



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE

Mémoire

**POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES
(DEA) DE BIOCHIMIE**

Option : Biochimie appliquée aux Sciences médicales

ETUDES CHIMIQUE ET TOXICOLOGIQUE D'UNE PLANTE MEDICINALE MALGACHE, *Psorospermum androsaemifolium* (HYPERICACEAE)

**Présentée par :
RAHERIMANAMPAMONJY Hanta Lalao Olga
Maître es Sciences**

le :07 Octobre 2010

Devant la commission d'examen composée de :

**Président : Professeur RALAMBORANTO Laurence
Rapporteur : Docteur RAKOTO- RANOROMALALA Danielle A. Doll
Examineurs : Professeur ANDRIANARISOA Blandine
Professeur RAZANAPARANY**

Je dédie ce mémoire à :

Mon Seigneur Dieu Tout-Puissant qui me bénit toujours, m'a montré tous les chemins pour réaliser ce mémoire, et a ouvert mon âme, ainsi que Jésus Christ Son Fils Unique qui m'a protégé de tous les obstacles, a toujours été à mes côtés, et m'a donné force et santé pour pouvoir accomplir ce travail.

Ma famille proche et lointaine qui m'a soutenue spirituellement, et matériellement le long de ce parcours. Qu'elle jouisse du fruit de ce travail.

Psaume 32 ; 8 :

« Je t'instruirai et te montrerai la voie que tu dois suivre, je te conseillerai, j'aurai le regard sur toi. »

Psaume 23 ; 1 :

« L'Eternel est mon berger ; je ne manquerai de rien. »

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je ne saurais me taire sans adresser mes vifs remerciements à tous ceux qui m'ont aidée dans sa réalisation. Je tiens à exprimer tout particulièrement mes reconnaissances à :

- Monsieur Le Président de l'Université d'Antananarivo Abel ANDRIATSIMAHAVANDY ;

- Monsieur Le Doyen de la Faculté des Sciences Antananarivo Bruno J. ANDRIANANTENAINA

- Madame Le Chef de Département de Biochimie fondamentale et appliquée, Danielle A. D. RAKOTO-RANOROMALALA pour les conseils et suggestions qu'elle m'a données tout au long de ce stage et pour son apport précieux dans l'élaboration et la finition de ce travail malgré ses nombreuses occupations ;

- Monsieur Le Professeur Victor JEANNODA Responsable de la Formation en Troisième cycle de Biochimie, co-encadreur de mon stage, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire malgré ses lourdes et multiples tâches ;

- Monsieur Le Docteur Ranjàna H. RANDRIANARIVO qui a partagé les meilleurs et les pires moments avec moi depuis le début jusqu'à la finition de ce travail ;

- Madame Le Recteur de l'Université ASJA Laurence RALAMBORANTO pour ses conseils précieux ;

- Madame Le Professeur Blandine ANDRIANARISOA et Professeur RAZANAMPARANY qui malgré leurs nombreuses tâches, ont l'amabilité d'apporter leur compétence dans le jugement de ce travail.

- tous les enseignants et personnels administratifs et techniques du Département de Biochimie fondamentale et appliquée, Faculté des sciences, Université d'Antananarivo, qui m'ont aidée tout au long du stage ;

- les équipes des laboratoires du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, et toutes les personnes qui ont contribué à l'élaboration de ce travail ;

- tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'accomplissement de ce travail ;

Qu'ils veuillent accepter encore mes plus vifs remerciements et ma respectueuse reconnaissance.

Merci pour votre affection et votre soutien, encore merci.

LISTE DES ABREVIATION

LABASM : Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales

B/A/E : Butanol / Acide acétique / Eau distillée

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DO : Densité Optique

EB : Extrait Brut

ED: Eau Distillée

FA : Fraction Aqueuse

FO: Fraction Organique

h : heure

IP : intrapéritonéale

IPM : Institut Pasteur de Madagascar

min : minute

p/p : poids par poids

p/v : poids par volume

qsp : en quantité suffisante pour

trs : tours

UV : ultraviolet

v/v : volume par volume

GLOSSAIRE

Analgésique : anti-douleur

Soporifique : somnifère

Contorsion abdominale : étirement de l'animal avec des torsions du corps ; traduction d'une douleur abdominale.

Convulsions cloniques : alternance des contractions et relâchements des muscles, répétée à courts intervalles.

Exophtalmie : grande ouverture des paupières ou protubérance des yeux, donnant l'impression d'une sortie des yeux de l'orbite.

Piloérection : hérississement des poils.

Neurotoxine : toxine à effet sur le système nerveux.

Cardiotoxique : toxique sur le tissu cardiaque.

LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure 1 : Feuilles et inflorescences de <i>Psorospermum androsaemifolium</i>	7
Figure 2 : Graines de <i>Psorospermum androsaemifolium</i>	7
Figure 3 : Schéma récapitulatif de l'extraction et de la purification	23
Figure 4 : Chromatogramme montrant l'évolution de l'homogénéité des divers extraits	24
Figure 5 : Effets des différents extraits sur <i>Staphylococcus aureus</i>	41
Figure 6 : Effets des différents extraits sur <i>Escherichia coli</i>	41
Figure 7: Effets des différents extraits sur <i>Vibrio harveyi</i>	42
Figure 8 : Effets des différents extraits sur <i>Vibrio fischeri</i>	42

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
Tableau 1 : Caractéristiques des extraits bruts obtenus	20
Tableau 2 : Résultats du criblage phytochimique de l'extrait brut (EB) et l'extrait E2	26
Tableau 3: Les souches utilisées	28
Tableau 4 : Normes utilisées pour la lecture des résultats de la méthode des disques	33
Tableau 5 : Temps de survie des souris après administration des différents extraits	35
Tableau 6 : Caractères morphologiques des souches bactériennes étudiées	36
Tableau 7 : Activité antibactérienne de l'extrait brut aqueux à froid (100 mg/ml)	36
Tableau 8 : Activité antibactérienne de l'extrait brut aqueux à chaud (100 mg/ml)	37
Tableau 9 : Activité antibactérienne de l'extrait brut hydroéthanolique 75% (100 mg/ml)	37
Tableau 10 : Activité antibactérienne de l'extrait E1 (100 mg/ml)	38
Tableau 11 : Activité antibactérienne de la fraction aqueuse (FA) (100 mg/ml)	38
Tableau 12 : Activité antibactérienne de la fraction organique (FO) 100 mg/ml	39
Tableau 13: Activité antibactérienne du dialysat ou E3 (100 mg/ml)	39
Tableau 14 : Activité antibactérienne de l'adialysat ou E2 (100 mg/ml)	39
Tableau 15 : Récapitulation des activités antibactériennes des différents extraits (concentration 100 mg/ml) sur les souches différentes	40
Tableau 16 : Résultats de la détermination de la CMI en milieu solide de l'extrait brut aqueux à froid	43
Tableau17 : Résultats de la détermination de la CMI de l'extrait E1	43
Tableau18 : Résultats de la détermination de la CMI de la fraction aqueuse FA	43
Tableau 19 : Résultats de la détermination de la CMI de l'adialysat E2 et du dialysat E3	44
Tableau 20 : Résultats de la détermination de la CMI de la fraction aqueuse FA sur <i>Vibrio fischeri</i> en milieu liquide	44

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les plantes font depuis toujours l'objet de divers usages par les êtres humains. On distingue, entre autres :

- les plantes vivrières ;
- les plantes médicinales ;
- les plantes utilisées dans l'ornementation ou contre l'érosion ;
- les plantes à propriétés toxiques utilisées comme poisons de pêche large et comme poisons d'épreuve ;
- les plantes à usage cosmétique,...

Depuis l'antiquité, plusieurs plantes sont utilisées traditionnellement pour résoudre les problèmes de santé. Cette tradition a été retenue et s'est épanouie chez certains pays comme La Chine, l'Indonésie, l'Afrique et Madagascar.

Madagascar peut se réjouir de sa richesse en ressources floristiques (... espèces dont 80% endémiques). Plusieurs plantes médicinales malgaches, terrestres ou marines, endémiques ou non, sont connues et utilisées.

Mais l'utilisation des plantes évolue avec la technologie actuelle. Ceci est prouvé par le développement des laboratoires de recherche tels que l' IMRA, l'HOMEOPHARMA, le RIRA. De même, les pays développés sont attirés par les ressources floristiques endémiques des pays tropicaux pour les utiliser comme leurs matières premières pharmaceutiques.

Empiriquement, le décocté ou l'infusion de la partie végétative sont les plus utilisées, surtout dans la médecine orientale. En effet, les Orientaux extraient des substances actives des plantes et ils arrivent même à les transformer en comprimés, poudres, sirops, liquides d'inhalation (par exemple pour soigner le rhume et les maux de tête),...

Par contre, les Occidentaux sont depuis longtemps très avancés du point de vue technologique et ils ont pu fabriquer des produits très raffinés et de haute qualité. Par exemple :

- ils ont fabriqué à partir des extraits des plantes des produits en poudre ou des gélules, des comprimés dragéifiés, des solutions buvables, injectables, ophtalmiques, nasales, ainsi que des suppositoires,... Les doses utilisées sont très précises ;

- ils ont mis au point des sérums (découverts par ROUX, 1893) ou anti-venin ou antidote à partir de venins, ou de toxines provenant d'animaux, de plantes et de microorganismes. Le sérum est fabriqué à partir du sang coagulé d'un animal (cheval) préalablement vacciné. Il offre l'immunité passive et est utilisé dans le traitement curatif d'un malade.
- Ils ont fabriqué des vaccins à partir des toxines atténuées des microorganismes.
- Ils ont découvert les antibiotiques à partir de certains microorganismes tel que *Penicillium nautatum* (découvert par Flemming, 1928).

Donc, des êtres vivants produisent aussi des toxines qu'il faut atténuer ou tuer ou transformer après extraction pour soigner à des doses très fines et précises, en éliminant leurs propriétés toxiques afin qu'elles deviennent des antitoxines et antipoisons appropriés contre un microorganisme pathogène déterminé, c'est-à-dire :

- contre l'organisme producteur lui-même, si on remédie par le semblable (cas de l'homéopathie). C'est par exemple à partir du venin qu'on fabrique le sérum anti-venin ; aussi on fabrique le vaccin BCG à partir des bacilles de Koch atténués. En effet, c'est à partir de la toxine elle-même ou le microbe lui-même qu'on prépare l'antidote ;
- contre d'autres microorganismes, si on remédie par le contraire (cas de l'allopathie). Ainsi par exemple, on utilise un antibiotique contre un germe pathogène.

A côté de la technologie moderne, le « Raokandro malagasy » est aussi célèbre dans la médecine traditionnelle malagasy à base des plantes qui utilise les « tapakazo ».

Par ailleurs, RABESA ZAFERA (1986) a recensé dans son livre « Pharmacopée malagasy » les plantes malgaches à effet bénéfique. Citons quelques plantes ayant des propriétés thérapeutiques ou à activités biologiques connues selon les enquêtes ethnobotaniques et la pharmacopée malagasy :

- le Sakatavilotra ou *Vernonia pectorales* Baker : le décocté de la plante administré par voie orale est utilisé contre le paludisme ;
- le Tandrokosy ou *Pentopetia androsaemifolia* Decne : le décocté de la tige et de quelques feuilles, administré par voie orale, est utilisé pour guérir la goutte ; le décocté associé au fanazava est utilisé contre la syphilis ;
- l'Anapatsa mena ou *Amaranthus spinosus* : le décocté des tiges et feuilles, administré par voie orale est utilisé contre la constipation ;

- l'Harongana ou *Harungana madagascariensis* : le décocté des feuilles pilées sèches ou fraîches en emplâtre sur la plaie de la gale la guérit ; leur infusion est administrée contre le désordre intestinal et la diarrhée banale ; la gomme gutte sécrétée par la plante (dintikarongana) sert à soigner la gale et autres dermatoses ;
- le Hofika ou *Dioscorea bulbifera* guérit les blessures et les plaies en utilisant la poudre des bulbilles aériennes séchées et râpées (DEBRAY, 1971) ;
- le romba ou *Ocimum gratissimum* : le décocté des feuilles, administré par voie orale est utilisé comme anti-diarrhéique et anti-vomitif (PERNET, 1957).

Donc, la plante crue ou après cuisson sert à guérir les maladies à l'intérieur de l'organisme ou même à la surface de la peau.

Les principes actifs de la plante sont très divers, et ils existent soit sous forme de latex (Euphorbiaceae), soit sous forme tanin, soit sous forme d'essence (huile essentielle), soit de forme de résines ou de substances urticaires (qui produisent directement des réactions allergiques en les touchant).

Des plantes d'utilisation médicinale ou celles réputées toxiques trouvées dans les ouvrages scientifiques possèdent des effets secondaires indésirables et leur toxicité n'est déclarée qu'en nombre restreint.

Tout cela implique la nécessité d'une étude approfondie des plantes à réputation médicinale, pour pouvoir utiliser une plante sans risque. Ceci exige une étude chimique, biologique et toxicologique dans les laboratoires de recherche, l'évaluation de la toxicité et les propriétés biologiques des principes actifs dans les différentes parties des plantes (tiges, feuilles, racine). Les plantes produisent des substances toxiques ou toxines qui sont des principes actifs se trouvant soit dans les feuilles, soit dans les tiges, soit dans les racines (bulbe), soit dans les fruits ou graines.

La majorité de leur population a recours à la thérapeutique à base de plantes en utilisant les traditions propres à chaque pays et à chaque région. Ainsi, les gens utilisent :

- des plantes anti-diarrhéiques ou anti-tussives pour les enfants ;
- des plantes purgatives ou anti-douleur abdominale pour les femmes (zozoro ou *Juncus*, une Juncacée ; vilindrano ou *Jussiaea repens*, une Denotheroicée) ;
- des plantes stimulantes et fortifiantes pour les hommes ;
- des plantes contre les maladies vénériennes pour les adultes.

