



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE



MEMOIRE DE RECHERCHE
Pour l'obtention du
Diplôme d'Etudes Approfondies
D.E.A.



Chimie Organique option « Produit Naturels »



Présenté par

ANDRIANARISON Jeriarisoa Miarana

CONTRIBUTION A L'ETUDE CHIMIQUE et BIOLOGIQUE DES FEUILLES de *Carica papaya* L. (Caricaceae)

Soutenu publiquement le Vendredi 13 Novembre 2009 devant la Commission d'examen

Président : Madame ANDRIANTSIFERANA Marta

Rapporteur : Madame RAHARISOLOLALAO Amélie

Examineurs : Madame RAZANAMAHEFA Bakonirina

Mademoiselle RASOANAIVO Herilala Léa

Professeur Titulaire

Professeur Titulaire

Professeur Titulaire

Docteur

Je dédie ce mémoire à ma mère,

Pour tes mains qui ont tant travaillé,

Pour ton cœur qui m'a tant aimé,

Pour ton sourire qui m'a tant réchauffé,

Pour tes yeux qui furent parfois mouillés,

Pour toi qui m'a tant aimé.

À la mémoire de mon oncle...

REMERCIEMENTS

Nous rendons grâce à Dieu Tout Puissant et le remercions de nous avoir guidés et aidés durant toutes les étapes de nos études.

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance

A Madame Amélie RAHARISOLOLALAO

Professeur Titulaire à la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo

Directeur du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et Chimie Organique
Biologique (LCSN/COB)

Enseignant Chercheur au Département de Chimie Organique à la Faculté des Sciences de
l'Université d'Antananarivo

Membre du Conseil Scientifique de la Faculté des Sciences

Membre de l'Académie Nationale des Arts, des Lettres et des Sciences (ANALS)

Membre du Mouvement Malgache pour le Contrôle de la Qualité

Membre de NAPRECA Madagascar

Toute notre gratitude pour l'enseignement que nous avons reçu.

Nous avons toujours trouvé auprès de vous conseils et aide inestimable

*Malgré vos multiples tâches et occupations, vous nous avez sacrifiés votre
temps pour suivre ce travail*

*Nous ne pouvons laisser la présente occasion sans vous exprimer nos
remerciements les plus sincères.*

A Madame Marta ANDRIANTSIFERANA

Professeur Titulaire à la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo

Directeur du Laboratoire de Chimie Organique « Produits Naturels » et Biotechnologie (LPNB)

Responsable du 3^{ème} cycle de Chimie Organique Option « Produits Naturels » depuis 1983 à ce jour

Membre du Conseil Scientifique de la Faculté des Sciences

Membre de l'American Society of Pharmacognosy (ASP) depuis 1986

Coordinatrice Nationale du Groupement de Recherches Internationales « Biodiversité et Développement Durable à Madagascar » GDRI-BDDM

Expert International Comité Coopération pour la Recherches Universitaire et Scientifique CORUS 2

Promoteur et coordonnateur de nombreux projets de recherche, dont celui entre Madagascar, le Japon et les USA sur « Studies on the Bioactive Principles of Venomous Land Animals in Madagascar » depuis 1993, et F@des SPO2 v2_04, intitulé

« Compléments de Recherches en Vue de la Valorisation Scientifique et Economique des Données sur les Grenouilles du genre Mantella, Endémique de Madagascar »

Projets qui ont impulsé un formidable essor à la Chimie des Mantellas

Promoteur et Membre Senior du Comité Scientifique du Projet « Biodev-Unesco Madagascar » depuis 2002

En dépit de vos nombreuses occupations, vous nous avez fait l'honneur de présider le Jury de ce mémoire.

En témoignage de notre gratitude pour l'enseignement que vous nous avez dispensé.

Veillez trouver ici nos vifs remerciements et toute notre reconnaissance.

A Madame Bakonirina RAZANAMAHEFA

Professeur Titulaire à la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo

Chef de Département de Chimie Organique

Directeur du Laboratoire de Chimie Appliquée aux Substances Naturelles (LaCASN)

Enseignant Chercheur au Département de Chimie Organique à la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo

Malgré vos lourdes responsabilités,

Vous avez accepté avec bienveillance de juger ce mémoire, vos suggestions et remarques seront appréciées, elles nous permettront de compléter nos connaissances,

Veillez trouver ici l'expression de notre sincère reconnaissance

A Mademoiselle Herilala Léa RASOANAIVO

Docteur de 3^{ème} Cycle en Chimie Organique « Produits Naturels »

Maître de Conférence au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et Chimie

Organique Biologique (LCSN/COB) au Département de Chimie Organique à la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo

Il nous est particulièrement agréable de vous remercier pour votre présence dans notre jury

Vos observations seront reçues avec intérêt

Soyez assurée de tous nos vifs remerciements et notre reconnaissance

Nos profonds remerciements vont aux membres du Comité de lecture pour leurs précieux conseils et encouragements

Madame Bakolinirina ANDRIAMIHAJA

Professeur à la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo

Enseignant Chercheur au Laboratoire de Chimie Appliquée aux Substances Naturelles (LaCASN), Département de Chimie Organique, Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo

Monsieur Adolphe RAKOTOMANGA

Docteur de 3^{ème} Cycle en Chimie Organique

Maître de Conférence au Laboratoire de Chimie Appliquée aux Substances Naturelles (LaCASN), Département de Chimie Organique, Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo

Monsieur Richard RASAMOELISENDRA

Docteur de 3^{ème} Cycle en Chimie Organique

Maître de Conférence au Laboratoire de Chimie Organique « Substances Marines » (LCOSM), Département de Chimie Organique, Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo

Notre profonde reconnaissance

Au **Professeur Joe D. CONNOLLY**

Enseignant Chercheur au Département de Chimie de l'Université de Glasgow, qui a eu l'amabilité d'enregistrer les spectres de RMN et de masse de notre produit et de nous les avoir fait parvenir très rapidement.

Nous remercions vivement

Tous les enseignants au Département de Chimie Organique, option « Produits Naturels »

L'équipe du Laboratoire de Chimie Organique « Produits Naturels » et Biotechnologie (LPNB), dirigée par le Professeur Marta ANDRIANTSIFERANA.

L'équipe du Laboratoire de Chimie et de Valorisation des Produits Naturels (LCVPN), dirigée par le Professeur Marcelle RAKOTOVAO.

L'équipe du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et Chimie Organique Biologique (LCSN/COB), sous la direction du Professeur Amélie RAHARISOLOLALAO.

L'équipe du Laboratoire de Chimie Organique « Substances Marines » (LCOSM), sous la direction du Professeur Yvonne RANARIVELO.

L'équipe du Laboratoire de Chimie Appliquée aux Substances Naturelles (LaCASN), sous la direction du Professeur Bakonirina RAZANAMAHEFA.

L'Institut Malgache des Recherches Appliquées (IMRA)

- L'équipe du Laboratoire de Chimie des Substances Marines de l'IMRA au sein duquel nous avons pu accéder aux matériels grâce à l'intervention très efficace du **Docteur Ruphin FATIANY** qui nous a également aidé à déterminer les activités biologiques à partir du fractionnement bioguidé des fractions et des produits isolés..
- L'équipe du Département de Biodiversité et Biotechnologie de l'IMRA dirigé par le Docteur Christian RABEMANANTSOA.

Ma famille et mes amis pour leur soutien inconditionnel durant la réalisation de ces travaux de recherche.

Tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce mémoire.

PLAN D'ETUDE

INTRODUCTION.....	1
Partie I- GENERALITES	
I-1-Les substances naturelles.....	3
I-1-1- Définition.....	3
I-1-2- Propriétés.....	3
I-1-3- Biogenèse.....	3
I-2-Généralités sur <i>Carica papaya</i> L.....	4
I-2-1- Botanique.....	4
I-2-2- Utilisation empirique.....	6
I-2-3- Travaux chimiques et biologiques antérieurs.....	7
I-3-Généralités sur les alcaloïdes.....	10
I-3-1- Définition.....	10
I-3-2- Propriétés.....	10
I-3-3- Biogenèse.....	10
I-3-4- Les différentes classes d'alcaloïdes.....	12
I-3-5- Les intérêts biologiques.....	14
I-4-Généralités sur les antibactériens et antioxydants.....	15
I-4-1- Les antibactériens.....	15
I-4-2- Les antioxydants.....	16
I-5-Détermination structurale.....	17
I-5-1- Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	17
I-5-2- Spectrométrie de Masse (SM).....	19
Partie II- MATERIELS ET METHODES	
II-1-Matériels de laboratoire.....	22
II-2-Méthodes.....	22
II-2-1- Préparation du matériel végétal.....	22
II-2-2- Screening phytochimique.....	23
II-2-3- Extraction.....	28
II-2-3-1-Extraction par solvant de polarité croissante.....	28
II-2-3-2-Extraction par partage.....	28
II-2-3-3-Extraction par solvant spécifique.....	29

II-2-4- Fractionnement et isolement.....	31
II-2-4-1-Chromatographie sur couche mince.....	31
II-2-4-2-Chromatographie sur couche mince préparative.....	33
II-2-4-3-Chromatographie liquide à basse pression.....	34
II-2-5- Méthodologie des tests biologiques.....	36
II-2-5-1-Test microbiologique : antibactérien.....	36
II-2-5- 2-Test antioxydant.....	36
II-2-6- Détermination de structure.....	37
Partie III- RESULTATS ET DISCUSSIONS	
III-1-Résultats du criblage phytochimique.....	38
III-2-Résultats de l'extraction des alcaloïdes totaux.....	39
III-3-Résultats des CCM des alcaloïdes totaux.....	39
III-4-Résultats du test antibactérien des alcaloïdes totaux.....	40
III-5-Résultats du fractionnement des alcaloïdes totaux.....	40
III-6-Résultats des CCM des fractions F₁ à F₅.....	43
III-7-Résultats du test antibactérien des fractions F₁ à F₅.....	44
III-8-Résultats du test antioxydant des fractions F₁ à F₅.....	46
III-9-Isolement de AR-011 et AR-012.....	47
III-10-Isolement de AR-013 et AR-014.....	49
III-11-Résultats des CCM des produits isolés.....	52
III-12-Résultats du test antibactérien des produits isolés.....	53
III-13-Résultats des analyses spectrales.....	54
CONCLUSION.....	72

REFERENCES

ANNEXES

- Annexes I : Screening phytochimique
- Annexes II : Préparation des réactifs
- Annexes III : Partie microbiologie
- Annexes IV : Différentes formules chimiques
- Annexes V : Spectres RMN (1H, 13, DEPT, HMBC, HSQC, COSY) de AR-013
Spectre de masse de AR-013

LISTE DES ABREVIATIONS

°C	: degré Celsius
µg	: microgramme
µL	: microlitre
1D	: monodimensionnel en RMN
2D	: bidimensionnel en RMN
AcOEt	: acétate d'éthyle
CCM	: chromatographie sur couche mince
CCP	: chromatographie sur couche mince préparative
CH ₂ Cl ₂	: dichlorométhane
CLBP	: Chromatographie Liquide à Basse Pression
COSY	: COrrélation SpectroscopY
d	: diamètre
DEPT	: Distorsionless Enhancement by Polarisation Transfert
DPPH	: 2, 2-diphénylpicrylhydrazyle
e-	: électron
EtOH	: éthanol
FAB	: Fast Atom Bombardment
FeCl ₃	: chlorure de Fe (III)
g	: gramme
h	: hauteur
H	: heures
H ₂ O	: eau
H ₂ SO ₄	: acide sulfurique
HCl	: acide chlorhydrique
HgCl ₂	: chlorure mercurique (II)
HMBC	: Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	: Heteronuclear Single Quantum Correlation
IR	: Infrarouge
KI	: iodure de potassium
KOH	: potasse
M	: masse moléculaire
MeOH	: méthanol

