRAOGO, Dr S. SOURABIE, Dr A. TRAORE, Dr S. TRAORE, Dr B. OUATTARA, Dr J.-C. OUEDRAOGO, Mr I. TISSOLOGO, Mr B. YARO, Mr G. R. KABORE, Mme YOUNGBARE, Mme RAMDE pour leur soutien inestimable ; et à tout le personnel de MEPHATRA-PH.

A Dr M. TIENDREBEOGO, Dr HILOU, Dr M. COMPAORE et Dr R. MEDA et le personnel du LABIOCA à l'UFR/SVT pour leurs conseils et leur soutien.

A mes amis Dr J.-P. OUEDRAOGO, Dr J. KABORE, L. BELEMNABA, C. HIEN-ZAGUE, G. OUEDRAOGO, S. ILBOUDO, Dr R. BOLY, Dr F. ZONGO

A Mr Sébastien OUEDRAOGO et sa famille pour leur soutien moral et les encouragements

A Mme Alice ILBOUDO et sa famille, pour leur soutien moral.

Aux familles LUSSIGNOL et BAYET pour leur soutien et leur accompagnement hors pédagogique tout au long de mes séjours à LYON.

A tous mes enseignants de l'UFR/SDS et de l'UFR/SVT de l'université de Ouagadougou, du lycée municipal de Bobo Dioulasso et de l'école primaire publique de Gbapleu (RCI) pour l'enseignement et les conseils que j'ai reçus durant toutes ces années d'études.

TABLE DES MATIERES

DEDICACE.....	i
REMERCIEMENTS	iii
TABLE DES MATIERES	vi
TABLE DES FIGURES.....	xiii
TABLE DES TABLEAUX.....	xvi
ABREVIATIONS	xvii
RESUME.....	xx
ABSTRACT	xxi
LISTE DES PUBLICATIONS.....	xxii
Introduction	1
CHAPITRE 1 : GENERALITES	6
1.1 La famille des Fabaceae	7
1.1.1.Position systématique de la famille des Fabaceae ou Leguminosae	7
1.1.2. Caractères morphologiques des Fabaceae.....	7
1.1.3.Utilisations en médecine traditionnelle	8
1.2 Le genre <i>Pterocarpus</i>	9
1.2.1.Caractères morphologiques	10
1.2.2.Utilisation en médecine traditionnelle.....	10
1.2.3.Métabolites secondaires isolés du genre <i>Pterocarpus</i>	12
1.2.4.Données pharmacologiques des métabolites isolés et extraits du genre <i>Pterocarpus</i>	21
1.3 L'espèce <i>P. erinaceus</i>	23
1.3.1.Caractères morphologiques	23
1.3.2.Répartition de <i>P. erinaceus</i>	24
1.3.3.Utilisations traditionnelles.....	25
1.3.4.Autres utilisations.....	26
1.3.5.Métabolites secondaires isolés de l'espèce <i>P. erinaceus</i>	26
1.3.6.Données pharmacologiques des molécules isolées de <i>P. erinaceus</i>	27
1.3.7.Données pharmacologiques antérieures sur l'espèce <i>P. erinaceus</i>	27

1.4	Inflammation	28
1.4.1.	Définition	28
1.4.2.	Les causes de l'inflammation	28
1.4.3.	Immunité innée et réaction inflammatoire	28
1.4.4.	Types d'inflammations.....	29
1.4.4.1.	La réaction inflammatoire aiguë	29
1.4.4.2.	L'inflammation chronique.....	29
1.4.5.	Les médiateurs de l'inflammation	29
1.4.5.1.	Le système du complément	29
1.4.5.2.	Amines vasoactives	30
1.4.5.3.	Protéases et peptides.....	30
1.4.5.4.	La substance P	31
1.4.5.5.	Médiateurs lipidiques	31
1.4.5.6.	Le Platelet activating factor (PAF).....	33
1.4.5.7.	Les cytokines.....	34
1.4.5.8.	Les radicaux libres oxygénés (RLO).....	35
1.4.5.9.	Le monoxyde d'azote (NO).....	35
1.4.6.	Les étapes de l'inflammation aiguë.....	36
1.4.6.1.	Réaction vasculo-exsudative	36
1.4.6.2.	Réaction cellulaire.....	37
1.4.6.3.	Détersion	38
1.4.6.4.	Réparation	38
1.4.7.	Quelques pathologies à composante inflammatoire	39
1.4.7.1.	Pathologies infectieuse	39
1.4.7.2.	Arthrite rhumatoïde	39
1.4.7.3.	L'asthme.....	40
1.4.7.4.	L'athérosclérose	40
1.4.8.	Traitement pathologique	40
1.4.8.1.	Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)	41
1.4.8.2.	Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)	45

1.4.9.Effet antalgique	46
1.4.10.Effet antipyrétique.....	47
1.4.11.Les antirhumatismaux	48
1.4.12.Médicament étiologique.....	49
1.4.13.Effets secondaires indésirables des anti-inflammatoires.....	49
1.4.13.1.Les anti-inflammatoires non stéroïdiens	49
1.4.13.2.Les anti-inflammatoires stéroïdiens	51
1.4.14.Métabolites secondaires à propriétés anti-inflammatoires : triterpènes et flavonoïdes	51
1.4.14.1.Les triterpènes	51
1.4.14.2.Les flavonoïdes	53
1.5 Antioxydants	57
1.5.1.Définition	57
1.5.2.Radicaux libres.....	57
1.5.3.Sources de production des RLO	58
1.5.3.1.Source exogène	58
1.5.3.2.Source endogène	58
1.5.4.Mécanisme d'action	60
1.5.4.1.Les antioxydants enzymatiques.....	60
1.5.4.2.Les antioxydants non enzymatiques.....	60
1.5.5.Le stress oxydatif	62
1.5.6.Maladies liées au stress oxydatif.....	62
CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES	64
2.1.Matériels d'étude phytochimique.....	65
2.1.1.Méthodes chromatographiques	65
2.1.1.1.Chromatographie analytique	65
2.1.1.3.Chromatographie préparative	65
2.1.2.Méthodes physicochimiques	66
2.1.2.1.Pouvoir rotatoire.....	66
2.1.2.2.Résonance magnétique nucléaire(RMN).....	67
2.2.Matériels d'étude biologique.....	67

2.2.1. Matériel végétal.....	67
2.2.2. Animaux de laboratoire.....	67
2.2.3. Matériels techniques pour les tests biologiques.....	68
2.2.4. Matériels divers.....	68
2.2.5. Substances pharmacologiques.....	68
2.3. Méthodes d'études phytochimiques.....	70
2.3.1. Matériel végétal.....	70
2.3.2. Extraction et fractionnement.....	70
2.3.2.1. Décoction.....	70
2.3.2.2. Criblage phytochimique (test colorimétrique).....	70
2.3.2.3. Ecorces du tronc de <i>P. erinaceus</i>	70
2.3.2.4. Ecorces de racines de <i>P. erinaceus</i>	73
2.3.2.4.3. CLHP Analytique.....	75
2.3.2.5. Feuilles de <i>P. erinaceus</i>	77
2.3.2.5.1. CLHP analytique.....	77
2.4. Méthodes d'études biologiques.....	82
2.4.1. Toxicité générale aigüe.....	82
2.4.1.1. Principe.....	82
2.4.1.2. Protocole.....	82
2.4.2. Activités anti-inflammatoires.....	83
2.4.2.3. Test anti-œdémateux à la Carragénine.....	83
2.4.2.4. Test anti-œdémateux à l'huile de croton.....	84
2.4.3. Activités analgésiques.....	85
2.4.3.1. Test à l'acide acétique.....	85
2.4.3.2. Test au formaldéhyde.....	86
2.4.4. Activité antipyrétique.....	87
2.4.4.1. Principe.....	87
2.4.4.2. Protocole.....	87
2.4.5. Test de détermination de tumor necrosis factor alpha (TNF α) et de nitrite.....	87
2.4.5.1. Principe.....	87

2.4.5.2. Protocole.....	88
2.4.6. Activités antioxydantes	88
2.4.6.1. Méthode anti-radicalaire DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)	88
2.4.6.2. Méthode CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity).....	90
2.4.7. Inhibition de la lipoxigénase	91
2.4.7.1. Principe.....	91
2.4.7.2. Protocole.....	91
2.4.8. Inhibition de la peroxydation lipidique	92
2.4.8.1. Principe.....	92
2.4.8.2. Protocole.....	92
2.4.9. Analyse des résultats	93
2.4.10. Aspect éthique de l'étude	93
CHAPITRE 3, RESULTATS ET DISCUSSIONS	94
3.1. Résultats d'études phytochimiques	95
3.1.1. Criblage phytochimique	95
3.1.2. Analyses CLHP	96
3.1.2.1. Extraits des écorces de tronc de <i>P. erinaceus</i>	96
3.1.2.2. Extraits des feuilles de <i>P. erinaceus</i>	97
3.1.3. Identification des composés isolés	98
3.1.3.1. Composé PE.1	99
3.1.3.2. Composé PE.2	101
3.1.3.3. Composé PE.3	103
3.1.3.5. Composé PE.5	105
3.1.3.6. Composé PE.7	108
3.1.3.7. Composé PE.8	111
3.1.3.8. Composé PE.9	115
3.1.3.9. Composé PE.11	117
3.1.3.10. Composé PE.12	121
3.1.3.11. Composé PE.14	123
3.1.3.12. Composé PE.15	126

3.1.3.13.Composé PE.16	129
3.1.3.14.Composé PE.17	131
3.1.3.15.Composé PE.18	133
3.2.Résultats d'études biologiques	136
3.2.1.Toxicité générale aigüe	136
3.2.2.Effets anti-inflammatoires	136
3.2.2.1.Test anti-œdémateux à la Carragénine	136
3.2.2.2.Test anti-œdémateux à l'huile de croton	142
3.2.3. Effets analgésiques	144
3.2.3.1.Test à l'acide acétique	144
3.2.3.2.Test au formaldéhyde	146
3.2.4. Effet antipyrétique	148
3.2.5.Effet inhibiteur de tumor necrosis factor alpha (TNF α) et de Nitrites	150
3.2.5.1.TNF α	150
3.2.5.2.Nitrites	151
3.2.6. Effet antioxydant	152
3.2.7.Effet inhibiteur de la peroxydation lipidique et de la lipoxygénase.....	154
3.3.Discussions.....	156
3.3.1.Etude phytochimique.....	156
3.3.2.Etude biologique	157
3.3.2.1.Toxicité générale aiguë	157
3.3.2.2.Activités anti-inflammatoires	157
3.3.2.3.Activités analgésiques	160
3.3.2.4.Activité Antipyrétique.....	162
3.3.2.5.Détermination de la production de TNF α et de NO	163
3.3.2.6.Activités Antioxydantes	165
3.3.2.7.Inhibition de la peroxydation lipidique et de l'activité de la lipoxygénase....	166
CHAPITRE IV : CONCLUSION GENERALE-PERSPECTIVES.....	168
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	171
ANNEXE	194

ARTICLES PUBLIES..... 214

TABLE DES FIGURES

Figure 1- 1: Divers types de feuilles chez les Fabacées (Guignard, 2004)	8
Figure 1- 2: Répartition géographique du genre <i>Pterocarpus</i> (Saslis-Lagoudakis et al., 2011)	10
Figure 1- 3: Nombre d'utilisation des espèces du genre <i>Pterocarpus</i> par catégorie de pathologies (Saslis-Lagoudakis et al., 2011)	11
Figure 1- 4: <i>P. erinaceus</i> : Plante (A), feuille (B), écorces de tronc (C) et fleurs et feuilles (D)	24
Figure 1- 5: Carte de repartition de <i>Pterocarpus erinaceus</i> sur le continent africain	25
Figure 1- 6: Biosynthèse des prostaglandines et des thromboxanes (Cipollone et al., 2008). 32	
Figure 1- 7: Biosynthèse des leucotriènes (Werz et Steinhilber, 2006)	33
Figure 1- 8 : Réaction inflammatoire (diapédèse) (Béné et al., 2005).....	37
Figure 1- 9: Mécanisme de la fièvre (Rogo von Vigier, 2002).....	48
Figure 1- 10 : pathogénie des lésions intestinales induites par les AINS (Thiéfin et Beaugerie , 2005)	50
Figure 1- 11: Inter-relations entre les différents types de flavonoïdes (Markham, 1982).....	54
Figure 1- 12 : Production de RLO et système antioxydant enzymatique (Schäfer et Werner, 2008) 59	
Figure 2- 1: Schéma d'extraction et de fractionnement des écorces de tronc de <i>P. erinaceus</i>	71
Figure 2- 2: Schéma de fractionnement d'extrait DCM (A)	72
Figure 2- 3: Schéma de fractionnement de la phase AcOEt (D)	73
Figure 2- 4 : Schéma d'extraction et de fractionnement des écorces des racines de <i>P. erinaceus</i>	74
Figure 2- 5 : Schéma de fractionnement de l'extrait DCM (E).....	75
Figure 2- 6 : Schéma de fractionnement de la phase BuOH (H).....	76
Figure 2- 7 : Schéma d'extraction et de fractionnement des feuilles de <i>P. erinaceus</i>	78
Figure 2- 8 : Schéma de fractionnement de la fraction flavonoïdique (J).....	79
Figure 2- 9 : Schéma de fractionnement de la phase AcOEt (O)	80
Figure 2- 10: Schéma de fractionnement de la phase BuOH (P)	81
Figure 3- 1: Profil CCM analytique de de la fraction flavonoïdique (L), des phases DCM (N), AcOEt (O), BuOH (P) et phase aqueuse (Q) des feuilles de <i>P. erinaceus</i>	95
Figure 3- 2: Profil CCM analytique de DCM (A) à l'UV 254 et 366 nm puis après révélation à la vanilline sulfurique.	96

Figure 3- 3: Chromatogrammes CLHP de l'extrait MeOH (F) et des phases AcOEt (G) et BuOH (H) des écorces de racines de <i>P. erinaceus</i> . Colonne : Kromasyl 250x4.6 mm ; 100 Å. Gradient : 8 à 40% de MeOH dans H ₂ O en 20 min ; 40 à 100% de MeOH dans H ₂ O en 2 min ; 100% MeOH pendant 5 min.....	97
Figure 3- 4: Chromatogrammes CLHP de la fraction flavonoïdique (L), des phases DCM (N), AcOEt (O), BuOH (P) et phase aqueuse (Q) des feuilles de <i>P. erinaceus</i> . Colonne : Kromasyl 250x4,6 mm ; 100 Å. Gradient : 2 à 100% MeOH dans H ₂ O en 30 min, 100% MeOH pendant 5 min.....	98
Figure 3- 5: Spectre RMN ¹ H du composé PE.1 (CDCl ₃ , 300 MHz)	100
Figure 3- 6: Spectre RMN ¹³ C du composé PE.1 (CDCl ₃ , 75 MHz)	100
Figure 3- 7: Spectre RMN ¹ H du composé PE.2 (CDCl ₃ , 300 MHz)	102
Figure 3- 8: Spectre RMN ¹³ C du composé PE.2 (CDCl ₃ , 75 MHz)	102
Figure 3- 9: Spectre RMN ¹ H du composé PE.3 (CD ₃ OD, 300 MHz)	104
Figure 3- 10: Spectre RMN ¹³ C du composé PE.3 (CD ₃ OD, 75 MHz)	104
Figure 3- 11: Spectre RMN ¹ H du composé PE.5 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	106
Figure 3- 12: Spectre RMN ¹³ C du composé PE.5 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	107
Figure 3- 13: Spectre DEPT 135 du composé PE.5 (CDCl ₃ , 300 MHz)	107
Figure 3- 14: Spectre RMN ¹ H du composé PE.7 (400 MHz, CDCl ₃)	109
Figure 3- 15: Spectre RMN ¹³ C du composé PE.7 (400 MHz, CDCl ₃)	109
Figure 3- 16: Spectre DEPT 135 du composé PE.7 (400 MHz, CDCl ₃).....	110
Figure 3- 17: Spectre HSQC du composé PE.7.....	110
Figure 3- 18: Spectre RMN ¹ H du composé PE.8 (CDCl ₃ , 400 MHz)	112
Figure 3- 19: Spectre RMN ¹³ C du composé PE.8 (CDCl ₃ , 100 MHz)	112
Figure 3- 20 : Spectre DEPT du composé PE.8 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	113
Figure 3- 21: Spectre COSY du composé PE.8	114
Figure 3- 22: Spectre RMN ¹ H du composé PE.9 (CDCl ₃ , 300 MHz)	115
Figure 3- 23: Spectre RMN ¹³ C du composé PE.9 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	116
Figure 3- 24: Spectre DEPT du composé PE.9 (CDCl ₃ , 75 MHz)	117
Figure 3- 25: Spectre RMN ¹ H du composé PE.11 (CD ₃ OD, 300 MHz).....	118
Figure 3- 26: Spectre RMN ¹³ C du composé PE.11 (CD ₃ OD, 300 MHz).....	119
Figure 3- 27: Spectre DEPT du composé PE.11 (CD ₃ OD, 300 MHz)	119
Figure 3- 28: Spectre HSQC du composé PE.11 (CD ₃ OD, 300 MHz).....	120
Figure 3- 29: Spectre HMBC du composé PE.11	120
Figure 3- 30: Spectre RMN ¹ H du composé PE.12 (CD ₃ OD, 300 MHz)	122
Figure 3- 31: Spectre RMN ¹ H du composé PE.12 (CD ₃ OD, 300 MHz)	122
Figure 3- 32: Spectre RMN ¹ H du composé PE.14 (acétone- <i>d</i> ₆ , 300 MHz)	124
Figure 3- 33: Spectre RMN ¹³ C du composé PE.14 (acétone- <i>d</i> ₆ , 300 MHz)	124
Figure 3- 34: Spectre DEPT du composé PE.14 (acétone- <i>d</i> ₆ , 300 MHz).....	125
Figure 3- 35: Spectre RMN ¹ H du composé PE.15 (CD ₃ OD, 400 MHz)	126

Figure 3- 36: Spectre RMN ¹³ C du composé PE.15 (CD ₃ OD, 400 MHz)	127
Figure 3- 37: Spectre DEPT du composé PE.15 (CD ₃ OD, 400 MHz).....	127
Figure 3- 38: Spectre HSQC du composé PE.15.....	128
Figure 3- 39: Spectre RMN ¹ H du composé PE.16 (CD ₃ OD, 400 MHz)	129
Figure 3- 40: Spectre RMN ¹³ C du composé PE.16 (CD ₃ OD, 300 MHz)	130
Figure 3- 41: Spectre RMN ¹ H du composé PE.17 (CD ₃ OD, 400 MHz)	131
Figure 3- 42: Spectre RMN ¹³ C du composé PE.17 (CD ₃ OD, 300 MHz)	132
Figure 3- 43: Spectre DEPT du composé PE.17 (CD ₃ OD, 400 MHz).....	132
Figure 3- 44: Spectre RMN ¹ H du composé PE.18 (CD ₃ OD, 400 MHz).....	133
Figure 3- 45: Spectre RMN ¹³ C du composé PE.18 (CD ₃ OD, 300 MHz)	134
Figure 3- 46: Spectre DEPT 135 du composé PE.18 (CD ₃ OD, 400 MHz).....	134
Figure 3- 47: Effet de DECEC, MeOH B et d'AAS sur l'œdème de la patte de souris induit par l'injection de la carragénine.	137
Figure 3- 48: Effet de DECFEU, MeOH (K) et d'AAS sur l'œdème de la patte de souris induit par l'injection de la carragénine.....	139
Figure 3- 49: Effet de DECRA et d'AAS sur l'œdème de la patte de souris induit par l'injection de la carragénine.	141
Figure 3- 50: Effet de DCM (A), DECEC, MeOH (B), friedeline (PE.1), lupeol (PE.2) et épicatechine (PE.3) et hydrocortisone sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton. 142	
Figure 3- 51: Effet de DCM (E) et de la phénylbutazone sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton	143
Figure 3- 52: Effet de DECEC, MeOH (B), DECFEU, MeOH K, DECRA et de paracétamol (PARA) sur le nombre de contorsions induit par l'injection de l'acide acétique.....	146
Figure 3- 53: Effet analgésique (test à la solution de formaldéhyde) des décoctés des écorces de tronc (DECEC), feuilles (DECFEU) et des écorces de racines (DECRA).....	147
Figure 3- 54 : Evolution de la température rectale en fonction du temps des décoctés des écorces (DECEC), des feuilles (DECFEU) et des racines (DECRA)	149
Figure 3- 55: Effet inhibiteur des extraits sur la production de TNF α.....	150
Figure 3- 56: Effet inhibiteur des extraits sur la production de nitrite	151

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1- 1 : Activités pharmacologiques de quelques espèces de <i>Pterocarpus</i>	21
Tableau 2- 1: Préparation des échantillons pour le test antioxydant DPPH	89
Tableau 3- 1 : Effet anti-inflammatoire du décocté et de l'extrait méthanolique (MeOH B) des écorces de tronc de <i>P. erinaceus</i> , après 1h, 3h et 5h.....	138
Tableau 3- 2 : Effet anti-inflammatoire du décocté et de l'extrait méthanolique (MeOH K) des feuilles de <i>P. erinaceus</i>	140
Tableau 3- 3 : Effet anti-inflammatoire du décocté des écorces de racines de <i>P. erinaceus</i> et de l'acide acétylsalicylique (AAS).....	141
Tableau 3- 4: Effet analgésique du décocté et de l'extrait méthanolique (MeOH B) des écorces du tronc.....	144
Tableau 3- 5 : Effet analgésique de l'extrait méthanolique (MeOH K) et du décocté des feuilles	145
Tableau 3- 6 : Effet analgésique du décocté des écorces de racines et du paracétamol	145
Tableau 3- 7 : Pourcentage d'inhibition des décoctés des écorces de tronc (DECEC), feuilles (DECFEU) et des écorces de racines (DECRA)	148
Tableau 3- 8 : Effet antioxydant du décocté, de l'extrait MeOH (B), des phases DCM (C) et AoCEt (D), du trolox et de l'acide chlorogénique	152
Tableau 3- 9 : Effet antioxydant du décocté, de l'extrait MeOH (K) et de la fraction flavonoïdique (FLAVO L)	153
Tableau 3- 10 : Effet antioxydant de l'extrait MeOH (F), des phases AcOEt (G) et BuOH (H)	153
Tableau 3- 11 : Effet inhibiteur des extraits sur la peroxydation lipidique et l'activité de la lipoxigénase.....	154

ABREVIATIONS

AcOEt	: acétate d'éthyle
AINS	: anti-inflammatoires non stéroïdiens
AIS	: anti-inflammatoires stéroïdiens
APG	: Angiosperm Phylogeny Group
ARP	: antiradical power
BMDM	: Bone marrow-derived macrophage
BuOH	: butanol
C. Seph	: colonne de Sephadex
CC	: colonne de chromatographie
CCM	: Chromatographie sur couche mince
CCM prep.	: Chromatographie sur couche mince préparative
CDCl ₃	: chloroforme deutéré
CD ₃ OD	: méthanol deutéré
CI ₅₀	: concentration inhibitrice 50
CIRDES	: Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide
CLHP	: Chromatographie liquide à haute performance
COSY	: correlated spectroscopy
COX 1	: cyclo-oxygénase 1
COX 2	: cyclo-oxygénase 2
COX 3	: cyclo-oxygénase 3
CUPRAC	: cupric ion reducing antioxidant capacity
DBA	: diphenylborate d'aminoéthanol
DCM	: dichlorométhane
DECEC	: décocté des écorces de tronc
DECFE	: décocté des feuilles
DECRA	: décocté des écorces de racines
DEPT	: distortionless enhancement by polarisation transfer
d	: doublet (RMN)
δ	: déplacement chimique (RMN)
DL ₅₀	: dose létale 50
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DPPH	: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
FLAVO	: flavonoïde
H ₂ SO ₄	: acide sulfurique
HMBC	: heteronuclear multiple bonding connectivity
HMQC	: heteronuclear multiple quantum coherence
HSQC	: heteronuclear single quantum connectivity
IFN γ	: interféron gamma
IL-1 β	: interleukine 1 β
<i>J</i> (Hz)	: constante de couplage exprimé en hertz
IRSS	: institut de recherche en science de la santé
LOX	: lipoxygénase
LPS	: lipopolysaccharide
m	: multiplet (RMN)
min	: minute
MeOH	: méthanol
MEPHATRA/PH	: department de medicine-pharmacopée traditionnelle-pharmacie
MHz	: mégahertz
MPLC	: medium pressure liquid chromatography
NaCl	: chlorure de sodium
NF- κ B	: facteur nucléaire kappa-B
NO	: monoxyde d'azote
NOSi	: monoxyde d'azote synthase inductible
<i>P. erinaceus</i>	: <i>Pterocarpus erinaceus</i>
PGE ₂	: prostaglandine E ₂
PGG ₂	: prostaglandine G ₂
PGI	: prostacycline
PEG	: polyéthylèneglycol
ppm	: partie par million
s	: singulet (RMN)
SiO ₂	: silice
SPE	: solid phase extraction
t	: triplet (RMN)
TEAC	: trolox equivalent antioxidant capacity

TNF α	: tumor necrosis factor alpha
TXA2	: thromboxane A2
Rf	: référence frontale
RLO	: radicaux libres oxygénés
RMN ^1H	: résonance magnétique nucléaire du proton
RMN ^{13}C	: résonance magnétique nucléaire du carbone 13
UV	: ultra-violet
VLC	: vacuum liquid chromatography

RESUME

Pterocarpus erinaceus Poir. (Fabaceae) est une plante médicinale utilisée dans la prise en charge de nombreuses pathologies dont les maladies à composante inflammatoire au Burkina Faso. Les feuilles, le tronc, et les racines sont utilisés comme remède dans le traitement des dermatoses, de l'inflammation, de l'ulcère, du rhumatisme, de la dysenterie, le paludisme, etc. ...

L'objectif de ce travail était de mener des études phytochimiques et pharmacologiques sur des extraits de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae) afin d'évaluer l'innocuité et l'efficacité de cette plante en vue d'obtenir des pré-requis pour le développement d'un phytomédicament.

L'étude phytochimique a été réalisée en utilisant des méthodes chromatographiques (CCM, SPE, CC, VLC, MPLC, CLHP) et spectroscopiques (RMN 1D et 2D). Cette étude a permis d'isoler 18 molécules dont 14 identifiées à savoir la friedeline (2 fois), le lupeol, l'épicatchine, la rutine, la lutéoline, la quercétine-3-O-sophoroside, le kaempferol-3-O-sophoroside, la quercétine-3-O- β -glucose, le stigmastérol, la friedeline, le 3 α -hydroxyfriedelan-2-one, l' α -sophoradiol et le maltol 6-O-apiofuranoside-gluco-pyranoside.

L'étude sur la toxicité aiguë a montré que les décoctés des feuilles (DECFEU), d'écorces de tronc (DECEC), d'écorces de racines (DECRA) et les extraits méthanoliques des feuilles (MeOH K), d'écorces du tronc (MeOH B) sont considérés comme des substances faiblement toxiques selon l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner et de l'OMS. Les effets anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques des extraits issus des écorces de tronc, des feuilles et des racines ont été validés sur des modèles animaux.

Les résultats obtenus dans les tests *in vitro* (antioxydant, tests sur l'inhibition de la production de TNF α et de nitrite cellulaires, de la peroxydation lipidique et de la lipoxigénase) montrent que les extraits manifestent des effets intéressants; plus particulièrement l'extrait méthanolique des écorces du tronc (MeOH B) qui a le meilleur pouvoir antioxydant (ARP = 5 ; TEAC = 0,9) et la forte inhibition sur la peroxydation lipidique (37,25 %) et sur la lipoxigénase (97,69 %). Par contre l'extrait méthanolique des feuilles (MeOH K) a présenté la forte inhibition à la concentration de 50 μ g/mL sur la production de TNF α (37,35 % et 30 %) et de NO (95 % et 50%) dans la culture de macrophages activés par LPS et LPS/IFN γ .

Mots clés : *Pterocarpus erinaceus*, anti-inflammatoire, analgésique, antipyrétique et antioxydant

ABSTRACT

Pterocarpus erinaceus Poir. (Fabaceae) is a medicinal plant used in the treatment of several diseases including diseases inflammatory component in Burkina Faso. The leaves, stem and roots are used as a drug in the treatment of skin diseases, inflammation, ulcer, rheumatism, dysentery, malaria....

The aim of this study was to carry out phytochemical and pharmacological studies on extracts of *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae) to evaluate the safety and efficacy of this plant to obtain the data for the development of a drug.

Phytochemical study has been performed using chromatographic methods (TLC, SPE, CC, VLC, MPLC, HPLC) and spectroscopic (1D and 2D NMR). This study has been leading to isolated 18 molecules including 14 identified namely friedelin, lupeol, epicatechin, rutin, luteolin, quercetin-3-O-sophorosid, kaempferol-3-O-sophorosid, quercetin-3-O- β -glucose, stigmasterol, 3 α -hydroxyfriedelan-2-on, α -sophoradiol, maltol-6-O-apiofuranoside-gluco-pyranoside.

The test on acute toxicity showed that the decoction of the leaves (DECFEU), stem (DECEC), roots (DECRA) and methanol extracts of leaves (MeOH K), stem bark (MeOH B) are considered slightly toxic substances according to the toxicity scale of Hodge and Sterner and WHO. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic extracts from the stem bark, leaves and roots have been validated en animal models.

The results obtained in vitro test (antioxidant test, tests on the inhibition of the production of cellular TNF α and nitrite, lipid peroxidation and lipoxygénase) showed that the extracts exhibited effects, especially the methanol extract stem bark (MeOH B) which has the best antioxidant power (ARP = 5; TEAC = 9) and the strongest inhibition of lipid peroxidation (37.25 %) and lipoxygénase (97.69 %). However the methanol extract of leaves (MeOH K) presented strong inhibition at a concentration of 50 μ g/mL on the production of TNF α (37.35 % and 30 %) and NO (95 % and 50 %) in the macrophages cultures active by LPS and LPS/INF- γ .

Key words: *Pterocarpus erinaceus*, anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and antioxidant

LISTE DES PUBLICATIONS

Articles

N. Ouédraogo, A. Tibiri, R. W. Sawadogo, M. Lompo, A. E. Hay, J. Koudou, M. G. Dijoux and I. P. Guissou. Antioxidant anti-inflammatory and analgesic activities of aqueous extract From stem bark of *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). *Journal of Medicinal Plants Research* (2011), 5, 2047-2053.

Ouédraogo Noufou, Sawadogo Richard Wantinga, Tibiri André, Bayet Christine, Lompo Marius, Hay A Emmanuelle, Koudou Jean, Dijoux Marie-Geneviève, Guissou Innocent Pierre. Pharmacological properties and related constituents of stem bark of *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* (2011), 412-420.

N. Ouédraogo, M. Lompo, RW. Sawadogo, A. Tibiri, A.-E. Hay, J. Koudou, M.-G. Dijoux, I.P. Guissou. Étude des activités anti-infl ammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). *Phyothérapie* (2012), H1-7.

Ouédraogo Noufou, Hay A.Emmanuelle, Michalet S, Koudou Jean, Dijoux Marie-Geneviève, Guissou Innocent Pierre. Phytochemical and biological investigations of methanol extract from leaves of *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). *En préparation*

Posters

Ouédraogo N., Bayet C, Hay A-E., Michalet S, Guissou I. P., Koudou J., Dijoux-Franca M. G. Etudes préliminaires de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). Colloque AFERP – BESANCON (France), 16 au 18 Juillet 2010.

Ouédraogo N., Tibiri A., Lompo M., Hay A-E., Sawadogo WR., Koudou J., Dijoux-Franca M. G, Guissou I. P. Pharmaco-chimie des écorces de tronc de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). 4^e édition des Journées Portes Ouvertes/Doctorants, Ouagadougou (Burkina Faso), 20 – 24 Février 2012.

Communications orales

Ouédraogo N., A. Tibiri, R. Sawadogo, M. Lompo, A.-E. Hay, J. Koudou, M.-G. Dijoux, I. P. Guissou. Propriétés anti-inflammatoire, analgésique et antioxydante du décocté de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). FRSIT, Bobo Dioulasso (Burkina Faso), 27 Novembre – 04 Décembre 2010.

Ouédraogo N., Sawadogo R. W., Tibiri A. , Lompo M., Hay A.E., Koudou J., Dijoux M-G. and Guissou I. P. Pharmacological and phytochemical investigations of stem bark of *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). WANNPRES, Nigeria, 6-9 Août 2012.

Introduction

Au fil des siècles, les hommes se sont appuyés sur la nature pour leurs besoins de base liés à l'alimentation, à la construction, à l'habillement, à la santé (médicaments). Les plantes ont constitué la base des systèmes de la médecine traditionnelle qui existent depuis des milliers d'années et qui continuent de fournir à l'humanité de nouveaux remèdes (Gurib-Fakim, 2006). Selon l'OMS, « la médecine traditionnelle est la somme totale des connaissances, compétences et pratiques qui reposent, rationnellement ou non, sur les théories, croyances et expériences propres à une culture et qui sont utilisées pour maintenir les êtres humains en bonne santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, traiter et guérir des maladies physiques et mentales » (Gurib-Fakim, 2006). Cette médication traditionnelle implique l'usage de plantes médicinales, de parties d'animaux et de minéraux, de thérapies spirituelles, de techniques et des pratiques manuelles, séparés ou en association. La médecine traditionnelle maintient sa popularité dans les pays en voie de développement et s'étend de plus en plus aux pays développés. En Chine par exemple, en plus de l'acupuncture très pratiquée, les préparations traditionnelles à base de plantes représentent 30 à 50 % de la consommation totale en médicaments. Aux Etats-Unis, selon la CACM (Commission for Alternative and Complementary Medicine), en 2000, 17 milliards de dollars ont été dépensés en remèdes traditionnels par 158 millions de personnes. De même, en Allemagne, 90 % de la population prend un remède naturel à un moment ou à un autre de leur vie. Au Canada, un sondage a montré qu'en 2005, 71 % de la population a recours au moins une fois à la médecine complémentaire et prendrait régulièrement des produits de santé naturels (Morel, 2009). En Inde, le terme Ayurveda, qui vient des mots indiens *Ayar* (vie) et *veda* (science), est l'une des plus vieilles médecines traditionnelles très pratiquées (Gurib-Fakim, 2006).

La médecine traditionnelle africaine est la plus vieille et la plus diversifiée des systèmes de médecine. Ses pratiques, transmises de génération en génération, sont la preuve de l'innocuité et de l'efficacité de cette médecine. Selon l'OMS, en Afrique, 80 % de la population a recours à la médecine traditionnelle pour répondre à certains de leurs besoins au niveau des soins de santé primaire. En plus du fait que la médecine traditionnelle fait partie intégrante du patrimoine culturel, les faibles revenus des populations face aux coûts élevés des médicaments modernes et l'accès facile à la médecine traditionnelle peuvent aussi expliquer le recours à cette dernière.

Les propriétés thérapeutiques des plantes médicinales sont basées essentiellement sur la composition des métabolites secondaires ayant des propriétés biologiques. Les plantes les synthétisent notamment pour se défendre contre ou s'adapter à toute agression biotique (bactéries, virus, champignons, parasites) ou abiotique (environnement). Ces composés ne sont pas nécessaires à la croissance de la plante. Les plantes médicinales, devenues la principale source naturelle de découverte de substances ou de molécules thérapeutiques occupent une position importante dans le domaine de recherche de nouveaux médicaments. Plusieurs molécules thérapeutiques disponibles dans les pharmacies sont issus directement ou indirectement de plantes médicinales :

- *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae) : morphine (morphine), analgésique ;
- *Cinchona officinalis* L., *Cinchona pubescens* Vahl. (Rubiaceae): quinine (quinine), anti-malaria
- *Salix alba* L., *Salix daphnoïdes* Vill., *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. (Salicaceae) : acide acétylsalicylique (Aspirine[®]), antipyrétique, analgésique et anti-inflammatoire ;
- *Harpagophytum procumbens* (Burch.) DC. (Pedaliaceae) : harpagoside et actéoside (harpagoMed[®]), anti-inflammatoire et antipyrétique ;
- *Ananas comosus* (L.) Merr. (Bromeliaceae) : bromélaïnes (bromélaïne protéase) : anti-inflammatoire ; (Goetz, 2011 ; Katzung, 2006).

Plus de 50 % des nouveaux produits chimiques enregistrés par le FDA (Food and Drug Administration) de 1981 à 2002 comme anticancéreux, antimigraineux et antihypertenseurs, sont des produits naturels ou des dérivés (Newman, 2003). Les échecs thérapeutiques et les problèmes iatrogènes rencontrés par la médecine moderne font que la médecine traditionnelle reste la voie alternative et d'espoir pour l'humanité. En effet, ces problèmes ont pour origine, par exemple, l'émergence des souches microbiennes résistantes : le MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) causant des infections nosocomiales dans les hôpitaux; la chloroquinorésistance développée par diverses formes pathogènes de *Plasmodium* ; et l'émergence des maladies (SIDA, EBOLA) sans traitement thérapeutique (Yasunaka *et al.*, 2005).

Les anti-inflammatoires font partir des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde. L'utilisation des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) dans la prise en charge des pathologies à composante inflammatoire engendre des troubles gastro-intestinaux, rénaux et hémorragiques. L'apparition de nouvelles classes d'anti-inflammatoires appelés « coxibs » (inhibiteurs

sélectifs de la cyclo-oxygénase 2) réduit les effets secondaires gastro-intestinaux mais induit des risques cardiovasculaires et rénaux (Mukherjee, 2002).

Face à ces problèmes de santé publique que rencontre la médecine moderne, il devient impérieux de valoriser la médecine traditionnelle par des études ethnobotaniques, pharmacologiques, toxicologiques et phytochimiques sur l'efficacité et l'innocuité des plantes médicinales en vue de découvrir de nouveaux médicaments ayant des effets secondaires minimes.

Le Burkina Faso dispose d'une flore qui est constituée de végétaux inférieurs et supérieurs appartenant à plusieurs familles parmi lesquelles la famille des Fabaceae. De nombreuses espèces de cette famille telles que *Parkia biglobosa* Jacq., *Crotalaria mucronata* Desv., *Indigofera tinctoria* Var. *Arrecta* Benth, *Indigofera nigritana* Hook F., *Stylosanthes erecta* P. Beauv., *Sesbania pachycarpa* DC., *Crotalaria naragutensis* Hutch. et *Pterocarpus lucens* Lepr. (ex Guill. Et Perrott.) sont utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement du paludisme, des hémorroïdes, des dermatoses, des infections, des maux de ventre et de la stérilité féminine (Mouity, 1999 ; Nadembega *et al.*, 2011).

Le présent travail s'inscrit dans la perspective de la valorisation de la médecine traditionnelle du Burkina Faso par des essais biologiques et la recherche de nouvelles molécules à visée thérapeutique. *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae) est une plante médicinale utilisée en décoction dans le traitement des pathologies à composante inflammatoire (dermatoses, inflammations, ulcère etc. ...). Des essais biologiques *in vivo* (anti-inflammatoire, analgésique, antipyrétique) et *in vitro* (antioxydant, inhibition de la production de TNF α et de nitrite cellulaires, de la peroxydation lipidique et de la lipoxygénase) ont été menés avec des extraits de feuilles, d'écorces de tronc et de racines ; une investigation phytochimique approfondie a ensuite permis d'isoler et d'identifier 18 composés phytochimiques bioactifs qui pourraient être responsables des effets thérapeutiques. Pour bien mener ce travail, nous nous sommes fixés comme objectifs dans un premier temps de réaliser les évaluations biologiques et dans un second temps de mener les études phytochimiques.

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une co-tutelle entre l'Université de Ouagadougou et l'Université Claude Bernard Lyon 1. L'étude phytochimique a été réalisée dans le laboratoire de botanique, pharmacognosie et phytothérapie de la faculté de médecine et pharmacie ; et les essais dans le domaine de l'inflammation ont été menés dans le laboratoire de pharmacologie de l'Institut de recherche en science de la santé (IRSS) et dans le laboratoire de pharmacologie de l'UFR/SDS.

Objectifs de l'étude

Objectif général

L'objectif général de cette étude était de mener des études phytochimique et pharmacologiques sur des extraits de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae) en vue d'obtenir des pré-requis pour le développement d'un phytomédicament.

Objectifs spécifiques :

- Réaliser des extractions méthanolique et dichlorométhanolique, et une décoction aqueuse sur chaque partie de la plante.
- Effectuer des fractionnements par partition liquide-liquide et par des différentes méthodes chromatographiques.
- Isoler et identifier les composés bioactifs par des méthodes chromatographiques (CCM, SPE, CC, VLC, MPLC, CLHP) et des méthodes spectroscopiques (RMN 1D et 2D)
- Evaluer la toxicité aiguë des décoctés et des extraits méthanoliques.
- Tester *in vivo* les activités anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques des extraits.
- tester *in vitro* l'effet des extraits sur la production de TNF α et de NO dans une culture cellulaire RAW264.7.
- Tester le pouvoir antioxydant des extraits avec la méthode de DPPH et la méthode de CUPRAC.
- Tester *in vitro* l'effet des extraits sur l'activité enzymatique de la lipoxygénase et sur la peroxydation lipidique.

Pour atteindre ces objectifs, une méthodologie phytochimique et biologique adéquate a été mise en place afin d'obtenir les résultats qui vont être discutés.

CHAPITRE 1 : GENERALITES

1.1 La famille des Fabaceae

1.1.1. Position systématique de la famille des Fabaceae ou Leguminosae

Les Fabaceae ou Leguminosae avec approximativement 720 genres et plus de 18000 espèces, constituent la troisième plus grande famille des Angiospermes après celles des Orchidaceae et des Asteraceae. Elle est composée d'arbres, d'arbustes et surtout de nombreuses espèces herbacées vivaces ou annuelles. C'est le plus grand ensemble angiosperme, cosmopolite, prédominant en individus et en espèces dans de nombreux biomes et surtout en région tropicale (Wojciechowski, 2003).

Le concept Leguminosae est utilisé soit à un niveau familial (chez Engler), soit à un niveau ordinal (chez Cronquist). Cependant, selon la classification phylogénétique, proposée par l'Angiosperm Phylogeny Group (APG II, 2003), la famille des *Fabaceae* est une superfamille cosmopolite composée de trois sous-familles, à savoir :

- ***Mimosoideae*** composée de 50 à 56 genres (*Acacia*, *Albizia*, *Calliandra*, *Inga*, *Mimosa*, *Parkia*, *Pithecellobium*, etc) et de 3000 espèces. Cette sous-famille est principalement répandue dans les régions tropicales.
- ***Faboideae*** ou ***Papilionoideae*** composée de 440 à 500 genres (*Arachis*, *Astragalus*, *Crotalaria*, *Desmodium*, *Eriosema*, *Erythrina*, *Indigofera*, *Lathyrus*, *Lonchocarpus*, *Lupinus*, *Machaerium*, *Medicago*, *Ononis*, *Phaseolus*, *Pisum*, *Pterocarpus*, *Robinia*, *Swartzia*, *Trifolium*, *Ulex*, etc) et de 12000 espèces. Elle est répartie dans le monde entier.
- ***Caesalpinioideae*** composée de 150 à 180 genres (*Bauhinia*, *Caesalpinia*, *Cassia*, *Cercis*, *Chamaecrista*, *Cynometra*, *Hymenaea*, *Macrolobium*, *Peltogyne*, *Senna*, etc....) et de 2200 à 3000 espèces. Les *Caesalpinioideae* se rencontrent dans les régions tropicales.

1.1.2. Caractères morphologiques des Fabaceae

Les Leguminosae ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique par l'intermédiaire d'une association symbiotique entre les bactéries du genre *Rhizobium* et les racines des plantes. Cette association forme ainsi des renflements ou nodosités qui permettent aux Fabacées d'obtenir un niveau élevé d'azote afin de répondre aux exigences métaboliques. Les nodules fixateurs d'azote sont présents chez les *Mimosoideae* et les *Papilionoideae* ou *Faboideae* alors qu'ils sont absents chez les *Caesalpinioideae*.

Les feuilles : les feuilles sont primitivement alternes, composées-imparipennées et stipulées, peuvent évoluer vers une feuille simple, ou vers une feuille composée-pennée. La foliole terminale peut se transformer souvent en vrille et les stipules peuvent devenir plus importantes que les feuilles et voire les remplacer (Figure 1- 1).

Les fleurs : les fleurs sont groupées en grappes plus ou moins allongées. La coupe florale est peu marquée et presque plane ; le calice est composé de cinq dents qui se groupent parfois en deux lèvres.

Le fruit : la principale caractéristique unificatrice de la famille des Fabaceae est le fruit. La gousse ou légume est un fruit sec défini par une double ouverture ventrale et dorsale. La gousse peut se transformer secondairement chez quelques espèces. Ainsi, la gousse peut devenir pauciséminée (*Arachis hypogaea*) ou multiséminée (*Sophora* sp.) ; elle peut présenter une fausse cloison longitudinale par introflexion (*Astragalus* sp.) ou devenir spirale (*Alfa alfa*) (Guignard, 2004).

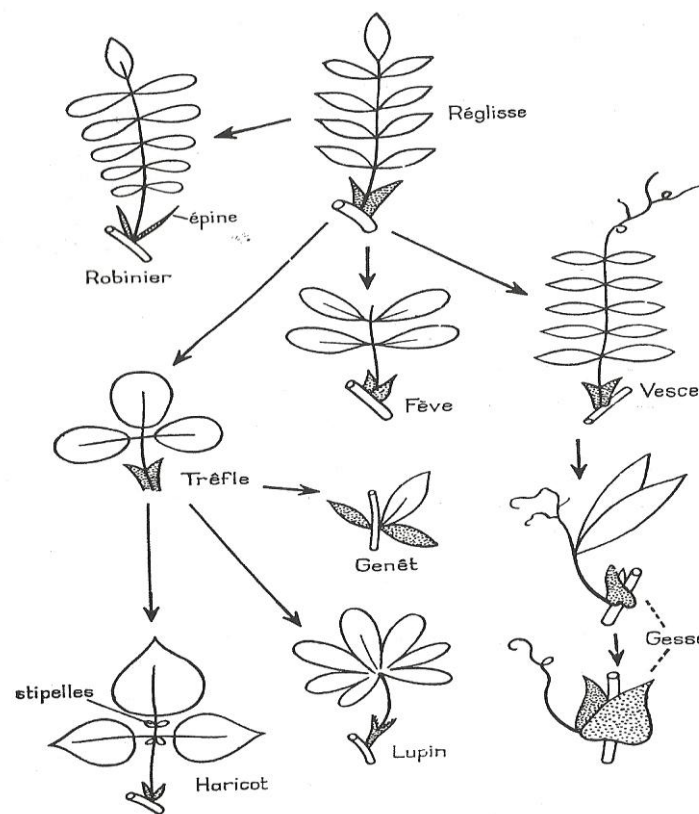


Figure 1- 1: Divers types de feuilles chez les Fabacées (Guignard, 2004)

1.1.3. Utilisations en médecine traditionnelle

Les Fabacées ont des propriétés thérapeutiques et sont utilisées tant en médecine traditionnelle dans la prise en charge de plusieurs pathologies, qu'en médecine moderne. En effet, des espèces des genres *Parkia* et *Acacia* sont utilisées traditionnellement dans le

traitement de l'hypertension, des dermatoses, de l'inflammation et de l'ulcère (*Parkia biglobosa*, *Acacia macrostachya*, *Acacia nilotica*). Les isoflavones trouvées couramment chez les Fabaceae sont utilisées pour réduire le risque de cancer et le taux de cholestérol. Les phytoestrogènes du soja sont étudiés pour une utilisation comme hormone post-ménopause. Les Légumineuses ont un effet hypoglycémiant quand elles sont consommées, ce qui les rend un aliment recommandé pour les diabétiques (Gepts et al., 2005).

Erythrina senegalensis DC. est utilisée en décoction en pays Haoussa au Nord du Nigéria pour traiter la jaunisse, l'anémie, la dysenterie et la gonococcie (Sadu et al., 2000).

Les espèces du genre *Desmodium* sont utilisées dans les médecines traditionnelles chinoise et indienne dans le traitement du rhumatisme, de la dysenterie, du paludisme, de la toux, de la fièvre et de la douleur (Ma et al., 2011).

Bauhinia purpurea Lam. est utilisée en Inde, en Malaisie et au Pakistan dans la prise en charge de la jaunisse, de la toux, du diabète, de l'ulcère, de la douleur, des convulsions et des maladies infectieuses (Zakaria et al., 2011).

Les espèces du genre *Senna* interviennent en médecine traditionnelle au Nigeria, en Inde et au Brésil pour soigner les dermatoses et les maladies infectieuses (Adedayo et al., 1999).

1.2 Le genre *Pterocarpus*

Le genre *Pterocarpus* appartient à la sous-famille des *Faboideae*. Le nom générique *Pterocarpus* donné par Linné en 1753, est dérivé des mots grecs *Pteros* (aile) et *Karpos* (fruit), se référant aux fruits ailés. Ce genre réparti dans les zones tropicales (Afrique tropicale, Amérique latine et Asie du sud) est composé de plusieurs espèces telles que *P. indicus* Willd., *P. marsupium* Roxb., *P. officinalis* Jacq., *P. osun* Craib., *P. santalinus* L. F., *P. soyauxii* Taubert., *P. erinaceus* Poir. etc (Seshadri, 1972).

Le genre *Pterocarpus* a fait l'objet de plusieurs traitements taxonomiques régionaux dont une étude monographique de Rojo qui a estimé à 20 espèces composant le genre *Pterocarpus* ; cependant le traitement de Lewis dénombre de 25 à 30 espèces ; l'estimation la plus récente est celle de Klitgaard et Lavin (2005) où le nombre d'espèces est estimé à 35-40 (Saslis-Lagoudakis et al., 2011).

Des espèces comme *P. indicus* Willd, *P. marsupium* Roxb, *P. dalbergioides* Roxb. et *P. soyauxii* Taubert. sont réparties en Asie du Sud (Inde, Malaisie, Birmanie et Philippines). En Afrique, les espèces rencontrées sont : *P. tinctorius* Welw., *P. osun* Craib, *P. mildbraedii* Harms., *P. santalinus* L. F. et *P. erinaceus* Poir. (Figure 1- 2).

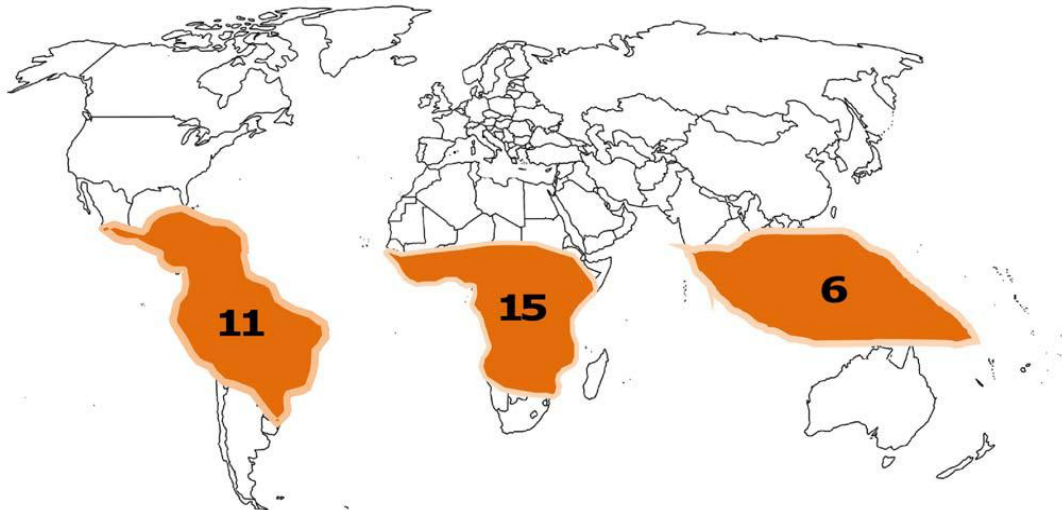


Figure 1- 2: Répartition géographique du genre *Pterocarpus* (Saslis-Lagoudakis et al., 2011)

(11 : zone Amérique latine, 15 : zone Afrique tropicale et 6 : zone Asie du sud)

Selon la classification de l'APG, le genre *Pterocarpus* est répertorié de la manière suivante :

(http://www.botany.wisc.edu/garden/UW-Botanical_Garden/Fabaceae.html#anchor1227391

le 27/11/11)

Règne :	Plantae
Division :	Magnoliophyta
Classe :	magnoliopsida
Ordre :	Fabales
Famille :	Fabaceae
Sub-famille :	<i>Faboideae</i> ou <i>Papilionoideae</i>
Genre :	<i>Pterocarpus</i>

1.2.1.Caractères morphologiques

Les feuilles du genre *Pterocarpus* sont alternes, pennées avec 7-9 folioles et rarement unifoliées ; les stipules sont généralement de petite taille, parfois grandes. Les fleurs sont petites, jaunes et odorantes. Le calice est à cinq dents et la corolle est papilionacée.

La gousse, contenant à 1, 2 ou 3 graines, est indéhiscente, plus ou moins irrégulière. Elle est plate, orbiculaire et ovale (Guignard, 2004).

1.2.2.Utilisation en médecine traditionnelle

Les différentes espèces du genre *Pterocarpus* sont largement utilisées en médecine traditionnelle contre de nombreuses pathologies. En effet, les cœurs de bois des espèces *P.*

santalinus L. F. et *P. marsupium* Roxb. sont utilisés en Inde dans le traitement des infections, de l'inflammation, de la diarrhée, de la fièvre et du diabète (Maurya et Rya, 1985 ; Krishnaveni et Rao, 2000). Les espèces *P. osun* Craib. et *P. soyauxii* Taubert. sont respectivement utilisées au Nigéria et au Cameroun dans la prise en charge du rhumatisme, de la fièvre, du diabète, des dermatoses, des parasitoses gastro-intestinales, de l'hypertension (Ebi et Ofoefule, 2000 ; Tchamadeu et *al.*, 2011). Une étude menée par Saslis-Lagoudakis et *al.* (2011) sur la compilation de données d'ethnomédecine en Afrique tropicale, Amérique latine et indo-malaysienne du genre *Pterocarpus* a indiqué que les espèces du genre sont utilisées dans les pathologies suivantes : maladies cardio-vasculaires, gastro-intestinales, génito-urinaire et fertilité, infection et fièvre, inflammation, système nerveux, douleur, poisons, maladies respiratoires et dermatoses (Figure 1- 3). Ces mêmes auteurs ont indiqué que les espèces *P. osun*, *P. santalinus*, *P. sayauxii*, *P. tessmanii* Harms., *P. erinaceus*, *P. dalbergioides*, *P. angolensis* DC. et *P. rohii* Vahl. sont utilisées dans le traitement du paludisme.

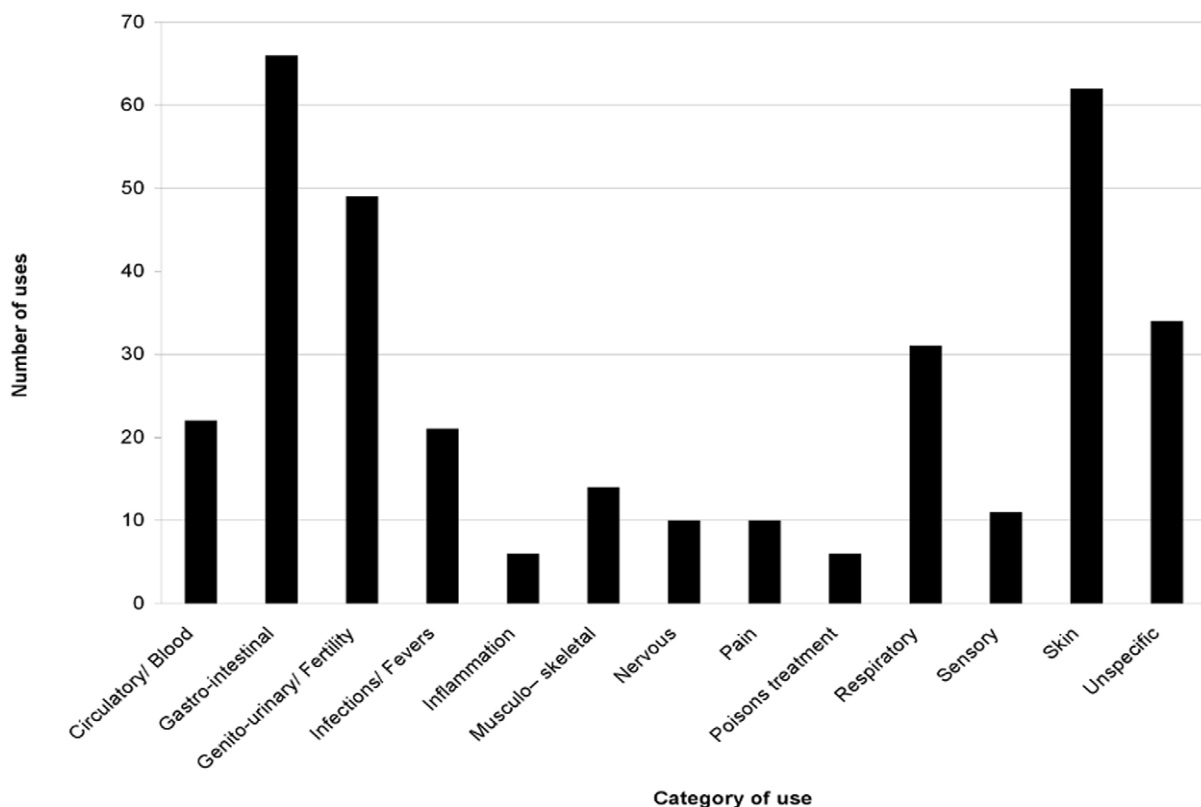


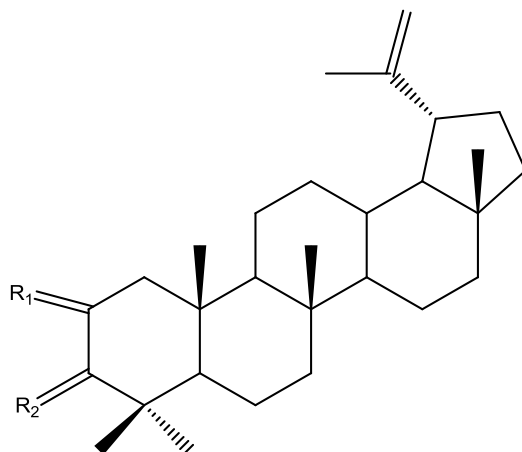
Figure 1- 3: Nombre d'utilisation des espèces du genre *Pterocarpus* par catégorie de pathologies (Saslis-Lagoudakis et *al.*, 2011)

1.2.3. Métabolites secondaires isolés du genre *Pterocarpus*

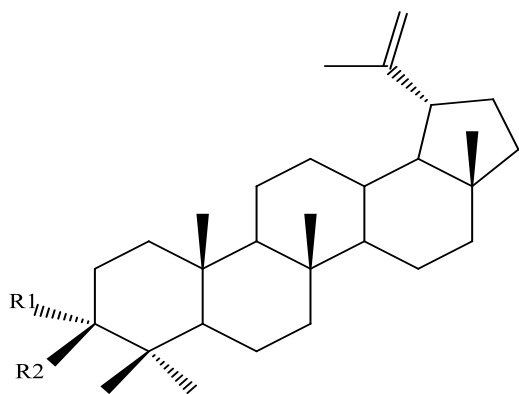
Dans la littérature, les principaux métabolites secondaires isolés du genre *Pterocarpus* sont les terpènes et les isoflavonoïdes. Ces métabolites ont été généralement isolés du cœur du bois.

- Les terpènes

L'un des premiers terpènes connus du genre *Pterocarpus* a été un acide triterpénique, en l'occurrence l'acide acétyloléanolique. D'autres études chimiques ont permis d'isoler de *P. santalinus* L.F. des triterpènes tels que l'amyrone, la lupénone (1), l'épi-lupéol (7), le lupéol (8), le sitostérol, le lupane-2 α -3 α -diol ; le lup-20(29)-èn-2 α ,3 α -acétonide (3); le diosphénol; le lup-(20)29-èn-2 α -tosyloxy,3 α -ol (4); le lup-(20)29-èn-2 α -acétoxy,3 α -ol (5) et la lup-20(29)-èn-2 α -acétoxy,3-one (6) (Kumar et al., 1975). Le triterpène pentacyclique, le 3-ketooléanane (9) a été isolé pour la première fois du genre dans l'extrait hexanique de *P. santalinus* L.F. (Krishnaveni et Rao, 2000).

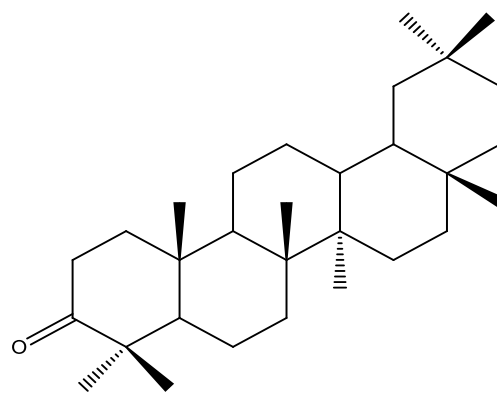


- (1) $R_1 = H_2$, $R_2 = O$: lupénone
- (2) $R_1 = R_2 = OCOOH$: lup-(20)29-en-2,3-diacétoxy
- (3) $R_1 = H_2$, $R_2 = OOC-(Me)_2$: lup-(20)29-en-2,3-acétonide
- (4) $R_1 = OTs$, $R_2 = OH$: lup-(20)29-en-2-tosyloxy,3-ol
- (5) $R_1 = O-COOH$, $R_2 = OH$: lup-(20)29-en-2-acétoxy,3-ol
- (6) $R_1 = O-COOH$, $R_2 = O$: lup-(20)29-en-2-acétoxy,3-one



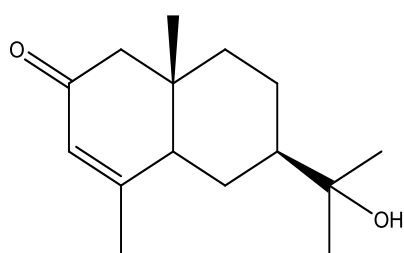
(7) $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$: épi-lupeol

(8) $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$: lupeol

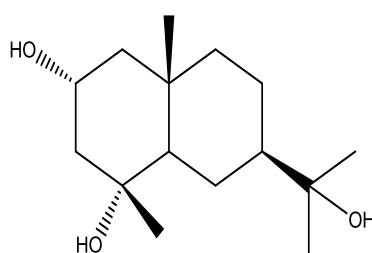


(9) 3-keto-oleanane

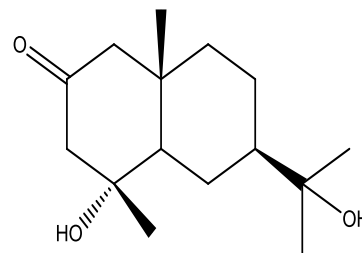
Des investigations phytochimiques ont également permis de mettre en évidence la présence de sesquiterpènes. En effet, Kumar et *al.* (1974) ont isolé le ptérocopol (17), le β -eudesmol (16), l'isoptérocopolone (10), le ptérocatriol (11) et ptérocapiolone (12), à partir des extraits apolaires du cœur de bois de *P. santalinus* L.F. Les sesquiterpènes tels que selin-4(15)-en-1 β ,11-diol (14), β -chénopodiol (13) et brasudol (18) ont été isolés de *P. marsupium* Roxb. (Adinarayana et Syamasundar, 1982).



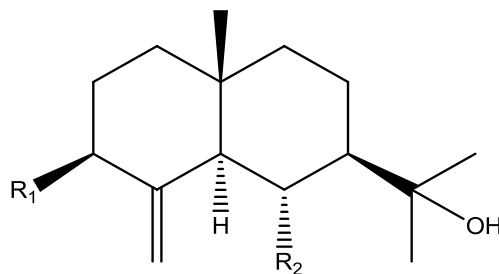
(10) isoptero-copolone



(11) pterocatriol

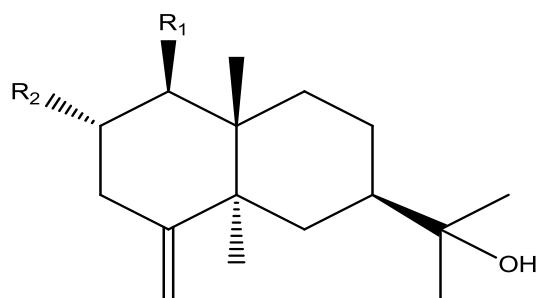


(12) pterocapiolone



(13) $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$: β -chénopodiol

(14) $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$: selin-4(15)-en-3 β ,11-diol



(15) $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$: selin-4(15)-en-1 β , 11-diol

(16) $R_1 = R_2 = \text{H}$: β -eudesmol

(17) $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$: pterocarpol

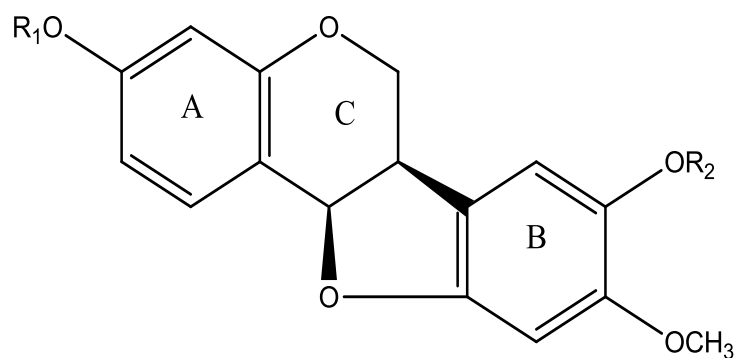
(18) $R_1 = \text{Br}$, $R_2 = \text{H}$: brasudol

- Les isoflavonoïdes

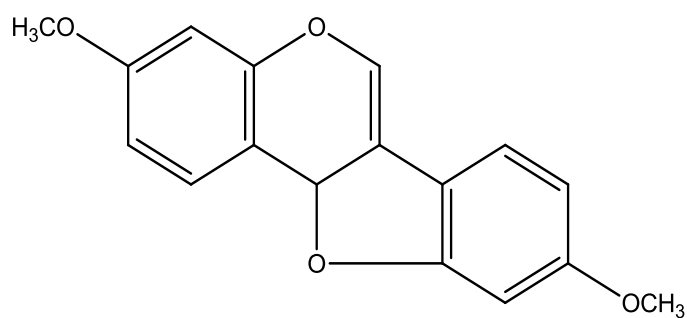
La particularité du genre est sa richesse en isoflavonoïdes. Ces composés qui ont été les premiers à être isolés de ce genre sont subdivisés en deux sous-groupes : les ptérocarpanes, les isoflavones.

Les ptérocarpanes sont des isoflavonoïdes qui ont un système dihydrofurane condensé entre les cycles C et B du noyau flavonoïdes. Les ptérocarpanes (-)-homoptérocarpine (23) et (-)-ptérocarpine (24) ont été les premiers à être identifiés dans le genre *Pterocarpus*, et plus précisément au sein de l'espèce *P. santalinus* L.F. (Seshadri, 1972).

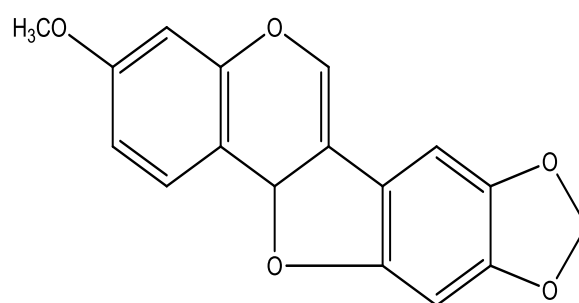
Les premières isoflavones, tels que la prunétine (25), la muningine (31), la 7-méthyl tectorigénine (32) et le santal (27), ont été isolées des espèces *P. santalinus* L.F., *P. indicus* Willd. et *P. osun* Craib. La 3'-hydroxy-formononétine (33) et la pseudobaptigénine (34) ont été isolées de *P. dalbergioides* Roxb. (Seshadri, 1972). Les ptérocarpanes tels que 8-hydroxy-3,9-diméthoxyptérocarpane (19), 8-acétoxy-3,9-diméthoxyptérocarpane (20), 3,8-dihydroxy-9-méthoxyptérocarpane (21) et 3,8-diacétoxy-9-méthoxyptérocarpane (22) ont été isolés du cœur de bois de *P. soyauxii* Taubert. par Bezuidenhoudt et al. (1987). Ces mêmes auteurs ont isolé également les isoflavones suivantes : prunétine (25), di-O-acetylprunétine (26), santal (27), tri-O-acétylsantal (28) et 5,4'-diacétoxy-7,3'-diméthoxyisoflavone (29).