Empiriquement, ils prennent des « tambavy », globalement sans savoir la dose précise, et ils se soignent naturellement sans tenir compte des effets indésirables, et ils ont la possibilité d'être guéris. Les gens pratiquent une médecine traditionnelle propre à leur pays et à leur région en buvant des extraits sous forme de « tambavy » ou tisanes, ou en se lavant avec le bouilli, la décoction, ou l'infusion d'organe de la plante.

Afin de pouvoir utiliser une plante sans risque, il faut :

- évaluer sa toxicité en déterminant les doses correspondantes
- déterminer les propriétés chimiques et biologiques des principes actifs des extraits de cette plante.
- Le laboratoire de Biochimie appliquée aux sciences médicales, notre structure d'accueil travaille depuis longtemps sur des plantes médicinales, A titre d'illustration :
- *Pachytroche dimpata* une MORACEAE (KANIZA, 2007) dont le décocté de feuilles est utilisé pour soigner la blennorragie et les maux d'estomac.
- *Pittosporum senecioides* une PITTOSPORACEAE (RAZAFINTSALAMA, 2006) employée pour soigner les piqûres d'araignées vénéreuses.
- *Phyllanthus madagascariensis* une BIGNONIACEAE (IBRAHIM, 2003) pour traiter les plaies syphilitiques et les condylomes.
- *Chassalia bojeriana* une RUBIACEAE (RANDRIAMAMPINANINA, 2008) pour traiter des maladies du foie et aussi le traitement de la goutte.
- *Dilobeia thouarsii* une PROTEACEAE (ANDRIAMASINORO, 2009) utilisée pour traiter la maladie diarrhéique.
- *Acrydopus excelcus* une MALPIGHIACEAE (ABDOULLAHI, 2009) la plante est utilisée pour soigner la diphtérie, les diarrhées. Les femmes utilisent le décocté pour leur hygiène intime
- *Psidium guajava* (MYRTACEAE) dont les feuilles et les écorces de la racine contiennent d'abondantes substances tanniques. Les feuilles sont utilisées en décoction pour combattre la diarrhée et s'avère également très efficace en cas de stomatite (inflammation de la muqueuse) et de pharyngite (PAMPLONA ROGER, 1999)
- Une des préoccupations du laboratoire est d'étudier la toxicité de ces plantes utilisées empiriquement. Pour notre part, nous nous sommes intéressés à une plante dont l'une des utilisations traditionnelles est le traitement des diarrhées (voir plus bas) parce que la diarrhée est la première maladie qui frappe Madagascar. Il s'agit de *Psorospermum androsaemifolium*

Notre matériel d'étude est la plante médicinale *Psorospermum androsaemifolium*.

Cette plante à réputation médicinale qui sert à soigner les désordres intestinaux et la diarrhée ; cette dernière provoque chaque année un taux élevé de mortalité infantile. En effet, vu l'insuffisance des infrastructures sanitaires dans le monde en voie de développement, surtout dans les pays tropicaux tels que Amérique latine, les pays Afro-asiatiques y compris Madagascar, la maladie diarrhéique en dehors du choléra, provoque une importante mortalité infantile.

Psorospermum androsaemifolium est répandue dans notre île où elle est endémique et on peut la cueillir facilement.

Cette plante posséderait un principe à propriété antimicrobienne contre l'agent diarrhéique qui s'est répandu facilement faute d'eau potable et à cause de la pollution aquatique ou terrestre. Les ruraux utilisent cette plante pour guérir leurs enfants sans tenir compte des inconvénients des effets indésirables.

Le présent travail a pour but d'extraire et de purifier les principes actifs présents dans les feuilles de *Psorospermum androsaemifolium* et aussi d'étudier les propriétés chimiques et biologiques des extraits obtenus. Il comprend deux grandes parties :

- la première partie intitulée Etude chimique qui comporte l'extraction, la purification et la caractérisation physico-chimique des principes actifs ;
- la seconde partie ou Etude biologique qui rapportera les résultats des tests toxicologiques des principes actifs des extraits.

Il est à noter que les matériels et méthodes sont mentionnés dans chaque partie et qu'une introduction générale précède les deux parties. Enfin, une conclusion générale et perspectives terminent le travail.

PREMIERE
PARTIE : ETUDE
CHIMIQUE

1. INTRODUCTION

- L'étude chimique des principes actifs de cette plante a été établie sur les points suivants :

- extraction des principes actifs à l'aide des différentes techniques à partir de la poudre des feuilles sèches ;

- mise au point d'un procédé de purification permettant d'obtenir un extrait suffisamment purifié ;

- caractérisation physico-chimique des substances toxiques et détermination de leur nature chimique.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. MATERIELS

2.1.1. Le matériel végétal

2.1.1.1. Classification de la plante

La classification du matériel végétal est la suivante :

Règne : VEGETAL

Embranchement : SPERMATOPHYTES

Sous-embranchement : ANGIOSPERMES

Classe : DICOTYLEDONES

Famille : HYPERICACEAE

Genre : *Psorospermum*

Espèce : *androsaemifolium* Baker

Nom vernaculaire : Harongampanihy

2.1.1.2. Identification de la plante

La plante a été identifiée au laboratoire du Parc Botanique Tsimbazaza où elle porte la référence d'herbier H01013- D1528 D1529, établie par PERRIER (1951).

2.1.1.3. Description botanique

La description du genre *Psorospermum androsaemifolium* est donnée en Annexe I. Les figures 1 et 2 ci- dessous montrent un rameau fleuri et des graines de notre plante.



Figure 1 : Feuilles et inflorescences de *Psorospermum androsaemifolium*



Figure 2 : Graines de *Psorospermum androsaemifolium*

2.1.1.4. Date et lieu de récolte :

La plante a été récoltée au stade végétatif dans la région Atsimo Antsinanana, district de Farafangana, dans la forêt de Mahabo et Manombo, au mois de mars 2009.

2.1.1.5. Distribution géographique

Psorospermum androsaemifolium Baker se trouve d'après PERRIER et coll. (1951) :

- à l'ouest : nord de l'île Thiry, montagnes aux environs de la baie de Lanivato (Nord) ; Ampasimentera, bassin moyen de Bemarivo (Boina) ; Ankarafantsika, Marolaka (Menabe) ;

- au centre : Ambatondrazaka, entre Betsitra et Analabe ; Manankazo, sur le Tampoketsa au nord d'Ankazobe ; vallée de Mandraka, forêt d'Analamazaotra ; Ankazomanga Vakinankaratra, ouest d'Antsirabe, massif d'Ivakoany (sud).

- Actuellement, la plante est trouvée dans les forêts denses et humides de l'est de l'île, le long de la côte est vers la côte sud : elle a été localisée dans la forêt de Périnet et Mandraka, Moramanga, et Toamasina en continuant vers Manakara, Vohiposa, Vohiparara, Farafangana, Ihosy, Vangaindrano, Fianarantsoa, à Ambositra, dans la forêt de Ranomafana ; elle pousse dans la province de Toliary plus précisément à Taolagnaro. Les **différents types présents** dans ces régions sont présentés sur la figure 9 de l'Annexe I.

2.1.1.6. Préparation et conservation du matériel végétal

Les feuilles constituent le matériel d'étude. Les feuilles fraîchement récoltées sont séchées au laboratoire à la température ambiante, pendant un mois environ. Elles sont ensuite broyées à l'aide d'un mixer BLENDER (Robot coupe GT 550), puis la poudre est tamisée. La poudre fine obtenue est alors conservée dans une boîte en plastique à la température ambiante. Elle constitue notre matériel de départ.

2.1.2. Produits chimiques

La plupart des produits chimiques utilisés au cours de cette étude sont de qualité pour analyse et de marque MERCK et PROLABO.

Les supports chromatographiques utilisés sont des plaques à support en plastique MERCK 60F₂₅₄, épaisseur de la couche 0,2 mm.

2.2. METHODES

2.2.1. Méthode d'extraction des principes toxiques

Nous avons utilisé des méthodes d'extraction solide-liquide.

Le principe est basé sur l'affinité des produits présents dans le matériel végétal vis-à-vis d'un solvant donné. Si les produits sont polaires, ils se font extraire dans un solvant polaire ; s'ils sont moins polaires, ils sont extraits par un solvant peu polaire (HARBONE, 1983).

2.2.1.1. Extraction à froid

La poudre végétale est mise en suspension dans le solvant d'extraction (eau distillée ou mélange hydroéthanolique 75%), suivant le rapport 1/10 (p/v), (10 ml de solvant pour 1 g de poudre).

Le mélange est soumis à une agitation magnétique pendant 3 h à la température ambiante, puis laissé macérer une nuit à +4° C. Le macérat est de nouveau agité pendant 1 h avant d'être filtré sur quatre épaisseurs de gaze pour éliminer le marc. Le filtrat obtenu est centrifugé à 12 000 tours/min pendant 30 min à l'aide d'une centrifugeuse BREMSE (modèle T52).

Le culot est écarté et le surnageant recueilli. Qu'il s'agisse d'extraction aqueuse ou d'extraction hydroéthanolique, le volume final du surnageant est réduit jusqu'à rapport 1/1 ou (p/v) (1 ml de solvant pour 1 g de matériel de départ), par évaporation sous pression réduite au moyen d'un évaporateur rotatif ROTAVAPOR (modèle R110) (voir méthode de concentration au paragraphe 2.2.3, p. 3).

Le précipité pouvant éventuellement apparaître est éliminé par centrifugation à 12 000 tours/min au moyen d'une centrifugeuse JOUAN (modèle TH12).

2.2.1.2. Extraction à chaud

La poudre végétale est mélangée avec le solvant d'extraction (eau distillée ou mélange hydroéthanolique 75 %) dans le rapport 1/10 (p/v).

L'extraction est effectuée par chauffage à reflux sur une plaque chauffante et sous agitation magnétique à la température d'ébullition du solvant d'extraction, c'est-à-dire 100°C pour l'eau distillée et +65°C pour le mélange hydroéthanolique (GAUTIER et MIOCQUE, 1968).

Elle dure trois heures à partir de l'apparition de la première goutte de condensation.

Le décocté est laissé refroidir à la température ambiante. Ensuite, il est laissé macérer pendant une nuit à + 4°C. La suite de la manipulation est identique à celle de l'extraction à froid.

2.2.2. Méthodes de purification

2.2.2.1. Traitement par la chaleur

2.2.2.1.1. Principe

C'est une méthode de fractionnement basée sur la coagulation de certaines macromolécules telles que les protéines, les acides nucléiques les polysaccharides sous l'effet de la chaleur.

2.2.2.1.2. Mode opératoire

L'extrait à traiter est chauffé au bain-marie bouillant à 96°C pendant 30 min. Le précipité formé est éliminé par centrifugation (centrifugeuse BREMSE, TH52) à 12 000 trs / min pendant 15 min Le surnageant est concentré.

2.2.2.2. Fractionnement par le n-butanol

2.2.2.2.1. Principe

(MAHUZIER et HAMON, 1986 ; KAMOUN, 1987)

La technique est fondée sur la distribution d'un soluté entre deux solvants non miscibles, l'eau et le n-butanol, en fonction de sa solubilité dans chacun d'eux.

2.2.2.2.2. Mode opératoire

Dans une ampoule à décanter sont introduits un volume de l'extrait à traiter et le même volume de n-butanol. Après agitation énergique, le mélange est laissé au repos dans l'ampoule débouchée jusqu'à la décantation totale des deux liquides, donnant deux phases nettes : la phase supérieure organique et la phase inférieure aqueuse. Les deux phases sont alors récupérées et leur volume est mesuré. L'opération est répétée deux fois en remplaçant le n-butanol.

Les trois phases organiques sont réunies, débarrassées du solvant organique par évaporation après ajout d'un grand volume d'eau, puis concentrées pour avoir le rapport 1/1 (p/v).

La phase aqueuse est débarrassée du n-butanol résiduel par évaporation.

2.2.2.3. Fractionnement par l'acétate d'éthyle

2.2.2.2.1. Principe

(KAMOUN, 1977)

Il s'agit d'une méthode de séparation basée sur le transfert d'un ou plusieurs constituants d'une première phase liquide (phase aqueuse) vers une seconde phase liquide extractive (phase organique)

2.2.2.2.2-Mode opératoire

L'extrait à traiter et l'acétate d'éthyle sont mélangés volume à volume dans une ampoule à décanter. Après une forte agitation manuelle du mélange, l'ensemble est laissé au repos jusqu'à décantation de deux phases distinctes : d'une part la phase supérieure organique et d'autre part la phase inférieure aqueuse. La phase organique est recueillie tandis que la phase aqueuse est soumise à deux autres traitements identiques au premier.

Les trois phases organiques sont rassemblées puis, après ajout d'un grand volume d'eau distillée, elles sont concentrées jusqu'au volume de l'extrait initial.

La phase aqueuse est aussi débarrassée de l'acétate d'éthyle résiduel par évaporation.

2.2.2.4. Dialyse

2.2.2.4.1. Principe

(MAHUZIER et HAMON, 1986 ; KAMOUN, 1977)

C'est une méthode de fractionnement des substances en fonction de leur taille, c'est-à-dire selon la capacité des molécules de traverser une membrane hémiperméable suivant leur poids moléculaire. La membrane poreuse, cylindrique appelée sac à dialyse ou boudin à dialyse se comporte comme un tamis moléculaire et possède un seuil de filtration bien déterminé. L'effet tamis explique la perméabilité à certaines molécules et l'imperméabilité à d'autres suivant leur taille. Elle sépare donc les petites molécules de grosses molécules en induisant deux phénomènes :

- l'osmose : qui est le mouvement d'eau du milieu le moins concentré (liquide de contre-dialyse) vers le milieu plus concentré (extrait à dialyser) ;
- la diffusion : les solutés traversent les pores de la membrane vers le liquide de contre-dialyse. Ainsi, la diffusion des grosses molécules est lente, voire même nulle.