Mg	: magnésium
mg	: milligramme
mL	: millilitre
mn	: minutes
Na ₂ SO ₄	: sulfate de sodium
NaCl	: chlorure de sodium
NH ₄ OH	: ammoniacque
nm	: nanomètre
ppm	: partie par million
R _f	: Référence frontale
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
SM	: Spectre de Masse
UV	: Ultraviolet
δ	: déplacement chimique en RMN
λ	: longueur d'onde

LISTE DES FIGURES

Figure-1	: Arbre de papayer.....	4
Figure-2	: Feuilles du papayer.....	5
Figure-3	: Fleurs du papayer.....	5
Figure-4	: Fruits du papayer.....	6
Figure 5	: CCM de l'extrait brut d'alcaloïdes.....	39
Figure 6	: Test antibactérien sur l'extrait brut d'alcaloïdes.....	40
Figure 7	: CCM des fractions F ₁ à F ₅ des alcaloïdes totaux.....	43
Figure 8	: Test antibactérien sur les 5 fractions.....	44
Figure 9	: Résultats du test antioxydant.....	46
Figure 10	: CCM des fractions F ₂₁ , F ₂₂ et F ₂₃	47
Figure 11	: CCM de la fraction F ₄₃	50
Figure-12	: CCM des produits isolés.....	52
Figure 13	: Tests antibactériens sur les produits isolés.....	53
Figure 14	: Corrélations ¹ H- ¹³ C HMBC observées sur le produits AR-013.....	64
Figure 15	: Corrélations ¹ H- ¹ H COSY observées sur AR-013.....	67
Figure 16	: Structure proposée pour le composé AR-013, « Structure A ».....	68
Figure 17	: Structure plane de AR-013.....	70
Figure 18	: Structure 3D de AR-013.....	71

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1 : Biogenèse des substances naturelles.....	3
Schéma 2 : Hypothèse biogénétique relative aux alcaloïdes.....	11
Schéma 3 : Protocole d'extraction par partage.....	28
Schéma 4 : Protocole d'extraction d'alcaloïdes totaux.....	30
Schéma 5 : Protocole de préfractionnement.....	42
Schéma 6: Protocole d'isolement des produits AR-011 et AR-012.....	48
Schéma 7 : Protocole d'isolement des produits AR-013 et AR-014.....	51

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	: Résumé des activités des molécules contenues dans le papayer.....	9
Tableau 2	: Criblage phytochimique.....	27
Tableau 3	: Résultats du criblage phytochimique des feuilles de <i>Carica papaya</i> L.....	38
Tableau 4	: Résultats de l'extraction des alcaloïdes totaux.....	39
Tableau-5	: Résultats du test antibactérien sur l'extrait d'alcaloïdes totaux.....	41
Tableau 6	: Résultats du préfractionnement des alcaloïdes totaux.....	42
Tableau 7	: Résultats du test antibactérien sur les fractions F ₁ à F ₅	45
Tableau 8	: Résultats du test antioxydant sur les fractions.....	46
Tableau 9	: Caractéristiques des produits isolés.....	49
Tableau 10	: Résultats du test antibactérien sur les produits isolés.....	53
Tableau 11	: Résultats des analyses en RMN ¹ H du produit AR-013.....	54
Tableau 12	: Déplacements chimiques des ¹³ C du produit AR-013.....	56
Tableau 13	: Résumé des déplacements chimiques des ¹³ C pour le spectre DEPT.....	57
Tableau 14	: Résultats des expérimentations en HSQC sur produit AR-013.....	58
Tableau 15	: Déplacements chimiques des carbones méthyléniques de AR-013.....	59
Tableau 16	: Corrélations ¹ H- ¹³ C HMBC observées pour la structure du produits AR-013....	62
Tableau 17	: Corrélations ¹ H- ¹ H COSY observées sur AR-013.....	66

INTRODUCTION

Depuis l'antiquité, dans le monde entier, les hommes apprécient les vertus des plantes qui jouent un rôle capital dans l'art de guérir. Il y a encore quelques siècles, il n'y avait que les plantes pour se soigner. Au fil des siècles, diverses pratiques ont été développées pour extraire les principes actifs des plantes [36].

De nos jours, les produits naturels sont encore une source importante pour la recherche de nouveaux composés actifs contre de nombreuses maladies. L'utilisation thérapeutique des plantes fait partie intégrante des traditions, de toutes les cultures. La valorisation médicinale dans ces pratiques passe par l'isolement et l'identification de nouvelle(s) molécule(s) en effectuant des fractionnements bioguidés par l'activité sur une cible biologique [1].

Les recherches modernes ont montré que l'action des plantes médicinales est due à quelques constituants, peu nombreux, élaborés par la plante [5]. Le travail des chimistes permettra une identification plus précise des agents actifs des plantes et une meilleure définition de leurs vertus. Les progrès de la science ont permis également un rapprochement significatif entre la pharmacopée végétale et la médecine moderne basée sur la chimiothérapie. Différents principes actifs de plantes ont ainsi pu émerger tels: la morphine et la quinine. La reproduction par synthèse de ces principes actifs a abouti à la découverte de nouveaux médicaments [28].

Dans les pays en voie de développement comme Madagascar, la population rurale utilise encore les plantes à des fins thérapeutiques [46]. A Madagascar il existe une grande biodiversité qui donne beaucoup d'avantages aux scientifiques pour développer leurs recherches. C'est à partir des théories et des pratiques observées par les tradipraticiens que les scientifiques du temps moderne tentent d'affirmer l'existence des principes actifs contenus dans une plante, d'isoler le principe actif responsable des vertus curatives et d'en déterminer leurs structures chimiques. Dans ce cadre, ce travail conduit à l'identification du ou des principe(s) actif(s).

Dans cette étude, nous avons choisi le **Papayer** connu sous le nom scientifique de *Carica papaya* L. de la famille des **Caricaceae**. C'est une plante originaire du Mexique qui a été introduite à Madagascar. Le but de notre recherche est d'isoler de(s) produit(s) actif(s) alcaloïdique(s) purs à partir des feuilles du papayer et d'en déterminer leur(s) activité(s) biologiques ainsi que leur(s) structure(s).

Notre travail se divise en trois grandes parties.

La première partie consistera aux généralités.

Dans la deuxième partie, nous procéderons à l'extraction des alcaloïdes contenus dans les feuilles de papayer, nous effectuerons l'isolement des produits biologiquement actifs et la

détermination des activités antibactérienne et anti-oxydante des différentes fractions de l'extrait d'alcaloïdes totaux.

Et dans la troisième partie, nous déterminerons les structures des produits isolés afin d'en émettre une hypothèse.

Partie I : GENERALITES

I-1-Les substances naturelles

I-2-Généralités sur *Carica papaya* L.

I-3-Généralités sur les alcaloïdes

I-4-Généralités sur les tests biologiques

I-5-Détermination structurale

I-1- LES SUBSTANCES NATURELLES

I-1-1-Définition

Ce sont des composés d'origine animale ou végétale [30].

I-1-2- Propriétés

Elles ont des propriétés diverses selon leur famille, leur genre ou leur espèce. Quelques unes de ces propriétés ont été notées : propriété anti-inflammatoire et analgésique du pinène, humlène, trans α -farnesène du Katrafay (*Cedrelopsis grevei*, Ptaeroxylacées) [41] ; propriétés anticancéreuses de Rutacéline isolée de la plante Fahavalokazo (*Zanthoxylum madagascariense* Baker, Rutaceae) [16].

I-1-3-Biogenèse

La biogenèse des substances naturelles est résumée sur le Schéma 1

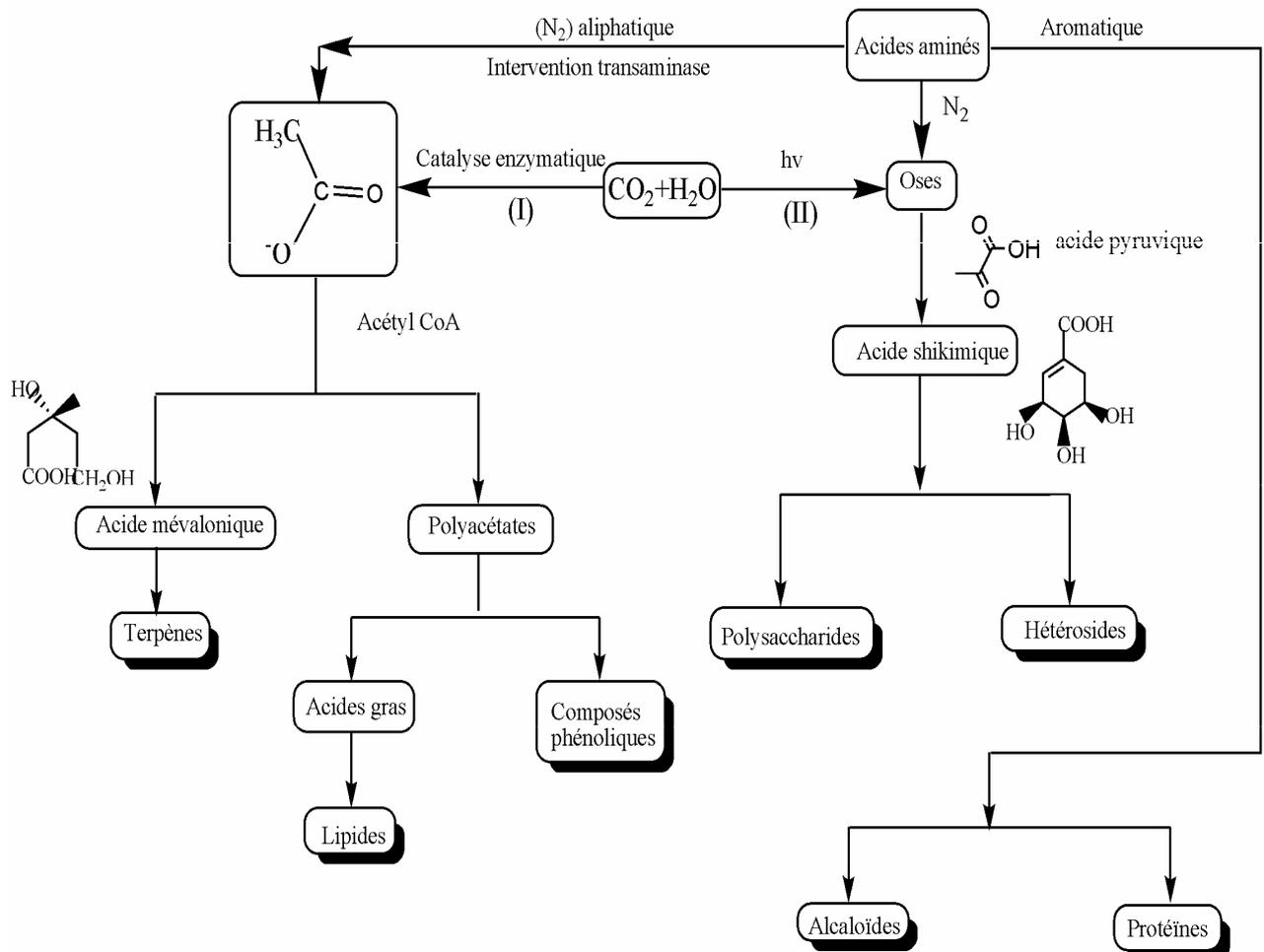


Schéma 1 : Biogenèse des substances naturelles [48]

II-2- GENERALITES SUR CARICA PAPAYA

II-2- 1- Botanique

Règne	: Plantae
Sous-règne	: Tracheobionta
Division	: Magnoliophyta
Classe	: Magnoliopsida
Sous-classe	: Dilleniidae
Ordre	: Violales
Famille	: Caricaceae
Genre	: <i>Carica</i>
Espèce	: <i>papaya</i>
Noms vernaculaires	: Papaye ou arbre à melon(en français) – Mapaza (en malgache)

C'est un arbre généralement non ramifié à tronc unique, non ligneux et fortement marqué par les cicatrices foliaires, atteignant 2 à 10m de haut [29] selon la Figure 1.