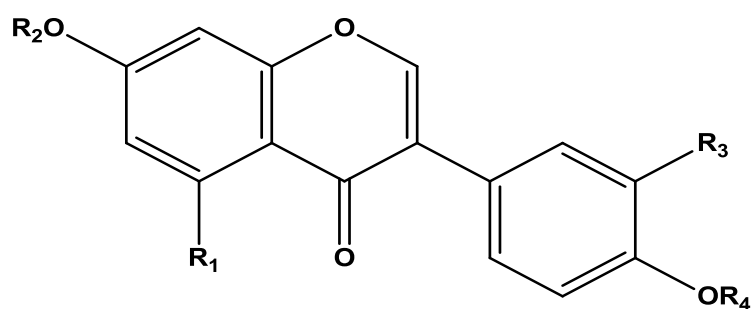
- (19) $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{OH}$: 8-hydroxy-3,9-dimethoxypterocarpane
 (20) $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{O-COOH}$: 8-acetoxy-3,9-dimethoxypterocarpane
 (21) $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$: 3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpane
 (22) $R_1 = \text{COOH}$, $R_2 = \text{OCOOH}$: 3,8-diacetoxy-9-methoxypterocarpane



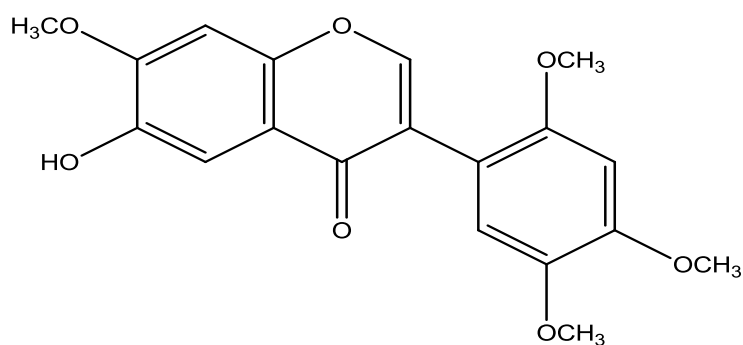
(23) (-)-homopterocarpine



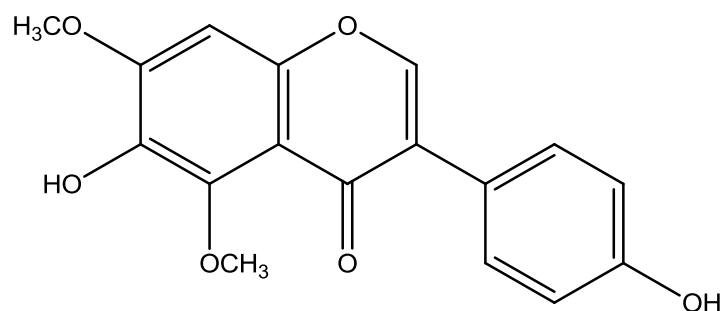
(24) (-)-pterocarpine



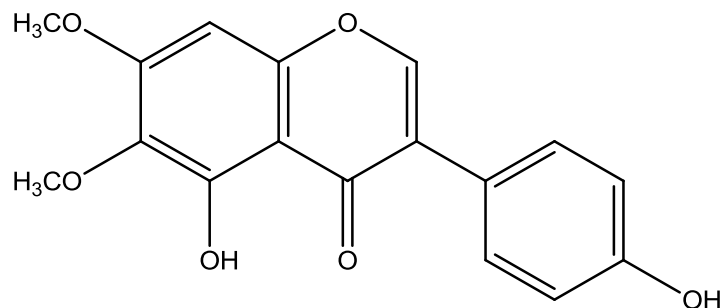
- (25) $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{Me}$, $R_3 = R_4 = \text{H}$: prunétine
 (26) $R_1 = \text{OCOOH}$, $R_2 = \text{Me}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{COOH}$: di-O-acetylprunétine
 (27) $R_1 = R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{Me}$, $R_4 = \text{H}$: santal
 (28) $R_1 = R_2 = \text{OCOOH}$, $R_3 = \text{Me}$, $R_4 = \text{COOH}$: tri-O-acetylsantal
 (29) $R_1 = \text{OCOOH}$, $R_2 = \text{Me}$, $R_3 = \text{OMe}$, $R_4 = \text{COOH}$: 5,4'-diacetoxy-7,3'-dimethoxyisoflavone



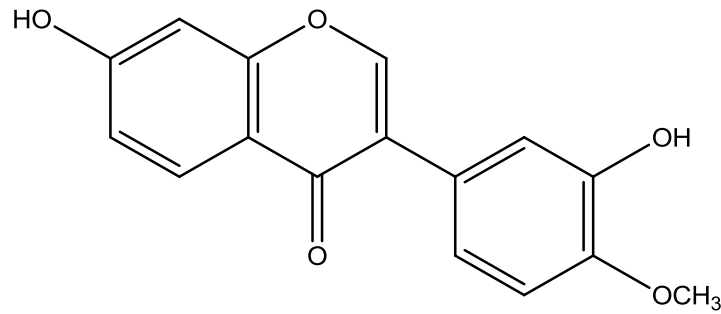
(30) 6-hydroxy, 7,2',4',5'-tetramethoxyisoflavone



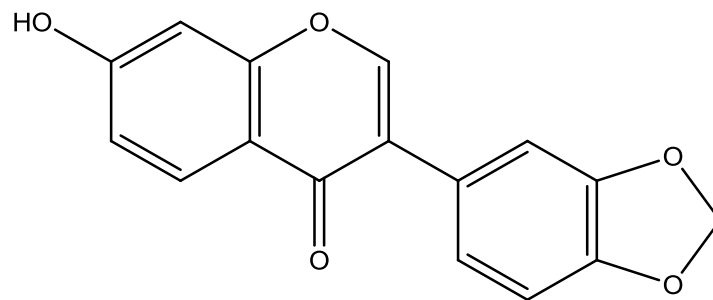
(31) muningine,



(32) 7-méthyl tectorigénine



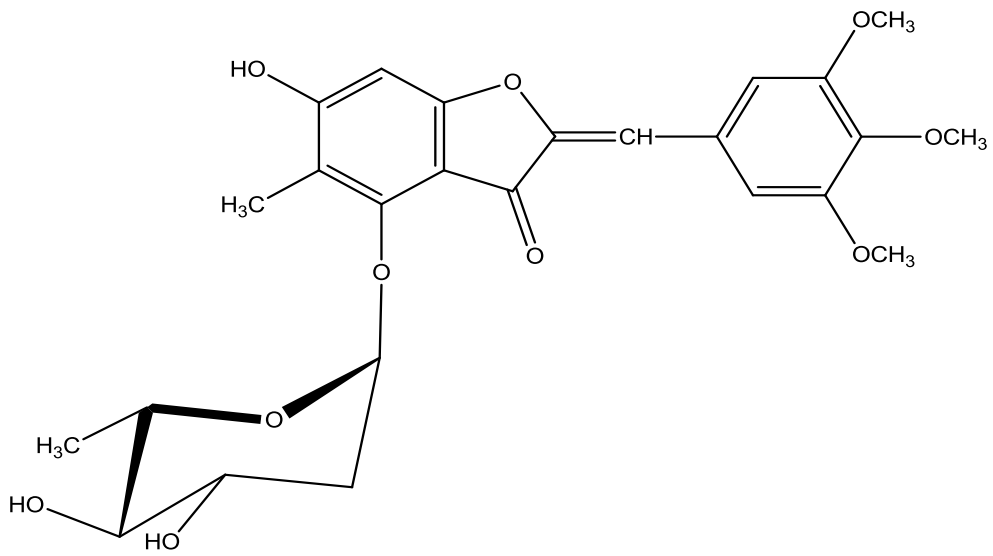
(33) 3'-hydroxy-formononetine



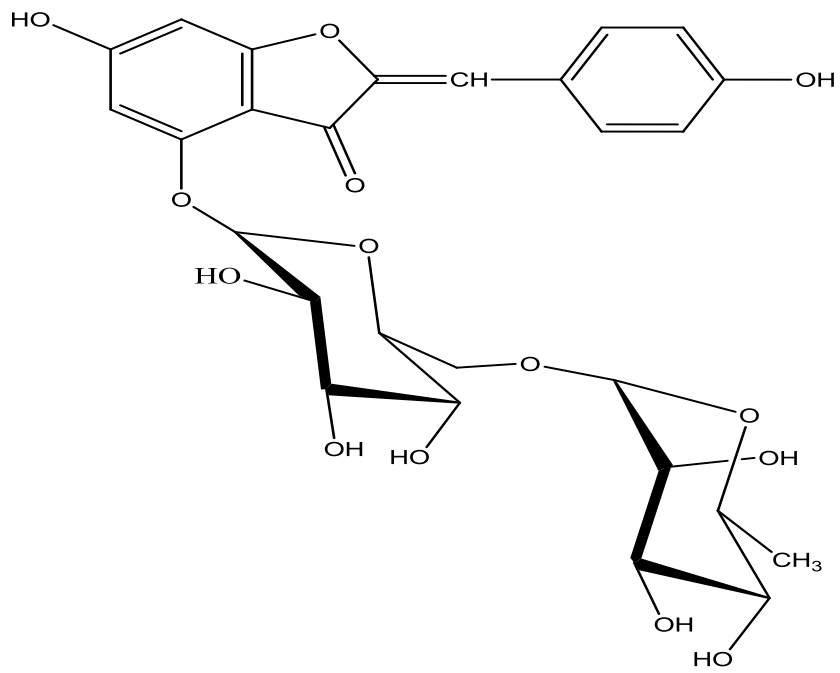
(34) pseudobaptigenine

D'autres flavonoïdes tels que les aurones et les flavanols ont également été isolés du genre. Une étude chimique réalisée par Maurya *et al.* (2004) sur le cœur de bois *P. marsupium* Roxb. a permis d'isoler les aurones suivants : le ptéroside (37), le ptéroisoauroside (38), le marsuposide (39). Kesari *et al.* (2004) ont, quant à eux, isolé et identifié deux aurones (la 6-hydroxy-5-méthyl-3',4',5'-triméthoxyaurone (35) et le 6,4'-dihydroxyaurone-4-O-rutinoside (36)) ainsi que le vijayoside (41) et la vijayosine (42) (flavone C-glucoside) à partir de l'extrait éthanolique du cœur de bois de *P. santalinus* L.F.

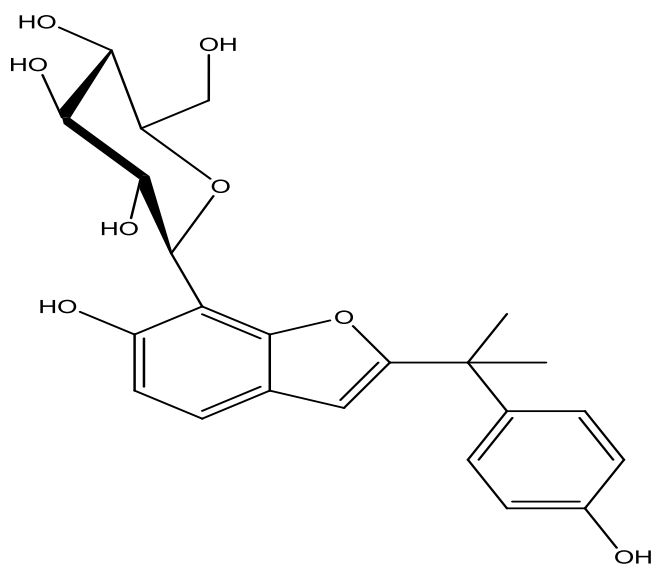
Les composés tels que l'épicatéchine, la ptérosupine (43), la liquiritigénine (44), la marsupsine (40) et l'isoliquiritigénine (45) ont été isolés de *P. marsupium* Roxb. par Farboodnlay et Ray (1993).



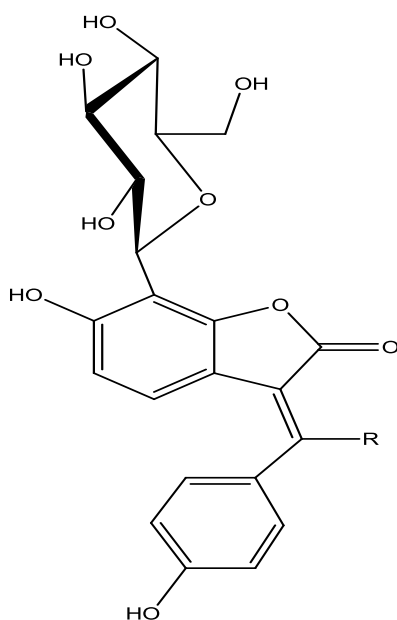
(35) 6-hydroxy-5-méthyl-3',4',5-triméthoxyaurone-4-*O*- α -L-rhamnopyranoside



(36) 6,4'-dihydroxyaurone-4-*O*-rutinoside

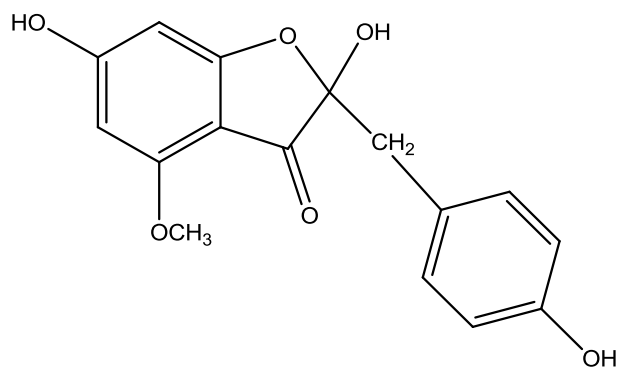


(37) ptéroside

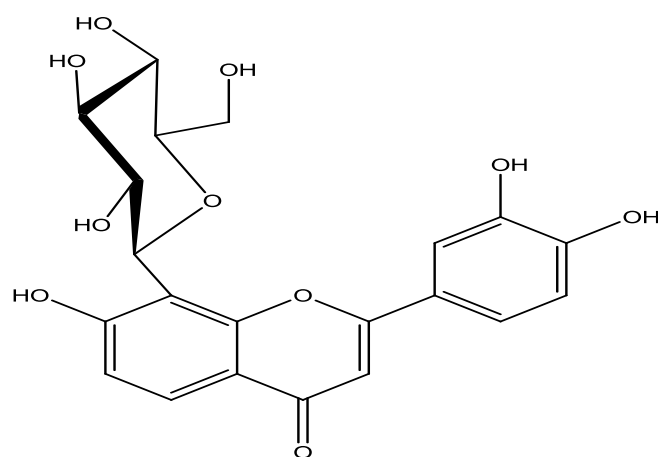


(38) R = OMe : pteroisauriside

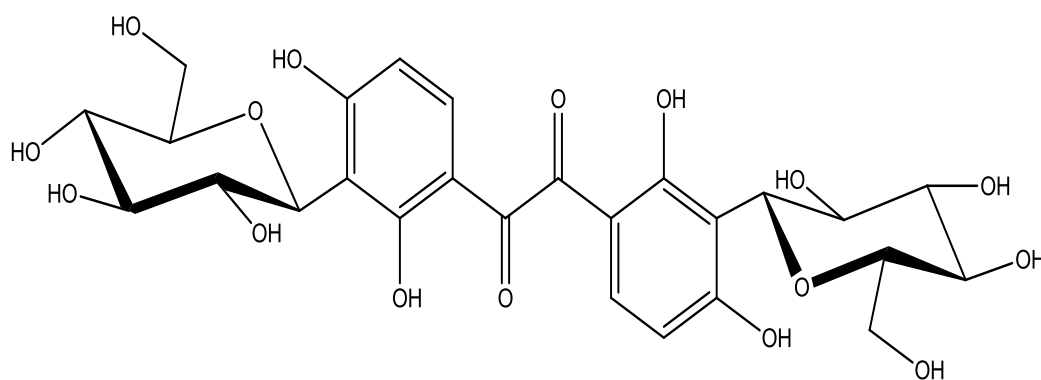
(39) R = H : marsupiside



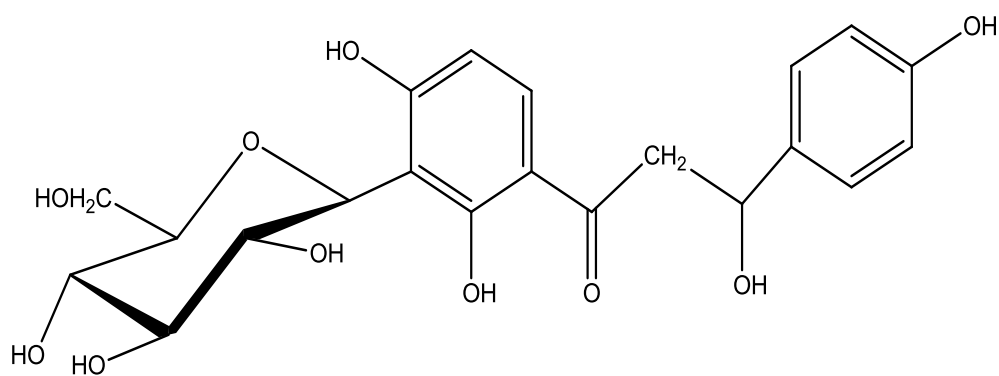
(40) marsupsine



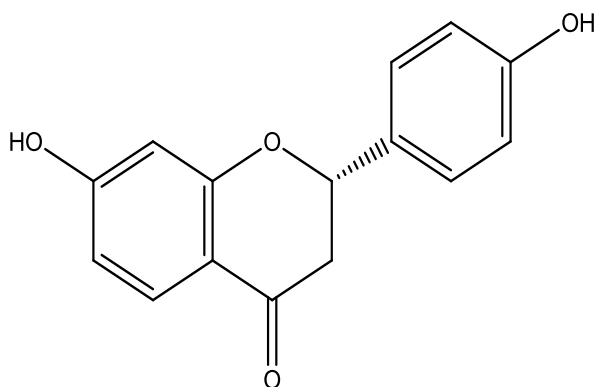
(41) vijayoside



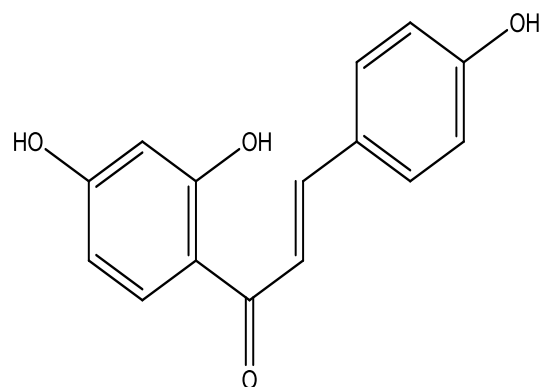
(42) vijayosine



(43) pterosupine



(44) liquiritigénine



(45) isoliquiritigénine

1.2.4. Données pharmacologiques des métabolites isolés et extraits du genre *Pterocarpus*

Les propriétés pharmacologiques des extraits et des métabolites secondaires de différentes espèces ont été mises en évidence par plusieurs études (Tableau 1- 1) :

Tableau 1- 1 : Activités pharmacologiques de quelques espèces de *Pterocarpus*

Espèces	Extraits/Composés actifs (partie de plantes)	Activités biologiques ou biochimiques démonstrées	Références
<i>P. santalinus</i> L.F.	Extrait MeOH (feuilles)	Antioxydant	Arokiyaraj et <i>al.</i> , (2008)
	Extrait MeOH (feuilles, écorces de tronc)	Antibactérien	Manjunatha, (2006)
	Savinine (lignane)	Inhibition du TNF α	Cho et <i>al.</i> , (2001)
	Extraits aqueux, éthanol et hexane (écorces de tronc)	Anti- hyperglycémiant	Kameswara et <i>al.</i> , (2001)

<i>P. marsupium</i> Roxb.	Pterostilbène	Inhibition de COX 2	Hougee et <i>al.</i> , (2005)
	Extrait aqueux (latex)	Inhibition de α - glucosidase	Abesundara et <i>al.</i> , (2004)
	Proptérol	Antibactérien	Mathew et <i>al.</i> , (1984)
	Fraction AcOEt (cœur du bois), marsupsine, pterosupsine, liquiritigenine	Anti- hyperlipidémiant	Farboodni et <i>al.</i> , (1993)
	Extrait aqueux (écorces de tronc)	Anti- hyperglycémiant	Grover et Rathi, (2002)
<i>P. osun</i> Craib.	Extrait MeOH, CHCl ₃ (écorces de tronc)	Antimicrobien	Ebi et Ofoefule, (1999)
<i>P. indicus</i> Willd.	Tanins (écorces de tronc)	Antiviral	Zhang et <i>al.</i> , (1990)
	Extraits DCM, AcOEt, MeOH et BuOH (écocres de tronc, feuilles et écorces des racines)	Antibactérien	Khan et Omoloso, (2003)
<i>P. soyauxii</i> Taubert.	Extrait aqueux (écorces de tronc)	Toxicité aiguë et subaiguë	Tchamadeu et <i>al.</i> , (2011)
<i>P. santalinoides</i> DC.	Décoction (écorces de tronc)	Antiplasmodial	Mustofa et <i>al.</i> , (2000)

1.3 L'espèce *P. erinaceus*

Synonymes : *Pterocarpus africanus* DC., *Lingoum erinaceum* Lam.

Noms courants : santal du Sénégal, kino de Gambie, vène

Noms en langues nationales: Mooré : Nohinka, Noèèga,

Dioula : Guénu,

Bobo : yini

1.3.1. Caractères morphologiques

Pterocarpus erinaceus Poir. est un arbre de 8 à 15 m de hauteur, à fût droit et cylindrique atteignant un mètre de diamètre et à cime ovoïde ou arrondie. Il peut être caractérisé d'emblée par son écorce foncée noirâtre très lamelleuse : la tranche est brune avec des stries rouges laissant s'écouler une résine rouge translucide qui se dessèche et se durcit rapidement (Figure 1- 4).

- *Les feuilles* : elles sont alternes, composées imparipennées, à pubescence opprimée à la face inférieure et mesurent 3 à 15 cm. Elles comportent de nombreuses nervures latérales finement saillantes sur les faces et des inters-nervures tertiaires qui sont presque aussi marquées que les nervures secondaires latérales.

- *Les fleurs* : de couleur jaune d'or, elles deviennent jaunes pâles. Elles sont pédicellées, asymétriques, odorantes et mesurent 10 – 12 mm de long ; elles ont des pétales gaufrés et un calice pubescent à 5 dents courtes.

- *Fruits et graines* : les fruits membraneux, mûrissent de décembre à janvier et mesurent 7,5 cm de diamètre. Ils persistent longtemps sur l'arbre. La graine est entourée d'une aile et hérissé de poils épineux (Arbonnier, 2002).



Figure 1- 4: *P. erinaceus* : Plante (A), feuille (B), écorces de tronc (C) et fleurs et feuilles (D)

Photo Noufou à Diendréso, en Juin 2011

1.3.2. Répartition de *P. erinaceus*

Pterocarpus erinaceus Poir. (Fabaceae) pousse dans les savanes soudano-guinéenne et guinéennes. Cette espèce s'étend de l'Afrique de l'ouest à l'Afrique centrale. On la trouve principalement dans les pays suivants : Bénin, Burkina Faso, Cameroun, République centrafricaine, Tchad, Côte d'Ivoire, Gabon, Gambie, Ghana, Guinée, Guinée-Bissau, Mali, Niger, Nigéria, Sénégal, Sierra Leone, Soudan, Togo (Figure 1- 5).

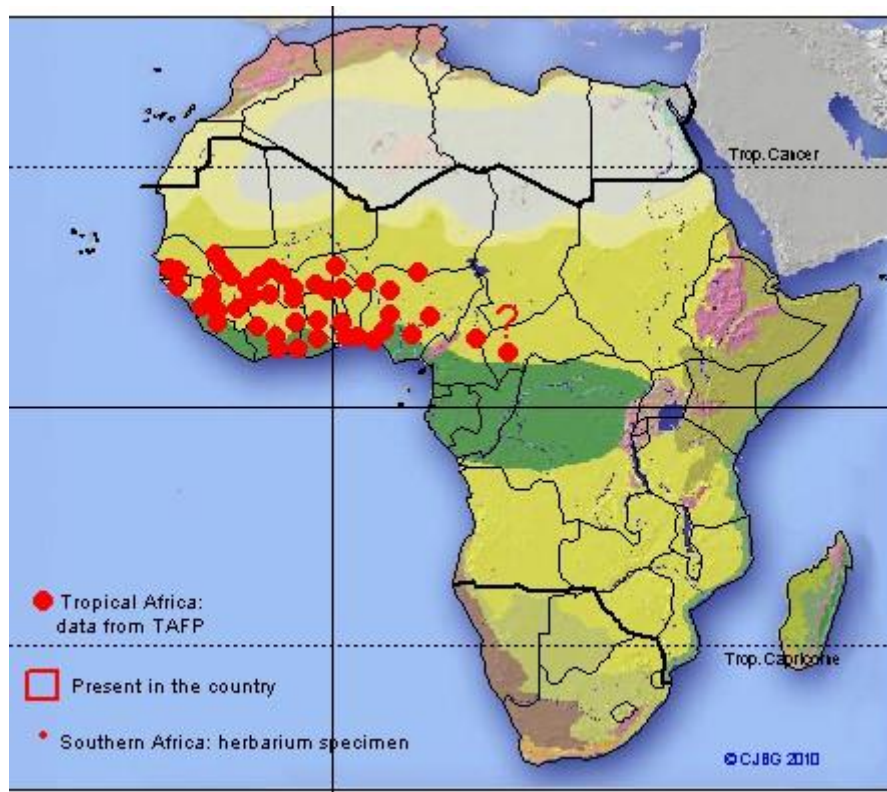


Figure 1- 5: Carte de repartition de *Pterocarpus erinaceus* sur le continent africain

(<http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details.php?langue=an&id=62762>

Consulté le 15/01/2011)

1.3.3. Utilisations traditionnelles

L'espèce *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae) est utilisée en médecine traditionnelle dans la prise en charge de nombreuses pathologies sur le plateau Mossi (Nacoulma, 1996) et dans le centre-est du Burkina Faso (Nadembega *et al.*, 2011). Toutes les parties de la plante sont utilisées comme remèdes :

Ecorces : dermatoses, blessures, ulcère chronique, plaie infectée, rhumatisme, bilharziose intestinale, dysenterie, lèpre, teigne capillaire, éléphantiasis, variole, gale, plaie rebelle, affections respiratoires, de la blennorragie.

Racines : stérilité des femmes, stimulant de la reproduction, ulcère, maux de ventre.

Feuilles : parasitose, paludisme, fatigue générale, états fébriles, arythmie, anémie, parasiticide interne.

Gui : morsure de chien, maladie du sommeil, antiseptique, antibactérien

Sève : blépharite, antiseptique oculaire

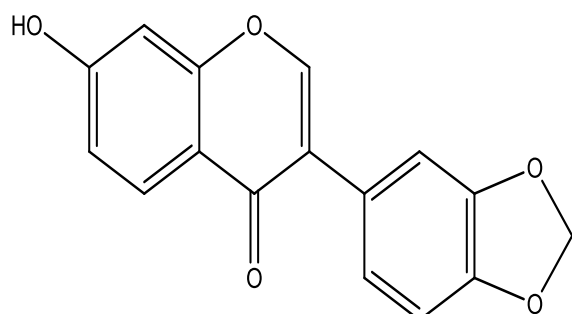
Au Ghana, les feuilles de *P. erinaceus* sont utilisées dans le traitement du paludisme en association avec des feuilles d'*Azelia africana* Smith (ex Pers.) (Fabaceae) (Asase *et al.*, 2005).

1.3.4. Autres utilisations

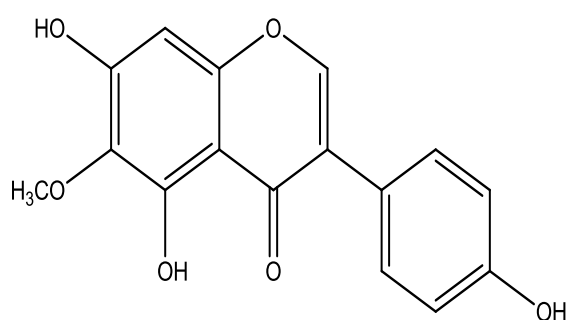
Les feuilles servent de fourrage pour alimenter des bétails et sont vendues sur les marchés à la saison sèche pour des moutons, des chèvres, du bétail et des chevaux d'engraissement. *P. erinaceus* produit également un bon charbon de bois. De plus, son bois est utilisé pour la construction et la confection des meubles (coffrets, tabourets). Les extraits des écorces de troncs de *P. erinaceus* sont utilisés comme colorant pour la teinture.

1.3.5. Métabolites secondaires isolés de l'espèce *P. erinaceus*

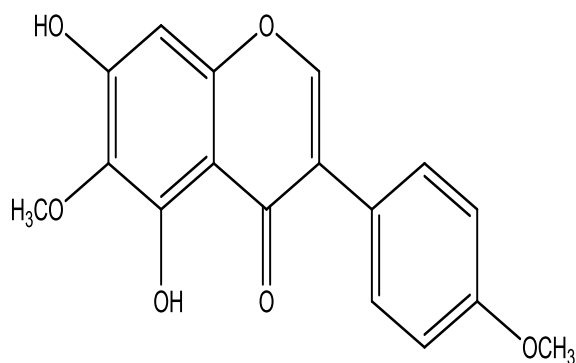
Une investigation phytochimique menée par Bevan *et al.*, (1965) a permis d'isoler des isoflavonoïdes tels que muningine (31), prunétine (25), pseudobaptigenine (46), tectorigénine (47), afromorsine (48), du cœur de bois de *P. erinaceus*.



(46) pseudobaptigénine



(47) tectorigénine



(48) afromorsine

1.3.6. Données pharmacologiques des molécules isolées de *P. erinaceus*

Différentes investigations ont permis de mettre en évidence les propriétés pharmacologiques de ces molécules. En effet, la tectorigénine (également isolée des rhizomes de *Belamcanda chinensis* (L.) DC. (Iridaceae) supprime la production de prostaglandine E2 par inhibition de l'induction de la cyclo-oxygénase 2 (COX 2) des cellules inflammatoires (Kim *et al.*, 1999). Une autre étude a permis de montrer que la tectorigénine inhibe l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et l'activation du facteur nucléaire kappa-B (NF-κB) dans une culture de macrophages RAW 264.7 (Pan *et al.*, 2008). Une étude menée par Ngamrojanavanich *et al.* (2007) a montré une cytotoxicité modérée de la prunétine sur une lignée cellulaire KB. L'afromosine et la soyasaponine isolées de *Wistaria brachybotrys* Sieb. et Zucc. inhibent les tumeurs de la peau et du poulmon chez la souris (Konoshima *et al.*, 1992).

1.3.7. Données pharmacologiques antérieures sur l'espèce *P. erinaceus*

Les activités antiplasmodiales modérées de l'extrait éthanolique et des fractions éther de pétrole, chloroforme et aqueuse des feuilles de *P. erinaceus* ont été étudiées par Karou *et al.* (2005). Nuhu *et al.* (2000) ont rapporté les activités antimicrobiennes de l'extrait hexanique des écorces de tronc de *P. erinaceus*. Les travaux de Benie et Thieulant (2004) ont prouvé que des extraits hydro-alcooliques de *Cola nitida* (Vent.) A. Chev. (Sterculiaceae), d'*Afromosia laxiflora* (Benth. Ex Bak.) Harms et de *P. erinaceus* (Fabaceae) ont provoqué un blocage d'ovulation chez le rat femelle en inhibant la libération de l'hormone lutéinisante (LH) et non sur la libération de l'hormone folliculo-stimulante (FSH).

1.4 Inflammation

1.4.1.Définition

L'inflammation est un ensemble d'événements bien coordonnés qui permet à tout tissu vascularisé de répondre à toute agression. Cliniquement, l'inflammation se manifeste en quatre signes cardinaux décrits, il y a 2000 ans, par un médecin romain nommé Celse à savoir : **rougeur** (*rubor*), **tumeur** (*tumor*), **chaleur** (*calor*) et **douleur** (*dolor*) (Russo-Marie et *al.*, 1996).

1.4.2.Les causes de l'inflammation

Les principales causes de l'inflammation sont essentiellement réparties en trois groupes :

- Causes infectieuses: virus, bactéries, champignons, prions, protéines infectieuses autres que les bactéries ou virus.
- Causes chimiques : substances toxiques (médicaments, environnementaux), allergènes.
- Causes physiques : chaleur, froid, traumatismes (ouvert ou non), brûlure, radiations, corps étrangers accidentels ou thérapeutiques (prothèse).

1.4.3. Immunité innée et réaction inflammatoire

La pénétration d'un agent pathogène dans l'organisme est confrontée à une réaction immunitaire appelée immunité innée, provoquant ainsi la stimulation des cellules immunitaires : monocytes, macrophages, neutrophiles, cellules endothéliales et lymphocytes. Cette stimulation induite par l'agent pathogène nécessite le complexe du modèle récepteur de reconnaissance appelé pattern-recognition-receptors (PRRs) qui constitue les éléments essentiels de l'immunité innée. Parmi les PRRs, il existe des récepteurs de signalisation appelés TLR (toll-like-receptors) ; ces récepteurs sont spécialisés dans la reconnaissance des micro-organismes. Les récepteurs PRRs exprimés sur la plupart des cellules immunitaires reconnaissent les motifs structuraux sur les enveloppes des micro-organismes appelés pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Les interactions entre PAMPs et PRRs vont conduire dans un premier temps à l'internalisation et à la destruction de l'agent pathogène par phagocytose, et dans un second temps à l'induction d'un processus inflammatoire protecteur (Hawiger, 2001). La réponse inflammatoire aiguë est ainsi déclenchée suite à la libération des médiateurs (cytokines, chimiokines, prostaglandines, leucotriènes, radicaux libres, monoxyde d'azote) issue de l'activation cellulaire. Ces médiateurs agissent en augmentant la perméabilité des vaisseaux sanguins et pour attirer des molécules et des cellules du système

immunitaire vers le site infecté. En effet la réaction inflammatoire permet d'orienter les éléments de l'immunité innée vers le site de l'infection (Kuby, 1992).

1.4.4.Types d'inflammations

Il existe deux types de réaction inflammatoire : l'inflammation aiguë et l'inflammation chronique.

1.4.4.1.La réaction inflammatoire aiguë

La réaction inflammatoire aiguë est immédiate suite à une agression, elle peut durer quelques heures ou jours. Ce succèdent de façon rapide l'agression, la destruction cellulaire, la détersion et la réparation. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante.

1.4.4.2.L'inflammation chronique

L'échec de la réaction inflammatoire aiguë conduit à l'inflammation chronique qui dure plusieurs mois, années ou toute la vie de l'individu et implique la réaction immunitaire. La chronicité est due à un défaut d'élimination de l'agent pathogène qui persiste ou à une perturbation du mécanisme inflammatoire (cancer, maladies auto-immunes). A la différence de l'inflammation aiguë les phénomènes vasculaire et cellulaire coexistent tout au long de l'inflammation. Les macrophages constituent les principales cellules de l'inflammation chronique, et les lymphocytes et les plasmocytes sont présents lorsque la cause est immunitaire. Dans la plupart des inflammations chroniques, la composante vasculaire est présente. En effet l'hyperplasie vasculaire des vaisseaux de petits calibres se caractérise par une augmentation du nombre de vaisseaux et un épaissement de leur paroi avec une hypertrophie des cellules endothéliales et des fibres musculaires (Russo-Marie *et al.*, 1996).

1.4.5.Les médiateurs de l'inflammation

1.4.5.1.Le système du complément

Le système du complément est composé d'une trentaine de protéines dont l'activation s'effectue par trois voies :

- Voie classique : elle est faite de composants C1, C4, C2 et C3 activés par des immunoglobulines IgG et IgM, l'endotoxine et des enzymes à activité trypsinique (plasmine).

- Voie alterne : les composants sont B, C3 et D.C3. Cette voie ne nécessite pas d'activateurs, elle se produit en absence d'anticorps.

- Voie tronc commun terminal : ses composants sont C5a, le complexe d'attaque des membranes (CAM), C5b, C6, C7, C8 et C9. L'activation de cette voie commence par le clivage enzymatique de C5 en C5a ou C5-anaphylatoxine et C5b par les C-convertases classiques ou alternes (C4b2a3b et C3Bbc3b).

L'activation du complément aboutit à la formation du complexe d'attaque C5b6789 qui détruit nombreuses bactéries. La formation des anaphylatoxines (C3a et C5a) est favorable au processus inflammatoire. En effet les anaphylatoxines induisent la libération de l'histamine et d'amines vasomotrices, accroissent la perméabilité vasculaire et présentent des propriétés chimiotactiques. L'anaphylatoxine C5a qui est un puissant chimioattractant augmente la production de cytokines pro-inflammatoires et active les polynucléaires neutrophiles. Les anaphylatoxines C3b et C4b s'adhèrent aux bactéries favorisant ainsi leur phagocytose (opsonisation).

1.4.5.2.Amines vasoactives

Ces substances sont présentes dans tous les tissus. Il s'agit essentiellement de l'histamine, la sérotonine et l'héparine. L'histamine, libérée à partir des granules mastocytaires, a une action vasodilatatrice et entraîne par là une augmentation de la perméabilité capillaire.

Substance très largement répandue dans le règne animal et végétal, la 5-hydroxytryptamine (5 HT) ou sérotonine provient essentiellement des mastocytes et des plaquettes. Elle a une action vasodilatatrice.

1.4.5.3.Protéases et peptides

Il s'agit essentiellement de la plasmine, de la kallikréine et de l'élastase, produites par les leucocytes activés. La plasmine a pour effet d'activer le facteur Hageman en particulier dans son action sur le système formateur de kinines. La kallikréine produite par les polynucléaires neutrophiles agit sur les kininogènes en libérant des kinines dont le principal actif est la bradykinine. Les kinines sont de puissants peptides vasodilatateurs à la dose d'ordre de nanogramme. Ils augmentent la perméabilité des vaisseaux et entraînent l'apparition de l'œdème à une molarité dix fois inférieure à celle de l'histamine. Au cours de l'inflammation, la bradykinine serait le responsable majeur de la douleur (Katzung, 2006).

1.4.5.4. La substance P

La substance P a un rôle pro-inflammatoire. La substance P favorise la libération des cytokines pro-inflammatoires et de l'histamine. Elle augmente également la perméabilité vasculaire.

1.4.5.5. Médiateurs lipidiques

Les médiateurs lipidiques comprennent les métabolites de l'acide arachidonique (eicosanoïdes) et le facteur d'activation plaquettaire

Eicosanoïdes : ce sont les prostaglandines, les thromboxanes et les leucotriènes. L'acide arachidonique est issu des acides gras membranaires sous l'action de la phospholipase A2. La transformation de l'acide arachidonique libre en eicosanoïdes emprunte deux voies enzymatiques :

- **Voie cyclo-oxygénase** : les cyclo-oxygénases (COX 1 et COX 2) sont localisées le long du réticulum et de l'enveloppe périmoléculaire dans les cellules de l'organisme. La COX 1 est constitutive et ubiquitaire. Elle joue un rôle de régulateur dans différents processus physiologiques tels que la cytoprotection gastrique, l'hémostase primaire, l'homéostasie vasculaire et l'hémodynamique rénale. Cependant la COX 2 est inducible et n'est exprimée à l'état basal que dans la prostate et le cerveau ; sa synthèse est stimulée par le TNF α et l'interleukine 1 β . La COX 2 intervient dans différentes réponses hormonales (ovulation, nidation, métabolisme osseux, métabolisme hydrosodé).

Les cyclo-oxygénases (COX) ou prostaglandines endoperoxydes synthases (PGH S) catalysent l'oxygénation de l'acide arachidonique, pour aboutir à la formation de la prostaglandine G2 (PGG 2). Au cours d'une cyclo-oxygénation suivie d'une peroxydation, la PGG 2 est transformée en prostaglandine H 2 (PGH2). La formation d'eicosanoïdes biologiquement actifs à partir de PGH2 requiert l'activité de différentes synthases spécifiques pour former PGD2, PGE2, PGF2 α , prostacycline (PGI2) et thromboxane A2 (TXA2) (Figure 1- 6) (Sawynok, 2003).

Les prostaglandines E2 sont responsables de la vasodilatation et de l'augmentation du flux sanguin. Les PGE1 et PGE2 sont responsables de l'élévation de la température du corps.

Les prostacyclines ont une action vasodilatatrice. Produite par les cellules endothéliales, la prostacycline PGI2 est un important médiateur dans l'œdème et la douleur de l'inflammation.

Le thromboxane A2 sécrété par les plaquettes sanguines induit l'agrégation plaquettaire et l'augmentation de la perméabilité vasculaire et elle est vasoconstrictrice.

- **Voie lipoxygénase** : les 5-, 12-, et 15-lipoxygénases interviennent dans la réaction inflammatoire. Ces enzymes métabolisent l'acide arachidonique en acide hydroperoxyeicosatétraénoïques (HPETEs), qui se transforment en dérivé hydroxyles (HETEs) et en leucotriènes. Le produit de la 5-lipoxygénase (présente dans les cellules inflammatoires : basophiles, mastocytes, éosinophiles, macrophages) le leucotriène A4 (LTA4) est transformé en leucotriènes B4 (LTB4), leucotriènes C4 (LTC4) et leucotriènes D4 (LTD4) (Figure 1- 7).

Les leucotriènes B4 participent au recrutement des polynucléaires neutrophiles. Ils ont un effet chimioattractant pour les cellules inflammatoires. Les LTC4 sont des vasoconstricteurs tandis que les LTD4 ont un effet amplificateur de la perméabilité vasculaire. Les LTD4 et LTC4 sont des agents chimioattractifs puissants pour les éosinophiles ; ils favorisent l'adhérence des éosinophiles, leur dégranulation et la formation des radicaux oxygénés (Katzung, 2006).

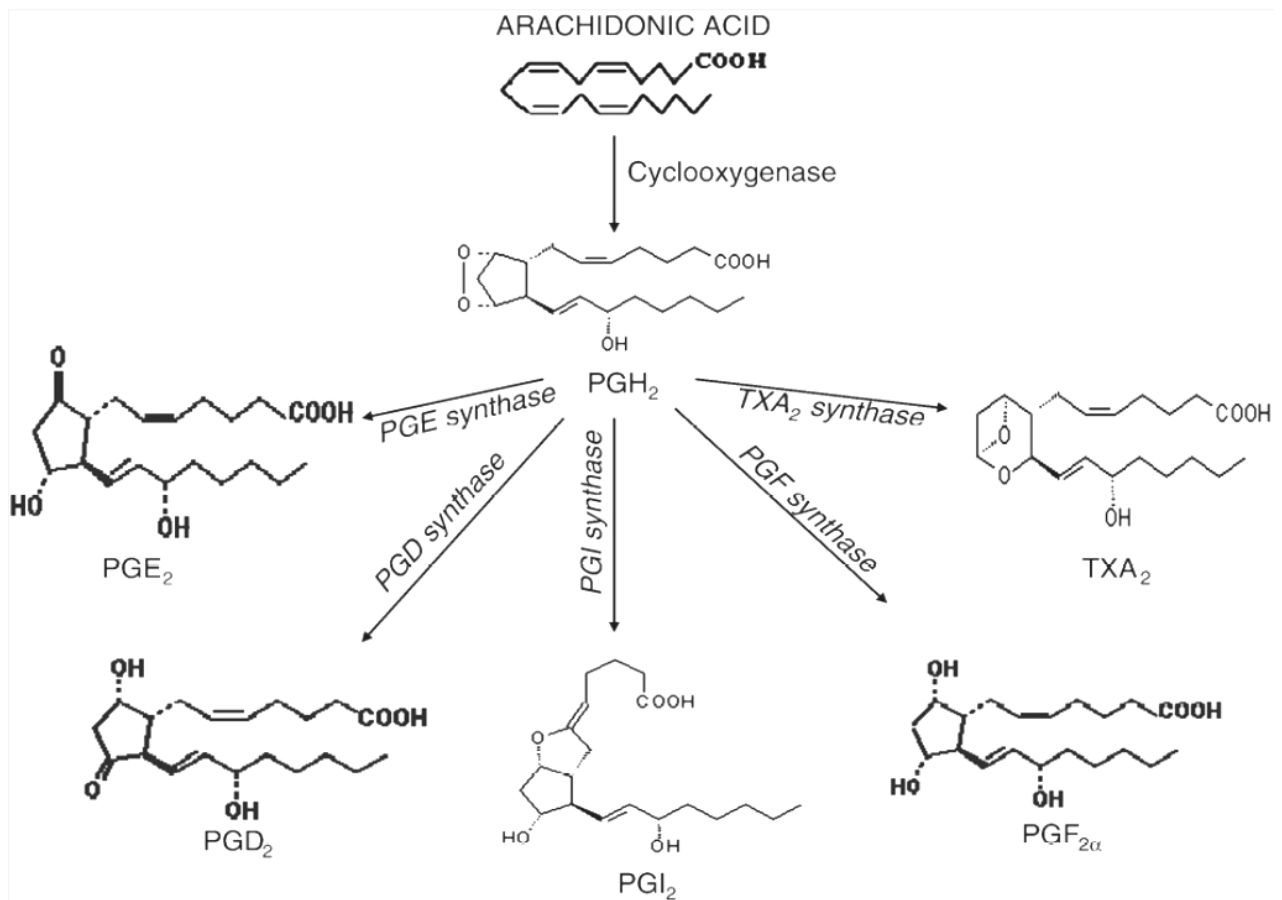


Figure 1- 6: Biosynthèse des prostaglandines et des thromboxanes (Cipollone et al., 2008)

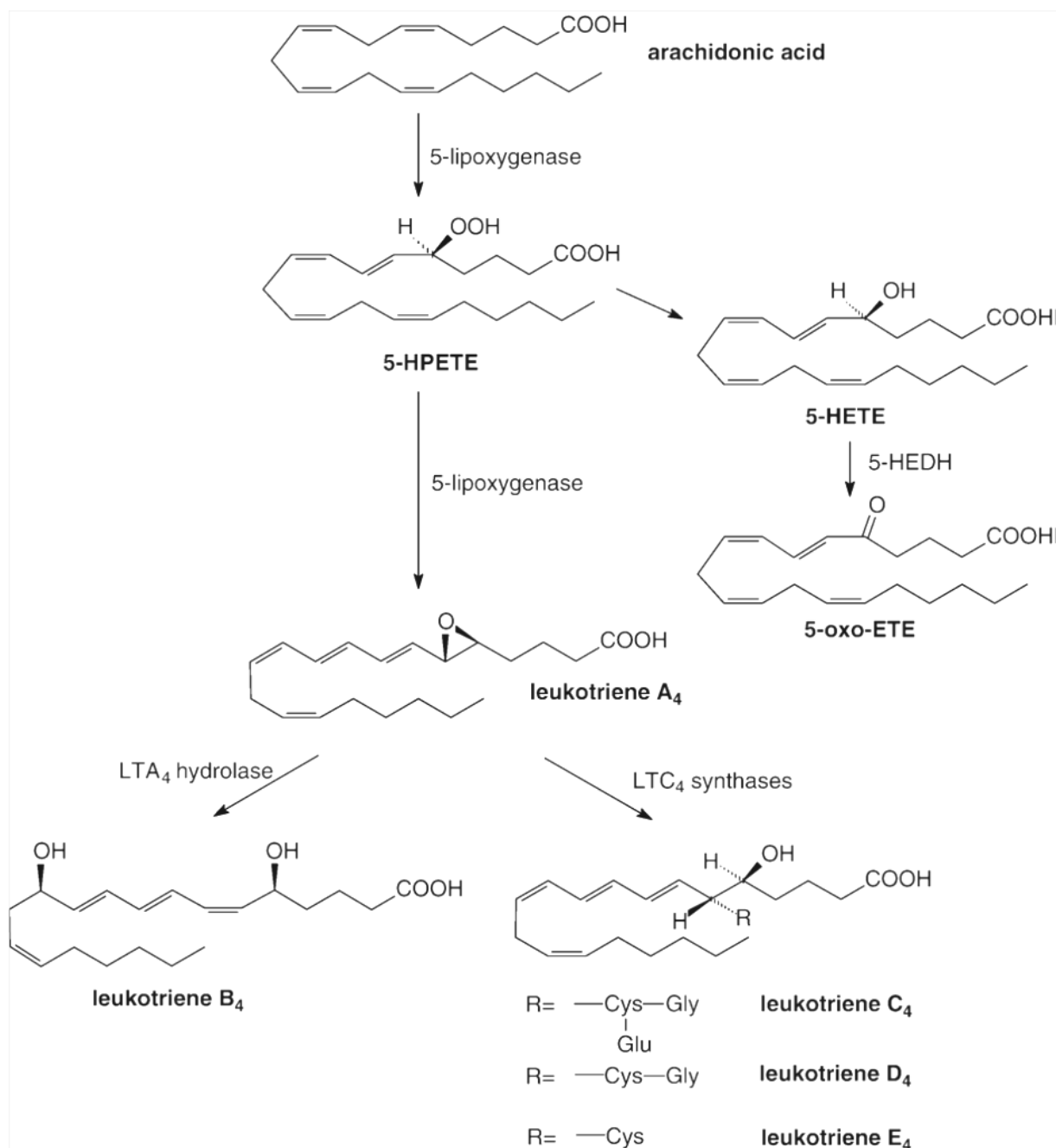


Figure 1- 7: Biosynthèse des leucotriènes (Werz et Steinhilber, 2006)

1.4.5.6. Le Platelet activating factor (PAF)

Le PAF est synthétisé dans les monocytes macrophages, polynucléaires neutrophiles, plaquettes, cellules endothéliales. Le PAF est généré à partir d'un métabolite appelé lyso-PAF sous l'action de acétyltransférase, issu du métabolisme de l'acide arachidonique. Le PAF est synthétisé dans les cellules endothéliales et monocytes stimulées par l'histamine, le TNF α , l'interleukine 1 et le leucotriène C₄. Le PAF favorise l'agrégation plaquettaire et active une série de fonctions des plaquettes, des macrophages, des neutrophiles et des éosinophiles

(activation ou agrégation, adhérence, augmentation du calcium intracellulaire, dégranulation, production de radicaux libres).

1.4.5.7. Les cytokines

Les cytokines sont des polypeptides ou glycoprotéines médiateurs qui régulent les aspects de l'immunité et de l'inflammation. En effet elles sont des messagers chimiques de la communication intercellulaire. Les cytokines sont produites par plusieurs cellules telles que les macrophages. Au cours de l'inflammation deux types de cytokines sont produits : les cytokines pro-inflammatoires et les cytokines anti-inflammatoires. Ces deux types de cytokines agissent sur leurs récepteurs de manière autocrine, paracrine et endocrine.

- *Cytokines pro-inflammatoires* : en réponse à toute stimulation inflammatoire en exemple la lipopolysaccharide (LPS), les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les macrophages sont le tumor necrosis factor alpha (TNF α), l'interleukine 1 (IL 1) et l'interleukine 6 (IL 6).

Le TNF α : le TNF α possède principalement deux récepteurs : TNFR1 et TNFR2. Le TNFR1 est constitutif et ubiquitaire, largement exprimé dans presque tous les types cellulaires alors que le TNFR2 est inductible et est exprimé dans les cellules immunitaires et endothéliales. Sa liaison aux récepteurs induit la sécrétion de nombreux médiateurs de l'inflammation, la prolifération et la différenciation cellulaire. Le TNF α stimule la production de PGE2 par les fibroblastes, IL-1, IL-6, IL-8 et les radicaux libres oxygénés. Il est responsable de l'adhérence cellulaire à l'endothélium (Landry et Gies, 2006).

L'interleukine 1 : deux types de récepteurs sont identifiés : IL1R de type I, exprimé à la surface des lymphocytes T et les fibroblastes ; et IL1R de type II est exprimé au sein des lymphocytes B, les monocytes et les neutrophiles. IL-1 active les neutrophiles et stimule la libération des prostaglandines (PGE2) et responsable de la destruction du cartilage. IL-1 agit en synergie avec le TNF α dans l'induction des protéases des chondrocytes. IL-1 et TNF α entretiennent leur propre production. Ils induisent différents types de cellules à produire des substances pro-inflammatoires telles que les médiateurs lipidiques, les chémokines, les radicaux libres et les enzymes protéolytiques.

L'interleukine 6 (IL-6) : IL-6 est une cytokine importante au cours de l'inflammation. Sa production est stimulée par IL-1 et TNF α . Il induit la coagulation, stimule la production des PAF par les neutrophiles et active les cellules endothéliales. IL-6

stimule la sécrétion de protéines par des cellules hépatocytes de la phase aiguë de l'inflammation.

- *Les cytokines anti-inflammatoires* : l'interleukine 4 (IL-4), l'interleukine 10 (IL-10), l'interleukine 13 (IL-13), l'interféron gamma (IFN γ) et le *transforming growth factor* bêta (TGF β) sont les principales cytokines anti-inflammatoires qui réduisent les réactions inflammatoires et immunitaires. Ils induisent des effets qui inhibent les activités générées par IL-1 et TNF α .

L'interleukine 4 et l'interleukine 13 : l'IL-4 induit la production du collagène en inhibant la collagénase. L'IL-4 inhibe la production de l'IL-1 et l'IL-6. L'IL-4 et l'IL-13 sont des inducteurs puissants de l'immunoglobuline E (IgE).

L'interleukine 10 : l'IL-10 bloque la production des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF α). L'IL-10 réduit l'expression des récepteurs de TNF α à la surface des monocytes.

L'interféron gamma (INF γ) : l'INF γ induit l'activité cytotoxique des macrophages vis-à-vis des cellules tumorales. Il rend les macrophages résistants face au développement des agents pathogènes (parasites, virus, bactéries).

Le transforming growth factor beta : le TGF β produit par les macrophages inhibe la production d'IL-1 et de TNF α . Il a un effet inhibiteur sur la production de l'anion superoxyde et de monoxyde d'azote, et sur le recrutement et l'activation des leucocytes.

1.4.5.8. Les radicaux libres oxygénés (RLO)

L'activation des macrophages et des neutrophiles stimule l'activité de l'enzyme NADPH oxydase qui provoque la génération de radicaux libres en particulier le superoxyde (O_2^-). Les RLO ont la propriété d'éliminer les pathogènes phagocytés ou situés au voisinage des phagocytes. Ils représentent la première ligne de défense non spécifique et essentielle dans la défense de l'organisme. La production de l'anion superoxyde exerce un effet toxique pour les tissus voisins.

1.4.5.9. Le monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote est synthétisé par une famille d'enzymes appelée NO-synthases (neuronale, endothéliale et inductibles). Les NO-synthases inductibles (iNOS) s'expriment en réponse aux cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et TNF α) et aux endotoxines.

Les iNOS transforment la L-arginine en NO et en citruline. En présence de l'anion superoxyde le NO forme un puissant composant cytotoxique, le peroxy-nitrite qui est un oxydant contribue aux dommages tissulaires. Le NO induit la vasodilatation et régule le recrutement des leucocytes.

1.4.6. Les étapes de l'inflammation aiguë

La réaction inflammatoire est un processus qui se déroule en quatre étapes : réaction vasculo-exsudative, réaction cellulaire, déterision et réparation.

1.4.6.1. Réaction vasculo-exsudative

Cette réaction se caractérise par une congestion active, un œdème inflammatoire (exsudat) et une diapédèse leucocytaire

Congestion active : cette phase est déclenchée sous l'action des médiateurs chimiques (histamine, sérotonine) et des stimuli nerveux. Elle se caractérise par une vasodilatation.

Œdème inflammatoire (exsudat) : l'augmentation de la perméabilité vasculaire des parois entraîne le passage dans le tissu conjonctif interstitiel de l'exsudat constitué essentiellement d'eau et de protéines plasmatiques.

Diapédèse leucocytaire : cette phase est la migration des leucocytes sous l'action de bradykinine, des facteurs chimiotactiques et des dérivés de l'acide arachidonique, et leur accumulation dans le foyer lésionnel. La migration leucocytaire comporte une margination des leucocytes à proximité des cellules endothéliales, une adhérence leucocytaire aux cellules endothéliales et un passage trans-endothélial des leucocytes (Figure 1- 8).

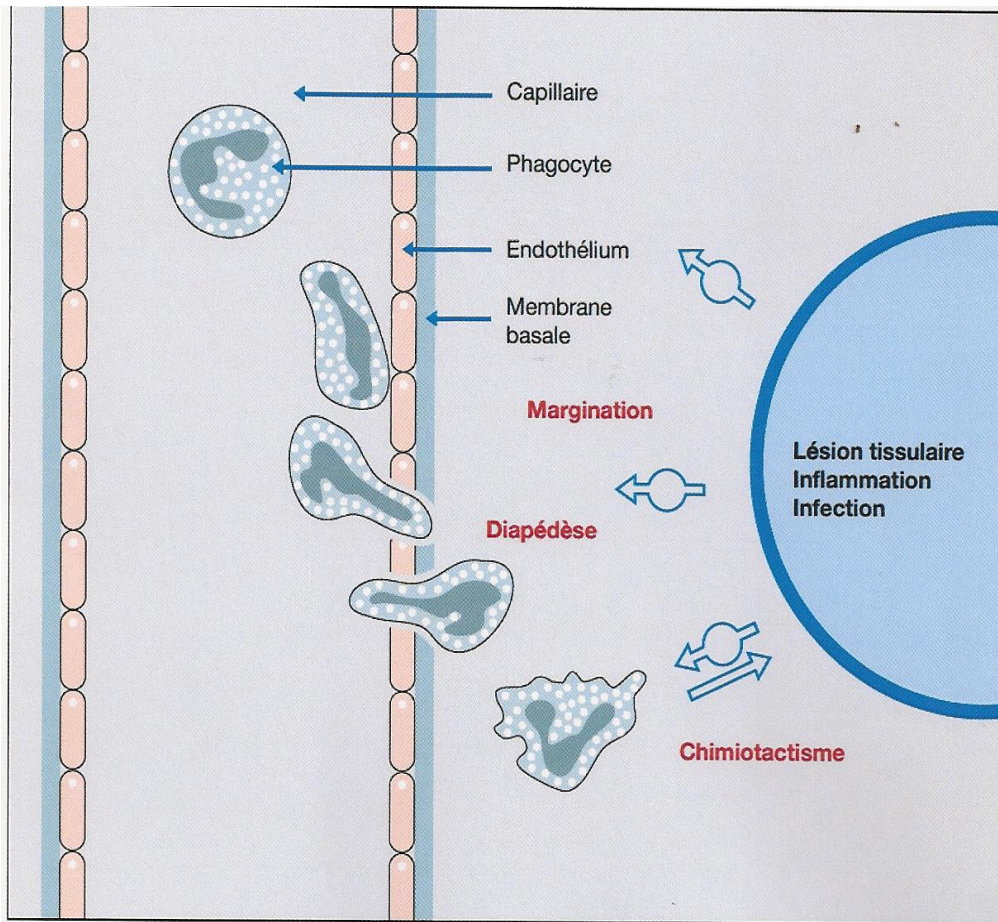


Figure 1- 8 : Réaction inflammatoire (diapédèse) (Béné *et al.*, 2005)

1.4.6.2. Réaction cellulaire

La réaction cellulaire se caractérise par la formation d'un granulome inflammatoire. La composition cellulaire est constituée des cellules du sang (polynucléaires, monocytes et lymphocytes) et des cellules du tissu conjonctif (fibroblastes, cellules endothéliales, macrophages résidents et mastocytes). La composition du tissu varie en fonction du temps, les polynucléaires caractéristiques de l'inflammation aiguë, après quelques jours ou semaines de l'évolution de l'inflammation, laissent la place aux macrophages, aux lymphocytes et plasmocytes. Puis progressivement sous l'influence des facteurs de croissance, le tissu de granulation s'enrichit en fibroblastes et en cellules endothéliales formant ainsi des néo-vaisseaux.

Le rôle du granulome inflammatoire est de :

- ✓ assurer la déterction par les phagocytes (polynucléaires et macrophages)
- ✓ développer une réaction immunitaire B et/ou T.

- ✓ sécréter des multiples médiateurs intervenant dans le recrutement cellulaire, la phagocytose, défense immunitaire et la modification de la matrice conjonctive.

1.4.6.3.Détersion

C'est la phase d'élimination des tissus nécrosés, des agents pathogènes et du liquide d'exsudat. Si la détersion est incomplète, l'inflammation aiguë va évoluer à une inflammation chronique. La détersion s'effectue en deux mécanismes :

Détersion interne : élimination des tissus nécrosés, agents pathogènes par phagocytose tandis que le liquide exsudat est drainé dans la circulation lymphatique et résorbé par les macrophages.

Détersion externe : liquéfaction du matériel nécrosé (pus, caséum) et élimination par fistulisation à la peau ou dans un conduit bronchique, urinaire, intestinal.

1.4.6.4.Réparation

Elle comprend deux étapes : la cicatrisation et la régénération

Cicatrisation : la cicatrisation aboutit à la formation d'un tissu conjonctif qui remplace les tissus détruits lors de l'inflammation. La phase précoce de la cicatrisation est caractérisée par l'élaboration de nombreux vaisseaux (angiogenèse). Ceux-ci peuvent prendre un aspect exubérant appelé le bourgeon charnu.

Régénération : elle apparaît parallèlement à la réparation conjonctive. Les cellules épithéliales détruites sont remplacées par la prolifération des cellules épithéliales saines situées autour du foyer inflammatoire. Au niveau d'un revêtement (peau, muqueuses), l'épithélium régénère de la périphérie au centre de la perte tissulaire.

La réponse inflammatoire qui devient pathologique peut se guérir de manière spontanée ou par l'intervention thérapeutique (anti-inflammatoire stéroïdiens et non stéroïdiens). Lorsque la guérison ne se fait pas, le processus inflammatoire évolue vers la chronicité avec une réponse lymphocytaire comprenant l'activation et la prolifération des lymphocytes B et T.

L'évolution de l'inflammation dépend également de l'apoptose et nécrose cellulaires. Ainsi, les cellules mortes par apoptose ne relarguent pas leur contenu potentiellement nocif, cependant les cellules en nécrose sont lysées et libèrent leur matériel cytosolique qui active les cellules phagocytoses conduisant à l'aggravation de l'inflammation.

1.4.7. Quelques pathologies à composante inflammatoire

1.4.7.1. Pathologies infectieuses

Bactérienne: l'inflammation s'installe autour des corps étrangers ayant pénétré dans l'organisme. Les bactéries libèrent les toxines (endotoxines et exotoxines) qui sont responsables de la libération massive des cytokines pro-inflammatoires (IL 1 β , IL 6, TNF α). La toxine B (*Clostridium difficile*), le lipopolysaccharide (LPS) (*E. coli*), pneumolysine (*Streptococcus pneumoniae*) stimulent la production des cytokines IL 1 β , IL 6, TNF α par les macrophages et monocytes, à des concentrations de l'ordre de nanomolaire (Brian et al., 1996)

Parasitaires : l'infection parasitaire provoque une réaction inflammatoire caractérisée par une activation des polynucléaires éosinophiles, des polynucléaires neutrophiles. Le TNF α joue un rôle central dans les aspects générant la pathologie du paludisme. L'infection du *plasmodium falciparum* induit la formation des prostaglandines qui provoquent des lésions tissulaires par le stress oxydatif causé par la libération des radicaux libres oxygénés (Clark et Cowden, 2003).

Mycose : les champignons pathogènes sont responsables des lésions cutanées superficielles, sous-cutanées ou viscérales. La candidose est riche en polynucléaires neutrophiles.

Virale : les virus sont des organismes microscopiques ayant un seul type d'acide nucléique (ADN, ARN). L'infection virale peut donner deux types de lésions : une lésion cellulaire directement induite par le virus et une lésion indirecte provoquée par la réaction immunitaire dirigée contre les cellules infectées. L'infection du virus VIH de type 1 induit une production d'IL 6 au niveau des monocytes ; en plus le taux d'IL 6 croît chez les personnes vivant avec le VIH (Wolfgang, 1996).

1.4.7.2. Arthrite rhumatoïde

Elle est une pathologie inflammatoire chronique caractérisée par la dégénérescence du cartilage articulaire associée à la prolifération du tissu osseux sous-jacent. Elle s'étend à toute la synoviale et dans les cas graves peut atteindre d'autres organes. Contrairement au liquide synovial normal acellulaire, l'arthrite rhumatoïde liquide synoviale est enrichie de neutrophiles, macrophages et de lymphocytes T. L'IL 1 et le TNF α stimulent la production des prostaglandines E et la collagénase ; ils interviennent dans la stimulation de la résorption du cartilage en inhibant la synthèse du protéoglycane. (Feldman *et al.*, 1996 ; Maini et Taylor, 2000).

1.4.7.3.L'asthme

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires impliquant les mastocytes, les éosinophiles et les lymphocytes T. De nombreux médiateurs sont impliqués dans l'inflammation asthmatique. La bradykinine joue un rôle important comme activateur de la sensibilisation des nerfs sensitifs dans les voies respiratoires, entraînant toux et oppression thoracique (Barnes, 1993). Les leucotriènes (C4, D4 et E4) ont ensuite été identifiés comme étant d'importants médiateurs de réactions d'hypersensibilité et de bronchoconstriction. Il est admis que les leucotriènes jouent un rôle important dans l'asthme. Ces médiateurs sont impliqués dans le recrutement des éosinophiles dans les tissus des voies aériennes, la contraction des muscles lisses pulmonaires et la sécrétion de mucus. Après accumulation aux sites inflammatoires, les éosinophiles ont le potentiel d'induire des lésions et un dysfonctionnement des voies respiratoires par la libération de médiateurs lipidiques (PAF et leucotriène C) (Hogan et Foster, 1997 ; Werz et Steinhilber, 2006).

1.4.7.4.L'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie chronique de la vascularisation influencée par de multiples facteurs impliquant une réaction entre les composants du sang et de la paroi artérielle. Les réactions inflammatoires et immunologiques jouent un rôle important au cours du développement de la maladie (Zhao et *al.*, 2009) . L'athérosclérose est la première cause de nombreuses maladies cardiovasculaires y compris les maladies coronariennes de l'artère, l'ischémie et de nombreux cas d'insuffisance cardiaque. L'athérosclérose est causée par l'accumulation de lipoprotéines à faible densité (LDL) et des éléments fibreux dans les grandes artères. Elle est initiée par la migration transendothéliale et l'activation des monocytes circulants et les lymphocytes sur le site de lésion vasculaire. Les cellules recrutées libèrent des chimiokines et des cytokines pro-inflammatoires qui favorisent la prolifération vasculaire et la migration des cellules musculaires lisses vers la lésion d'athérosclérose, ce qui augmente l'épaississement néo-intimale. Les macrophages chargés de cholestérol subissent une nécrose ou une apoptose (Lusis et *al.*, 2004).

1.4.8.Traitement pathologique

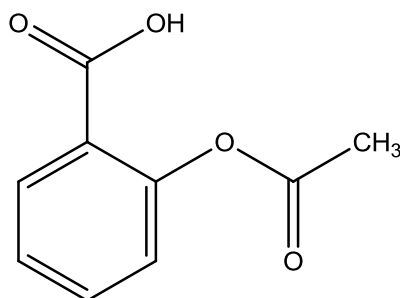
La prise en charge de l'inflammation utilise une variété de médicaments anti-inflammatoires qui inhibe le processus inflammatoire à plusieurs niveaux de l'inflammation. On note

essentiellement deux catégories d'anti-inflammatoires : les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS).

1.4.8.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

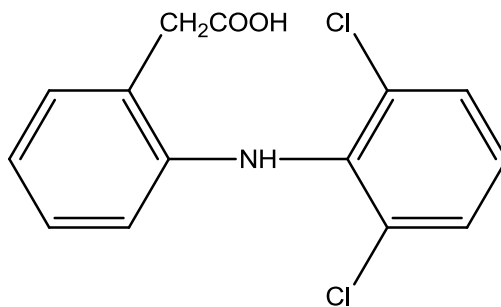
Les AINS classiques sont regroupés en sept classes chimiques en dehors des autres qui agissent préférentiellement à un isoenzyme de la cyclo-oxygénase. Toutes les différentes classes chimiques ont en commun l'inhibition de la production des prostaglandines à des degrés différents (Katzung, 2006 ; Russo-Marie *et al.*, 1998).

- Acides salicyliques et dérivés : l'acide acétylsalicylique (**49**) ou aspirine est la molécule type de cette classe. Elle exerce un effet anti-agrégant plaquettaire à faible dose, un effet antalgique et antipyrétique à dose moyenne et un effet anti-inflammatoire à forte dose. Tous les salicylates non acétylés tels que le choline-salicylate de magnésium, le salicylate de sodium et le salicyl-salicylate ont des effets antalgiques et sont inhibiteurs compétitifs réversibles de la COX moindre que l'aspirine.



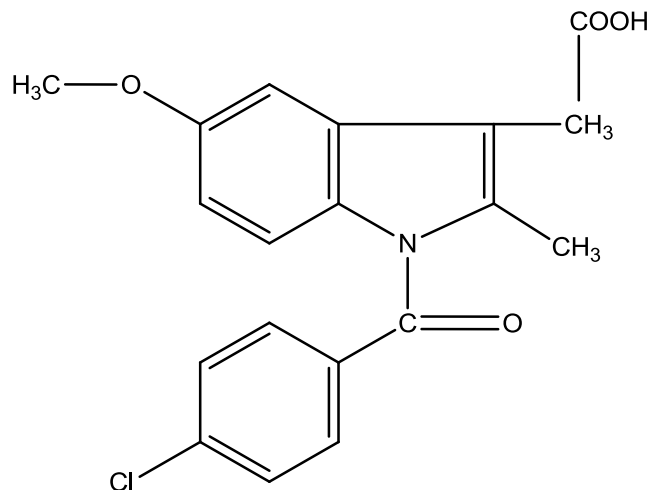
(49) acide acétylsalicylique

- Acides phénylacétiques et apparentés : le diclofénac (**50**) est un dérivé de l'acide phénylacétique, il inhibe les cyclo-oxygénases de manière non sélective.



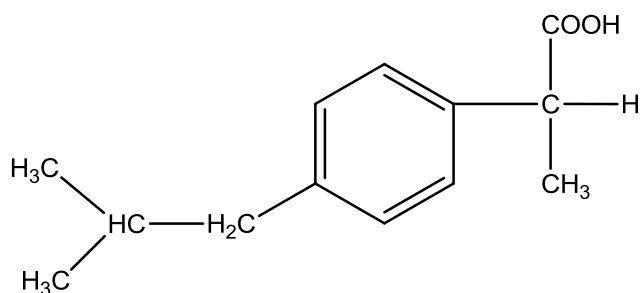
(50) diclofénac

- Acides indolacétiques et dérivés : l'indométacine est la molécule de référence de cette classe. L'indométacine **(51)** exerce des effets anti-inflammatoire et antalgique aux mêmes doses. Elle possède des effets anti-agrégant plaquettaire et antipyrétique. Le sulindac, tolmétine et ténidap font partis de cette famille chimique.



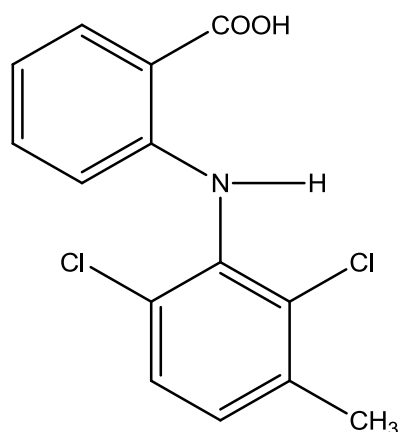
(51) indométacine

- Acides propioniques et dérivés : ce groupe exerce des effets pharmacologiques selon les doses administrées. Ainsi, la dose administrée pour un effet anti-inflammatoire est le double de celle administrée pour un effet antalgique et antipyrétique. L'ibuprofène **(52)** et le kétoprofène sous leur forme pharmaceutique sont à faible dose à visée antalgique et à forte dose à visée anti-inflammatoire.



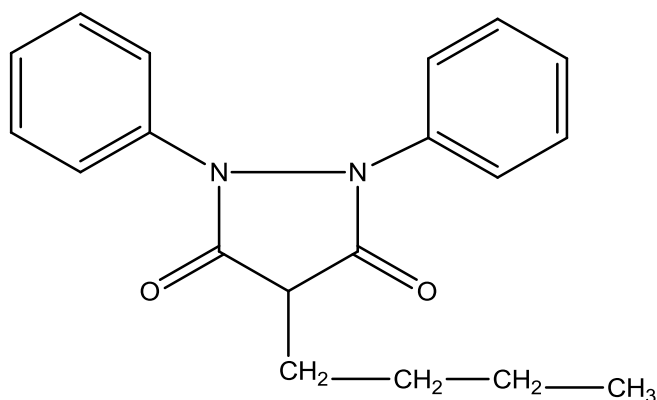
(52) ibuprofène

- Acides anthraniliques et apparentés : cette famille chimique des AINS comprend les fénamates : acide méfénamique, acide flufénamique, acide méclofénamique **(53)**, acide tolfénamique et acide niflumique. L'usage des fénamates est essentiellement dû à leurs propriétés anti-inflammatoire et antalgique.



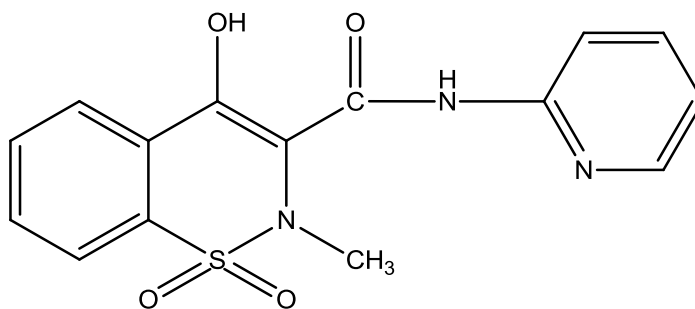
(53) acide méclofénamique

- Pyrazolones : le phénylbutazone **(54)** est un dérivé des pyrazolones, il possède un puissant effet anti-inflammatoire. Sa toxicité, en particulier ses effets hématologiques (anémie aplastiques) limite son emploi en thérapie.



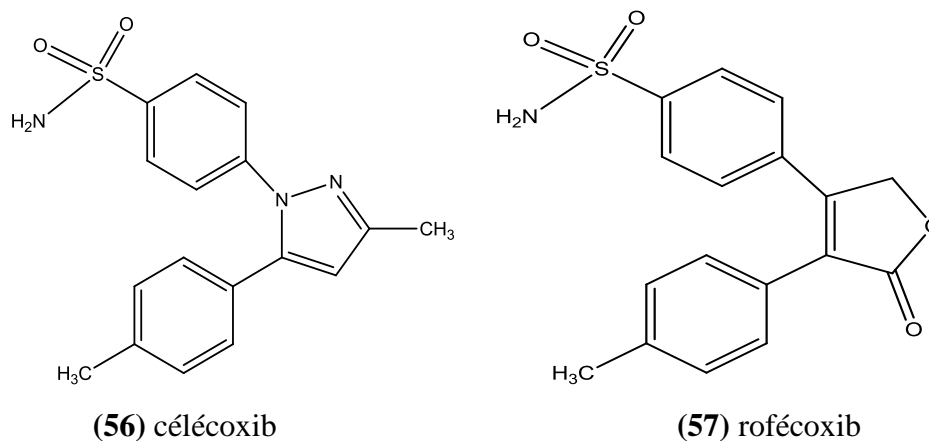
(54) phénylbutazone

- Carboxamides du thiazine-dioxyde (oxicams) : ce groupe comprend le piroxicam **(55)**, le meloxicam et le ténoxicam. Le piroxicam inhibe la migration des leucocytes et la production des radicaux libres oxygénés à fortes doses.



(55) piroxicam

A ces différentes classes chimiques des AINS classique on distingue une récente classe d'AINS. Il s'agit des inhibiteurs sélectifs de la COX 2, appelés coxibs. Les coxibs inhibent plus activement la COX 2 que la COX 1. Cette classe regroupe le célécoxib (**56**), l'étoricoxib, méloxicam, le rofécoxib (**57**) et le valdécoxib. Le célécoxib possède un pouvoir inhibiteur très sélectif de la COX 2 environ 10 à 20 fois que la COX 1. Le méloxicam inhibe de manière préférentielle la COX 2 comparativement à la COX 1.



Mécanisme d'action

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibent les isoenzymes COX1 et COX2. Les isoenzymes COX1 et COX2 ont environ 60 % de la séquence d'acides aminés identique cependant l'inductibilité reste la différence majeure entre ces isoenzymes. L'isoforme COX 1 est constitutivement exprimé dans la plupart des cellules et entraîne la production de prostaglandines homéostatiques qui maintiennent l'intégrité des muqueuses gastro-intestinale ainsi que le débit sanguin rénal. Il est également exprimé dans les plaquettes et responsable de la production du thromboxane A2 qui intervient dans l'activation et l'agrégation des plaquettes (Mukherjee, 2002).

Le COX 2 est inductible, il est prédominant dans les lésions tissulaires et est la principale source de production des prostanoïdes pendant l'inflammation. Sa concentration physiologique étant très faible dans les cellules (prostate, utérus, cerveau, poumons) est multipliée par 10 à 80 fois lors d'une inflammation (Burian et Geisslinger, 2005).

L'interaction des AINS avec les cyclo-oxygénases est, soit mixte avec une inhibition de la COX 1 et 2, soit plus sélective vis-à-vis de l'une ou l'autre cyclo-oxygénase. L'acide acétylsalicylique inhibe de manière irréversible la COX 1, l'aspirine acétyle la sérine (ser) situé au voisinage du site actif et empêche la formation de la prostaglandine PGG2. Les autres AINS inhibent les COX par un mécanisme réversible. L'indométacine et le sulindac sont légèrement sélectifs pour la COX 1 ; le méclofénamate et l'ibuprofène inhibent les deux

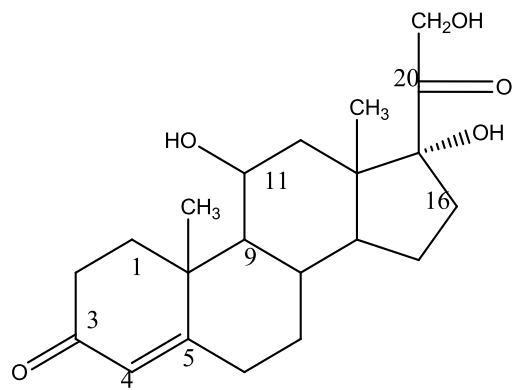
cyclo-oxygénases. Les inhibiteurs sélectifs de la COX 2 (coxibs) ont des propriétés anti-inflammatoire, antalgique et antipyrétique similaires aux AINS traditionnels. Les coxibs ont moins d'effets indésirables digestifs, et ils n'ont aucun impact sur l'agrégation plaquettaire. Les AINS ont d'autres mécanismes d'action à savoir l'inhibition du chimiotactisme, des cytokines pro-inflammatoires et la production des radicaux libres oxygénés. Ils atténuent la sensibilité des vaisseaux à la bradykinine et l'histamine et antagonisent la vasodilatation. A dose thérapeutique les AINS traditionnels sont incapables de bloquer l'activité de 5-lipoxygénase, ce qui pourrait accroître la production des leucotriènes (Katzung, 2006 ; Russo-Marie *et al.*, 1998).