Par contre celle des petites molécules se fait selon le gradient de concentration.

Plusieurs paramètres influencent la vitesse de passage d'une substance à travers la membrane :

- le diamètre des pores de la membrane ;
- la différence de concentration entre les deux compartiments ;
- le temps de contact ;
- la température ;
- le pH.

2.2.2.4.2. Mode opératoire

Le boudin à dialyse est un cylindre en cellophane (Cellu Sep de 33mm de large ; son seuil de filtration est de 6000 à 8000 Da).

a.) Préparation de la membrane de dialyse

La membrane de dialyse présente une couche protectrice formée de glycérine, de métaux lourds et de composés sulfureux qu'il faut préalablement éliminer par cuisson dans l'eau distillée bouillante pendant 15 min. Cette opération est répétée trois fois en renouvelant à chaque fois l'eau distillée.

La membrane ainsi préparée est laissée refroidir à la température ambiante puis conservée à +4°C dans la dernière eau bouillie pendant quelques jours. Il est nécessaire de rincer la membrane à l'eau distillée avant chaque utilisation.

b) Déroulement de la dialyse

Le boudin à dialyse est rempli au tiers d'extrait à traiter, laissant ainsi un espace suffisant pour les échanges ; ceci permet d'éviter l'éclatement du boudin par augmentation du volume de l'extrait à dialyser. Le boudin est noué à ses deux extrémités après avoir éliminé l'air. Il est immergé entièrement dans l'eau distillée (liquide de contre-dialyse) de volume égal à 100 fois celui de l'extrait à dialyser. Pour éviter la formation d'un gradient de concentration de molécules diffusibles autour du boudin, l'ensemble est soumis à une légère agitation magnétique. D'autre part, le liquide de contre-dialyse doit être renouvelé fréquemment afin d'accélérer les échanges (trois fois en 48 heures).

A la fin de l'opération, le dialysat (liquide à l'extérieur du boudin) et l'adialysat (liquide à l'intérieur du boudin) sont concentrés jusqu'au rapport 1/1 (p/v).

2.2.3. Méthode de concentration

Toutes les opérations de réduction de volume des extraits et d'évaporation de solvants sont réalisées à +55°C au moyen d'un évaporateur rotatif ROTAVAPOR (modèle R110). La pression est réduite à l'aide d'une pompe à vide. Les extraits obtenus sont :

- soit ramenés à leur volume initial ;
- soit évaporés à sec.

La concentration initiale des extraits (rapport 1/1, p/v) à étudier peut être calculée à partir de la relation ci-après :

$$\text{Concentration (mg/ml)} = \frac{\text{Poids du résidu d'évaporation à sec (mg)}}{\text{Volume de l'extrait de départ (ml)}}$$

2.2.4. Calcul de rendement

L'extrait obtenu à l'extraction ou à chaque étape de purification est évaporé à sec. Le ballon vide est taré sur la balance de précision (SARTORIUS) avant l'évaporation, ensuite le ballon contenant le résidu sec est aussi pesé pour obtenir le poids du résidu sec. Cette opération est effectuée après chaque étape de fractionnement. Le rendement est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Poids du résidu d'évaporation à sec (g)}}{\text{Poids du matériel végétal de départ (g)}} \times 100$$

2.2.5. Méthode d'analyse

2.2.5.1. Chromatographie sur couche mince

2.2.5.1.1. Principe

(BOREL et RANDOUX, 1987 ; AUDIGIE et al., 1989 ; MAHUZIER et HAMON, 1990)

La chromatographie sur couche mince (CCM) est un procédé d'analyse basé sur les mécanismes physico-chimiques d'adsorption et de partage. La vitesse de migration des substances sur un support chromatographique qui est un adsorbant, dépend de leur affinité pour la phase liquide mobile d'une part et des forces d'adsorption dues au support d'autre part.

2.2.5.1.2. Mode opératoire

a) Préparation de la plaque

Les extraits à analyser sont déposés à l'aide d'un capillaire sur une plaque découpée aux dimensions voulues. Ils se présentent sous forme de traits fins horizontaux de 7 mm espacés de 6 mm, situés à 1,3 cm de deux bord latéraux et à 1,5 cm du bord inférieur de la plaque. Les dépôts sont séchés à l'aide d'un séchoir à main.

b) Développement du chromatogramme

La plaque préparée est introduite dans une cuve chromatographique (DESAGA) dont l'atmosphère a été préalablement saturée par les vapeurs du solvant : le système Butanol /Acide acétique /Eau distillée ou BAE 60 /20 /20 (p/p/p). La saturation est obtenue par application de papier filtre imprégné du solvant de migration contre les parois internes de la cuve. Le développement se poursuit jusqu'au moment où le front du solvant arrive à 0,5 cm du bord supérieur de la plaque. A ce stade, elle est retirée de la cuve puis séchée à l'aide d'un séchoir à main.

c) Révélation du chromatogramme

Les molécules qui ont migré sur la plaque sont révélées de deux façons :

- par exposition de la plaque aux rayonnements ultraviolets (UV), de longueurs d'ondes caractéristiques : 254 nm et 366 nm. Les substances sont visibles sous forme de taches fluorescentes ;
- à l'aide d'une réaction colorée par pulvérisation du réactif à la vanilline sulfurique sur la plaque. Les substances apparaissent sous forme des taches colorées. Ce révélateur universel permet de révéler les composés carbonés ayant deux atomes de carbone au minimum. La composition du réactif à la vanilline sulfurique est donnée en ANNEXE II.

2.2.5.2. Criblage phytochimique

(DALTON, 1979 ; BRUNETON J., 1987 ; HARBONE J., 1983)

La détection des principales familles chimiques se fait soit directement à partir de la poudre végétale, soit à partir du résidu d'évaporation à sec de l'extrait à analyser. Les tests sont réalisés sur différents extraits préparés à partir de ces matériels selon les méthodes décrites ci-dessous.

2.2.5.2.1. Préparation des extraits à tester

a) Extrait aqueux

Un gramme de poudre végétale ou de résidu d'évaporation à sec de l'extrait à tester est dissous dans 10 ml d'eau distillée. Le mélange est chauffé jusqu'à l'ébullition. Après refroidissement, le décocté est filtré et le filtrat obtenu constitue l'extrait aqueux.

b) Extrait hydroéthanolique

Un gramme de poudre végétale ou de résidu d'évaporation à sec de l'extrait à tester est mélangé à 10 ml de mélange hydroéthanolique 75% (75 ml d'éthanol absolu + 25 ml d'eau distillée). Après une macération d'une nuit, le mélange est filtré sous pression légère, et le filtrat recueilli correspond à l'extrait hydroéthanolique.

c) Extrait acide

Un gramme de poudre végétale ou de résidu d'évaporation à sec d'extrait à tester est mélangé à 10 ml de HCl. Le mélange est placé pendant 2 min au bain-marie bouillant, puis laissé macérer une nuit. Le liquide recueilli après filtration du macérat constitue l'extrait acide.

d) Extrait chloroformique

Un gramme de poudre végétale ou de résidu d'évaporation à sec d'extrait à tester est délayé dans 10 ml de chloroforme. Le mélange obtenu est laissé macérer une nuit, puis filtré sur du coton hydrophile pour obtenir l'extrait chloroformique.

e) Extrait méthanolique

Un gramme de poudre végétale ou de résidu d'évaporation à sec est délayé dans 10 ml de méthanol. Le mélange est laissé macérer une nuit à +4°C, puis filtré. Le filtrat obtenu constitue l'extrait méthanolique.

2.2.5.2.2. Méthodes de détection des familles chimiques

a) Détection des alcaloïdes

Elle nécessite 4 tubes à essai contenant chacun 1 ml d'extrait acide. Le premier tube sert de témoin tandis que les trois autres sont utilisés pour les tests, respectivement à l'aide des réactifs de MAYER, de WAGNER et de DRAGENDORFF. La composition de ces réactifs est donnée en Annexe III.

**Test de MAYER :*

Dans le tube n°2, 4 à 5 gouttes de réactif de MAYER sont ajoutées. L'apparition d'un précipité blanc ou d'une floculation indique la présence d'alcaloïdes dans l'extrait à analyser.

**Test de WAGNER :*

Dans le tube n°3, l'apparition d'un précipité blanc ou d'une floculation après ajout de 4 gouttes de réactif de WAGNER indique la présence d'alcaloïdes dans l'extrait.

**Test de DRAGENDORFF :*

Dans le tube n°4 sont ajoutées 4 gouttes de réactif de DRAGENDORFF. La présence d'alcaloïdes se traduit par l'apparition d'un précipité dans ce tube.

b) Détection de flavonoïdes (test de WILSTATER)

Leur détection est effectuée sur l'extrait hydroéthanolique. Le déroulement du test est le suivant :

- dans le premier tube, 2 ml d'extrait hydroéthanolique sont ajoutées dans 4 gouttes d'acide chlorhydrique (HCl) 12N et 2 tournures de magnésium. Après 10 min, l'apparition d'une couleur rouge marque la présence de flavones ; celle d'une couleur rouge pourpre celle de flavonols. Si une couleur rouge à rouge violacé apparaît, le milieu contient des flavonones.

- dans le deuxième tube, le mélange précédent (2 ml d'extrait additionnés de 4 gouttes de HCl 12N et de 2 tournures de magnésium) est également préparé, mais cette fois-ci, il est ajouté de 0,5 ml d'eau distillée et de 0,5 ml d'alcool isoamylique. Après 10 min de pause, si la coloration de la phase supérieure est :

- rouge, on est en présence de flavones ;
- pourpre, on est en présence de flavonols.

c) Détection des leucoanthocyanes (test de BATE-SMITH)

Du HCl 12N, de volume 0,5 ml, est versé le long de la paroi d'un tube à essai contenant 2 ml d'extrait aqueux. Le tout est chauffé au bain-marie à 96°C pendant 30 min. L'apparition d'une coloration rouge après refroidissement indique la présence de leucoanthocyanes.

d) Détection des tanins et polyphénols

L'extrait aqueux (2ml) est utilisé pour la détection des tanins et polyphénols. Il est distribué dans quatre tubes à essai. Le premier sert de témoin tandis que les trois autres sont utilisés pour les tests.

Test à la gélatine :

Dans le deuxième tube, 4 gouttes de gélatine à 1% (p/v) sont additionnées dans 0,5 ml d'extrait aqueux. L'apparition d'un précipité blanc témoigne de la présence de tanins condensés de type catéchique.

Test à la gélatine salée :

Dans le troisième tube contenant 0,5 ml d'extrait aqueux sont ajoutées 4 gouttes de gélatine salée 10 % (10 g de NaCl dans 100 ml de gélatine aqueuse à 1%). La formation d'un précipité blanc montre la présence de tanins hydrolysables de type pyrogallique.

Test au chlorure ferrique :

Le contenu du dernier tube reçoit 4 gouttes de chlorure ferrique 10% en solution dans le méthanol. L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou vert noirâtre indique la présence des composés phénoliques.

e) Détection des stéroïdes et triterpènes

Trois tubes à essai dont le premier sert de témoin reçoivent chacun 1 ml d'extrait chloroformique.

Test de LIEBERMANN-BUCHARD :

Trois gouttes d'anhydride acétique sont ajoutées dans l'extrait du deuxième tube. Après une légère agitation, 2 gouttes d'acide sulfurique (H_2SO_4) 4N sont coulées le long du tube.

Au bout d'une heure, si la coloration de la phase supérieure est verte ou bleu-vert, des stéroïdes sont présents, tandis que l'apparition d'un anneau pourpre à rouge violacé à l'interface indique la présence de triterpènes. Les deux phénomènes peuvent être observés simultanément.

Test de SALKOWSKI :

Dans le dernier tube, la présence de stérols insaturés est mise en évidence par la formation d'un anneau rouge ou d'une coloration rouge de la phase inférieure après addition de H_2SO_4 12 N et 3 gouttes d'anhydride acétique dans l'extrait.

f) Détection des desoxyoses : Test de KELLER-KILIANI

A 1ml d'extrait aqueux dans un tube sont ajoutés successivement 1ml de chlorure ferrique à 10% et 1 ml d'acide acétique glacial.

Après une légère agitation, 0,5 ml de H_2SO_4 12 N est coulé le long de la paroi du tube incliné à 45° .

La formation d'un anneau pourpre à l'interface révèle la présence de desoxyoses.

g) Détection des irridoides

L'extrait aqueux 1 ml est ajouté de 0,5 ml de HCl 12N. Le tout est chauffé au bain-marie bouillant pendant 30 min.

L'apparition d'une précipité ou d'une coloration bleue ou vert foncé révèle la présence d'irridoides.

h) Détection des anthraquinones : Test de BORNSTRÄGER

L'extrait aqueux de volume 1 ml est délayé dans 2 ml de benzène. L'ensemble est mis dans une ampoule à décanter, puis agité énergiquement. Après séparation nette de deux phases, la phase benzénique supérieure est recueillie, puis elle est additionnée de 1 ml d'ammoniaque 25%.

Après une forte agitation manuelle, le changement de couleur de la phase alcaline au rouge prouve la présence d'anthraquinones dans l'extrait.

i) Détection des saponines (Test de mousse)

Un volume de 1 ml d'extrait aqueux est agité énergiquement pendant 30 s. La présence de saponines se traduit par la formation d'une mousse de 3 cm de hauteur, persistant pendant 30 min.

3.- RESULTATS

Toutes les expériences se sont déroulées à la température ambiante étant donné la stabilité des principes actifs.

3.1- EXTRACTION

Diverses techniques d'extraction à froid et à chaud à l'aide de différents solvants (eau et mélange hydroéthanolique 75% ou éthanol absolu 100%) ont été effectuées à partir de la poudre de feuilles sèches. L'objectif est de déterminer la méthode d'extraction la plus performante et d'obtenir un extrait facile à manipuler.

Pour chaque extraction, 50 g de poudre de feuilles sont utilisés.