Figure 1 : Arbre de papayer [29]

Les grandes feuilles palmées possèdent sept lobes qui sont groupés en couronne terminale au faîte du tronc et sont longuement pétiolés ; sous ces feuilles pendent les papayes groupées comme en grappes [32] selon la Figure 2. Lorsque les feuilles tombent, fanées, elles laissent une cicatrice très apparente sur le tronc.



Figure 2 : Feuilles du papayer [32]

Le papayer est ordinairement un arbre dioïque, les pieds sont mâles ou femelles, mais il existe des types hermaphrodites (bisexués). Les fleurs mâles apparaissent sur de longues panicules ramifiées à l'aisselle des feuilles, tandis que les fleurs femelles naissent isolées ou par groupe de 2 ou 3 sur la partie supérieure du tronc [47]. Les fleurs du papayer sont représentées par la Figure 3.



Figure 3 : Fleurs du papayer [47]

Au point de vue génétique, il a été établi que :

- Lorsque les fleurs femelles sont fécondées par des fleurs mâles, leur descendance est constituée de 50% de pieds mâles et 50% de pieds femelles.
- Lorsque des fleurs hermaphrodites sont autofécondées, leur descendance est de 66% de pieds bisexués et 33% de pieds femelles.
- Lorsque des fleurs femelles sont fécondées par du pollen de fleurs bisexuées, leur descendance est de 50% de pieds bisexués et de 50% de pieds femelles [44].

Le fruit charnu est une baie ovoïde, de grosseur, de forme et de couleur variables selon les variétés [50], il est représenté sur la Figure 4.



Figure 4 : Fruits du papayer [50]

II-2- 2- Utilisations empiriques

Les utilisations traditionnelles du papayer sont nombreuses. On peut citer 3 propriétés principales de l'espèce: anti-ictérique (feuilles, fruits et écorces), vermifuges (graines et latex des fruits) et diurétique (racines) [18].

Le fruit est traditionnellement utilisé pour l'affinement de la silhouette lors des cures d'amincissement avec état cellulitique associé [50]. La consommation du fruit est conseillée contre la constipation [26].

Les feuilles légèrement froissées servent à attendrir la viande; il suffit d'envelopper la viande et de la laisser ainsi quelques heures au frais. La décoction de feuilles permet d'enlever les taches de sang sur les vêtements [29]. Les feuilles en cataplasme sont appliquées sur les abcès.

Le latex possède un pouvoir anthelminthique, cependant il s'avère toxique et purgatif aux doses efficaces. A l'état frais, le latex sert à traiter cors et verrues [3]. Il sert également à soigner l'acné, l'eczéma, les dartres et estompe les taches de rousseur.

Les graines contiennent également une substance anthelminthique mais leur saveur piquante en fait perdre leur usage [29].

La papaye verte écrasée est utilisée en application sur le visage, par les populations du Pacifique et d'Asie utilisent, pour "éclaircir" le teint et détruire certaines formes de taches mélaniques [26].

II-2- 3- Travaux chimiques et biologiques antérieurs

Chacun des organes ou parties de la papaye présente de multiples vertus, dont quelques unes sont rapportées dans le présent document.

La graine contient des dérivés soufrés dont l'isothiocyanate de benzyle qui est responsable de l'activité antihelminthique [24]. D'autre part, l'ingestion d'un extrait aqueux ou chloroformique des graines par le lapin provoque l'arrêt de la spermatogenèse et une stérilité complète [18].

Les racines sont très riches en sels minéraux. La diurèse provoquée par l'ingestion d'une décoction de racines n'est pas due à une action propre mais à la richesse en sels de potassium [29].

L'écorce du tronc utilisée au Cameroun dans les ictères, a fait l'objet d'une étude approfondie. L'extrait aqueux de l'écorce a été testé sur des animaux dans un état ictérique provoqué par des saponosides. Le déjaunissement a été deux fois plus rapide pour les animaux ayant reçu, par voie buccale, cet extrait de *Carica papaya*. Les substances responsables de cette action sont les sucres, en particulier le xylitol qui augmente la résistance des globules rouges à l'hémolyse [18].

Enfin, le fruit est l'élément le plus important puisque deux publications, l'une en Jamaïque, l'autre en Gambie, préconisent l'application de la pulpe sur les ulcères chroniques et sur les brûlures. L'extrait aqueux du fruit non mûr a aussi montré une activité anti-drépanocytaire *in vitro* qui serait due à la présence d'acides benzoïques. Dans le fruit on trouve des acides organiques, des carotènes, des vitamines C et E [44].

Le latex contient des enzymes protéolytiques : la papaïne et la chymopapaïne.

La papaïne, de formule brute $C_{15}H_{28}N_2O_5$, est un complexe enzymatique qui a la faculté de digérer les protéines, les pectines, et aussi certains lipides et sucres. Ce pouvoir digestif peut donc être mis à contribution pour soigner les troubles digestifs dus à la mauvaise digestion des graisses et des protéines, ainsi que ceux dus aux troubles hépatobiliaires [29].

La chymopapaïne est utilisée pour soulager ou guérir les névralgies du nerf sciatique résultant d'une compression par hernie discale [47].

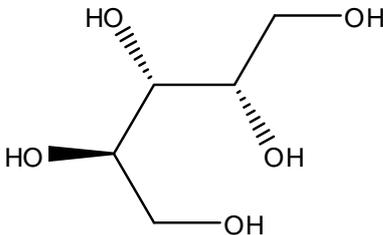
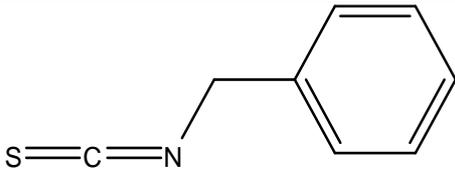
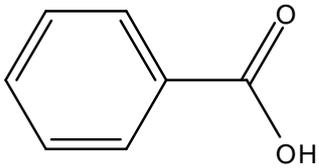
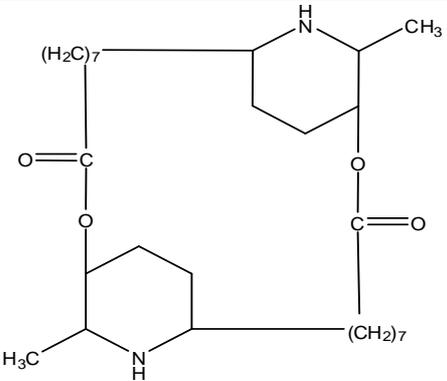
Dans les feuilles sont rencontrés des alcaloïdes dont la carpaïne.

La carpaïne, de formule brute $C_{28}H_{50}N_2O_4$ est l'un des alcaloïdes majeurs contenus dans les feuilles qui a été étudiée pour son effet cardiovasculaire [4]. La carpaïne contenue dans l'écorce a montré une activité antipaludique *in vitro* [12]. Elle est aussi connue par son activité antiparasitaire [12] ; antimicrobienne et cytotoxique *in vitro* [18]. Une étude de l'activité cytotoxique de la carpaïne sur une gamme de lignées cellulaires cancéreuses a été

confirmée et, d'une manière inattendue, il a été prouvé que certains dérivés de cette molécule sont dotés d'activité cytotoxique bien plus puissante que celle de la Carpaïne [4].

Le Tableau 1 résume les structures, ainsi que les activités respectives des molécules citées.

Tableau 1 : Résumé des activités des molécules contenues dans le papayer

Nom de la molécule	Structure	Activité
Xylitol		Augmente la résistance des globules rouges à l'hémolyse [18]
Isothiocyanate de benzyle		Possède une activité antihelminthique [24]
Acide benzoïque		Est un anti-drépanocytaire [44]
Papaïne	$C_{15}H_{28}N_2O_5$	Soigne les troubles digestifs dus à la mauvaise digestion des graisses et des protéines, ainsi que les troubles hépatobiliaires [29]
Chymopapaïne		Guéri les névralgies du nerf sciatique résultant d'une compression par hernie discale [47]
Carpaine		Possède un effet cardiovasculaire [5] et à la fois antipaludique [12], antimicrobienne [18], cytotoxique [18], antiparasitaire [12]

I-3- GENERALITES SUR LES ALCALOÏDES

I-3- 1- Définition

Ce sont des substances azotées qui ont toutes une action plus ou moins énergique sur le système nerveux central et souvent aussi sur le système nerveux végétatif [17].

I-3- 2- Propriétés

Les alcaloïdes ont en général une saveur amère et sont souvent colorés. Ils sont solides et cristallisables lorsqu'ils sont oxygénés, sinon ce sont des liquides volatiles.

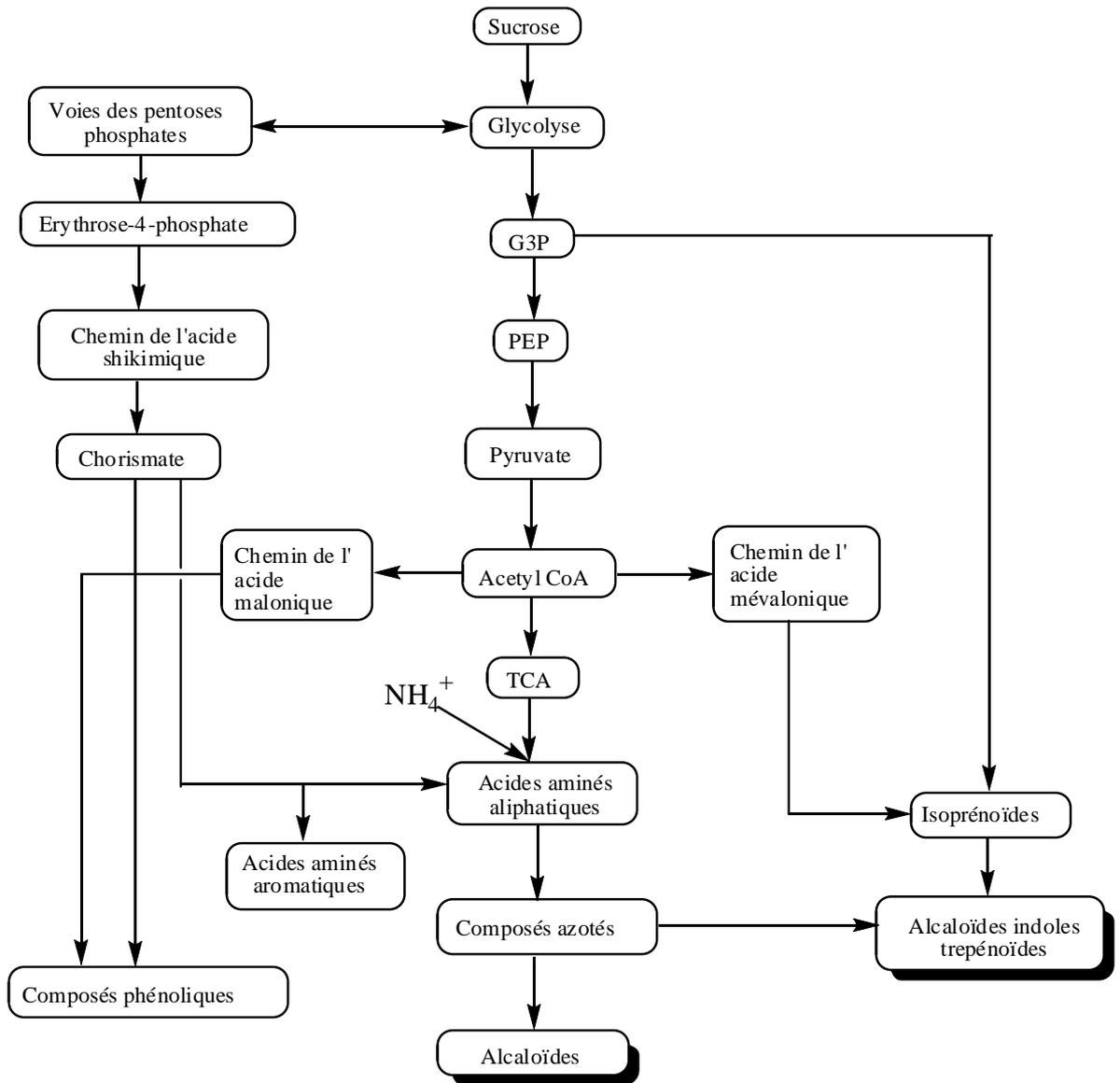
Ils sont doués de pouvoir rotatoire qui constitue un test de contrôle de pureté du point de vue physiologique, la forme lévogyre est la plus active [11].