1.4.8.2. Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)

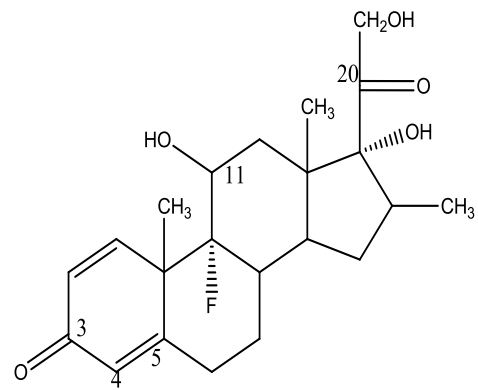
Au niveau du cortex surrénal, le cholestérol est converti par des oxydases en corticostéroïdes à 21 carbones (glucocorticoïdes) et en androgènes à 19 carbones (minéralocorticoïdes). Les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes naturels et synthétiques sont utilisés pour le traitement de certains processus physiopathologiques. L'aldostérone le principal minéralocorticoïde est caractérisée par ses effets sur la balance des ions monovalents essentiellement la réabsorption du sodium, la sécrétion des ions potassium et hydrogène. Les synthétiques de l'aldostérone tels que la désoxycortone et la fluoro-9 alpha-hydrocortisone sont indiqués en thérapeutique en cas de déficit d'insuffisance surrénale et en d'hypotension (Landry et Gies, 2003 ; Schorderet, 1992).

Le cortisol (**58**) qui est le principal glucocorticoïde est caractérisé par ses effets métabolique du glucose et anti-inflammatoire. Toute modification structurale des minéralocorticoïdes et des glucocorticoïdes sur l'oxygène en C₃ et en C₂₀, sur la double liaison en C₄ – C₅ et sur le radical hydroxyl (OH) en C₁₁ entraîne la perte de l'activité biologique (Schorderet, 1992).

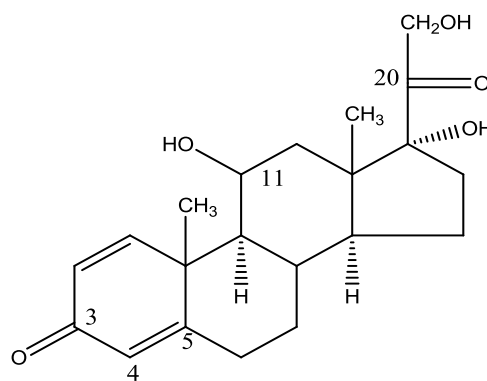
Les anti-inflammatoires stéroïdiens constituent essentiellement les glucocorticoïdes : hydrocortisone (**58**), prednisolone (**60**), bétamétasone (**59**), dexaméthasone. Les glucocorticoïdes sont des dérivés de synthèse chimique du cortisol qui est une hormone de la corticosurrénale. Les AIS possèdent un effet anti-inflammatoire lorsque l'organisme se trouve dans un état pathologique.



(58) hydrocortisone (Cortisol)



(59) bêtaméthasone



(60) prednisolone

Mécanisme d'action

La particularité des AIS est qu'ils interviennent à toutes les étapes du processus inflammatoire. Ils diminuent le phénomène vasculaire et antagonisent les phénomènes cellulaires précoces et tardifs de l'inflammation. L'efficacité anti-inflammatoire des AIS s'explique par leur effet inhibiteur sur la production des cytokines, des médiateurs lipidiques et les enzymes pro-inflammatoires. Ainsi au niveau des macrophages les AIS inhibent l'activation de la phospholipase A2, la production des médiateurs lipidiques (prostaglandines, leucotriènes, le PAF), des radicaux libres, du monoxyde d'azote et des cytokines. (Russo-Marie *et al.*, 1998; Muster, 2005)

1.4.9.Effet antalgique

La douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles ou décrites dans des termes évoquant une telle lésion (Moore, 2009). La douleur inflammatoire a une fonction protectrice de la région lésée ; et

cette action est due à l'intervention de plusieurs médiateurs chimiques et la compression des terminaisons nerveuses par de l'œdème.

Les prostaglandines (PGE₂, PGD₂, PGI₂) jouent un rôle essentiel dans la douleur inflammatoire, ainsi elles ont la capacité d'abaisser le seuil d'excitabilité des nocicepteurs des fibres C. Elles exercent leurs actions par activation de récepteurs spécialisés (EP1, EP2, EP3, EP4, DP1, DP2, IP) couplés à une protéine G. La bradykinine, médiateur chimique produit lors d'une inflammation, exerce son action nociceptive lors que son récepteur B1 est induit.

Le pouvoir analgésique des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) est lié à leur capacité d'inhiber la biosynthèse des prostaglandines. La dose analgésique des AINS est faible comparativement à celle de l'anti-inflammatoire (Kressec *et al.*, 2007 ; Blatties, 2005).

1.4.10.Effet antipyrétique

La fièvre est définie comme étant une élévation de température du corps qui se manifeste en réponse défensive à l'entrée d'un corps étranger. Elle est consécutive à un réglage transitoire du thermostat hypothalamique à une température de 3 à 4 °C au plus. La fièvre est un processus à distinguer de l'hyperthermie qui correspond à une augmentation de température incontrôlée et est indépendante de la valeur cible de la thermorégulation hypothalamique (Blatteis, 2005).

La fièvre est la conséquence de la biosynthèse des prostaglandines PGE₂ au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins de l'hypothalamus. Le pyrogène exogène qui peut être soit un agent pathogène (virus, bactéries, champignons, endotoxine), soit un autre corps étranger (greffe, allergène) ou des cellules cancéreuses activent les leucocytes. Les leucocytes activés produisent des cytokines pro-inflammatoires (IL 1 β , TNF α , IL 6) qui stimulent la production de PGE₂.

L'effet antipyrétique des anti-inflammatoires non stéroïdiens est lié à une inhibition de la biosynthèse de PGE₂. Le passage de l'acétaminophène (paracétamol), à travers la barrière hémato-encéphalique, explique son effet antipyrétique et analgésique lié à l'inhibition de PGE₂. Des études suggèrent qu'il pourrait inhiber la cyclo-oxygénase 3 (COX 3) dans le système nerveux central (Katzung, 2006). La COX 3 est une isoenzyme dérivées de la COX 1 avec un intron de 33 acides aminés de plus que la COX 1 ; elle est sélectivement inhibée par le paracétamol, l'antipyrine, la dipyronne et la phénacétine (Chandrasekharan *et al.*, 2002).

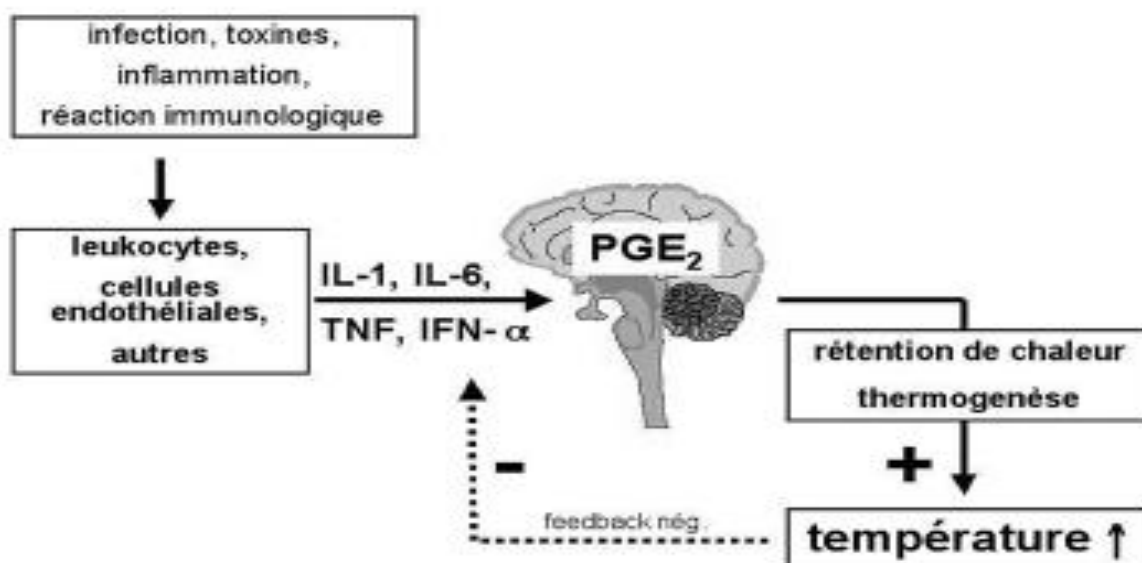


Figure 1- 9: Mécanisme de la fièvre (Rogo von Vigier, 2002)

1.4.11. Les antirhumatismaux

Outres les anti-inflammatoires non stéroïdiens et stéroïdiens, les antirhumatismaux, utilisés dans la prise en charge de l'arthrite rhumatoïde, ont des effets anti-inflammatoires. Il s'agit des sels d'or, la ciclosporine et les anticorps anti-TNF α .

Les sels d'or : ils modifient le processus pathologique du rhumatisme arthrite. L'aurothiomalate et l'aurothioglucose sont administrés par injection cependant l'auranofine est administré oralement. Les sels d'or suppriment la fonction du système immunitaire par réduction de l'activité des macrophages et des lymphocytes. En plus l'aurothiomalate réduit les lymphocytes circulant et l'auranofine inhibe la libération des prostaglandines PGE₂ et de leucotriènes B₄ des cellules synoviales (Vane et Botting, 1987).

La ciclosporine : elle exerce un effet immunosuppresseur principalement à travers l'inhibition des lymphocytes T. la ciclosporine inhibe la production de récepteurs IL-1 et IL-2 et l'interaction entre macrophages et lymphocytes. L'hypertension artérielle, la néphrotoxicité et l'hépatotoxicité constituent les effets indésirables de ce médicament.

Les anticorps anti-TNF α : la cytokine TNF α joue un rôle important dans le processus inflammatoire et dans le processus des destructions des os et du cartilage par leur action directe sur les cellules synoviales (fibroblastes). La stratégie visant à bloquer le TNF α a conduit au développement des anticorps monoclonaux anti-TNF α dont trois ont été mis sur le marché. L'adalimumab et l'infliximab qui se complexent avec du TNF α soluble et prévient

son interaction avec les récepteurs de surfaces cellulaires p55 et p75 ; ce qui entraîne un rétrocontrôle négatif de la fonction des macrophages et des lymphocytes T. L'étanercept inhibe ainsi la lymphotoxine- α en se liant aux molécules de TNF α (Katzung, 2006).

1.4.12.Médicament étiologique

La thérapie utilisée contre l'agent pathogène arrive à réduire le processus inflammatoire.

- Les tétracyclines sont des piègeurs des radicaux libres oxygénés et ont un pouvoir antioxydant (Griffin *et al.*, 2011).
- Les antibiotiques macrolides ont la capacité d'inhiber la production de l'interleukine 6 (IL6) et la biosynthèse des prostaglandines (PGE 2) (Vesna *et al.*, 2011).
- La chloroquine et l'hydroxychloroquine utilisés dans le traitement du paludisme ont une action anti-inflammatoire dans la polyarthrite rhumatoïde (Katzung, 2006).

1.4.13.Effets secondaires indésirables des anti-inflammatoires

1.4.13.1.Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

L'inhibition de la biosynthèse des prostaglandines par les AINS entraîne des effets indésirables qui sont essentiellement gastro-intestinaux et rénaux. Les effets indésirables des AINS sont généralement plus observés sur un traitement au long cours et/ou chez des patients à risque.

- Effets gastro-intestinaux : les effets indésirables gastro-intestinaux des AINS non-sélectifs de la COX constituent la principale cause. Ces effets qui sont dose-dépendants sont à prédominance gastrique et comportent des douleurs, des brûlures et des nausées. Les effets indésirables des AINS dépendent de l'inhibition des isoenzymes COX 1 et COX 2. Les AINS inhibiteurs de la COX 1 provoquent les dommages digestifs (ulcères gastroduodénaux, sténose, perforation) car la COX 1 est constitutive et physiologique. Cependant les inhibiteurs sélectifs de la COX 2 (inductible) présentent moins d'effets indésirables digestifs comparativement aux AINS non-sélectifs. La longue durée du traitement et la forte dose sont des facteurs favorisant la survenue de la sténose (Figure 1- 10) (Muster, 2005 ; Martin, 2001).

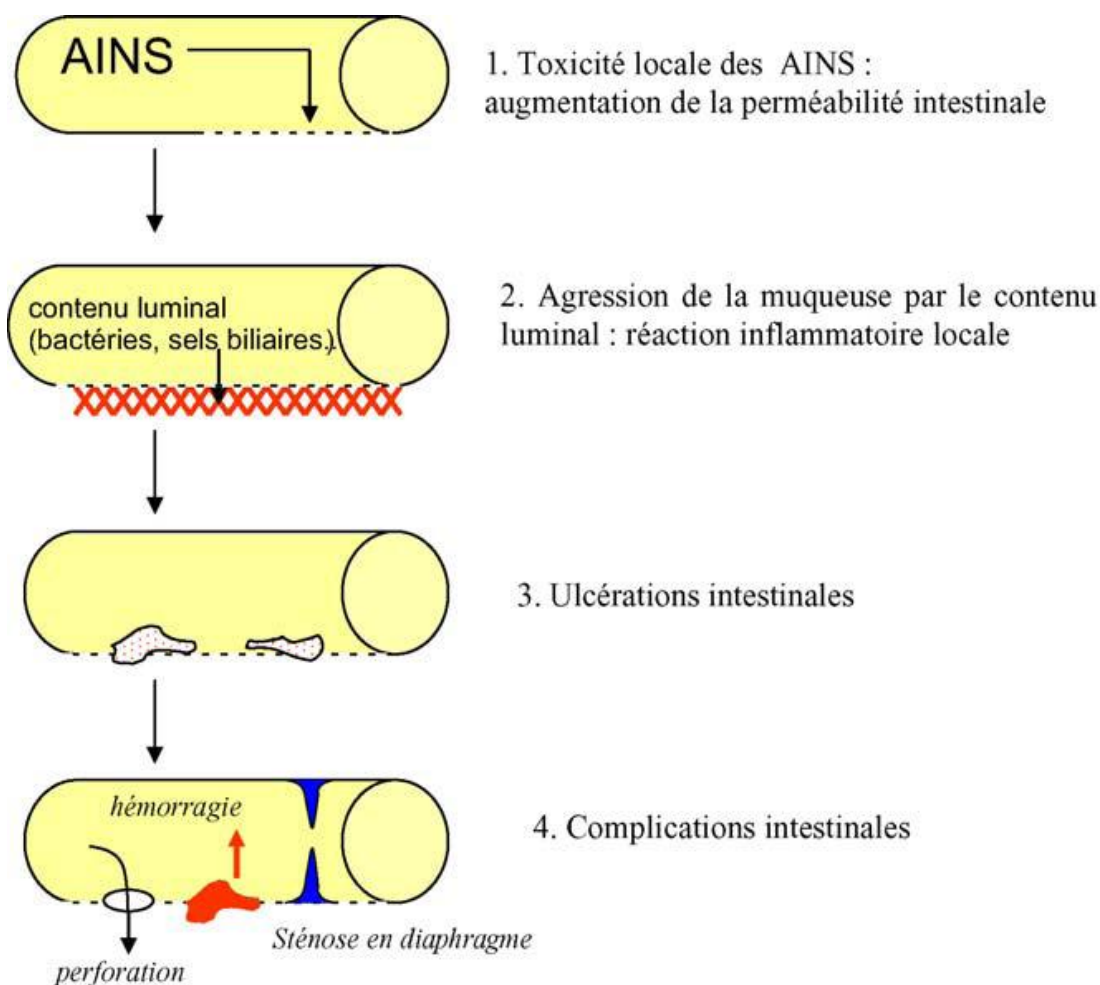


Figure 1- 10 : pathogénie des lésions intestinales induites par les AINS (Thiéfin et Beaugerie , 2005)

- Effets rénaux : les principales prostaglandines présentes dans le rein sont PGE₂, PGD₂, PGF₂ et PGI₂. Elles interviennent dans la régulation de la microcirculation, le transport tubulaire hydrosodique, le débit de filtration glomérulaire et la sécrétion de rénine. Ainsi comme la COX 2 est constitutivement active dans le rein, les doses recommandées des inhibiteurs sélectifs de COX 2 causent des toxicités rénales (insuffisance rénale aiguë, rétention hydrosodée) similaires aux AINS classiques.
- Agrégation plaquettaire : les AINS inhibent la COX plaquettaire. Cette inhibition de la biosynthèse des thromboxanes (agent agrégant plaquettaire) est responsable de l'allongement du temps de saignement. Les inhibiteurs sélectifs de la COX 2 n'affectent pas l'agrégation plaquettaire (Muster, 2005 ; Martin, 2001 ; Thiéfin et Beaugerie, 2005)
- Autres effets : les AINS induisent des effets hépatites (augmentation des transaminases), pseudo-asthmatiques (broncho-constriction, crises d'asthme) et

l'hypertension. Les inhibiteurs de la COX 2 induisent des événements cardiovasculaires thrombotiques. Le risque de toxidermie est observé avec la phénylbutazone et les oxicams.

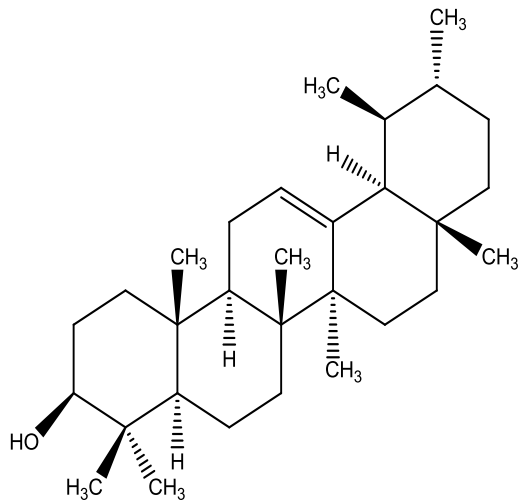
1.4.13.2. Les anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens qui sont essentiellement les glucocorticoïdes induisent des effets indésirables. La corticothérapie provoque à long terme une fœtotoxicité, un ulcère gastroduodéal, des hémorragies et une pancréatite aiguë (chez l'enfant). La corticothérapie est à l'origine des troubles métaboliques (rétention hydrosodée, augmentation du catabolisme protéique), des troubles endocriniens (atrophie corticosurrénale secondaire) et entraîne une complication infectieuse secondaire due à son effet immunosuppresseur (Muster, 2005 ; Faure, 2009). Ils bloquent la synthèse de la mélanine ce qui entraîne une dépigmentation des patients soumis à une longue corticothérapie.

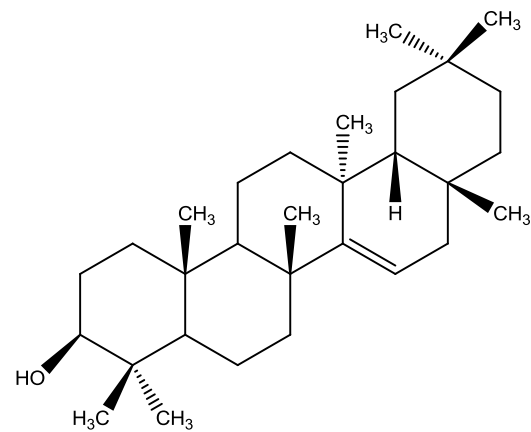
1.4.14. Métabolites secondaires à propriétés anti-inflammatoires : triterpènes et flavonoïdes

1.4.14.1. Les triterpènes

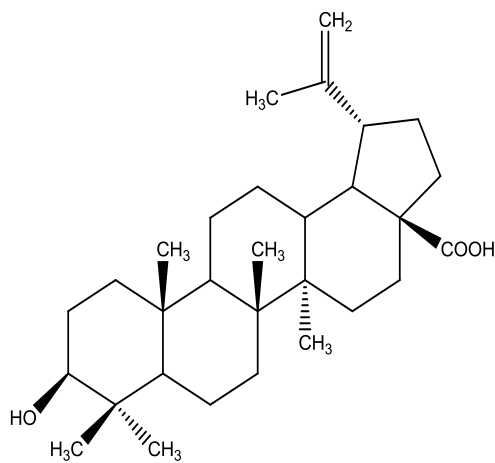
Les triterpénoïdes sont des oligomères de l'isopentényl pyrophosphaste, lui-même impliqué dans la biogénèse du squalène. Les dérivés du squalène constituent un large groupe de molécules en C₃₀, plus ou moins oxygénés. La cyclisation du squalène conduit, en effet, à la biogénèse de différentes classes de triterpènes : les mono-, di-, tri-, tetra- ou pentacycliques. Les triterpénoïdes et leurs différentes formes (esters, éthers, glycosides) sont des métabolites secondaires ubiquitaires dans la flore et les faunes terrestres et marines (Yadav *et al.*, 2010).



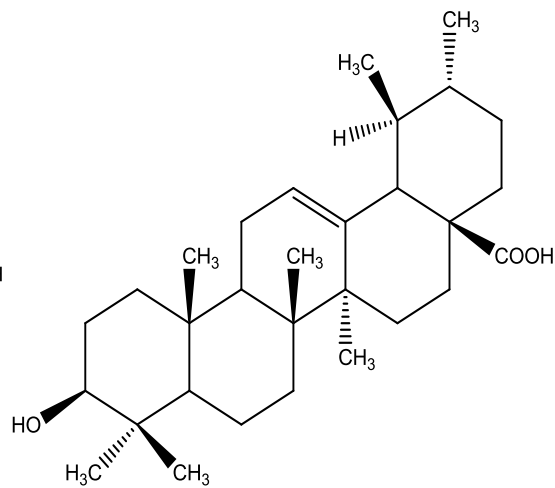
(61) α -amyrine



(62) taraxérol



(63) acide bétulinique



(64) acide ursolique

Quelques molécules triterpéniques parmi les plus connues

- *Propriétés anti-inflammatoires des triterpènes*

Les triterpènes sont constitutifs et induisent une réponse défensive à toute agression biologique et environnementale contre la plante. Plusieurs triterpènes issus de sources végétales jouent un rôle important dans la réduction de l'inflammation. En effet, le lupeol, la diosgénine, l'acide asiatique, l'avicine, l'acide madécassique, l'acide ursolique, la bétuline, l'oléandrine inhibent l'activité du natural factor – kappaB (NF- κ B) qui joue un rôle majeur dans le processus inflammatoire et la cancérisation des cellules (Yadav *et al.*, 2010). L'activité anti-inflammatoire du taraxastérol, du moreténol et du neulupanol a été rapportée par Mahato et Sen (1997). Le lupéol (200 mg/kg), administré oralement possède un effet anti-

inflammatoire comparable à celui de l'acide acétylsalicylique (100 mg/kg), cependant il n'a aucun effet analgésique ou antipyrétique (Patocka, 2003). La production de TNF α , de IL 6 et de monoxyde d'azote induite par LPS chez les macrophages RAW264.7 a été réduite par l'acide oléanolique, l'acide 3-O-acétyl-ursolique et l'acide tormentique isolés de *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai (Zhang *et al.*, 2010).

Les saponosides ou saponines sont constitués structurellement d'une génine triterpénique ou stéroïdique liée à un ou plusieurs sucres. Le nom saponoside vient du mot latin *sapo* signifiant savon en raison de leurs propriétés de former des mousses en présence d'eau. Les saponosides exercent plusieurs activités pharmacologiques telles qu'antimicrobienne, anti-inflammatoire, anti-tumorale et antiparasitaire (Gauthier, 2008). En effet, les saponosides triterpéniques (β -D-glucopyranosyl-2 α -3 β -6 β -trihydroxy-2,3-galloyloléan-12-èn-28-oate ; arjunglucoside ; combreglucoside) et les triterpènes pentacycliques (combrégénine, arjungénine,) isolés des écorces de tronc de *Combretum molle* R.Br ex G. Don (Combretaceae) ont réduit l'œdème induit par la carragénine (Ponou *et al.*, 2008). Les saponines, ilwensisaponine A isolé des fleurs de *Verbascum lasianthium* et les balanines B1 et B2, isolés de *Balanites aegyptiaca* L. Delile (Zygophyllaceae), ont également inhibé l'œdème induit par la carragénine (Kupeli *et al.*, 2007 ; Speroni *et al.*, 2005).

Le sitostérol, le stigmastérol et les saponines (sitostérol-3-glucopyranoside, diosgénin-3-glucopyranosyl-1-glucopyranoside et diosgénin-3-rhamnosyl-1-glucopyranoside), isolés des rhizomes de *Dioscorea membranacea* Pierre (Dioscoreaceae), ont réduit la production de NO dans une culture de macrophage RAW264.7 (Tewtrakul et Itharat, 2007). Le sitostérol et le stigmastérol sont également utilisés dans l'industrie pharmaceutique dans la fabrication des drogues contraceptives et anti-inflammatoires (Bruneton, 2009).

1.4.14.2. Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde vient du mot latin *flavus* qui signifie jaune. Les flavonoïdes constituent une importante classe de composés naturels polyphénoliques qui a récemment fait l'objet de considérables intérêts scientifique et thérapeutique. Les flavonoïdes sont responsables, entre autres, de la pigmentation des fruits, feuilles et fleurs des plantes et assurent la protection des plantes vis-à-vis des rayons ultra-violets (Morel, 2009). Les flavonoïdes ont une structure commune de type diphenylpropanique (C₆-C₃-C₆). Le cycle A, formé à partir d'une molécule de résorcinol ou de phloroglucinol provient de la voie des acétates. Le cycle B provient de la voie du shikimate (Ross et Kasum, 2002). Le premier intermédiaire formé dans cette voie de

biosynthèse est la chalcone et les autres flavonoïdes dérivent de celle-ci par plusieurs voies. La chalcone est formée par condensation, catalysée par la chalcone-synthétase, de trois molécules de malonyl-CoA avec d'un acide hydroxycinnamique. Plusieurs modification des flavonoïdes peuvent se produire à des stades divers résultant en l'hydroxylation, la méthylation ou la prénylation des groupes hydroxyle (OH), la dimérisation ou encore la glycosylation (pour donner des flavonoïdes O- ou C-glycosides) (Bruneton, 2009 ; Markham, 1982).

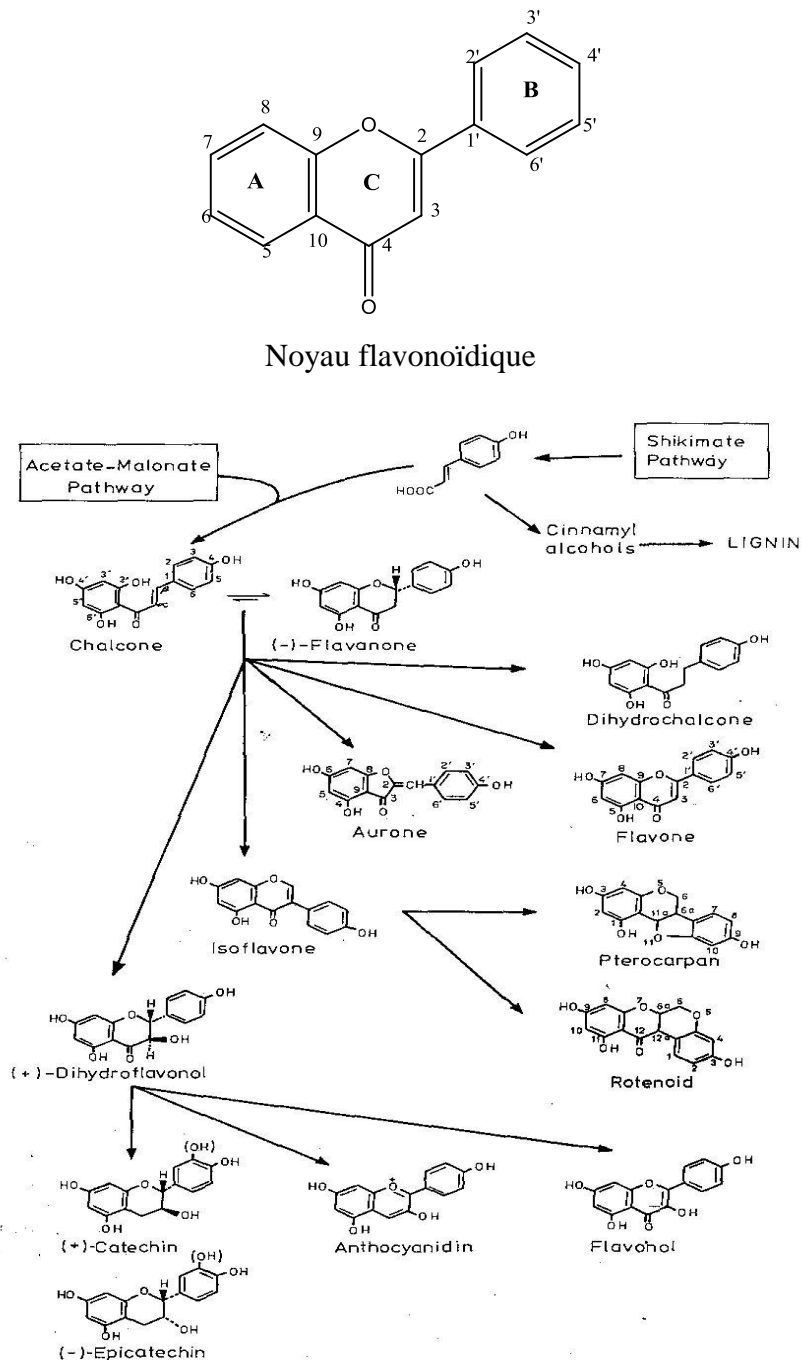


Figure 1- 11: Inter-relations entre les différents types de flavonoïdes (Markham, 1982)

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs groupes basés sur la présence ou non du cycle C, le degré d'insaturation et l'oxydation du cycle C ; on compte ainsi les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanols, les chalcones, les anthocyanidines, les auronones et les isoflavonoïdes. Plus de 6000 flavonoïdes ont été identifiés, ce large nombre est dû à la combinaison possible entre les différents types d'aglycone et les différents sucres qui peuvent y être reliés.

- *Propriétés anti-inflammatoires des flavonoïdes*

Les flavonoïdes sont connus pour leurs diverses activités biologiques et pharmacologiques notamment anti-tumorale, anti-inflammatoire, antivirale, antimicrobienne, immunomodulatrice et anti-thrombotique. Plusieurs études pharmacologiques *in vitro* ou *in vivo* ont montré les effets anti-inflammatoires des flavonoïdes à travers des tests menés sur les animaux (souris, rats), les enzymes pro-inflammatoires (COX 1, COX 2 et LOX), les cultures cellulaires et également leurs propriétés antioxydantes. En effet, une étude menée par Chi *et al.* (2001) a révélé l'effet inhibiteur des cyclo-oxygénases (COX 1 et 2) et des lipoxigénases (5- et 12-lipoxigénases) pour la kuraridine, la quercétine, la kuwanone, la sophoraflavanone D, la kurarinone, la sanggenone D, la psoralidine.

Les flavonoïdes pourraient réguler les activités cellulaires de l'inflammation (mastocytes, macrophages, lymphocytes, neutrophiles). En effet, une étude menée sur la réaction inflammatoire allergique *via* les mastocytes a permis de constater que la quercétine, la rutine, le kaempferol, la myricétine et la fisétine inhibaient la sécrétion d'histamine (Akroum, 2011). La wogonine, la baicaléine et la baicaline isolées de *Scutellaria baicalensis* Georgi. ont montré une activité anti-inflammatoire sur plusieurs modèles animaux. L'administration orale de l'apigénine, du kaempferol et de la quercétine et leurs hétérosides respectifs ont présenté le même effet anti-inflammatoire sur l'œdème induit par l'huile de croton et l'acide arachidonique (Kim *et al.*, 2004). Ces mêmes auteurs ont rapporté que les flavanones, les flavones et les flavonols sont plus efficaces que les chalcones sur le modèle animal à la carragénine. L'investigation de Toker *et al.* (2004) a montré que le kaempferol-3,7-*O*- α -dirhamnoside et la quercétine-3,7-*O*- α -dirhamnoside isolés de *Tilia argentea* Desf. (Tiliaceae) ont donné des effets analgésique et anti-inflammatoire sur le modèle animal (carragénine et acide acétique).

L'effet anti-inflammatoire des flavonoïdes a été prouvé par des mécanismes cellulaires *in vitro*. En effet, la quercétine a inhibé la production des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL 1 β) et le monoxyde d'azote induite par LPS sur une culture cellulaire de macrophages. La quercétine et le kaempferol ont inhibé la production de NO et l'expression de iNOS sur des cultures cellulaires RAW264.7 et J774.2 stimulées par LPS (Gallego *et al.*, 2007). Hougee *et al.* (2005) ont montré que les flavones (lutéoline, chrysin et apigénine) ont inhibé plus la production de TNF α , IL 1 β et IL 6 que les flavonols (quercétine, kaempferol et morine).

- *Biodisponibilité des flavonoïdes*

L'absorption, le métabolisme, la distribution et l'élimination des composés phytochimiques constituent un processus complexe impliquant une variété de modifications structurales dans plusieurs tissus et cellules. La biodisponibilité d'une substance est définie comme la fraction de la substance inchangée atteignant la circulation générale ou l'organe cible après administration (Katzung, 2006 ; Haddad, 2008).

Après l'administration orale, la majorité des composés phytochimiques subissent des actions enzymatiques et microbiennes de la flore intestinale avant leur absorption. Les aglycones flavonoïdiques sont absorbés au niveau de l'intestin grêle, alors que les hétérosides de flavonoïdes, avant d'être absorbés, doivent subir une hydrolyse enzymatique ou bactérienne afin de se libérer de la partie osidique. Les sites importants du métabolisme des flavonoïdes sont la lumière gastro-intestinale, les cellules de la paroi intestinale et le foie. L'absorption n'est pas complète et la partie non absorbée sera éliminée (Erlund , 2002). La cinétique d'absorption dépend de la complexité de l'extrait. En effet, Hollman et Katan (1997) ont montré que 52 % des hétérosides de la quercétine de l'oignon sont absorbés contre 17 % de rutine pure ou d'un mélange d'hétérosides de la quercétine de la pomme. Manach *et al.* (2004) ont rapporté que la concentration plasmatique est de 0.3 – 0.75 $\mu\text{mol/L}$ après la consommation de 50–100 mg équivalent de quercétine, de catéchine ou épicatechine provenant de pommes ou d'oignons.

Au cours de l'absorption les substances subissent des réactions de biotransformation. Ces réactions impliquent la glucuroconjugaison, la méthylation et la sulfatation. La biotransformation des flavonoïdes améliorent leur solubilité afin de les excréter. Des investigations ont permis de mettre en évidence les propriétés pharmacologiques des métabolites et de la molécule correspondante. En effet, la quercétine et ses métabolites (3'-*O*-méthylquercétine, quercétine-3'-*O*-sulfate, quercétine-3'-*O*-glucuronide et 3'-*O*-

méthylquercétine-3-*O*-glucuronide) ont un effet inhibiteur de la formation de prostaglandines (PGE 2), de leucotriènes (LTB4), de l'oxydation des lipoprotéines et une activité antioxydante; et à la concentration physiologique (~2 µM) les métabolites sont moins actifs comparativement à la quercétine (Loke et *al.*, 2008). Cependant les études menées par Shirai et *al.*, (2002) sur une culture cellulaire 3T3 prétraitée avec la quercétine et son métabolite quercétine 3-*O*-glucuronide, ont montré que le quercétine 3-*O*-glucuronide a été plus efficace sur l'inhibition des radicaux libres oxygénés induits par H₂O₂ que la quercétine, elle même.

Après administration orale, les proanthocyanidines et les tanins sont métabolisés en acide phénolique, catéchine ou d'épicatchine en majorité par la flore microbienne du colon avant d'être absorbés. Ces unités de polyphénols traversent la barrière intestinale et arrivent au niveau du foie où ils vont subir des réactions de biotransformation pour donner des formes conjuguées. En effet, des études ont montré que la concentration plasmatique des métabolites des flavanols est plus élevée que celle de la molécule parente (Manach et *al.*, 2005 ; Aron et Kennedy, 2008).

1.5 Antioxydants

1.5.1.Définition

L'antioxydant est défini comme étant toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de retarder ou d'inhiber de manière significative l'oxydation du substrat (Niki, 2010). L'oxydation du substrat est causée par des radicaux libres générés dans l'organisme dans des conditions physiologiques (métabolisme cellulaire normal de l'oxygène) ou physiopathologiques (inflammation). Les antioxydants peuvent être soit des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, soit des protéines, soit des petites molécules hydro ou liposolubles.

1.5.2.Radicaux libres

Un radical libre est défini comme étant un atome ou une molécule possédant un ou des électrons non appariés. Les radicaux libres générés dans l'organisme sont généralement les radicaux libres oxygénés (RLO) à savoir l'anion superoxyde (O₂^{•-}), le radical hydroxyle (HO[•]), le radical perhydroxyle (HO₂[•]), les radicaux peroxyde (ROO[•]), et les non RLO tels que le monoxyde d'azote (NO) et le peroxyde d'azote (ONOO[•]). Les RLO engendrent aussi des molécules non radicalaires mais très réactives comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ ou eau

oxygénée) et l'acide hypochloreux (HOCl) (Cuzzocrea *et al.*, 2001 ; Russo-Marie *et al.*, 1998).

1.5.3.Sources de production des RLO

On distingue essentiellement deux sources de production des radicaux libres :

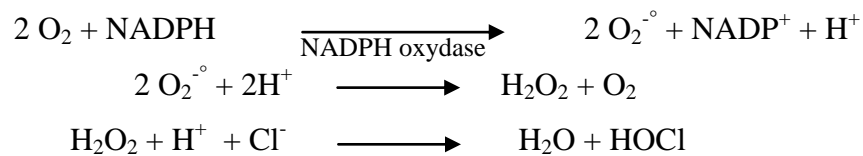
1.5.3.1.Source exogène

L'exposition au tabac, aux herbicides, aux gaz tels que l'ozone, le dioxyde nitreux, aux gaz et microparticules (< 10 µm) des échappements des véhicules, aux radiations UV et aux autres polluants environnementaux constitue une source de production des radicaux libres (Govindarajan *et al.* ;2005).

1.5.3.2.Source endogène

Dans les systèmes biologiques, il existe plusieurs sources de production de radicaux libres en occurrence le système respiratoire mitochondrial, la NADPH oxydase, le monoxyde d'azote. Les radicaux libres oxygénés sont produits lors du métabolisme cellulaire normal à de faibles quantités séquestrées tandis que dans les conditions pathologiques la production des RLO s'accroît et génère des dommages cellulaires et tissulaires. Les RLO ont pour rôle essentiel de tuer les micro-organismes phagocytés ou situés dans le voisinage des phagocytes.

- *La NADPH oxydase* : elle est inactive dans les conditions normales et se trouve au niveau des membranes des neutrophiles et macrophages. Lors d'un processus inflammatoire la phagocytose déclenche l'activité enzymatique de la NADPH oxydase, qui catalyse la production de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). L'anion superoxyde induit la production du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et de l'acide hypochloreux (HOCl).



- *Le système respiratoire mitochondrial* : l'anion superoxyde est produit par la réaction de l'oxygène avec le radical semi-ubiquinone lors du transfert de l'électron dans la chaîne respiratoire.
- *Le monoxyde d'azote* : le monoxyde d'azote produit à partir d'oxygène et d'arginine, est physiologique et a un rôle majeur dans le tonus vasculaire. Les cytokines pro-

inflammatoires et les endotoxines induisent la forme inductible de NO-oxydase à produire plus de NO. Le NO réagit avec $O_2^{\cdot-}$ pour former un puissant oxydant qui est le peroxynitrite ($ONOO^{\cdot-}$), qui, à son tour se décompose en NO_2^{\cdot} et en OH^{\cdot} .

La détoxification des radicaux libres se fait par des systèmes enzymatiques et non-enzymatiques possédant un pouvoir antioxydant. Dans le cas où la détoxification est insuffisante, les radicaux libres peuvent entraîner un stress oxydatif résultant d'une sévère destruction cellulaire.

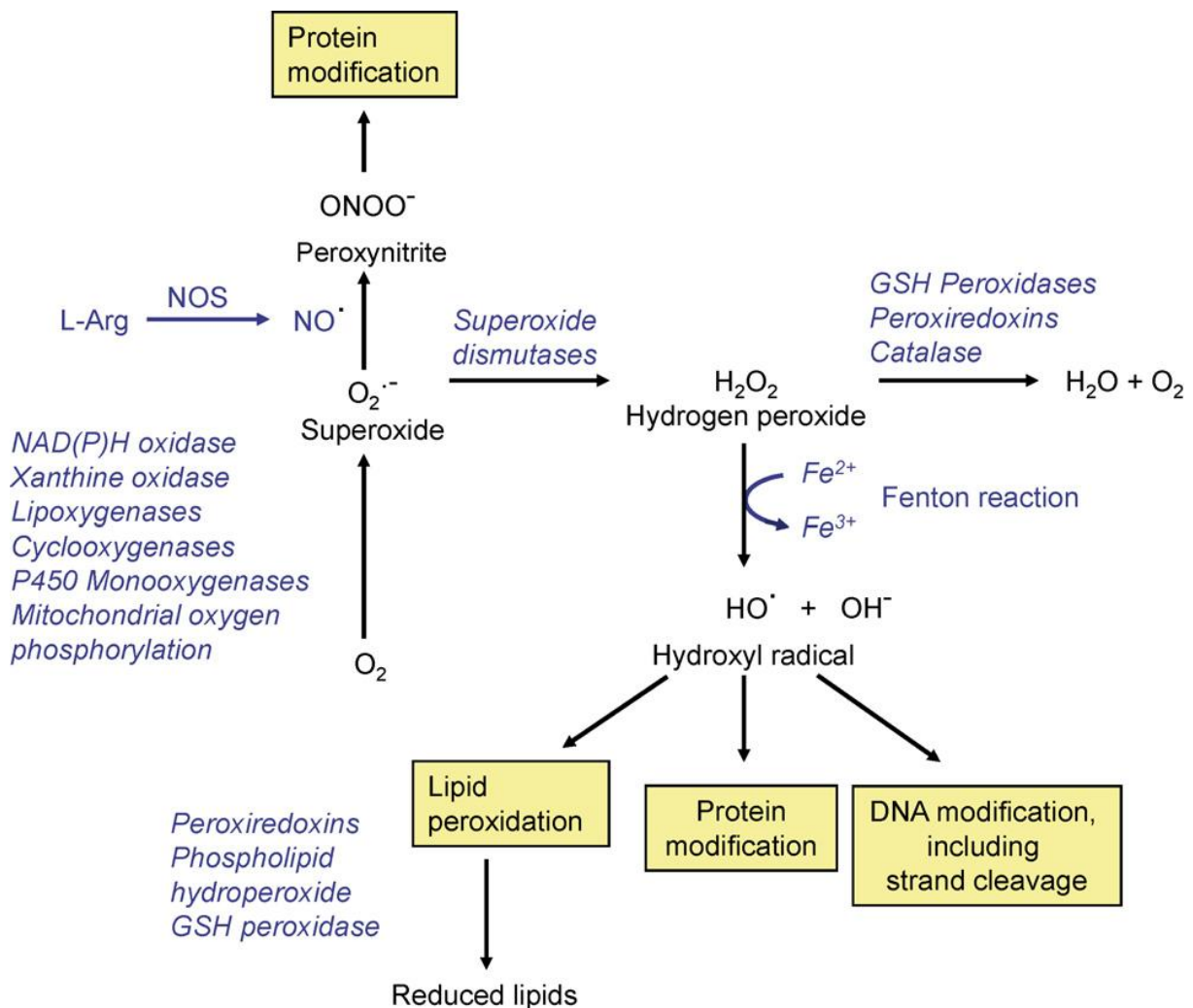


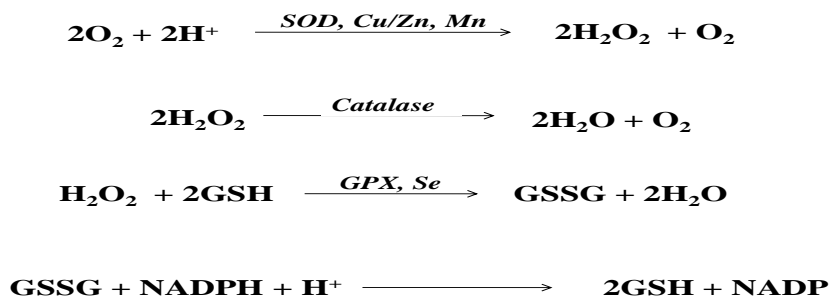
Figure 1- 12 : Production de RLO et système antioxydant enzymatique (Schäfer et Werner, 2008)

1.5.4.Mécanisme d'action

Dans les conditions physiologiques normales il y a un équilibre entre la production des radicaux libres et les mécanismes endogènes de défense antioxydante. Cette défense antioxydante est constituée du système enzymatique (la catalase, la peroxydase dismutase, glutathion peroxydase), et des vitamines (A, E et C) et les polyphénols apportés par l'alimentation.

1.5.4.1.Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques sont constitués essentiellement de la catalase, la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase. Toutes les cellules phagocytaires possèdent des cuivre-zinc (Cu-Zn) superoxyde dismutase qui convertit l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est dismuté en oxygène et en eau par la catalase ; l'anion superoxyde est transformé en eau lors d'une réaction couplée à l'oxydation de glutathion (GSH) catalysé par le glutathion peroxydase (GPX). La forme oxydée du glutathion (GSSG) est non toxique et peut être réduite en glutathion par NADPH grâce à la glutathion réductase.



1.5.4.2.Les antioxydants non enzymatiques

Vitamine E : la vitamine E est un antioxydant lipophile et un composant lipidique des membranes cellulaires. La forme d- α -tocophérol élimine les radicaux peroxydes qui se forment lors de la peroxydation lipidique. La deuxième forme de la vitamine E, l' α -tocotriénol joue le rôle de protecteur contre les radicaux libres. La vitamine E permet donc de réduire la peroxydation des lipides dans la membrane cellulaire et dans les lipoprotéines de faible densité (LDL) (Roth et Hejjel, 2003 ; Goudable et Favier, 1997).

Vitamine C : la vitamine C (acide ascorbique) est un puissant antioxydant hydrosoluble dans les conditions physiologiques, cependant à forte concentration, elle peut jouer le rôle de pro-oxydant. Elle n'est pas synthétisée par l'organisme, son apport est extérieur. Elle intervient dans la conversion du radical tocophérol en α -tocophérol (vitamine E). La vitamine C protège les vaisseaux sanguins contre les lipoprotéines de faible densité (LDL).

Caroténoïdes : les caroténoïdes sont des pigments liposolubles des plantes, ils possèdent un pouvoir antioxydant considérable contre les radicaux peroxydes. Le plus étudié des caroténoïdes est le β -carotène ou provitamine A, présent dans la carotte, l'orange et les feuilles. Le β -carotène préviendrait le cancer et réduirait le risque des pathologies cardiovasculaires (Lecerf, 2006). Le lycopène, un autre caroténoïde possède un pouvoir antioxydant et est présent dans la tomate. Le lycopène réduirait, quant à lui, le risque d'infarctus myocarde et l'athérosclérose (Menveille-Bourg, 2005).

Le Glutathion : le glutathion est un antioxydant direct intracellulaire et est un cofacteur de l'enzyme glutathion peroxydase. Son rôle essentiel est de protéger les lipides, les protéines et les acides nucléiques contre l'oxydation (Goudable et Favier, 1997).

Les oligoéléments : les oligo-éléments tels que le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le magnésium (Mn) et le sélénium (Se) sont indispensables pour l'activité antioxydante enzymatique (Zn, CuSOD, MnSOD ; SeGPX). Le zinc est un inducteur des métallothionéines, des protéines possédant une activité antioxydante (Pincemail *et al.*, 2002).

Les polyphénols : les polyphénols sont largement répandus dans le règne végétal, on en dénombre plus de 8000 structures de polyphénols. Les polyphénols regroupent les tanins, les flavonoïdes, les coumarines, les lignines, les anthocyanes, les acides phénols, les stilbénoloïdes. Le point commun structural des groupements phénoliques est la présence d'un noyau benzénique et d'au moins un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction (Bruneton, 2009). Les polyphénols sont des antioxydants apportés par l'alimentation. Les flavonoïdes, constituant un groupe important des polyphénols, sont regroupés en différentes classes structurales : les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanols, les isoflavones, les chalcones, et les anthocyanes.

L'une des propriétés biologiques la plus étudiée des flavonoïdes est leur pouvoir antioxydant et leur capacité à piéger les radicaux libres produits lors de l'anoxie, de l'inflammation et l'autoxydation lipidique (Ghedira, 2005). La configuration structurale et le nombre de groupe hydroxyl (OH) influencent l'activité antioxydante des flavonoïdes. Ainsi la position d'OH en 3 du cycle C et la double liaison en position $C_2=C_3$ sont importantes pour l'activité

antioxydante. Les flavonoïdes hétérosides ont une moindre activité antioxydante comparativement à l'aglycone correspondante.

Cependant dans certaines conditions les flavonoïdes se comportent comme des pro-oxydants. Cette activité pro-oxydante est croissante avec le nombre de groupes hydroxyles (OH) sur le cycle B dans la réaction de Fenton. En plus, l'autoxydation des flavonoïdes peut entraîner des radicaux libres appelés radicaux phenoxy. L'activité pro-oxydante est détectable à des concentrations supérieures à 25 µM (Procházková *et al.*, 2011). Les flavonoïdes inhibent les enzymes impliquées dans le processus inflammatoire : xanthine oxydase, cyclo-oxygénases, lipoxygénase.

1.5.5. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif, conséquence naturelle du métabolisme de l'oxygène, est normalement contrôlé par des systèmes de défense antioxydante endogènes qui sont de deux types : le système enzymatique et le système non enzymatique. Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants en faveur des oxydants (radicaux libres) (Katalinic *et al.*, 2004). Cette situation peut être due à un dysfonctionnement du système respiratoire mitochondrial, d'une activation du système enzymatique (xanthine oxydase, NADPH oxydase, glucose oxydase, monoamine oxydase) et une alimentation pauvre en micronutriments antioxydants (Pincemail *et al.*, 2002). Le stress oxydatif est un facteur potentialisant l'apparition de plusieurs maladies métaboliques (l'athérosclérose, l'asthme, le diabète...)

1.5.6. Maladies liées au stress oxydatif

- **L'athérosclérose** : c'est une maladie artérielle qui est caractérisée sur le plan anatomique par un épaississement de l'intima avec présence de dépôts lipidiques. Cependant elle reste une pathologie complexe dont le mécanisme moléculaire contribuant à sa pathogénèse n'est pas complètement défini. L'athérosclérose est une maladie multifactorielle due à une oxydation lipidique et une inflammation. L'infiltration monocytaire, les dépôts lipidiques et la prolifération des cellules musculaires lisses pourraient être stimulés par l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL). Les LDL oxydés jouent un rôle crucial dans la pathogénèse de l'athérosclérose. Les LDL, d'abord faiblement oxydées, subissent une oxydation plus poussée grâce à des mécanismes multiples faisant intervenir l'action des radicaux libres oxygénés et impliquant l'activité de la NADPH oxydase qui stimule également la production des RLO (Bonnetfont-Rousselot *et al.*, 2002 ; Cipollone *et al.*, 2008)

-Le diabète : les diabètes de type I et II sont associés à de nombreuses perturbations du statut des microéléments. La concentration des oligoéléments (Cu, Zn) et les vitamines (E, C) sont en baisse chez les patients diabétiques. L'hyperglycémie accroît l'activité des mitochondries conduisant ainsi à la formation des radicaux libres (superoxyde, peroxyde). La vitamine C, seule, n'arrive pas à améliorer les complications diabétiques, par contre combinée à la vitamine E et autres antioxydants, le stress oxydatif est réduit (James, 2008 ; Mette, 1997).

- L'asthme : l'asthme est une pathologie chronique obstructive des voies respiratoires, qui est cliniquement caractérisée par une inflammation et une obstruction des voies aériennes. Des études menées sur les cellules issues du fluide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) produisent plus de radicaux libres oxygénés après exposition à un allergène. L'anion superoxyde produit par les cellules LBA est responsable de l'aggravation nocturne des symptômes respiratoires chez les sujets asthmatiques. L'activité de la Cu, Zn-SOD dans les cellules épithéliales bronchiques est réduite chez les patients asthmatiques (Reimund, 2002).

Ce chapitre a permis dans un premier temps d'apporter des informations sur la famille Fabaceae, le genre *Pterocarpus* et l'espèce *P. erinaceus* ; et dans un second temps de définir l'inflammation, de décrire le processus inflammatoire et de donner des exemples de pathologies à composante inflammatoire. L'utilisation de *P. erinaceus* contre l'inflammation a été mise en évidence sur des modèles expérimentaux avec l'appui de l'étude phytochimique afin de caractériser et d'identifier les composés chimiques qui seraient responsables de l'effet pharmacologique.

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

2.1. Matériels d'étude phytochimique

2.1.1. Méthodes chromatographiques

2.1.1.1. Chromatographie analytique

Chromatographie sur couche mince (CCM): les plaques CCM analytiques ont été utilisées à chaque niveau de nos travaux afin de vérifier le profil des fractions et des extraits mais aussi la pureté des composés isolés. Les différents types de CCM analytique utilisés sont :

Les plaques CCM Gel de silice 60 F₂₅₄, Merck (20 x 20 cm) sur support aluminium

Les plaques CCM phase inverse RP-18, Merck (20 x 20 cm) sur support aluminium

Les plaques CCM de polyamide 11F254, Merck, sur support aluminium

Le profil des CCM analytique est observé à la lumière visible ou à l'UV (254 et 366 nm) avant et après pulvérisation d'un réactif. Les principaux réactifs utilisés pour observer les différentes tâches sur les plaques CCM sont :

La vanilline sulfurique : elle est utilisée pour caractériser essentiellement les composés triterpéniques et stéroïdiques. Elle est constituée d'un mélange solution A et d'une solution B. La préparation des solutions est la suivante :

Solution A : 6 mL de H₂SO₄ dans 100 mL d'éthanol 96 %

Solution B : 6 g de vanilline dans 100 mL d'éthanol 96 %

Le mélange à volume égal des deux solutions est utilisé pour pulvériser les plaques CCM analytiques.

Le DBA : 1 g de diphenylborate d'aminoéthanol dans 100 mL de méthanol plus 5 mL de PEG 400 (polyéthylèneglycol). Ce réactif est généralement utilisé pour la caractérisation des flavonoïdes.

2.1.1.2. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP) : l'appareil utilisé est de marque Thermo Separation Products (TSP) avec un détecteur à barrette de diode UV6000LP. Cette chromatographie est utilisée pour analyser les extraits et fractions avant de les fractionner.

2.1.1.3. Chromatographie préparative

Chromatographie sur colonne ouverte : elle est utilisée pour le fractionnement des différents extraits et fractions. La hauteur et le diamètre des colonnes sont choisis en fonctions de la quantité d'échantillon dont on dispose. Les éluants sont utilisés également en fonction de

l'allure de l'extrait sur la CCM analytique. Les différentes phases stationnaires en poudre utilisées sont :

Gel de silice 60 (40 – 63 μm) (Merck)

Silice RP-18 (40 – 63 μm) (Merck)

Sephadex LH – 20 (Merck)

2.1.1.4.Extraction en phase solide (SPE : solid phase extraction) : cette technique chromatographique permet de fractionner des échantillons en petite quantité sous une pression faible. Des cartouches contenant ces différentes phases stationnaires citées ci-dessus sont utilisées pour le fractionnement.

Chromatographie sur couche mince préparative (CCM prep.) : on se sert de cette technique pour purifier une fraction. La préparation se fait sur des plaques en verre (20 x 20 cm). Deux phases stationnaires ont été utilisées :

45 g de CCM silice (Gel de silice 60 GF254) dans 120 mL d'éthanol 96 %

17g de CCM Polyamide (M N – Polyamide – DC6) dans 80 mL d'éthanol 96 %

2.1.1.5.Chromatographie liquide sous vide (CLV ou VLC : vacum liquid chromatography) : elle est utilisée pour un fractionnement grossier avec différentes phases stationnaires. Cette technique a comme avantage une économie de solvants.

2.1.1.6.Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC : medium pressure liquid chromatography) : elle sert à fractionner un échantillon à l'aide d'une colonne et d'une pompe Büchi. Pour fractionner un extrait on utilise une pré-colonne dans la quelle se trouve l'échantillon adsorbé sur une petite quantité de phase stationnaire, cette pré-colonne est reliée à une colonne remplie de la phase stationnaire.

2.1.2.Méthodes physicochimiques

2.1.2.1.Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire d'un composé a été mesuré à l'aide d'un Polarimètre PERKIN-ELMER 241 (Lampe Na et Hg). La longueur de la cuve est de 1 dm et l'échantillon est dans le méthanol à une température de 25°C. Le pouvoir rotatoire se calcule en utilisant cette formule :

$$[\alpha] = (\alpha_{\text{lu}} \times 1000) / (C \times l) ; (C \text{ en g/100 mL} ; l \text{ en dm})$$

2.1.2.2. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les appareils Bruker AvanceIII 500, Bruker DRX 400 et Bruker DRX 300 ont permis d'effectuer l'enregistrement des différents spectres RMN. Les spectres RMN ^1H ont été enregistrés à 300 et 400 MHz et ceux de RMN ^{13}C à 75 et 300 MHz. Les solvants utilisés pour la solubilisation des composés sont deutérés. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm (partie par million) en prenant comme origine le tétraméthylsilane (TMS).

RMN monodimensionnel (RMN 1D) : trois méthodes ont été utilisées :

- **RMN ^1H :** est utilisée pour déterminer la structure d'un composé, elle fournit des informations sur les différents types de protons que possèdent les composés.
- **RMN ^{13}C :** apporte plus d'information sur la structure d'un composé en fournissant le nombre de carbones présents dans le composé.
- **RMN ^{13}C (DEPT) :** permet de mettre en évidence les carbones primaires (CH), secondaires (CH₂) et tertiaires (CH₃), présents dans une molécule.

RMN bidimensionnel (RMN 2D) : trois méthodes sont utilisées

- **Corrélation homonucléaire**

COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) : elle fournit des informations sur les couplages homonucléaires 2J et 3J entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents.

- **Corrélation hétéronucléaire**

HSQC ($^1\text{J}_{\text{H-C}}$) : fournit des informations sur les couplages chimiques entre les carbones et protons directement liés.

HBMC ($^2\text{J}_{\text{H-C}}$, $^3\text{J}_{\text{H-C}}$) : permet de détecter les couplages chimiques à longue distance

2.2. Matériels d'étude biologique

2.2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des écorces de tronc, des feuilles et des écorces des racines de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae).

2.2.2. Animaux de laboratoire

Des souris males et femelles de race NMRI pesant entre 24 et 35 grammes ont été utilisées lors de nos études. Ces animaux ont été fournis par l'animalerie du département Médecine, Pharmacopée Traditionnelle et Pharmacie (MEPHATRA/PH) et celle du Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES) de Bobo Dioulasso. Les animaux provenant de l'animalerie du CIRDES sont tabulés dans l'animalerie

du département Médecine, Pharmacopée Traditionnelle et Pharmacie (MEPHATRA/PH) à la température comprise entre 20-25°C et avec une humidité de 75% pendant deux semaines avant le début de l'expérience. Ils sont alimentés avec des granulés composés de poudres de maïs et de poisson à 29% de protéines et ont un accès libre à l'eau courante. La photopériode était de 12h/24h ; elles ont été soumises à l'éclairage nocturne et à l'obscurité diurne pour tenir compte de leur cycle activité/repos inversé par rapport à celui de l'homme.

2.2.3. Matériels techniques pour les tests biologiques

- Plétysmomètre du type UGO BASILE 7141, Italy, a servi pour la mesure de l'œdème au cours du test anti-œdémateux à la carragénine.
- Le spectrophotomètre Multiskan Ex (Thermo Electron Corporation) est utilisé pour la lecture des plaques.
- Un thermomètre électronique digital de type Physitemp Thermalert ModelTH-8 Temperature Monitor, est utilisé pour la prise de température rectale des animaux.
- Une balance pèse-souris de marque Berkel type E

2.2.4. Matériels divers

- seringues 1 cc, microseringues (10, 25, 50 µL)
- pipettes, micropipettes,
- plaques de 96 puits
- la verrerie : béchers, erlenmeyers etc ...

2.2.5. Substances pharmacologiques

- La levure de bière (*Saccharomyces cerevisiae*) (Arkopharma) est utilisée pour le test antipyrétique.
- La carragénine (Sigma), l'acide acétique (Sigma) et le formaldéhyde (Sigma) sont utilisés respectivement pour les tests de l'activité anti-inflammatoire et analgésique.
- L'huile de croton (Sigma), utilisé pour le test anti-inflammatoire locale sur l'oreille des souris.
- La ketamine hydrochloride (Rotexmedica, Trittau, Germany), utilisée comme anesthésique lors du test anti-inflammatoire local.

- Le paracétamol (Sigma), l'hydrocortisone (Sigma), l'acide acétylsalicylique (Sigma) et la phénylbutazone (Sigma) sont tous des produits de référence utilisés lors des tests *in vivo*.
- le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), pour le test antioxydant DPPH
- Le chlorure de cuivre II (CuCl₂) (Sigma), la néocuproïne (2,9-diméthyl-1,10-phenanthroline) (Sigma) et le tampon ammonium acétate (NH₄Ac) (Prolabo) sont utilisés pour le test antioxydant CUPRAC
- Le sodium tetraborate (Sigma), acide borique (Sigma), acide linoléique ont été utilisés pour le test d'inhibition de la lipoxigénase.
- L'acide 2-thiobarbiturique (Sigma), le chlorure ferrique (FeCl₂) (Prolabo) et l'acide trichloro-acétique (Prolabo) utilisés pour le test d'inhibition de la peroxydation lipidique.
- l'eau physiologique (0,9 % NaCl) ; l'eau distillée et le méthanol.
- La solution de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), la lipopolysaccharides, l'interféron gamma, le kit d'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) et réactif de Griess ont été utilisés lors des tests de détermination de TNF α et NO

2.3.Méthodes d'études phytochimiques

2.3.1.Matériel végétal

Les écorces de tronc de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae) ont été récoltées en Mars 2007 à Gourcy dans la région du nord (Burkina Faso) ; les feuilles et les écorces de racines ont été récoltées en Mars 2008. La plante a été identifiée par le Pr Adjirma Thiombiano du laboratoire d'écologie de l'Université de Ouagadougou, où un herbier a été déposé sous le numéro ON 01. Le matériel végétal a été séché à l'abri du soleil et à température ambiante sous ventilation. Après séchage, il a été broyé.

2.3.2.Extraction et fractionnement

2.3.2.1.Décoction

La décoction a été réalisée sur les trois parties (écorces de tronc, feuilles et écorces de racines) de la plante. 50 g de poudre du matériel végétal ont été portés à ébullition pendant 30 min dans un volume d'eau distillée de 500 mL. Après filtration et concentration, le décocté a été lyophilisé. Des lyophilisats ont été obtenus : 5.2, 4.7 g et 4.2g respectivement issus des écorces de tronc (DECEC), des écorces de racines (DECRA) et des feuilles (DECFE). Ces lyophilisats ont servi pour les manipulations.

2.3.2.2.Criblage phytochimique (test colorimétrique)

Les procédures décrites par Ciulei (1982) ont été utilisées pour la mise en évidence les principaux groupes chimiques des décoctés des écorces de racines (DECRA) et des feuilles (DECFE). Les flavonoïdes ont été caractérisés par le test Shibata, les tanins et les polyphénols par le test de chlorure ferrique. Le test de Liebermann-Buchard a permis de caractériser les triterpènes/stéroïdes. La caractérisation des saponosides est basée sur l'apparition des mousses après agitation des extraits.

2.3.2.3.Ecorces du tronc de *P. erinaceus*

661 g de poudre sèche des écorces de tronc de *P. erinaceus* ont successivement macéré dans le dichlorométhane (DCM) (3x2 L) puis le méthanol (MeOH) (3x2.5 L) pendant 24 heures pour chaque macération. Après filtration et évaporation sous vide, un extrait au dichlorométhane (A) (3.5 g) et un extrait méthanolique (B) (100 g) ont été obtenus. (**Figure 2-1**)

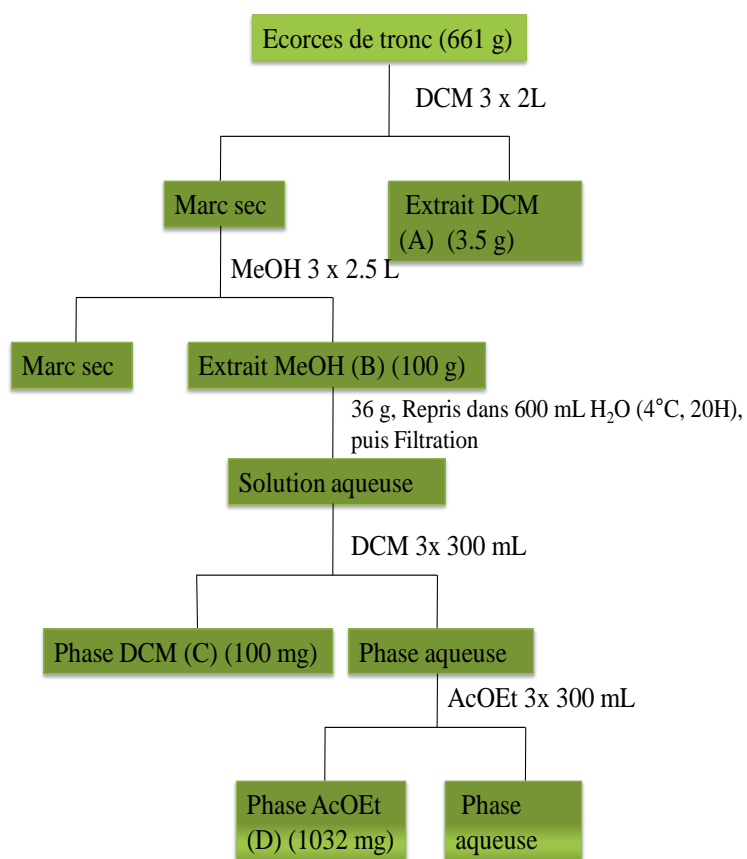


Figure 2- 1: Schéma d'extraction et de fractionnement des écorces de tronc de *P. erinaceus*

2.3.2.3.1. Fractionnement de l'extrait DCM (A)

1.5 g de l'extrait dichlorométhane a été fractionné par chromatographie sur colonne ouverte de silice (gel de silice Si 60 Merck, 40-36 μm). Le système d'éluant utilisé a été un gradient de solvant : n-hexane/DCM (50/50 à 0/100) et DCM/AcOEt (100/0 à 0/100). 13 fractions (A.1 – A.13) ont été obtenues après rassemblement selon leur profil chromatographique obtenu sur CCM analytique. La fraction A.4 a été fractionnée sur colonne de silice Si 60 en utilisant un mélange n-hexane/AcOEt (100/0 à 70/30), et a permis d'isoler le composé **PE.1** (25mg). Le composé **PE.2** (6 mg) a été isolé de la fraction A.8 par extraction sur phase solide normale (SPE), l'éluant utilisé a été hexane/AcOEt (100/0 à 70/30) (**Figure 2- 2**).

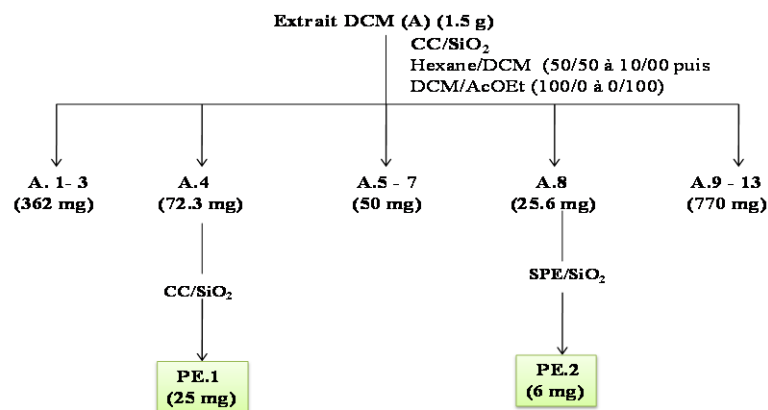


Figure 2- 2: Schéma de fractionnement d'extrait DCM (A)

2.3.2.3.2. Fractionnement de l'extrait MeOH (B)

L'extrait méthanolique (B) (36 g) a été repris dans de l'eau distillée tiède (600 mL). Après 20 h au réfrigérateur puis filtration, un résidu de tanins (12g) a été obtenu et la phase aqueuse a été soumise à des partitions liquide-liquide successives avec le DCM (3 x 300 mL) puis avec l'AcOEt (3 x 300 mL) (Figure 2- 1)

La phase AcOEt (D) a été fractionnée sur colonne d'exclusion de Sephadex LH-20 avec du MeOH. Selon le profil chromatographique obtenu par CCM analytique, huit fractions (D.1 – D.8) ont été rassemblées. Le composé **PE.3** (27 mg) a été isolé à partir de la fraction D.3 à l'aide d'une colonne ouverte de silice en utilisant un mélange n-hexane/AcOEt (60/40 à 0/100) (**Figure 2- 3**).

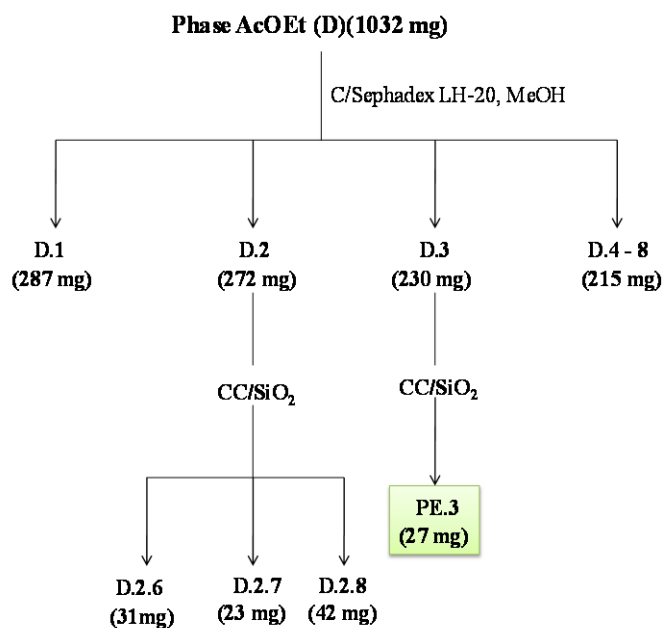


Figure 2- 3: Schéma de fractionnement de la phase AcOEt (D)

2.3.2.4.Ecorces de racines de *P.erinaceus*

750 g de poudre sèche des écorces de racines de *P. erinaceus* ont été mis successivement à macérer dans le DCM (3x3 L) puis dans le MeOH (3x3 L). 5.6 g d'extrait DCM (E) et 54.4 g d'extrait MeOH (F) ont été obtenus après filtration et évaporation des solvants. L'extrait MeOH (F) repris dans de l'eau tiède (1,2 L) a été fractionné par chromatographie de partage liquide-liquide successivement avec AcOEt (3 x 300 mL) puis BuOH (3 x 300 mL) (**Figure 2- 4**).

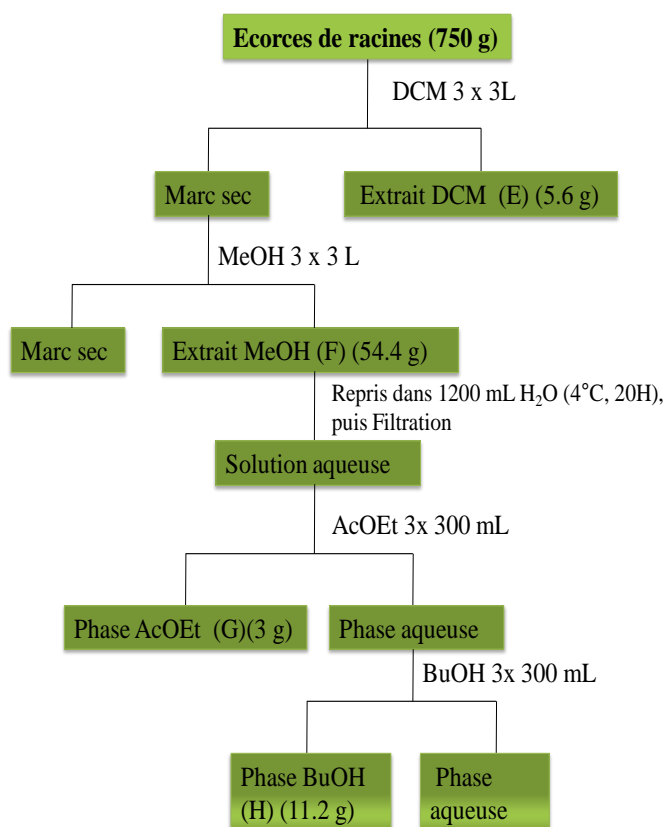


Figure 2- 4 : Schéma d'extraction et de fractionnement des écorces des racines de *P. erinaceus*

2.3.2.4.1. Fractionnement de l'extrait DCM (E)

Nous avons réalisé un premier fractionnement sur 4.2 g de l'extrait DCM (E) sur colonne ouverte de silice en utilisant comme éluant un mélange hexane/DCM (100/0 à 0/100) puis DCM/AcOEt (100/0 à 0/100). Les fractions obtenues ont été regroupées en 23 fractions (E.1 – E.23) selon leur profil chromatographique observé par CCM analytique.