Quant au volume des extraits après extraction, il est réduit à 50 ml, pour obtenir le rapport 1/1 (p/v).

La toxicité des différents extraits est appréciée grâce à des tests sur souris (voir méthode au paragraphe I, p. 46).

3.1.1. Extraction à froid

3.1.1.1. Extraction aqueuse

Le solvant utilisé est l'eau distillée. L'extraction aqueuse à froid est décrite au paragraphe 2.2.1.1 (p. 10).

Un extrait brut toxique, limpide, fluide, de couleur marron et de pH = 5,34 est obtenu.

3.1.1.2. Extraction hydroéthanolique

Le solvant utilisé est le mélange hydroéthanolique 75 %. Les opérations sont décrites au paragraphe 2.2.1.1 (p. 9). Un extrait brut toxique, limpide, de couleur marron et de pH = 5,3 est obtenu.

3.1.2- Extraction à chaud

3.1.2.1. Extraction aqueuse

Le solvant utilisé est l'eau distillée. Le mélange est soumis à un chauffage à reflux sous agitation magnétique, en appliquant la méthode décrite au paragraphe 2.2.1.2 (p. 10). Un extrait brut trouble a été obtenu.

Les caractéristiques des extraits obtenus sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques des extraits bruts obtenus

Types d'extraction	Extraction aqueuse à froid	Extraction aqueuse à chaud	Extraction hydroéthanolique 75% à froid
Aspect	limpide	limpide	limpide
Consistance	fluide	fluide	fluide
Goût	amer	amer	amer
Couleur	marron	marron clair	orange
Rendement	13,78%	13,09%	13,71%
pH	5,34	5,30	5,31

Les différents extraits bruts sont tous toxiques pour la souris. Néanmoins, la méthode d'extraction aqueuse à froid a été adoptée pour la suite de la manipulation, car elle donne le meilleur rendement et l'extrait brut (EB) montre la meilleure activité sur les différents germes-tests (§ 3.2.1, p. ...).

3.2- PURIFICATION

L'extrait brut a été purifié à l'aide de techniques reposant essentiellement sur les différences des propriétés physico-chimiques telles que le poids moléculaire ou la solubilité des principes actifs.

3.2.1. Méthodes adoptées dans le protocole de purification

3.2.1.1 Traitement par la chaleur

L'extrait brut est chauffé au bain-marie à 96°C pendant 30 min (voir méthode paragraphe 2.2.2.1.2, p. 10). Le culot abondant qui se forme est écarté par centrifugation à 12 000 trs/min pendant 15 min. Le surnageant obtenu de couleur marron clair qui s'avère toxique sur souris constitue l'extrait E1.

3.2.2.2 Fractionnement par l'acétate d'éthyle

L'extrait E1 est traité trois fois par l'acétate d'éthyle selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.2.2. (p. 11). Après décantation, une phase aqueuse et une phase organique sont obtenues, et chaque phase est recueillie séparément :

- la fraction aqueuse appelée FA, limpide, fluide, de couleur marron clair sans odeur spécifique, est toxique sur souris ;
- la fraction organique appelée FO, de couleur marron, limpide, fluide, sans odeur caractéristique, est également toxique sur souris.

Les principes actifs se sont donc partagés entre les deux fractions (voir tableau 21, p. 48), mais seule la fraction FA a subi l'étape suivante car elle s'est avérée à la fois toxique et la plus **active sur les microorganismes.**

3.2.3.3 Dialyse

La fraction aqueuse FA est dialysée contre de l'eau distillée selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.2.4.1 (p. 12). Le dialysat (liquide à l'extérieur du boudin) et l'adialysat (liquide à l'intérieur du boudin) sont concentrés :

- l'adialysat est de couleur marron clair, limpide, fluide, toxique sur les souris testées. Il constitue l'extrait E2.
- le dialysat est de couleur marron, limpide, fluide, non toxique sur les souris mais actif sur les microorganismes. Il constitue l'extrait E3 (voir tableau 22, p. 47).

3.2.2 Méthode non adoptées dans le protocole de purification

3.2.2.1 Fractionnement par le n-butanol

Le fractionnement par le n-butanol est une méthode non adoptée dans le procédé de purification. Le fractionnement de E1 (10 ml) au n-butanol (voir paragraphe 2.2.2.2.1, p. 11) aboutit à deux extraits :

- la phase organique de couleur marron clair est toxique sur les souris testées ;
- la phase aqueuse de couleur marron est toxique sur les souris testées, elle est moins toxique que la phase organique.

Cette méthode s'est avérée performante mais elle n'a pas été retenue dans le protocole définitif pour des raisons d'économie de solvant. Nous avons adopté à sa place le fractionnement par l'acétate d'éthyle décrit plus haut.

Le procédé de purification adopté est résumé sur la figure 3 (p. 23)

3.2.1. Rendement de purification

A partir de la poudre de feuilles pesant 50g, le résidu d'évaporation de l'extrait E2 pèse 0,0906 g et celui de l'extrait E3 0,295 g. Ainsi, les rendements en toxines calculés selon la formule donnée au paragraphe 2.2.4 (p. 12), sont respectivement de 0.18% et 0,59%.

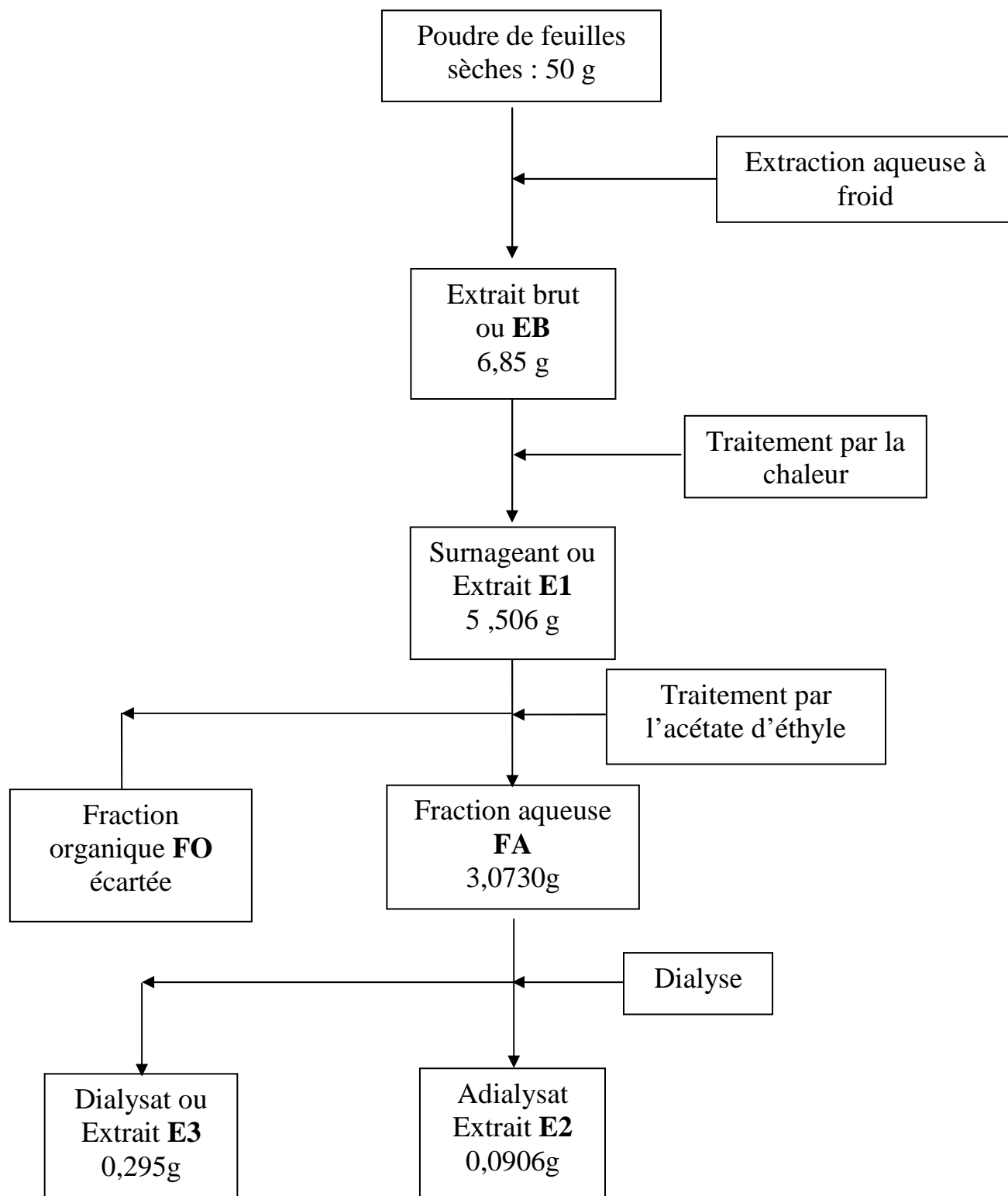


Figure 3 : Schéma récapitulatif de l'extraction et de la purification

3.3- ETUDE DE L'HOMOGENEITE DES EXTRAITS

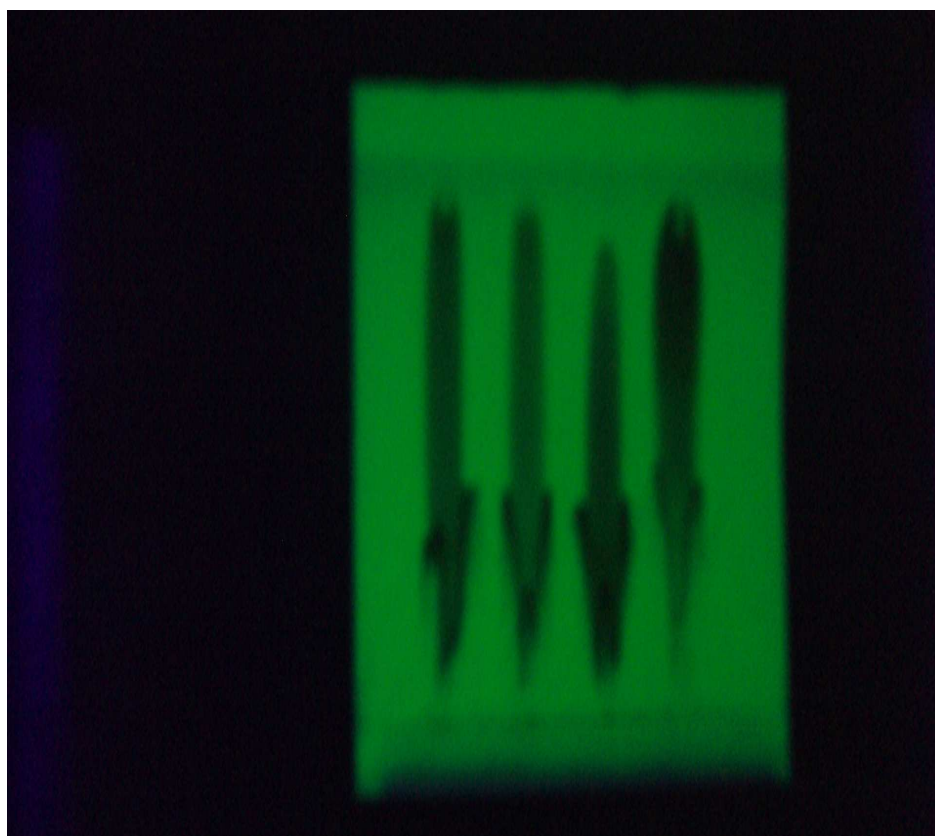
L'évolution de l'homogénéité des extraits au cours des étapes de fractionnement a été appréciée par CCM dans le système BAE (60/20/20) (p/p/p).

Le chromatogramme est révélé par observation sous UV à 254 nm puis 366 nm. A cette dernière longueur d'ondes, des taches fluorescentes ont été observées. Des bandes apparaissent pour les extraits EB, E1, FA et E2 avec respectivement 5, 4, 2 et 1 bandes.

Une révélation par le réactif à la vanilline sulfurique est ensuite pratiquée. L'EB présente cinq bandes majeures révélables par ce réactif et l'E1 en présente quatre, alors que la fraction aqueuse FA n'en comporte que deux et l'extrait E2 une seule.

Le fractionnement par l'acétate d'éthyle a éliminé deux bandes, et après la dialyse, E2 ne possède plus qu'une bande.

Ainsi, la purification a permis d'éliminer trois bandes majeures contaminantes.



EB E1 FA E2

B/A/E (60/20/20), révélation sous UV 254 nm

Figure 4 : Chromatogramme montrant l'évolution de l'homogénéité des divers extraits.

EB : extrait brut

E1 : extrait issu du traitement par la chaleur

FA : fraction aqueuse de l'acétate d'éthyle

E2 : adialysat obtenu par dialyse de FA

3.3.2. Caractérisation chimique

3.3.2.1- Propriétés physico-chimiques

Le procédé de purification nous a permis de déduire les propriétés physico-chimiques des molécules actives présentes dans les feuilles de notre plante. Celles-ci sont :

- thermostables car elles résistent au chauffage à 96°C et à des opérations de congélation et décongélation répétées ;
- solubles dans les solvants polaires tels que l'eau et l'éthanol ;
- solubles dans les solvants peu polaires tels que l'acétate d'éthyle, le n-butanol ;
- capables de traverser la membrane de dialyse de seuil 6000-8000 Da ;
- de goût amer et de couleur marron.

3.3.2.2- Nature chimique

Les résultats du criblage phytochimique de l'extrait brut et l'extrait purifié E2 sont récapitulés dans le tableau 3, (p. 27). Celui-ci montre la nature des principes et permet de comparer les composés présents dans ces 2 extraits.

Ainsi, l'EB et l'E2 ont tous les deux réagi positivement aux tests des tanins et polyphénols, des désoxyoses, des flavonoïdes et leucoanthocyanes, des stéroïdes et triterpènes et des stérols insaturés.