Ces alcaloïdes basiques sont généralement peu solubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques moyennement polaires tels CH_2Cl_2 , CHCl_3 , AcOEt.

L'atome d'azote dans les alcaloïdes est sous forme d'amine secondaire ou tertiaire, dans certains cas quaternaires et l'on parle d'alcaloïdes quaternaires.

I-3- 3- Biogenèse

La plupart des alcaloïdes sont dérivés d'acides aminés tels que le tryptophane, l'ornithine, la lysine, l'acide aspartique, la phénylalanine et la tyrosine. Ces acides aminés sont décarboxylés en amines biogènes qui sont ensuite couplées à d'autres squelettes carbonyles. Le Schéma 2 montre le schéma général de la biogenèse des alcaloïdes. Ce qui a permis leur classification.



G3P: glycéraldéhyde-3-phosphate
 PEP: phosphoénolpyruvate
 CoA: coenzyme A
 TCA: cycle de l'acide citrique

Schéma 2 : Hypothèse biogénétique relative aux alcaloïdes [9]

I-3- 4- Les différentes classes d'alcaloïdes

En général, ce sont des bases primaires, secondaires ou tertiaires et parfois d'hydrate d'ammonium quaternaire. L'azote fait partie le plus souvent d'un noyau hétérocycle mais il existe des alcaloïdes où l'azote est extracyclique [27]. On distingue deux grandes classes d'alcaloïdes :

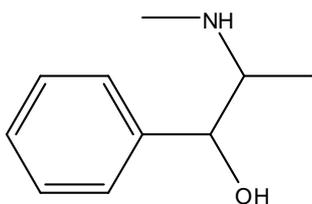
- Les alcaloïdes aliphatiques appelés Protoalcaloïdes
- Les « vrais alcaloïdes »

I-3- 4-1- Les alcaloïdes aliphatiques : Protoalcaloïdes

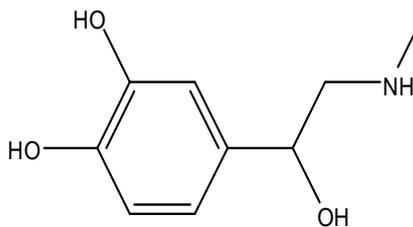
Peu de substances appartiennent à cette série. L'atome d'azote est exocyclique.

Ce sont des amines aliphatiques se comportant comme des alcaloïdes quant à leur activité biologique [27].

Exemples : éphédrine, adrénaline



Ephédrine



Adrénaline

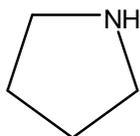
Ce sont des produits agissant sur le système nerveux [38].

I-3- 4-2- Les « vrais alcaloïdes »

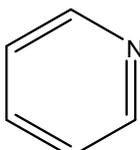
Ce sont les plus nombreux. Ils peuvent être monocycliques ou polycycliques et peuvent appartenir à des classes particulières comme les alcaloïdes indoliques ou stéroïdiques.

- Les alcaloïdes monocycliques

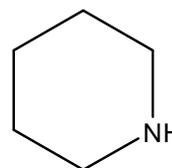
Ce sont les alcaloïdes dérivés de la pyrrolidine, de la pyridine, de la pipéridine, du pyrrole et de l'imidazole.



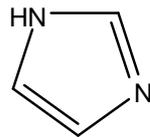
pyrrolidine



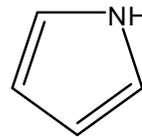
pyridine



pipéridine



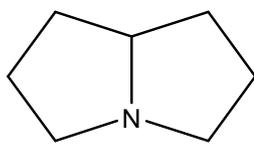
imidazole



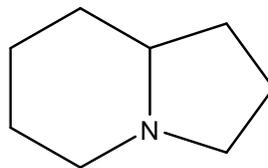
pyrrole

- Les alcaloïdes bicycliques

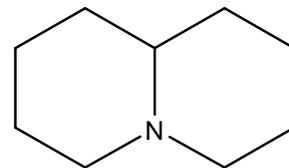
Il s'agit particulièrement des alcaloïdes extraits des peaux de grenouilles [27]. Ce sont les alcaloïdes dérivés de la pyrrolizidine, de l'indolizidine, de l'indole, de la quinolizidine, de quinoléine, de la tropane, de l'isoquinoléine et de la purine.



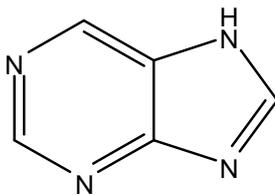
Pyrrolizidine



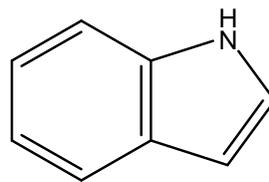
Indolizidine



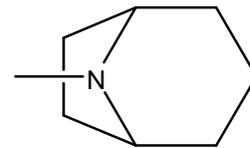
Quinolizidine



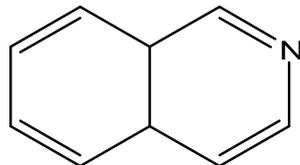
purine



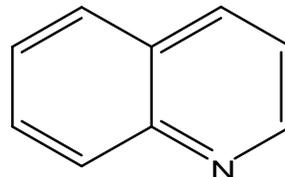
indole



tropane



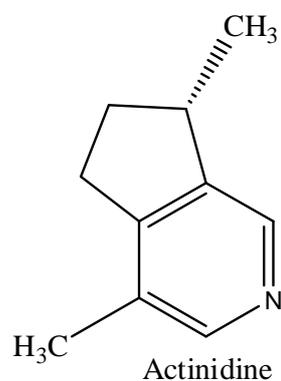
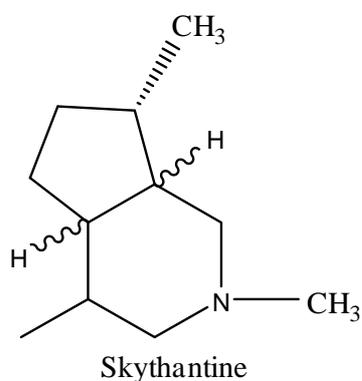
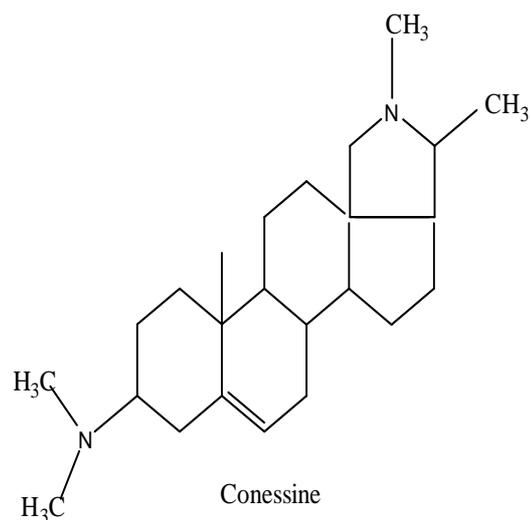
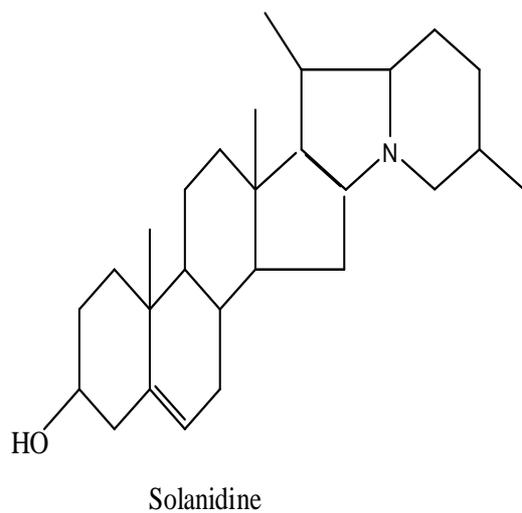
isoquinoléine



quinoléine

Il existe aussi des alcaloïdes dérivés par l'introduction d'atome d'azote dans un squelette terpénique : les alcaloïdes stéroïdiques et les alcaloïdes monoterpéniques.

Exemples : solanidine et conessine ; skythantine et actinidine.



I-3- 5- Les intérêts biologiques

Certains alcaloïdes comptent parmi les plus violents poisons que l'on connaisse [11]. Environ 20 % des espèces de plantes produisent des alcaloïdes. Les alcaloïdes ont en général une activité biologique et à ce titre, ils entrent comme principe actif dans la composition de nombreux médicaments [7].

I-4- GENERALITES SUR LES ANTIBACTERIENS ET LES ANTIOXYDANTS

I-4- 1- Les antibactériens

Ce sont des organismes de taille microscopique (de l'ordre du μm), en particulier les bactéries, les protozoaires, les virus, les champignons microscopiques (levures et champignons filamenteux) et les algues unicellulaires de petite taille. Ces microorganismes sont des êtres unicellulaires (virus, bactérie) ou pluricellulaires (champignon), ils peuvent être classés en deux grands groupes :

- Les procaryotes qui sont des organismes dont la cellule ne possède pas de noyau cellulaire (bactéries).
- Les eucaryotes qui sont des organismes dont la cellule possède de véritable noyau (parasites) [35].

Les paramètres de croissance [41]

La croissance de ces microorganismes dépend de plusieurs facteurs :

- La température,
- Le pH,
- La nature des éléments nutritifs,
- Le taux d'oxygène,
- Le potentiel d'oxydoréduction,
- L'activité de l'eau

Structure des bactéries

Le cytoplasme d'une bactérie ne contient ni organelle ni noyau cellulaire. Le chromosome de la bactérie, constitué d'ADN, est libre dans le cytoplasme. Ce cytoplasme est entouré, comme pour n'importe quelle cellule, par une membrane plasmique constituée de phospholipides. Autour de cette dernière se trouve toujours une paroi peptidique, plus ou moins épaisse. C'est l'épaisseur de la paroi qui détermine la réaction à la coloration de Gram et qui permet de classer les bactéries en **gram -** (paroi épaisse) et **gram +** (paroi fine) [45].

Milieu de culture

C'est un milieu synthétique comparable au milieu naturel d'un organisme. Ce milieu représente les paramètres de croissance. Tous les éléments nutritifs à la croissance des bactéries sont classés comme suit [41] :

- Les macroéléments : en grande quantité (en g)
- Les microéléments : en petite quantité (en mg)
- Les oligoéléments : à l'état de trace (en µg)

On distingue cinq types :

- Milieu de culture standard : pour tous les micro-organismes
- Milieu de revivification
- Milieu d'enrichissement
- Milieu sélectif
- Milieu de conservation

Le milieu peut être :

- Solide : avec agar
- Liquide : sans agar
- Semi-solide ou semi-liquide : quantité d'agar diminuée

I-4-2- Les antioxydants

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation des autres substances chimiques.

Les antioxydants sont utilisés pour empêcher les aliments gras de rancir et pour protéger les vitamines liposolubles (A, D, E et K) contre l'oxydation. Les esters d'acides galliques, le butylhydroxytoluène et le butylhydroxyanisol, appartiennent à cette catégorie [52].

Des recherches ont montré que les antioxydants synthétiques employés par l'industrie alimentaire sont également bénéfiques pour l'organisme [53].

Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamines A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E), les polyphénols et le lycopène. Ceux-ci incluent les flavonoïdes (très répandus dans les végétaux), les tanins (dans le cacao, le café, le thé, le raisin, etc.), les anthocyanes (notamment dans les fruits rouges) et les acides phénoliques (dans les céréales, les fruits et les légumes) [49].