La fraction E.5 a subi un fractionnement à l'aide d'une colonne SPE en phase inverse (Lichroprep RP-18, 40-60µm, Merck) et le composé **PE.4** (13.8 mg) a été isolé ; l'éluant utilisé a été MeOH/H₂O (80/20 à 0/100) puis MeOH/DCM (100/0 à 50/50) (**Figure 2- 5**).

Le composé **PE.5** (25 mg) issu de la fraction E.6, a été isolé par deux méthodes chromatographiques différentes: SPE/RP-18 avec un éluant de MeOH/H₂O (80/20 à 0/100) puis MeOH/DCM (100/0 à 50/50) et une colonne d'exclusion Sephadex LH-20 en utilisant le DCM comme éluant. Les fractions (E.8 – E.10) rassemblées ont été solubilisées dans le MeOH et dans le DCM successivement afin d'enlever les impuretés ; ce qui a permis d'isoler le composé **PE.6** (42.5 mg). La fraction E.16 a subi un fractionnement sur SPE/RP-18 avec un éluant MeOH/H₂O (70/30 à 0/100) puis MeOH/DCM (100/0 à 70/30) et la fraction E.16.10

obtenue a été traitée sur colonne ouverte de silice en utilisant un gradient hexane/AcOEt (100/0 à 40/60).Le composé **PE.7** (2.6 mg) a été ainsi obtenu (**Figure 2- 5**).

La fraction E.19 a été fractionnée par SPE/RP18 en utilisant comme éluant : MeOH/H₂O (70/30 à 0/100) puis MeOH/DCM (100/0 à 0/100). 18 fractions (E.19.1 – E.19.18) et le composé **PE.8** (17,7 mg) ont été obtenus. Le composé **PE.9** (14 mg), issu de la sous-fraction E.19.19 a été purifié à l'aide d'une colonne de Sephadex LH-20 en utilisant le DCM comme éluant (**Figure 2- 5**).

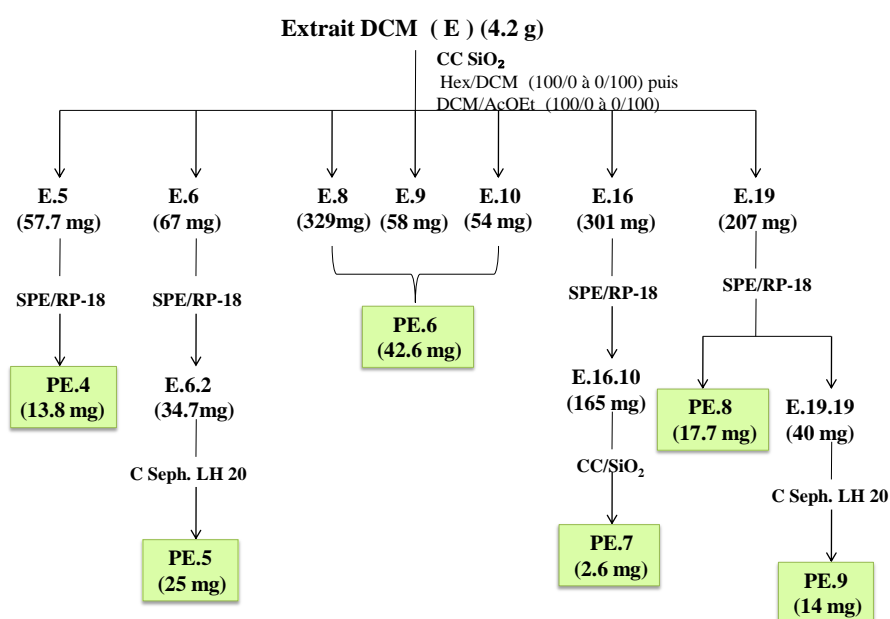


Figure 2- 5 : Schéma de fractionnement de l'extrait DCM (E)

2.3.2.4.2. Fractionnement de l'extrait MeOH (F)

L'extrait MeOH (F) a été dissout dans 1.2 L d'eau distillée puis la solution a été laissée au repos pendant 20 h à 4°C. Après filtration, la solution a été partitionnée successivement avec de l'AcOEt (3 x 300 mL) puis du BuOH saturé en eau distillée (3 x 300 mL). La phase AcOEt (G) (3 g) et la phase BuOH (H) (11.2 g) ont été obtenues. (Figure 2- 4)

2.3.2.4.3. CLHP Analytique

L'extrait MeOH (F), les fractions AcOEt (G) et BuOH (H) ont été analysés par CLHP analytique dans les conditions suivantes :

Colonne : Kromasyl 250x4.6 mm ; 100 Å

Concentration d'échantillon : 10 mg/mL

Volume injecté : 10 µL

Débit : 1 mL/min

Méthode d'éluion : 8 à 40% de MeOH dans Eau en 20 min

40 à 100% de MeOH dans Eau en 2 min

100% MeOH pendant 5 min

254 nm, longueur d'onde de détection

2.3.2.4.4. Fractionnement de la phase BuOH (H)

La phase BuOH (H) (11.2 g) a subi un fractionnement à l'aide d'une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur silice en utilisant un mélange CHCl₃/ MeOH (100/0 à 0/100). Quatre fractions (H.1 – H.4) ont été obtenues. La fraction H.3 (3g) a été purifiée sur colonne de silice pour donner 11 fractions notées H.3.1 à H.3.11 (éluant CHCl₃/MeOH (100/0 à 0/100)). La fraction H.3.7 (200 mg) a subi un fractionnement à l'aide d'une SPE sur phase inverse RP-18 et huit fractions (H.3.7.1 – H.3.7.8) ont été obtenues ; le système d'éluion a été H₂O/MeOH (100/0 à 40/60). La purification de la fraction H.3.7.1 sur une colonne de Sephadex LH-20 a permis d'isoler le composé **PE.10** (23 mg). Deux composés, à savoir **PE.11** (12.6 mg) et **PE.12** (21.5 mg), issus de la fraction H.3.7.3 (72 mg) ont été isolés à l'aide d'une chromatographie sur couche mince (CCM) préparative sur phase normale en utilisant MeOH/AcOEt (50/50) comme éluant (**Figure 2- 6**)

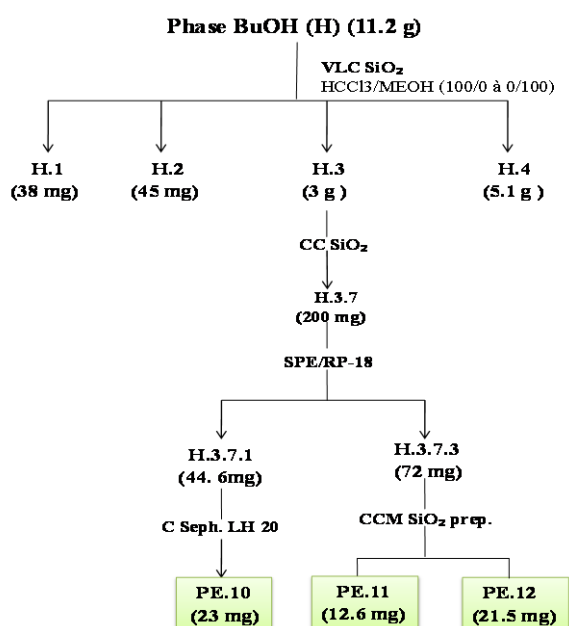


Figure 2- 6 : Schéma de fractionnement de la phase BuOH (H)

2.3.2.5. Feuilles de *P. erinaceus*

1 kg de poudre des feuilles sèches de *P. erinaceus* a été mis à macérer dans du MeOH (4 x 2.5 L) puis dans MeOH/H₂O (70/0) (3 x 2.5 L) sous agitation magnétique. Un extrait MeOH (I) (60 g) et un extrait MeOH aqueux (J) (51.8 g) ont été obtenus. Les deux extraits ont été rassemblés parce qu'ils avaient le même profil chromatographique sur CCM analytique. La masse totale des deux extraits a été de 111.8 g (**Figure 2- 7**).

72 g de l'extrait méthanolique rassemblé des feuilles ont été dissouts dans 500 mL d'un mélange MeOH/CHCl₃ (50/50, v/v). La solution obtenue a été mise dans une ampoule à décanter puis un ajout progressif d'eau distillée a permis d'obtenir deux phases. La phase supérieure constituait la fraction flavonoïdique (L) (64 g) et la phase inférieure contenait de la chlorophylle (M) (7.7 g) et des composés apolaires. (**Figure 2- 7**)

Une partie de la fraction flavonoïdique (41 g) dissoute dans 600 mL d'eau distillée a été partitionnée successivement avec du DCM (3 x 200 mL) puis de l'AcOEt (3 x 200 mL) et ensuite du BuOH (3 x 200 mL). Des fractions DCM (N) (50 mg), AcOEt (O) (814 mg) et BuOH (P) (5.2 g) ont ainsi été obtenues. (**Figure 2- 8**)

2.3.2.5.1. CLHP analytique

La fraction flavonoïdique et les fractions DCM, AcOEt et BuOH ont été analysées par CLHP dans les conditions suivantes :

Colonne : Kromasyl 250X4 ,6 mm ; 100 Å

Concentration d'échantillon : 10 mg/mL

Volume injecté : 10 µL Débit : 1 mL/min

Méthode d'élution : 2 à 100% MeOH dans Eau en 30 min

100% MeOH pendant 5 min

254 nm de détection

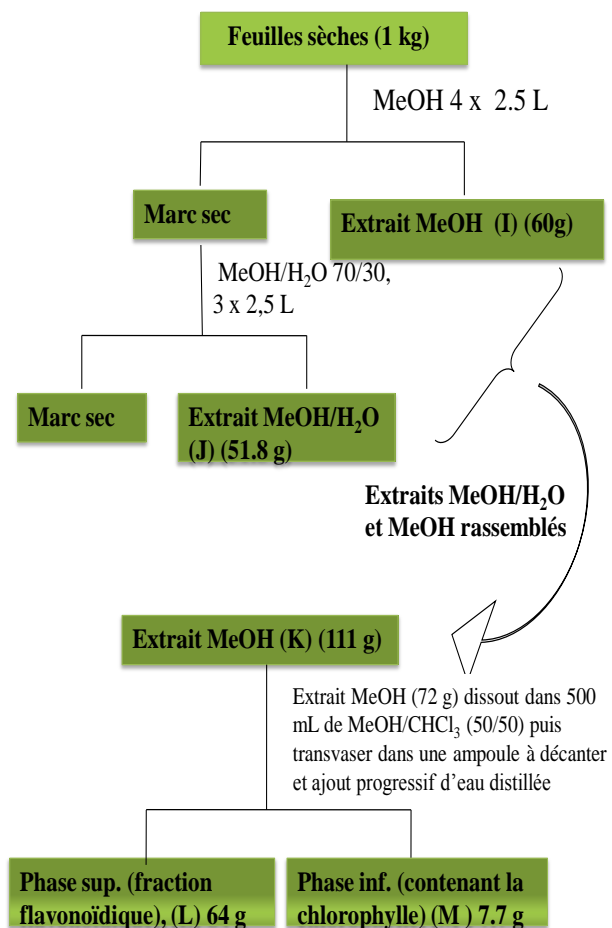


Figure 2- 7 : Schéma d'extraction et de fractionnement des feuilles de *P. erinaceus*

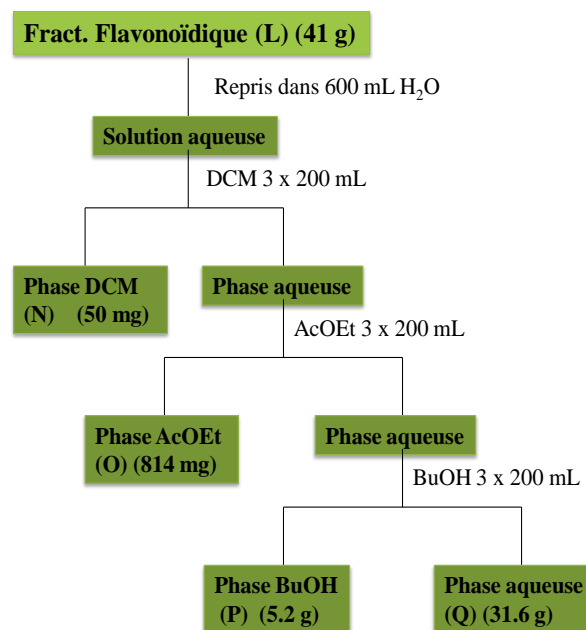


Figure 2- 8 : Schéma de fractionnement de la fraction flavonoïdique (J)

2.3.2.5.2. Fractionnement de la phase AcOEt (O)

La phase AcOEt (O) (814 mg) a subi un fractionnement à l'aide d'une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice (200 μ m, Merck) avec le gradient d'élution suivant : hexane/AcOEt (50/50 à 0/100) puis AcOEt/MeOH (100/0 à 0/100). Trois fractions (O.1 – O.3) ont été obtenues. **(Figure 2- 9)**

La fraction O.2 a été soumise à une purification sur une cartouche SPE (Lichroprep RP18, MERCK), le système d'éluant utilisé est H₂O/MeOH (100/0 à 0/100). D'après le profil chromatographique CCM analytique, le composé **PE.13** (7 mg) et 12 fractions (O.2.2 – O.2.12) ont été obtenus. La fraction O.2.11 purifiée sur une colonne de Sephadex LH-20 dans le MeOH, a permis d'isoler le composé **PE.14** (3.1 mg). **(Figure 2- 9)**

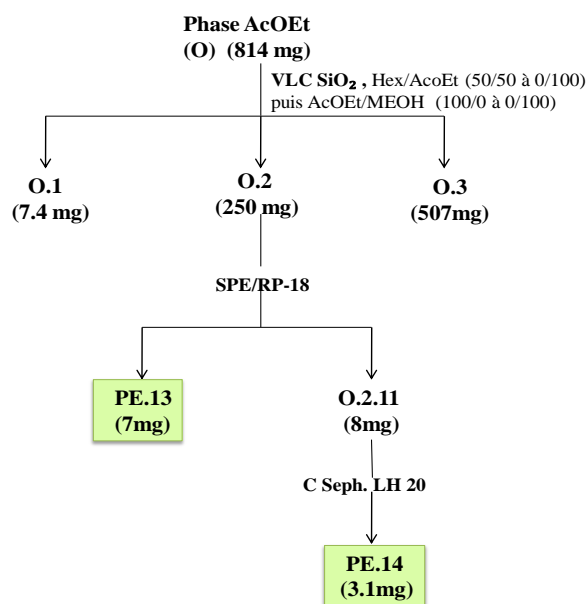


Figure 2- 9 : Schéma de fractionnement de la phase AcOEt (O)

2.3.2.5.3. Fractionnement de la phase BuOH (P)

La phase BuOH a été fractionnée par chromatographie liquide moyenne pression (MPLC) sur une colonne Lichroprep RP18 (40-63 μm , Merck). Le système de solvant utilisé comme éluant est : $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (100/0 à 0/100). Au total 18 fractions (P.1 – P.18) ont été rassemblées suivant leur profil chromatographique sur CCM analytique. **(Figure 2- 10)**

La fraction P.11 a été purifiée sur une colonne ouverte de silice avec le système d'éluant suivant : $\text{AcOEt}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (114/15/1 ; 100/21/9 puis 100/16.5/13.5). Cinq fractions (P.11.1 – P.11.5) ont été obtenues. La fraction P.11.3 a été purifiée sur une CCM préparative de silice avec $\text{AcOEt}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (70/17/13) comme éluant ; ceci a permis d'isoler le composé **PE.15** (6.5 mg). **(Figure 2- 10)**

La fraction P.12 a subi un fractionnement sur une colonne ouverte de silice avec un système ternaire de solvant comme éluant : $\text{AcOEt}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (85/8/7, 70/17/13 puis 65/20/15). Treize fractions (P.12.1 – P.12.13) ont été rassemblées suivant leur profil chromatographique. Une purification de la fraction P.12.2 sur colonne ouverte de Sephadex LH-20 a permis d'isoler le composé **PE.16** (32 mg) avec du MeOH comme éluant. La fraction P.12.7 a été purifiée sur une CCM préparative de polyamide (MN Polyamid DC 6) avec l'éluant : $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{Méthylethylcétone}/\text{Acétylacétone}$ (13/3/3/1). Le composé **PE.17** (9 mg) et trois autres

fractions (P.12.7.1 – P.12.7.3) ont été obtenus. Le fractionnement P.12.8 sur une colonne ouverte de Sephadex LH-20 dans le MeOH a permis de purifier le composé **PE.18** (7.7 mg). (Figure 2- 10)

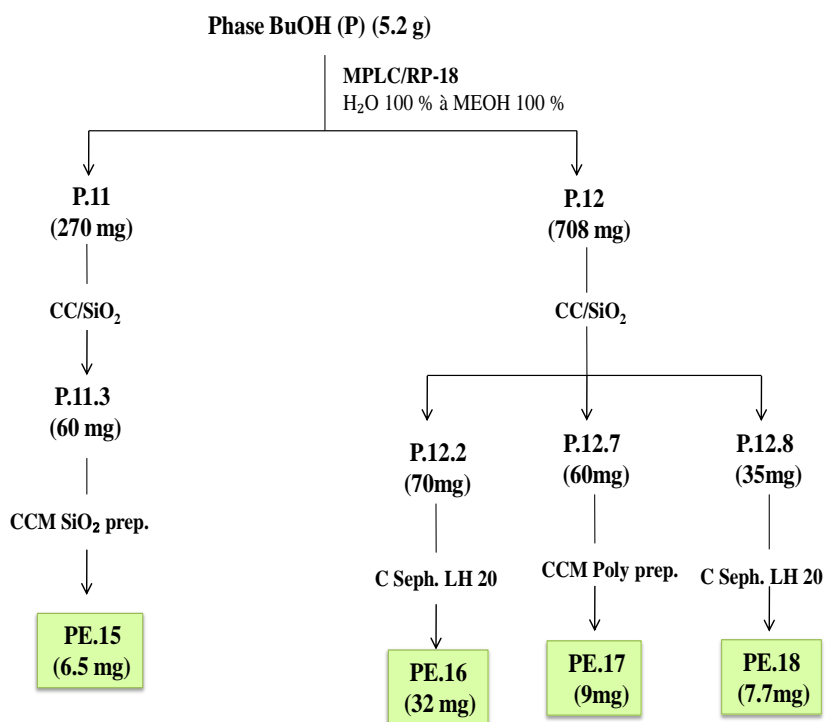


Figure 2- 10: Schéma de fractionnement de la phase BuOH (P)

2.4.Méthodes d'études biologiques

2.4.1.Toxicité générale aigüe

2.4.1.1.Principe

Le principe consiste à administrer à des lots homogènes de souris une substance à des doses croissantes et à déterminer le taux de mortalité au bout de 72 heures. Ce taux de mortalité permet de déterminer la dose létale 50 (DL₅₀).

La DL₅₀ est définie comme étant la dose capable de tuer, dans des conditions déterminées, la moitié des animaux mis en expérience dans une même espèce animale. (Wepierre, 1977, Lompo 2008). La DL₅₀ est évaluée selon l'échelle de valeur de toxicité de Hodge et Sterner (Hodge *et* Sterner, 1943) et de l'OMS (ICPS, 2002).

2.4.1.2.Protocole

Voie intrapéritonéale : 4 lots de six souris Swiss NMRI ont reçu l'extrait méthanolique des écorces de tronc (MeOH B) à des doses de 250, 500, 1000 et 1500 mg/kg de poids corporel et le lot témoin a reçu de l'eau physiologique (NaCl 0.9 %). Après l'administration des extraits les animaux ont été observés pendant 2 heures à l'issue desquelles ils sont alimentés. Ils sont ensuite observés pendant 24, 48 et 72 heures au cours desquelles les symptômes d'intoxications ont été notés

Voie per os : 5 lots de six souris Swiss NMRI ont reçu les extraits par voie orale à des doses de 500, 1000, 1500, 2000 et 2500 mg/kg de poids corporel et le lot témoin a reçu de l'eau distillée. Après l'administration des extraits les animaux ont été observés pendant 2 heures à l'issue desquelles ils sont alimentés. Ils sont ensuite observés pendant 24, 48 et 72 heures au cours desquelles les symptômes d'intoxications ont été notés. Les souris mortes ont été dénombrées en fonction de la période d'observation pour déterminer la DL₅₀. Les extraits utilisés pour déterminer la DL₅₀ ont été : les décoctés (feuilles, écorces de tronc, écorces de racine) et les extraits méthanoliques (feuilles, écorces du tronc).

2.4.2. Activités anti-inflammatoires

2.4.2.3. Test anti-œdémateux à la Carragénine

2.4.2.3.1. Principe

L'injection de carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure de la souris provoque une réaction inflammatoire qui peut être réduite par toute substance possédant un pouvoir anti-inflammatoire (Winter et *al.*, 1962). L'injection de la carragénine chez l'animal provoque une inflammation aiguë impliquant la libération de plusieurs médiateurs chimiques à savoir l'histamine, la bradykinine, la sérotonine et les prostaglandines. L'histamine et la sérotonine interviennent dans la première phase de l'inflammation qui dure environ 60 minutes, la seconde phase qui dure au delà des trois heures voit la libération des prostaglandines ; la libération de la bradykinine intervient entre ces deux phases.

2.4.2.3.2. Protocole

Les souris ont été mises à jeun pendant 17 heures avant le test. L'injection de 0,05 mL de carragénine (1 % suspendue dans NaCl 0,9 %) a été réalisée sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure provoquant ainsi l'apparition d'œdème dans la région métatarsienne.

Des lots de six souris ont été constitués. Les différents lots ont été traités avec la drogue végétale ou les substances de référence une heure avant l'injection de la carragénine. Les substances de référence utilisées étaient l'acide acétylsalicylique comme AINS et l'hydrocortine comme AIS. Les drogues végétales étaient constituées des décoctés (écorces de tronc, feuilles et écorces de racines) et des extraits méthanoliques de feuilles et d'écorces de tronc. Les doses utilisées pour chaque extrait ont été :

- décocté des écorces du tronc : 200, 400 et 600 mg/kg (*per os*)
- décocté des feuilles : 200, 400 et 600 mg/kg (*per os*)
- décocté des écorces des racines : 200, 400 et 600 mg/kg (*per os*)
- extrait méthanolique des écorces du tronc : 100 et 200 mg/kg pour la voie *per os* et 50, 100 et 200 mg/kg pour la voie intrapéritonéale
- extrait méthanolique des feuilles : 100, 200 et 400 mg/kg (*per os*)

Le volume de la patte traitée a été mesurée avant, et 1, 3 et 5 heures après l'injection de la carragénine. La variation du volume de la patte traitée permettait d'évaluer le pouvoir anti-inflammatoire de toute substance. Le volume moyen de l'œdème de la patte traitée a été calculé à partir de 3 mesures de déviation n'excédant pas 4 %. L'activité anti-inflammatoire a

été évaluée en pourcentage de réduction de l'œdème chez des rats traités par rapport aux témoins blanc selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A représente la différence moyenne du volume d'augmentation de la patte des souris du lot témoin blanc et B représente la différence moyenne du volume d'augmentation de la patte des souris des lots traités.

Selon que le pourcentage d'inhibition de l'œdème est positif ou négatif, on a une activité anti-inflammatoire démontrée ou non. Si le PI est positif, selon qu'il est très bas ou très élevé, l'activité anti-inflammatoire sera faible ou importante. L'effet des extraits est comparé à celui obtenu avec les substances de référence.

2.4.2.4. Test anti-œdémateux à l'huile de croton

2.4.2.4.1. Principe

L'application de l'huile de croton sur la face de l'oreille provoque une inflammation, qui peut être réduite par une application locale de toute substance anti-inflammatoire.

2.4.2.4.2. Protocole

Les souris ont été mises à jeun 17 heures et réparties en des lots de six. Avant l'application de l'huile de croton, les animaux ont été anesthésiés par l'administration intra péritonéale d'une solution de kétamine chlorhydrate à 150 mg/kg de poids corporel (Nikiéma *et al.*, 2001 ; Sawadogo *et al.*, 2008). L'inflammation a été induite sur la face interne du pavillon de l'oreille droite de la souris, par l'application de 5 µL de l'huile de croton dissoute dans le dichlorométhane (pour les extraits DCM) et dans 42 % d'éthanol (pour le décocté et les extraits MeOH) ; et l'oreille gauche non traitée a servi de témoin. Le lot témoin blanc a reçu la substance irritante tandis que les autres lots ont reçu la drogue dissoute dans la solution de l'huile de croton. Les extraits utilisés ont été :

- extrait DCM des écorces de tronc : 50, 100 et 200 µg/oreille
- extrait DCM des écorces des racines : 100, 200 et 300 µg/oreille
- décocté des écorces de tronc : 300 et 500 µg/oreille
- extrait méthanolique des écorces de tronc : 300 et 500 µg/oreille

Six heures après l'opération, temps correspondant au maximum de l'œdème (Colot, 1972), les animaux ont été sacrifiés par rupture de la moelle épinière au niveau cervical par

étirement. Les oreilles gauches et droites ont été alors sectionnées au ras de leur implantation. A l'aide d'une perce bouchon de 7 mm de diamètre, un morceau du pavillon de l'oreille a été prélevé au niveau de la marge en pointe et pesé immédiatement. L'activité anti-inflammatoire topique a été calculée selon la formule suivante :

$$A (\%) = [(\Delta P_c - \Delta P_t) / \Delta P_c] \times 100$$

où ΔP est la moyenne des différences de poids entre l'oreille droite et gauche des lots contrôles (ΔP_c) et des lots traités (ΔP_t) (Sawadogo *et al.*, 2008).

Les tests ont été réalisés dans la journée entre 10H et 16H pour éviter les éventuelles variations des réponses dues aux fluctuations circadiennes des corticostéroïdes des animaux (Lompo, 1999).

2.4.3. Activités analgésiques

2.4.3.1. Test à l'acide acétique

2.4.3.1.1. Principe

L'administration intrapéritonéale d'une solution d'acide acétique (0,6 %) chez la souris provoque des contorsions abdominales. Le nombre de contorsions observé après administration d'une substance pharmacologique permet d'évaluer son effet analgésique périphérique.

2.4.3.1.2. Protocole

L'effet analgésique a été évalué sur le nombre de contorsions abdominales induite par l'injection intrapéritonéale de l'acide acétique (0,6 %) suivant la méthode décrite par Sawadogo *et al.*, (2006). Les souris ont été mises en jeun 17 heures avant l'expérience. Des lots de six souris ont été constitués. Le lot témoin blanc a reçu de l'eau distillée, les autres lots ont reçu les extraits à étudier et les substances de référence. Des doses différentes ont été administrées oralement aux souris en fonction de leur poids corporel. Les extraits et les doses utilisés ont été :

- décocté des écorces du tronc : 200, 400 et 600 mg/kg (per os)
- décocté des feuilles : 200, 400 et 600 mg/kg (per os)
- décocté des écorces des racines : 200, 400 et 600 mg/kg (per os)
- Extrait méthanolique des écorces du tronc : 100 et 200 mg/kg pour la voie per os
- Extrait méthanolique des feuilles : 100, 200 et 400 mg/kg (per os)

Une heure après l'administration des extraits, les animaux ont reçu l'acide acétique par voie intrapéritonéale à la dose de 10 mL/kg. Cinq minutes après l'injection de l'acide acétique, le nombre de contorsion a été compté chez chaque souris durant 15 minutes. L'effet analgésique a été évalué selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = (1 - W_t / W_b) \times 100$$

W_b représente la moyenne du nombre de contorsions des souris du lot témoin blanc et W_t est la moyenne du nombre de contorsion des souris du lot traité.

2.4.3.2. Test au formaldéhyde

2.4.3.2.1. Principe

L'injection d'une solution de formaldéhyde (2,5 %) à la patte postérieure de la souris induit une réaction biphasique se traduisant par le temps (secondes) mis pour lécher la patte traitée : phase immédiate (0 – 5 min) et la seconde phase (15 – 30 min). L'effet analgésique de toute substance est évalué par la réduction du temps de léchage de la patte traitée.

2.4.3.2.2. Protocole

La méthode de Wibool *et al.*, (2008) a été utilisée pour déterminer l'effet analgésique des extraits et produits de référence. Des lots de six souris, mises en jeun 17 heures avant, ont été constitués. Le lot témoin blanc a reçu l'eau distillée tandis que les autres lots ont été traités avec les substances à étudier et les produits de référence. Une heure avant l'injection de la solution de formaldéhyde (20 μ L) à la patte postérieure droite, les souris ont reçu oralement les extraits à différentes doses. Immédiatement après l'injection de la solution de formaldéhyde, le temps de léchage de la patte traitée a été compté pendant cinq minutes, puis entre 15 et 30 min. L'effet analgésique a été déterminé en fonction de la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = (1 - T_t / T_c) \times 100$$

Où T_t est le temps (en secondes) de léchage des souris traitées avec les extraits et les substances de référence et T_c est le temps (en secondes) de léchage des souris non traitées.

2.4.4. Activité antipyrétique

2.4.4.1. Principe

L'injection sous cutanée d'une suspension aqueuse de levure de bière (*Saccharomyces cerevisiae*) à 20 % chez la souris, induit une élévation de température. Cette hyperthermie peut être réduite par une substance antipyrétique.

2.4.4.2. Protocole

Après la prise de la température rectale, les souris ont reçu par voie sous cutanée dans la région dorso-latérale, une suspension aqueuse de levure (20 %) en raison de 1 mL pour 100g de poids corporel (Sawadogo et *al.*, 2006). Ensuite les animaux ont été mis en jeun de nourriture 17 heures avant la mesure de l'hyperthermie et des lots de six souris ont été constitués avec celles présentant une augmentation de température supérieure ou égale à 0,5 °C. Les lots ont été rendus homogènes quant au niveau de l'hyperthermie. Les différents lots ont reçu par voie per os soit l'eau distillée, soit les extraits à étudier ou soit la substance de référence (paracétamol, 100 mg/kg). Une heure après l'administration des extraits, la prise de température a été faite toute les heures pendant cinq heures.

L'effet antipyrétique a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de réduction de la température} = (1 - \Delta T_0 / \Delta T_n) \times 100$$

$\Delta T_0 = T_{0h} - T_{-16h}$ = variation de température rectale moyenne avant traitement antipyrétique.

$\Delta T_n = T_{nh} - T_{-16h}$ = variation de température rectale moyenne à la n^{ème} heure après traitement antipyrétique.

T_{-16h} = Température moyenne initiale du lot.

T_{0h} = Température moyenne du lot après induction de l'hyperthermie soit 16 heures après administration du pyrogène.

T_{nh} = Température moyenne du lot à la n^{ème} après traitement antipyrétique.

2.4.5. Test de détermination de tumor necrosis factor alpha (TNF α) et de nitrite

2.4.5.1. Principe

Le principe consiste à induire des macrophages cultivés *in vitro* à produire des cytokines pro-inflammatoires tels que le tumor necrosis factor alpha (TNF α) et la nitrite, par l'ajout dans le

milieu de culture d'*Escherichia coli* (sérotype 055 : B5) LPS (1 µg/mL) ou LPS/IFN γ pour une durée donnée.

2.4.5.2. Protocole

Selon Fotio *et al.*, (2010) les extraits ont été solubilisés dans une solution de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). Les cellules murines de la moelle osseuse ont été différenciées en macrophages après culture de $1,5 \times 10^6$ cellules /puits dans une plaque de 24 puits. Chaque puits contenait du DMEM supplémenté avec 10 % du sérum de fœtus de veau et 20 % de cellules RAW264.7 conditionnées comme source de facteur de colonie-stimulant de granulocytes et de macrophages.

Après six jours de culture, la préparation cellulaire contenait 99 % de macrophages adhérents qui représentaient environ 10 % du total des cellules initialement mises en culture. Les macrophages dérivés de la moelle osseuse (Bone marrow-derived macrophage : BMDM) ont été traités ou non avec différentes concentrations (25 ; 50 µg/mL) d'extraits pendant 30 minutes. Les BMDM ont été stimulés par *Escherichia coli* (sérotype 055 : B5) LPS (1 µg/mL) ou LPS/IFN γ durant 24 heures. Le surnageant a été récolté pour la détermination de la quantité de nitrite et de la cytokine tumor necrosis factor alpha (TNF α) :

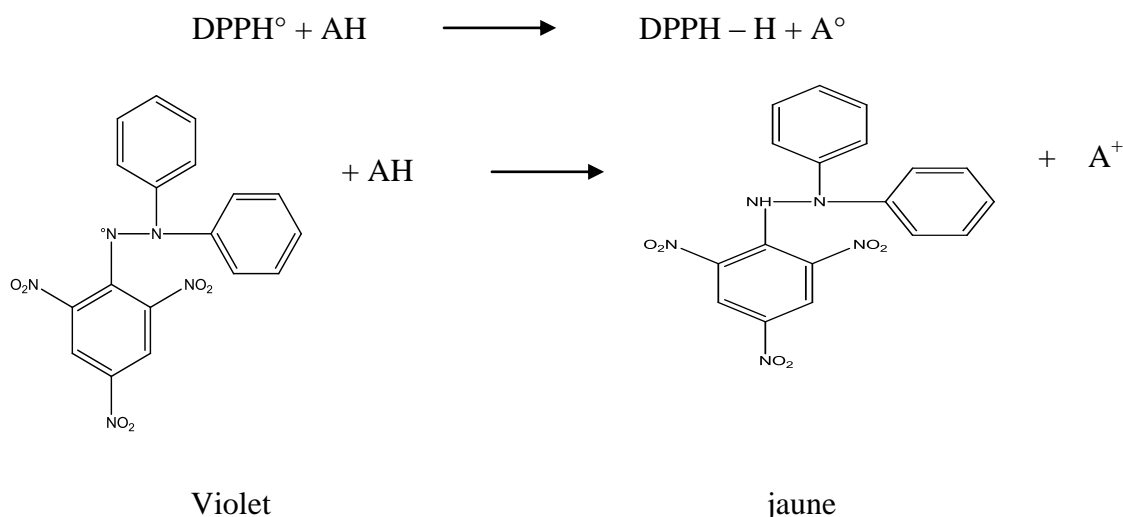
- la quantité de TNF α , dans le surnageant de la culture cellulaire, a été évaluée en utilisant le test d'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)
- L'accumulation de nitrite dans le milieu de culture BMDM a été déterminée comme indicateur de la production d'oxyde nitrique par le réactif de Griess (1 % de sulfanilamide et 0,1 % de naphthyethylenediamide dans 2,5 % d'acide phosphorique). 25 µl du surnageant récolté ont été mélangés avec 50 µl du réactif de Griess pendant 5 min. l'absorbance a été mesurée à 570 nm et la concentration de nitrite a été déterminée par comparaison avec une référence à sodium courbe standard de nitrite.

2.4.6. Activités antioxydantes

2.4.6.1. Méthode anti-radicalaire DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

2.4.6.1.1. Principe

La méthode de mesure du pouvoir antioxydant par le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) repose sur la capacité d'un composé à réduire le radical DPPH $^\circ$:



La réduction se traduit par un changement de couleur de la solution qui vire du violet au jaune en présence d'un antiradicalaire. La réaction est alors quantifiée en mesurant l'absorbance de la solution par spectrophotométrie à 515 nm.

2.4.6.1.2. Protocole

L'activité antiradicalaire DPPH[°] a été effectuée à la température ambiante suivant la méthode de Brand-William (1995). 4 mg de DPPH ont été dissout dans 50 mL de MeOH ; 50 mg de trolox dissout dans 10 mL de MeOH et 10 mg de chaque échantillon dissout dans 1 mL de MeOH.

A partir de la concentration mère (10 mg/mL pour les échantillons et 5mg/mL pour le trolox) des dilutions au 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32 ont été préparées. Sur une microplaque de 96 puits, le remplissage de chaque puits pour chaque concentration a été fait selon le **Tableau 2- 1**

Tableau 2- 1: Préparation des échantillons pour le test antioxydant DPPH

	Blanc réactif	DPPH 100%	Echantillons à tester
Prise d'essai en μL			20
Méthanol en μL	220	20	
DPPH en μL		200	200
Volume final en μL	220	220	220

Après une incubation de 30 min à la température ambiante, l'absorbance a été lue à une longueur d'onde de 515 nm chaque minute pendant 45 min. Pour chaque échantillon l'opération a été effectuée à trois reprises.

Le pouvoir anti-radicalaire des extraits a été évalué par rapport à la solution 100 % qui renferme le méthanol (blanc réactif) et par rapport à la solution 100 % de DPPH. Une courbe de pourcentage de DPPH restant, a été tracée en fonction de la quantité de l'échantillon antioxydant/mg DPPH. Sur la courbe, la concentration nécessaire pour dégrader 50 % DPPH (CI₅₀, concentration inhibitrice) a été déterminée. Le pouvoir anti-radicalaire (antiradical power : ARP) a été déterminé ainsi :

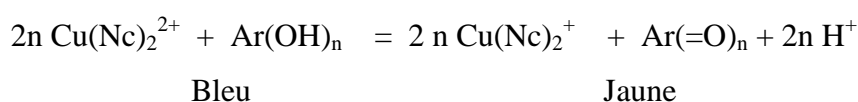
$$\text{ARP} = 1/\text{CI}_{50}$$

NB : CI₅₀ est exprimée en mg antioxydant/mg de DPPH restant

2.4.6.2.Méthode CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity)

2.4.6.2.1. Principe

Le test CUPRAC repose sur la capacité du complexe cuivre(II)-néocuproïne à se faire réduire en cuivre (I)-néocuproïne par le groupe réactif des polyphénols : Ar-OH selon la réaction suivante :



2.4.6.2.2.Protocole

Le test de CUPRAC a été réalisé suivant la méthode décrite par Apak *et al.* (2004). 10 mg de chaque extrait ou fraction ont été dissout dans 1 mL de MeOH et les produits de référence ont été préparés à une concentration mère de 1 mg/mL. Des dilutions au 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32 ont été préparées à partir des concentrations mères. Les réactifs ont été préparés de la manière suivante :

- 0,8524 g de chlorure de cuivre II (CuCl₂) dans 50 mL d'eau distillée
- 0,039 g de néocuproïne (2,9-diméthyl-1,10-phenanthroline) dans 25 ml d'éthanol
- 3,854 g de tampon ammonium acétate (NH₄Ac) dans 50 ml d'eau distillée

Sur une microplaque de 96 puits, 50 μ L de la dilution de chaque échantillon ont été repartis, auxquels sont ajoutés 50 μ L d'eau distillée, 50 μ L de CuCl_2 , 50 μ L de NH_4Ac et 50 μ L de néocuproïne. Les solutions dans les puits ont été homogénéisées puis laissées incuber à 25 °C pendant 60 minutes. L'absorbance a été mesurée à 450 nm par un lecteur de plaque (Multiskan EX). La capacité antioxydante est calculée en équivalent Trolox :

$$\text{TEAC}_{\text{massique}} = \text{E \%échantillon} / \text{E \%trolox}$$

E % : est le coefficient d'extinction massique et exprimée en g/L

TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) est défini comme étant la concentration millimolaire de trolox ayant la capacité antioxydante équivalente à une solution de 1 mM de la substance à étudier.

2.4.7. Inhibition de la lipoxygénase

2.4.7.1. Principe

Le principe consiste à inhiber *in vitro* la lipoxygénase à produire des leucotriènes et de la lipoxine en présence d'une substance inhibitrice.

2.4.7.2. Protocole

La méthode spectrophotométrique développée par Malterud et Rydland (2000) a été utilisée pour évaluer l'activité inhibitrice des extraits sur la lipoxygénase. Les réactifs ont été préparés de la manière suivante :

- 19,05 g de Sodium tetraborate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) dans 250 mL d'eau distillée afin d'obtenir une solution A ; la solution B a été obtenue avec 4,34 g d'Acide borique dans 350 mL d'eau. Le tampon borate 0.2 M, est obtenu en ajoutant la solution B à A jusqu'à obtenir du pH 9.0, le volume a été ensuite ajusté à 1L.
- L'acide linoléique (substrat) a été laissé à l'air libre pendant toute une nuit à la température du laboratoire pour être oxydé afin de favoriser l'activité de l'enzyme puis il a ensuite été conservé au congélateur avant utilisation. 10 μ L d'acide linoléique, 30 μ L d'éthanol et 120 mL de tampon borate ont été mélangés pour obtenir 250 μ M d'acide linoléique. La solution est utilisée dans un intervalle de 24 h.

- La solution d'enzyme est obtenue par préparation de la lipoxigénase (EC 1.13.11.12) de type I-B (extraite du soja) (200 U/mL) dans du tampon borate.

400 µl d'une solution de lipoxigénase (167 U/ml), 100µl d'une solution d'extrait (à la concentration finale de 50 µg/ml) sont mélangés et incubés pendant 2 min à 25°C. La réaction est initiée par addition de 500 µl d'une solution de substrat d'acide linoléique (134 µM) et la variation d'absorbance est suivie à 234 nm pendant 90 secondes. Tous les tests ont été réalisés en triplicata. Le solu-medrol et l'hydrocortisone ont été utilisés comme produits de référence. Les extraits suivants ont été testés :

- le décocté et l'extrait MeOH (B) des écorces de tronc
- le décocté, l'extrait MeOH (K) et la fraction flavonoïdique des feuilles
- le décocté, l'extrait DCM et l'extrait MeOH (F) des écorces de racines

L'activité inhibitrice de la lipoxigénase exprimée en pourcentage d'inhibition a été déterminée en utilisant la formule suivante:

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = (E - S)/E \times 100$$

Où E est l'activité de l'enzyme sans inhibiteur et S son activité en présence de l'extrait à tester.

2.4.8. Inhibition de la peroxydation lipidique

2.4.8.1. Principe

Le principe consiste à induire *in vitro* une peroxydation lipidique d'homogénat de foie de rat avec un mélange de bichlorure ferrique (FeCl₂) et de l'eau oxygénée (H₂O₂). La peroxydation est inhibée en présence d'une substance à activité inhibitrice.

2.4.8.2. Protocole

L'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique de foie de rat a été déterminée en utilisant l'acide 2-thiobarbiturique. Le FeCl₂-H₂O₂ a été utilisé pour induire la peroxydation de l'homogénat de foie selon Su et al. (2009) avec quelques modifications. 0,2 ml d'extrait ou de fraction à la concentration de 1,5 mg/ml ont été mélangés avec 1ml de 1% d'homogénat de foie (chaque 100 ml de solution d'homogénat contient 1g de foie de rat), puis 50 µl de FeCl₂ (0,5 mM) et 50µl de H₂O₂ (0,5 mM) ont été ajoutés. Le mélange est incubé à 37°C pendant 60 minutes, puis 1 ml d'acide trichloro-acétique (15%) et 1 ml d'acide 2-thiobarbiturique (0,67%) ont été ajoutés et le mélange a été chauffé dans de l'eau bouillante pendant 15 minutes. L'absorbance est lue à 532 nm. La quercétine a été utilisée comme produit de référence. Les extraits utilisés sont :

- le décocté et l'extrait MeOH (B) des écorces de tronc
- le décocté, l'extrait MeOH (K) et la fraction flavonoïdique des feuilles
- Le décocté et l'extrait MeOH (F) des écorces de racines

La capacité des extraits à inhiber la peroxydation lipidique du foie est exprimée en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante:

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0 \times 100]$$

A_0 est l'absorbance du contrôle (sans échantillon), A_1 est l'absorbance avec échantillon et A_2 est l'absorbance sans homogénat de foie.

2.4.9. Analyse des résultats

L'analyse des résultats des tests *in vivo* a été réalisée sur la base du traitement statistique en utilisant le logiciel Graph Prism version 5. One way ANOVA suivi de Dunnett's test ont été utilisés comme traitement statistique. Les différences sont considérées significatives si P (p value) est inférieure à 0,05 comparativement au témoin. Le logiciel EXCEL a été utilisé pour l'analyse statistique des résultats issus des tests *in vitro*.

2.4.10. Aspect éthique de l'étude

En l'absence de comité d'éthique nationale au Burkina Faso concernant les études chez les animaux de laboratoires, tous les protocoles d'études et expériences *in vivo* ont été effectués conformément aux protocoles déjà validés par l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS, Burkina Faso) et qui respectent les normes internationales en la matière (lignes directrices établies par l'Union européenne sur la protection des animaux (CCE Conseil 86/609) (Zimmermann, 1983).

CHAPITRE 3, RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1.Résultats d'études phytochimiques

3.1.1.Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique colorimétrique a permis de caractériser la présence de tanins, de flavonoïdes, de saponosides et de triterpènes/stéroïdes dans les décoctés des feuilles (DECFEU) et des écorces de racines (DECRA) de *Pterocarpus erinaceus*.

L'analyse CCM lors des purifications des extraits a permis de mettre en évidence la présence des flavonoïdes, des tanins et des coumarines dans les extraits MeOH (B), MeOH (F) et MeOH (K) en utilisant les réactifs DBA et la vanilline sulfurique, et des triterpènes et stéroïdes dans les extraits DCM (A) et DCM (E) en utilisant seulement la vanilline sulfurique.

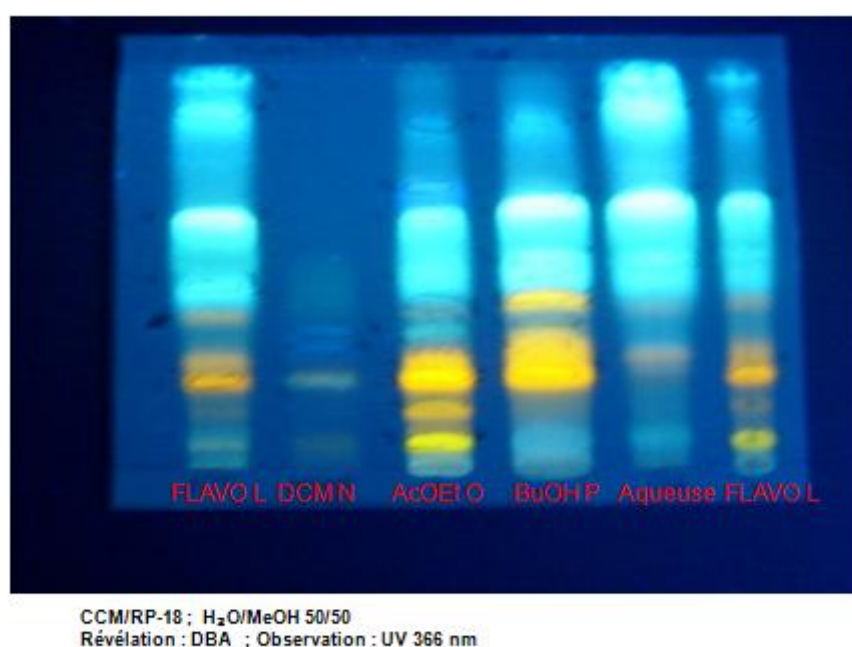


Figure 3- 1: Profil CCM analytique de de la fraction flavonoïdique (L), des phases DCM (N), AcOEt (O), BuOH (P) et phase aqueuse (Q) des feuilles de *P. erinaceus*

Le profil CCM montre à l'UV 366 nm des tâches de couleur jaune, bleu et vert après révélation au DBA, indicateur de la présence des flavonoïdes (**Figure 3- 1**). Ces fractions ont subi également une analyse CHLP analytique.

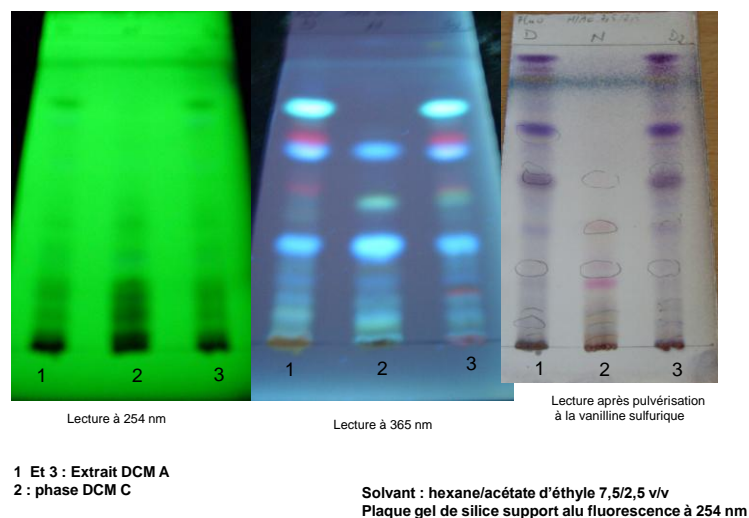


Figure 3- 2: Profil CCM analytique de DCM (A) à l'UV 254 et 366 nm puis après révélation à la vanilline sulfurique.

Le profil CCM de l'extrait DCM (A) montre à l'UV 254 nm des tâches noires et à 366 nm des tâches de couleur vert-clair, rouge (chlorophylle). Après révélation à la vanilline sulfurique des tâches violettes apparaissent caractéristiques des triterpènes (**Figure 3- 2**).

3.1.2. Analyses CLHP

3.1.2.1. Extraits des écorces de tronc de *P. erinaceus*

L'extrait MeOH (F) et ses phases AcOEt (G) et BuOH (H) ont été analysés par CHLP analytique (**Figure 3- 3**) afin de comparer leurs profils chromatographiques et d'identifier les composés UV-majoritaires. Les profils chromatographiques sont assez similaires et il apparaît essentiellement deux composés majoritaires dont la teneur est plus élevée dans la phase BuOH (H). Il s'agit de composés relativement polaires.

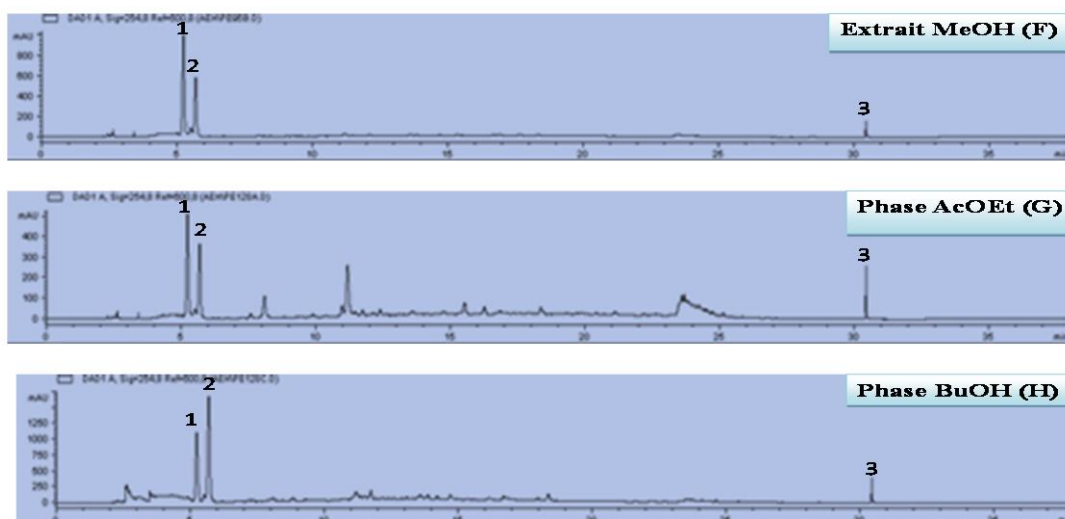


Figure 3- 3: Chromatogrammes CLHP de l'extrait MeOH (F) et des phases AcOEt (G) et BuOH (H) des écorces de racines de *P. erinaceus*. Colonne : Kromasyl 250x4.6 mm ; 100 Å. Gradient : 8 à 40% de MeOH dans H₂O en 20 min ; 40 à 100% de MeOH dans H₂O en 2 min ; 100% MeOH pendant 5 min

3.1.2.2.Extraits des feuilles de *P. erinaceus*

Une analyse par CLHP analytique a été réalisée sur la fraction flavonoïdique (L) et les phases DCM (N), AcOEt (O), BuOH (P) et aqueuse (Q) issues de l'extrait MeOH des feuilles de *P. erinaceus* afin de comparer les profils chromatographiques et d'identifier les composés UV-majoritaires. Les profils chromatographiques des phases sont différents ; mais il apparait des pics similaires (identifiés par des chiffres de 1 à 5) entre les différents chromatogrammes (Figure 3- 4).

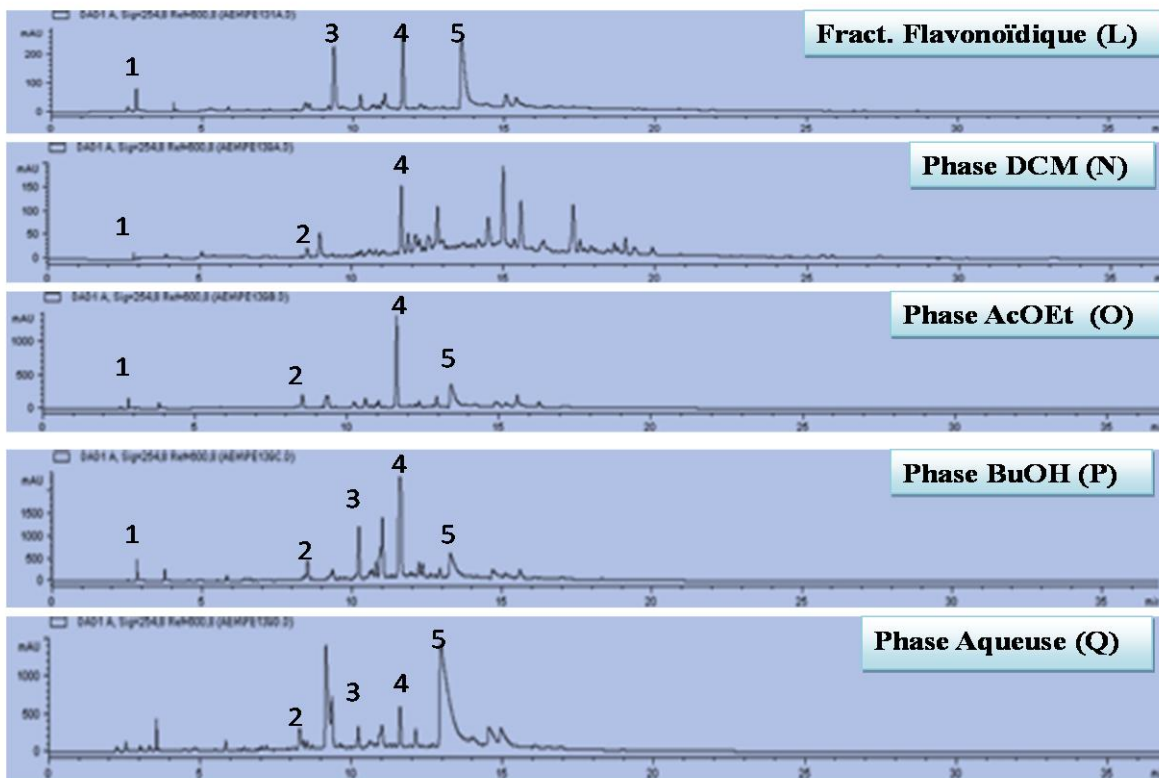


Figure 3- 4: Chromatogrammes CLHP de la fraction flavonoïdique (L), des phases DCM (N), AcOEt (O), BuOH (P) et phase aqueuse (Q) des feuilles de *P. erinaceus*. Colonne : Kromasyl 250x4 ,6 mm ; 100 Å. Gradient : 2 à 100% MeOH dans H₂O en 30 min, 100% MeOH pendant 5 min

3.1.3. Identification des composés isolés

Plusieurs techniques chromatographiques ont été utilisées pour isoler et identifier les composés présents dans les différents extraits de *P. erinaceus*. Les composés **PE.1** et **PE.2** issus de l'extrait DCM (A) et le composé **PE.3** de la phase AcOEt (D) ont été isolés grâce aux chromatographies sur colonne ouverte de gel de silice, de Sephadex LH20 et SPE (Lichroprep RP18, MERCK). La combinaison de SPE (Lichroprep RP18, MERCK) et de chromatographie sur colonne ouverte de Sephadex LH20 et de gel de silice a permis d'isoler **PE.4**, **PE.5**, **PE.6**, **PE.7**, **PE.8** et **PE.9**, composés issus de l'extrait DCM (E). Les composés **PE.10**, **PE.11** et **PE.12**, issus de la phase BuOH (H) ont été isolés à l'aide de la combinaison VLC, CCM préparative et de colonne de Sephadex LH20. La VLC, la SPE (Lichroprep RP18, MERCK) et la colonne de Sephadex LH20 ont servi à isoler les composés **PE.13** et **PE.14** de la phase AcOEt (O). Les composés **PE.15**, **PE.16**, **PE.17** et **PE.18** de la phase BuOH (P) ont été

purifiés par les techniques de MPLC, de CCM préparative et de colonne de Sephadex LH20. Le détail de ces fractionnements est exposé dans le chapitre II de ce manuscrit.

L'identification de ces composés purs isolés a été faite par l'utilisation combinée des méthodes d'analyse suivantes :

- RMN 1D de proton et de carbone 13, DEPT 135
- RMN 2D (COSY, HMQC, HMBC)
- Pouvoir rotatoire
- UV 254 et 366 nm
- Par comparaison avec les données de la littérature

3.1.3.1. Composé **PE.1**

Le composé **PE.1** (25 mg) se présente sous la forme d'une poudre blanche, soluble dans le DCM et le chloroforme. Après migration dans un système de solvant hexane/AcOEt (90/10), révélation à la vanilline sulfurique puis chauffage de la plaque CCM phase normale, il prend une coloration orange caractéristique d'un triterpène avec un Rf de 0.42.

Le spectre RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) (**Figure 3- 5**) montre des signaux qui s'intensifient entre 0.73 et 2.50 ppm. A haut champs, on distingue huit singulets caractéristiques de groupements méthyles à δ_{H} 0.72 ; 0.86 ; 0.88 ; 0.96 ; 1.01 ; 1.01 ; 1.06 et 1.19 ppm.

L'analyse du spectre RMN ^1H (**Figure 3- 5**) a été complétée par l'analyse du spectre RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) (**Figure 3- 6**) présentant 30 signaux et qui confirme la présence d'un triterpène avec huit méthyles dont les signaux peuvent être observés entre 6.8 et 35.0 ppm. Un carbone très déblindé, résonnant à δ_{C} 212.0 ppm, correspond à une fonction carbonyle sur le carbone 3. Sur la base de ces données et de celles de la littérature (Carlos *et al.*, 2004 ; Mahato *et al.*, 1994), le composé **PE.1** est identifié comme étant la friedeline. La friedeline a été isolée à deux moments au cours du fractionnement sous les numéros **PE.1** et **PE.6**.

La friedeline a été identifiée pour la première fois par Friedel en 1892 (Chandler et Hooper, 1979) et isolée des écorces de *Siphonodon australe* en 1956 (Shannon et Macdonald, 1963). La friedeline, répandue dans le règne végétal (plantes supérieures, algues, mousses et lichens), possède des propriétés antitumorale, anti-convulsion, anti-inflammatoire, antiulcéreuse localement, antipyrétique et contre la dysenterie (Chandler et Hooper, 1979).

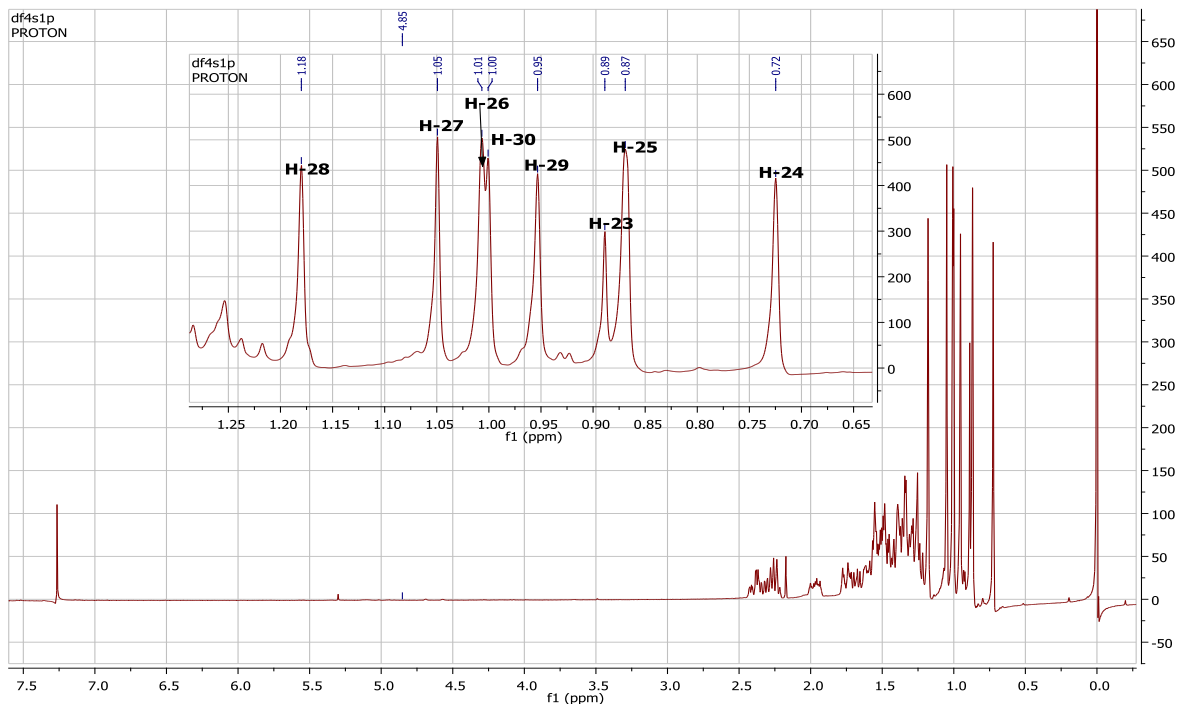


Figure 3- 5: Spectre RMN ^1H du composé PE.1 (CDCl_3 , 300 MHz)

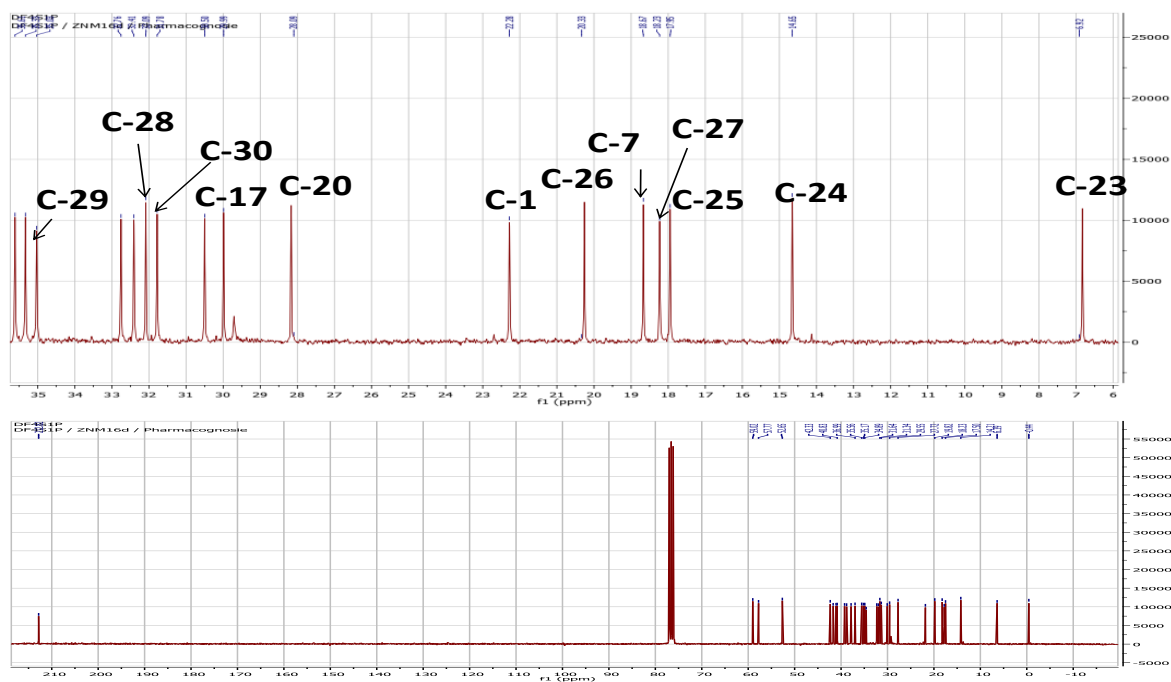
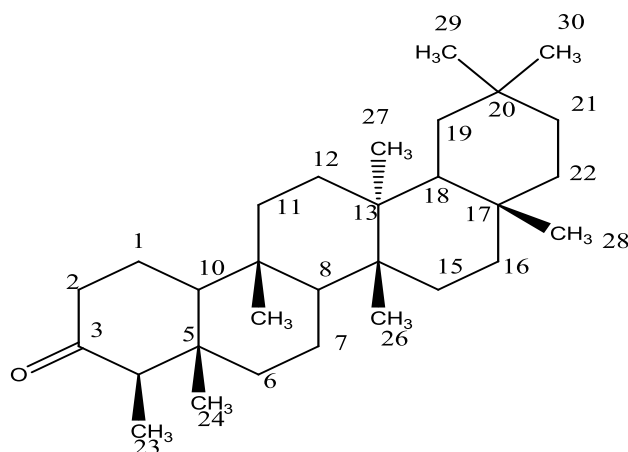


Figure 3- 6: Spectre RMN ^{13}C du composé PE.1 (CDCl_3 , 75 MHz)



Friedeline

3.1.3.2. Composé PE.2

Le composé **PE.2** (6 mg) se présentant sous forme d'une poudre blanche soluble dans le DCM. Après migration dans DCM 100% puis révélation à la vanilline sulfurique et chauffage de la plaque CCM gel de silice (60F₂₅₄), il prend une coloration violette caractérisant la présence d'un triterpène avec un R_f de 0.57.

Le spectre RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) (**Figure 3- 7**) présente plus de signaux dans les hauts champs. L'étude du spectre montre la présence de trois zones spécifiques à un triterpène : une zone à haut champ avec 7 méthyles (δ_H 0.77 à 1.20 ppm) ; deux singulet large à δ_H 4.56 et 4.69 correspondent aux protons éthyléniques du carbone C-29, et à δ_H 3.21 le doublet de doublet correspond au proton H-3 lorsque le carbone C-3 est substitué par un hydroxyle.

L'analyse du spectre RMN ¹³C (**Figure 3- 8**) révèle la présence de 30 carbones. Toutes ces informations conduisent à l'identification du lupéol comparativement aux données de la littérature (Mahato et Kundu, 1994 ; Fotie *et al.*, 2005 ; Nougoué Tchamo *et al.*, 1998).

Le lupéol possède de nombreuses propriétés pharmacologiques à savoir anti-inflammatoire, antimutagénique, antitumorale et antiarthritique. Une étude menée par (Saleem *et al.*, 2001) a démontré l'effet protecteur du lupéol contre la tumeur cutanée provoquée chez la souris par le traitement de peroxyde de benzoyle.

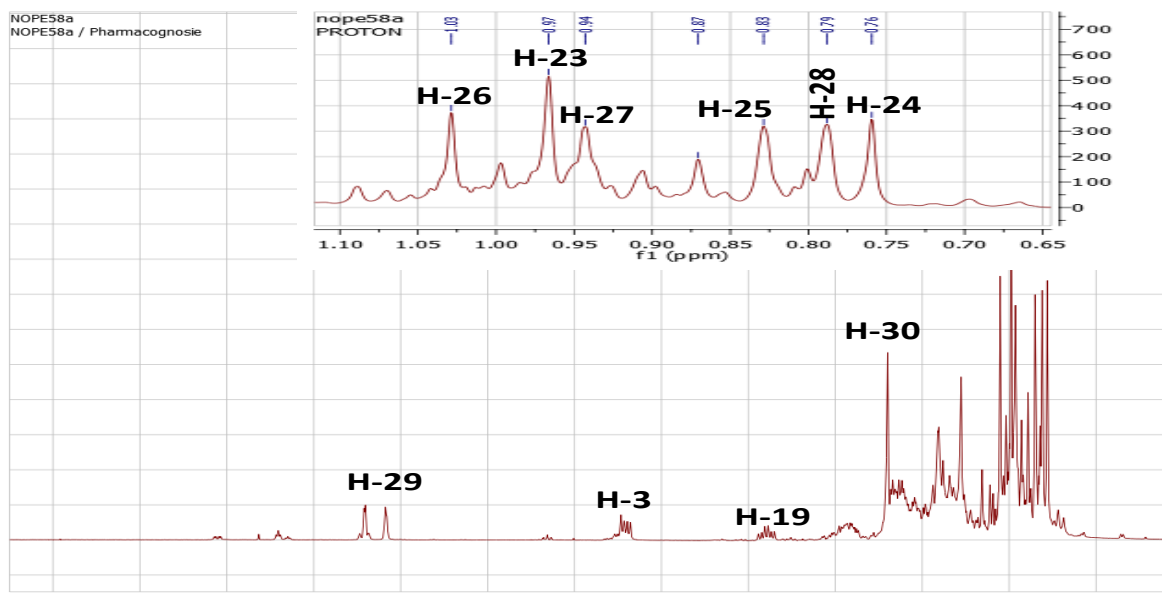


Figure 3- 7: Spectre RMN ^1H du composé PE.2 (CDCl_3 , 300 MHz)

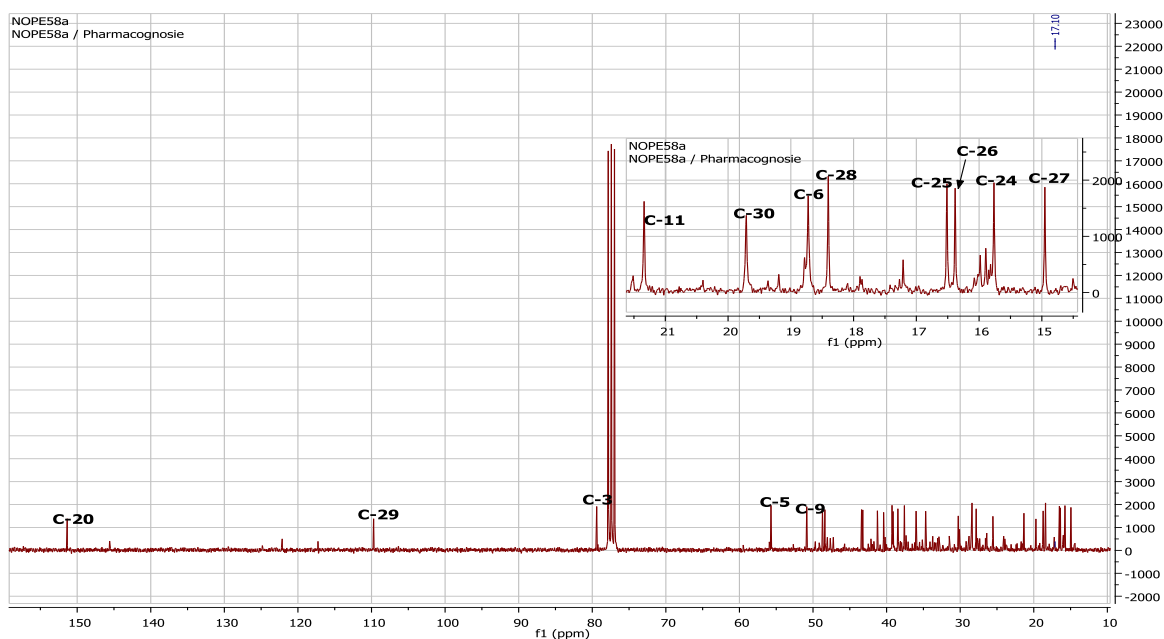
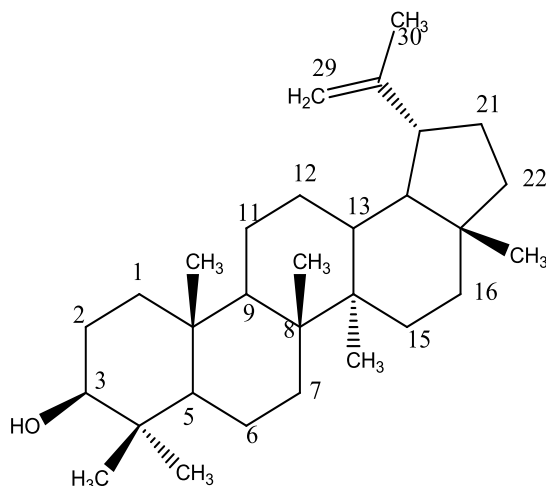


Figure 3- 8: Spectre RMN ^{13}C du composé PE.2 (CDCl_3 , 75 MHz)



Lupéol

3.1.3.3. Composé PE.3

Le composé **PE.3** (27 mg) présente un aspect rouge-brun. Il est soluble dans le MeOH. Son Rf est de 0.34 dans un système de solvant MeOH/H₂O (50/50) sur une plaque CCM RP-18. Après révélation avec le DBA (diphénylborate d'aminoéthanol) il apparaît rouge au visible. Son pouvoir rotatoire : $[\alpha] = -46^\circ$ (C=0.19, MeOH).