Tableau 2 : Résultats du criblage phytochimique de l'extrait brut (EB) et l'extrait E2

Famille chimique	Tests	Observations	Réactions	
			EB	E2
ALCALOÏDES	MAYER	Pas de précipité	–	–
	DRAGENDORFF	Pas de précipité	–	–
	WAGNER	Pas de précipité	–	–
SAPONOSIDES	Test de mousse	Pas de mousse	–	–
TANINS ET POLYPHENOLS	Gélatine	Floculation blanche	+	+
	Gélatine salée	Précipitation blanche	+	+
	Chlorure ferrique	Précipitation verte	+	+
ANTHRAQUINONES	BORNSTRÄGER	Pas de coloration rouge	–	–
DESOXYOSES	KELLER-KILIANI	Anneau pourpre à l'interface	+	+
IRRIDOÏDES	HCl à chaud	Pas de précipité	–	–
FLAVONOÏDES ET LEUCOANTHOCYANES	WILSTATER	Coloration rouge	+	+
	BATE-SMITH	Coloration rouge	+	+
STEROÏDES TRITERPENES	LIEBERMANN- BURCHARD	Anneau rouge violet à l'interface	+	+
STEROLS INSATURES	SALKOWSKI	Anneau rouge à l'interface	+	+

- (-): Réaction négative ; (+) : Réaction positive

4-DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

L'étude chimique effectuée précédemment nous a permis de montrer que les feuilles de *Psorospermum androsaemifolium* contiennent des principes toxiques.

Différentes méthodes ont été réalisées pour les extraire à partir de la poudre de feuilles sèches. La méthode d'extraction à froid a été adoptée pour la suite des travaux car l'extrait brut obtenu par cette méthode montre les meilleures caractéristiques : aspect limpide, meilleur rendement, temps de survie le plus court.

A partir de l'extrait brut aqueux à froid (EB), un procédé de fractionnement comprenant dans l'ordre : un traitement par la chaleur, un fractionnement par l'acétate d'éthyle, et une dialyse a été établi. Les rendements en toxines sont de 0,18% pour l'adialysat (extrait E2) et de 0,59% pour le dialysat (extrait E3).

Les propriétés physico-chimiques des principes actifs montrent qu'ils sont :

- thermostables car ils résistent au chauffage à 96°C et à des opérations de congélation et décongélation répétées. Ils ne sont donc pas de nature protéique.
- solubles dans les solvants polaires tels que l'eau et l'éthanol et dans les solvants peu polaires tels que l'acétate d'éthyle et le n-butanol : En outre, ils sont en partie capables de traverser la membrane de dialyse de seuil 6000-8000 Da, mais une autre partie de l'activité reste dans la membrane. Des recherches plus approfondies montreront s'il s'agit de principes différents ou d'une partition des mêmes principes.

Au niveau des extraits E2 et E3, la faible activité antimicrobienne (voir [au paragraphe ... p....](#)) fait penser à une synergie entre les composés présents dans l'extrait précédent (fraction aqueuse de l'acétate d'éthyle), mais ces substances actives ont été séparées par la dialyse.

D'après les résultats du criblage phytochimique, les extraits EB et E2 de feuilles de cette plante contiennent des molécules qui pourraient être :

- des flavonoïdes et des leucoanthocyanes : certains de ces composés sont connus pour leur propriétés anti-bactériennes (BRUNETON, 1993) ;
- des stéroïdes ou triterpènes et des stérols insaturés ,
- des stérols insaturés;
- des tanins et polyphénols : les phénols sont des désinfectants de premier ordre, ils détruisent les germes microbiennes de l'air, de la plaie. Les tanins sont des astringents toniques. Les phénols sont des poisons mais leur antidote est le sucrate de chaux.
- des désoxyoses ;

Ainsi, les principes actifs de feuilles de notre plante pourraient être des hétérosides dont la génine serait un flavonoïde, un stéroïde, un stérol insaturé ou triterpène ou encore un polyphénol.

Les alcaloïdes n'ont pas été observés dans les extraits testés.

DEUXIEME PARTIE :
ETUDE
BIOLOGIQUE

DEUXIEME PARTIE : ETUDE BIOLOGIQUE

I-INTRODUCTION

Dans cette deuxième partie, l'activité de l'extrait brut (EB) et de l'extrait purifié E2 sur les souris et les germes microbiens a été établie.

La toxicité a été observée à l'aide d'un test sur des animaux à sang chaud : les souris blanches *Mus musculus*.

L'activité antibactérienne a été testée par la méthode de diffusion en gélose et la CMI des extraits a été déterminée en milieu solide et liquide.

2-MATERIELS ET METHODES

2.1-MATERIELS

2.2.1. Les souris

Des souris blanches (*Mus musculus*) de race Tana Swiss stabilisée depuis plusieurs années à l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) sont utilisées comme représentants des animaux à sang chaud.

Elles sont élevées à l'animalerie du département.

2.1.2. Les souches bactériennes

Cinq souches bactériennes ont été utilisées pour les tests d'activité antibactérienne (tableau 4 ci-dessous).

Tableau 4: Les souches utilisées

SOUCHE	FORME
<i>Vibrio harveyi</i>	vibrion
<i>Vibrio fischeri</i>	vibrion
<i>Salmonella typhimurium</i>	bacille
<i>Escherichia coli</i>	bacille
<i>Staphylococcus aureus</i>	coque

2.1.3. Les milieux de culture

2.1.3.1- Les milieux solides

Deux milieux solides ont été utilisés pendant cette étude :

- milieu de MUELLER-HINTON : un milieu solide de marque Liofilchem. Il permet la culture des bactéries telles que *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* ;

- milieu MARINE AGAR : un milieu solide de marque Difco. Il est utilisé pour cultiver les bactéries marines hétérotrophes telles que *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri*.

Le milieu préparé est stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 50 min, ensuite coulé dans de boîtes de Petri stériles de 90 mm de diamètre ; l'épaisseur de la gélose doit être au 1/3 de la hauteur de la boîte. Après séchage à la température ambiante, les boîtes sont conservées à +4°C.

2.1.3.2- Les milieux liquides

Les milieux liquides utilisés sont :

- le bouillon nutritif qui sert à la conservation et la culture des souches. Il permet le développement et la croissance des bactéries qui ne présentent pas d'exigence particulière comme *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*.

- le milieu ZOBELL utilisé pour l'étude de la croissance bactérienne et des effets de substances sur les microorganismes. Ce milieu permet le développement des bactéries telles que les vibrions.

La composition de ces différents milieux est trouvée en annexe IV et leur préparation en annexe VII.

2.1.3.3- Les disques utilisés pour l'antibiogramme

Les disques utilisés sont en papier filtre. Ils ont 6mm de diamètre et sont fournis par Biomérieux.

2.2-METHODES

2.2.1-Estimation de la toxicité sur souris

Généralement, la toxicité d'un extrait est estimée par administration par voie intrapéritonéale (IP), d'un volume égal à 0,3 ml pour 25 g de souris. Deux lots homogènes comprenant chacun 3 souris de même sexe sont utilisés. Les souris du premier lot sont destinées au test tandis que chaque souris du deuxième lot servant de témoin reçoit 0,3 ml de sérum physiologique. Les symptômes apparaissant pendant l'expérience qui dure au moins 24 h sont tous notés.

2.2.2-Méthodes microbiologique

2.2.2.1-Stérilisation

Afin d'éviter toute contamination :

- les milieux de culture, les disques et les cônes de micropipette sont stérilisés à l'autoclave (WEBECO) à 121°C pendant 30 min ;
- la verrerie et les pinces sont stérilisées à l'étuve (JOUAN B 463) à 180°C pendant 60 à 90 min. ;
- la paillasse de travail ainsi que les mains de manipulateur sont nettoyées préalablement à l'alcool ;
- les manipulations sont effectuées entre deux flammes de bec de Bunsen.

2.2.2.2-Identification de la souche bactérienne par la coloration GRAM

2.2.2.2.1-Principe

Il est basé sur la propriété tinctoriale de la paroi des bactéries. La coloration de GRAM consiste à faire agir sur les bactéries préalablement fixées sur une lame le colorant Cristal violet dont l'action est renforcée par le lugol. Ainsi traitées toutes les bactéries se colorent en violet. Dans un deuxième temps, elles sont décolorées par un solvant, habituellement l'alcool et/ou l'acétone. Certaines bactéries gardent la coloration violette et sont dites GRAM positif, et les autres se décolorent, sont appelées GRAM négatif.

La paroi représente le support de certains constituants antigéniques des bactéries ; la propriété tinctoriale des germes dépend de ces constituants. Les bactéries GRAM négatif laissent passer la coloration du colorant cristal violet lorsqu'on fait agir l'alcool et/ou l'acétone. Cette sortie de colorant se fait par les lipides abondants dans la paroi d'où la décoloration des bactéries GRAM négatif.

2.2.2.2-Mode opératoire

a) Préparation et fixation des souches bactériennes

Une colonie isolée est prélevée à l'aide d'une anse de platine, puis mise en suspension dans trois gouttes d'eau distillée. Une goutte de la suspension obtenue est étalée en couche mince sur une lame propre. Le frottis déposé est séché par passages rapides de la lame au dessus de la flamme d'un bec Bunsen.

b) Coloration-décoloration-recoloration

La lame avec frottis est ensuite colorée par le Cristal violet pendant une minute et rincée doucement à l'eau ;

- elle est recouverte d'une solution de lugol pendant une minute ;
- la lame est ensuite décolorée par l'alcool/acétone durant 30 s ;
- après rinçage à l'eau, la lame est recolorée par la safranine pendant une minute. La préparation est de nouveau lavée à l'eau puis séchée entre deux feuilles de papier filtre.

Les résultats sont observés au microscope, au fort grossissement (OLYMPUS CH 20, objectif à immersion, G x 100) :

- les bactéries GRAM+ apparaissent violettes ;
- les bactéries GRAM- apparaissent roses après coloration avec la safranine.

2.2.2.3-Test d'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne est étudiée à l'aide de la méthode de diffusion en milieu gélosé ou méthode des disques.

2.2.2.3.1- Principe

Le test consiste à déposer des disques imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique à la surface du milieu gélosé préalablementensemencé avec une suspension de bactéries.

L'antibiotique diffuse au sein de la gélose en créant autour des disques une zone circulaire d'inhibition de croissance appelée halo d'inhibition ou auréole d'inhibition. Dans cette zone, les concentrations de l'antibiotique diminuent du centre de dépôt vers la périphérie.

Le diamètre du halo d'inhibition varie en fonction du degré de sensibilité de la bactérie à l'antibiotique (DUVAL et SOUSSY, 1991 ; FERRON, 1994).

2.2.2.3.2- Mode opératoire

a) Préparation de l'inoculum

A partir des tubes de conservation, les différentes souches bactériennes sont repiquées par la méthode des stries sur des boîtes de Petri contenant le milieu adéquat (milieu de MUELLER-HINTON pour *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* et *Staphylococcus aureus* ; et milieu MARINE AGAR pour *Vibrio fischeri* et *Vibrio harveyi*). Les boîtes sont ensuite incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 h pour *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* *Salmonella typhimurium* et à la température ambiante pendant 48 h pour *Vibrio fischeri* et *Vibrio harveyi*, afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées.

Une colonie de bactérie prélevée à l'aide d'une anse stérile est homogénéisée dans 10 ml d'eau physiologique (solution de NaCl 0,9%) et diluée de manière à obtenir une densité optique (DO) égale à 0,125 à 600 nm (DO équivalent à 10^6 bactéries /ml). La suspension ainsi obtenue servira d'inoculum pour l'ensemencement sur les boîtes de Petri.

b) Ensemencement

La surface entière de la gélose est inondée avec l'inoculum. L'excès est aspiré à l'aide d'une micropipette. Les boîtes sont ensuite séchées à l'étuve à 37°C pendant 15 min.

c) Dépôts des extraits à tester

20 µl de solution à tester sont déposés à l'aide d'une micropipette sur les disques pour antibiogramme. Après séchage à l'air libre, les disques sont déposés à la surface de la gélose dans les boîtes ensemencées.

d) Incubation

Les boîtes ensemencées avec *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* sont incubées à 37°C pendant 24 h, tandis que celles avec *Vibrio fischeri* et *Vibrio harveyi* sont incubées à la température de laboratoire (25°C) pendant 48 h.

e) Lecture des résultats

Les résultats sont lus en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition avec une règle graduée. Ils sont exprimés par référence aux normes utilisées à l'IPM (tableau 4, p. 33).

Tableau 4 : Normes utilisées pour la lecture des résultats

Diamètre du halo (X)	Résultats	Sensibilité du germe
$X < 7 \text{ mm}$	-	Insensible
$7 \text{ mm} < X < 8 \text{ mm}$	+	Assez sensible
$8 \text{ mm} < X < 9 \text{ mm}$	++	Sensible
$X > 9 \text{ mm}$	+++	Très sensible

2.2.2.4. Détermination de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la plus faible concentration d'extrait antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 24 h.

La CMI a été déterminée sur le germe le plus sensible en milieu solide et liquide.

Pour le test en milieu solide, la manipulation est la même que celle pour le test d'activité antibactérienne (§ 2.2.3, p. 32).

Pour le test en milieu liquide, la manipulation s'effectue comme suit :

2.2.2.4.1-Relancement de la culture bactérienne

A partir des tubes de conservation, la souche bactérienne est repiquée sur le milieu adéquat par la méthode de stries, puis incubée dans les conditions voulues afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées.

2.2.2.4.2-Préparation de l'inoculum

Une colonie isolée du germe à étudier est prélevée à l'aide d'une anse stérile et homogénéisée dans du milieu liquide. L'homogénat est incubé pendant 24 h à 37°C pour avoir une pré-culture.

Cette pré-culture est diluée de manière à obtenir une densité optique initiale de 0,002 à 600 nm. Elle sert d'inoculum.