Du point de vue chimique, un antioxydant n'est qu'un composé réducteur qui peut réagir avec un oxydant pour le neutraliser. Les antioxydants vont ainsi réduire les radicaux libres si

dangereux pour l'organisme en raison de leur pouvoir oxydant très élevé. Ainsi, les antioxydants présents dans les aliments protègent les molécules organiques de l'oxydation, par exemple les graisses ou l'ADN, et semblent jouer un rôle protecteur contre la cancérogenèse [34].

I-5- DETERMINATION STRUCTURALE

La détermination de structures est basée sur les interprétations des spectres de la RMN et la spectrométrie de masse pour notre cas. Ainsi, nous rappelons brièvement ces deux techniques utilisées.

I-5- 1- Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

I-5- 1-1- Définition

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique d'analyse chimique et structurale, non destructive, très utilisée en physique (études de matériaux), en chimie ou en biochimie (structure de molécules) et pour l'imagerie médicale. C'est une technique de spectroscopie applicable aux particules ou ensembles de particules qui ont un spin nucléaire non nul [31].

I-5- 1-2- Principe

Tous les noyaux atomiques possèdent une charge en rotation identifiée sous le nom de spin nucléaire, sont assimilables à de petits aimants et de ce fait, peuvent présenter un moment magnétique nucléaire. Certains noyaux ne sont pas observables en RMN car ils n'ont pas de spin nucléaire. Sous l'action d'un champ magnétique externe uniforme, son moment magnétique nucléaire peut prendre différentes orientations.

A ces différentes orientations correspondent différents niveaux d'énergie. Dans le cas de protons de spin $\frac{1}{2}$ il y a 2 orientations :

- l'un de basse énergie, si le moment magnétique est parallèle et de même sens que le champ extérieur,
- l'autre d'énergie plus élevée, s'ils sont de sens contraire.

La différence d'énergie ΔE qui existe entre ces deux états d'énergie est proportionnelle au champ extérieur. La transition du niveau bas au niveau haut peut avoir lieu par absorption d'une radiation de fréquence ν telle que $\Delta E = h\nu$. Lorsque la transition a lieu, on dit qu'il y a résonance du noyau [40].

I-5- 1-3- Les différents types de spectres RMN

Il existe deux grands types de spectres RMN : le spectre RMN 1D et le spectre RMN 2D.

❖ Spectres RMN 1D (monodimensionnels) [39]

Le spectre RMN 1D donne la position et l'intensité des pics de résonance pour le spin de type A ainsi que les couplages à courtes distances.

Le spectre RMN ^1H 1D présente une courbe d'intégration dont la hauteur est proportionnelle au nombre de protons sur chaque site protonique. Les pics se présentent sous forme de multiplets. Le déplacement chimique varie entre 0 à 15ppm.

Le spectre RMN ^{13}C -1D ne présente aucune courbe d'intégration et les pics sont sous forme de singulets uniquement. Le déplacement chimique est compris entre 0 et 250ppm.

❖ Spectres RMN 2D (bidimensionnels) [39]

Le spectre RMN 2D permet de montrer les corrélations plus complexes existant entre le spin A et le spin X c'est-à-dire de trouver les corrélations entre les déplacements chimiques des différents spins qui sont couplés entre eux.

Spectres de corrélation homonucléaire ^1H - ^1H

Le spectre RMN ^1H - ^1H COSY indique les couplages scalaires entre protons géminés et protons vicinaux.

Les taches relatives au spectre RMN ^1H se trouvent sur une diagonale et les corrélations distantes de 2 ou 3 liaisons sont indiquées sous forme de taches symétriques par rapport à la diagonale.

Spectres de corrélation hétéronucléaire ^1H - ^{13}C en mode inverse

- Spectre HSQC

Le spectre ^1H - ^{13}C HSQC présente des taches de corrélation se situant à l'intersection de la fréquence du proton et celle du carbone qui le porte.

- Spectre HMBC

Le spectre ^1H - ^{13}C HMBC montre des taches de corrélation entre un proton et des carbones séparés par plusieurs liaisons.

I-5-2- Spectrométrie de Masse (SM) [51]

La spectrométrie de masse repose sur l'ionisation de la molécule en phase gazeuse, la fragmentation de l'ion moléculaire et la séparation des ions selon le rapport entre la masse m et la charge z (m/z). L'ionisation de la molécule entraîne en effet une accumulation d'énergie qui, en se dissipant, peut provoquer la rupture des liaisons interatomiques et donner naissance à des fragments caractérisés par m/z .

Processus d'ionisation

La formation des ions a lieu dans la chambre d'ionisation. A cet effet, plusieurs méthodes sont utilisées. Le choix d'une méthode est fonction de l'état physique et de la volatilité du produit ainsi que de la stabilité thermique des molécules.

Le plus couramment utilisé consiste à bombarder la molécule dont la structure est inconnue, par un faisceau d'électron de haute énergie (70-2100eV ; 1eV=23 Kcal/mole). Dans ces conditions, la molécule se brise en de nombreux fragments ioniques. C'est la méthode d'ionisation appelée impact électronique (IE).

- Premier résultat : formation de l'ion moléculaire $M^{+\cdot}$ par expulsion d'un e^- (liant ou non liant).



$M^{+\cdot}$ est un ion positif à nombre impair d' e^-

\cdot désigne un radical

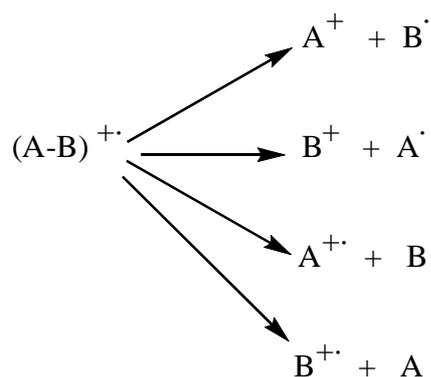
$\cdot+$ désigne un cation ou un ion radical

- Deuxième résultat : décomposition de l'ion moléculaire $M^{+\cdot}$, les réactions de fragmentation les plus probables sont celles qui ont une faible énergie d'activation et qui conduisent à la formation d'ions ou de molécules neutres, relativement stables.

L'ion moléculaire $M^{+\cdot}$ pourra donner :

- ✓ Soit un radical et un ion à nombre pair d' e^-
- ✓ Soit un nouvel ion radical et une molécule neutre

Tous les deux suivent la loi de conservation.



A^+ et B^+ sont des ions à nombre pair d'e-.

$A^{\cdot+}$ et $B^{\cdot+}$ sont des ions à nombre impair d'e-.

Ces ions positifs obtenus directement à partir de l'ion moléculaire peuvent à leur tour se fragmenter et ainsi de suite. Ils sont ensuite séparés d'après leur masse et détectés en proportion de leur nombre.

Spectre de masse

Le spectre de masse d'un composé est une représentation des abondances relatives des divers fragments ioniques en fonction de leur masse. Il peut se présenter sous 2 formes:

❖ Tableau

m/z	A.r. (%)

A.r. : abondance relative

❖ Représentation graphique

-En abscisse : m/z

-En ordonnée : intensité des pics en unités arbitraires ou abondance relative.

Le spectre de masse est constitué non seulement du pic correspondant à la masse moléculaire du composé mais également d'autres pics correspondant à la masse de divers fragments.

Types de pics [33]

- ✓ Pic moléculaire : il correspond à la molécule ionisée M^{+} , donne la masse moléculaire du produit et n'est pas toujours présent dans le spectre de masse. On l'appelle également pic parent (P). S'il est présent, il sera le dernier pic du spectre, généralement suivi des pics dus aux contributions isotopiques (pic P+1, pic P+2). Les pics de diverses abondances isotopiques sont exprimés en % du pic parent.
- ✓ Pic de base : c'est un pic au choix qui sert à normaliser le spectrogramme. D'habitude, on prend comme pic de base le pic le plus intense avec la valeur 100. Ce pic est caractéristique d'une molécule donnée. L'intensité des autres pics du spectre est définie en pourcentage du pic de base.
- ✓ Pic de réarrangement : il est généré par les ions dont au moins un atome ayant subi un déplacement intra ionique (ex : réarrangement de Mc Lafferty)
- ✓ Pic d'ion secondaire : les méthodes d'ionisation spécifiques pour les produits lourds, peu volatils ou instables donnent le pic quasi moléculaire. Celui-ci remplace le pic moléculaire, absent d'habitude dans ces spectres.

Partie II: MATÉRIELS ET MÉTHODES

II-1-Matériels de laboratoire

II-2-Méthodes

II-2-1- Préparation du matériel végétal

II-2-2- Screening phytochimique

II-2-3- Extraction

II-2-4- Fractionnement et isolement

II-2-5- Méthodologie des tests biologiques

II-2-6- Détermination de structure

II-1- MATERIELS DE LABORATOIRE

- Balance
- Balance de précision METTLER H80 de portée maximale de 160 g et de précision de 0,1mg
- Rotavapor de marque BÜCHI avec bain marie de température variant de 30 à 110°C.
- Etuve de marque MEMMERT de 20 à 220°C
- Verreries
 - Colonnes de dimension variable
 - Eprouvettes graduées
 - Ballons rodés
 - Erlenmeyers à vide
 - Entonnoirs
 - Béchers
 - Erlenmeyers
 - Tubes à essais
 - Tubes capillaires
 - Cuves chromatographiques

II-2- METHODES

II-2- 1- Préparation du matériel végétal

Les feuilles de *Carica papaya* L. ont été collectées dans un jardin de *Papayer* dans la commune rurale d'Itaosy (Région d'Analamanga) au mois d'Avril 2008, puis séchées dans un endroit non humide, à l'air libre pendant 10 jours. Ensuite, les feuilles séchées ont été broyées à l'aide d'une machine broyeuse mécanique pour les rendre en poudre et enfin pesées pour connaître la masse de la poudre obtenue.

II-2- 2- Screening phytochimique [37]

Le screening phytochimique, première étape de l'étude chimique, a été effectué pour déterminer de façon qualitative les principales familles de composés chimiques de produits naturels qui peuvent se trouver dans l'échantillon de la plante. Il s'agit de faire l'inventaire des grandes classes de composés chimiques présents dans cette plante telles que les alcaloïdes, les flavonoïdes et leucoanthocyanes, les tanins et polyphénols, les quinones, les stéroïdes et triterpénoïdes, les saponosides et polysaccharides en utilisant des réactifs appropriés à chaque test.

Une fois le matériel végétal collecté et déterminé, le chercheur dispose de toute une batterie de tests pour détecter de façon qualitative les principales familles de produits naturels qui peuvent se trouver dans l'échantillon : La détection de ces familles constitue le screening ou criblage phytochimique. C'est une étude basée soit :

- 1) sur la formation de complexes insolubles : en utilisant des réactions de précipitation
- 2) sur la formation de complexes colorés : réaction de coloration.

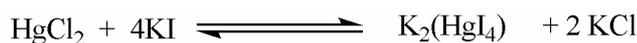
La coloration observée est due généralement à la formation d'une conjugaison ou d'une insaturation dans la molécule. Dans les tests de caractérisation on provoque cette insaturation par utilisation d'un réactif approprié.

Les tests chimiques de coloration ou de précipitation sont effectués sur les extraits des organes des plantes étudiées (Méthodes de FONG H. *et al.*) [6].

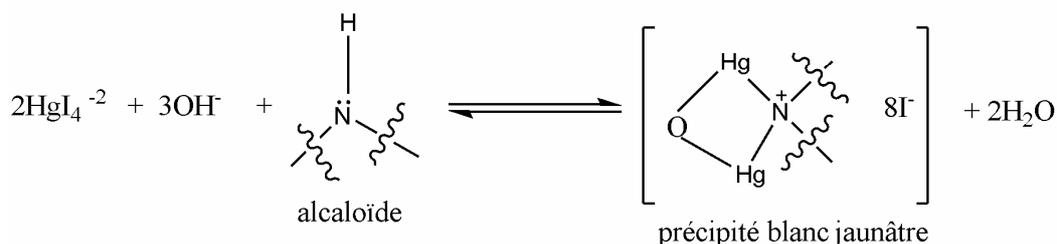
II-2- 2-1- Criblage des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques d'origine naturelle, le plus souvent végétale, azotés, plus ou moins basiques, de distribution restreinte et doués, à faible dose, de propriété pharmacologique marquée.