Le spectre RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) (**Figure 3- 9**) présente des signaux de protons aromatiques du cycle A (δ_H 6.75 – 6.96 ppm) et du cycle B (δ_H 5.90 – 5.94 ppm) d'un flavonoïde. On note la présence des protons du noyau C entre δ_H 2.69 et 2.88 et le signal à δ_H 4.17 ppm est attribuable à un groupement de type alcool secondaire -CH-OH.

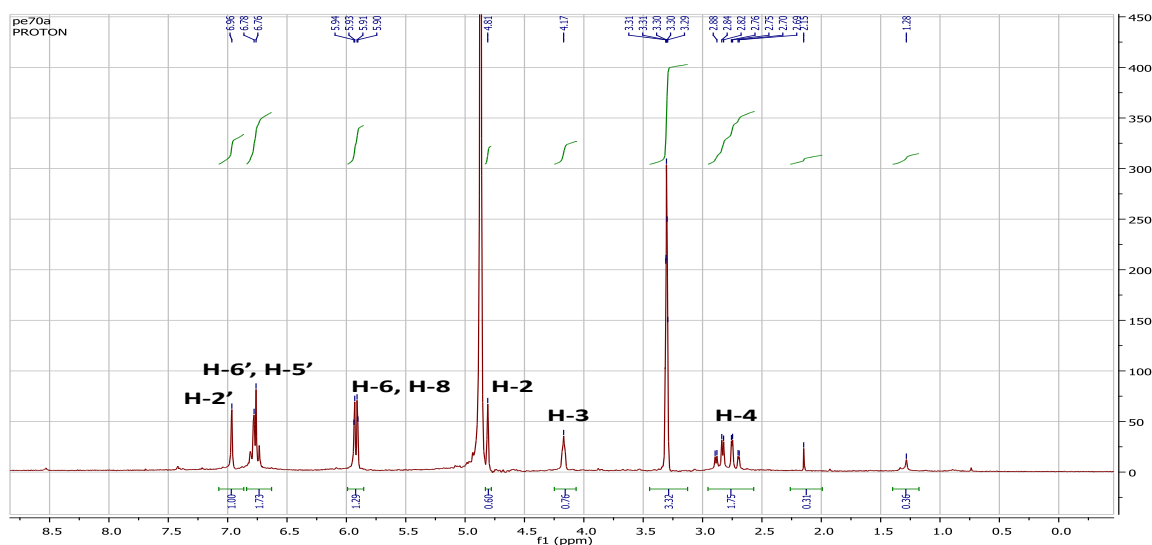


Figure 3- 9: Spectre RMN ¹H du composé PE.3 (CD₃OD, 300 MHz)

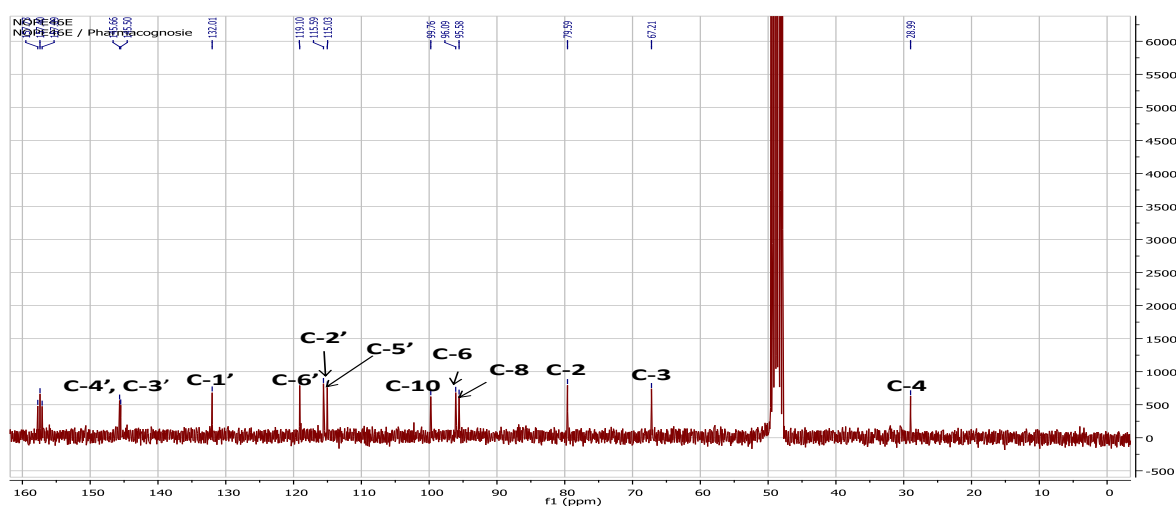
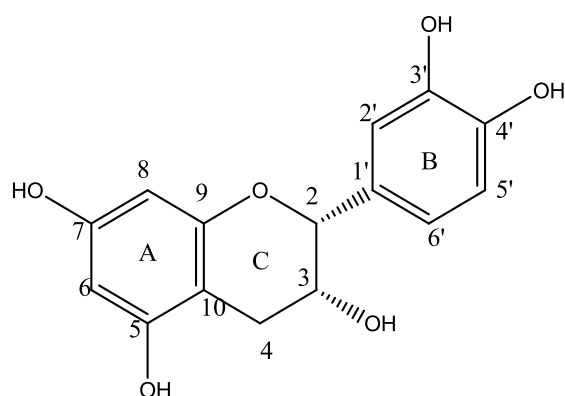


Figure 3- 10: Spectre RMN ¹³C du composé PE.3 (CD₃OD, 75 MHz)

Le spectre RMN ¹³C (Figure 3- 10) montre la présence des 15 signaux confirmant la structure de type flavonoïde. Ces informations comparées aux données de la littérature (Noungoué Tchamo *et al.*, 1998 ; Lhuillier, 2007) font ressortir que le composé **PE.3** est l'épicatéchine, et le pouvoir rotatoire précise qu'il s'agit de la (-)-épicatéchine (Foo *et al.*, 1996). L'épicatéchine réduit le taux de glucose dans les myocytes C2C12 (Deutschländer *et al.*, 2011).



(-) épicatechine

3.1.3.5. Composé PE.5

Le composé **PE.5** se présente sous forme blanchâtre. Il est visible à l'UV 254 et 366 nm. Il ne réagit pas avec la vanilline sulfurique. Son R_f est de 0,64 avec un éluant de DCM/MeOH (50/50, v/v) sur une plaque CCM analytique de phase inverse.

Le spectre RMN ¹H (**Figure 3- 11**), relativement simple montre 5 signaux à 1.23 (s, 6H), 1.28 (s, 6H), 7.12 (dd, J=2.4, 8.6 Hz, 2H), 7.36 (tl, J=2.1 Hz, 2H), 7.54 (d, J=8.6 Hz, 2H) (Figure).

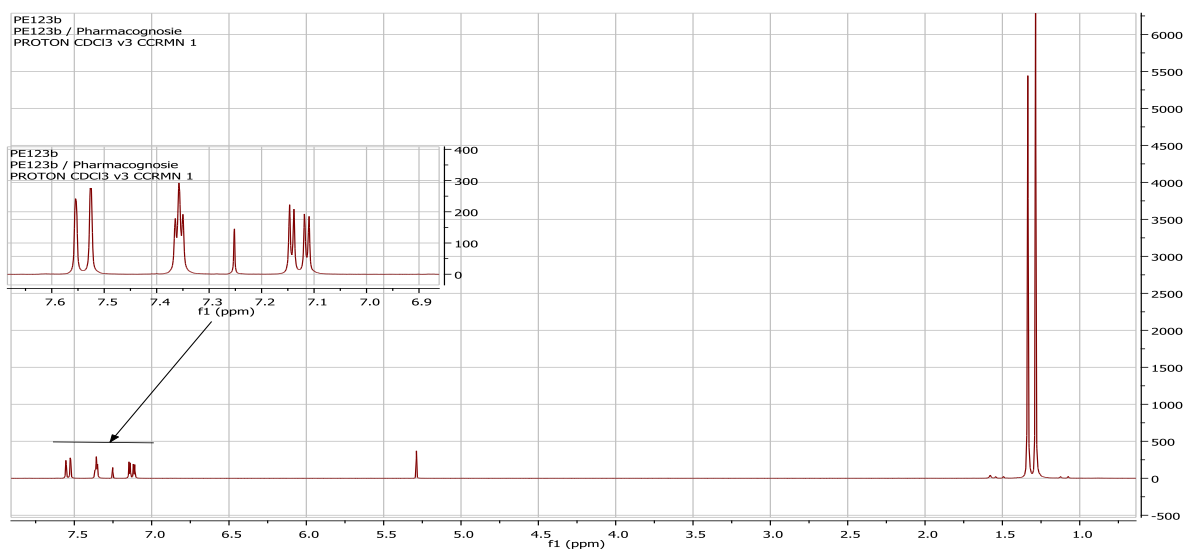


Figure 3- 11: Spectre RMN ^1H du composé **PE.5** (CDCl_3 , 300 MHz)

La présence des deux groupes de 6 méthyles, et les intégrales des protons aromatiques, suggèrent l'existence d'une symétrie dans la molécule. Par ailleurs, les multiplicités des protons aromatiques ne sont compatibles avec aucune structure (en particulier le triplet avec les constantes *mé*ta). Aussi, ce signal à δ 7.36 (tl, $J=2.1$ Hz, 2H) doit être interprété comme deux doublets *mé*ta, appartenant à deux systèmes de spins différents permettant ainsi d'envisager la présence de deux noyaux aromatiques portant 3 protons engagés dans un système ABX.

La notion de symétrie est retrouvée sur le spectre RMN ^{13}C où on observe 10 signaux entre 30.2 et 147.7 ppm, avec des déplacements parfois très proches (**Figure 3- 12**). On distingue ainsi 6 carbones aromatiques (entre 120 et 150 ppm), 2 carbones quaternaires à δ 34.5/34.9 et 2 signaux de méthyles à δ 30.2/30.4.

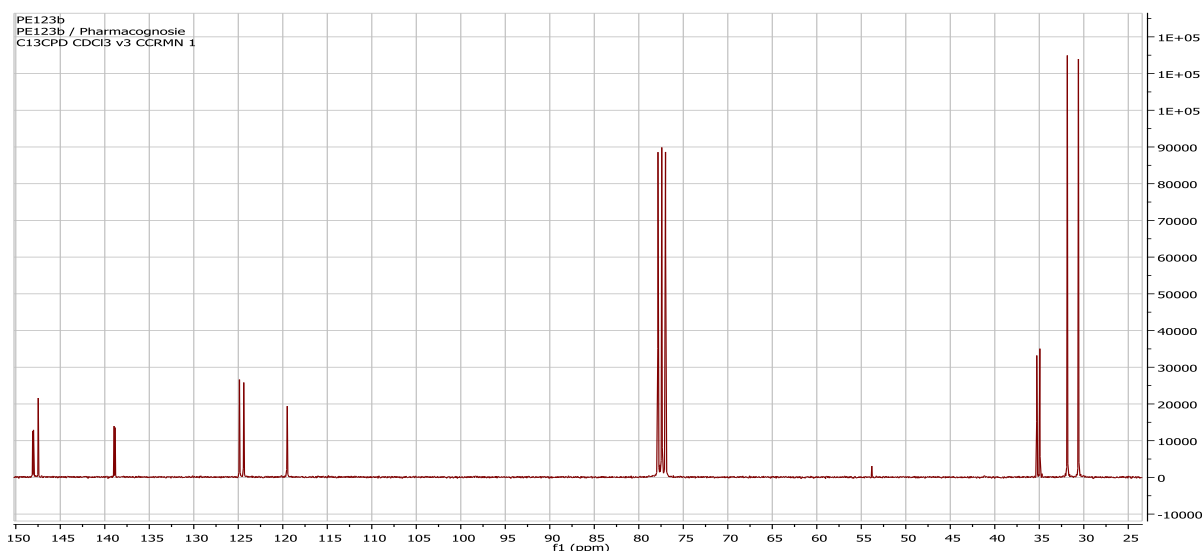


Figure 3- 12: Spectre RMN ^{13}C du composé **PE.5** (CDCl_3 , 300 MHz)

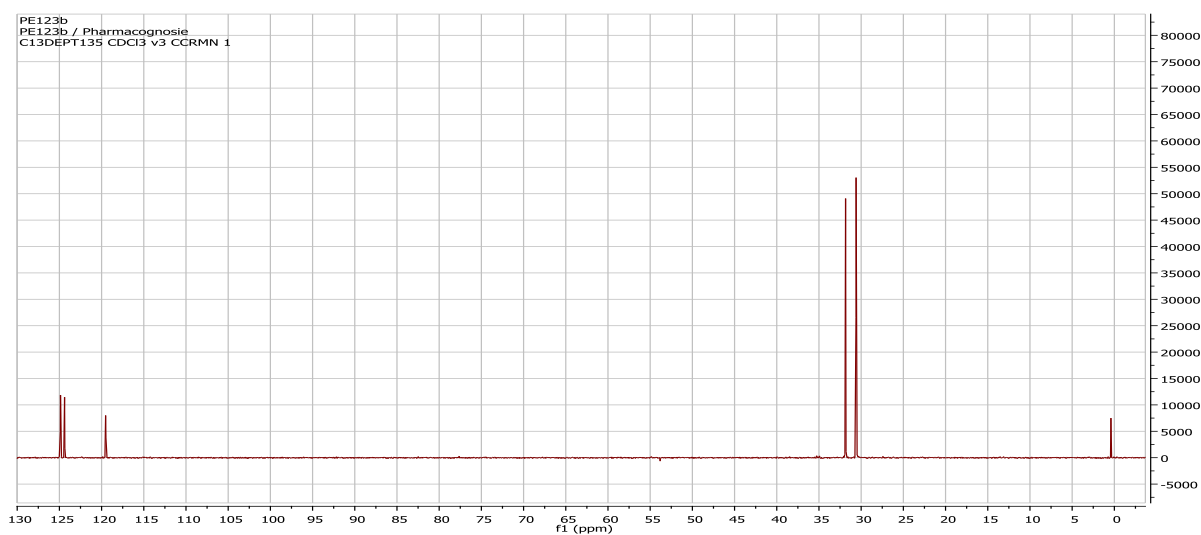
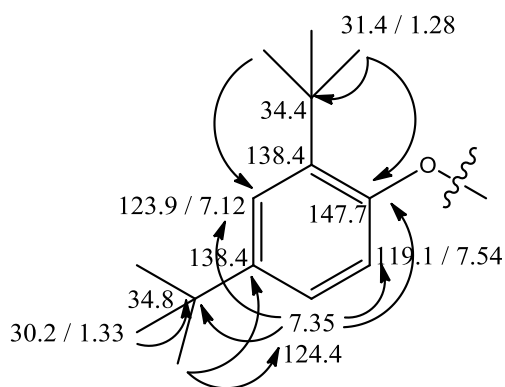
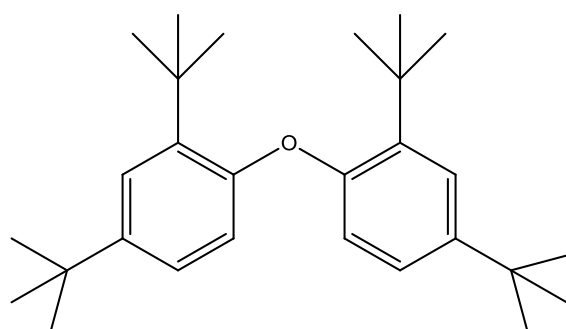


Figure 3- 13: Spectre DEPT 135 du composé **PE.5** (CDCl_3 , 300 MHz)

L'équivalence de 6 méthyles laisse penser à l'existence de 2 groupements de type tertiobutyl. La combinaison des corrélations COSY ^1H - ^1H , HSQC et HMBC a permis de proposer la sous-structure suivante pour **PE.5**.



Corrélations HMBC



Structure du composé PE.5

Il s'agit d'un composé nouveau. Les composés naturels présentant le motif terbutyl sont en effet rares dans le règne végétal. Des analyses (SM, UV) viendront confirmer ou infirmer ces hypothèses.

3.1.3.6. Composé PE.7

Le composé **PE.7** (2.6 mg) se présente sous forme de poudre blanche soluble dans le DCM et le CHCl_3 . Il absorbe à 254 et 366 nm et prend une coloration orange après révélation à la vanilline sulfurique puis chauffage. Son R_f est de 0.30 dans un mélange hexane/AcOEt (90/10, v/v) sur plaque CCM silice.

L'analyse du spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (**Figure 3- 14**) de ce composé met en évidence la majorité des signaux dans les hauts champs, ce qui est caractéristique d'un triterpène. On note la présence de huit groupements méthyles à δ_{H} 0.89 ; 0.94 ; 0.97 ; 0.99 ; 1.00 ; 1.03 ; 1.04 ; 1.17 ppm. Le spectre présente également :

- un double doublet à δ_{H} 2.50 ppm correspondant au proton méthylénique 1α ($1\alpha\text{-H}$)
- un double doublet à δ_{H} 3.83 ppm attribué au proton méthinique hydroxylé 3β ($3\beta\text{-H}$)
- un triplet à δ_{H} 2.39 ppm attribué au proton méthylénique 1β ($1\beta\text{-H}$)
- un multiplet à δ_{H} 1.84 ppm correspondant au proton méthylénique 6β ($6\beta\text{-H}$)
- un doublet à δ_{H} 3.54 ppm correspondant à un groupement -CH-OH

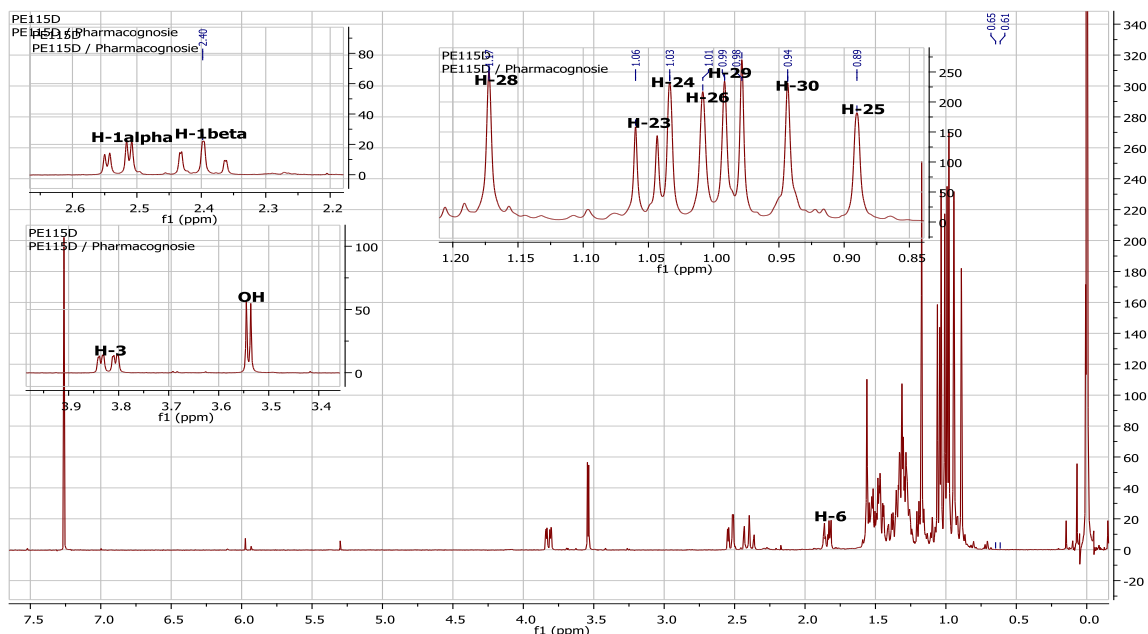


Figure 3- 14: Spectre RMN ^1H du composé PE.7 (400 MHz, CDCl_3)

L'analyse du spectre RMN ^{13}C (Figure 3- 15) met en évidence la présence de 30 signaux correspondant au nombre de carbones existants. Dans le champ le plus déblindé, le carbone à δ_{C} 211.9 ppm correspond au signal du carbone C-2 portant le groupe cétone. Le carbone C-3 portant le groupe OH apparait à δ_{C} 77.2 ppm. Le spectre DEPT 135 (Figure 3- 16) a apporté plus d'informations et a permis par déduction de déterminer sept carbones quaternaires dont C-2.

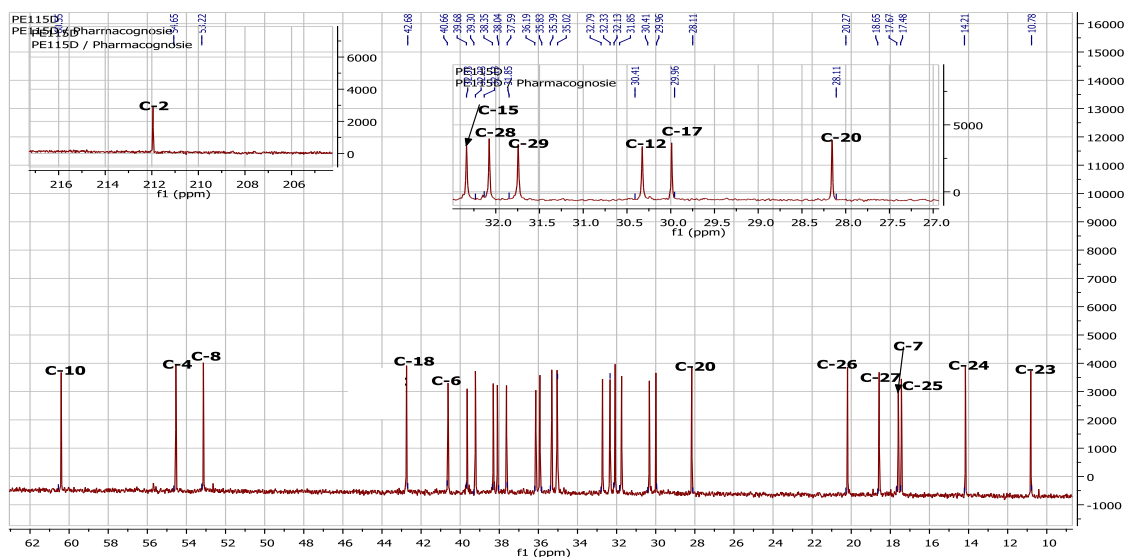


Figure 3- 15: Spectre RMN ^{13}C du composé PE.7 (400 MHz, CDCl_3)

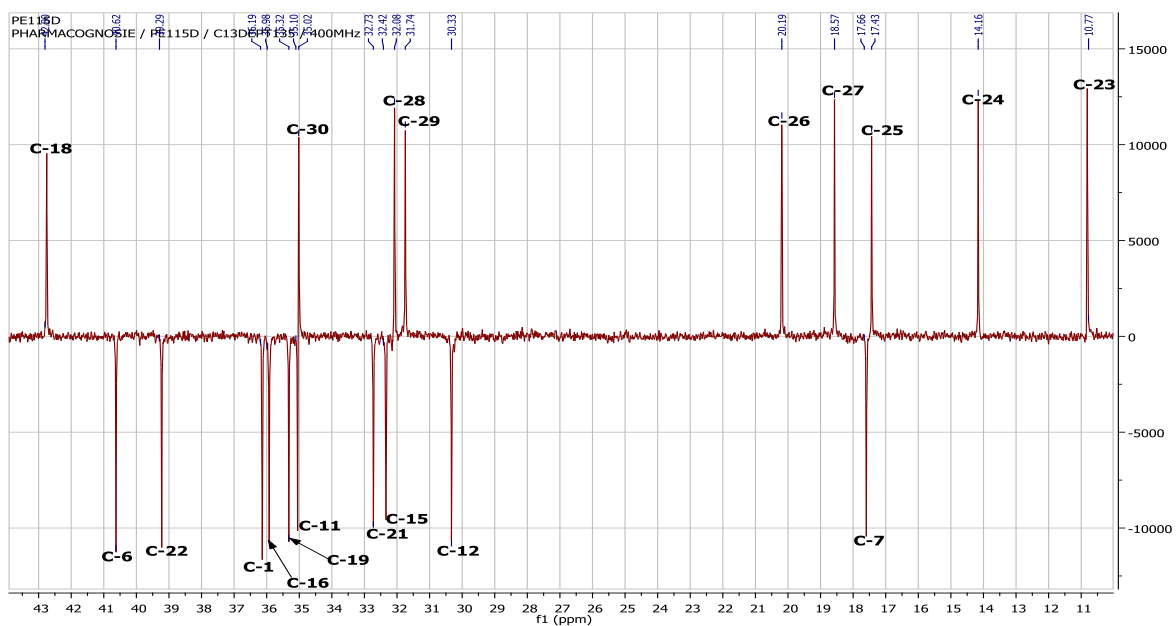


Figure 3- 16: Spectre DEPT 135 du composé PE.7 (400 MHz, CDCl_3)

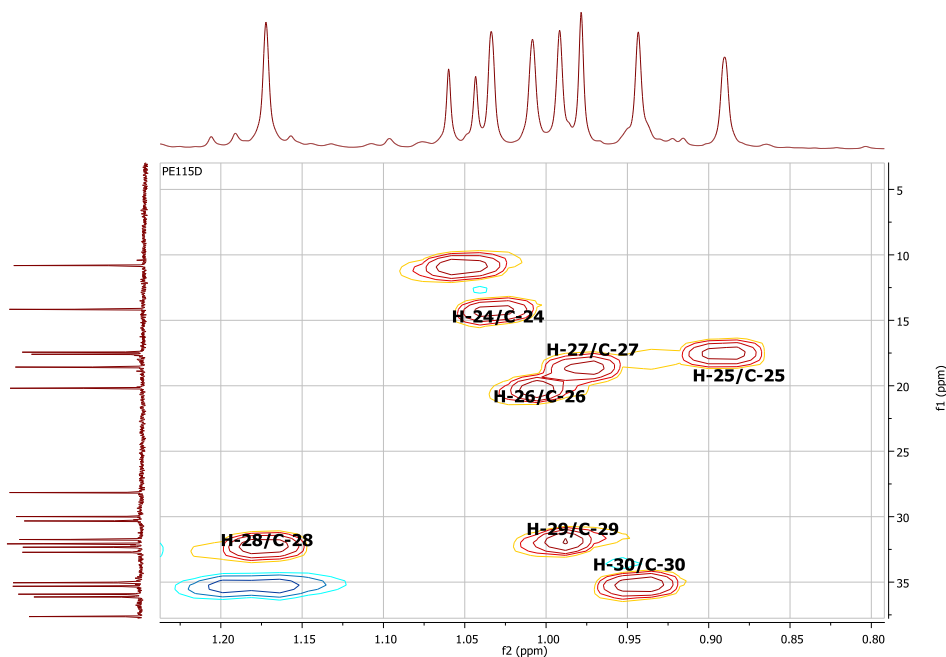
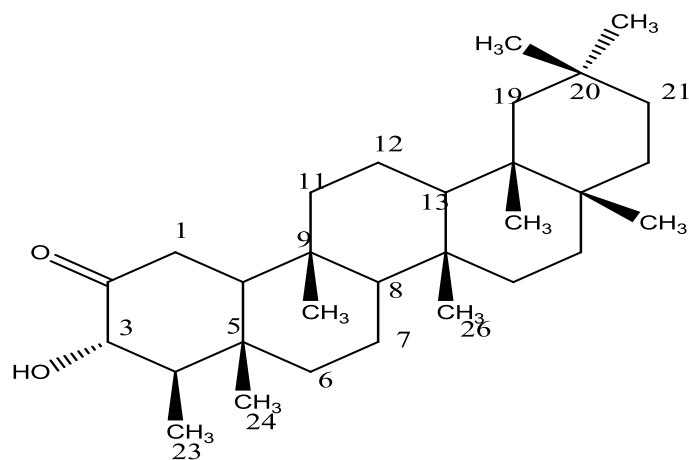


Figure 3- 17: Spectre HSQC du composé PE.7

L'expérience HSQC (Figure 3- 17) montre que les protons méthyliques H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-29 et H-30 sont rattachés respectivement aux carbones C-24 (14.2 ppm), C-25 (17.4 ppm), C-26 (20.2 ppm), C-27 (18.6 ppm), C-28 (32.1 ppm), C-29 (31.7 ppm) et C-30 (35.0 ppm). Sur la base des données apportées par les différents spectres (^1H et ^{13}C ,

DEPT) et celles de la littérature (Lingbo *et al.*, 2005) le composé **PE.7** s'avère être la 3 α -hydroxyfriedelan-2-one.



3 α -hydroxyfriedelan-2-one

3.1.3.7. Composé **PE.8**

Le composé **PE.8** (17.7 mg) se présente sous forme d'aiguilles blanches. Il prend une coloration bleue après révélation à la vanilline sulfurique puis chauffage (5 – 10 min à 100°C). Dans un système d'éluant MeOH/DCM (60/40, v/v) sur plaque CCM phase inverse, son Rf est de 0.66.

Le spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (**Figure 3- 18**) du composé **PE.8** présente les signaux rappelant là encore un triterpène dont huit méthyles angulaires à δ_{H} 0.79 ; 0.87 ; 0.91 ; 0.94 ; 0.98 ; 0.99 ; 1.02 ; 1.12 ppm. Nous observons également un proton vinylique à 5.25 ppm (t, $J= 3.6$ Hz, H-12) et un double doublet à 3.22 ppm (dd, $J=11.0, 4.9$ Hz, H-3) et 3.44 ppm (t, H-22) correspondant aux protons vicinaux.

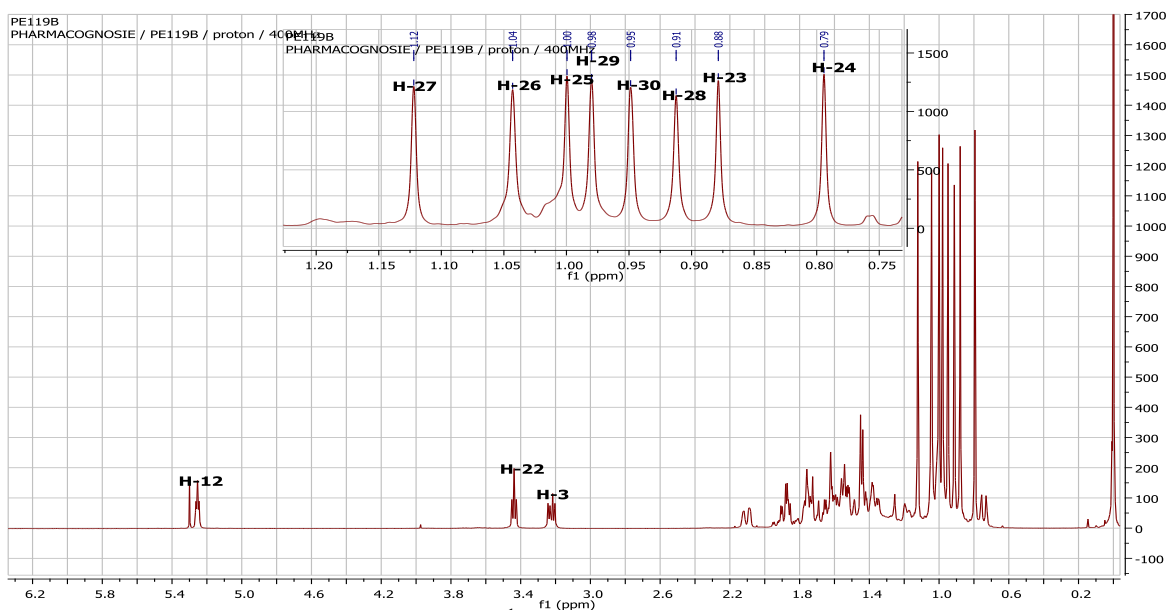


Figure 3- 18: Spectre RMN ^1H du composé PE.8 (CDCl_3 , 400 MHz)

Le spectre RMN ^{13}C (**Figure 3- 19**) présente 30 signaux dont les carbones des 8 méthyles et les carbones oléfiniques (120-145 ppm) mais le DEPT 135 °C (**Figure 3- 20**) a permis de faire la différence entre les CH_3 et les CH_2 dans cette zone. Ainsi, on note la présence des méthyles à δ_c 15.5 (C-25), 16.8 (C-26, C-24); 19.9 (C-27); 25.3 (C-30); 28.0 (C-23); 28.1 (C-28) et 32.7 (C-29).

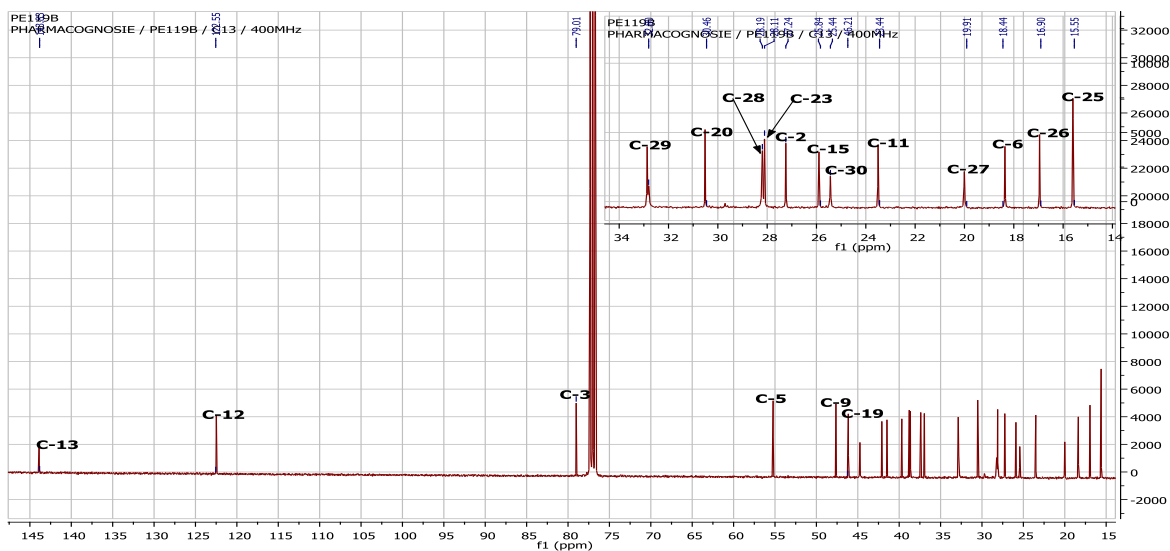


Figure 3- 19: Spectre RMN ^{13}C du composé PE.8 (CDCl_3 , 400 MHz)

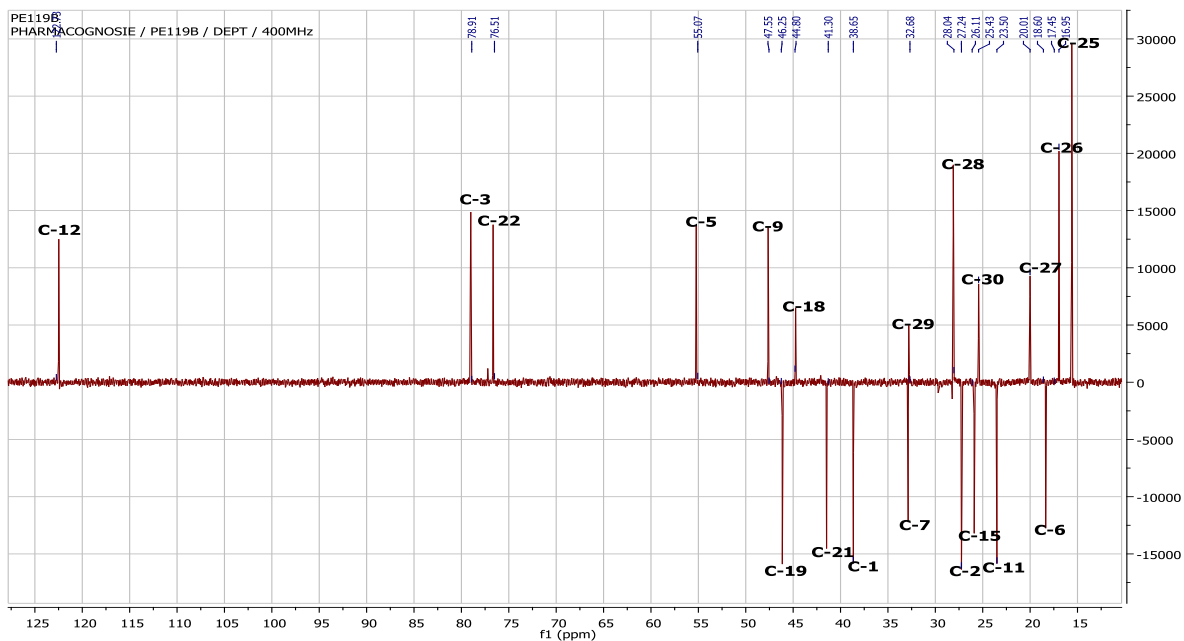


Figure 3- 20 : Spectre DEPT du composé PE.8 (CDCl₃, 400 MHz)

Les déplacements chimiques en RMN ¹³C des carbones oléfiniques C-12 et C-13 ont permis de faire la différence entre un triterpène de type oléanane et de type ursane. En effet, les carbones C-12 et C-13 ont des déplacements chimiques respectifs à δ_C 122.0 et 145.0 ppm pour les structures de type oléanane et δ_C 129.1 et 134.2 ppm pour les structures de type ursane (Mahato et *al.*, 1994). Ainsi, étant donné que notre spectre RMN ¹³C présente des signaux à δ_C 122.5 et 143.9 ppm pour les carbones C-12 et C-13, nous pouvons en déduire que le composé **PE.8** est de type oléanane.

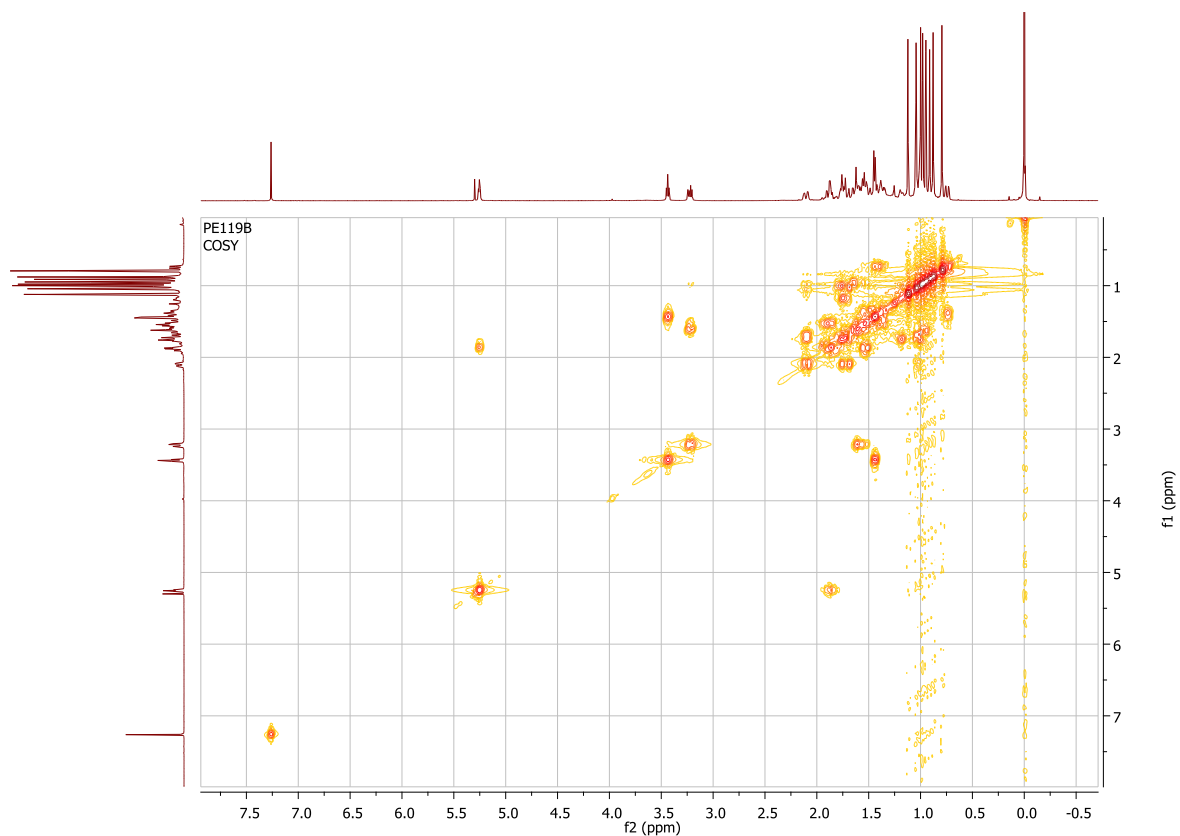
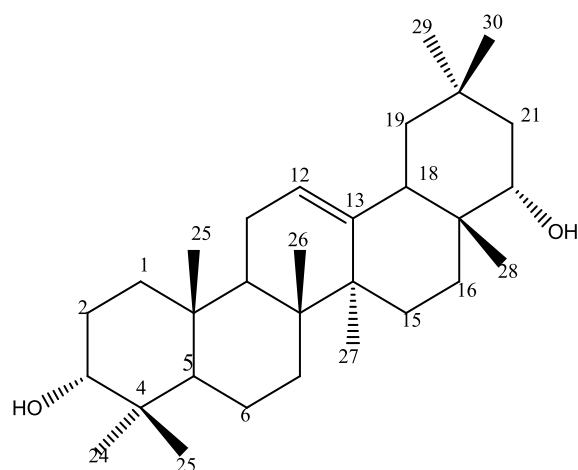


Figure 3- 21: Spectre COSY du composé **PE.8**

Les expériences RMN 2D COSY, HMQC et HMBC ainsi que les données de la littérature (Mahato *et al.*, 1994 ; Ndom *et al.*, 2001) ont permis de fixer les groupes OH sur les carbones C-3 et C-22. De plus, selon Ndom *et al.*, (2001) ces carbones hydroxylés ont pour déplacements chimiques δ_C 79.0 et 76.6 ppm lors d'une configuration α et 78.1 et 75.6 pour β . Sur le spectre RMN ^{13}C , C-3 et C-22 ont pour valeurs 79.0 et 76.7 ppm laissant supposer que le composé **PE.8** est de configuration α .

Ainsi, avec toutes ces informations fournies, le composé **PE.8** est identifié comme étant l' α -sophoradiol.

L'effet hépatoprotecteur du sophoradiol et ses hétérosides a été mené sur l'hépatotoxicité d'une lignée cellulaire hépatique (HepG2) induite par l'hydroperoxyde *tert*-butyle (*t*-BuOOH). L'étude a montré que le sophoradiol a le même effet que la substance de référence (la glycyrrhizine) (Kinjo *et al.*, 2003).



α -sophoradiol

3.1.3.8. Composé PE.9

Le Composé **PE.9** (14 mg) se présente sous forme de poudre blanche, il prend une coloration violette après révélation à la vanilline sulfurique puis chauffage. Son R_f est 0.40 dans hexane/AcOEt (80/20, v/v) sur CCM en phase normale.

Le spectre RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) (**Figure 3- 22**) de ce composé présente des signaux allant de 0.68 à 5.36 ppm. On observe la présence des six méthyles qui apparaissent à δ_H 0.68, 0.78, 0.82, 0.86, 0.91 et 1.03 ppm. L'analyse de ce spectre montre la présence de protons oléfiniques à δ_H 5.35 ppm (t, $J = 11.7$ Hz, H-6) ; 5.15 ppm (dd, $J = 15.2, 8.6$ Hz, H-22) et 5.02 ppm (dd, $J = 15.2, 8.6$ Hz, H-23). Le proton H-3 apparaît comme un multiplet à δ_H 3.51 ppm (Jamal, 2009).

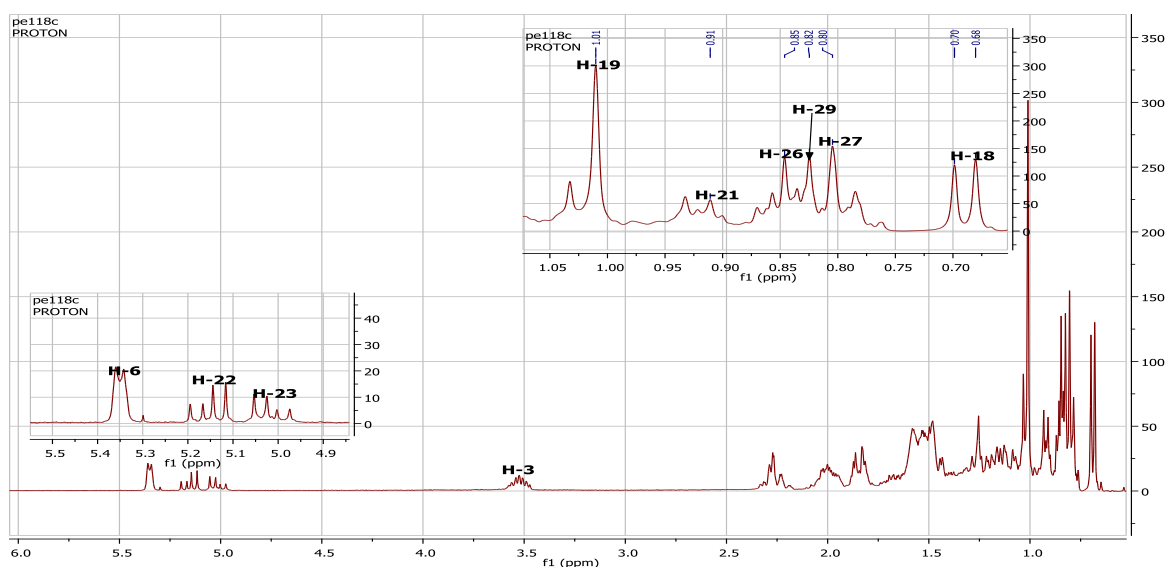


Figure 3- 22: Spectre RMN ¹H du composé PE.9 (CDCl₃, 300 MHz)

Le spectre RMN ^{13}C (**Figure 3- 23**) montre la présence de vingt neuf signaux. Les signaux des carbones C-5, C-22, C-3 et C-6 apparaissent à δ_{C} 140.7, 138.3, 129.3 et 121.7 ppm. Les déplacements chimiques des C-22, C-23 sont caractéristiques des Δ^{22} -stéroïdes (Rubinstein et *al.*, 1976). Les déplacements chimiques à δ_{H} 3.51 ppm et δ_{C} 71.8 ppm de C-3 ont montré l'existence d'un hydroxyle. A l'issue de l'analyse des informations apportées par les expériences DEPT (**Figure 3- 24**), COSY, HMQC et HMBC et par comparaison avec la littérature, le composé **PE.9** est identifié comme étant le stigmastérol.

Lagnika et *al.* (2008) ont rapporté les propriétés anti-inflammatoire, antipyrétique et antimutagénique du stigmastérol et du sitostérol. Le stigmastérol a été isolé de *Solanum melongena* L. (Solanaceae) et son inhibition sur la xanthine oxydase a été démontrée avec une IC_{50} de 98.7 μM comparée à celle de la quercétine (25.9) (Chiang et Chen, 1993).

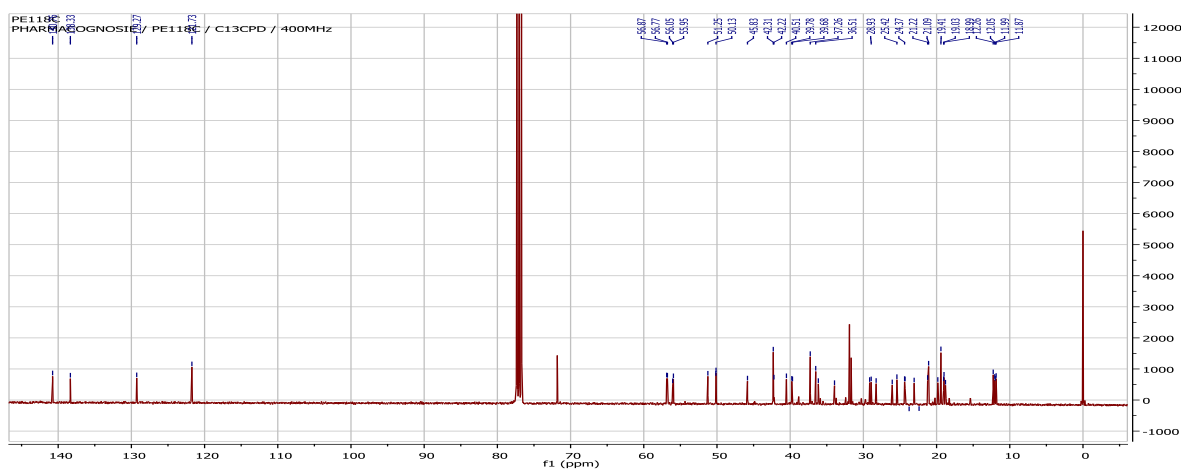


Figure 3- 23: Spectre RMN ^{13}C du composé PE.9 (CDCl_3 , 400 MHz)

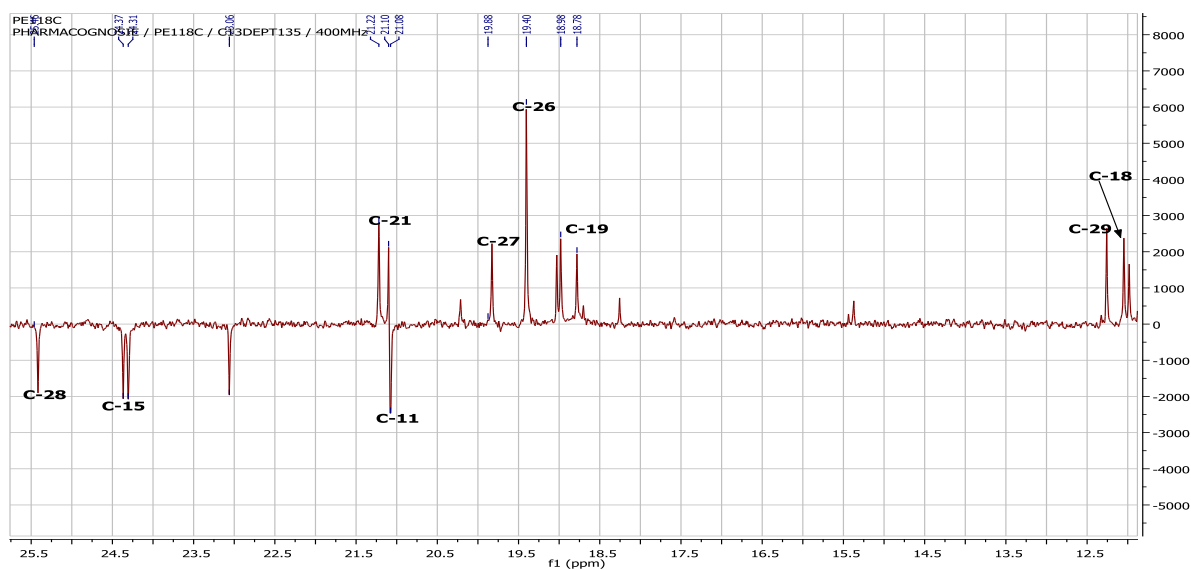
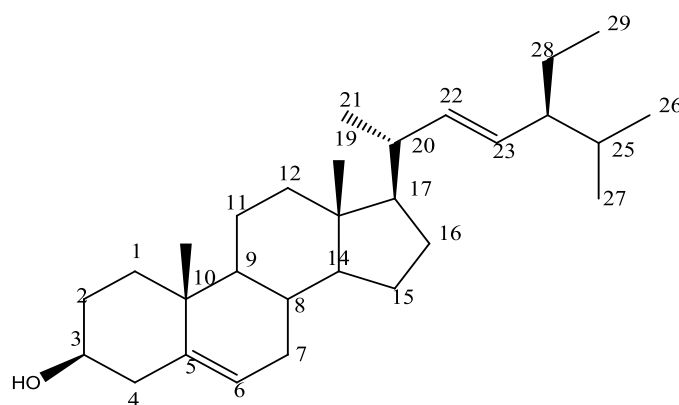


Figure 3- 24: Spectre DEPT du composé PE.9 (CDCl₃, 400 MHz)



Stigmastérol

3.1.3.9. Composé PE.11

Le composé **PE.11** (12.6 mg) a un aspect blanc. Après migration dans MeOH/AcOEt (50/50, v/v) sur plaque CCM phase normale puis révélation à la vanilline sulfurique il apparait jaune-brun et est visible à l'UV 254 nm. Son Rf est de 0.36.

Le spectre RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) (**Figure 3- 25**) du composé **PE.11** présente des signaux allant de δ_H 1.80 à 8.00 ppm. L'analyse montre la présence de protons osidiques dont les déplacements chimiques se situent entre δ_H 3.36 à 3.20 ppm, et protons anomériques à δ_H 4.80 (d, J= 7.2 Hz) et 4.9 (d, J= 2.3 Hz). La constante de couplage de 7.2 Hz du signal à 4.8 ppm permet de déterminer la configuration du sucre correspondant comme étant β. La

présence de doublets à δ_H 8.00, 6.5 et d'un singlet à 2.4 ppm suggère l'existence d'un groupe maltol (Haizhou et *al.*, 2007).

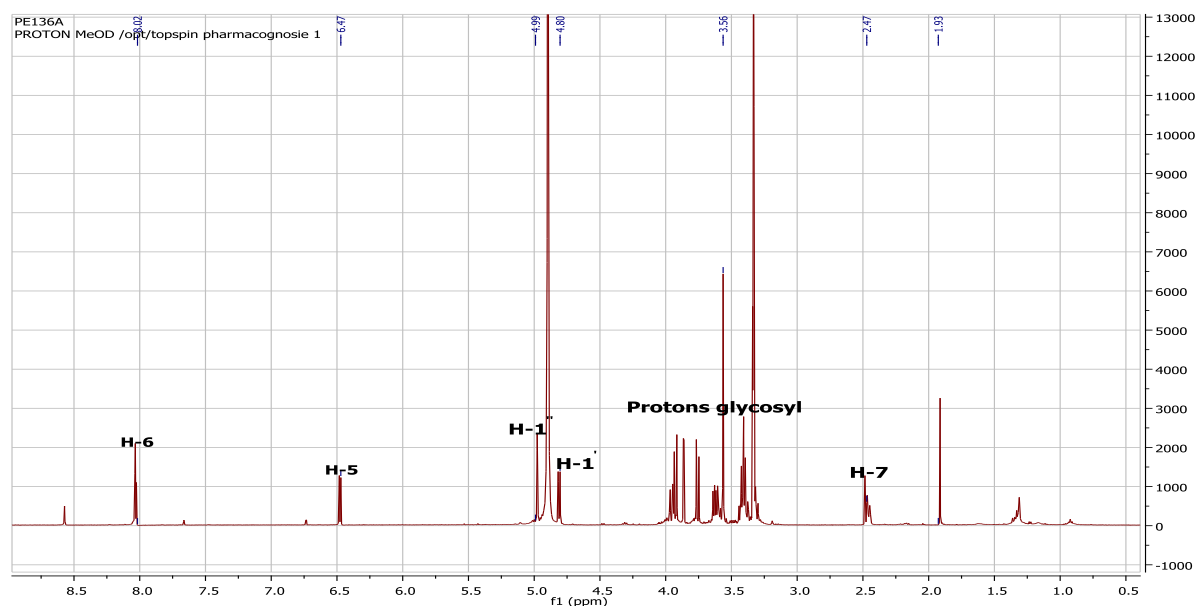


Figure 3- 25: Spectre RMN 1H du composé PE.11 (CD_3OD , 300 MHz)

Le spectre RMN ^{13}C (500 MHz, CD_3OD) (**Figure 3- 26**) met en évidence l'existence d'un composé comportant 17 carbones. Par déduction avec l'expérience de DEPT 135°C (**Figure 3- 27**) on dénombre quatre carbones quaternaires. L'expérience de corrélation hétéronucléaire HSQC (**Figure 3- 28**) a permis d'établir des liaisons géminales 1H - ^{13}C de ce composé. Ainsi, les protons anomériques H-1' (4.80 ppm) et H-1'' (4.95 ppm) ainsi que le proton H-5 (6.45 ppm) sont respectivement liés aux carbones situés à δ_C 105.0, 111.0 et 118.0 ppm. Le spectre des corrélations hétéronucléaires HMBC (**Figure 3- 29**) a permis d'identifier des corrélations entre le proton anomérique H-1'' et les carbones C-6', C-4'', C-2'' et C-3'' ; ainsi qu'entre H-1' et C-5'. Ainsi le second sucre est lié au premier sur le C-6' et la chaîne est, elle-même, portée par le C-3 du maltol.

Les analyses des spectres RMN 1H et ^{13}C , DEPT 135, COSY, HSQC, ainsi que la mesure de constantes de couplage ont permis d'identifier les unités osidiques comme étant un β -apiofuranosyl et un β -glucopyranosyl. Les données de la littérature ont enfin, permis de déterminer la structure complète du composé **PE.11** comme étant le maltol -3-*O*-[β -apiofuranoside- β -(1-6)-glucopyranoside] (Haizhou et *al.*, 2008).

Haizhou et *al.* (2008) ont isolé pour la première fois le maltol 6'-*O*- β -apiofuranoside- β -glucopyranoside d'*Elsholtzia rugulosa* Hemsl. (Lamiaceae). A notre connaissance aucune activité biologique n'a été rapportée pour ce composé.

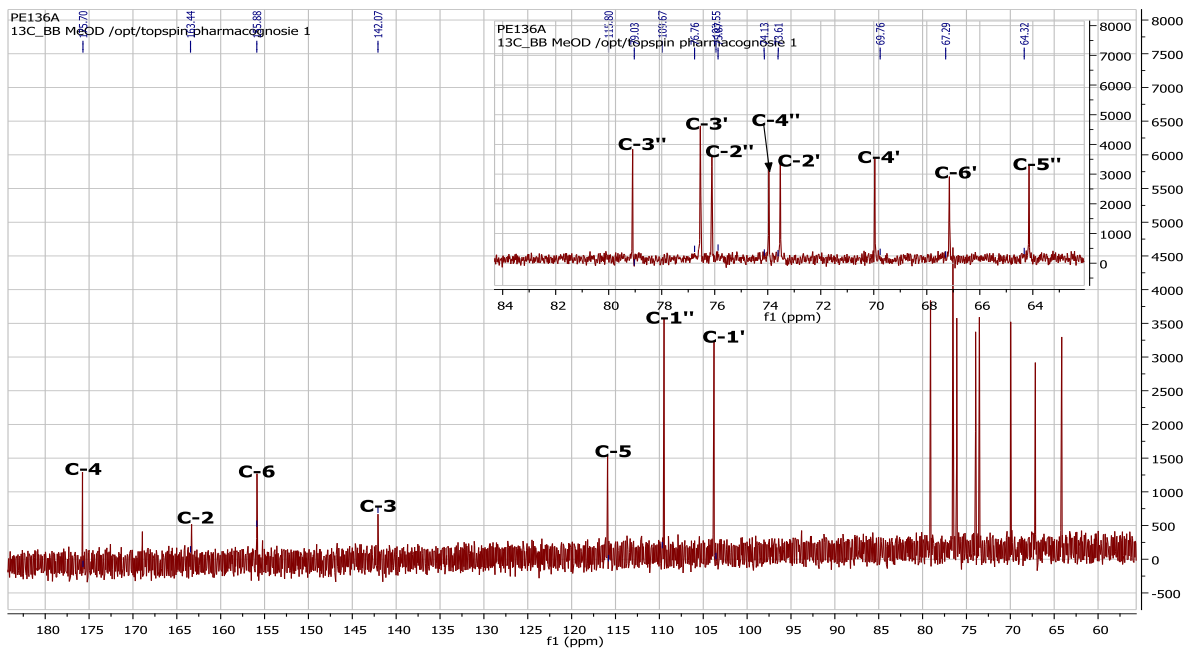


Figure 3- 26: Spectre RMN ^{13}C du composé PE.11 (CD_3OD , 300 MHz)

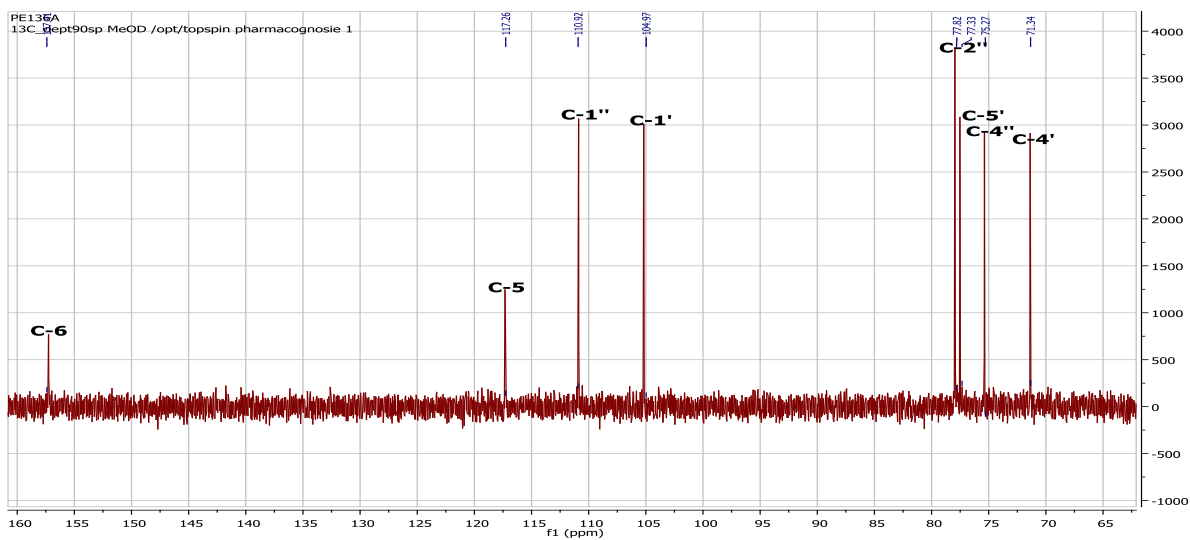


Figure 3- 27: Spectre DEPT du composé PE.11 (CD_3OD , 300 MHz)

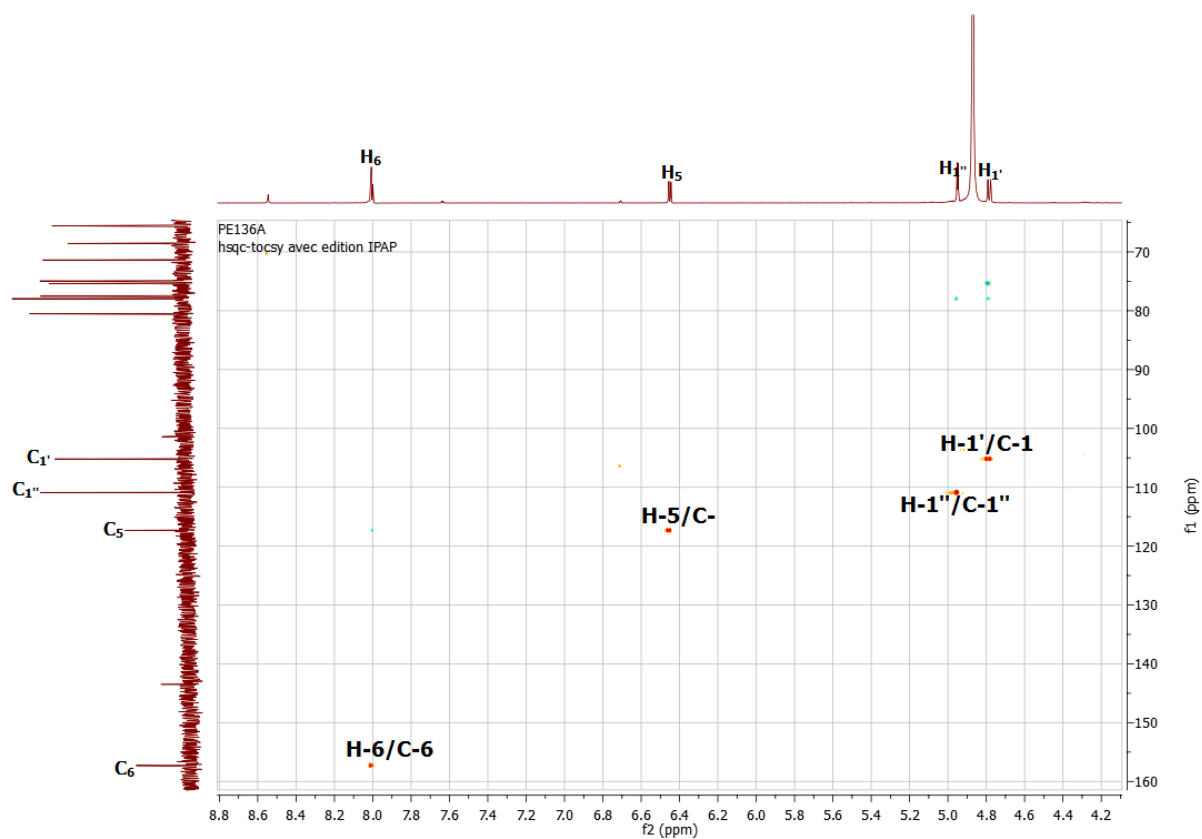


Figure 3- 28: Spectre HSQC du composé PE.11 (CD₃OD, 300 MHz)

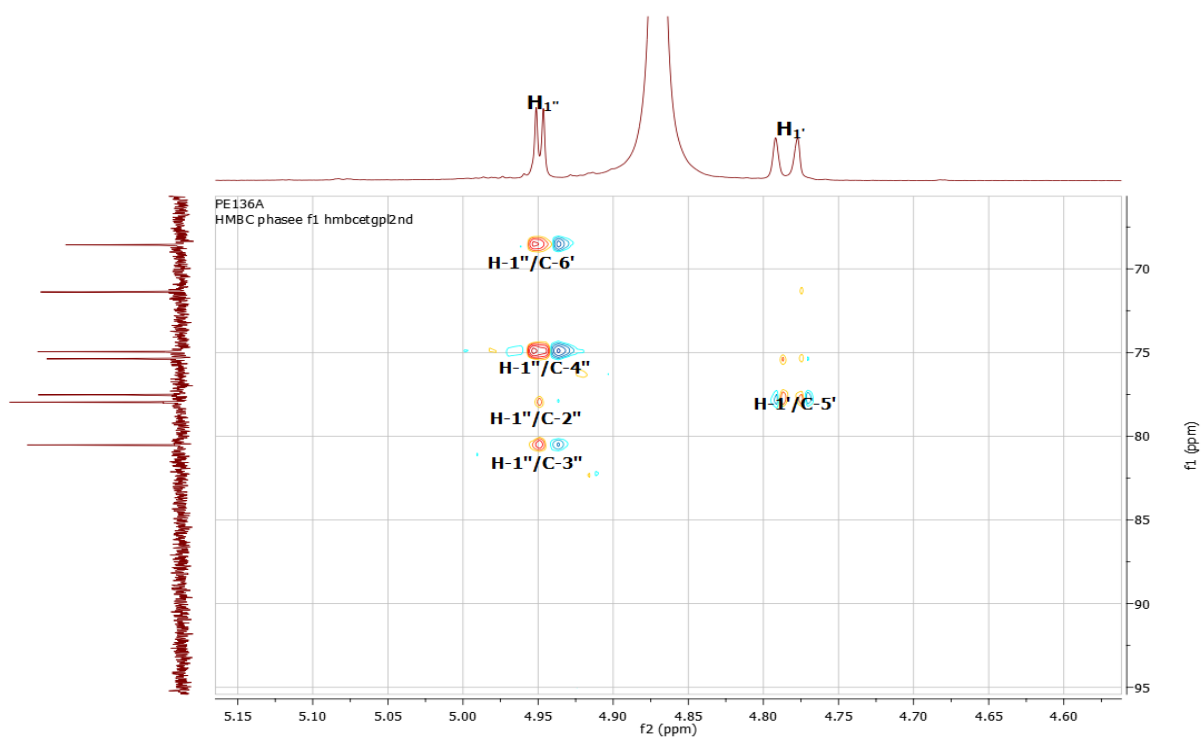
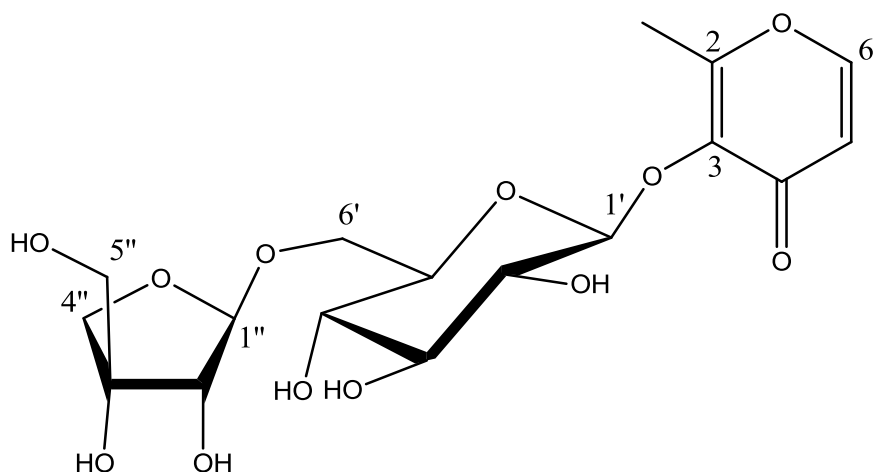


Figure 3- 29: Spectre HMBC du composé PE.11



maltol 3-O-[\beta-apiofuranoside-\beta-(1-6)-glucopyranoside]

3.1.3.10. Composé PE.12

Le composé PE.12 (21.5 mg) a un aspect blanc. Après révélation à la vanilline sulfurique il apparaît jaune-brun et est visible à l'UV 254 nm. Son R_f est de 0,60 avec un éluant de MeOH/AcOEt (50/50, v/v) sur une plaque CCM silice.

Les spectres RMN du composé PE.12 rappellent beaucoup ceux de **PE.11**. En effet, sur le spectre RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) (Figure 3- 30) on retrouve des signaux correspondant à deux unités osidiques de 3.5 à 4.9 ppm. La présence de deux protons anomériques suggère qu'ici aussi le composé comporte deux sucres. Parallèlement à ces signaux, le spectre montre deux protons éthyléniques à δ_H 6.7 (s, 1H) et δ_H 7.6 (s, 1H) et d'un méthyl singulet à 2.5 ppm. Ces derniers protons rappellent fortement le maltol du composé précédent. Cependant, les deux éthyléniques ne doivent pas être sur la même double liaison car ils résonnent sous forme de singulet.