2.2.2.4.3-Préparation de la gamme de concentrations de l'extrait à tester

La fraction à tester sous forme de poudre est solubilisée dans de l'eau distillée de façon à avoir une solution-mère de 100 mg/ml.

L'extrait ainsi obtenu est ensuite stérilisé (voir méthode au § 2.2.2.1, p. 3). La gamme de concentrations est préparée dans des tubes à essai stériles par des dilutions en cascade de la solution-mère (coefficient de dilution $\frac{1}{2}$) pour avoir des concentrations allant de 3,125 mg/ml à 100 mg/ml.

2.2.2.4.4-Inoculation

L'inoculum (1 ml) est introduit dans une série de six tubes numérotés de 1 à 6 et le dernier est le tube « témoin » (T). Dans chaque tube est ensuite ajouté 1 ml d'extrait à étudier de concentrations (différentes allant de 3,125 à 100 mg/ml). Le tube témoin reçoit 1 ml d'inoculum puis 1 ml du milieu non contaminé.

La DO finale est de 0,001 dans chaque tube. Les six premiers tubes (1 à 6) appelés « tubes expérimentaux » et le dernier tube (T) ou tube « témoin » sont incubés à la température adéquate dans une bain-marie agité.

2.2.2.4.5-Lecture des résultats

Elle est effectuée après l'incubation par la mesure de la DO de chaque tube à 600 nm.

La valeur obtenue pour le tube témoin représente 100% de survie. Les valeurs obtenues pour les six autres tubes (« tubes expérimentaux ») sont par la suite exprimées en pourcentage de survie par rapport au tube témoin.

La CMI correspond à la plus petite concentration avec une DO correspondant à l'absence de croissance bactérienne.

3-RESULTATS

3.1-EFFETS SUR LES SOURIS

La toxicité de l'extrait brut (EB) et de la fraction aqueuse (FA) du traitement par l'acétate d'éthyle a été évaluée en observant leurs effets sur souris.

Description des symptômes :

L'administration de l'EB et de la FA à la concentration 100 mg/ml par voie IP provoque chez la souris les symptômes suivants :

- juste après l'injection, les souris présentent un étirement de l'abdomen, des contorsions abdominales et elles traînent leurs pattes postérieures ;
- après 2 min, les souris marchent en contractant la hanche et leur queue est tendue ;
- à la dixième minute, il y a augmentation du rythme respiratoire qui s'accroît de plus en plus ; des convulsions des pattes postérieures apparaissent ; les poils se dressent (piloérection) ; la queue est perpendiculaire au corps ;
-

- 20 min après, de fortes convulsions apparaissent, puis les souris sont paralysées. Enfin, elles meurent par asphyxie.

Remarques :

- les souris injectées de ces extraits dilués 4, 6, 8 ou 10 fois, présentent les mêmes symptômes que celles injectées des extraits concentrés (100 mg/ml), cependant ces symptômes sont légers et elles reprennent leur apparence normale après quelques heures. Elles meurent toutefois après un délai plus ou moins long selon la dose ;
- les autres extraits obtenus (dialysat et adialysat) provoquent des symptômes d'intoxication très légers et les temps de survie sont plus longs.

Exceptions :

- pour la fraction aqueuse (FA) à la concentration 100 mg/ml, les souris présentent des oedèmes sur les pattes, elles ne supportent pas la lumière, leur tête tremble ;
- avec le dialysat et adialysat (100 mg/ml), les souris urinent beaucoup, elles présentent une exophtalmie et des oedèmes sur les pattes.

Le tableau 5 montre les différences de temps de survie de la souris après le test de toxicité des différents extraits :

Tableau 5 : Récapitulation de temps de survie après le test de toxicité sur souris

Extraits (100 mg/ml)	EB	E1	FA	FO	Dialysat	Adialysat
Temps de survie	30 min à 1h	1 h	20 min	30 min	+ de 24 h	1 h

D'après ces résultats, c'est l'extrait FA qui est la plus toxique sur les souris, compte tenu du temps de survie.

3.2-IDENTIFICATION DES SOUCHES BACTERIENNES

A l'aide de la coloration de GRAM, les cinq souches de bactéries qui ont servi de germes-tests ont été identifiées et leurs caractères morphologiques sont résumés dans le tableau 6 ci-dessous :

Tableau 6 : Caractères morphologiques des souches bactériennes étudiées

Souche bactérienne	GRAM	Morphologie
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Coque
<i>Escherichia coli</i>	-	Bacille
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	Bacille
<i>Vibrio harveyi</i>	-	Vibrion
<i>Vibrio fischeri</i>	-	Vibrion

3.3- EFFETS DES DIFFERENTS EXTRAITS SUR LES BACTERIES

3.3.1. Effet des extraits bruts

L'activité antibactérienne des différents EB obtenus à partir des feuilles (voir § , p.) a été testée pour déterminer la meilleure méthode d'extraction.

Les résultats des tests pour l'EB aqueux à froid sur les différents germes-tests sont résumés dans le tableau 7 ci-dessous.

Tableau 7 : Activité antibactérienne de l'extrait brut aqueux à froid (100 mg/ml)

Souche bactérienne	GRAM	Diamètre des halos d'inhibition (mm)	Sensibilité
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	13	+++
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	6	-
<i>Escherichia coli</i>	-	13	+++
<i>Vibrio harveyi</i>	-	11	+++
<i>Vibrio fischeri</i>	-	15	+++

(-) absence d'activité antibactérienne ou insensible

(+) germe assez sensible ; (++) germe sensible ; (+++) germe très sensible

L'activité antibactérienne de l'EB aqueux à chaud (concentration 100 mg/ml) est résumée dans le tableau 8 ci-dessous.

Tableau 8 : Activité antibactérienne de l'extrait brut aqueux à chaud (100 mg/ml)

Souche bactérienne	GRAM	Diamètre des halos d'inhibition (mm)	Sensibilité
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	9	++
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	6	-
<i>Escherichia coli</i>	-	9	++
<i>Vibrio harveyi</i>	-	8	+
<i>Vibrio fischeri</i>	-	8	+

(-) germe insensible ; (+) germe assez sensible ; (++) germe sensible

L'activité antibactérienne de l'EB hydroéthanolique 75% (concentration 100 mg/ml) est résumée dans le tableau 9 suivant.

Tableau 9 : Activité antibactérienne de l'extrait brut hydroéthanolique 75% (100 mg/ml)

Souches bactériennes	GRAM	Diamètre des halos d'inhibition (mm)	Sensibilité
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	11	+++
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	6	-
<i>Escherichia coli</i>	-	10	+++
<i>Vibrio harveyi</i>	-	9	++
<i>Vibrio fischeri</i>	-	9	++

(-) germe insensible ; (++) germe sensible ; (+++) germe très sensible

Conclusions :

L'EB aqueux à froid montre la meilleure activité vis-à-vis des souches bactériennes testées. Ainsi l'avons-nous choisi pour la suite de l'étude.

Notons que *Salmonella typhimurium* est résistante à tous ces EB.

3.3.2. Effets des extraits obtenus après les étapes de fractionnement sur les bactéries

Les différents extraits obtenus au cours des étapes de la purification à partir de l'EB aqueux à froid ont été testés sur les germes-tests. Les résultats sont présentés dans les tableaux 9 à 13.

Le tableau 10 montre l'activité antibactérienne de l'extrait obtenu après traitement par la chaleur (extrait E1, concentration 100 mg/ml).

Tableau 10 : Activité antibactérienne de l'extrait E1 (100 mg/ml)

Souches bactériennes	GRAM	Diamètre des halos d'inhibition (mm)	Sensibilité
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	13	+++
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	6	-
<i>Escherichia coli</i>	-	11	+++
<i>Vibrio harveyi</i>	-	10	+++
<i>Vibrio fischeri</i>	-	11	+++

(-) germe insensible ; (+) germe assez sensible ; (+++) germe très sensible

Le tableau 11 montre l'activité antibactérienne de la fraction aqueuse (FA) du traitement par l'acétate d'éthyle (concentration 100 mg/ml).

Tableau 11 : Activité antibactérienne de la fraction aqueuse (FA) (100 mg/ml)

Souches bactériennes	GRAM	Diamètre des halos d'inhibition (mm)	Sensibilité
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	15	+++
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	6	-
<i>Escherichia coli</i>	-	14	+++
<i>Vibrio harveyi</i>	-	12	+++
<i>Vibrio fischeri</i>	-	15	+++

(-) germe insensible ; (++) germe sensible ; (+++) germe très sensible

Le tableau 12 montre l'activité antibactérienne de la fraction organique (FO) du traitement par l'acétate d'éthyle (concentration 100 mg/ml).

Tableau 12 : Activité antibactérienne de la fraction organique (FO) (100 mg/ml)

Souches bactériennes	GRAM	Diamètre des halos d'inhibition (mm)	Sensibilité
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	13	++
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	6	-
<i>Escherichia coli</i>	-	13	++
<i>Vibrio harveyi</i>	-	12	++
<i>Vibrio fischeri</i>	-	14	+++

(-) germe insensible ; (++) germe sensible ; (+++) germe très sensible

Le tableau 13 montre l'activité antibactérienne du dialysat (concentration 100 mg/ml).

Tableau 13: Activité antibactérienne du dialysat ou E3 (100 mg/ml)

Souches bactériennes	GRAM	Diamètre des halos d'inhibition (mm)	Sensibilité
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	10	+++
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	6	-
<i>Escherichia coli</i>	-	9	++
<i>Vibrio harveyi</i>	-	9	++
<i>Vibrio fischeri</i>	-	10	+ ++

(-) germe insensible ; (++) germe sensible ; (+++) germe très sensible

Le tableau 14 montre l'activité antibactérienne de l'adialysat (concentration 100 mg/ml).

Tableau 14 : Activité antibactérienne de l'adialysat ou E2 (100 mg/ml)

Souches bactériennes	GRAM	Diamètre des halos d'inhibition (mm)	Sensibilité
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	10	+++
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	6	-
<i>Escherichia coli</i>	-	9	++
<i>Vibrio harveyi</i>	-	9	++
<i>Vibrio fischeri</i>	-	10	+++

(-) germe insensible ; (++) germe sensible ; (+++) germe très sensible

3.3.3-Récapitulation des activités antibactériennes des différents extraits obtenus

Le tableau 15 récapitule l'activité des différents extraits obtenus sur les germes utilisés.

Tableau 15 : Récapitulation des activités antibactériennes des différents extraits (concentration 100 mg/ml) sur les souches différentes

EXTRAITS	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Vibrio harveyi</i>		<i>Vibrio fischeri</i>	
	Diamètre (mm)	Sensibilité	Diamètre (mm)	Sensibilité	Diamètre (mm)	Sensibilité	Diamètre (mm)	Sensibilité
EB aqueux à froid	13	+++	13	+++	11	+++	15	+++
Extrait E1	13	+++	11	+++	10	+++	11	+++
Fraction organique FO	13	+++	13	+++	12	+++	14	+++
Fraction aqueuse FA	15	+++	14	+++	12	+++	15	+++
Dialysat (E3)	10	+++	9	++	9	++	10	+++
Adialysat (E2)	10	+++	9	++	9	++	10	+++

(++) germe sensible ; (+++) germe très sensible

Ces résultats montrent que :

- La croissance de 4 bactéries sur les 5 testées est affectée par les différents extraits issus des étapes de la purification ;
- les bactéries GRAM + *Staphylococcus aureus* et la bactérie GRAM - *Vibrio fischeri* sont les plus sensibles (diamètre des halos ≥ 10 mm).

La fraction aqueuse (FA) du traitement par l'acétate d'éthyle donne les meilleurs résultats par rapport à la fraction organique (FO). C'est pourquoi elle a été choisie pour la suite de la purification.

En outre, cette fraction FA a été utilisée pour la détermination de la CMI, car elle donne aussi les plus diamètres des halos d'inhibition les plus élevés.

Les résultats des tests précédents sur les 5 souches sont présentés sur les figures 5 à 8.