Tous les alcaloïdes présentent des propriétés alcalines plus ou moins marquées et forment des sels avec les acides (sulfates, chlorhydrates...). Ils peuvent aussi précipiter les hydrates de métaux lourds tels que le bismuth, le mercure, le tungstène, l'iode, leur permettant ainsi d'adopter une structure d'ammonium quaternaire :



tetraiodomercurate
de potassium



Les alcaloïdes sont détectés par des réactions de précipitation.

Les alcaloïdes peuvent être caractérisés par les réactifs généraux suivants :

- réactif au mercuri-iodure de potassium (Valser Mayer): précipité blanc jaunâtre
- réactif à l'iodobismuthite de potassium (Dragendorff): précipité orange
- réactif à l'iodo-ioduré (Wagner): précipité rouge orangé

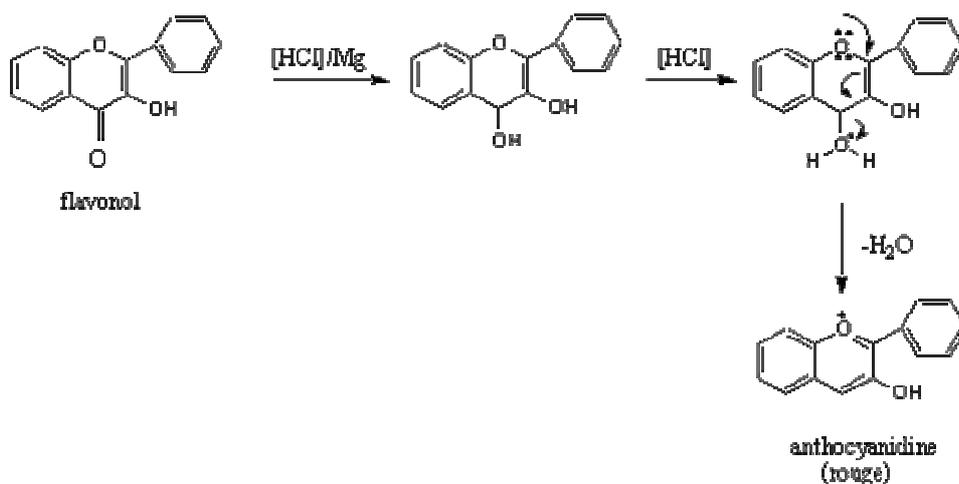
II-2- 2-2- Criblage des flavonoïdes et des leucoanthocyanes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques dont beaucoup sont les pigments responsables de la coloration de nombreuses fleurs et de certains fruits.

Ils peuvent être caractérisés par les réactions suivantes:

- Test à la cyanidine

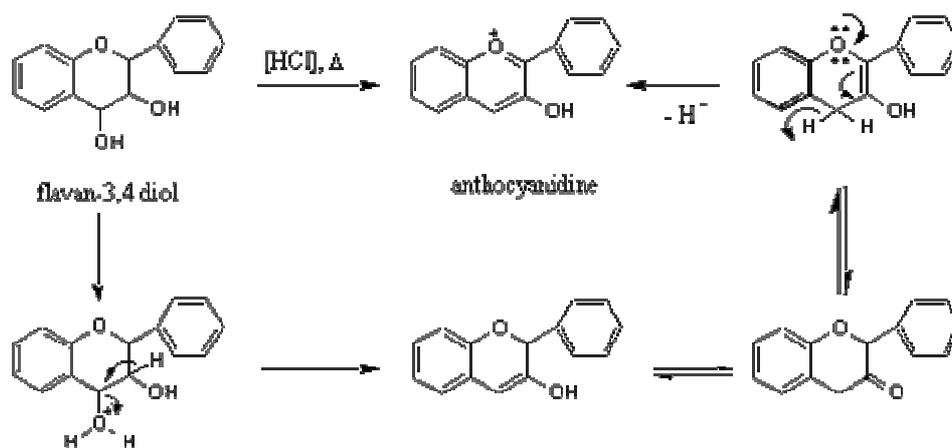
Les composés flavoniques sont réduits en présence d'un acide concentré et de magnésium. Après élimination d'une molécule d'eau, le produit de réduction conduit à des anthocyanidines de couleur rouge.



- Test de Wilstater : HCl concentré en présence de trois ou quatre tournures de magnésium. Le changement de coloration est observé : virage au rouge (flavones), virage au rouge pourpre (flavonols), rouge violacée (flavanones et flavanols)

- Test de Wilstater modifié : même protocole expérimental mais ajouter 1ml d'eau distillée et 1ml d'alcool isoamylique. C'est la coloration de la phase supérieure qui est alors notée.
- Test de Bate-Smith : additionner de HCl concentré (0,5ml) et porter au bain marie trente minutes. L'apparition d'une coloration rouge dénote la présence de leucoanthocyanes.

Les leucoanthocyanes ou proanthocyanidols monomères qui sont des dérivés du flavan -3,4-diol se transforment en anthocyanidols correspondants par traitement acide.



II-2- 2-3- Criblage des tanins et polyphénols

Les tanins sont des composés phénoliques hydrosolubles qui présentent, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines.

Le chlorure ferrique ($FeCl_3$) en solution diluée forme avec les phénols des colorations variant du bleu au violet, qui sont dues à la formation de complexes d'oxydation.

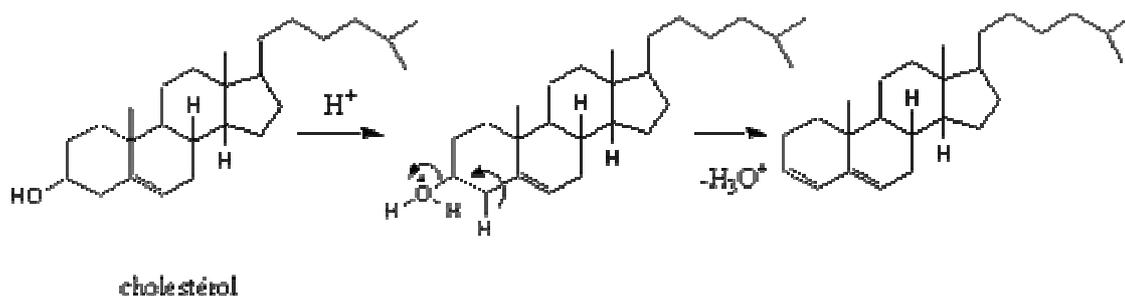
II-2- 2-4- Criblage des stérols insaturés et des triterpènes

Les stérols sont des lipides dérivant du noyau cyclopentanophénanthrénique. Les différents types de stérols se distinguent selon le nombre et la position d'insaturation et/ou de chaînes latérales.

Les stérols et triterpènes peuvent être caractérisés par les réactions suivantes :

- Test de Salkowski : dans ce test on met en évidence les stérols insaturés par une réaction qui provoque l'apparition de coloration rouge: l'addition d'acide sulfurique concentrée entraîne l'élimination d'une molécule d'eau et conduit à la formation d'insaturation supplémentaire.

Exemple :



- Test de Liebermann-Burchard : le groupement OH en 3 est protégé par addition d'anhydride acétique. Cette réaction est suivie soit d'une isomérisation soit d'une transposition moléculaire, ce qui provoque le changement de coloration.
 - une coloration bleu-vert indique la présence de stéroïdes
 - une coloration rouge-violet à rose dénote la présence de triterpènes.
- Test de Badjet-Kedde : L'addition d'acide picrique entraîne l'ouverture du cycle lactonique insaturé puis formation de complexe entre l'hydrocarbure et l'acide picrique.

L'apparition d'une coloration orange est due aux stéroïdes lactoniques.

II-2- 2- 5- Criblage des saponides

Ce sont des hétérosides à génine stéroïdique ou triterpénoïdique. Les sapogénines stéroïdiques sont généralement caractéristiques des Monocotylédones tandis que les sapogénines triterpéniques sont largement distribués chez les Dicotylédones.

Ils sont caractérisés par des propriétés physiques et physiologiques telles que:

- pouvoir moussant en solution aqueuse, dû à la fois à la partie osidique hydrosoluble et à la génine hydrophobe.
- hémolytique
- toxique pour les animaux à sang froid.

Ils peuvent être soumis au test de mousse : introduire 10mg de poudre végétale dans un tube à essai, additionner 10ml d'eau distillée, agiter le mélange vigoureusement pendant trente secondes, placer alors le tube verticalement pendant trente minutes. Au bout de cette période, si la mousse mesure 3cm et plus, la drogue contient des saponines.

Le criblage phytochimique est résumé dans le Tableau-2.

Tableau 2 : Criblage phytochimique

Famille Chimique	Test	Réactif	Résultats attendus
Alcaloïdes	Wagner	I ₂ /IK	Précipité rouge orangé
	Mayer	HgCl ₂ /IK	Précipité blanc
	Dragendorff	Bi(NO ₃) ₃ /IK	Précipité jaune orangé
Stéroïdes- Triterpènes	Liebermann Burschard	3 à 4 gouttes d'anhydride acétique + 3 à 4 gouttes de H ₂ SO ₄ concentré	Coloration pourpre : triterpènes Bleu vert ou violet : stéroïdes
		1 à 2ml de MeOH + 3gouttes de KOH 1N + quelques grains d'acide	Coloration orange
	Badjet Kedde	1ml de KOH + 3gouttes d'acide 3,5-dinitrobenzoïque	Coloration violette
Flavonoïdes- Leucoanthocyanes	Wilstater	Tournure de Mg + quelques gouttes de HCl concentré	Coloration rouge : flavones Rouge à pourpre : flavonols Rouge violacée : flavanones
	Bate Smith	Quelques gouttes de HCl concentré	Rouge violacée : leucoanthocyanes
		Quelques gouttes de NH ₄ OH	Intensification de la couleur
Tanins et Polyphénols		4 à 5gouttes de gélatine salée	Précipité
		4 à 5gouttes de FeCl ₃ 10% dans MeOH	Précipité bleu-vert : tanin catéchique
Coumarines		Quelques gouttes de NH ₄ OH concentré	Pas de fluorescence sous la lumière UV
Saponines		3ml d'eau distillée + agitation vigoureuse	Hauteur de la mousse < 1

II-2-3- Méthode d'extraction

Il n'existe que très peu de méthodes générales d'extraction de substances naturelles. Chaque équipe de chercheurs utilise sa propre technique pour isoler un produit naturel.

II-2-3-1- Extraction par solvant de polarité croissante

La similitude entre le solvant d'extraction et les composés existant dans une plante joue un rôle important dans l'extraction. Le solvant tend à en extraire les composés ayant une polarité voisine à la sienne. Par exemple, les solvants apolaires comme l'éther de pétrole extrait les produits apolaires tels que les acides gras ; les moyennement polaires comme le CH_2Cl_2 extrait les alcaloïdes et les solvants polaires comme le méthanol pour les produits polaires tels que les flavonoïdes [14].

II-2-3-2- Extraction par partage

Méthode de BLIGH et DYER est consignée dans le Schéma 3.