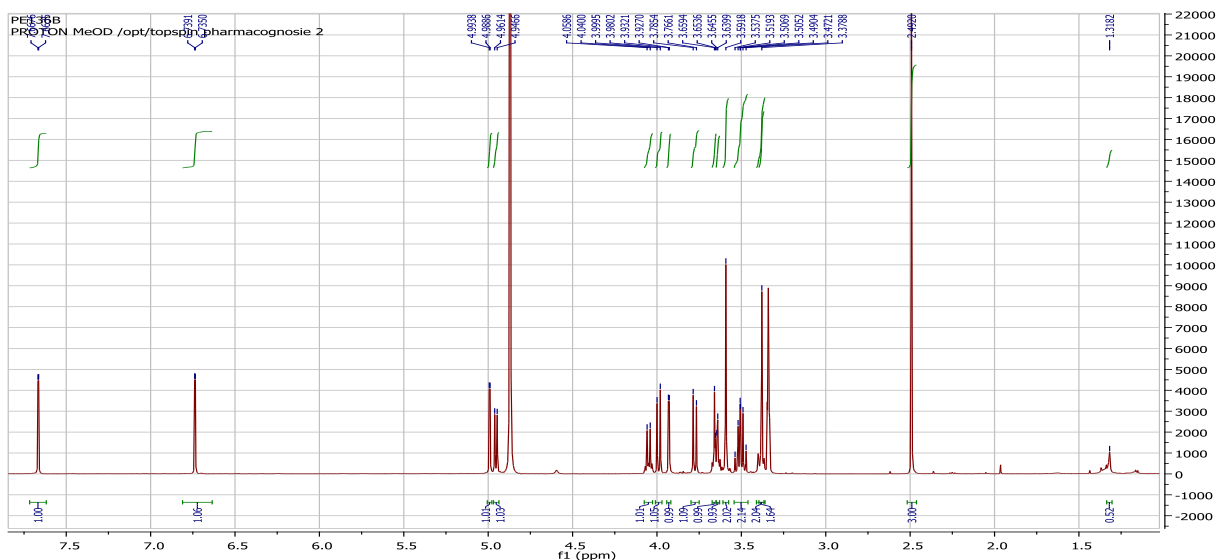


Figure 3- 30: Spectre RMN ^1H du composé PE.12 (CD_3OD , 300 MHz)

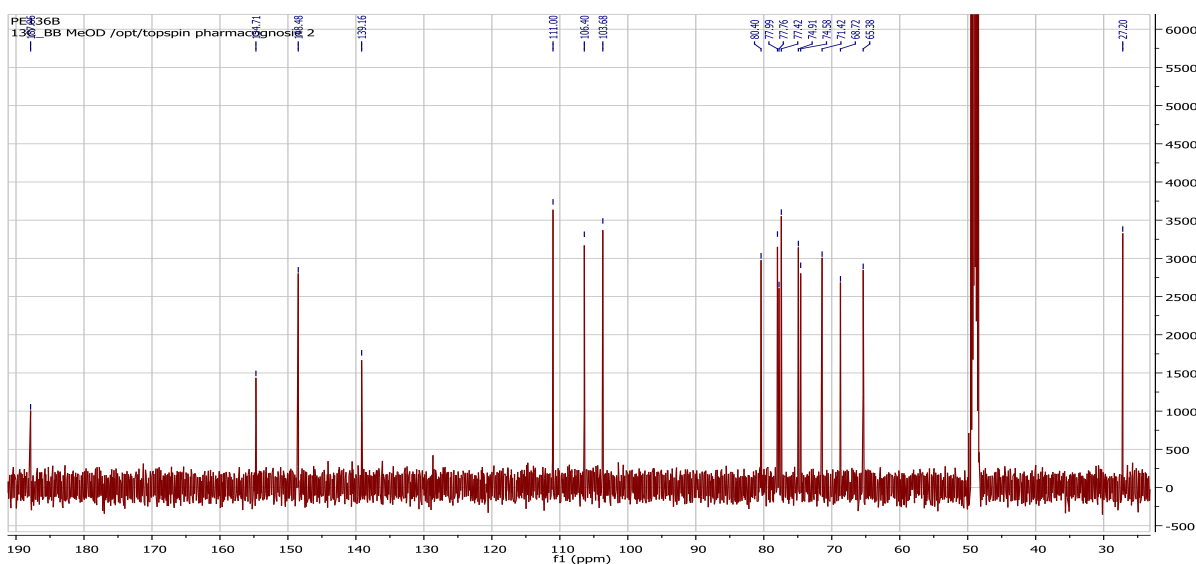
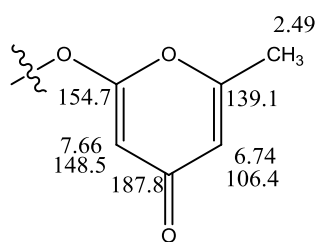


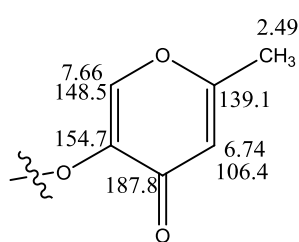
Figure 3- 31: Spectre RMN ^{13}C du composé PE.12 (CD_3OD , 300 MHz)

L'analyse du spectre COSY ^1H - ^1H permet d'identifier les deux sucres au β -glucopyranose et au β -apiofuranose. Sur le spectre RMN ^{13}C la partie aglycone comporte 6 carbones à δ 27.2 (CH_3), 106.4 (CH), 139.1 (C), 148.5 (CH), 154.7 (C) et 187.8 (C). Les corrélations HMBC observées à travers 2 ou 3 liaisons ont permis de proposer différentes possibilités de structure (entre parenthèses des corrélations de faible intensité):

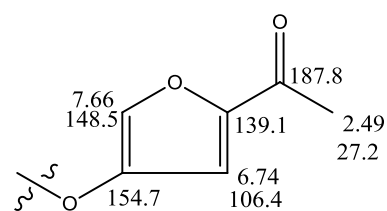
- δ_{H} 2.49 / δ_{C} 139.1, 187.8
- δ_{H} 6.74 / δ_{C} 139.1, 148.5, (154.7), (187.8)
- δ_{H} 7.66 / δ_{C} 106.4, 139.1, 154.7, (187.8).



Proposition A



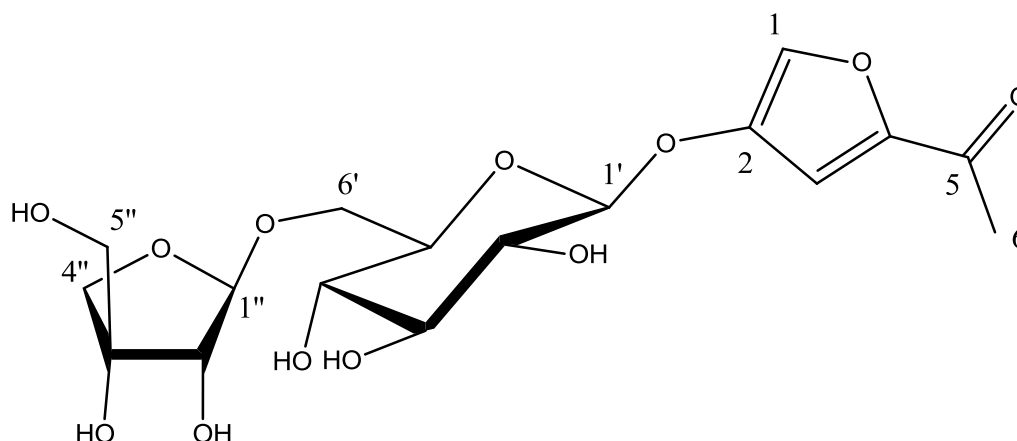
Proposition B



Proposition C

La structure permettant d'observer exactement toutes les corrélations HMBC est la proposition C.

De plus, un des protons anomériques (δ 4.95, d, $J = 2,6$ Hz) présente une corrélation avec le carbone à δ 154.7 indiquant ainsi le point de fixation de la chaîne osidique sur ce synthon. La recherche bibliographique n'a fait ressortir aucune structure équivalente. La combinaison des corrélations COSY ^1H - ^1H , HSQC et HMBC a permis de proposer pour le composé PE.12 la structure suivante :



Les logiciels de simulations de spectres RMN ont apporté également des éléments en faveur de cette structure. Des données d'analyses (SM, UV) viendront confirmer ou infirmer ces hypothèses.

3.1.3.11. Composé PE.14

Le composé **PE.14** (3.1 mg) a un aspect jaune. Il est visible à l'UV 254 et 366 nm. Il prend une coloration orange avec le réactif DBA caractéristique de la présence d'un flavonoïde portant deux hydroxyles sur le noyau B (Brasseur et Angenot, 1986). Son R_f est de 0.33 sur une plaque CCM de phase inverse, après migration dans MeOH/H₂O (70/30, v/v).

Le spectre RMN ^1H (300 MHz, acétone- d_6) (**Figure 3- 32**) présente des protons confirmant la présence d'un flavonoïde. Les protons H-6 et H-8 du cycle A apparaissent en doublet, avec une faible constante de couplage, respectivement à δ_{H} 6.21 et 6.51 ppm. Les protons H-2', H-5' et H-6' du cycle B sont situés à δ_{H} 7.52, 6.98 et 7.45 ppm respectivement.

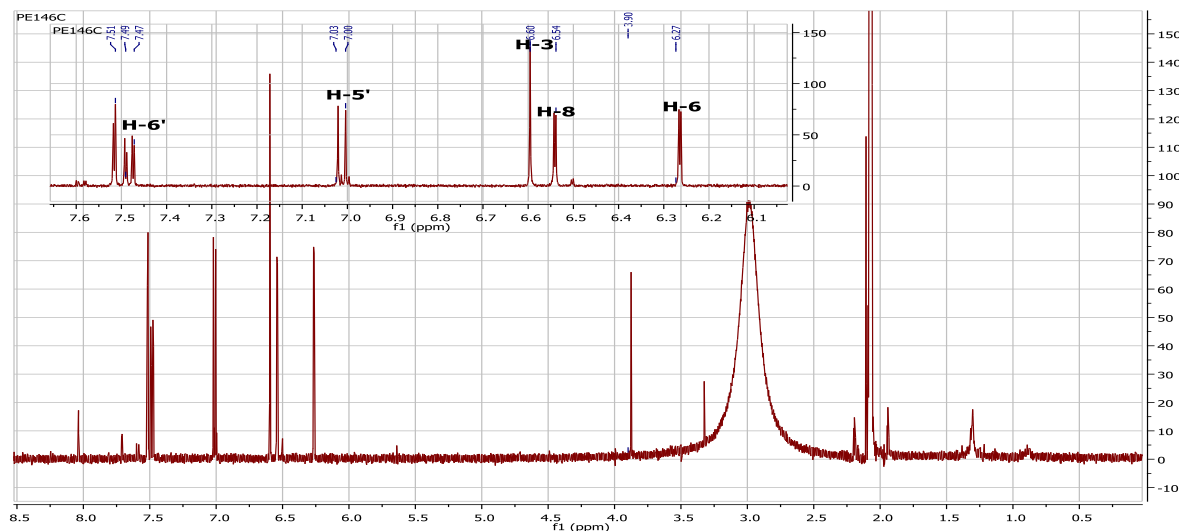


Figure 3- 32: Spectre RMN ^1H du composé PE.14 (acétone- d_6 , 300 MHz)

L'analyse du spectre RMN ^{13}C (**Figure 3- 33**) indique la présence de 15 carbones. L'expérience de DEPT 135 présente 6 signaux correspondant aux carbones tertiaires CH ; et par déduction 9 carbones quaternaires ont été identifiés.

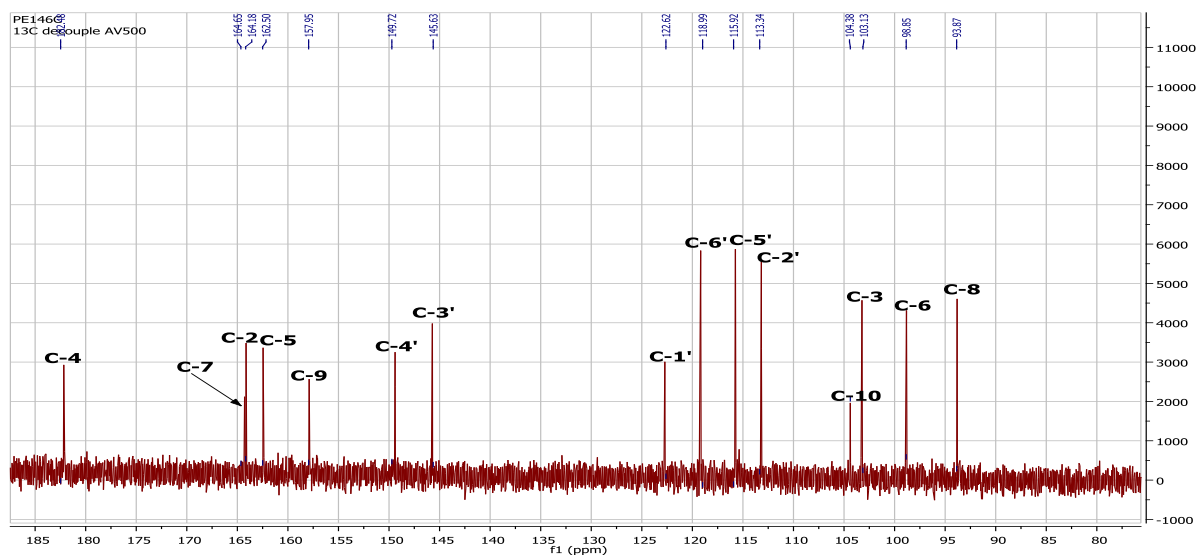


Figure 3- 33: Spectre RMN ^{13}C du composé PE.14 (acétone- d_6 , 300 MHz)

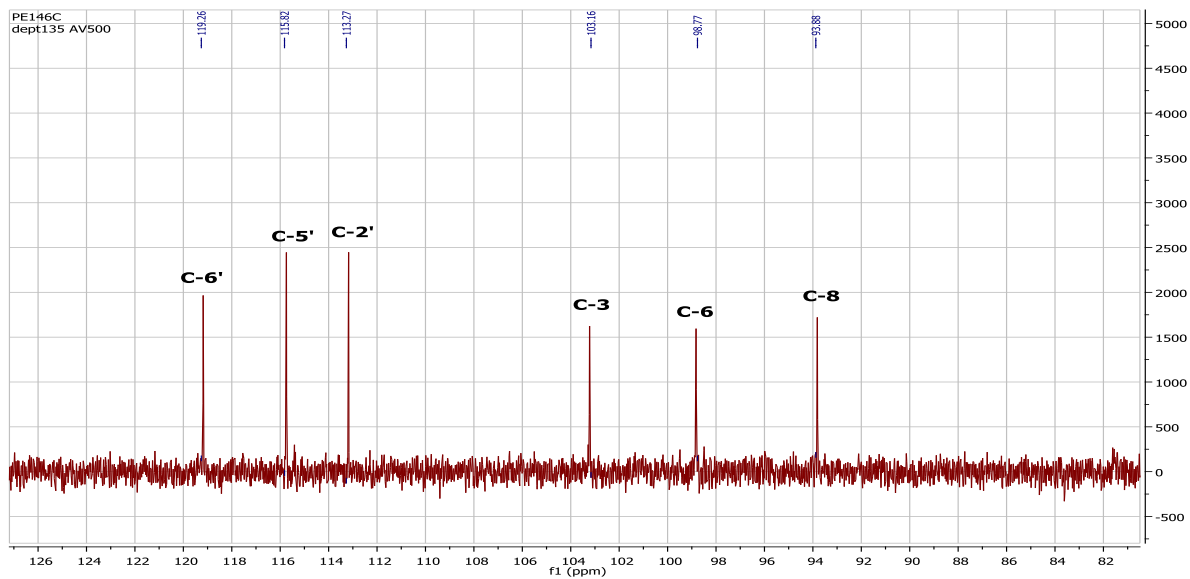
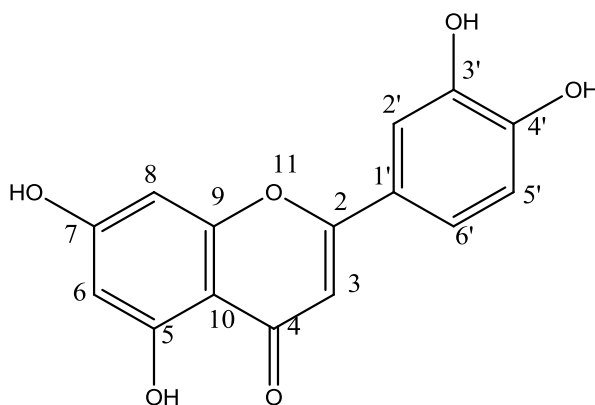


Figure 3- 34: Spectre DEPT du composé PE.14 (acétone- d_6 , 300 MHz)

Les informations fournies par les spectres RMN ^1H , ^{13}C et l'expérience de DEPT 135 (Figure 3- 34) concordent avec les données de la littérature (Bennaghmouch et *al.*, 2002). Ainsi, le composé **PE.14** est identifié comme la lutéoline.

Ferreira et *al.* (2010) ont rapporté que la lutéoline inhibe les germes de *Plasmodium falciparum* de souche chloroquine-sensible (3D7) et chloroquine-résistante (7G8) à des concentrations respectives de 11 et 12 μM . Ces auteurs ont rapporté également les effets anticancéreux et inhibiteurs de la prolifération cellulaire et de l'angiogénèse.



Lutéoline

3.1.3.12. Composé PE.15

Le composé **PE.15** (6.5 mg) se présente sous forme de poudre jaune. Il est visible à l'UV 254 et sombre à 366 nm. Il prend une coloration jaune au visible après migration dans AcOEt/MeOH/H₂O (70/17/13, v/v/v) puis pulvérisation avec le DBA. Le R_f est de 0.47 sur phase normale.

L'analyse du spectre RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) (**Figure 3- 35**) présente des doublets à δ_H 6.2 et à 6.4 ppm caractéristiques de protons aromatiques. Ces déplacements chimiques correspondent respectivement aux protons *mé*ta H-6 et H-8 du cycle A des flavonoïdes. Le spectre indique des protons à δ_H 6.9, 7.5 et 7.6 ppm correspondant aux protons du cycle B. L'observation des protons à δ_H 4.7 (d, J= 7.2 Hz) et 5.3 (d, J= 7.6 Hz) indique la présence de deux protons anomériques de configuration β. Les autres protons osidiques sont situés entre 3.2 et 3.8 ppm.

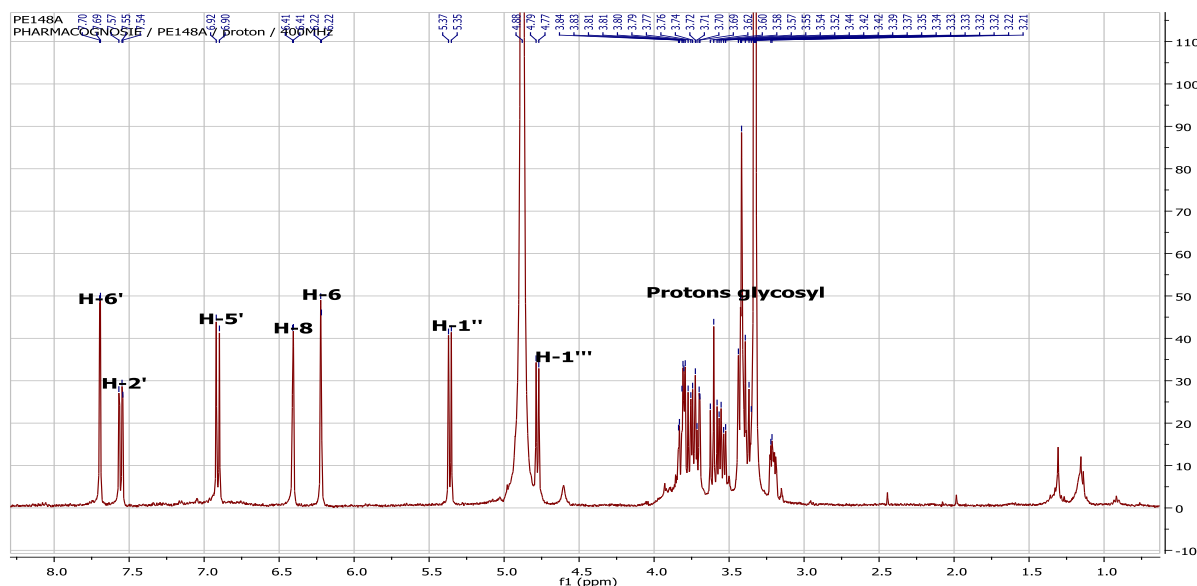


Figure 3- 35: Spectre RMN ¹H du composé PE.15 (CD₃OD, 400 MHz)

Le spectre RNM ¹³C (**Figure 3- 36**) présente 27 signaux. L'expérience de la DEPT (**Figure 3- 37**) a permis de mettre en évidence la présence d'un carbone secondaire CH₂. Le spectre de corrélations hétéronucléaires à courte distance HSQC (**Figure 3- 38**) permet d'établir des corrélations entre H-8, H-6 et les carbones C-8, C-6 ; ainsi que les protons anomériques (H-1'' et H-1''') et les carbones (C-1'' et C-1'''). Sur le spectre HMBC, les protons anomériques à δ_H 4.74 (H-1''') et 5.34 (H-1'') montrent des corrélations permettant de déterminer leur point de fixation en C-2'' (82.9 ppm) et en C-3 (135.1 ppm), respectivement.

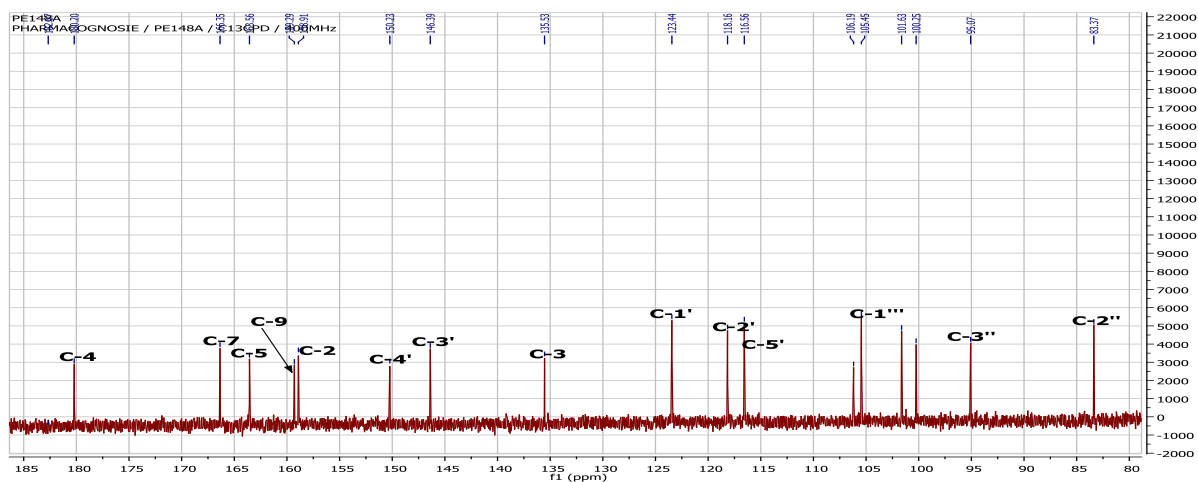


Figure 3- 36: Spectre RMN ^{13}C du composé PE.15 (CD_3OD , 400 MHz)

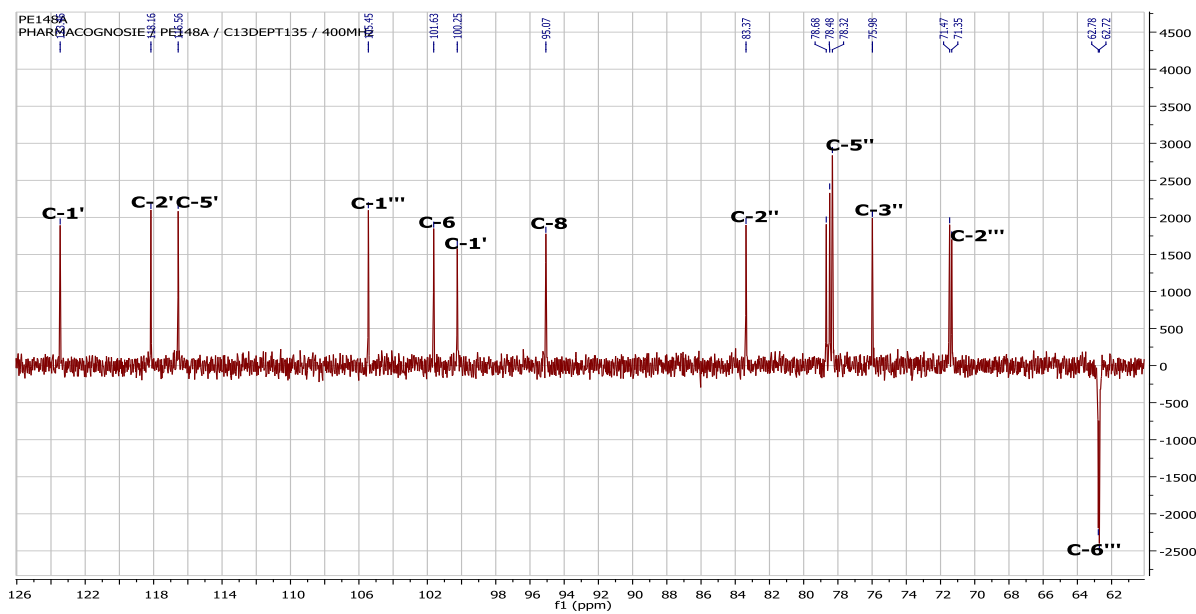


Figure 3- 37: Spectre DEPT du composé PE.15 (CD_3OD , 400 MHz)

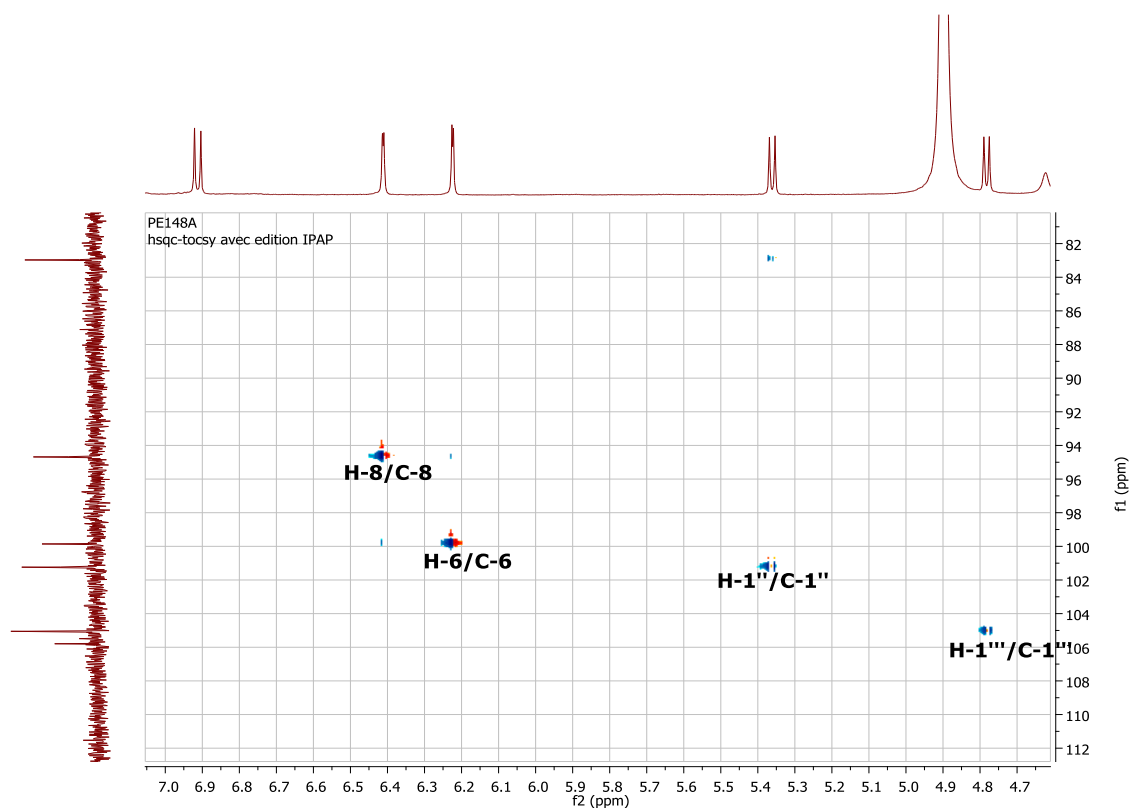
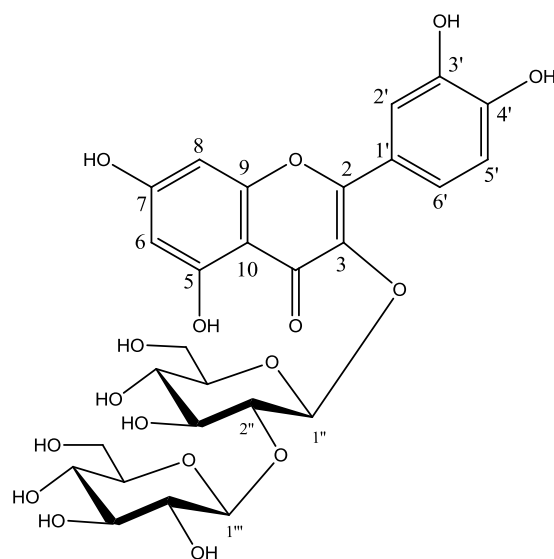


Figure 3- 38: Spectre HSQC du composé PE.15

Avec les informations basées sur les expériences de DEPT 135 (Figure 3- 37), HSQC (Figure 3- 38) et HMBC et les données de littératures (Samir et *al.*, 2005), le composé **PE.15** est identifié comme étant le quercétine-3-*O*-sophoroside.

L'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique et le pouvoir antioxydant de quercétine-3-*O*-sophoroside ont été montrés par Plumb et *al.* (1997).



quercétine-3-*O*-sophoroside

3.1.3.13. Composé PE.16

Le composé **PE.16** (32 mg) se présente sous forme de poudre jaune. Il est observable à l'UV 254 nm et apparaît sombre à l'UV 366 nm ; il prend une coloration jaune au visible après migration dans AcOEt/MeOH/H₂O (70/17/13, v/v/v) puis révélation au DBA. Son R_f est de 0.70.

Le spectre RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) (**Figure 3- 39**) du composé **PE.16** a la même allure que celui de **PE.15**. Mais la seule différence observée est la présence d'un seul proton anomérique H-1''. Les protons aromatiques H-6 et H-8 du cycle A des flavonoïdes apparaissent respectivement à δ_H 6.14 et 6.32 ppm. Les protons situés à δ_H 7.67 (s, 1H), 7.53 (dd, *J* = 8.4, 1.6 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H) correspondent respectivement aux protons H-2', H-6' et H-5' du cycle B des flavonoïdes. Le seul proton anomérique H-1'' apparaît à δ_H 5.20 ppm (d, *J* = 7.3 Hz, 1H). La valeur de la constante de couplage suggère une configuration β pour la partie glycoside.

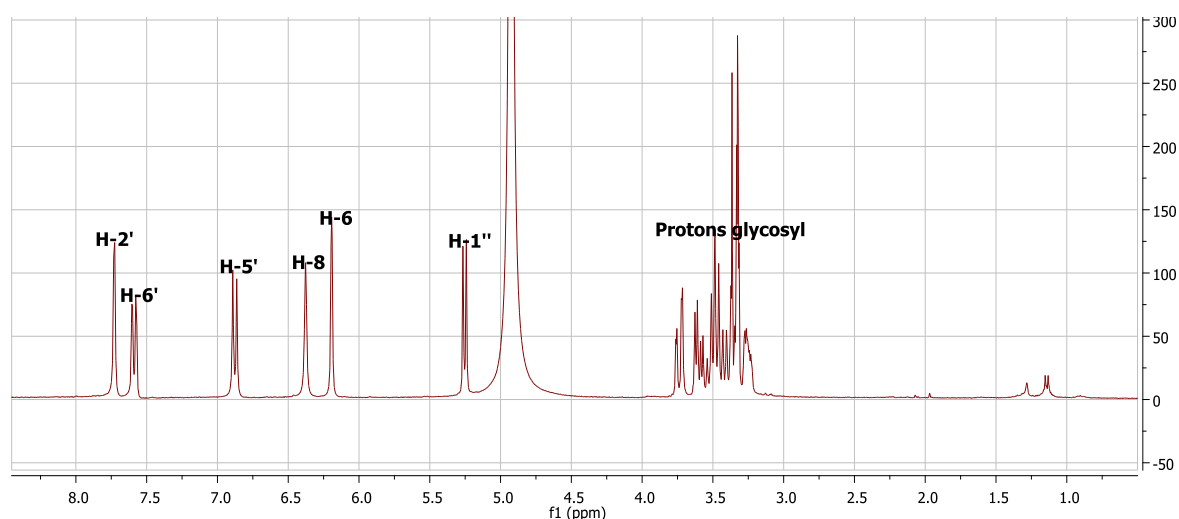


Figure 3- 39: Spectre RMN ¹H du composé PE.16 (CD₃OD, 400 MHz)

Le spectre RMN ¹³C (**Figure 3- 40**) du composé **PE.16** fait ressortir 21 carbones dont cinq correspondent aux carbones du sucre. La corrélation entre H-1'' et le carbone C-3 (135.6 ppm) suppose que l'unité osidique est fixée en C-3 de l'aglycone.

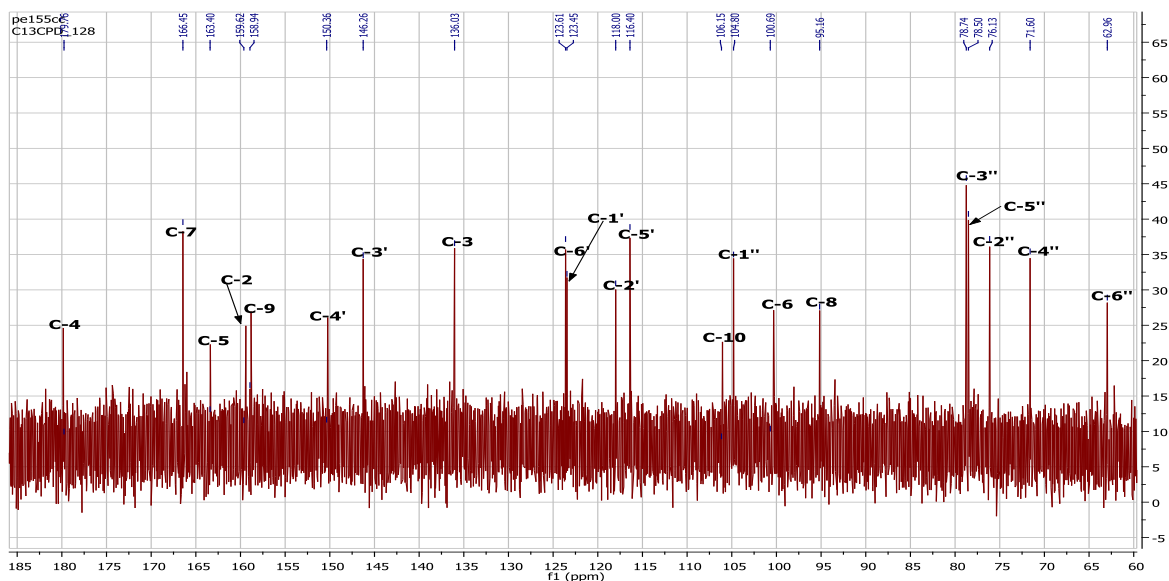
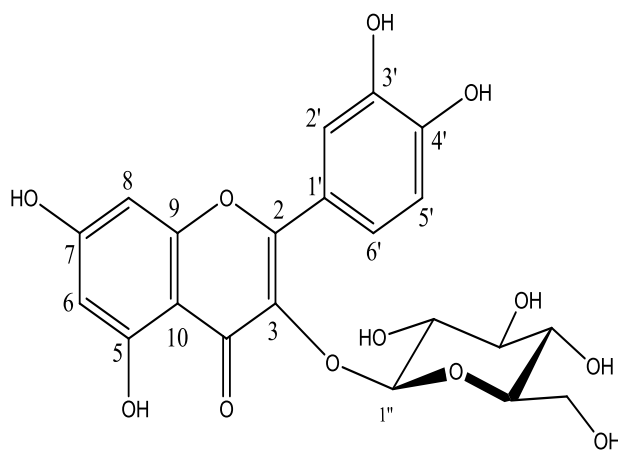


Figure 3- 40: Spectre RMN ^{13}C du composé PE.16 (CD_3OD , 300 MHz)

Les informations fournies par les spectres RNM ^1H et ^{13}C et la littérature (Iwashina et *al.*, 1990 ; Markham, 1977) ont permis d'identifier le composé **PE.16** comme étant le quercétine-3-*O*- β -glucose (ou isoquercitrine).

Une étude menée par Arquimedes et *al.* (2011) a montré que le quercétine-3-*O*- β -glucose réduit la pression artérielle en induisant une hypotension et il réduit l'activité d'ACE (angiotensin converting enzyme) dans le sérum après 90 min d'administration intraveineuse.



quercétine-3-*O*- β -glucose (isoquercitrine)

3.1.3.14. Composé PE.17

Le composé **PE.17** (9 mg) obtenu a un aspect de poudre jaune. Il est visible à l'UV 254 nm et apparaît sombre à l'UV 366 nm. Après migration dans MeOH/H₂O (50/50, v/v) puis révélation au DBA, la tache correspondant à **PE.17** vire au jaune visible. Sur une plaque CCM de phase inverse son R_f est de 0.40.

Le spectre RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) (**Figure 3- 41**) présente des signaux typiquement flavonoïdiques. Les protons à δ_H 8.05 (d, J= 8.8 Hz, 2H) et 6.92 (d, J=8.9 Hz, 2H) correspondent respectivement aux protons H-2', H-6' et H-3', H-5' du cycle B des flavonoïdes, lorsque celui-ci présente un axe de symétrie. Les protons à δ_H 6.40 (d, J=1.7 Hz) et 6.21 (d, J=1.8 Hz) sont attribués aux protons H-8 et H-6 du cycle A des flavonoïdes. Les protons localisés à δ_H 5.44 (d, J=7.5 Hz) et 4,77 (d, J=7.3 Hz) correspondent à deux protons anomériques H-1'' et H-1'''.

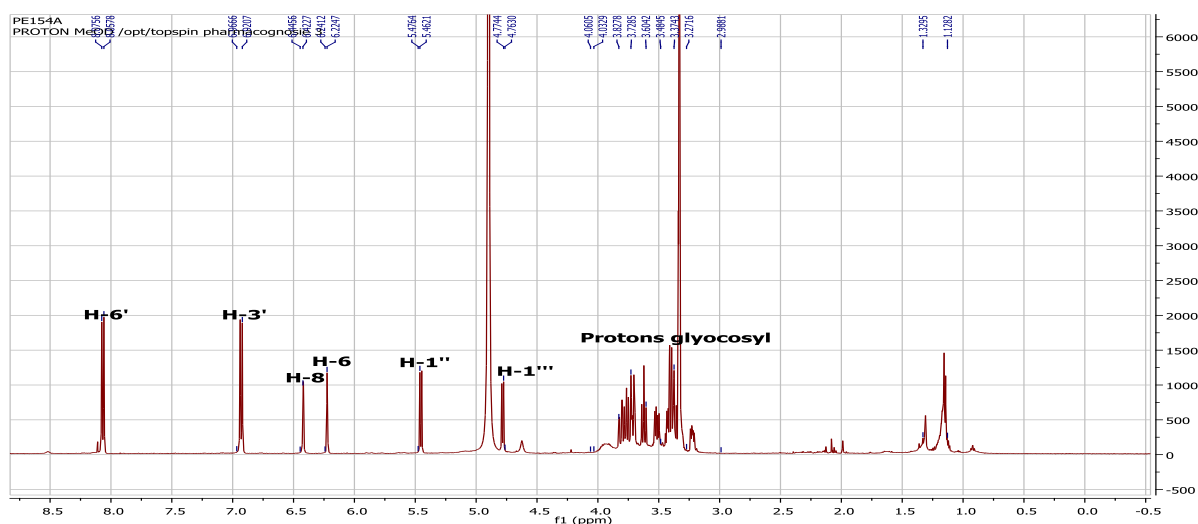


Figure 3- 41: Spectre RMN ¹H du composé PE.17 (CD₃OD, 400 MHz)

L'analyse du spectre RMN ¹³C (**Figure 3- 42**) indique la présence de 27 carbones. L'expérience de DEPT 135 indique l'existence de 9 carbones quaternaires par déduction dans ce composé.

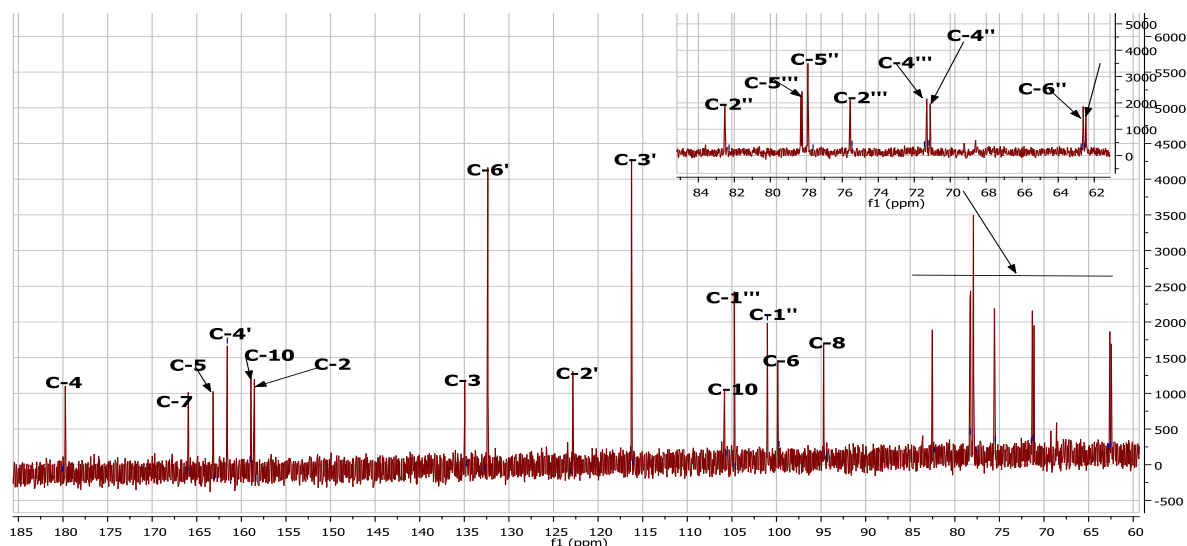


Figure 3- 42: Spectre RMN ^{13}C du composé PE.17 (CD_3OD , 300 MHz)

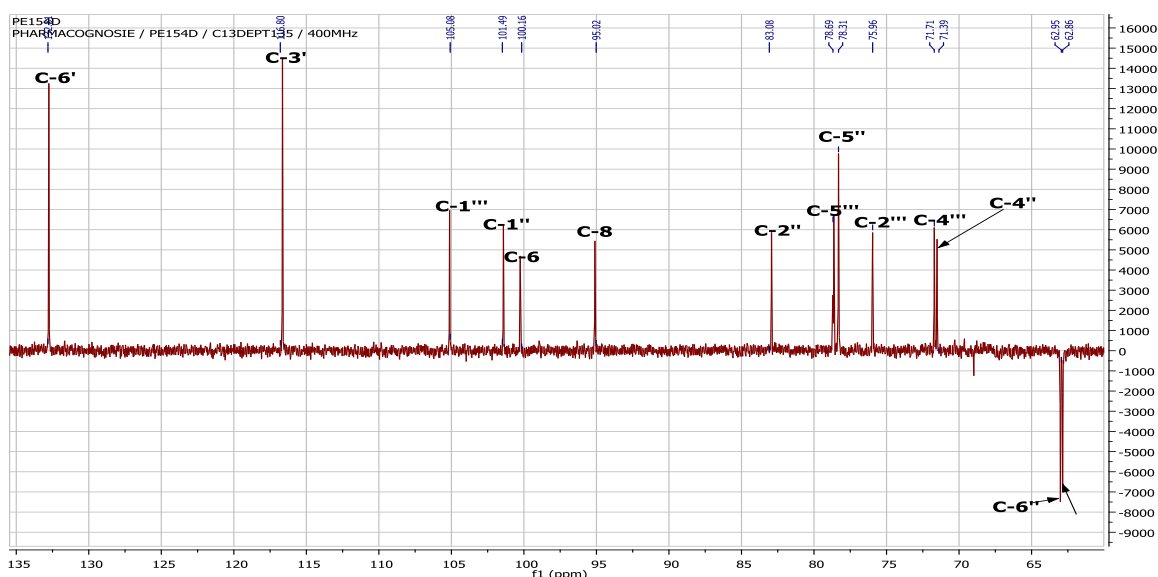
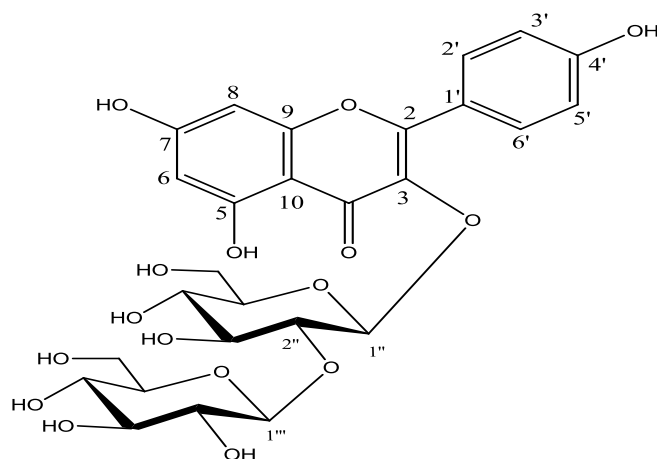


Figure 3- 43: Spectre DEPT du composé PE.17 (CD_3OD , 400 MHz)

Les analyses des spectres RMN ^1H et ^{13}C et l'expérience de DEPT 135 (Figure 3- 43) ont permis d'identifier le composé **PE.17** par comparaison avec les données de la littérature (Markham, 1978 ; Jaromir, 1990) comme étant le kaempferol-3-*O*-sophoroside.

L'effet analgésique morphine et non morphinique du kaempferol-3-*O*-sophoroside a été montré sur des modèles animaux (Palanichamy et Nagarajan, 1990).



kaempferol-3-O-sophorose

3.1.3.15. Composé PE.18

Le composé **PE.18** (7.7 mg) se présente sous forme de poudre jaune. Il est visible à l'UV 254 nm et apparaît sombre à l'UV 366 nm. Il prend une coloration orange au visible avec le DBA. Son R_f est 0.51 avec un éluant AcOEt/MeOH/H₂O (70/17/13, v/v/v) sur une plaque CCM silice.

Le spectre RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) (**Figure 3- 44**) présente des signaux semblables à ceux identifiés pour **PE.17**. Les protons H-8 et H-6 du cycle A apparaissent respectivement à δ_H 6.4 et 6.2 ppm. Les protons du cycle B apparaissent à δ_H 7.7 et 6.9 ppm. Les protons situés à δ_H 5.1 (d, J= 7.4 Hz) et 4.5 (s) ppm correspondent aux protons anomériques H-1'' et H-1''''. Le signal à δ_H 1.10 ppm indiquant la présence d'un méthyle et le proton anomérique à δ_H 4.54 ppm ont permis d'identifier la présence de l'α-rhamnose.

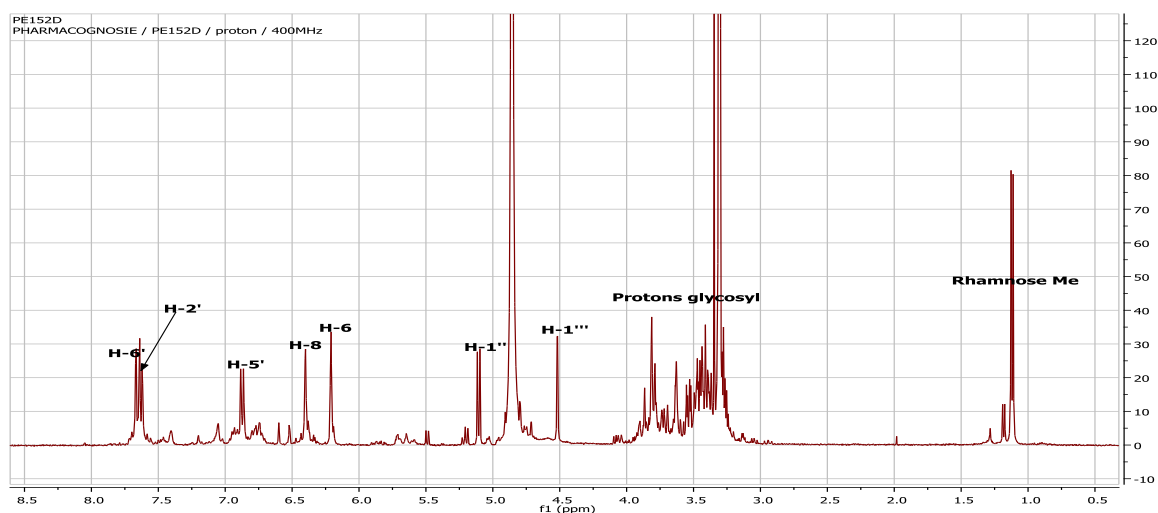


Figure 3- 44: Spectre RMN ¹H du composé **PE.18** (CD₃OD, 400 MHz)

L'analyse du spectre RMN ^{13}C (**Figure 3- 45**) indique 28 carbones dont ceux des sucres pour lesquels les déplacements chimiques sont situés entre δ_{C} 68.5 et 78.2 ppm. Les carbones anomériques C-1'' et C-1''' sont, quand à eux, respectivement localisés à δ_{C} 104.7 et 102.4 ppm. Le carbone résonnant à δ_{C} 17.9 ppm caractérise le méthyle du rhamnose. Le composé **PE.18** comporte, par ailleurs, un carbone secondaire CH_2 et 10 carbones quaternaires par déduction avec l'expérience DEPT 135 (**Figure 3- 46**).

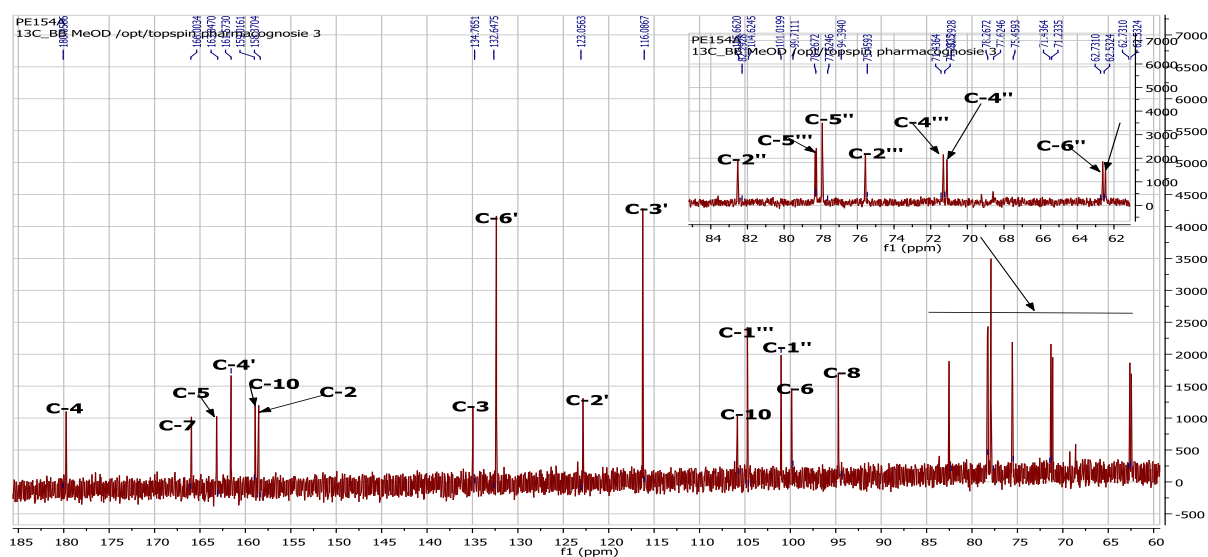


Figure 3- 45: Spectre RMN ^{13}C du composé PE.18 (CD_3OD , 300 MHz)

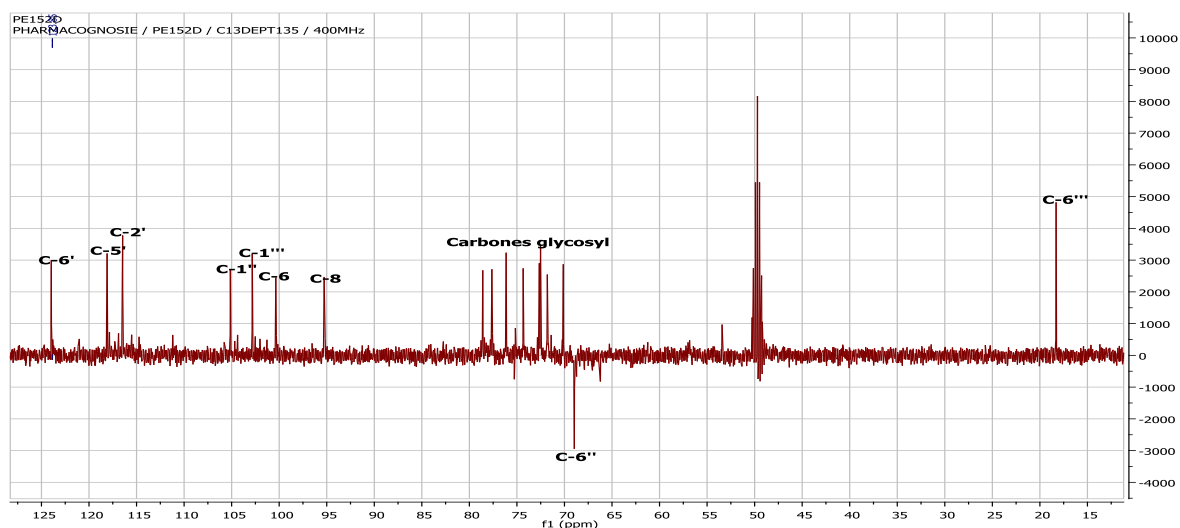
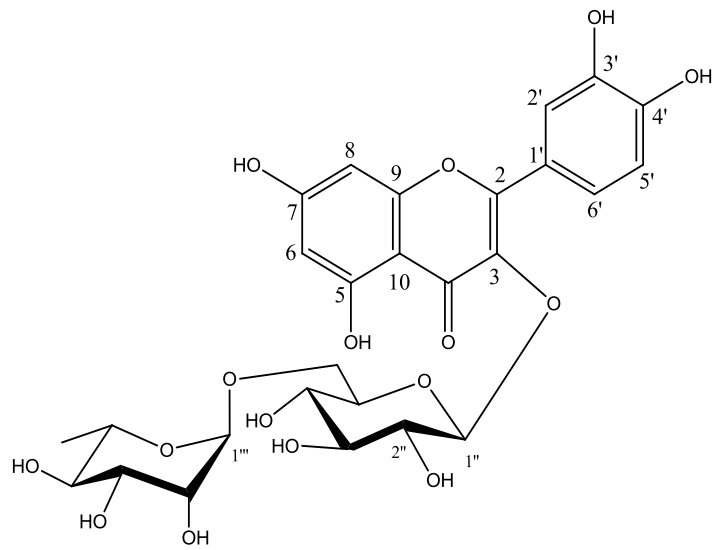


Figure 3- 46: Spectre DEPT 135 du composé PE.18 (CD_3OD , 400 MHz)

Sur la base des informations fournies par les spectres RMN ^1H et ^{13}C et l'expérience de DEPT 135 et les données de la littérature, le composé **PE.18** est identifié comme étant la rutine.

La rutine réduit l'œdème de la patte de rat à la cinquième heure après l'injection à la carragénine (Selloum et *al.*, 2003). La rutine a un faible effet inhibiteur de la production de

NO, TNF α et PE2 en milieu de culture de macrophages RAW 264.7 stimulé par LPS (Shen et al., 2002).



Rutine

3.2.Résultats d'études biologiques

Des études biologiques ont été menées afin de montrer l'innocuité et l'efficacité des extraits et fractions obtenus, de même que quelques composés isolés, à travers des méthodes *in vivo* et *in vitro*.

3.2.1.Toxicité générale aigüe

- Voie *per os*

Aux doses de 500, 1000, 1500, 2000 et 2500 mg/kg de poids corporel de souris. Après deux semaines d'observation, aucune mortalité n'est observée. Aucun changement de comportement n'a été constaté comparativement au lot témoin. La DL₅₀ limite est donc supérieure à 2500 mg/kg de poids corporel.

- Voie intrapéritonéale

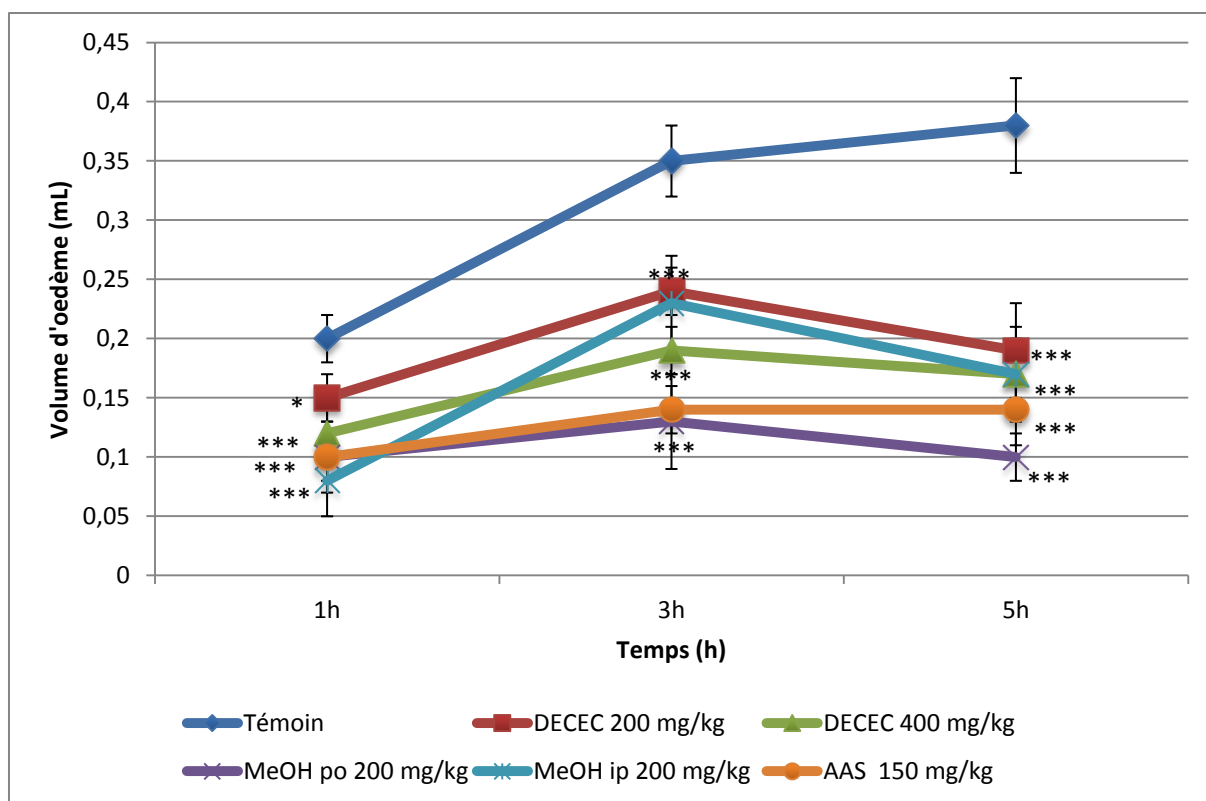
Aux doses de 250, 500, 750, 1000 et 1500 mg/kg de poids corporel, après 72 h d'observation, aucun animal mort n'a été signalé ; et l'administration d'extrait n'a pas changé le comportement des souris. La DL₅₀ limite par cette voie est donc supérieure à 1500 mg/kg.

3.2.2.Effets anti-inflammatoires

3.2.2.1.Test anti-œdémateux à la Carragénine

- Ecorces de tronc de *P. erinaceus*

L'effet anti-œdémateux du décocté et de l'extrait méthanolique (MeOH B) a été évalué aux doses de 100, 200, 400 et 600 mg/kg. Les volumes et les pourcentages d'inhibition d'œdème sont représentés respectivement sur la **Figure 3- 47** et dans le **Tableau 3- 1**.



n = 6. * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$ est considéré significatif par rapport au témoin (analyse ANOVA suivi de Dunnett's test).

Figure 3- 47: Effet de DECEC, MeOH B et d'AAS sur l'œdème de la patte de souris induit par l'injection de la carragénine.

Figure 3- 47 représente l'évolution de l'œdème (mL) de la patte enflammée en fonction du temps (h), des extraits (DECEC, MeOH B) et de la référence l'acide acétylsalicylique (AAS). Le DECEC, le MeOH (B) et l'AAS réduisent l'œdème de la même manière parce que leurs effets sur l'œdème sont plus intenses à la 1^{ère} et à la 5^{ème} heure comparativement au témoin.

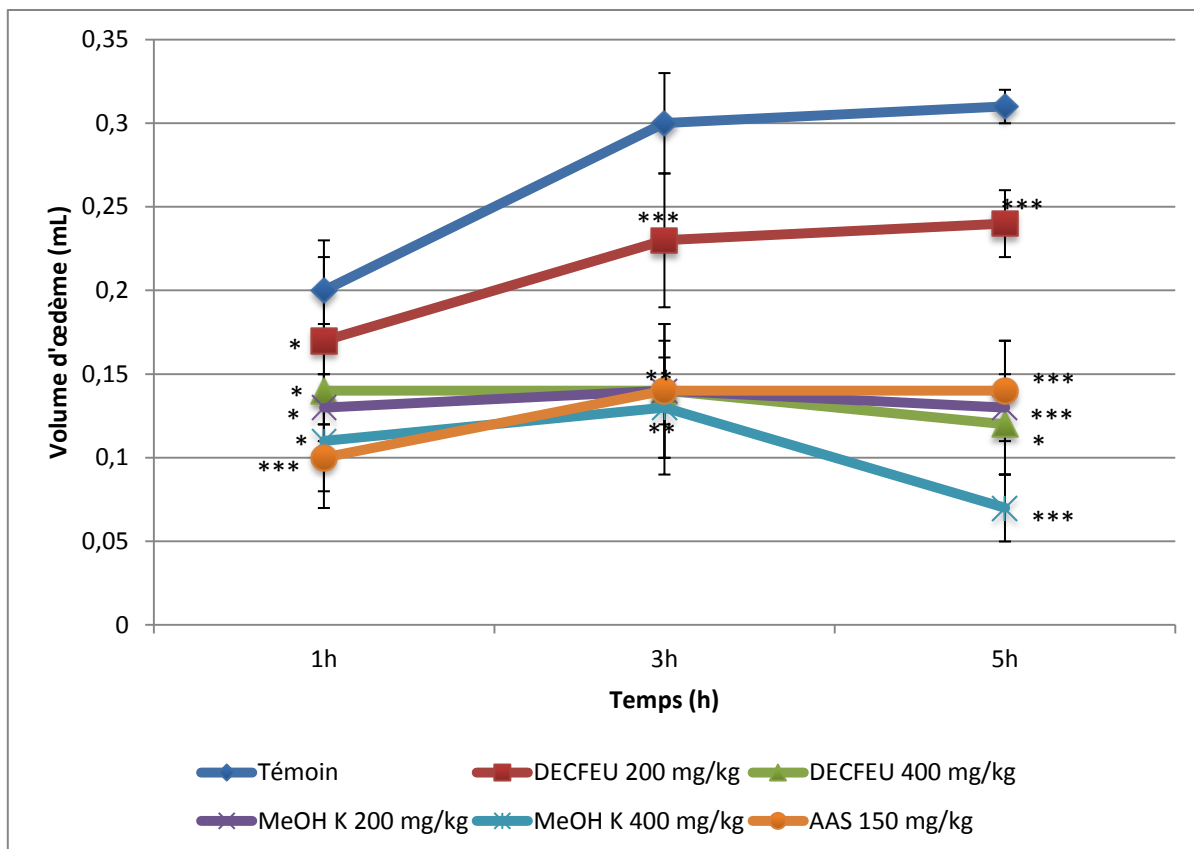
Tableau 3- 1 : Effet anti-inflammatoire du décocté et de l'extrait méthanolique (MeOH B) des écorces de tronc de *P. erinaceus*, après 1h, 3h et 5h.

p.c)	Doses (mg/kg	Pourcentage d'inhibition (%)		
		1H	3H	5H
Décocté	200	25.0	31.4	50.0
	400	40.0	45.7	55.2
	600	65.0	51.4	63.2
Extrait MeOH B (<i>per os</i>)	100	28.6	25.0	42.8
	200	52.4	45.8	64.3
Extrait MeOH B (<i>i.p.</i>)	50	41.7	14.7	35.1
	100	58.3	23.5	45.9
	200	66.7	32.4	54.1

Les deux extraits (DECEC, MeOH B) ont présenté une inhibition dose-dépendante (Tableau 3- 1). Les résultats de l'administration i.p. de l'extrait méthanolique présentent une meilleure inhibition à la première heure de l'inflammation comparativement à l'administration orale qui est plus active à la cinquième heure. En effet, à la dose de 200 mg/kg de l'extrait MeOH (B), l'inhibition observée à la première et cinquième heure est de 66.7 et 54.1 % pour l'administration i.p. et 52.4 et 64.3 % oralement. L'effet anti-inflammatoire *per os* du décocté et de l'extrait MeOH (B) a été plus efficace à la cinquième heure.

- Feuilles de *P. erinaceus*

L'extrait méthanolique (MeOH K) et le décocté des feuilles de *P. erinaceus* ont un effet anti-inflammatoire aux doses de 100, 200, 400 et 600 mg/kg. Ces résultats sont consignés sur la **Figure 3- 48** et dans le **Tableau 3- 2**.



n = 6. * : P< 0.05, ** : P< 0.01, *** : P< 0.001 est considéré significatif par rapport au témoin (analyse ANOVA suivi de Dunnett's test).

Figure 3- 48: Effet de DECFEU, MeOH (K) et d'AAS sur l'œdème de la patte de souris induit par l'injection de la carragénine.

La **Figure 3- 48** montre l'évolution de l'œdème (mL) en fonction du temps (h) de DECFEU, MeOH (K) et l'AAS. L'effet anti-œdémateux des extraits (DECFEU et MeOH K) et l'AAS est plus accentué à la 1^{ère} et à la 5^{ème} heure comparés au témoin.

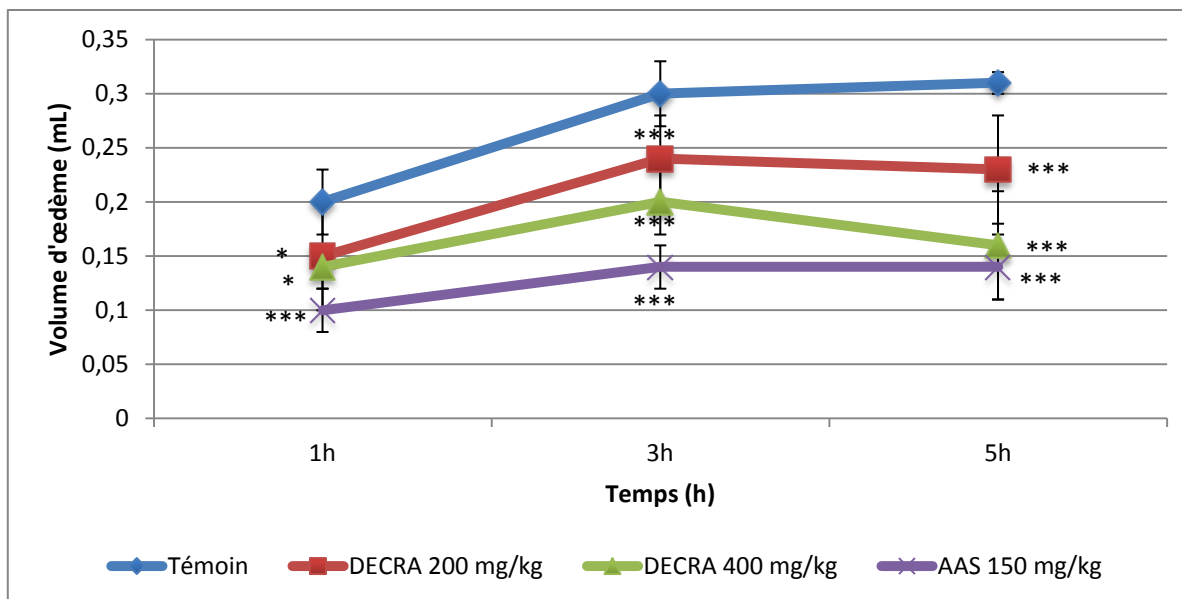
Tableau 3- 2 : Effet anti-inflammatoire du décocté et de l'extrait méthanolique (MeOH K) des feuilles de *P. erinaceus*

Doses (mg/kg p.c)		Pourcentage d'inhibition (%)		
		1H	3H	5H
Décocté	200	15.0	23.3	22.6
	400	30.0	53.3	62.3
	600	52.5	56.7	67.7
Extrait MeOH K	100	14.3	13.8	16.1
	200	38.1	51.7	58.1
	400	47.6	55.2	77.4

Les résultats présentés dans le Tableau 3- 2 montrent que le décocté et l'extrait méthanolique des feuilles ont un pouvoir anti-inflammatoire. L'effet d'inhibition des deux extraits est dose-dépendant vis-à-vis de l'oedème. L'inhibition exercée par l'extrait MeOH (K) a été plus efficace que celle du décocté (Tableau 3- 2). La forte inhibition (77.4 %) a été observée avec l'extrait méthanolique à la dose de 400 mg/kg à la cinquième heure.

- Ecorces de racine de *P. erinaceus*

Le décocté des écorces de racines (DECRA) aux doses de 200, 400 et 600 mg/kg, a été utilisé pour évaluer l'effet anti-inflammatoire. Les résultats sont consignés sur la **Figure 3- 49** et dans le **Tableau 3- 3**.



n = 6. * : P< 0.05, ** : P< 0.01, *** : P< 0.001 est considéré significatif par rapport au témoin (analyse ANOVA suivi de Dunnett's test).

Figure 3- 49: Effet de DECRA et d'AAS sur l'œdème de la patte de souris induit par l'injection de la carragénine.

La **Figure 3- 49** présente des courbes représentant l'évolution de l'œdème, ont la même allure. En effet à la 1^{ère} et à la 5^{ème} heure le DECRA et l'AAS sont plus efficace. L'AAS s'est montré plus active sur l'œdème que le DECRA.

Tableau 3- 3 : Effet anti-inflammatoire du décocté des écorces de racines de *P. erinaceus* et de l'acide acétylsalicylique (AAS).

Doses (mg/kg p.c)		Pourcentage d'inhibition (%)		
		1H	3H	5H
Décocté	200	25.0	20.0	25.8
	400	30.0	33.3	48.4
	600	50.0	40.0	61.3
AAS	50	14.3	20.0	25.0
	100	33.3	25.0	39.3
	150	52.4	41.7	50.0

L'œdème induit par l'injection de la carragénine a été réduite à toutes les étapes par le décocté des écorces de racines et par l'acide acétylsalicylique (AAS) de manière dose-dépendante. L'inhibition du décocté a été plus significative à la cinquième heure après l'administration de

la carragénine. Ainsi à la dose de 600 mg/kg le décocté a réduit l'œdème aux pourcentages de 50.0 et 61.3 % respectivement à la première et cinquième heure (Tableau 3- 3). L'AAS a présenté une inhibition plus efficace que le décocté.

3.2.2.2. Test anti-œdémateux à l'huile de croton

- Ecorces de tronc de *P. erinaceus*

Le décocté (DECEC), l'extrait méthanolique (MeOH B), l'extrait dichlorométhane (DCM A) et les composés isolés (friedeline (PE.1), lupéol (PE.2) et épicatechine (PE.3)) ont présenté un effet anti-inflammatoire local. Les résultats sont consignés sur la **Figure 3- 50**.

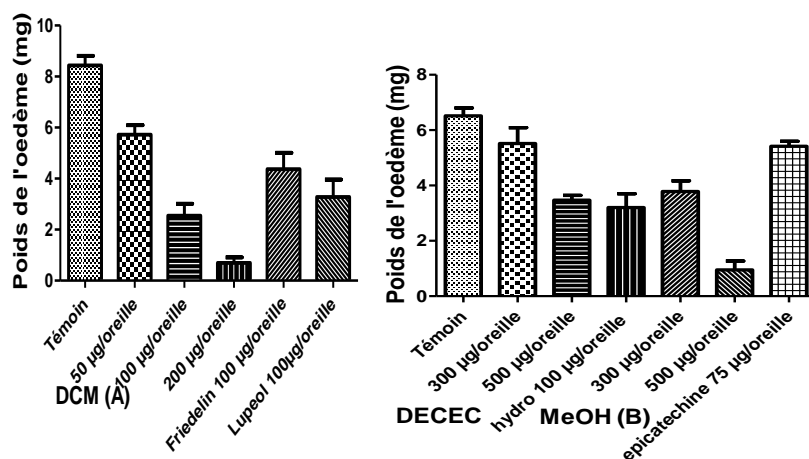


Figure 3- 50: Effet de DCM (A), DECEC, MeOH (B), friedeline (PE.1), lupeol (PE.2) et épicatechine (PE.3) et hydrocortisone sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton

L'œdème local induit par l'application de l'huile de croton a été réduit par le décocté, l'extrait MeOH (B), l'extrait DCM (A), les composés isolés (friedeline (PE.1), lupéol (PE.2) et épicatechine (PE.3)) et la substance de référence (hydrocortisone) à différentes doses (Figure 3- 50). Nous avons utilisé deux témoins différents (DCM et 42% EtOH) pour des raisons de solubilité des extraits. L'extrait DCM (A) et les composés apolaires isolés ont été plus actifs par rapport aux extraits polaires. A 100 µg/oreille, l'extrait DCM (A) a présenté une inhibition (69.8 %) supérieure comparativement à l'hydrocortisone (50.9 %). La forte inhibition observée reste celle de l'extrait DCM (A) 91.7 % à 200 µg/oreille. La friedeline (48.2 %) et le

lupéol (61.1 %) ont été plus efficaces que l'épicatchine qui a montré une faible activité (16.9 %).

- Ecorces des racines de *P. erinaceus*

L'extrait dichlorométhane (DCM E) des écorces des racines a été utilisé pour déterminer l'effet anti-inflammatoire local des écorces de racines. Les résultats sont représentés par la **Figure 3- 51**.

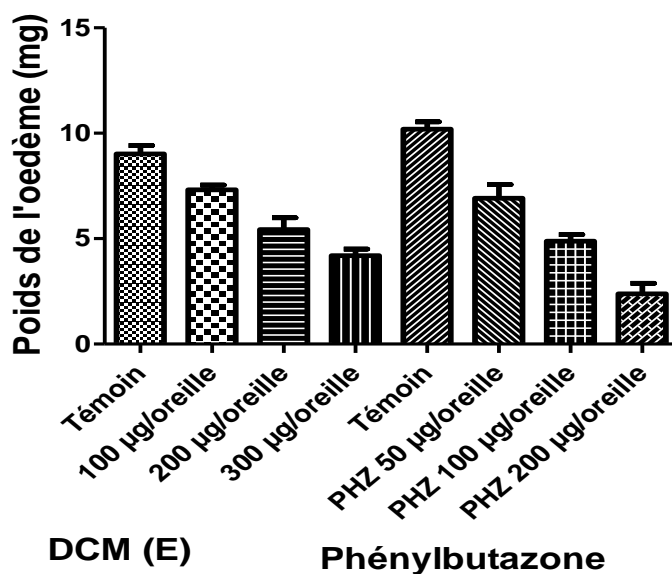


Figure 3- 51: Effet de DCM (E) et de la phénylbutazone sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton

L'inflammation locale induite a été réduite de manière dose-dépendante par l'extrait DCM (E) des écorces de racines (Figure 3- 51). La phénylbutazone (76.5 %) utilisée comme substance de référence a été deux fois plus efficace que l'extrait DCM (E) à la dose de 200 µg/oreille.