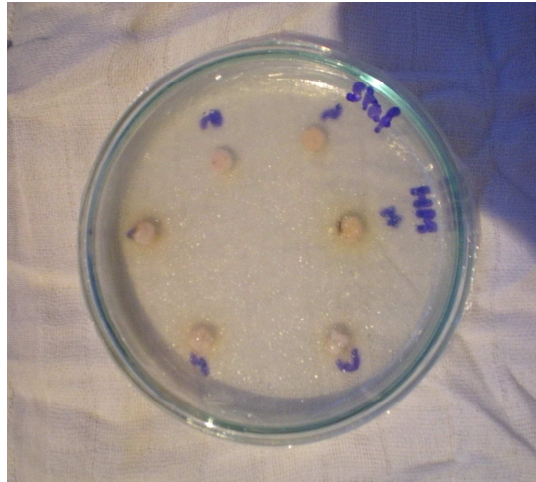


Figure 5 : Effets des différents extraits sur *Staphylococcus aureus*

1 : EB (extrait brut)

2 : E1 (extrait après traitement par
la chaleur)

3 : FO (fraction organique)

4 : FA (fraction aqueuse)

5 : A (adialysat E2)

6 : D (dialysat E3)

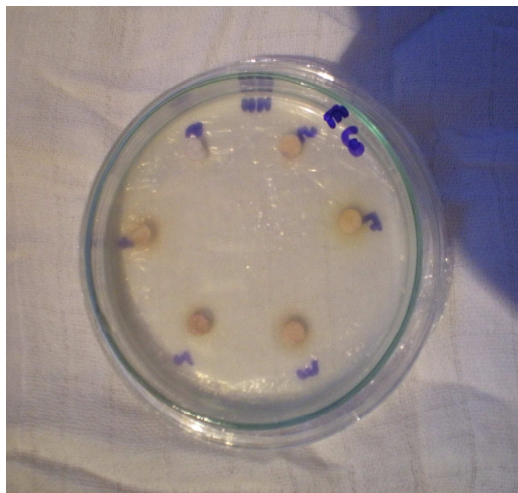


Figure 6 : Effets des différents extraits sur *Escherichia coli*

1 : EB (extrait brut)

2 : E1 (extrait par traitement par la chaleur)

3 : FO (fraction organique)

4 : FA (fraction aqueuse)

5 : A (adialysat E2)

6 : D (dialysat E3)

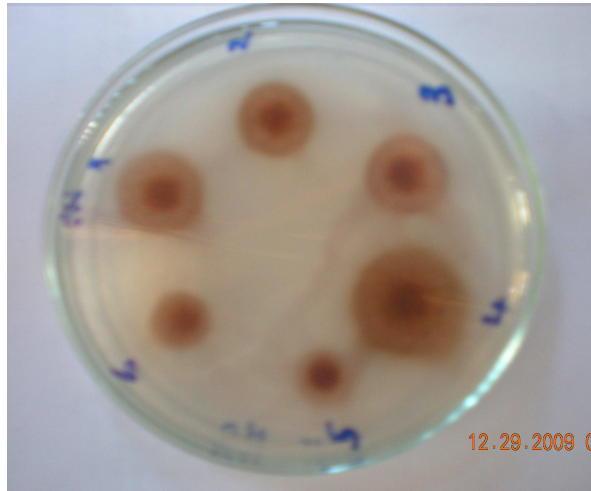


Figure 7: Effets des différents extraits sur *Vibrio harveyi*

- | | |
|--|---------------------------|
| 1 : EB (extrait brut) | 4 : FA (fraction aqueuse) |
| 2 : E1 (extrait par traitement par la chaleur) | 5 : A (adialysat E2) |
| 3 : FO (fraction organique) | 6 : D (dialysat E3) |

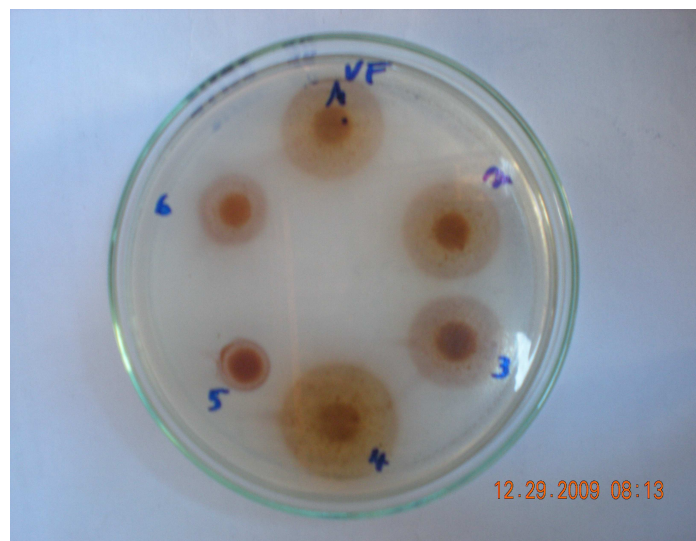


Figure 8: Effets des différents extraits sur *Vibrio fischeri*

- | | |
|--|---------------------------|
| 1 : EB (extrait brut) | 4 : FA (fraction aqueuse) |
| 2 : E1 (extrait par traitement par la chaleur) | 5 : A (adialysat E2) |
| 3 : FO (fraction organique) | 6 : D (dialysat E3) |

3.4-DETERMINATION DE LA CMI

La CMI a été déterminée sur *Vibrio fischeri* qui d'après les tests en milieu solide s'est montrée la plus sensible aux extraits issus de la purification de l'EB aqueux à froid des feuilles de *Psorospermum androsaemifolium*. Les tests ont été effectués en milieu liquide et en milieu solide (voir méthode au § 3.2.4, p. 34).

3.4.1- CMI en milieu solide

La CMI a été évaluée en milieu solide pour les extraits EB, E1, FA (fraction aqueuse), l'adialysat et dialysat (tableaux 16 à 19).

La CMI est la plus faible concentration donnant un halo d'inhibition de 7 mm.

Tableau 16 : Résultats de la détermination de la CMI en milieu solide de l'extrait brut aqueux à froid

Concentration de l'EB (mg/ml)	100	50	25	12,5	6,75	3,125
Activité	+	+	+	+	-	-
Diamètres de halo (mm)	15	13	11	9	7	6

Tableau17 : Résultats de la détermination de la CMI de l'extrait E1

Concentration de l'E1 (mg/ml)	100	50	25	12,5	6,75	3,125
Activité	+	+	+	+	-	-
Diamètres de halo (mm)	15	12	11	9	7	6

Tableau18 : Résultats de la détermination de la CMI de la fraction aqueuse FA

Concentration de la FA (mg/ml)	100	50	25	12,5	6,75	3,125
Activité	+	+	+	+	-	-
Diamètres du halo (mm)	15	13	10	8	7	6

Le tableau suivant montre l'activité antibactérienne de l'adialysat et du dialysat :

Tableau 19 : Résultats de la détermination de la CMI de l'adialysat E2 et du dialysat E3

Concentration d'extrait A et D (mg /ml)	100	50	25	12,5	6,75	3,125
Activité	+	+	+	-	-	-
Diamètre du halo (mm)	10	10	9	8	6	6

La fraction aqueuse d'acétate d'éthyle est préférable pour déterminer la CMI, puisque les résultats obtenus avec les produits de la dernière étape de fractionnement (adialysat-dialysat) ont été très faible.

Ces résultats montrent que la CMI sur le milieu solide correspond à la concentration 12,5 mg/ml pour tous ces extraits.

3.4.2—La CMI en milieu liquide

La CMI a été déterminée en milieu liquide selon la méthode décrite au paragraphe 3.2.3 (p. 30). *Vibrio fischeri*, germe le plus sensible, a été utilisé. La fraction aqueuse FA a été choisie car elle s'est montrée la plus active.

Le tableau 20 suivant montre les résultats obtenus.

Tableau 20 : Résultats de la détermination de la CMI de la fraction aqueuse FA sur *Vibrio fischeri* en milieu liquide

Tube n°	T	1	2	3	4	5
Concentration de FA (mg/ml)	0	50	25	12,5	6,75	3,125
DO à t = 0 à 600 nm	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
DO à t = 24 h à 600 nm	0,018	0,005	0,007	0,009	0,019	0,019

La CMI correspond à la concentration 12,5 mg/ml avec la DO = 0,009 où il y a inhibition de la croissance bactérienne.

4- DISCUSSION ET CONCLUSION

Les principes actifs présents dans les feuilles de *Psorospermum androsaemifolium* montrent une activité toxique.

L'extrait brut (EB), l'extrait E1 obtenu par traitement par la chaleur, les fractions aqueuse et organique (FA, FO) du traitement par l'acétate d'éthyle, le dialysat et l'adialysat à une concentration 100 mg/ml sont tous toxiques sur les souris mais seulement les temps de le plus court sur les souris testées par rapport aux autres extraits utilisés, donc elle présente la plus forte toxicité.

Les principaux symptômes d'intoxication provoqués par voie IP par l'extrait brut et la fraction aqueuse chez la souris sont principalement l'augmentation du rythme respiratoire, les contorsions abdominales, la piloérection, l'exophtalmie, les convulsions. Ces manifestations suggèrent que les principes actifs contenus dans ces extraits pourraient être des neurotoxines.

L'accélération du rythme respiratoire pourrait par ailleurs traduire un effet cardiotoxique.

Les résultats des tests d'activité de nos différents extraits sur 5 bactéries (1 bactérie GRAM négatif et 4 bactéries GRAM positif) ont montré que :

- la croissance de 4 bactéries sur les 5 testées, est inhibée par les différents extraits ;
- *Staphylococcus aureus* et *Vibrio fischeri* sont les plus sensibles aux différents extraits (diamètre de halo supérieur ou égal à 10) ;
- *Escherichia coli* et *Vibrio harveyi* présentent une sensibilité moyenne vis-à-vis des différents extraits (diamètre de halo entre 9 et 14 mm) ;
- par contre, *Salmonella typhimurium* résiste à tous les extraits, cette bactérie est insensible aux principes toxiques des feuilles de *Psorospermum androsaemifolium*.

En outre, la fraction aqueuse (FA) est la plus active sur *Staphylococcus aureus* et *Vibrio fischeri*.

Il faut aussi noter que l'adialysat et le dialysat présentent une faible activité vis-à-vis d'*Escherichia coli* et *Vibrio harveyi*.

La CMI en milieu solide sur *Vibrio fischeri* est 12,5 mg/ml pour tous les extraits. De même, la CMI en milieu liquide de l'extrait FA a été évaluée à 12,5 mg/ml.

Ces extraits sont donc moins actifs que l'extrait brut d'*Acridocarpus excelsus* qui montrent une CMI de 8,43 mg/ml sur le même germe (ABDOULLAHI, 2009).

Ils sont par contre plus actifs que l'extrait brut de *Macaranga alnifolia* qui montrent une CMI de 16,06 mg/ml sur le même germe (DJAZA, 2009)

D'après le criblage phytochimique, les extraits contiennent des stéroïdes ou triterpènes et des stérols insaturés : d'après la littérature certains terpènes possèdent une activité antimicrobienne et jouent un rôle important dans la défense contre les microorganismes (BRUNETON, 1987).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les expériences réalisées sur les feuilles de *Psorospermum androsaemifolium* ont permis de :

- mettre en évidence l'activité toxique des extraits des feuilles sur les souris ainsi que leurs effets antibactériens ;
- cerner la nature chimique des principes actifs ;
- obtenir des informations qui pourront être utilisées à des fins utiles sur la plante.

Les perspectives de cette étude sont :

- l'isolement des molécules actives présentes dans les feuilles de *Psorospermum androsaemifolium* ;
- l'approfondissement des propriétés antibactériennes et la recherche d'autres activités biologiques ;
- l'étude du mécanisme d'action des principes actifs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANDRIAMASINORO S. N. Caractérisation chimique et biologique des principes antibactériens de l'écorce des tiges de *Dilobeia thouarsii* (Proteaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université Antananarivo, 2009 ; 52p.

ABDOU D. Etude chimique et toxicologique des extraits des écorces des branches de *Conchopetalum madagascariensis* (Sapindaceae), plante endémique de Madagascar. [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université Antananarivo, 2009 ; 70p.

ABDOULLAHI S. Etudes chimique et toxicologique des extraits de feuilles d'une plante médicinale malgache *Acridocarpus excelsus* (Malpighiaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2009 ; 68p.

ANDRIANALIJAONA J. A. Etude de la composition chimique de *Lantana camara* (huiles essentielles). Thèse de Docteur Ingénieur. Département Industries Agricoles et Alimentaires. E.S.S.A. Antananarivo : Université Antananarivo, 2003 ; 167p.

AUDIGIER C., DUPONT D., ZONSZAIN F. Principes et méthodes d'analyse biochimique. Paris : Doin éditeur, 1992 ; Tome II : 174p.

BOITEAU P. Dictionnaire des noms malgaches des végétaux. Collection « Nature Flore de Madagascar ». Grenoble, Edition Alizieu, 1989 ; 109p.

BRUNETON J. Eléments de phytochimie et de pharmacognosie, Paris : Tech. et Doc. Lavoisier, 1987 ; 595p.

BRUNETON J. Pharmacognosie : phytochimie, plante médicinale, 2^{ème} éd. Paris : Tech. & Doc. Lavoisier ; 1993 ; 915p.

BOYD W. C. Fundamentals of immunology : 4^{ème} éd. New-York : Wiley and Sons, 1966 ; 503p.

DAVID R. Les hormones végétales. Paris ; 1952 ; 50p.

DALTON D. R. The alkaloids; the fundamental of chemistry, a biogenetic approach. New York : Marcel Dekker, 1979; 565p.

DEBRAY M., JACQUEMIN H., RAZAFINDRAMBAO R. Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar (Travaux et documents de l'ORSTOM n° 8) Paris : ORSTOM, 1971; 150p.

DUVAL J., SOUSSY C. J. Antibiothérapie ; base bactériologique pour l'installation des antibiotiques, 4^{ème} éd. Paris : Masson, 1990 ; 188p.

GAUTIER J. et MIOCQUE M. Précis de chimie organique : séries cycliques. Collection de Précis de pharmacie, Paris : Masson et Cie, 1968 ; 391 p.

HARBONE J. B. Phytochemical methods : a guide to modern techniques of plant analysis, 2^{ème} éd. New-York, Chapman and Hall London, 1983; 297p.

JEANNODA V. Etude chimique, biologique et toxicologique du principe convulsivant des *Connaracées* de Madagascar. [Thèse de Doctorat d'Etat : Sciences]. Strasbourg : Université Louis Pasteur de Strasbourg, 1986 ; 273p.

KAMOUN P. Appareils et méthodes en biochimie. 3^{ème} éd. Paris : Médecine-Sciences Flammarion, 1987 ; 373p.

LEANDRI J. Les arbres et grands arbustes malgaches de la famille des Euphorbiaes.
In : Le naturaliste malgache. Antananarivo Tome VI, 1952 : 47-82.

LECLERC H., IZARD D., HUSSON M.O., WATTRE P., JAKUBCZAK E. Microbiologie générale. 2^{ème} éd. Paris : Doins Editeurs, 1983 ; 369p.

LEFEVRE G. Manuel de microbiologie. 1997 ; 153p.

MAHUZIER G. et HAMON M. Abrégé de chimie analytique : méthode de séparation. 2^{ème} éd. (Collection Abrégé de pharmacie), 1990 ; 261p.

MAYER A., POLJAKOFF-MAYBERA A. The germination of seeds. London : Pergamon press, 1963; 236p.

MEYER A., DEJANAJ , LECLERC H. Cours de microbiologie générale. Paris : Doin éd., 1994 ; 495p.

MOUNIDATI F. B. M. Purification et caractérisation partielles des principes antimicrobiens des téguments des graines d'*Albizia arenicola* (Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2009 ; 72p.