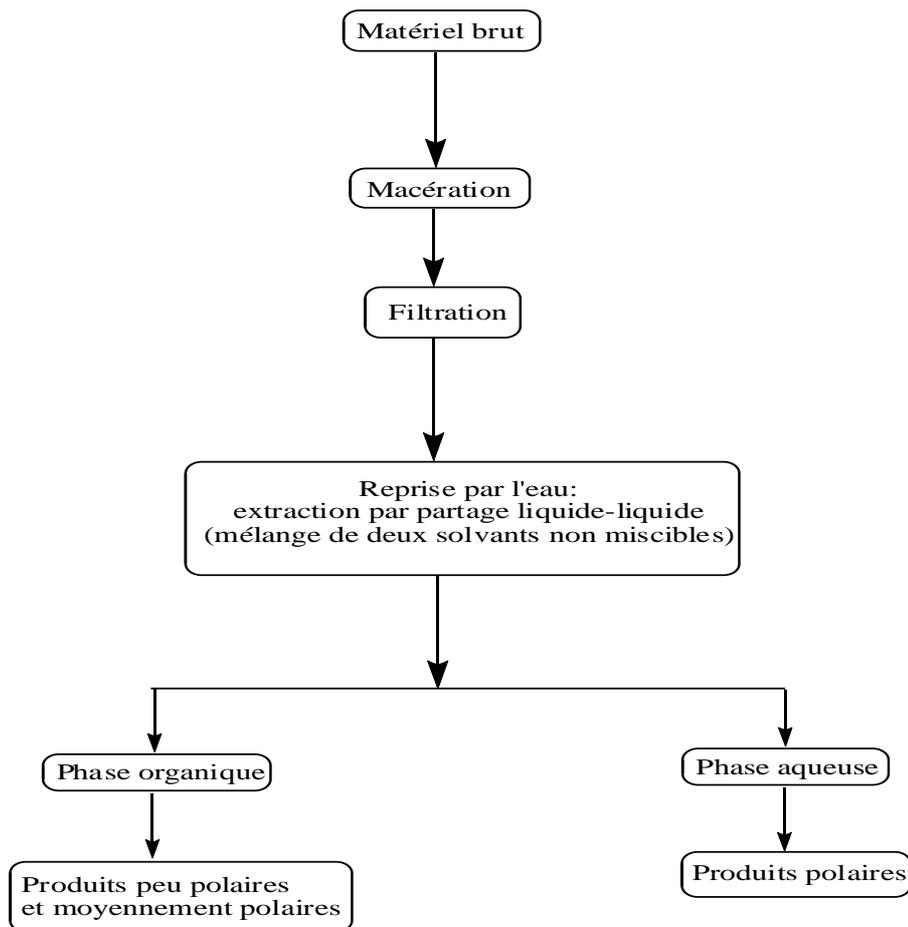


Schéma 3 : Protocole d'extraction par partage [2]

II-2-3-3- Extraction par solvant spécifique

La recherche concernant les familles chimiques des alcaloïdes est une extraction spécifique, en ce sens que l'extrait obtenu ne contient plus que des alcaloïdes bruts et cela facilite la purification des produits.

Extraction d'alcaloïdes totaux

La poudre de feuilles de plante, de masse (500 ± 1) g a été laissée macérer dans (1000.0 ± 0.1) mL de mélange binaire EtOH/H₂O (80/20) pendant 48 heures. L'opération a été répétée deux fois. La solution hydroalcoolique a été filtrée sur l'entonnoir Büchner, puis évaporée sous pression réduite. L'extrait hydroalcoolique a été repris avec (500.1 ± 0.1) mL d'éther de pétrole pour éliminer les acides gras, les chlorophylles et les autres pigments. Ensuite, l'extrait dégraissé a été acidifié par une solution aqueuse à 2% d'acide chlorhydrique. L'alcaloïde sous forme de sel passe dans l'eau acidulée, puis alcalinisée par l'ammoniaque à 33% jusqu'à un pH= 10. L'extraction a été réalisée avec le dichlorométhane jusqu'à épuisement total des alcaloïdes, contrôlée par le réactif de Mayer. Les solutions dichlorométhaniques ont été réunies, lavées avec l'eau et séchées sur sulfate de sodium anhydre, puis concentrées sous pression réduite. Un extrait d'alcaloïdes totaux a été obtenu dont le protocole est donné dans le Schéma 4.

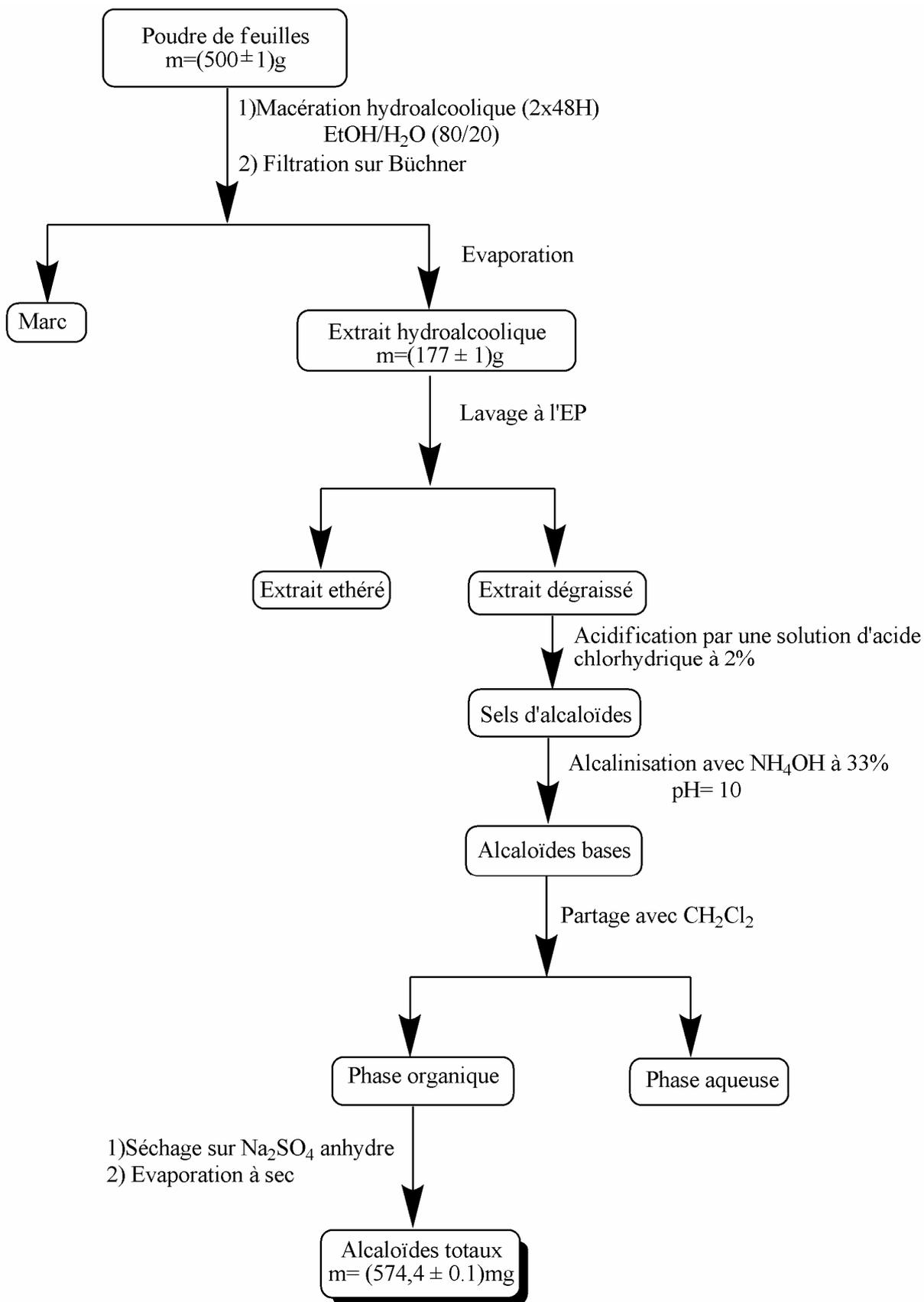


Schéma 4 : Protocole d'extraction d'alcaloïdes totaux

II-2-4- Fractionnement et isolement

Le fractionnement et l'isolement de divers produits s'avèrent longs et difficiles car tous les produits autres que les produits peu polaires se trouvent dans une seule phase. On utilise généralement la technique chromatographique pour toutes les substances d'origine marine, animale ou végétale [10].

La chromatographie est une méthode physique de séparation. Elle est basée sur les différences d'affinité que peuvent présenter deux ou plusieurs composés pour deux phases différentes dont l'une stationnaire ou fixe ou adsorbant dans le cas de la chromatographie d'adsorption, l'autre mobile nommée éluant [23].

II-2-4-1- Chromatographie sur couche mince (CCM) [19]

C'est une chromatographie d'adsorption solide-liquide. L'éluant est constitué soit par un solvant unique, soit par un mélange de solvants, il progresse par capillarité le long d'un adsorbant solide, finement divisé, fixé au préalable sur une matière plastique, ou une plaque de verre ou une feuille d'aluminium.

Les composants du mélange sont élués à des vitesses différentes selon leur adsorption derrière le front du solvant. En général, les composants de faible polarité sont entraînés plus vite que les constituants polaires.

Chaque composant sera déterminé par sa référence frontale, notée R_f , dans un système chromatographique déterminé.

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par la substance}}{\text{distance parcourue par le solvant}}$$

La CCM est la méthode chromatographique la plus utilisée pour les raisons suivantes :

- simplicité du matériel utilisé
- rapidité pour la détermination plus ou moins approximative du nombre des constituants d'un mélange
- détermination de la pureté d'une substance
- identification d'une substance inconnue par comparaison de R_f avec celle de composés connus
- recherche des solvants d'éluion utilisés pour la séparation en chromatographie liquide à basse pression

Préparation de la cuve chromatographique

Environ 10mL du mélange de solvants ont été introduits dans la cuve chromatographique. Puis, la cuve a été bien fermée pour que le milieu soit saturé de vapeur de solvant.

Dépôt de l'échantillon

Les échantillons à chromatographier ont été dissous dans un solvant moyennement polaire. A l'aide d'un tube capillaire, environ 0,5 μ L de l'extrait a été déposé en un point situé à 1cm de l'extrémité inférieure de la plaque CCM. Le diamètre de la tache ne doit pas dépasser 3mm on laisse 1cm entre le premier dépôt et le bord de la plaque ainsi qu'entre chaque dépôt, puis le dépôt est laissé sécher ; ensuite une seconde application a été faite. Enfin, une marque a été déposée en dessous de chaque dépôt.

L'extrait d'alcaloïdes totaux ainsi que les différentes fractions F₁, F₂, F₃, F₄ et F₅ ont été chromatographiés sur couche mince de silice.

Développement du chromatogramme

La plaque CCM a été placée dans la cuve chromatographique en position verticale et la cuve a été fermée. Lorsque le front du solvant se trouve à environ 1cm de l'extrémité supérieure de la plaque, la plaque a été retirée et le front du solvant a été marqué à l'aide d'un crayon. Puis, la plaque a été séchée avec un séchoir.

Révélation

Les taches invisibles doivent être révélées.

L'observation de la plaque aux rayonnements UV de longueurs d'onde $\lambda = 254\text{nm}$ et $\lambda = 365\text{nm}$ ainsi que la pulvérisation de celle-ci à l'aide du réactif de Dragendorff feront apparaître l'emplacement des constituants [13].

II-2-4-2- Chromatographie sur couche mince préparative [15]

C'est un aspect très particulier de la CCM qui couvre une large gamme d'applications, depuis la séparation d'un échantillon pour identification spectroscopique, jusqu'à la préparation d'un composé pur à partir de 1g de mélange.

Préparation de la cuve chromatographique

Environ 100mL du mélange de solvant a été introduit dans la cuve chromatographique. Puis, la cuve a été bien fermée pour en avoir une bonne saturation.

Dépôt de l'échantillon

L'échantillon a été déposé en bande large à l'aide d'un tube capillaire à 1cm de l'extrémité inférieure de la plaque. Le dépôt a été laissé sécher, ensuite une seconde application a été faite.

Développement du chromatogramme

Le développement du chromatogramme fractionne l'échantillon en bandes parallèles.

La plaque chromatographique a été placée dans la cuve chromatographique en position verticale puis fermée. Lorsque le front du solvant se trouve à environ 1cm de l'extrémité supérieure de la plaque laquelle a été retirée, il a été marqué à l'aide d'un crayon. Ensuite, la plaque a été séchée avec un séchoir, puis un deuxième développement a été fait (deux migrations).