3.2.3. Effets analgésiques

3.2.3.1. Test à l'acide acétique

- Ecorces du tronc *P. erinaceus*

Les résultats de l'effet analgésique du décocté et de l'extrait méthanolique sont consignés dans le **Tableau 3- 4**.

Tableau 3- 4: Effet analgésique du décocté et de l'extrait méthanolique (MeOH B) des écorces du tronc

Extrait	Doses (mg/kg p.c)	Nombre de contorsions	Pourcentage d'inhibition(%)
Témoin	---	67.5 ± 3.05	---
Décocté	200	35.2 ± 1.2***	50.1
	400	23.3 ± 2.0***	66.5
	600	15.8 ± 1.7***	76.5
Témoin	---	66.2± 2.0	---
Extrait MeOH B	100	40.5 ± 1.8***	38.8
	200	20.2 ± 2.0***	69.5
	400	17.0 ± 3.0***	74.3

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type (n = 6). *** : P < 0,001 est considéré significatif par rapport au témoin (analyse ANOVA suivi de Dunnett's test).

L'effet analgésique du décocté (DECEC) et de l'extrait MeOH (B) des écorces de tronc a réduit le nombre de contorsions de manière dose-dépendante. L'effet analgésique de l'extrait MeOH (B) est plus efficace que celui du décocté. Ainsi à 400 mg/kg, le décocté (DECEC) et l'extrait MeOH (B) ont respectivement réduit les contractions abdominales aux pourcentages de 66.5 et 74.3 % (Tableau 3- 4).

- Feuilles de *P. erinaceus*

Le **Tableau 3- 5** présente les résultats de l'effet analgésique de l'extrait méthanolique (MeOH K) et du décocté des feuilles.

Tableau 3- 5 : Effet analgésique de l'extrait méthanolique (MeOH K) et du décocté des feuilles

Extrait	Doses (mg/kg p.c)	Nombre de contorsions	Pourcentage d'inhibition(%)
Témoin	---	66.2 ± 2.0	---
Décocté	200	34.5 ± 1.8***	47.9
	400	25.3 ± 3.0***	61.7
	600	21.2 ± 2.0**	68.0
Extrait MeOH K	100	45.5 ± 1.8***	31.2
	200	26.2 ± 2.0***	60.5
	400	21.0 ± 3.0***	68.3

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type (n = 6). *** : P< 0,001 est considéré significatif par rapport au témoin (analyse ANOVA suivi de Dunnett's test).

Après l'injection de l'acide acétique (0.6 %) au lot témoin, le nombre de contorsions a été compté. L'administration orale du décocté et de l'extrait MeOH (K) des feuilles de *P. erinaceus* a réduit significativement (P< 0.001) le nombre de contorsions de manière dose-dépendante. Les résultats dans le Tableau 3- 5 montrent que l'extrait MeOH (K) est plus efficace que le décocté. En effet, l'extrait MeOH (K) (400 mg/kg) et le décocté (600 mg/kg) ont présenté le même pouvoir analgésique (68 %).

- Ecorces de racines de *P. erinaceus*

Le décocté des écorces de racines a présenté un effet analgésique. Les résultats sont consignés dans le **Tableau 3- 6**.

Tableau 3- 6 : Effet analgésique du décocté des écorces de racines et du paracétamol

Extrait	Doses (mg/kg p.c)	Nombre de contorsions	Pourcentage d'inhibition (%)
Témoin	---	66.17 ± 2	---
Décocté	200	34.7 ± 2***	47.6
	400	23.67 ± 3***	64.2
	600	17.67 ± 2***	73.3
Paracétamol	50	40.17 ± 2***	39.3
	100	34.83 ± 1***	47.4
	200	17.5 ± 2***	73.6

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type (n = 6). *** : P< 0,001 est considéré significatif par rapport au témoin (analyse ANOVA suivi de Dunnett's test).

Le décocté et le paracétamol ont réduit significativement ($P < 0.001$) le nombre de contorsions abdominales induits par l'injection de l'acide acétique. L'inhibition a été produite de manière dose-dépendante. Le produit de référence (paracétamol) reste plus efficace. Mais à la dose de 600 mg/kg, le décocté a présenté le même effet analgésique (73 %) que le paracétamol à 200 mg/kg.

- Etude comparée de l'effet analgésique

La **Figure 3- 52** montre l'effet analgésique comparé de DECEC, MeOH (B), DECFEU, MeOH K, DECRA et de paracétamol (PARA).

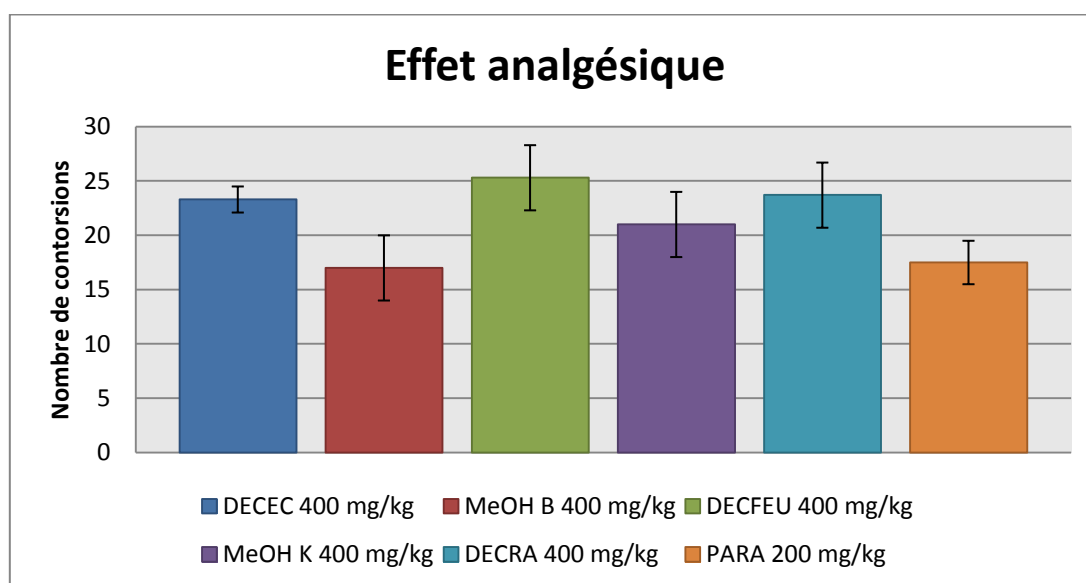


Figure 3- 52: Effet de DECEC, MeOH (B), DECFEU, MeOH K, DECRA et de paracétamol (PARA) sur le nombre de contorsions induit par l'injection de l'acide acétique

A la dose de 400 mg/kg de p.c, le MeOH (B) présente l'effet analgésique le plus efficace. A cette même dose, il est plus actif que le paracétamol à 200 mg/kg de p.c. Parmi les décoctés, le DECFEU présente un effet analgésique moindre comparé à DECEC et DECRA (Figure 3- 47).

3.2.3.2. Test au formaldéhyde

L'effet analgésique provoqué par les différentes doses des décoctés des écorces de tronc (DECEC), des feuilles (DECFEU) et des écorces de racines (DECRA) comparativement aux témoins de références (morphine et paracétamol) est représenté par **Figure 3- 53**.

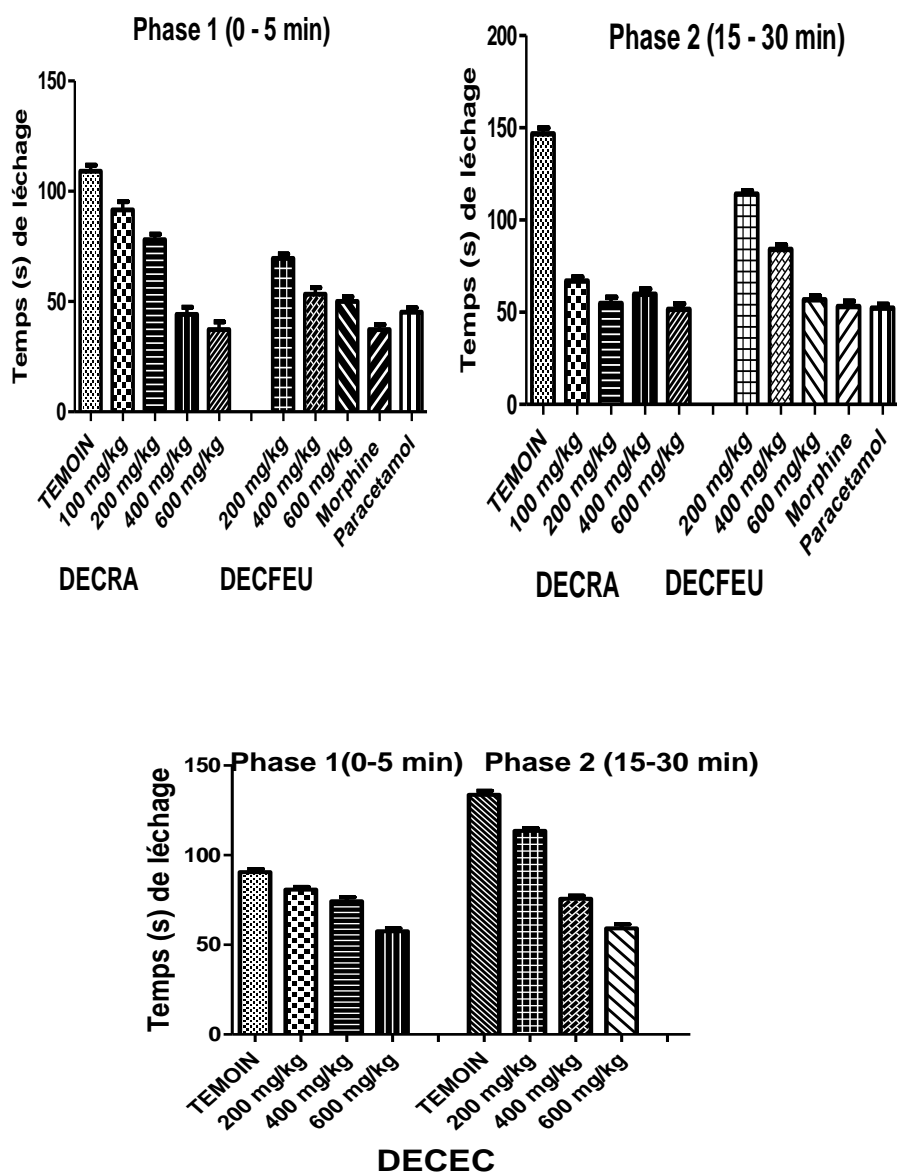


Figure 3- 53: Effet analgésique (test à la solution de formaldéhyde) des décoctés des écorces de tronc (DECEC), feuilles (DECFEU) et des écorces de racines (DECRA)

Les deux phases de la réaction ont été réduites par les décoctés (DECEC, DECFEU, DECRA), le paracétamol et la morphine à différentes doses. Cependant, les décoctés et le paracétamol ont présenté une inhibition plus efficace à la deuxième phase. Ainsi, à la dose de 600 mg/kg, le décocté de tronc (DECEC) et le décocté des feuilles (DECFEU) ont provoqué respectivement un pourcentage d'inhibition de 36.6 et 54.1 % (première phase) et 55.7 et 61.3 % (deuxième phase). D'une manière générale l'inhibition des extraits est dose-dépendante. La morphine (5 mg/kg), le paracétamol (300 mg/kg), le DECFEU (600 mg/kg) et le DECRA

(600 mg/kg) ont présenté sensiblement le même pouvoir inhibiteur de la douleur à la seconde phase (Figure 3- 53).

3.2.4. Effet antipyrétique

Les résultats de l'effet antipyrétique des décoctés issus des écorces de tronc, des feuilles et des écorces de racines sont consignés dans le **Tableau 3- 7**.

Tableau 3- 7 : Pourcentage d'inhibition des décoctés des écorces de tronc (DECEC), feuilles (DECFEU) et des écorces de racines (DECRA)

Extrait et dose (mg/kg)	Pourcentage d'inhibition (%)				
	1H	2H	3H	4H	5H
Décocté des écorces de tronc					
200	15.3	17.6	21.2	38.8	58.8
400	27.9	35.4	53.2	65.8	68.4
Décocté des feuilles					
200	4.3	11.4	18.6	22.9	40.4
400	15.7	33.7	60.2	78.3	84.3
600	26.4	40.3	65.3	100	100
Décocté des écorces de racines					
200	8.5	14.6	26.8	36.6	48.8
400	21.5	40.5	60.0	62.0	65.8
Paracétamol					
100	44.7	43.5	48.2	52.9	68.2

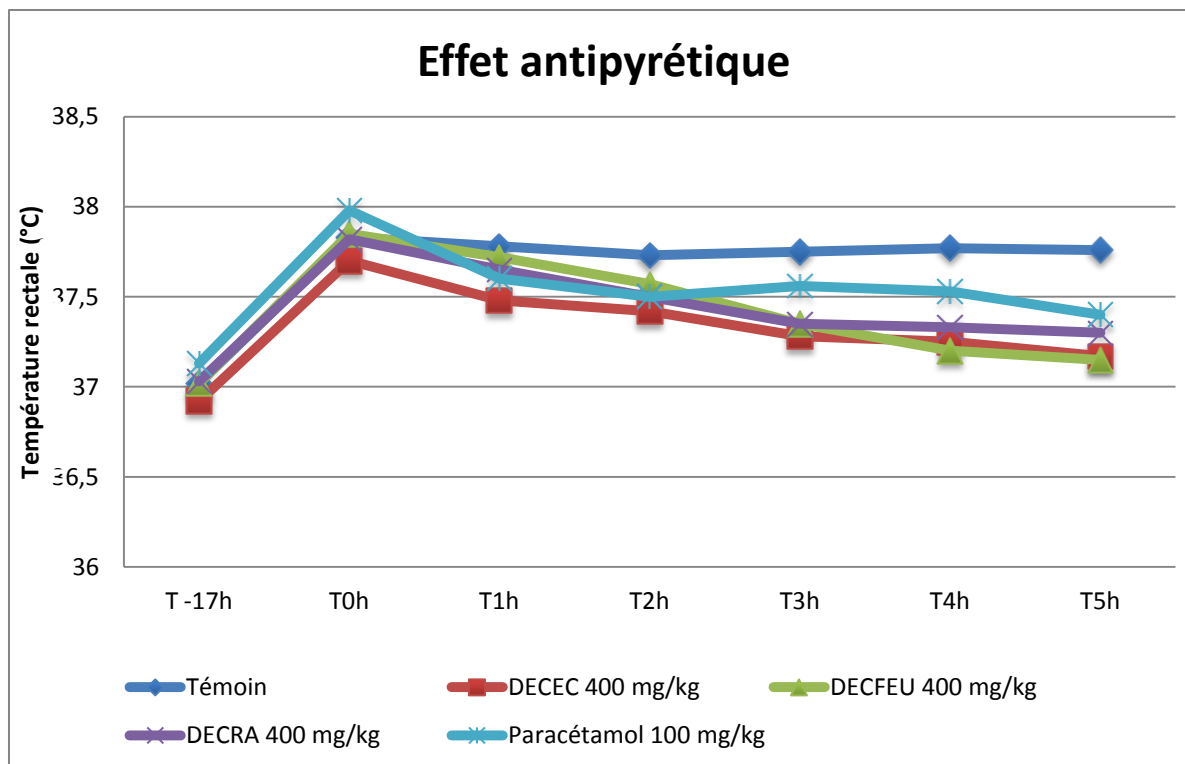


Figure 3- 54 : Evolution de la température rectale en fonction du temps des décoctés des écorces (DECEC), des feuilles (DECFEU) et des racines (DECRA)

L'étude de l'effet antipyrétique des décoctés (DECEC, DECFEU, DECRA) a montré que la baisse de température est remarquable à partir de la deuxième heure après administration des extraits et du paracétamol. En effet à la dose de 400 mg/kg l'activité des différents décoctés présente la même allure de réduction de température (Figure 3- 54). A 400 mg/kg, le décocté des feuilles (DECFEU) a présenté la meilleure réduction de la température comparativement aux décoctés (DECEC, DECRA). A la dose de 600 mg/kg, le décocté des feuilles (DECFEU) a inhibée totalement l'hyperthermie à partir de la 4^{ème} heure après l'injection de la levure de bière (Tableau 3- 7).

3.2.5. Effet inhibiteur de tumor necrosis factor alpha (TNF α) et de Nitrites

3.2.5.1. TNF α

La production de TNF α par les macrophages cultivés a été induite par l'ajout dans le milieu de culture de LPS (lipopolysaccharide) ou de LPS/IFN (lipopolysaccharide/interféron). La teneur de TNF α a été mesurée en utilisant le test ELISA. L'effet inhibiteur des différents extraits testés a été représenté par des histogrammes dans la **Figure 3- 55**.

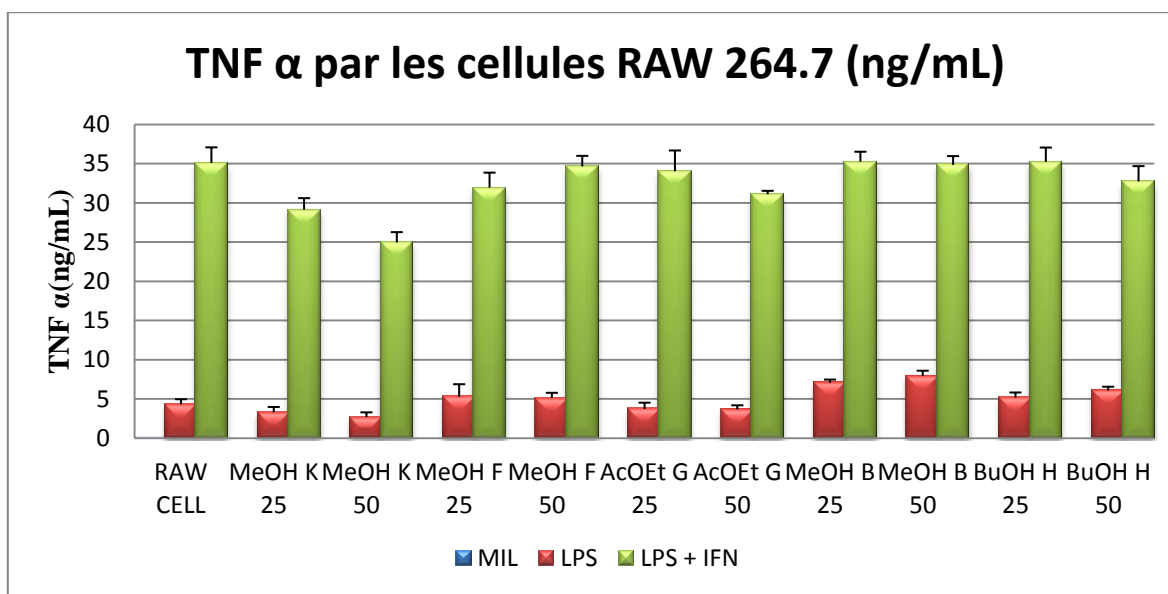


Figure 3- 55: Effet inhibiteur des extraits sur la production de TNF α

MeOH B : extrait méthanolique des écorces du tronc ; MeOH K : extrait méthanolique des feuilles ; MeOH F : extrait méthanolique des écorces des racines ; AcOEt G : phase acétate d'éthyle ; BuOH H : phase butanolique ; 25 : 25 $\mu\text{g/mL}$; 50 : 50 $\mu\text{g/mL}$; MIL : milieu ; LPS : lipopolysaccharide ; IFN : interféron gamma

La quantité de TNF α produite par les macrophages suite à la stimulation de LPS ou LPS/IFN a permis d'évaluer l'effet inhibiteur des extraits suivants : l'extrait MeOH (K), l'extrait MeOH (F), la phase AcOEt (G), l'extrait MeOH (B), la phase BuOH (H). Les résultats montrent que la teneur de TNF α induite par LPS/IFN est supérieure à celle induite par LPS seule. Sur le TNF induite par LPS, seul l'extrait MeOH (K) a présenté un effet inhibiteur remarquable ; la phase AcOEt (G) a présenté un effet inhibiteur moindre par rapport à celui de l'extrait MeOH (K).

La teneur de TNF α induite par LPS/IFN a été réduite par l'extrait MeOH (K), la phase AcOEt (G) aux concentrations de 25 et 50 $\mu\text{g/mL}$. La phase BuOH (H) a réduit la production de la cytokine à 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 3- 55).

3.2.5.2. Nitrites

L'ajout dans le milieu de culture de macrophages, de LPS ou de LPS/IFN a provoqué la production de nitrites. La **Figure 3- 56** représente l'effet inhibiteur induit par les différents extraits testés sur la production de nitrite.

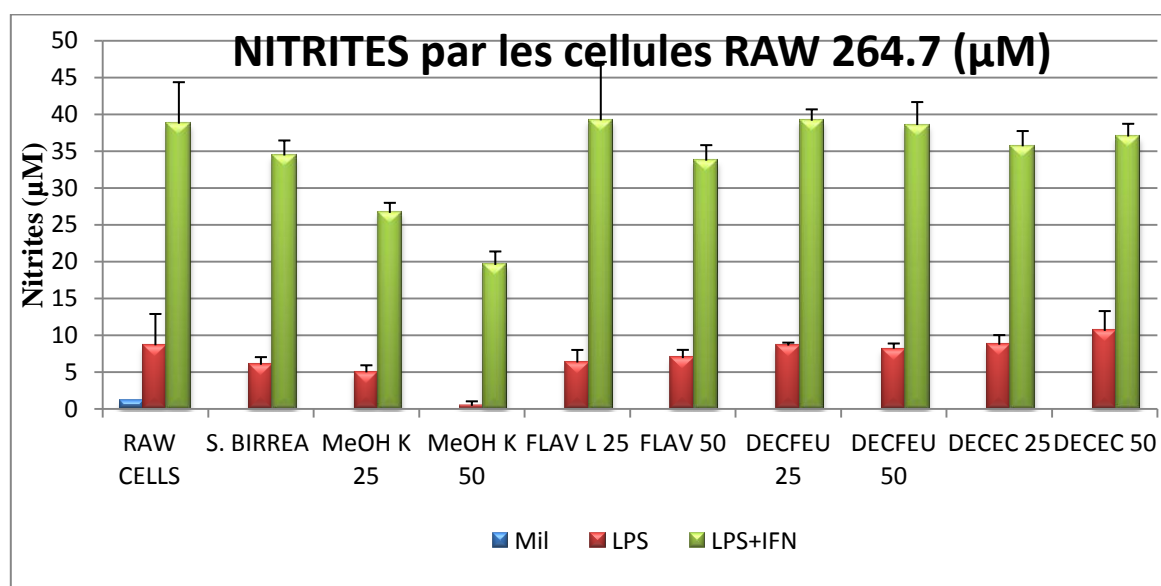


Figure 3- 56: Effet inhibiteur des extraits sur la production de nitrite

DECEC : décocté des écorces de tronc ; DECFEU : décocté des feuilles ; MeOH K : extrait méthanolique des feuilles ; FLAVO L : fraction flavonoïdique ; 25 : 25 $\mu\text{g/mL}$; 50 : 50 $\mu\text{g/mL}$; MIL : milieu ; LPS : lipopolysaccharide ; IFN : interféron gamma ; S.BIRREA : *Sclerocarya. birrea*

Les résultats montrent que LPS/IFN induit plus de nitrite que LPS. La production de nitrite induite par LPS ou LPS/IFN a été réduite par l'extrait MeOH (K) et la fraction flavonoïdique (FLAV L) aux concentrations de 25 et 50 $\mu\text{g/mL}$. L'extrait MeOH (K) a présenté un effet inhibiteur efficace par rapport à l'extrait méthanolique de *Sclerocarya. birrea* (A. Rich.) Hochst. (Anacardiaceae) (25 $\mu\text{g/ml}$) utilisé comme témoin (Figure 3- 56). Le décocté des écorces de tronc (DECEC) a présenté une faible inhibition sur la production de nitrite induite par LPS/IFN, par contre le décocté des feuilles (DECFEU) n'a présenté aucun effet inhibiteur.

3.2.6. Effet antioxydant

L'effet antioxydant des différents extraits et fractions a été déterminé en utilisant la méthode au DPPH et la méthode de CUPRAC. Dans la méthode au DPPH, l'effet antioxydant est apprécié en considérant le pouvoir antiradicalaire (ARP = antiradical power) ; la valeur de TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) permet d'apprécier la capacité antioxydante d'une substance dans la méthode de CUPRAC.

- Ecorce de tronc de *P. erinaceus*

Le **Tableau 3- 8** représente le pouvoir antiradicalaire et la capacité antioxydante du décocté, de l'extrait MeOH (B), des phases DCM (C) et AoCEt (D) et deux produits de référence (trolox et acide chlorogénique).

Tableau 3- 8 : Effet antioxydant du décocté, de l'extrait MeOH (B), des phases DCM (C) et AoCEt (D), du trolox et de l'acide chlorogénique

Echantillon	DPPH		CUPRAC	
	IC50	ARP	E %	TEAC
Décocté	0.30 ± 0.01	3.7	0.075 ± 0.008	0.8
Extrait MeOH B	0.20 ± 0.02	5	0.090 ± 0.005	0.9
Phase DCM C	0.50 ± 0.04	2	nd	nd
Phase AoCEt D	0.30 ± 0.05	3.6	nd	nd
Trolox	0.20 ± 0.01	4.8	0.100 ± 0.001	1.0
Ac. Chlorogénique	0.30 ± 0.03	3.7	nd	nd

ARP: antiradical power; TEAC: trolox equivalent antioxidant capacity; nd : non déterminée

Le décocté et l'acide chlorogénique ont présenté le même pouvoir anti-radicalaire. L'extrait MeOH (B) a donné le meilleur effet anti-radicalaire comparé au trolox et aux autres échantillons. L'ARP de la phase AoCEt (D) est supérieur à celui de la phase DCM (C). Les valeurs de TEAC du décocté (0.8) et de l'extrait MeOH (B) (0.9) sont intéressantes par rapport à celle du trolox.

- Feuilles de *P. erinaceus*

Les résultats du pouvoir anti-radicalaire et de la capacité antioxydante du décocté, de l'extrait MeOH (K) et de la fraction flavonoïdique (FLAVO L) sont consignés dans le **Tableau 3- 9**.

Tableau 3- 9 : Effet antioxydant du décocté, de l'extrait MeOH (K) et de la fraction flavonoïdique (FLAVO L)

Echantillon	DPPH		CUPRAC	
	IC50	ARP	E %	TEAC
Décocté	0.8 ± 0.04	1.3	0.07 ± 0.007	0.7
Extrait MeOH K	1.1 ± 0.03	0.9	0.06 ± 0.005	0.6
FLAVO L	0.8 ± 0.02	1.3	0.055 ± 0.007	0.6
Rutine	nd	nd	0.29 ± 0.004	2.9

ARP: antiradical power; TEAC: trolox equivalent antioxidant capacity. nd : non déterminée

Le décocté et la fraction flavonoïdique ont présenté sensiblement le même pouvoir anti-radicalaire. L'ARP de l'extrait MeOH (K) a été moindre comparativement au décocté et à la fraction flavonoïdique. Les valeurs de TEAC du décocté (0.7), de l'extrait MeOH (K) (0.6) et de la fraction flavonoïdique (0.6) ont permis de montrer que ces extraits possèdent un pouvoir antioxydant mais moins prononcé que la rutine (2.9).

- Ecorces de racines de *P. erinaceus*

Le **Tableau 3- 10** présente les résultats de l'activité antioxydante de l'extrait MeOH (F), des phases AcOEt (G) et BuOH (H) exprimée en ARP avec la méthode au DPPH et en TEAC avec la méthode CUPRAC.

Tableau 3- 10 : Effet antioxydant de l'extrait MeOH (F), des phases AcOEt (G) et BuOH (H)

Echantillon	DPPH		CUPRAC	
	IC50	ARP	E %	TEAC
Extrait MeOH F	0.5 ± 0.05	2.0	0.08 ± 0.002	0.8
Phase AcOEt G	0.5 ± 0.04	2	0.09 ± 0.004	0.9
Phase BuOH H	0.5 ± 0.01	2.0	0.10 ± 0.003	1

ARP: antiradical power; TEAC: trolox equivalent antioxidant capacity

Le pouvoir anti-radicalaire de l'extrait MeOH (F) a été le même que celui de la phase AcOEt (G) et de la phase BuOH (H). L'extrait MeOH (F) et la phase AcOEt (G) ont donné une capacité antioxydante remarquable avec des TEAC de 0.8 et 0.9 respectivement. La capacité antioxydante de la phase BuOH (H) a été égale à celle du trolox (Tableau 3- 10).

Conclusion partielle

Au niveau de la méthode au DPPH, l'extrait MeOH (B) des écorces de tronc a présenté l'activité antiradicalaire la plus importante (ARP = 5) suivi du décocté (DECEC) (ARP = 3.7). Avec la méthode de CUPRAC, la meilleure activité a été celle de la phase BuOH (H) avec TEAC = 1.

3.2.7.Effet inhibiteur de la peroxydation lipidique et de la lipoxygénase

Le **Tableau 3- 11** présente l'effet inhibiteur de DECEC, DECFEU, DECRA, MeOH (B), MeOH (K), MeOH F, FLAVO L et DCM E sur la peroxydation lipidique et la lipoxygénase.

Tableau 3- 11 : Effet inhibiteur des extraits sur la peroxydation lipidique et l'activité de la lipoxygénase

Echantillon	Inhibition(%) / Peroxydation lipidique	Inhibition(%) / 5-lipoxygénase
DECEC	35.6 ± 1.5	61.9 ± 2
DECRA	30.4 ± 1	42.3 ± 0.4
DECFEU	31.0 ± 0.6	58.1 ± 1
MeOH B	37.3 ± 0.6	97.7 ± 0.5
MeOH K	35.6 ± 1	28.1 ± 0.7
FLAVO L	28.0 ± 1	16.3 ± 1
MeOH F	30.7 ± 0.5	45.1 ± 3
DCM E	nd	54.2 ± 0.7
Quercétine	37.4 ± 1	nd
SOLUMEDROL	nd	21.5 ± 3
HYDROCORTISONE	nd	42.1 ± 1

nd : non déterminée. DECEC : décocté des écorces de tronc ; DECFEU : décocté des feuilles ; DECRA : décocté des écorces de racines ; MeOH B : extrait méthanolique des écorces du tronc ; MeOH K : extrait méthanolique des feuilles ; FLAVO L : fraction flavonoïdique ; MeOH F : extrait méthanolique des écorces des racines ; DCM E : extrait dichlorométhane des écorces des racines.

L'effet inhibiteur sur la peroxydation lipidique des extraits a été évalué à une concentration unique (150 µg/mL). Les pourcentages d'inhibition oscillent entre 37.3 et 28.0 % ; l'extrait MeOH (B) a présenté le meilleur effet tandis que le faible effet a été présenté par la fraction flavonoïdique (FLAVO L). La quercétine utilisée comme produit de référence a présenté une inhibition de 37.4 % à la concentration de 150 µg/mL.

L'effet des extraits sur l'activité enzymatique de la lipoxygénase a été déterminé à la concentration de 100 µg/mL. Les valeurs d'inhibition varient entre 97.7 et 16.3 %. La forte inhibition (97.7 %) a été obtenue avec l'extrait MeOH (B) et la faible inhibition (16.3 %) avec la fraction flavonoïdique (FLAVO L). Les pourcentages d'inhibition du solu-medrol et de l'hydrocortisone ont été respectivement de 21.5 et 42.1 %.

3.3.Discussions

3.3.1.Etude phytochimique

L'étude phytochimique a permis d'isoler et d'identifier 18 composés de *P. erinaceus*. La friedeline (**PE.1**), le lupeol (**PE.2**) et l'épicatchine (**PE.3**) sont issus des écorces du tronc ; le stigmastérol (**PE.9**), la friedeline (**PE.6**), le 3 α -hydroxyfriedelan-2-one (**PE.7**), l' α -sophoradiol (**PE.8**), le maltol 6-*O*-apiofuranoside-glucofuranoside (**PE.11**) et les composés non identifiés **PE.4**, **PE.5**, **PE.10**, **PE.12** ont été isolés des écorces de racines de *P. erinaceus*. L'étude a permis de purifier au niveau des feuilles la rutine (**PE.18**), la lutéoline (**PE.14**), la quercétine-3-*O*-sophoroside (**PE.15**), le kaempferol-3-*O*-sophoroside (**PE.17**), la quercétine-3-*O*- β -glucose (**PE.16**) et le composé **PE.13**. Hormis le lupeol et l'épicatchine qui ont été isolés respectivement des espèces *P. santalinus* et *P. marsupium* (Kumar et al., 1975 ; Farboodnlay et Ray, 1993), aucune étude antérieure n'a rapporté l'isolement et l'identification de ces molécules du genre *Pterocarpus* et de l'espèce *P. erinaceus*.

Parmi les isoflavones (la muningine, la prunetine, la pseudobaptigenine, la tectorigenine, l'afromosine) isolés de *P. erinaceus* par Bevan et al. (1965), aucun n'a été retrouvé au cours de nos travaux. Ceci s'explique par le fait que les parties de la plante étudiées sont différentes. En effet les isoflavones ont été purifiés du cœur de bois tandis que nous avons menés nos travaux sur les écorces de tronc, les feuilles et les écorces de racines de *P. erinaceus*.

Ces résultats contribuent à enrichir le répertoire des métabolites secondaires du genre *Pterocarpus* de types triterpénique et flavonoïdique, et ces derniers pourront servir de complément à une étude plus approfondie de la chimiotaxonomie du genre *Pterocarpus*. C'est la première fois que le maltol 6'-*O*- β -apiofuranoside- β -glucofuranoside est identifié et isolé au sein des Fabaceae. Il a été isolé et identifié de l'extrait hydro-acétonique de *Elsholtzia rugulosa* Hemsl. (Labiatae) pour la première fois par Haizhou et al. (2008). Les flavonoïdes isolés sont ubiquitaires dans la famille des Fabaceae. En effet l'épicatchine a été isolé d'*Eysenhardtia subcoriacea* Pennell par Mastache et al. (2008). La rutine et l'isoquercitrine ont été isolés de *Styphnolobium japonicum* (L.) Schott et de *Pterogyne nitens* Tulasne (Regasini et al., 2008; Kite et al., 2009). La lutéoline a été isolée de *Senna alata* (L.) Roxb. par Hennebelle et al. (2009).

3.3.2. Etude biologique

3.3.2.1. Toxicité générale aiguë

- Voie orale

La détermination de la dose létale 50 (DL₅₀) d'une drogue permet d'évaluer son niveau de toxicité aiguë selon une échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1943) et celle de l'OMS (2002). Après deux semaines d'observation aux doses de 500, 1000, 1500, 2000 et 2500 mg/kg de poids corporel, aucune souris n'est morte. Ainsi avec une DL₅₀ limite supérieure à 2500 mg/kg, selon l'échelle de toxicité, les décoctés issus des feuilles (DECFEU), d'écorces de tronc (DECEC), d'écorces de racines (DECRA) et les extraits méthanoliques des feuilles (MeOH K), d'écorces du tronc (MeOH B) sont considérés comme des substances faiblement toxiques.

- Voie intra-péritonéale

Concernant l'administration par voie intrapéritonéale, les souris ont toléré l'extrait méthanolique d'écorces de tronc (MeOH B) jusqu'à la dose de 1500 mg/kg de poids corporel. La DL₅₀ limite étant supérieure à 1500 mg/kg, l'extrait méthanolique d'écorces de tronc (MeOH B) de *P. erinaceus* est donc considéré comme un produit faiblement toxique selon l'échelle de toxicité.

3.3.2.2. Activités anti-inflammatoires

- Test anti-œdémateux à la carragénine

L'œdème induit au niveau de la patte par l'injection de la carragénine est un modèle animal largement utilisé pour évaluer l'activité anti-inflammatoire des drogues. L'injection de la carragénine provoque la libération de plusieurs médiateurs chimiques endogènes qui sont responsables du processus inflammatoire. La manifestation de l'inflammation bi-phasique est due à la libération des différents médiateurs endogènes. La phase initiale qui dure environ 1h30 est due à la libération de l'histamine, de la sérotonine et de la bradykinine qui sont responsables de l'augmentation de la perméabilité vasculaire. La biosynthèse des prostaglandines et la formation des protéases et les lysosomes sont responsables de la seconde et dernière phase qui intervient après la phase initiale (Santa et al., 2011, Vanderlinde et al., 2009). La prostaglandine PGE₂ reste la prostaglandine majoritaire au cours de

l'inflammation et induit l'œdème et l'hyperalgésie (Hata et Breyer, 2004 ; Simmons et *al.*, 2004).

Les décoctés (DECEC, DECFEU, DECRA) et les extraits méthanoliques (MeOH B, MeOH K) ont inhibé les deux phases de l'inflammation provoquée par l'injection de la carragénine. Ainsi les extraits pourraient avoir une action antagoniste à la libération de l'histamine, de la bradykinine, de la sérotonine et de la biosynthèse des prostaglandines. L'effet anti-inflammatoire pourrait être dû aussi au blocage des récepteurs de ces différents médiateurs endogènes. La forte inhibition de l'œdème a été observée à la 5^{ème} heure pour les extraits administrés oralement. Ceci suggère que l'action inhibitrice des extraits s'exercerait davantage sur les cyclo-oxygénases (COX 1 et COX 2) qui sont responsables de la biosynthèse des prostaglandines. L'œdème induit par la carragénine est sensible aux inhibiteurs des cyclo-oxygénase (COX) et aux inhibiteurs de la lipoxigénase (Dhara et *al.*, 2000). Ceci suggère que l'effet anti-œdémateux des extraits pourrait être dû en partie à l'inhibition de la lipoxigénase. La réduction de l'œdème au delà de la troisième heure après l'administration de la carragénine corrèle raisonnablement avec les doses thérapeutiques de la majorité des agents anti-inflammatoires cliniquement efficaces (Woldesellassie et *al.*, 2011). L'extrait méthanolique des feuilles (MeOH K) a présenté la meilleure inhibition (77.4 %) à la dose de 400 mg/kg. Cependant l'administration intrapéritonéale de l'extrait méthanolique (MeOH B) des écorces de tronc agirait plus sur la libération de l'histamine et la sérotonine parce qu'il a présenté une forte inhibition à la première heure. Cette remarque est similaire aux travaux de Mota et *al.* (1985) qui ont rapporté que l'effet pharmacologique de l'administration *i.p.* de la fraction de tanins d'*Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) a été plus efficace comparé à la voie orale. En effet la voie digestive peut jouer un rôle de barrière au passage des substances bioactives tandis que la voie *i.p.* offre une large biodisponibilité aux substances bioactives.

L'activité intrinsèque des composants chimiques bioactifs et de leurs quantités sont responsables de l'effet anti-inflammatoire des extraits. Nos travaux antérieurs (Noufou, 2006) ont révélé la présence de tanins, de saponosides, de flavonoïdes et de triterpènes/stéroïdes dans le décocté et l'extrait méthanolique des écorces de tronc. Plusieurs auteurs ont montré la propriété anti-inflammatoire de ces composés (Wang *et al.*, 2008 ; Wenzig *et al.*, 2008). Le criblage phytochimique a permis de caractériser les principaux groupes chimiques (les flavonoïdes, les tanins et polyphénols, les saponosides et les triterpènes et stéroïdes) qui pourraient être responsables des propriétés des décoctés des feuilles et d'écorces de racines de *P. erinaceus*. Sulaiman et *al.* (2008) et Ijoema et *al.* (2011) ont rapporté que les flavonoïdes,

les tanins, les saponosides et les triterpènes/stéroïdes sont responsables de l'effet anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique et de *Kaempferia galanga* Linn. (Zingiberaceae) et de l'extrait aqueux d'*Ipomoea involucrata* Beauv P. (Convolvulaceae).

L'extrait méthanolique (MeOH K) qui a présenté la forte activité (77.4 % à 400 mg/kg) a été fractionné en phases DCM, AcOEt, BuOH et aqueuse. L'analyse par CLHP analytique de l'extrait MeOH (K) et de ses fractions a permis de caractériser des flavonoïdes dont la rutine, la quercétine-3-glucoside, la lutéoline, la quercétine-3-sophoroside, le kaempferol-3-sophoroside ont été isolés lors de l'étude phytochimique. Les flavonoïdes sont connus pour leur effet anti-inflammatoire (Bruneton, 2009 ; Zainul *et al.*, 2008). Les propriétés anti-inflammatoire, anti-cancérogène et antioxydant de la lutéoline ont été rapportées (Seelinger *et al.*, 2008). Rotelli *et al.* (2003) ont montré que la quercétine et la rutine ont réduit l'œdème induit par la carragénine, mais la rutine a été moins active sur l'œdème induit sur l'oreille de la souris par le xylène.

- *Test anti-œdémateux à l'huile de croton*

L'œdème induit par l'application de l'huile de croton sur la face interne de l'oreille de la souris, est utilisé pour évaluer l'effet anti-inflammatoire local d'une substance. L'œdème provoqué est dû à la libération d'histamine et de la sérotonine responsables de la vasodilatation et de l'infiltration des leucocytes (Felipe *et al.*, 2010), et à la production de IL 1 β , de TNF α (Towbin *et al.*, 1995). Le TPA (12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate) composant majoritaire de l'huile de croton active la protéine kinase C (PKC) avec la stimulation de la phospholipase A₂ conduisant à la libération de l'acide arachidonique et la biosynthèse des prostaglandines et des leucotriènes (LT₄) ainsi que la libération de TNF α et nuclear factor kappa B (NF- κ B) (Pinto *et al.*, 2010 ; Saraiva *et al.*, 2011 ; Gorzalczany *et al.*, 2011).

Le décocté (DECEC), l'extrait MeOH (B) et l'extrait DCM (A) des écorces de tronc ont inhibé de manière significative ($p < 0.001$) l'œdème induit par l'huile de croton. Il est possible que le mécanisme d'inhibition de l'œdème soit dû au blocage de la libération des médiateurs endogènes pro-inflammatoires, de IL 1 β et de TNF α . L'effet inhibiteur de l'extrait DCM (A) a été plus intense que celui de DECEC et MeOH (B). Cette différence d'intensité d'activité s'explique par la composition chimique et la polarité des extraits. La couche cornée qui constitue la barrière épidermique reste une barrière limitante de caractère lipophile. Les composés lipophiles pourraient s'y dissoudre et diffuser dans la matrice lipidique située entre les filaments de kératine et au sein des lipides intercellulaires (Lompo *et*

al., 1998). En effet l'extrait DCM (A) étant apolaire traverse facilement à travers la membrane plasmique de l'oreille.

L'analyse CCM a permis de révéler la présence des triterpènes et stéroïdes dans l'extrait DCM (A) dont la friedeline et le lupeol ont été isolés. La friedeline et le lupeol ont contribué à l'activité de l'extrait DCM (A) avec des pourcentages d'inhibition respectifs de 48.2 et 61.1 %. En effet les effets anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique de la friedeline isolée d'*Azima tetracantha* Lam. (Salvadoraceae) ont été rapportés par Paulrayer *et al.* (2011). Des études ont rapporté aussi que le lupeol et ses esters isolés du latex de *Leptadenia hastata* (Pers.) Decne (Asclepiadaceae) et des fleurs de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) ont inhibé l'œdème induit par l'huile de croton (Nikiema *et al.*, 2001 ; Akihisa *et al.*, 1996).

L'effet anti-inflammatoire local de l'extrait DCM (E) des écorces de racines pourrait être lié à l'inhibition de la biosynthèse des médiateurs pro-inflammatoires endogènes et aux cytokines (IL 1 β , TNF α). La présence des triterpènes/stéroïdes dont la friedeline, le stigmastérol, le sophoradiol pourrait justifier son effet. Les propriétés anti-inflammatoires et anticancéreuses de stigmastérol (Lai *et al.*, 2010 ; Quilez *et al.*, 2010), de la friedeline (Tewtrakul *et al.*, 2010) ont déjà été démontrées.

L'extrait DCM (A) a exercé significativement ($p < 0.001$) la forte activité anti-inflammatoire locale (97.7 %) avec une dose de 200 μ g/oreille. La différence d'efficacité entre les deux extraits apolaires (DCM A et DCM E) serait liée à leur composition chimique. En effet entre les deux extraits la friedeline a été le seul composé commun cependant son effet anti-inflammatoire local a été moindre comparativement à celui du lupeol isolé de DCM (A).

3.3.2.3. Activités analgésiques

- *Test à l'acide acétique*

L'injection de l'acide acétique provoque une réaction composée de la contraction abdominale s'accompagnant d'une extension des membres antérieures et l'allongement du corps. Cette méthode est utilisée pour étudier l'effet analgésique périphérique d'une substance. Les décoctés (DECEC, DECFEU, DECRA) et les extraits méthanoliques (MeOH B, MeOH K) aux doses testées ont réduit significativement ($p < 0.001$) le nombre de contorsions abdominales comparés au témoin.

L'injection de l'acide acétique provoque une douleur inflammatoire viscérale par la libération de la sérotonine, de l'histamine, de la bradykinine, de la substance P et des prostaglandines (PGE_{2 α} , PGF_{2 α}) qui agissent en stimulant les neurones nociceptifs

périphériques (Zhu et *al.*, 2011 ; Peerati et *al.*, 2010 ; Yi et *al.*, 2010). Ainsi il est possible que le mécanisme de l'effet analgésique de ces extraits soit la réduction de la libération de l'histamine, de la sérotonine et des prostaglandines, soit le blocage direct des récepteurs de ces médiateurs endogènes. Comme l'injection de l'acide acétique induit également la production des cytokines (IL 1 β , IL 8 et TNF α) (Guginski et *al.* 2009), l'effet analgésique des extraits serait lié partiellement à l'inhibition de ces cytokines.

L'effet analgésique des décoctés (DECEC, DECFEU, DECRA) serait à attribuer à la présence des tanins, des saponosides, des flavonoïdes et des triterpènes/stéroïdes mis en évidence lors des criblages chimiques. Zeashan et *al.* (2009) ont rapporté que les tanins, les saponosides, les flavonoïdes et les triterpènes/stéroïdes possèdent des effets anti-inflammatoires et analgésiques. L'action synergique de ces différents composés chimiques pourrait être responsable des propriétés analgésique et anti-inflammatoire des extraits. La présence de tanins et de flavonoïdes identifiés lors de l'étude phytochimique de l'extrait MeOH (B) contribuerait à son effet analgésique.

On observe que les doses anti-inflammatoires des décoctés (DECEC, DECFEU, DECRA) et des extraits méthanoliques (MeOH B, MeOH K) sont supérieures à celles analgésiques. Ces extraits se comportent ainsi comme les AINS dont les doses analgésiques restent faibles comparativement à celles de l'anti-inflammatoire (Balou, 2005).

- *Test au Formaldéhyde*

En plus du test à l'acide acétique, le test au formaldéhyde est utilisé pour investiguer le mécanisme de l'effet analgésique des extraits utilisés : décocté des écorces de tronc (DECEC), décocté des feuilles (DECFEU) et le décocté des écorces de racines (DECRA) de *P. erinaceus*. Le test se manifeste par une réponse à deux phases sur lesquelles les drogues analgésiques agissent différemment. La première phase est déclenchée immédiatement après l'injection de la solution de formaldéhyde et est caractérisée par la stimulation directe des nocicepteurs (fibres C) et la libération de la substance P et la bradykinine; la seconde phase est due à la douleur inflammatoire locale causée par la production d'oxyde nitrique, de la sérotonine, de l'histamine et des prostaglandines (PGE_{2 α} , PGF_{2 α}) (Nonato et *al.*, 2009 ; Peerati et *al.*, 2010, Shang et *al.*, 2010).

Les résultats obtenus (Figure 3- 53) montrent que les décoctés inhibent toutes les deux phases avec un effet plus élevé dans la seconde phase. Ceci corrobore avec leurs effets anti-inflammatoires constatés au niveau du test à la carragénine. En effet l'effet analgésique

pourrait être lié à l'inhibition de la biosynthèse des prostaglandines ($PGE_{2\alpha}$, $PGF_{2\alpha}$) et les autres médiateurs endogènes pro-inflammatoires. L'inhibition de la première phase suggère que les trois décoctés pourraient avoir un effet analgésique central comparativement au paracétamol. Les anti-inflammatoires stéroïdiens et non-stéroïdiens ont un effet moindre ou pas d'effet sur la première phase. Les analgésiques centraux tels que les opioïdes inhibent les deux phases tandis que l'inhibition de la seconde phase est caractéristique aux inhibiteurs des cyclo-oxygénases (les anti-inflammatoires non stéroïdiens) (Mino *et al.*, 2004).

Yashpal et Coderre (1998) ont rapporté que la réponse nociceptive et inflammatoire de la solution de formaldéhyde est relativement affectée par des fortes doses des agents anti-inflammatoires. Ce fait a été constaté sur les doses analgésiques au test à l'acide acétique comparées à celles du test au formaldéhyde. Cette différence d'efficacité pourrait être due à la persistance de la sensibilisation centrale de la solution du formaldéhyde (2.5 %). En effet l'administration centrale des AINS et des AIS inhibe la nociception induite par la solution de formaldéhyde (Yashpal et Coderre, 1994).

L'effet analgésique central et anti-inflammatoire des décoctés pourrait être attribué à la présence de tanins, de flavonoïdes, de saponosides et de triterpènes/stéroïdes révélés dans ces décoctés. Des études menées par Ahmadiani *et al.* (1998) ont montré que ces composés sont responsables des effets inhibiteurs des deux phases du test au formaldéhyde.

3.3.2.4. Activité Antipyrétique

L'hyperthermie induite par l'injection de la suspension de levure de bière (20 %) a été réduite sous l'effet antipyrétique des décoctés des écorces de tronc (DECEC), des feuilles (DECFEU) et des écorces de racines (DECRA). L'effet anti-inflammatoire des décoctés permet de suggérer que l'effet antipyrétique est dû à l'interaction des extraits avec la biosynthèse des prostaglandines et la formation des cytokines. En effet l'injection de la suspension de levure de bière induit la libération des cytokines pro-inflammatoires ($IL\ 1\beta$, $TNF\ \alpha$) stimulant la biosynthèse de PGE_2 aux environs du centre hypothalamique thermorégulateur (Santos *et al.*, 2011). Or les prostaglandines ($PGE\ 2$) et les cytokines ($IL\ 1\beta$, $TNF\ \alpha$) sont des importants médiateurs responsables de la fièvre, de la formation de l'œdème et de la migration cellulaire lors de l'inflammation (Kassuya, *et al.*, 2009).

Des saponosides, des tanins, des flavonoïdes et des triterpènes/stéroïdes ont été caractérisés dans les décoctés DECEC, DECFEU et DECRA. Plusieurs études ont démontré que l'effet antipyrétique d'extrait méthanolique des feuilles de *Bombax malabaricum* DC.

(Bombacaceae), d'extrait éthanolique des racines de *Laportea crenulata* Gaud (Urticaceae) et d'extrait aqueux des feuilles de *Prosopis cineraria* (L.) Druce (Fabaceae) est dû à la présence de ces groupes phytochimiques (Lincy *et al.*, 2011 ; Khan *et al.*, 2007 ; Hossain *et al.*, 2011)

La barrière hémato-encéphalique empêche des molécules de drogue ou d'autres produits chimiques d'atteindre le système nerveux central (SNC). Il est également indiqué que le passage d'une drogue à travers la barrière hémato-encéphalique est un des facteurs contribuant à son activité antipyrétique (Zainul *et al.*, 2008). L'effet antipyrétique des décoctés pourrait être lié au passage de certains de leurs composés chimiques bioactifs à travers la barrière hémato-encéphalique et/ou au blocage de synthèse de prostaglandine PGE 2. L'effet antipyrétique des décoctés est comparé à celui du paracétamol dont l'effet antipyrétique et analgésique est lié à l'inhibition des prostaglandines dans les systèmes nerveux central et périphérique (Lucas *et al.*, 2005).

Les effets anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique *in vivo* sont associés aux paramètres pharmacocinétiques notamment à la biodisponibilité des composés phytochimiques bioactifs des extraits administrés. Ainsi ces effets pharmacologiques dépendent de l'absorption à travers la paroi intestinale, le métabolisme et de la distribution des composés phytochimiques présents dans les différents extraits. En plus le caractère hydrophile des composés chimiques est un facteur déterminant pour le passage à travers la paroi intestinale. En effet des études ont montré que les flavonoïdes et les tanins subissent une métabolisation avant d'être absorbés et les métabolites sont ensuite biotransformés (Loke *et al.*, 2008 ; Manach *et al.*, 2005).

3.3.2.5. Détermination de la production de TNF α et de NO

- *Détermination de TNF α*

Le TNF α est une des cytokines importantes qui jouent un rôle crucial dans le processus inflammatoire, y compris la stimulation de la production de l'oxyde nitrique (NO) qui est lié au stress oxydatif et aux maladies inflammatoires. Les extraits (MeOH K, AcOEt G, BuOH H) ont inhibé la production de TNF α produite par les macrophages suite à la stimulation de LPS ou LPS/IFN. L'activation de NF-KB (nuclear factor kappa B) suite à une infection (LPS) contribue à l'induction de TNF α (Lee *et al.*, 2003). L'effet inhibiteur des extraits actifs pourrait être lié au blocage de l'activation de NF-KB. De plus l'inhibition de TNF α pourrait

résulter de l'inhibition de la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle du ARN messager de TNF α (Wang *et al.*, 2002, Wadsworth *et al.*, 2001).

L'inhibition de TNF α par l'extrait MeOH (K) pourrait être attribuée à la présence des flavonoïdes dont la caractérisation a été faite par la CLHP analytique sur la fraction flavonoïdique. En effet des études ont montré la capacité des flavonoïdes à inhiber la production de TNF α (Wang *et al.*, 2002 ; Kempuraj *et al.*, 2005). Lihua *et al.* (2010) ont montré que la lutéoline (molécule isolée de la fraction flavonoïdique) empêche l'expression de TNF α par l'inactivation de NF-KB.

L'activité inhibitrice des phases AcOEt (G) et BuOH (H) pourrait expliquer l'effet inhibiteur de MeOH F. L'inactivité de MeOH B pourrait être liée à son caractère hydrophile qui lui rend incapable de passer à travers les membranes cellulaires. Cet extrait pourrait se comporter comme le resveratrol, un composé anticancéreux. Le resveratrol induit la production de TNF α par les macrophages stimulés par LPS ou IFN, cette production de TNF α conduit à la cytotatique et à la cytotoxicité des cellules malignes (Wang *et al.*, 2002).

- *Détermination de NO*

L'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote (NO) est important dans le maintien de la dilatation des vaisseaux sanguins mais ses concentrations élevées peuvent entraîner des dommages oxydatifs. En effet la NO qui est produite par l'oxyde nitrique synthase inductible suite à la stimulation de TNF α , IFN et LPS, contribue au processus pathologique inflammatoire. L'oxyde nitrique a été estimé en mesurant la quantité de nitrite formée dans le milieu de culture cellulaire. L'extrait MeOH K a présenté une meilleure inhibition sur la production de nitrite comparativement à la fraction flavonoïdique (FLAV L) et le décocté DECEC. Des auteurs (Konho *et al.*, 2011 ; Sheeba *et al.*, 2009) ont rapporté que l'inhibition de la formation de NO et de TNF α est due au blocage de l'activation de NF- κ B. Des études récentes ont montré que NF- κ B est impliqué dans la régulation de l'expression de iNOS (inductible nitric oxide synthase) et de COX 2 (Kang *et al.*, 2009). Ainsi il est possible que l'effet inhibiteur de la production de NO des extraits puisse être lié soit au blocage de l'activation de NF- κ B ou soit à l'inhibition de iNOS. A ce sujet, Kim *et al.* (2001) ont ajouté que l'inhibition de iNOS se fait de manière indirecte soit sur la transcription de l'ARN messager de iNOS ou soit sur la stabilisation de NF- κ B.

L'inhibition de la formation de TNF α par l'extrait MeOH (K) peut être attribuée en partie à son effet inhibiteur sur la libération de NO et son effet anti-inflammatoire observé à la 5^{ème}

heure après injection de la carragénine. Le NO couplé au radical superoxyde forme le radical peroxytrite qui accroît la biosynthèse des prostaglandines (Houssain *et al.*, 2010). Ceci pourrait refléter l'effet anti-inflammatoire des extraits.

3.3.2.6. Activités Antioxydantes

Les radicaux libres oxygénés (O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot) dans la physiologie normale cellulaire sont immédiatement éliminés par les systèmes antioxydants endogènes (enzymatique et non enzymatique). Lors d'une inflammation la production excessive de ces radicaux libres peut entraîner une lésion cellulaire et tissulaire et la peroxydation lipidique contribuant ainsi au maintien de l'inflammation. La NADPH oxydase, la xanthine oxydase et iNOS jouent un rôle important dans la production de radicaux libres lors d'une inflammation.

L'activité antioxydante des extraits et des fractions a été évaluée en utilisant deux méthodes (DPPH et CUPRAC). L'étude antiradicalaire (DPPH $^\circ$) montre que tous les extraits sont doués de capacité à piéger le radical DPPH $^\circ$. La capacité de piéger le radical DPPH $^\circ$ traduit le pouvoir d'éliminer les radicaux libres formés dans l'organisme. Le meilleur résultat a été obtenu avec l'extrait MeOH B (ARP = 5), comparable à celui du trolox (ARP = 4.8) utilisé comme produit de référence. L'extrait MeOH (K) a présenté la plus faible activité (ARP = 0.9), les autres extraits ont présenté des valeurs intermédiaires ($1.3 < ARP < 3.7$). La différence d'activité est probablement liée à la composition chimique des différents extraits. La présence de l'épicatchine et de tanins (environ 1/3) dans l'extrait MeOH B pourrait expliquer la forte activité antioxydante. En effet Geetha *et al.* (2004) ont mis évidence le pouvoir antioxydant de l'épicatchine avec la méthode de DPPH.

La méthode de CUPRAC est la seconde méthode utilisée pour évaluer le pouvoir antioxydant des différents extraits et fractions. Cette méthode est basée sur la réduction de l'ion Cu^{2+} à Cu^+ par un antioxydant. L'étude a montré que le pouvoir antioxydant des différents extraits sont restés moindre comparativement au produit de référence, la rutine (TEAC = 2.9). Les valeurs de TEAC de l'extrait MeOH (F), de la phase AcOEt (G), de la phase BuOH (H), de l'extrait MeOH (B) et du décocté (DECEC) sont respectivement de 0.8 ; 0.9 ; 1 ; 0.9 et 0.75. L'extrait MeOH (F), la phase AcOEt (G), la phase BuOH (H), l'extrait MeOH (B) ont un pouvoir antioxydant similaire à celui de l'acide ascorbique et des flavanones (hespéridine, hespéretine) (Yildiz *et al.*, 2008). Il a été rapporté que le pouvoir antioxydant obtenu avec CUPRAC est plus efficacement extensible aux réactions possibles *in vivo* des antioxydants

(Ilhami *et al.*, 2011). Ainsi la capacité antioxydante des différents extraits traduit leur capacité à piéger les radicaux libres formés lors d'une inflammation.

Le pouvoir antioxydant des décoctés (DECEC, DECFEU et DECRA), de l'extrait MeOH (B) et de l'extrait MeOH (K) pourrait contribuer à renforcer leur effet anti-inflammatoire dans le modèle à la carragénine. En effet l'œdème induit par la carragénine chez l'animal provoque l'activation de NADPH oxydase conduisant à la formation de radicaux libres qui stimulent la libérations des médiateurs endogènes pro-inflammatoires (PGE 2) et de cytokines (IL 1 β , TNF α) (Deng *et al.*, 2011 ; Impellizzeri *et al.*, 2010).

Les résultats des deux méthodes utilisées montrent que les différents extraits possèdent une activité antioxydante liée à la teneur des composés antioxydants qui pourraient agir de manière synergique. Les méthodes phytochimiques utilisées (tests colorimétriques, CCM, CLHP) ont permis de caractériser les flavonoïdes dans tous les extraits ; la quantité flavonoïdique a été importante dans l'extrait MeOH (K) dont six flavonoïdes ont été isolés. Les flavonoïdes sont connus comme des composés chimiques possédant de meilleure activité antioxydante. Cependant le pouvoir antioxydant de cet extrait a été faible, ceci pourrait être dû aux hétérosides flavonoïdiques qui le composent. A ce sujet Apak *et al.* (2007) ont rapporté que la glycosylation atténue l'activité antioxydante des flavonoïdes.

3.3.2.7. Inhibition de la peroxydation lipidique et de l'activité de la lipoxygénase

- *Inhibition de la peroxydation lipidique*

Les radicaux libres oxydent les lipides insaturés de la membrane cellulaire conduisant à la formation des peroxydes lipidiques. Les peroxydes lipidiques sont potentiellement toxiques et possèdent la capacité de détruire les cellules. La peroxydation lipidique est impliquée dans plusieurs conditions pathologiques incluant l'inflammation, le cancer, l'hépatotoxicité et les maladies cardiovasculaires (Middleton *et al.*, 2000). Le système FeCl₂-H₂O₂ a été utilisé pour induire la peroxydation lipidique dans l'homogénat de foie de rat. La peroxydation lipidique induite a été inhibée à différents pourcentages d'inhibition selon les extraits utilisés (Tableau 3- 11). Nous suggérons que la réduction de la formation des peroxydes lipidiques par les extraits est liée à leur pouvoir antioxydant.

Des auteurs ont rapporté que l'administration de la carragénine chez l'animal provoque une peroxydation lipidique dans les tissus de la patte (Agha et Gad 1995 ; Tanas *et al.*, 2010). Ainsi l'effet anti-inflammatoire des décoctés (DECEC, DECFEU, DECRA) et des extraits méthanoliques (MeOH B, MeOH F) pourrait être attribué en partie à leur capacité de réduire

la peroxydation lipidique. Ces résultats suggèrent que l'effet réducteur de la peroxydation lipidique de l'homogénat de foie induit par les extraits leur confère un pouvoir hépatoprotecteur (Chang *et al.*, 1994).

- *Inhibition de l'activité de la lipoxygénase*

La lipoxygénase (LOX) catalyse les premières étapes de la transformation de l'acide arachidonique en leucotriènes qui sont des médiateurs des réactions inflammatoires et allergiques incluant le rhumatisme, la rhinite, l'asthme, le cancer et les maladies cardiovasculaires. Le test sur l'inhibition de l'activité de la lipoxygénase a été réalisé avec les extraits suivants : les décoctés (DECEC, DECFEU, DECRA), les extraits méthanoliques (MeOH B, MeOH F, MeOH K), la fraction flavonoïdique et l'extrait DCM des racines (DCM E). Les résultats du Tableau 3- 11 montrent que tous les extraits ont eu une action inhibitrice sur l'activité de la LO. La forte inhibition a été observée avec l'extrait MeOH B (97.7 %) comparé aux autres extraits et aux produits de référence (solumedrol et hydrocortisone). La différence de l'efficacité pourrait être due à la composition chimique. La quantité élevée de tanins de l'extrait MeOH (B) (environ 1/3) pourrait expliquer sa forte inhibition de l'activité de LO. Les tanins sont des inhibiteurs de LOX (Bruneton, 2009), sont anticancéreux (Ramos, 2008) et ont des propriétés antioxydantes (Zhou *et al.*, 2011), anti-inflammatoires et analgésiques (Viana *et al.*, 1997).

Holsapple et Yim (1984) ont rapporté que l'injection de la carragénine chez l'animal provoque une biosynthèse de leucotriènes. Ceci suggère que l'effet anti-œdémateux des décoctés (DECEC, DECFEU, DECRA) et des extraits méthanoliques (MeOH B, MeOH K) pourrait être associé à l'inhibition de la LOX.

CHAPITRE IV : CONCLUSION GENERALE-PERSPECTIVES

La présente étude répond à la question de la politique nationale de valoriser la médecine traditionnelle à travers des études phytochimiques, toxicologiques et pharmacologiques afin de mettre à la disposition des populations, des phytomédicaments améliorés et accessibles.

Pterocarpus erinaceus Poir. (Fabaceae) est une plante médicinale dont les différentes parties sont utilisées dans le traitement de nombreuses pathologies y compris les maladies à composante inflammatoire (ulcère, rhumatisme, dysenterie, inflammation, dermatoses ...). Notre étude a été menée sur deux grands axes à savoir la phytochimie et la biologie.

L'étude phytochimique a permis d'isoler et d'identifier 18 composés des différents extraits issus des écorces de tronc, des feuilles et des écorces de racines de *P. erinaceus* :

- écorces de tronc : la friedeline (**PE.1**), le lupeol (**PE.2**) et l'épicatchine (**PE.3**)
- feuilles : la rutine (**PE.18**), la lutéoline (**PE.14**), la quercétine-3-O-sophoroside (**PE.15**), le kaempferol-3-O-sophoroside (**PE.17**), la quercétine-3-O- β -glucose (**PE.16**) et le composé **PE.13**
- écorces de racines : le stigmastérol (**PE.9**), la friedeline (**PE.6**), le 3 α -hydroxyfriedelan-2-one (**PE.7**), l' α -sophoradiol (**PE.8**), le maltol 6-O-apiofuranoside-glucopyranoside (**PE.11**) et les composés **PE.4**, **PE.5**, **PE.10**, **PE.12** sont en cours d'identification.

L'étude biologique a été réalisée : *in vivo* (toxicité aiguë, anti-inflammatoire, analgésique, antipyrétique) et *in vitro* (antioxydant, tests sur l'inhibition de la production de TNF α et de nitrite cellulaires, de la peroxydation lipidique et de la lipoxgénase).

L'innocuité des extraits a été réalisée sur l'étude de la toxicité aiguë qui constitue le premier volet de l'étude biologique. En effet l'étude a montré que les décoctés des feuilles (DECFEU), d'écorces de tronc (DECEC), d'écorces de racines (DECRA) et les extraits méthanoliques des feuilles (MeOH K), d'écorces du tronc (MeOH B) sont considérés comme des substances faiblement toxiques selon l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner.

L'étude anti-œdémateuse à la carragénine a montré que l'extrait méthanolique des feuilles (MeOH K) a présenté la forte inhibition (77.4 %) à la dose de 400 mg/kg cependant l'extrait dichlorométhanique des écorces de tronc (DMC A) présente la forte inhibition (91 %) à la dose de 200 μ g/oreille sur l'œdème induit par l'huile de croton.

L'évaluation de l'effet analgésique (à l'acide acétique) révèle que le décocté des écorces du tronc (DECEC) manifeste l'effet le plus important parmi les décoctés et que de tous les extraits, l'extrait méthanolique (MeOH B) des écorces du tronc est le plus actif. Par contre

avec la méthode au formaldéhyde, le décocté des écorces de racine se manifeste plus en termes d'effet analgésique.

Les résultats des mesures d'activité antipyrétique montre que les décoctés sont actifs et plus particulièrement le décocté des feuilles qui a présenté le meilleur effet, ce qui confirme son utilisation contre la fièvre.

La production de TNF α et de NO cellulaires a été inhibée par différents extraits (MeOH K, AcOEt G, BuOH H) dont l'extrait méthanolique des feuilles (MeOH K) a présenté une inhibition remarquable. Les activités antioxydantes observées pour les différents extraits renforcent l'hypothèse de l'activité anti-inflammatoire à travers l'élimination des radicaux libre formés lors de l'inflammation.

L'étude sur la peroxydation lipidique a permis de montrer que l'effet inhibiteur des décoctés (DECEC, DECFEU, DECRA) et des extraits méthanoliques (MeOH B, MeOH K) contribue à l'effet anti-inflammatoire de ces extraits. L'inhibition de l'activité enzymatique de la lipoxigénase a permis de montrer que les extraits inhibent la production des leucotriènes (B4, C4, D4) qui participent au recrutement des polynucléaires neutrophiles et à l'augmentation de la perméabilité vasculaire.

L'ensemble de ces résultats phytochimiques et pharmacologiques constituent des bases scientifiques qui valident l'utilisation de *P. erinaceus* comme remède traditionnel contre diverses pathologies à composante inflammatoire.

Les données phytochimiques et pharmacologiques obtenues lors de notre travail pourraient être complétés par d'autres études :

- déterminer la structure des molécules isolées et non identifiées
- tester les composés isolés sur la lipoxigénase, la phospholipase A2 et les cyclo-oxygénases (COX1 et COX2).
- tester l'extrait MeOH B et MeOH K sur des lignées cellulaires cancéreuses,
- tester les extraits et les composés sur la production cellulaire de TNF α , NO et NF- κ B,
- déterminer l'effet analgésique central des extraits.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abesundara KJ, Matsui T, Matsumoto K. 2004. alpha-Glucosidase inhibitory activity of some Sri Lanka plant extracts, one of which, *Cassia auriculata*, exerts a strong antihyperglycemic effect in rats comparable to the therapeutic drug acarbose. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, 2541-2545.

Adedayo O, Anderson WA, Moo-Young M, Kolawole DO. 1999. Antifungal Properties of Some Components of *Senna Alata* flower. *Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy)* 37, 369-374.

Adinarayana D, Syamasundar KV. 1982. A new sesquiterpene alcohol from *Pterocarpus marsupium*. *Phytochemistry* 21, 1083-1085.

Agha AM, Gad MZ. 1995. Lipid peroxidation and lysosomal integrity in different inflammatory models in rats: the effects of indomethacin and naftazone. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 32, 279-285.

Agrawal PK. 1992. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* 31, 3307-3330.

Ahmadiani A, Fereidoni M, Semnianian S, Kamalinejad M, Saremi S. 1998. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Sambucus ebulus* rhizome extract in rats. *Journal of ethnopharmacology* 61, 229-235.

Akihisa T, Yasukawa K, Oinuma H, Kasahara Y, Yamanouchi S, Takido M, et al. 1996. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry* 43, 1255-1260.

Akroum S Etude analytique et biologique des flavonoïdes naturels. PhD, Université Mentouri de Constantine, Constantine, 2011.

Antonisamy P, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S. 2011. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* Lam. in mouse and rat models. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 63, 1070-1077.

Apak R, Guclu K, Demirata B, Ozyurek M, Celik SE, Bektasoglu B, et al. 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* 12, 1496-1547.

Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE. 2004. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, 7970-7981.

Arbonnier M. 2002. Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. edn). CIRAD-MNHN: Montpellier-Paris.

Arokiyaraj S, Martin S, Perinbam K, Arockianathan K, Marie Arockianathan P, Beatrice V. 2008. Free radical scavenging activity and HPTLC finger print of *Pterocarpus santalinus* L.-an in vitro study. *Indian Journal of Science and Technology* 1, 1-3.

Aron PM, Kennedy JA. 2008. Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Molecular nutrition & food research* 52, 79-104.

Arquimedes Gasparotto Juniora, Francielly Mourão Gasparotto, Emerson Luiz Botelho Lourenc, Sandra Crestani, Maria Elida Alves Stefanello, Marcos José Salvador et al., 2011. Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: Evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. *Journal of ethnopharmacology* 134, 363–372.

Asase A, Oteng-Yeboah AA, Odamtten GT, Simmonds MS. 2005. Ethnobotanical study of some Ghanaian anti-malarial plants. *Journal of ethnopharmacology* 99, 273-279.

Barnes PJ. 1993. Anti-inflammatory therapy for asthma. *Annual review of medicine* 44: 229-242.

Béné M-C. 2005. *Cahier de formation, Biologie médicale* 35: 22.

Benie T, Thieulant ML. 2004. Mechanisms underlying antigonadotropic effects of some traditional plant extracts in pituitary cell culture. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 11, 157-164.

Bevan CWL, Ekong DEU, Obasi ME, Powell JW. 1966. West African timbers. Part XIII. Extracts from the heartwood of *Amphimas pterocarpoides* and *Pterocarpus erinaceus*. *Journal of the Chemical Society C: Organic.* 2, 509-510.

Bezuidenhoudt BCB, Brandt EV, Ferreira D. 1987. Flavonoid analogues from *Pterocarpus* species. *Phytochemistry* 26, 531-535.

- Bonnefont-Rousselot D, Peynet J, Beaudeau J-L, Thérond P, Legrand A, Delattre J. 2002.** Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 16, 260-267.
- Brand W, Cuvelier M, Berset C. 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-wiss. U.-Technol* 28, 25-30.
- Bruneton J. 2009.** *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales.* (4th edn). Lavoisier Tec & Doc: Paris.
- Budzianowski J. 1990.** Kaempferol glycosides from *Hosta ventricosa*. *Phytochemistry* 29, 3643-3647.
- Cartea ME, Francisco M, Soengas P, Velasco P. 2010.** Phenolic Compounds in Brassica Vegetables. *Molecules* 16, 251-280.
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, et al. 2002.** COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 13926-13931.
- Chang CH, Lin CC, Hattori M, Namba T. 1994.** Effects on anti-lipid peroxidation of *Cudrania cochinchinensis* var. *gerontogea*. *Journal of ethnopharmacology* 44, 79-85.
- Chi YS, Jong HG, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP. 2001.** Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochemical pharmacology* 62, 1185-1191.
- Chiang Hsueh-Ching and Yen-Yeou Chen, 1993.** Xanthine oxidase inhibitors from the roots of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Journal of Enzyme Inhibition.* 7,225-235.
- Cho JY, Park J, Kim PS, Yoo ES, Baik KU, Park MH. 2001.** Savinin, a lignan from *Pterocarpus santalinus* inhibits tumor necrosis factor-alpha production and T cell proliferation. *Biological & pharmaceutical bulletin* 24, 167-171.
- Ciangherotti C, Buitrago D, Morales A. 2004.** Estudio de los componentes químicos de las hojas y tallos de *Cestrum buxifolium* Kunth. *Revista de la Facultad de Farmacia* 46, 31-34.