OMS. Techniques de base pour le laboratoire. Genève, 1982 ; 488p.

PERNET R. et MEYER G. Pharmacopée de Madagascar. Publication de l'Institut de Recherches Scientifiques de Madagascar, 1957 ; 86p.

PERRIER de la BATHIE. Flore de Madagascar, Février 1951. 132^{ème} Famille ; 95p

PETIT JEAN A. L'Ethnobotanique base de la recherche sur les plantes médicinales. In : ANDRIATSIFERANA M. Réunion sous-régionale de l'océan Indien (Antananarivo, 26 au 30 avril). Médecine traditionnelle et pharmacopée. Environnement et développement durable. Antananarivo : TSIPIKA éditeur, 1993 ; 168p.

RABENANDRIANINA S.N. Etude chimique et toxicologique des extraits des feuilles de *Dilobeia thouarsii* (Protaceae) une plante médicinale malgache. [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2008 ; 52p.

RABESA Z. A. Pharmacopée de l'Alaotra. Antananarivo. Imprimerie Tatsinanana, 1986 ; 288p.

RAKOTO-RANOROMALALA D.A.D. Purification et caractérisation partielle des principes toxiques de *Rourea orientalis* (Connaraceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1984 ; 44p.

RAKOTO-RATSIMAMANGA A. Eléments de pharmacopée Malagasy. Tome I. Antananarivo : Imprimerie Nationale, 1969 ; 579p.

RAMISIRAY G. La médecine des Malgaches : pratique et croyance médicinale des malgaches. [Thèse de médecine]. Paris, 1901 ; (C.R. : Madagascar, Août 1901).

RANDERATH K. Chromatographie sur couche mince. Paris : édition Gauthier-Villars , 1964 ; 296p.

RASOATAHIANA V. Etude chimique et toxicologique des principes toxiques des feuilles de *Gambeya boiviniana* (Sapotaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2005 ; 74p.

RASOLOHARIJAONA F. Y. Etude chimique et toxicologique d'une plante médicinale malgache, *Schefflera longipedicellata* (Araliaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université Antananarivo, 2008 ; 57p.

REED L., MUENCH H. A. simple method of estimating fifty per cent points. Am. J. Hyg. 27, 1938 ; 293p.

ROGER G.G. Guide des plantes médicinales. Editions vie et santé, 1996 ; 97p.

SINGLETON P. Bactériologie. 2^{ème} éd. Paris : Masson, 1994 ; 247p.

SIROT J. Evaluation de l'activité antimicrobienne des antibiotiques in vitro. In : LE MINOR.

VERON M. Bactériologie médicale, 2^{ème} éd. Paris : Flammarion médecine – sciences, 1989 : 287-309.

TSITOVICH. Chimie analytique. Moscou : éd. Mir Moscou, 1989 : 440p.

VALISOLALAO J. Huiles essentielles, inventaire et études des plantes aromatiques et médicinales des Etats de l'Océan Indien. Projet FED/COI/AIRDOI, 1989 ; 61p.

ANNEXES

ANNEXE I : Description botanique de *Psorospermum androsaemifolium*

Plante : *Arbuste* de 1 à 5 m dans les lieux découverts, petit arbre de 5 à 10 m dans les forêts, à feuilles caduques ; jeunes pousses et inflorescences couvertes d'une pubescence ferrugineuse courte, plus ou moins abondante, feuilles glabres à leur complet développement. **Feuilles** un peu généralement noirâtres au-dessus ; plus claires et souvent un peu ferrugineuses en dessous, avec les nervures secondaires saillantes ; pétiole de 5 à 15 mm, assez grêle, limbe variable de formes et dimensions, ovale, oblong ou lancéolé, souvent atténué aigu vers les deux extrémités, parfois plus obtus à la base, assez grand, à face inférieure sans ponctuations bien visibles en lumière directe, les points noirs des sinus marginaux exceptés, les ponctuations par contre souvent très visibles par transparence, en rouge sur les feuilles jeunes, en noir sur les feuilles adultes, puis, à la fin obscures ou invisibles.

Inflorescence : cymes terminaux, très variables, pédonculées ou sessiles (ramifiées dès la base) plus ou moins denses ou lâches, corymbiformes ou ombelliformes. En général, fleurs nombreuses (20 à 60) ; pédicelles de 2,5 à 6 mm de long, s'accroissant après l'anthèse ; fleurs de 5-6 mm de long. **Sépales** : souvent obtus de 2,5 mm de long, un peu pubescents sur la face externe, immaculés ou plus souvent ornés. **Pétales** : ordinairement ornés sur la moitié supérieure, rarement immaculés. **Etamines** : en nombre variable, ce nombre peut varier dans une même fleur ; anthères toujours dépourvues de glandes noires. **Style** : de 2 à 4 mm de long, de forme soit brévistyle et longistyle peu nette.

Fruits : baies et résines globuleuses ou un peu turbinées, jaunâtres, ponctuées de rouge à maturité. Baies comestibles, aromatiques recherchées surtout par les oiseaux.

Localisation : lieux découverts, rocailles ou forêts denses et forêts plus ou moins sèches de 0 à 1 200 m d'altitude ; floraison et fructification : septembre- janvier.

Indication thérapeutique : les feuilles sont utilisées pour soigner les piqûres ou morsures d'insectes ou d'autres animaux ; elles sont anti-diarrhéiques et utilisées contre les désordres intestinaux.

Mode d'emploi : on applique les feuilles sur la partie mordue. L'infusion des feuilles est souvent administrée contre les désordres intestinaux.

Références : H01013

D1528/D1529 PERRIER de la BATHIE (1951)

NOMS VERNACULAIRES DE *Psorospermum androsaemifolium*
SELON LES GROUPES ETHNIQUES

ETHNIES	NOMS VERNACULAIRES
Merina	Tsifady, tsifadilahy
Sakalava	Aleriky
Betsileo	Fanera, fanerana, taimbitsina, hazomafaika
Antemoro-antesaka	Harongampanihy
Sihanaka	Taimbitsy
Bezanozano	Taimbintsy
Betsimisaraka	harongampanihy



(a)



(c)



(b)



(d)

Figure 9 : *Psorospermum androsaemifolium* : échantillons de feuilles cueillis dans quatre régions différentes : (a) Farafangana ; (b) Antsirabe ; (c) Périnet ; (d) Mandraka.

ANNEXE II: Composition du réactif à la vanilline sulfurique

Vanilline	0,5 g
Acide sulfurique	100 ml

ANNEXE III : Composition des réactifs pour les tests alcaloïdes

Réactif de Mayer :

Chlorure de mercure	1,36 g
Iodure de potassium	5 g
Eau distillée q.s.p.	100 ml

Réactif de Wagner :

Iodure de potassium	2 g
Iode	1,27 g
Eau distillée qsp	100 ml

Réactif de Dragendorff : c'est un mélange de volume à volume de la solution A et solution B

SOLUTION A ;

Nitrate de bismuth	1,7 g
Acide tartrique concentré	20 g
Eau distillée qsp	30 ml

SOLUTION B :

Iodure de potassium	1 g
Eau distillée qsp	40 ml

ANNEXE IV : Composition des milieux de culture

Milieu de MUELLER-HINTON (Liofilchem) :

Extrait de viande	2 g
Peptone	17,5 g
Amidon	1,5 g
Agar	15 g
Eau distillée	10 ml

pH = 7,3 à 25°C

Milieu MARINE AGAR (Difco)

Peptone	5,0 g
Extrait de levure	1,0 g
Citrate de fer	0,1 g
Chlorure de sodium	1,45 g
Sulfate disodique	3,2 4 g
Sulfate de calcium	1,80 g
Chlorure de potassium	0,55 g
Bicarbonate de sodium	0,16 g
Bicarbonate de potassium	0,08 g
Gélose	15 g
Chlorure de strontium	34 g
Acide borique	22,0 g
Silicate de sodium	4,0 g
Fluorure de sodium	2,4 g
Nitrate d'ammonium	1,6 g
Phosphate disodique	8,0 g
Chlorure de magnésium	8,8 g

pH = 7,6± 0.2

ANNEXE V : Composition du PBS (Phosphate Buffer Solution)

Chlorure de sodium	7,65 g
Phosphate disodique	0,72 g
Phosphate monosodique	0,21 g
Eau distillée qsp	1000 ml

ANNEXE VI :

a- Composition de milieu ZOBELL (milieu liquide)

Extrait de levure	1 g
Peptone	4 g
Chlorure de sodium	30 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 7,4 avec la soude si nécessaire

b- Composition de bouillon nutritif (milieu liquide)

Peptone	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	1000 ml

pH= 7,4

ANNEXE VII : Préparation des milieux

Préparation du milieu de MUELLER-HINTON (MH)

- Dissoudre 36 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée
- Chauffer le milieu jusqu'à dissolution entière sur une plaque chauffante toujours en soumettant à une agitation magnétique
- Autoclaver à 121°C pendant 15 min.

Préparation du milieu MARINE AGAR (MA)

- Peser 55,1 g de milieu déshydraté pour un litre d'eau distillée
- Mélanger et chauffer sous agitation magnétique continue sur une plaque chauffante
- Mettre à l'autoclave 121°C pendant 15 min.

Après l'autoclavage, on fait le coulage, chaque milieu MH et MA est coulé dans les boîtes de Petri ; sous un volume de 12,5 ml pour une boîte, puis laisser quelques minutes sur la paillasse avant d'effectuer la pré-culture ou culture. Les milieux non utilisés sont conservés au réfrigérateur à + 4°C.

Préparation du milieu ZOBELL

Dans 1000 ml d'eau distillée :

- mettre 1 g d'extrait de levure, 4 g de peptone et 30 g de NaCl ;
- chauffer sous agitation magnétique sur une plaque chauffante jusqu'à obtenir un mélange homogène (ajuster à pH = 7,4) ;
- autoclaver à 121°C pendant 15 min.

Préparation du bouillon nutritif

Dans 1000 ml d'eau distillée :

- mettre 10 g de peptone et 5 g de NaCl
- chauffer sous agitation magnétique sur une plaque chauffante jusqu'à obtenir un mélange homogène (ajuster à pH = 7,4)
- autoclaver à 121°C pendant 15 min.

Le milieu liquide est conservé dans l'incubateur.

Name: Olga RAHERIMANAMPAMONJY Hanta Lalao

Thesis title: Chemical and Biological Studies of a medicinal plant Madagascar *Psorospermum androsaemifolium* (Hypericaceae)

SUMMARY

The leaves of *Psorospermum androsaemifolium* a Hypericaceae endemic to Madagascar, contain active ingredients on mice and bacteria.

An aqueous crude extract of brown color, bitter taste, obtained by cold aqueous extraction, was purified by a purification procedure comprising heat treatment, fractionation with ethyl acetate and dialysis. The yields of toxins from 0.18% for adialysat (extract E2) and 0.59% for the dialysate (extract E3).

The toxic principles contained in the extracts are heat stable, soluble in water, ethanol and weakly polar solvents such as ethyl acetate and n-butanol. They would have a molecular weight less than 6000-8000 Da. They could be glycosides whose aglycon is a flavonoid, a steroid, a sterol or unsaturated triterpene or a polyphenol.

In mice, the crude extract and aqueous fraction of treatment with ethyl acetate (FA) (100 mg / ml) injected intraperitoneally cause symptoms suggesting central nervous system and cardiovascular system.

All extracts (100 mg / ml) obtained in the steps of extraction and purification exert antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio fischeri*. *Salmonella typhimurium* proved insensitive to all extracts.

The MIC of extracts from leaves of *Psorospermum androsaemifolium* is 12.5 mg / ml in solid medium for all extracts. This value is the same for FA in liquid medium.

Keywords: *Psorospermum androsaemifolium*, Hypericaceae, toxic, antibacterial, CMI.

Supervisors: Dr RAKOTO-RANOROMALALA Danielle.A. Doll

Professor Victor Jeannod

Nom : RAHERIMANAMPAMONJY Hanta Lalao Olga

Titre de mémoire : Etudes chimique et biologique d'une plante médicinale malgache,
Psorospermum androsaemifolium (Hypericaceae)

RESUME

Les feuilles de *Psorospermum androsaemifolium*, une Hypericacée endémique de Madagascar, contiennent des principes actifs sur la souris et des bactéries.

Un extrait brut aqueux de couleur marron, de goût amer, obtenu par extraction aqueuse à froid, a été purifié selon un protocole de purification comprenant un traitement par la chaleur, un fractionnement par l'acétate d'éthyle et une dialyse. Les rendements en toxines sont de 0,18% pour l'adialysat (extrait E2) et de 0,59% pour le dialysat (extrait E3).

Les principes toxiques contenus dans les extraits sont thermostables, solubles dans l'eau, l'éthanol et dans les solvants peu polaires tels que l'acétate d'éthyle et le n-butanol. Ils auraient un poids moléculaire inférieur à 6000-8000 Da. Ils pourraient être des hétérosides dont la génine serait un flavonoïde, un stéroïde, un stérol insaturé ou triterpène ou encore un polyphénol.

Chez la souris, l'extrait brut et la fraction aqueuse du traitement par l'acétate d'éthyle (FA) (100 mg/ml) injectés par voie intrapéritonéale entraînent des symptômes suggérant une atteinte du système nerveux central et du système cardiovasculaire.

Tous les extraits (100 mg/ml) obtenus au cours des étapes de l'extraction et de la purification exercent une activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi* et *Vibrio fischeri*. *Salmonella typhimurium* s'est montré insensible à tous les extraits.

La CMI des extraits des feuilles de *Psorospermum androsaemifolium* est de 12,5 mg/ml en milieu solide pour tous les extraits. Cette valeur est la même pour FA en milieu liquide.

Mots-clés : *Psorospermum androsaemifolium*, Hypericaceae, toxique, antibactérien, CMI.

Encadreurs : Docteur RAKOTO-RANOROMALALA Danielle.A. Doll

Professeur JEANNODA Victor