- Cipollone F, Cicolini G, Bucci M. 2008.** Cyclooxygenase and prostaglandin synthases in atherosclerosis: Recent insights and future perspectives. *Pharmacology & Therapeutics* 118, 161-180.
- Ciulei I. 1982.** Methodology for analysis of vegetable drug. Practical manual on industrial utilization of medicinal and aromatic plants. edn). Ministry of Chemical Industrie: Bucharest.
- Clark IA, Cowden WB. 2003.** The pathophysiology of falciparum malaria. *Pharmacology & therapeutics* 99, 221-260.
- Clark M B. 2006.** Endotoxic fever: New concepts of its regulation suggest new approaches to its management. *Pharmacology & Therapeutics* 111, 194-223.
- Colot M. 1972.** *Notions techniques de pharmacologie générale.* edn). Masson et C^{ie}: Paris.
- Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. 2001.** Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacological reviews* 53, 135-159.
- D M. 2005.** Médicaments de l'inflammation. *EMC - Stomatologie* 1(1): 21-29.
- Deng J-S, Chi C-S, Huang S-S, Shie P-H, Lin T-H, Huang G-J. 2011.** Antioxidant, analgesic, and anti-inflammatory activities of the ethanolic extracts of *Taxillus liquidambaricola*. *Journal of ethnopharmacology* 137, 1161-1171.
- Deutschländer M.S., N. Lall, M. Van de Venter, A.A. Husseina, 2011.** Hypoglycemic evaluation of a new triterpene and other compounds isolated from *Euclea undulata* Thunb. var. myrtina (Ebenaceae) root bark. *Journal of Ethnopharmacology.* 133, 1091–1095.
- Dhara AK, Suba V, Sen T, Pal S, Chaudhuri AK. 2000.** Preliminary studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of the methanolic fraction of the root extract of *Tragia involucrata* Linn. *Journal of ethnopharmacology* 72, 265-268.
- Dupont F, Guignard J-L. 2004.** *Botanique systématique moléculaire.* (13e edn). Masson: Paris.
- Ebi GC, Ofoefule SI. 2000.** Antimicrobial activity of *Pterocarpus osun* stems. *Fitoterapia* 71, 433-435.

Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. 1996. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol* 14, 397-440.

Ferreira Jorge F.S., Devanand L. Luthria, Tomikazu Sasaki and Arne Heyerick, 2010. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as Antioxidants and Their Potential Synergism with Artemisinin against Malaria and Cancer. *Molecules*, 15, 3135-3170.

Foo LY, Newman R, Waghorn G, McNabb WC, Ulyatt MJ. 1996. Proanthocyanidins from *Lotus corniculatus*. *Phytochemistry* 41, 617-624.

Fotie J, Bohle DS, Leimanis ML, Georges E, Rukunga G, Nkengfack AE. 2006. Lupeol long-chain fatty acid esters with antimalarial activity from *Holarrhena floribunda*. *Journal of natural products* 69, 62-67.

Fotio AL, Olleros ML, Vesin D, Tauzin S, Bisig R, Dimo T, et al. 2010. In vitro inhibition of lipopolysaccharide and mycobacterium bovis bacillus Calmette Guerin-induced inflammatory cytokines and in vivo protection from D-galactosamine/LPS -mediated liver injury by the medicinal plant *Sclerocarya birrea*. *International journal of immunopathology and pharmacology* 23, 61-72.

Gauthier C, 2008. Amélioration du comportement biopharmaceutique de triterpènes naturels anticancéreux par synthèse de saponines mono- et bidesmosidiques. PhD, Université du Québec à Chicoutimi, Québec.

Geetha T, Garg A, Chopra K, Pal Kaur I. 2004. Delineation of antimutagenic activity of catechin, epicatechin and green tea extract. *Mutation research* 556, 65-74.

Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, et al. 2005. Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the Cross-Legume Advances Through Genomics Conference. *Plant physiology* 137, 1228-1235.

Ghedira K. 2005. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* 3, 162-169.

Goetz P. 2011. Phytothérapie de l'inflammation (partie II). *Phytothérapie* 9, 310-317.

- Gonzalez-Gallego J, Sanchez-Campos S, Tunon MJ. 2007.** Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutricion hospitalaria : organo oficial de la Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral* 22, 287-293.
- Gorzalczany S, Lopez P, Acevedo C, Ferraro G. 2011.** Anti-inflammatory effect of *Lithrea molleoides* extracts and isolated active compounds. *Journal of ethnopharmacology* 133, 994-998.
- Goudable J, Favier A. 1997.** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 11, 115-120.
- Govindarajan R., Vijayakumar M., Pushpangadan P., 2005.** Antioxidant approach to disease management and the role of Rasayana herbs of Ayurveda. *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 165-178
- Grover JK, Yadav S, Vats V. 2002.** Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *Journal of ethnopharmacology* 81, 81-100.
- Guginski G, Luiz AP, Silva MD, Massaro M, Martins DF, Chaves J, et al. 2009.** Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 93, 10-16.
- Gülçin I, Topal F, Sar.kaya SBÖ, Bursal E, Bilsel G, Gören AC. 2011.** Polyphenol Contents and Antioxidant Properties of Medlar (*Mespilus germanica* L.). *Records of Natural Products* 5, 158-175.
- Henderson B, Poole S, Wilson M. 1996.** Microbial/host interactions in health and disease: who controls the cytokine network? *Immunopharmacology* 35, 1-21.
- Hennebelle T, Weniger B, Joseph H, Sahpaz S, Bailleul F. 2009.** *Senna alata*. *Fitoterapia* 80, 385-393.
- Hodge HC, Sterner JH. 1943.** Determination of substances acute toxicity by LD₅₀. *American Industrial Hygiene Association* 10, 93-99.
- Hogan SP, Foster PS. 1997.** Cytokines as targets for the inhibition of eosinophilic inflammation. *Pharmacology & Therapeutics* 74, 259-283.

Hollman PC, Katan MB. 1997. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine & pharmacotherapy Biomedecine & pharmacotherapie* 51, 305-310.

Holsapple MP, Yim GK. 1984. Therapeutic reduction of ongoing carrageenin-induced inflammation by lipoxygenase, but not cyclooxygenase inhibitors. *Inflammation* 8, 223-230.

Hossain E, Mandal SC, Gupta J. 2011. Phytochemical Screening and In-vivo Antipyretic Activity of the Methanol Leaf-Extract of *Bombax Malabaricum* DC (Bombacaceae). *Tropical J. Pharmaceutical Research* 10, 55-60.

Hossain E, Sarkar D, Maiti A, Chatterjee M, Mandal SC, Gupta JK. 2010. Anti-inflammatory effect of a methanolic extract of leaves of *Dregea volubilis*. *Journal of ethnopharmacology* 132, 525-528.

Hougee S, Faber J, Sanders A, de Jong RB, van den Berg WB, Garssen J, et al. 2005. Selective COX-2 inhibition by a *Pterocarpus marsupium* extract characterized by pterostilbene, and its activity in healthy human volunteers. *Planta medica* 71, 387-392.

Hougee S, Sanders A, Faber J, Graus YM, van den Berg WB, Garssen J, et al. 2005. Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages. *Biochemical pharmacology* 69, 241-248.

ICPS, 2002. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2000-2002. IOMC, WHO/PCS/01.5.

Ijeoma UF, Aderonke SO, Ogbonna O, Augustina MA, Ifeyinwa CN. 2011. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of crude extracts of *Ipomoea involucreta* leaves in mice and rats. *Asian Pacific journal of tropical medicine* 4, 121-124.

Impellizzeri D, Esposito E, Mazzon E, Paterniti I, Di Paola R, Bramanti P, et al. 2011. Effect of apocynin, a NADPH oxidase inhibitor, on acute lung inflammation. *Biochemical pharmacology* 81, 636-648.

Iris E, 2002. Chemical analysis and pharmacokinetics of the flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin in humans. PhD, University of Helsinki, Helsinki.

Iwashina T, Matsumoto S, Ozawa K, Akuzawa K. 1990. Flavone glycosides from *Asplenium normale*. *Phytochemistry* 29, 3543-3546.

Jahromi MA, Ray AB. 1993. Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Pterocarpus marsupium*. *Journal of natural products* 56, 989-994.

Kim Ju E, Jin HK, Kim YK, Lee HY, Lee SY, Lee KR, et al. 2001. Suppression by a sesquiterpene lactone from *Carpesium divaricatum* of inducible nitric oxide synthase by inhibiting nuclear factor- κ B activation. *Biochemical pharmacology* 61, 903-910.

Junli Z, Takahashi K, Kono Y, Suzuki Y, Takeuchi S, Shimizu T, et al. 1990. Bioactive condensed tannins from bark : chemical properties, enzyme inhibition and anti-plant-viral activities. *Japonais* 15, 585-591.

Kameswara Rao B, Giri R, Kesavulu MM, Apparao C. 2001. Effect of oral administration of bark extracts of *Pterocarpus santalinus* L. on blood glucose level in experimental animals. *Journal of ethnopharmacology* 74, 69-74.

Kang KH, Kong CS, Seo Y, Kim MM, Kim SK. 2009. Anti-inflammatory effect of coumarins isolated from *Corydalis heterocarpa* in HT-29 human colon carcinoma cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 47, 2129-2134.

Karou D, Dicko MH, Sanon S, Simpore J, Traore AS. 2003. Antimalarial activity of *Sida acuta* Burm. f. (Malvaceae) and *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). *Journal of ethnopharmacology* 89, 291-294.

Kassuya CA, Cremoneze A, Barros LF, Simas AS, Lapa Fda R, Mello-Silva R, et al. 2009. Antipyretic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract, dichloromethane fraction and costunolide from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae). *Journal of ethnopharmacology* 124, 369-376.

Katzung B. 2006. *Pharmacologie fondamentale et Clinique*. (9th edn). PICCIN: Padoue.

Kempuraj D, Madhappan B, Christodoulou S, Boucher W, Cao J, Papadopoulou N, et al. 2005. Flavonols inhibit proinflammatory mediator release, intracellular calcium ion levels and protein kinase C θ phosphorylation in human mast cells. *British journal of pharmacology* 145, 934-944.

- Kesari AN, Gupta RK, Watal G. 2004.** Two aurone glycosides from heartwood of *Pterocarpus santalinus*. *Phytochemistry* 65, 3125-3129.
- Khan A, Baki MA, Al-Bari MAA, Hasan S, Mosaddik MA, Rahman MM, et al. 2007.** Antipyretic Activity of Roots of *Laportea crenulata* Gaud in Rabbit. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences* 2, 58-61.
- Khan MR, Omoloso AD. 2003.** Antibacterial activity of *Pterocarpus indicus*. *Fitoterapia* 74, 603-605.
- Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. 2004.** Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of pharmacological sciences* 96, 229-245.
- Kim YP, Yamada M, Lim SS, Lee SH, Ryu N, Shin KH, et al. 1999.** Inhibition by tectorigenin and tectoridin of prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 induction in rat peritoneal macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1438, 399-407.
- Kinjo Junei, Tomoki Hirakawa, Ryota Tsuchihashi, Tsuneatsu Nagao, Masafumi Okawa, Toshihiro Nohara, Hikaru Okabe, 2003.** Hepatoprotective constituents in Plants 14. Effects of soyasapogenol B, sophoradiol and their glucuronides on the cytotoxicity of tert-butyl hydroperoxide to HepG2 cells. *Biology and Pharmaceutical Bulletin*, 26, 1357-1360.
- Kite GC, Veitch NC, Boalch ME, Lewis GP, Leon CJ, Simmonds MS. 2009.** Flavonol tetraglycosides from fruits of *Styphnolobium japonicum* (Leguminosae) and the authentication of *Fructus Sophorae* and *Flos Sophorae*. *Phytochemistry* 70, 785-794.
- Kohno S, Murata T, Sugiura A, Ito C, Iranshahi M, Hikita K, et al. 2011.** Methyl galbanate, a novel inhibitor of nitric oxide production in mouse macrophage RAW264.7 cells. *Journal of natural medicines* 65, 353-359.
- Konoshima T, Kokumai M, Kozuka M, Tokuda H, Nishino H, Iwashima A. 1992.** Anti-tumor-promoting activities of afromosin and soyasaponin I isolated from *Wistaria brachybotrys*. *Journal of natural products* 55, 1776-1778.
- Kresec O, Richard D, Busserolles J, Guastella V, Eschalier A. 2007.** Composante centrale de l'effet analgésique des AINS. *Douleur et Analgésie* 20, 1-9.

Krishnaveni KS, Rao JV. 2000. An isoflavone from *Pterocarpus santalinus*. *Phytochemistry* 53, 605-606.

Kumar N, Ravindranath B, Seshadri TR. 1974. Terpenoids of *Pterocarpus santalinus* heartwood. *Phytochemistry* 13, 633-636.

Kumar N, Seshadri TR. 1975. Triterpenoids of *Pterocarpus santalinus*: Constitution of a new lupene diol. *Phytochemistry* 14, 521-523.

Kupeli E, Tatli II, Akdemir ZS, Yesilada E. 2007. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory and antinociceptive glycoterpenoids from the flowers of *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. *Journal of ethnopharmacology* 110, 444-450.

Lagnika L, B. Attioua, B Weniger, M Kaiser, A Sanni, and C Vonthron-Senecheau, 2008. Phytochemical Study and Antiprotozoal Activity of Compounds Isolated from *Thalia geniculata*. *Pharmaceutical Biology*, 46, 162–165.

Lai CS, Mas RH, Nair NK, Mansor SM, Navaratnam V. 2010. Chemical constituents and in vitro anticancer activity of *Typhonium flagelliforme* (Araceae). *Journal of ethnopharmacology* 127, 486-494.

Laila Bennaghmouch, Hajjaji N, Gmira N, 2002. Flavonoïdes d'*Ajuga iva* (L.) Schreb (Labiée). *Actes Inst. Agron. Vet.* 22, 25-30.

Landry Y, Gies J, 2003. Pharmacologie: des cibles vers l'indication thérapeutique (Cours et exercices Sciences Sup). edn). DUNOD: Paris.

Lecerf J-M, 2006. Tomate, lycopen`ne et prévention cardiovasculaire. *Phytothérapie*, 1, HS34-39.

Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG, 2003. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF-alpha and COX-2 expression by sauchinone effects on I-kappaBalpha phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British journal of pharmacology* 139, 11-20.

Lhuillier MA, 2007. Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* hook.f ex oliver, *Agauria polyphylla* baker (ericaceae), *Tambourissa trichophylla* baker (monimiaceae) et *Embelia concinna* baker (myrsinaceae). Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse.

Li H, Nakashima T, Tanaka T, Zhang YJ, Yang CR, Kouno I, 2008. Two new maltol glycosides and cyanogenic glycosides from *Elsholtzia rugulosa* Hemsl. *Journal of natural medicines* 62, 75-78.

Lincy J, Mathew G, Sharma A, Gopal N, 2011. Antipyretic and analgesic effects of the aqueous extract of *Prosopis cineraria*. *Global J. Pharmacol.* 5, 73-77.

Lingbo Q, Xiaolan C, Jiansha L, Jingwei Y, Yufen Z, 2005. Chemical Components of *Leptopus chinensis*. *Chemistry of Natural Compounds* 41, 565-568.

Loke WM, Proudfoot JM, Stewart S, McKinley AJ, Needs PW, Kroon PA, et al. 2008. Metabolic transformation has a profound effect on anti-inflammatory activity of flavonoids such as quercetin: lack of association between antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity. *Biochemical pharmacology* 75, 1045-1053.

Lompo M, 2008. Étude pharmacologique des propriétés antiinflammatoires de *khaya senegalensis* a. juss. (meliaceae) : modes d'action biologique. Thèse d'Etat, Université de Ouagadougou - Université Libre de Bruxelles, Ouagadougou.

Lompo M, Ouedraogo S, Sourabie S, Guissou IP. 1998. Kase: valorisation d'une plante medicinale anti-inflammatoire. *Pharm. Méd. Trad. Afr.* 10, 68-79.

Lucas R, Warner TD, Vojnovic I, Mitchell JA, 2005. Cellular mechanisms of acetaminophen: role of cyclo-oxygenase. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 635-637.

Lusis AJ, Mar R, Pajukanta P, 2004. Genetics of atherosclerosis. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet* 5, 189-218.

Lu L, Zhang Y, Kong Q, 2011. Luteolin prevents LPS-induced TNF-alpha expression in cardiac myocytes through inhibiting NF-kappaB signaling pathway. *Inflammation* 34, 620-629.

- Ma X, Zheng C, Hu C, Rahman K, Qin L, 2011.** The genus *Desmodium* (Fabaceae)-traditional uses in Chinese medicine, phytochemistry and pharmacology. *Journal of ethnopharmacology* 138, 314-332.
- Mabry TJ, Kagan J, Rösler H, 1965.** NMR spectra of trimethylsilyl ethers of flavonoid glycosides. *Phytochemistry* 4, 177-183.
- Mahato SB, Kundu AP, 1994.** ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features. *Phytochemistry* 37, 1517-1575.
- Mahato SB, Sen S, 1997.** Advances in triterpenoid research, 1990-1994. *Phytochemistry* 44, 1185-1236.
- Maini RN, Taylor PC, 2000.** Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Med.* 51, 207-229.
- Malterud KE, Rydland KM, 2000.** Inhibitors of 15-lipoxygenase from orange peel. *Journal of agricultural and food chemistry* 48, 5576-5580.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L, 2004.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition* 79, 727-747.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C, 2005.** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition* 81, 230S-242S.
- Manjunatha BK, 2006.** Antibacterial activity of *Perocarpus santalinus*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 68, 115-116.
- Markham KR, 1982.** *Techniques of flavonoids identification*. edn). Academy Press.
- Markham KR, Ternai B, Stanley R, Geiger H, Mabry TJ, 1978.** Carbon-13 nmr studies of flavonoids III naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron* 34, 1389-1397.
- Mathew J, Subba Rao AV, Rambhav S, 1984.** Propterol, an antibacterial agent from *Pterocarpus marsupium*. *Current Science* 53, 576-577.

Maurya R, Ray AB, Chattopadhyay SK, Duah FK, Lin MC, Slatkin DJ, et al. 1985. The Synthesis of Propterol, a Novel 1,3-Diarylpropan-2-ol from *Pterocarpus marsupium*. *Journal of natural products* 48, 313-315.

Maurya R, Singh R, Deepak M, Handa SS, Yadav PP, Mishra PK, 2004. Constituents of *Pterocarpus marsupium*: an ayurvedic crude drug. *Phytochemistry* 65, 915-920.

Menvielle-Bourg F. Joanny, 2005. Plantes et vieillissement, données actuelles. *Phytothérapie*, 2, 57-71.

Mino J, Moscatelli V, Hnatyszyn O, Gorzalczany S, Acevedo C, Ferraro G, 2004. Antinociceptive and antiinflammatory activities of *Artemisia copa* extracts. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 50, 59-63.

Moore ND, 2009. In search of an ideal analgesic for common acute pain. 11, 129-137.

Mota ML, Thomas G, Barbosa Filho JM, 1985. Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. *Journal of ethnopharmacology* 13, 289-300.

Mukherjee Debabrata, 2002. Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and potential risk of cardiovascular events. *Biochemical Pharmacology*, 63, 817-821.

Mustofa, Valentin A, Benoit-Vical F, Pelissier Y, Kone-Bamba D, Mallie M, 2000. Antiplasmodial activity of plant extracts used in west African traditional medicine. *Journal of ethnopharmacology* 73, 145-151.

Nacoulma OG, 1996. Plantes médicinales et pratiques médicinales traditionnelles au Burkina Faso - Cas du plateau central (Medicinal plants and traditional medical practices in Burkina Faso: the case of the central plateau). Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences Naturelles, Université de Ouagadougou.

Nadembega P, Boussim JI, Nikiema JB, Poli F, Antognoni F, 2011. Medicinal plants in Baskoure, Kourittenga Province, Burkina Faso: an ethnobotanical study. *Journal of ethnopharmacology* 133, 378-395.

Narvaez-Mastache JM, Novillo F, Delgado G, 2008. Antioxidant aryl-prenylcoumarin, flavan-3-ols and flavonoids from *Eysenhardtia subcoriacea*. *Phytochemistry* 69, 451-456.

Ndom JC, Vardamides KJC, Wansi JD, Kamdem AW, Mbafor JT, Fomum ZT, 2001. Constituents of *Erythrina sigmoidea*. *Bull. Chem. Soc. Ethiop* 15, 151-156.

Ngamrojanavanich N, Loontaisong A, Pengpreecha S, Cherdshewasart W, Pornpakakul S, Pudhom K, et al. 2007. Cytotoxic constituents from *Butea superba* Roxb. *Journal of ethnopharmacology* 109, 354-358.

Niki E. 2010. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free radical biology & medicine* 49, 503-515.

Nikiema JB, Vanhaelen-Fastre R, Vanhaelen M, Fontaine J, De Graef C, Heenen M, 2001. Effects of antiinflammatory triterpenes isolated from *Leptadenia hastata* latex on keratinocyte proliferation. *Phytotherapy research* : 15, 131-134.

Nonato FR, Barros TA, Lucchese AM, Oliveira CE, dos Santos RR, Soares MB, et al. 2009. Antiinflammatory and antinociceptive activities of *Blechnum occidentale* L. extract. *Journal of ethnopharmacology* 125, 102-107.

Noungoué TD, 1998. Contribution à l'étude de *Trema orientalis* L. Blume (Ulmaceae) et Hemisynthèse de xanthes prenylées, Université Joseph Fourier Grenoble I, Grenoble.

Nuhu AM, Mshelia MS, Yakubu Y, 2000. Antimicrobial screening of, the bark extract of *Pterocarpus erinaceus* tree. *Journal of Chemical Society of Nigeria* 25, 85-87.

Ouédraogo Noufou, 2006. Etude pharmaco-chimique des extraits des écorces de *Pterocarpus erinaceus* (Fabaceae) : propriétés antioxydante et antibactérienne. Mémoire de DEA, Université de Ouagadougou (UFR/ Science de la Santé), 89 pages.

Palanichamy S. and S. Nagarajan, 1993. Analgesic activity of *cassia alata* leaf extract and kaempferol sosteroside. *Journal of Ethnopharmacology*, 29 ,73-78.

Pan C-H, Kim E, Jung S, Nho C, Lee J, 2008. Tectorigenin inhibits IFN- γ /LPS-induced inflammatory responses in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Archives of pharmacal research* 31, 1447-1456.

Panthong A, Supraditaporn W, Kanjanapothi D, Taesotikul T, Reutrakul V, 2007. Analgesic, anti-inflammatory and venotonic effects of *Cissus quadrangularis* Linn. *Journal of ethnopharmacology* 110, 264-270.

Patocka J, 2003. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *J. Appl. Biomed* 1, 7-12.

Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne J-O, 2002. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 16, 233-239.

Pinto NB, Morais TC, Carvalho KM, Silva CR, Andrade GM, Brito GA, et al. 2010. Topical anti-inflammatory potential of Physalin E from *Physalis angulata* on experimental dermatitis in mice. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 17, 740-743.

Plumb Geoffrey W., Keith R. Price, Michael J. C. Modes and Gary Williamson, 1997. Antioxidant Properties of the Major Polyphenolic Compounds in Broccoli. *Free Radical Research*, 27, 429-435.

Ponou BK, Barboni L, Teponno RB, Mbiancha M, Nguenefack TB, Park H-J, et al. 2008. Polyhydroxyoleanane-type triterpenoids from *Combretum molle* and their anti-inflammatory activity. *Phytochemistry letters* 1, 183-187.

Prochazkova D, Bousova I, Wilhelmova N, 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82, 513-523.

Qais HA, 2008. The cellular and molecular properties of flavonoids in prostate cancer chemoprevention. PhD, University of Toronto.

Quilez A, Berenguer B, Gilardoni G, Souccar C, de Mendonca S, Oliveira LF, et al. 2010. Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-Helicobacter pylori activities of several fractions isolated from *Piper carpunya* Ruiz & Pav. *Journal of ethnopharmacology* 128, 583-589.

Regasini LO, Velloso JC, Silva DH, Furlan M, de Oliveira OM, Khalil NM, et al. 2008. Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. *Phytochemistry* 69, 1739-1744.

Ridditid W, Sae-Wong C, Reanmongkol W, Wongnawa M, 2008. Antinociceptive activity of the methanolic extract of *Kaempferia galanga* Linn. in experimental animals. *Journal of ethnopharmacology* 118, 225-230.

Ross JA, Kasum CM, 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual review of nutrition* 22, 19-34.

Ross SA, ElSohly MA, Sultana GN, Mehmedic Z, Hossain CF, Chandra S, 2005. Flavonoid glycosides and cannabinoids from the pollen of *Cannabis sativa* L. *Phytochemical analysis*, 16, 45-48.

Rotelli AE, Guardia T, Juarez AO, de la Rocha NE, Pelzer LE, 2003. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 48, 601-606.

Roth E, Hejfel L, 2003. Oxygen Free Radicals in Heart Disease. In: (ed). *Cardiac Drug Development Guide* Totowa, NJ: Humana Press Inc; 47-67.

Ruangsang P, Tewtrakul S, Reanmongkol W, 2010. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory activities of *Curcuma mangga* Val and rhizomes. *Journal of natural medicines* 64, 36-41.

Rubinstein I, Goad LJ, Clague ADH, Mulheirn LJ, 1976. The 220 MHz NMR spectra of phytosterols. *Phytochemistry* 15, 195-200.

Saidu K, Onah J, Orisadipe A, Olusola A, Wambebe C, Gamaniel K, 2000. Antiplasmodial, analgesic, and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the stem bark of *Erythrina senegalensis*. *Journal of ethnopharmacology* 71, 275-280.

Saleem Mohammad, Aftab Alam, Shamasul Arifin, M. Shafi Shah, Bahar Ahmed and Sarwat Sultana, 2001. Lupeol, a triterpene, inhibits early responses of tumor promotion induced by benzoyl peroxide in murine skin. *Pharmacological Research*, 43, 2, 2001.

Samir A. Ross, Mahmoud A. ElSohly, Gazi N. N. Sultana, Zlatko Mehmedic, Chowdhury F. Hossain, Suman Chandra, 2005. Flavonoid Glycosides and Cannabinoids from the pollen of *Cannabis sativa* L. *Phytochemical Analysis*, 16, 45-48.

Santa-Cecilia FV, Vilela FC, da Rocha CQ, Dias DF, Cavalcante GP, Freitas LA, et al. 2011. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*. *Journal of ethnopharmacology* 133, 467-473.

Santos EN, Lima JC, Noldin VF, Cechinel-Filho V, Rao VS, Lima EF, et al. 2011. Anti-inflammatory, antinociceptive, and antipyretic effects of methanol extract of *Cariniana rubra* stem bark in animal models. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 83, 557-566.

Saraiva RA, Araruna MK, Oliveira RC, Menezes KD, Leite GO, Kerntopf MR, et al. 2011. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. *Journal of ethnopharmacology* 136, 504-510.

Saslis-Lagoudakis CH, Klitgaard BB, Forest F, Francis L, Savolainen V, Williamson EM, et al. 2011. The use of phylogeny to interpret cross-cultural patterns in plant use and guide medicinal plant discovery: an example from *Pterocarpus* (Leguminosae). *PloS one* 6(7): e22275.

Sawadogo WR, Boly R, M. Lompo, Somé N, Lamien CE, Guissou IP, et al. 2006. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of *Dicliptera verticillata*. *International Journal of Pharmacology* 2, 435-438.

Sawadogo WR, M. Lompo, Guissou IP, Nacoulma OG, 2008. Dosage des triterpènes et stéroïdes de *Dicliptera verticillata* et évaluation de leur activité anti-inflammatoire topique. *Médecine d'Afrique Noire* 55, 223-229.

Sawynok J, 2003. Topical and peripherally acting analgesics. *Pharmacological reviews* 55, 1-20.

Schafer M, Werner S, 2008. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 58, 165-171.

Scholz W, 1996. Interleukin 6 in diseases: cause or cure? *Immunopharmacology* 31, 131-150.

Sébastien F, 2009. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens. *Actualités pharmaceutiques*, 489-495.

Seelinger G, Merfort I, Wolfle U, Schempp CM, 2008. Anti-carcinogenic effects of the flavonoid luteolin. *Molecules* 13, 2628-2651.

Selloum Laid, Hamama Bouriche, Chafia Tigrine, and Chahra Boudoukha, 2003. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Experimental and Toxicology Pathology*, 54, 313–318.

Sheeba MS, Asha VV, 2009. *Cardiospermum halicacabum* ethanol extract inhibits LPS induced COX-2, TNF-alpha and iNOS expression, which is mediated by NF-kappaB regulation, in RAW264.7 cells. *Journal of ethnopharmacology* 124, 39-44.

Shen Shing-Chuan, Woan-Ruoh Lee, Hui-Yi Lin, Ho-Chun Huang, Ching-Huai Ko, Ling-Ling Yang, Yen-Chou Chen, 2002. In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E2 production. *European Journal of Pharmacology*, 446, 187– 194.

Shirai M, Yamanishi R, Moon JH, Murota K, Terao J, 2002. Effect of quercetin and its conjugated metabolite on the hydrogen peroxide-induced intracellular production of reactive oxygen species in mouse fibroblasts. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 66, 1015-1021.

Simmons DL, Botting RM, Hla T, 2004. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological reviews* 56, 387-437.

Speroni E, Cervellati R, Innocenti G, Costa S, Guerra MC, Dall' Acqua S, et al. 2005. Anti-inflammatory, anti-nociceptive and antioxidant activities of *Balanites aegyptiaca* (L.) Delile. *Journal of ethnopharmacology* 98, 117-125.

Su X-Y, Wang Z-Y, Liu J-R, 2009. In vitro and in vivo antioxidant activity of *Pinus koraiensis* seed extract containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 117, 681-686.

Sulaiman MR, Zakaria ZA, Daud IA, Ng FN, Ng YC, Hidayat MT, 2008. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of *Kaempferia galanga* leaves in animal models. *Journal of natural medicines* 62, 221-227.

T.R S. 1972. Polyphenols of *Pterocarpus*. and *Dalbergia* woods. *Phytochemistry* 11, 881-898.

- Tanas S, Odabasoglu F, Halici Z, Cakir A, Aygun H, Aslan A, et al. 2010.** Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant activities of *Peltigera rufescens* lichen species in acute and chronic inflammation models. *Journal of natural medicines* 64, 42-49.
- Tchamadeu MC, Dzeufiet PD, Nana P, Kouambou Nouga CC, Nguenguim Tsofack F, Allard J, et al. 2011.** Acute and sub-chronic oral toxicity studies of an aqueous stem bark extract of *Pterocarpus soyauxii* Taub (Papilionaceae) in rodents. *Journal of ethnopharmacology* 133, 329-335.
- Tewtrakul S, Itharat A, 2007.** Nitric oxide inhibitory substances from the rhizomes of *Dioscorea membranacea*. *Journal of ethnopharmacology* 109, 412-416.
- Tewtrakul S, Tansakul P, Daengrot C, Ponglimanont C, Karalai C, 2010.** Anti-inflammatory principles from *Heritiera littoralis* bark. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 17, 851-855.
- Thieffn G, Beaugerie L, 2005.** Toxic effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on the small bowel, colon, and rectum. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* 72, 286-294.
- Toker G, Küpeli E, Memisoğlu M, Yesilada E, 2004.** Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden). *Journal of ethnopharmacology* 95, 393-397.
- Vanderlinde FA, Landim HF, Costa EA, Galdino PM, Maciel MAM, Anjos GCd, et al. 2009.** Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the acetone extract from *Anacardium occidentale* L. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 45, 437-442.
- Viana GSB, Bandeira MAM, Moura LC, Souza-Filho MVP, Matos FJA, Ribeiro RA, 1997.** Analgesic and Antiinflammatory Effects of the Tannin Fraction from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. *Phytotherapy Research* 11, 118-122.
- Vigier RV, 2002.** Traitement de la fièvre de l'enfant. *Paediatrica erschienen* 13, 45-49.
- Wadsworth TL, McDonald TL, Koop DR, 2001.** Effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced signaling pathways involved in the release of tumor necrosis factor-alpha. *Biochemical pharmacology* 62, 963-974.

- Wang H, Gao J, Kou J, Zhu D, Yu B, 2008.** Anti-inflammatory activities of triterpenoid saponins from *Polygala japonica*. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 15, 321-326.
- Wang J, Mazza G, 2002.** Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of agricultural and food chemistry* 50, 4183-4189.
- Wenzig EM, Widowitz U, Kunert O, Chrubasik S, Bucar F, Knauder E, et al. 2008.** Phytochemical composition and in vitro pharmacological activity of two rose hip (*Rosa canina* L.) preparations. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 15, 826-835.
- Wepierre J, 1981.** *Abrégé de pharmacologie générale et moléculaire*. ed. Masson: Paris.
- Werz O, Steinhilber D, 2006.** Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. *Pharmacology & therapeutics* 112, 701-718.
- Winter CA, Risley EA, Nuss GW, 1962.** Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 111, 544-547.
- Wojciechowski MF, 2003.** Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective. In: (ed). *Advances in legume systematics, part 10, Higher Level Systematics*. B. B. Klitgaard and A. Bruneau (eds.): Royal Botanic Gardens , Kew; 5-35.
- Woldesellassie M, Eyasu M, Kelbessa U, 2011.** In vivo anti-inflammatory activities of leaf extracts of *Ocimum lamiiifolium* in mice model. *Journal of ethnopharmacology* 134, 32-36.
- Yadav VR, Prasad S, Sung B, Kannappan R, Aggarwal BB, 2010.** Targeting Inflammatory Pathways by Triterpenoids for Prevention and Treatment of Cancer. *Toxins* 2, 2428-2466.
- Yashpal K, Coderre TJ, 1998.** Influence of formalin concentration on the antinociceptive effects of anti-inflammatory drugs in the formalin test in rats: separate mechanisms underlying the nociceptive effects of low- and high-concentration formalin. *European Journal of Pain* 2, 63-68.

Yasunaka Kakuko, Fumiko Abe, Ariaki Nagayama, Hikaru Okabe, Lucio Lozada-Perez, Edith Lopez-Villafranco et al., 2005. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 293–299.

Yi T, Zhao Z-Z, Yu Z-L, Chen H-B, 2010. Comparison of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of three medicinal plants known as “Snow Lotus” herb in traditional Uighur and Tibetan medicines. *Journal of ethnopharmacology* 128, 405-411.

Yıldız L, Başkan KS, Tütem E, Apak R, 2008. Combined HPLC-CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay of parsley, celery leaves, and nettle. *Talanta* 77, 304-313.

Zakaria ZA, Abdul Hisam EE, Rofiee MS, Norhafizah M, Somchit MN, Teh LK, et al. 2011. In vivo antiulcer activity of the aqueous extract of *Bauhinia purpurea* leaf. *Journal of ethnopharmacology* 137, 1047-1054.

Zakaria ZA, Ghani ZD, Nor RN, Gopalan HK, Sulaiman MR, Jais AM, et al. 2008. Antinociceptive, anti-inflammatory, and antipyretic properties of an aqueous extract of *Dicranopteris linearis* leaves in experimental animal models. *Journal of natural medicines* 62, 179-187.

Zeashan H, Amresh G, Rao CV, Singh S, 2009. Antinociceptive activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. *Journal of ethnopharmacology* 122, 492-496.

Zhang L, Cheng Y-X, Liu A-L, Wang H-D, Wang Y-L, Du G-H, 2010. Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Influenza Properties of Components from *Chaenomeles speciosa*. *Molecules* 15, 8507-8517.

Zhao L, Ding T, Cyrus T, Cheng Y, Tian H, Ma M, et al. 2009. Low-dose oral sirolimus reduces atherogenesis, vascular inflammation and modulates plaque composition in mice lacking the LDL receptor. *British journal of pharmacology* 156, 774-785.

Zhou H-C, Lin Y-M, Wei S-D, Tam NF-Y, 2011. Structural diversity and antioxidant activity of condensed tannins fractionated from *Mangosteen pericarp*. *Food Chemistry* 129, 1710-1720.

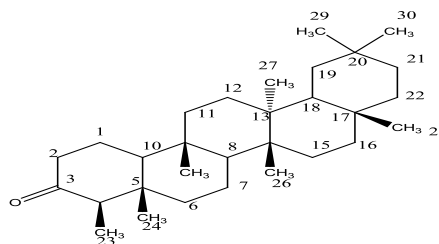
Zhu ZZ, Ma KJ, Ran X, Zhang H, Zheng CJ, Han T, et al. 2011. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the petroleum ether fraction from the ethanol extract of *Desmodium podocarpum*. *Journal of ethnopharmacology* 133, 1126-1131.

Zimmermann M, 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.

ANNEXE

Composé PE.1 : Friedeline

C₃₀H₅₀O
 PM : 426 uma
 Nom IUPAC : Friedooleanan-3-one
 Aspect : poudre blanche
 PF : 286 – 288 ° C



	CDCl ₃		CDCl ₃ (Ciangherotti et al., 2004)	
	δ _H (multiplicité, <i>J en Hz</i>)	δ _C	δ _H (multiplicité, <i>J</i>)	δ _C
1	1.62 -1.98 m	22.2	1.65 m ; 1.95 m	22.3
2	2.36 – 2.40 m	41.5	2.33 m ; 2.39 m	41.5
3	-	213.2	-	212.0
4	2.23 – 2.30 m	58.2	2.22 m	58.2
5	-	42.1	-	42.1
6	1.74 m	41.3	1.26 m ; 1.74 m	41.2
7	1.48 m	18.2	1.35 m ; 1.49 m	18.2
8		52.1	1.38 m	53.1
9		37.4	-	37.4
10	1.58 m	59.4	1.52 m	59.4
11		35.6	1.32 m ; 1.42 m	35.6
12		30.5	1.33 m	30.5
13		39.7	-	39.7
14		38.3	-	38.3
15		32.4	1.29 m ; 1.52 m	32.3
16		36.0	1.40 m ; 1.52 m	36.0
17		30.0	-	30.0
18		42.7	1.55 m	42.7
19		35.3	1.18 m ; 1.40 m	35.3
20	-	28.1	-	28.1
21	1.22 m , 1.41 m	32.7	1.25 m ; 1.45 m	32.7
22	0.91 m ; 1.55 m	39.2	0.90 m ; 1.50 m	39.2
23	0.88	6.8	0.85	6.8
24	0.72	14.6	0.70	14.6
25	0.86	17.9	0.84	17.9
26	1.01	20.2	1.02	20.2
27	1.06	18.6	1.15	18.7
28	1.19	31.1	1.18	32.1
29	0.96	35.0	0.93	35.0
30	1.01	31.8	0.97	31.8

Composé PE.2 : Lupeol

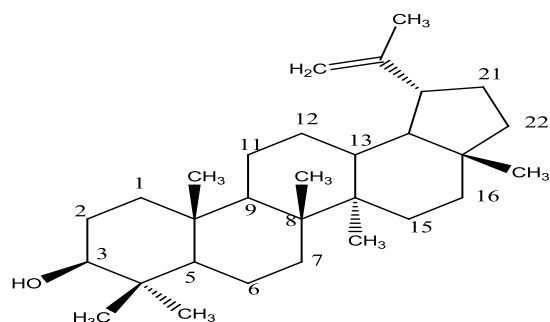
$C_{30}H_{50}O$

PM : 426 uma

Nom IUPAC : (20)29-lupèn-3 β -ol

Aspect : poudre blanche

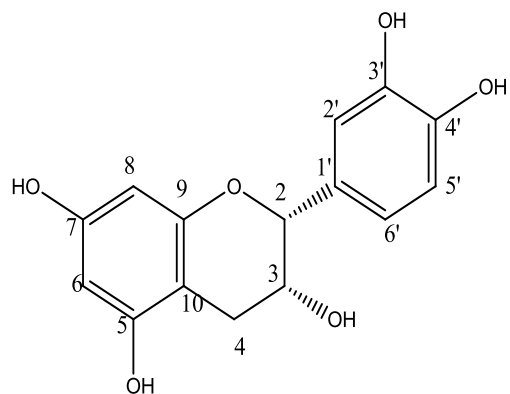
PF : 208 – 209 ° C



	$CDCl_3$		$CDCl_3$ (Noungoué, 1998)	
	δ_H (multiplicité, <i>J</i> en Hz)	δ_C	δ_H (multiplicité, <i>J</i> en Hz)	δ_C
1		38.7		38.7
2		27.5		27.5
3	3.2 m	79.0	3.15 m	79.0
4		38.9		38.9
5	-	55.3	-	55.3
6		18.3		18.3
7		34.3		34.3
8		40.9		40.9
9		50.5	-	50.5
10		37.2		37.2
11		21.0		21.0
12		25.2		25.2
13		38.1	-	38.1
14		42.9	-	42.9
15		27.4		27.4
16		35.6		35.6
17		43.0	-	43.0
18		48.3		48.3
19	2.4 m	48.0	2.4 m	48.0
20	-	151.0	-	151.0
21		29.9		29.9
22		40.0		40.0
23	0.97 s	28.0	0.97 s	28.0
24	0.76 s	15.4	0.76 s	15.4
25	0.82 s	16.1	0.83 s	16.1
26	1.03 s	15.9	1.03 s	15.9
27	0.94 s	14.6	0.95 s	14.6
28	0.78 s	18.0	0.79 s	18.0
29	4.56 ; 4.69 m	109.3	4.57 ; 4.68 m	109.3
30	1.67 s	19.3	1.68 s	19.3

Composé PE.3 : (-) épicatechine

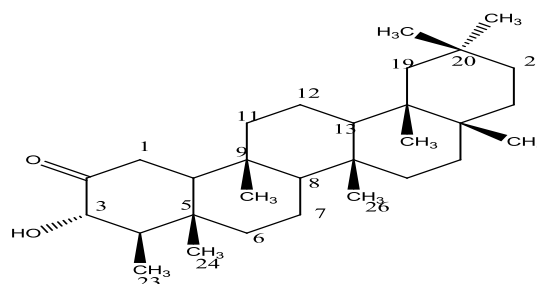
$C_{15}H_{14}O_6$
 PM : 290 uma
 Nom IUPAC : épicatechine
 Aspect : brun-rougeâtre
 UV : λ_{max} (MeOH) 226, 278 nm
 (Lhuillier, 2007)



	MeOD		CD ₃ OD (Noungoué, 1998)	
	δ_H (multiplicité, <i>J</i> en Hz)	δ_C	δ_H (multiplicité, <i>J</i> en Hz)	δ_C
2	4.8	79.6	4.8	79.9
3	4.2	67.2	4.2 m	67.5
4	2.7 dd (16.7 ; 2.8) 2.9 dd (16.9 ; 4.5)	29.3	2.7 dd (17 ; 3) 2.9 dd (17 ; 4.7)	29.3
5		157.6		157.7
6	5.9 d(5.9)	96.1	5.9 d (2.3)	96.4
7	-	158.1	-	158
8	5.9 d(5.9)	95.6	5.9 d (2.3)	95.9
9		157.0		157.4
10		99.8		100.1
1'		132.0		132.3
2'	6.96 s	115.6	6.97 d (1.7)	115.9
3'		145.5		145.9
4'		145.7		146.0
5'	6.7 d(8.1)	115.0	6.7 d (8.1)	115.4
6'	6.8 dd (8.2 ; 1.5)	119.1	6.8 dd (8.1 ; 1.7)	119.4

Composé PE.7 : 3 α -hydroxyfriedelan-2-one

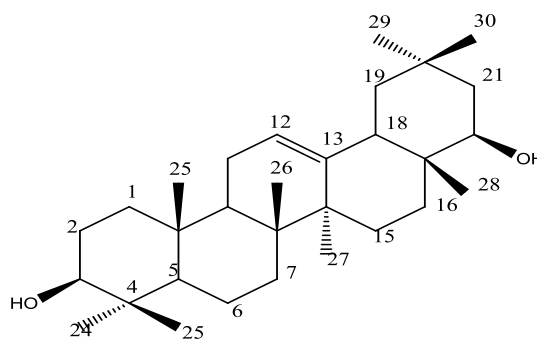
C₃₀H₅₀O₂
 PM : 442 uma
 Nom : 3 α -hydroxyfriedelan-2-one
 Aspect : poudre blanche
 PF : 232 - 234 ° C



	CDCl ₃		CDCl ₃ (Lingbo et al., 2005)	
	δ_H (multiplicité, <i>J</i> en Hz)	δ_C	δ_H (multiplicité, <i>J</i> en Hz)	δ_C
1	2.5 dd (13.6 ; 3.2) 2.4 t	36.1	2.5 (1 α -H) 2.4 (1 β -H)	36.1
2		211.9	-	211.7
3	3.8 m	77.2	3.8 dd (11.6)	77.0
4		54.5		54.6
5		38.1		38.1
6	1.8 m	40.6	1.8	40.7
7		17.6		17.6
8		53.1		53.2
9		37.6		37.6
10		60.4		60.5
11		35.0		35.1
12		30.3		30.4
13		39.6		39.6
14		38.3		38.4
15		32.3		32.4
16		35.9		36.0
17		30.0		30.0
18		42.7		42.7
19		35.3		35.4
20		28.2		28.2
21		32.7		32.8
22		39.2		39.3
23	1.04	10.8	1.04	10.8
24	1.03	14.2	1.03	14.2
25	0.89	17.4	0.89	17.5
26	1.01	20.2	1.01	20.2
27	0.99	18.6	0.98	18.6
28	1.17	32.1	1.17	32.1
29	0.99	31.7	0.99	31.8
30	0.94	35.0	0.94	35.0

Composé PE.8 : α -sophoradiol

$C_{30}H_{50}O_2$
 PM : 442 uma
 Nom: α -sophoradiol
 Aspect : poudre blanche
 PF : 268 °C



	CDCl ₃		CDCl ₃ (Ndom, et al. , 2001)	
	δ_H (multiplicité, <i>J</i> en Hz)	δ_C	δ_H (multiplicité, <i>J</i> en Hz)	δ_C
1		37.0		36.6
2	2.1 d (11.2)	27.2	2.1 m	27.2
3	3.2 m	79.0	3.2 (11.00 ; 6.50)	79.0
4		37.5		37.5
5		55.2		55.2
6		18.4		18.4
7		32.9		32.9
8		39.7		39.9
9		47.6		47.6
10		37.0		36.9
11		23.5		23.5
12	5.3 t	122.5	5.2 t (3.52)	122.5
13		143.9		143.9
14		42.1		42.1
15		25.9		25.9
16		30.5		29.7
17		37.4		37.4
18	2.1 d	44.7	2.2 (10.20 ; 4.60)	44.7
19		46.1		46.1
20		30.5		30.5
21		41.5	2.2 (12.20 ; 3.80)	41.5
22	3.4 t	76.7	3.4 (13.68 ; 4.28)	76.6
23	0.87	28.0	0.89	28.1
24	0.79	16.8	0.77	15.6
25	1.00	15.5	0.97	15.6
26	1.04	16.8	1.02	16.9
27	1.12	19.9	1.09	20.0
28	0.91	28.1	0.85	28.2
29	0.98	32.7	0.95	32.2
30	0.95	25.3	0.92	25.4

Composé PE.9 : Stigmastérol

C₂₉H₄₂O

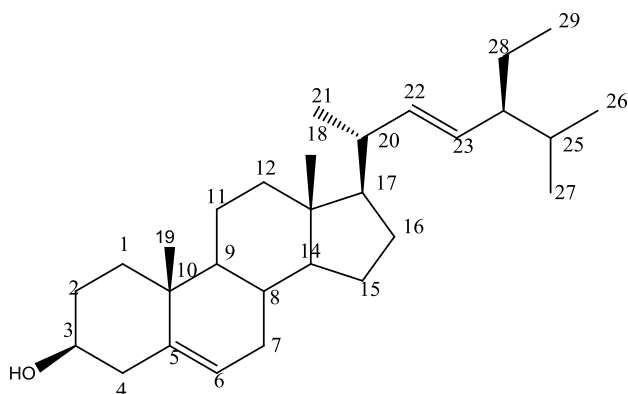
PM : 412uma

Nom IUPAC : (3β,22E)-stigmasta-5,22-dien-3-ol

Aspect : poudre

blanche

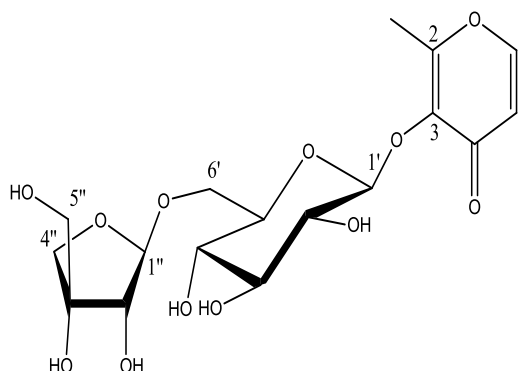
PF : 165 ° C



	CDCl ₃		CDCl ₃ (Jamal et al., 2009)	
	δ _H (multiplicité, <i>J</i> en Hz)	δ _C	δ _H (multiplicité, <i>J</i> en Hz)	δ _C
1		36.5		37.4
2		28.3		28.4
3	3.5m	129.3	3.5 m	129.5
4		37.3		37.5
5		140.7		140.9
6	5.4 d (5.2)	121.7	5.4 d (4.8)	121.9
7		31.6		31.9
8		31.9		32.1
9		50.6		50.3
10		36.5		36.7
11		21.2		21.3
12		39.8		39.8
13		42.3		42.4
14		56.9		57.0
15		24.4		24.5
16		29.1		29.2
17		56.1		56.1
18	0.68 s	12.1	0.68 s	12.1
19	1.01 s	19.0	1.02 s	19.1
20		40.5		40.7
21	0.91 s	21.2	0.92 d (6.6)	21.4
22	5.16 dd (15.1 ; 8.4)	138.3	5.15 dd (8.8 ; 15.4)	138.5
23	5.02 dd (15.2 ; 8.5)	71.8	5.01 dd (8.8 ; 14.8)	72.0
24		51.2		51.4
25		45.8		46.0
26	0.85	19.4	0.86 d (7.7)	19.6
27	0.78	19.8	0.79 d (8.4)	20.0
28		25.4		25.6
29	0.82	12.3	0.82 t (7.3)	12.2

Composé PE.11 : maltol 6-O-apiofuranoside-glucopyranoside

C₁₇H₂₄O₁₂
 PM : 420 uma
 Nom: maltol 6-O-apiofuranoside-
 glucopyranoside
 Aspect : poudre blanche



	CD ₃ OD		CD ₃ OD (Haizhou et al., 2008)	
	δ _H (multiplicité, <i>J</i> en Hz)	δ _C	δ _H (multiplicité, <i>J</i> en Hz)	δ _C
2		164.5		164.6
3		143.5		143.3
4		177.1		177.0
5	6.5 d (5.6)	118.0	6.5 d (5.6)	117.2
6	8.0 d (5.6)	157.3	8.0 d (5.6)	157.1
7	2.4 s	15.4	2.4 s	15.9
1'	4.8 d (7.2)	105.0	4.8 d (7,6)	105.0
2'	3.4 – 3.5 m	74.9	3.3 – 3.5 m	74.9
3'	3.4 – 3.6 m	77.9	3.3 – 3.5 m	77.9
4'	3.4 – 3.6 m	71.4	3.3 – 3.5 m	71.3
5'	3.4 – 3.6 m	77.5	3.3 – 3.5 m	77.4
6'	3.9 d 3.6 d	68.6	3.9 dd (2 ; 11.2) 3.6 dd (6.1 ; 11.2)	68.5
1''	4.9 d (2.3)	110.0	4.9 d (2.2)	110.7
2''	3.9 d (2.3)	77.8	3.8 d (2.2)	77.8
3''		80.5		80.4
4''	3.9 3.7	75.4	3.9 d (9.5) 3.7 d (9.5)	75.3
5''	3.6 s	65.6	3.5 s	65.5

Composé PE.14 : lutéoline

$C_{15}H_{10}O_6$

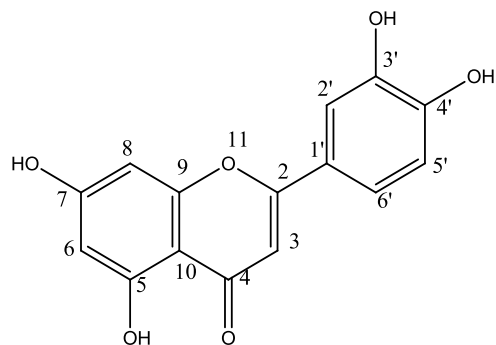
PM : 286 uma

Nom IUPAC : 5,7,3', 4'-
tetrahydroxyflavone

Aspect : poudre jaune

PF : 328-330 ° C

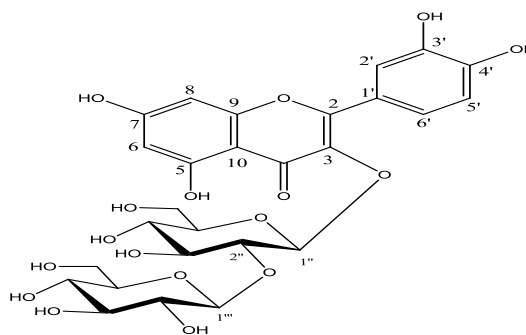
UV : λ_{max} (MeOH) 245, 348 nm
(Bennaghmouch et al., 2002)



	CD ₃ OD		CD ₃ OD (Bennaghmouch et al., 2002)	
	δ_H (multiplicité, <i>J</i> en Hz)	δ_C	δ_H (multiplicité, <i>J</i> en Hz)	δ_C
2		165.5		164.5
3	6.6 s	104.5	6.6 s	103.3
4		183.4		182.2
5		163.7		162.1
6	6.2 d (2.1)	100.2	6.2 d (2)	99.2
7		165.4		164.7
8	6.5 d (2.1)	95.1	6.5 d (2)	94.2
9		159.1		157.9
10		105.6		104.2
1'		123.9		122.1
2'	7.4 d (2.2)	114.4	7.4 d (2)	113.8
3'		146.9		146.2
4'		150.7		150.1
5'	6.9 d (8.3)	116.9	6.9 d (7.9)	116.4
6'	7.5 dd (2.2 ; 2.2)	120.4	7.4 dd (2 ; 7.9)	119.3

Composé PE.15 : quercétine-3-O-sophoroside

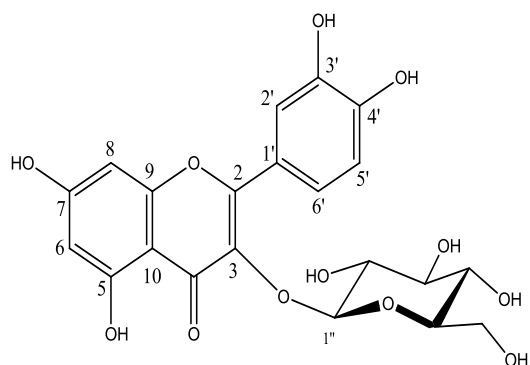
C₂₇H₃₀O₁₇
 PM : 626 uma
 Nom : quercétine-3-O-sophoroside
 Aspect : poudre jaune
 UV : λ_{\max} (MeOH) 216, 344 nm (Samir et al., 2005)



	CD ₃ OD		DMSO-d ₆ (Viet et al., 1990)	
	δ_H (multiplicité, <i>J</i> en Hz)	δ_C	δ_H (multiplicité, <i>J</i> en Hz)	δ_C
2		158.0		156.2
3		135.1		132.9
4		179.8		177.4
5		158.8		161.2
6	6.2 d (2)	99.9	6.2 d (2.1)	98.0
7		163.2		163.9
8	6.4 d (1.9)	94.7	6.4 d (1.5)	93.4
9		158.6		155.5
10		105.1		104.1
1'		123.1		121.8
2'	7.5 d (21)	117.8	7.6 d (2.4)	116.0
3'		145.9		144.7
4'		149.8		148.4
5'	6.9 d (8.5)	116.2	6.9 d (8.5)	115.3
6'	7.7 d (21)		7.6 dd (2.1 ; 8.5)	121.1
1''	5.3 d (7.6)	98	5.7 d (7)	98.6
2''		82.9		82.6
3''		75.6		76.6
4''		70.9		69.3
5''		77.9		76.5
6''		62.4		60.7
1'''	4.7 d (7.2)	105.8	4.6 d (7.9)	104.4
2'''				74.6
3'''				76.7
4'''		70.9		69.7
5'''		78.0		77.0
6'''		62.7		60.8

Composé PE.16 : quercétine-3-O-β-glucose (isoquercitrine)

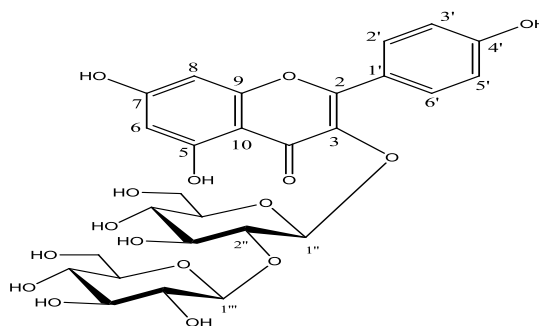
$C_{21}H_{20}O_{12}$
 PM : 464 uma
 Nom IUPAC : 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-glucose
 Aspect : poudre jaune
 PF : 225-227 ° C
 UV : λ_{max} (MeOH) 257, 358 nm
 (Gluchoff et al., 1997)



	CD ₃ OD		CD ₃ OD (Kim et al., 2004)	
	δ_H (multiplicité, <i>J en Hz</i>)	δ_C	δ_H (multiplicité, <i>J en Hz</i>)	δ_C
2		159.1		159.2
3		135.6		135.8
4		179.6		179.6
5		163.3		163.2
6	6.1 s	99.8	6.2 s	100.1
7		166.0		165.3
8	6.3 s	94.7	6.4 s	94.9
9		158.5		158.6
10		105.7		105.8
1'		123.2		123.2
2'	7.7 s	117.6	7.7 s	117.7
3'		145.8		146.0
4'		149.7		150.0
5'	6.8 d (8.5)	116.0	6.8 d (8.3)	116.1
6'	7.5 d (8.4)	123.2	7.6 d (8.3)	123.3
1''	5.2 d (7.3)	104.4	5.2 d (7.6)	104.5
2''		75.7		75.9
3''		78.3		78.3
4''		71.2		71.4
5''	3.2 m	78.1	3.2 m	78.5
6''	3.7 d (2.1) 3.6 d (5.2)	62.5	3.7 d (11.8) 3.6 dd (5.3 ; 11.8)	62.3

Composé PE.17 : kaempferol-3-O-sophoroside

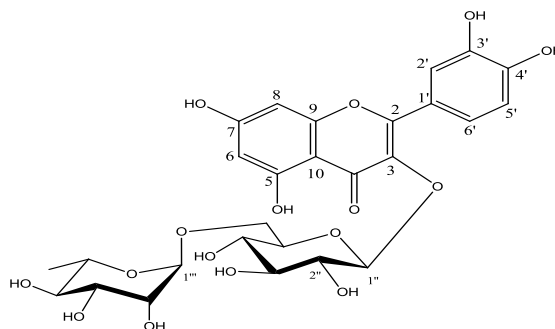
$C_{27}H_{30}O_{16}$
 PM : 626 uma
 Nom: kaempferol-3-O-sophoroside
 Aspect : poudre jaune
 UV : λ_{max} (MeOH) 216, 344 nm (Samir et al., 2005)



	CD ₃ OD		DMSO-d ₆ (Markham, 1978 ; Budzianowski, 1990)	
	δ_H (multiplicité, <i>J</i> en Hz)	δ_C	δ_H (multiplicité, <i>J</i> en Hz)	δ_C
2		158.3		156.4
3		134.9		133.1
4		179.7		177.5
5		163.1		161.2
6	6.2 d (1.8)	99.8	6.2 d (2.0)	98.6
7		165.3		164.0
8	6.4 d (1.7)	94.9	6.5 d (2.0)	93.6
9		158.3		156.4
10		104.7		104.2
1'		122.8		121.1
2'		132.3		130.6
3'	6.9 d (8.9)	116.2	6.9 d (8.8)	115.2
4'		161.2		159.7
5'		116.2		115.2
6'	8.1 d (8.8)	132.3	8.0 d (8.8)	130.6
1''	5.4 d (7.5)	99.8	5.6 d (7.0)	98.6
2''		82.5		82.0
3''		77.9		76.6
4''		71.1		70.0
5''		77.9		76.6
6''		62.4		61.0
1'''		104.7		103.6
2'''	4.8 d (7.3)	75.5	4.6 d (7.3)	74.3
3'''		78.2		76.7
4'''		71.3		70.5
5'''		77.9		76.7
6'''		62.0		61.4

Composé PE.18 : rutine

$C_{27}H_{30}O_{16}$
 PM : 610 uma
 Nom IUPAC : 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-rutinoside
 Aspect : poudre jaune
 PF : 242 ° C
 UV : λ_{max} (MeOH) 257, 348 nm
 (Gluchoff et al., 1997)



	CD ₃ OD		DMSO-d ₆ (Markham et Ternai, 1976)	
	δ_H (multiplicité, <i>J</i> en Hz)	δ_C	δ_H (multiplicité, <i>J</i> en Hz)	δ_C
2		158.5		156.4
3		135.6		133.6
4		179.4		177.4
5		159.3		156.6
6	6.2 s	99.9	6.2	98.8
7		166.0		164.0
8	6.4 s	94.9	6.4	93.6
9		162.9		161.2
10		105.6		105.2
1'		123.1		121.6
2'	7.7 m	116.1	7.4	115.3
3'		145.9		144.6
4'		149.9		148.3
5'	6.9 d (8.2)	117.7	6.9	116.5
6'		123.6	7.5	121.6
1''	5.1 d (7.4)	104.7	5.9	103.4
2''		75.7		75.3
3''		78.2		77.4
4''		71.4		71.1
5''		77.2		76.6
6''		68.6		68.7
1'''	4.5 s	102.4	4.2	102.0
2'''		72.1		71.5
3'''		72.2		71.7
4'''		73.9		73.2
5'''		69.7		69.7
6'''		17.9		18.6

Activités anti-inflammatoires

Test anti-œdémateux à la Carragénine

- Ecorces de tronc de *P. erinaceus*

Tableau : Effet anti-inflammatoire du décocté (DECEC) et de l'extrait méthanolique (MeOH B) des écorces de tronc de *P. erinaceus*

Doses (mg/kg p.c)	Volume d'œdème (mL)			Pourcentage d'inhibition (%)		
	1H	3H	5H	1H	3H	5H
Témoin	0.20± 0.02	0.35 ± 0.03	0.38± 0.04	---	---	---
Décocté						
200	0.15± 0.02*	0.24± 0.02***	0.19± 0.04***	25.0	31.4	50.0
400	0.12± 0.02***	0.19± 0.02***	0.17± 0.04***	40.0	45.7	55.2
600	0.07± 0.03***	0.17± 0.03***	0.14± 0.05***	65.0	51.4	63.2
Témoin	0.21± 0.02	0.24 ± 0.03	0.28± 0.03	---	---	---
Extrait MeOH B						
100	0.15± 0.04**	0.18± 0.04**	0.16± 0.05***	28.6	25.0	42.8
200	0.10± 0.03***	0.13± 0.04***	0.10± 0.02***	52.4	45.8	64.3
Témoin	0.24± 0.03	0.34 ± 0.01	0.37± 0.06	---	---	---
Extrait MeOH B (i.p.)						
50	0.14± 0.02***	0.29 ± 0.04	0.24± 0.04**	41.7	14.7	35.1
100	0.10± 0.02***	0.26± 0.04***	0.20± 0.03***	58.3	23.5	45.9
200	0.08± 0.03***	0.23± 0.04***	0.17± 0.03***	66.7	32.4	54.1

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type (n = 6). * : P< 0,05, ** : P< 0.01, *** : P< 0.001 est considéré significatif par rapport au témoin (analyse ANOVA suivi de Dunnett's test).

- Feuilles de *P. erinaceus*

Tableau : Effet anti-inflammatoire du décocté (DECFEU) et de l'extrait méthanolique (MeOH K) des feuilles de *P. erinaceus*

Doses (mg/kg p.c)		Volume d'œdème (mL)			Pourcentage d'inhibition (%)		
		1H	3H	5H	1H	3H	5H
Témoin		0.20± 0.03	0.30± 0.03	0.31± 0.01	---	---	---
Décocté	200	0.17± 0.05*	0.23± 0.04***	0.24± 0.02***	15.0	23.3	22.6
	400	0.14± 0.04*	0.14± 0.04**	0.12± 0.03***	30.0	53.3	62.3
	600	0.10± 0.02*	0.13± 0.04***	0.10± 0.04***	52.5	56.7	67.7
Témoin		0.21± 0.03	0.29± 0.03	0.31± 0.02	---	---	---
Extrait MeOH K	100	0.18± 0.03*	0.25± 0.03	0.26± 0.05*	14.3	13.8	16.1
	200	0.13± 0.02***	0.14± 0.04***	0.13± 0.04***	38.1	51.7	58.1
	400	0.11± 0.04**	0.13± 0.04***	0.07± 0.02***	47.6	55.2	77.4

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type (n = 6). * : P< 0,05, ** : P< 0.01, *** : P< 0.001 est considéré significatif par rapport au témoin (analyse ANOVA suivi de Dunnett's test).

- *Ecorces de racine de P. erinaceus*

Tableau : Effet anti-inflammatoire du décocté des écorces de racines (DECRA) de *P. erinaceus* et de l'acide acétylsalicylique (AAS).

Doses (mg/kg p.c)		Volume d'œdème (mL)			Pourcentage d'inhibition (%)		
		1H	3H	5H	1H	3H	5H
Témoin		0.20 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.31 ± 0.01	---	---	---
Décocté	200	0.15 ± 0.05*	0.24 ± 0.04***	0.23 ± 0.05***	25.0	20.0	25.8
	400	0.14 ± 0.02*	0.20 ± 0.03***	0.16 ± 0.05***	30.0	33.3	48.4
	600	0.10 ± 0.03*	0.18 ± 0.03***	0.12 ± 0.04***	50.0	40.0	61.3
Témoin		0.21 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.28 ± 0.03	---	---	---
AAS	50	0.18 ± 0.03	0.20 ± 0.02**	0.21 ± 0.03**	14.3	20.0	25.0
	100	0.14 ± 0.04**	0.18 ± 0.02**	0.17 ± 0.06***	33.3	25.0	39.3
	150	0.10 ± 0.02***	0.14 ± 0.02***	0.14 ± 0.03***	52.4	41.7	50.0

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type (n = 6). * : P< 0,05, ** : P< 0.01, *** : P< 0.001 est considéré significatif par rapport au témoin (analyse ANOVA suivi de Dunnett's test).

Test anti-œdémateux à l'huile de croton

- Ecorces de tronc de *P. erinaceus*

Tableau : Effet anti-inflammatoire local du décocté (DECEC), de l'extrait méthanolique (MeOH B), de l'extrait dichlorométhane (DCM A) et des composés isolés (friedeline, lupéol et épicatechine)

Extrait	Dose (µg/oreille)	Poids de l'œdème (mg)	Pourcentage d'inhibition (%)
Témoin (42% EtOH)	---	6.52 ± 0.7	---
Décocté	300	5.51 ± 1.4***	15.5
	500	3.47 ± 0.5	46.9
Extrait MeOH B	300	3.7 ± 0.9***	42.0
	500	0.95 ± 0.7***	85.4
(-) épicatechine (PE.3)	75	5.41 ± 0.4***	16.9
Hydrocortisone	100	3.2 ± 1.23***	50.9
Témoin (DCM)	---	8.43 ± 0.9	---
Extrait DCM A	50	5.71 ± 0.9***	32.3
	100	2.55 ± 1.13***	69.8
	200	0.7 ± 0.5***	91.7
Friedeline (PE.1)	100	4.37 ± 1.5***	48.2
Lupeol (PE.2)	100	3.28 ± 1.6***	61.1

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type (n = 6). * : P < 0,05, ** : P < 0.01, *** : P < 0.001 est considéré significatif par rapport au témoin (analyse ANOVA suivi de Dunnett's test).

- *Ecorces des racines de P. erinaceus*

Tableau: Effet anti-inflammatoire local de l'extrait dichlorométhane (DCM E) des écorces de racines de *P. erinaceus* et de la phénylbutazone

Extrait	dose ($\mu\text{g}/\text{oreille}$)	Poids de l'œdème (mg)	Pourcentage d'inhibition (%)
Témoin	---	9.01 ± 0.9	---
Extrait DCM E	100	$7.31 \pm 0.5^{**}$	18.8
	200	$5.43 \pm 1.3^{***}$	39.7
	300	$4.2 \pm 0.7^{***}$	53.4
Témoin	---	10.2 ± 0.8	---
Phénylbutazone	50	$6.92 \pm 1.6^{***}$	32.2
	100	$4.9 \pm 0.8^{***}$	52.0
	200	$2.4 \pm 1^{***}$	76.5

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type (n = 6). * : $P < 0,05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$ est considéré significatif par rapport au témoin (analyse ANOVA suivi de Dunnett's test).

Activités analgésiques

Test au formaldéhyde

Tableau : Effet analgésique des décoctés des écorces de tronc, des feuilles et des écorces de racines, morphine et paracétamol

Organes et Extraits	Doses (mg/kg p.c)	Première phase (0 à 5 min)		Deuxième phase (15 à 30 min)	
		Temps de léchage (s)	Pourcentage d'inhibition(%)	Temps de léchage (s)	Pourcentage d'inhibition(%)
Tronc					
Témoin	---	90.5 ± .5	---	133.7 ± 5.7	---
Décocté	200	80.8 ± 3.7**	10.7	113.5 ± 3.7***	15.1
	400	74.3 ± 5.3***	17.9	75.7 ± 4.4***	43.4
	600	57.5 ± 4.2***	36.6	59.2 ± 5.4***	55.7
Feuilles					
Témoin		109 ± 7	---	146.8 ± 7.3***	---
Décocté	200	69.5 ± 5***	36.2	114 ± 4.6***	22.4
	400	53.3 ± 7.3**	51.1	84.16 ± 5.4***	42.7
	600	50.0 ± 3.0***	54.1	56.83 ± 5***	61.3
Racines					
Décocté	100	91.5 ± 7.0**	16.1	66.8 ± 5.0***	54.5
	200	78.0 ± 6.0***	28.4	59.7 ± 7.0***	59.4
	400	44.2 ± 8.0***	59.5	54.8 ± 7.0***	62.7
	600	37.3 ± 6.0***	65.8	51.5 ± 5.0***	64.9
Morphine	5	37.3 ± 5.0***	65.8	53.0 ± 6.0***	63.9
Paracétamol	100	73.5 ± 3.0**	32.6	107.8 ± 5.0**	26.6
	200	57.5 ± 4.0***	47.3	59.17 ± 5.0***	59.7
	300	45.2 ± 4.0***	58.6	52.3 ± 5.0***	64.4

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type (n = 6). * : P< 0,05, ** : P< 0.01, *** : P< 0.001 est considéré significatif par rapport au témoin (analyse ANOVA suivi de Dunnett's test)

Activité antipyrétique

Tableau : Effet antipyrétique des décoctés des écorces de tronc (DECEC), des feuilles (DECFEU) et des écorces de racines (DECRA) sur l'hyperthermie induite chez la souris par l'injection de la suspension aqueuse de levure de bière

Extraits et doses (mg/kg)	Température (°C)							
	-	17 h	0 h	1h	2h	3h	4h	5h
Témoin	37.0 ± 0.2		37.8 ± 0.4	37.8 ± 0.3	37.7 ± 0.4	37.7 ± 0.3	37.8 ± 0.4	37.8 ± 0.4
Décocté d'écorces de tronc								
200	36.7 ± 0.3**		37.6 ± 0.3***	37.5 ± 0.4*	37.4 ± 0.4**	37.4 ± 0.2*	37.3 ± 0.5**	37.2 ± 0.4***
400	36.9 ± 0.2*		37.7 ± 0.4**	37.5 ± 0.5*	37.4 ± 0.4*	37.3 ± 0.4***	37.2 ± 0.3**	37.2 ± 0.3*
Décocté de feuilles								
200	37.0 ± 0.3*		37.7 ± 0.4**	37.6 ± 0.5***	37.6 ± 0.3**	37.5 ± 0.3**	37.5 ± 0.4*	37.4 ± 0.5*
400	37.0 ± 0.4***		37.8 ± 0.5*	37.7 ± 0.4**	37.6 ± 0.4**	37.3 ± 0.3*	37.2 ± 0.4**	37.1 ± 0.4*
600	36.9 ± 0.4*		37.7 ± 0.5**	37.5 ± 0.3**	37.4 ± 0.4***	37.2 ± 0.5*	36.8 ± 0.4*	36.7 ± 0.5**
Décocté d'écorces de racines								
200	37.1 ± 0.3		37.9 ± 0.5**	37.9 ± 0.4***	37.8 ± 0.4**	37.7 ± 0.4**	37.6 ± 0.3**	37.5 ± 0.3*
400	37.0 ± 0.2*		37.8 ± 0.3**	37.6 ± 0.3**	37.5 ± 0.3*	37.3 ± 0.3*	37.3 ± 0.2**	37.3 ± 0.2**
Paracétamol								
100	37.1 ± 0.4**		38.0 ± 0.4**	37.6 ± 0.5*	37.5 ± 0.4***	37.6 ± 0.4**	37.5 ± 0.5**	37.4 ± 0.4***

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type (n = 6). * : P< 0,05, ** : P< 0.01, *** : P< 0.001 est considéré significatif par rapport au témoin (analyse ANOVA suivi de Dunnett's test).

ARTICLES PUBLIES