Grattage de la silice

Les bandes révélées par la lumière UV ont été délimitées au crayon puis grattées.

Récupération du produit

La récupération du produit a été faite par extraction avec un solvant adéquat pendant 2 à 4 heures. Ensuite, une filtration simple a été effectuée. Après évaporation du filtrat la masse du composé désiré a été obtenue.

II-2-4-3- Chromatographie Liquide à Basse Pression (CLBP) [42]

Alors que les autres méthodes chromatographiques sont habituellement employées pour l'analyse et la séparation de très faibles quantités de produits, la chromatographie liquide à basse pression peut être une méthode préparative; elle permet, en effet, la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre quelques grammes.

C'est une chromatographie d'adsorption solide-liquide. L'éluant s'écoule en continu dans la colonne remplie d'adsorbant solide finement divisé. Ceci entraîne l'adsorption et la désorption des molécules d'un mélange déposé à la surface supérieure de l'adsorbant. Les molécules sont éluées par gravité vers la partie inférieure de la colonne à des vitesses différentes selon leur solubilité dans l'éluant et leur affinité pour l'adsorbant. Plus l'affinité du soluté pour l'adsorbant est faible, plus l'éluion est rapide et inversement. Il existe deux modes de développement de la colonne :

- Analyse par gradient d'éluion, si on fait varier le système d'éluant
- Analyse par éluion isocratique dans le cas d'un seul système de solvant

La phase solide, le plus souvent l'alumine ou la silice, remplit une colonne de longueur et de section variables; l'échantillon, en solution concentrée, a été déposé en haut de la colonne et la séparation des composants résulte de l'écoulement continu d'un éluant, traversant la colonne par gravité.

Plusieurs fractionnements sur colonne ont été effectués jusqu'à l'isolement des produits purs.

Le fractionnement des alcaloïdes totaux a été fait sur une colonne chromatographique ouverte de gel de silice 35 à 60 mesh ou gel de Sephadex LH-20. Les choix des conditions d'éluion, suivis de la séparation et des rassemblements finaux des fractions ont été basés sur les analyses de la CCM.

Préparation de la colonne : remplissage par voie humide

Le remplissage de la colonne par l'adsorbant a été fait par voie humide. La phase stationnaire (gel de silice ou gel de Sephadex LH-20) a été mise en suspension dans le moins polaire des solvants d'éluion et agitée jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène. Puis, la verser dans la colonne.

Dépôt de l'échantillon

L'extrait à chromatographier a été dissous en solution dans un petit volume de dichlorométhane. Le mélange a été ensuite versé soigneusement au sommet de la colonne.

Elution

L'éluant a été introduit manuellement par écoulement continu à l'aide d'un entonnoir placé au dessus de la colonne. Pour une élution en mode gradient de solvant, le solvant utilisé en premier est le moins polaire.

Recueil des fractions

Les fractions ont été recueillies avec des tubes à essais ou des erlenmeyers.

L'extrait d'alcaloïdes totaux, les fractions F₂ et F₄ ont été chromatographiés sur colonne.

Afin d'isoler le ou les principes alcaloïdes responsables de l'activité antibactérienne et antioxydant dans les feuilles du papayer, le fractionnement bioguidé des alcaloïdes totaux des feuilles du papayer a été réalisé au cours de ce travail.

II-2-5- METHODOLOGIE DES TESTS BIOLOGIQUES

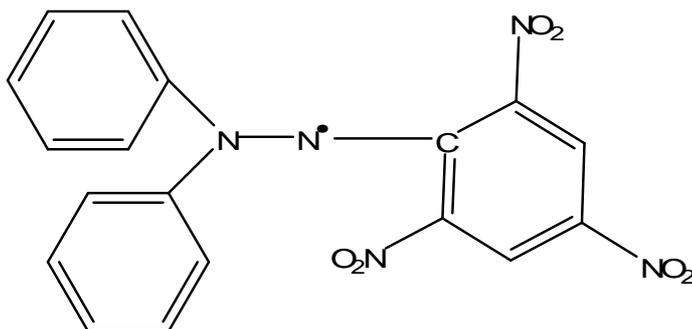
II-2-4-1- Test microbiologique antibactérien

La méthode utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne de(s) produit(s) est la méthode de bio-autographie. Cette méthode consiste à effectuer les tests sur le produit développé sur une plaque de CCM. Une culture en nappe a été faite sur un milieu solide Mueller Hinton gélosé (MHA) puis déposée sur les plaques et incubée à 37°C pendant 24H. Ensuite, les plaques ont été pulvérisées avec un colorant vital comme révélateur. Après une incubation de 2H, l'observation des zones claires ou zone d'inhibition montre que le produit est actif.

Les souches bactériologiques utilisées sont des souches à gram+ : *Staphylococcus aureus* (SA), *Bacillus subtilis* (BS), *Streptococcus faecalis* (SF) ; des souches à gram- : *Salmonella typhii* (ST), *Escherichia coli* (EC), *Citrobacter freundii* (CF), *Pseudomonas aeruginosa* (PA) et un champignon *Candida albicans* (CA).

II-2-4-2- Test antioxydant

L'activité antioxydant des extraits et des composés purs a été évaluée sur des plaques de Silice développées puis révélées par le 2,2-diphénylpicrylhydrazyle (DPPH). Ce réactif est un radical libre stable qui, réduit par des capteurs de radicaux, passe du pourpre au jaune, révélant ainsi les composés avec une activité antioxydant [53].



2,2-diphénylpicrylhydrazyle

100 µg des échantillons ou 5 µg des produits purs ont été déposés sur des plaques Silica gel 60 F₂₅₄ sur feuille d'aluminium (Merck), et celles-ci ont été développées dans le système d'éluant approprié : CH₂Cl₂/ MeOH (95/5) avec 3 gouttes de NH₄OH. Les plaques ont ensuite été révélées par une solution méthanolique de DDPH à 2 mg/ml.

II-2-6- DETERMINATION DE STRUCTURE

Des spectres RMN et spectre de masse ont été enregistrés sur le produit isolé envoyé au Département de Chimie de Glasgow Ecosse.

Partie III: RESULTATS ET DISCUSSIONS

III-1-Résultats du criblage phytochimique

III-2-Résultats de l'extraction des alcaloïdes totaux

III-3-Résultats CCM des alcaloïdes totaux

III-4-Résultats du test antibactérien des alcaloïdes totaux

III-5-Résultats du fractionnement des alcaloïdes totaux

III-6-Résultats CCM des fractions F₁ à F₅

III-7-Résultats du test antibactérien des fractions F₁ à F₅

III-8-Résultats du test antioxydant des fractions F₁ à F₅

III-9-Isolement de AR-011 et AR-012

III-10-Isolement de AR-013 et AR-014

III-11-Résultats des CCM des produits isolés

III-12-Résultats du test antibactérien des produits isolés

III-13-Résultats des spectres du produit AR-013

III-1- RESULTATS DU CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE

Les résultats du criblage phytochimique donnés dans le Tableau 3 ont montré la présence des alcaloïdes, des stéroïdes, des tanins et l'absence de coumarines, de saponines dans les feuilles de *Carica papaya* L.

Tableau 3 : Résultats du criblage phytochimique des feuilles de *Carica papaya* L.

Famille Chimique	Test	Observation	Conclusion
Alcaloïdes	Wagner	Précipité brun orangé	Présence d'alcaloïdes
	Mayer	Précipité blanc cassé	
	Dragendorff	Précipité jaune orangé	
Stéroïdes- Triterpènes	Liebermann Burchard	Coloration pourpre	Présence de triterpènes
		Pas de coloration orange	-
		Pas de coloration violette	-
Flavonoïdes- Leucoanthocyanes	Wilstater	Pas de coloration rouge ou orangée	-
	Bate Smith	Pas de coloration rouge violacée	-
		Intensification de la couleur	Présence de flavonoïdes
Tanins et Polyphénols		Pas de précipité	-
		Précipité bleu-vert	Présence de tanins catéchiques
Coumarines		Pas de fluorescence à 365nm	-
Saponines		Hauteur de la mousse < 1	-

(-) : absence

III-2- RESULTATS DE L'EXTRACTION DES ALCALOÏDES TOTAUX

Les résultats de l'extraction des alcaloïdes totaux à partir de (500 ± 1) g de poudre de feuilles de papayer sont consignés dans le Tableau 4.

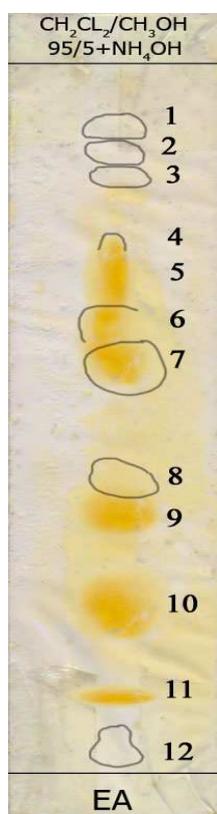
Tableau 4 : Résultats de l'extraction des alcaloïdes totaux

Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
Extrait hydroalcoolique	(177 ± 1)	35.52
Alcaloïdes totaux	(0.5744 ± 0.0001)	0.12

III-3- RESULTATS DES CCM DES ALCALOÏDES TOTAUX

Une étude préalable sur CCM a été faite pour déterminer le système de solvant adéquat pour la séparation en chromatographie sur colonne (CLBP) et aussi utilisé sur les tests biologiques.

Les résultats ont donné une meilleure séparation avec le système $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95/5) avec 3 gouttes d'ammoniaque en présentant plusieurs taches de couleur rouge-orangée après révélation au réactif de Dragendorff selon le profil chromatographique donné par la Figure 5.

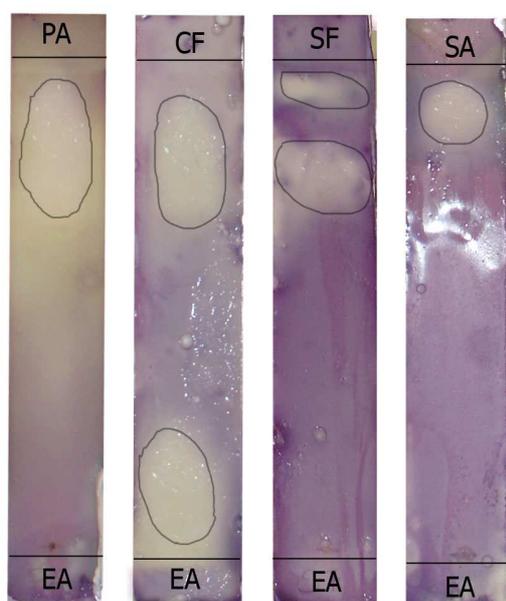


Système d'éluant	: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ [95/5] avec 3 gouttes d'ammoniaque
Phase stationnaire	: gel de silice 60
Révéléateur	: réactif de Dragendorff
Observation	: coloration rouge-orangée

Figure 5 : CCM de l'extrait brut d'alcaloïdes

III-4- RESULTATS DU TEST ANTIBACTERIEN DES ALCALOÏDES TOTAUX

Afin de connaître l'activité biologique des alcaloïdes totaux des feuilles, des plaques CCM développées de l'extrait brut d'alcaloïdes totaux ont été soumises au test biologique antibactérien sur les différentes souches de bactéries existant dans le Laboratoire de bactériologie de l'IMRA. Après incubation, les plaques présentant une zone d'inhibition sur des souches à gram+ : *Streptococcus faecalis* (SF), *Staphylococcus aureus* (SA) et à gram- : *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Citrobacter freundii* (CF) sont représentés par la Figure 6 et résumé dans le Tableau 5.



Système d'éluant	: CH ₂ Cl ₂ /MeOH [95/5] + 3 gouttes d'ammoniaque
Phase stationnaire	: gel de silice 60
Révéléateur	: colorant vital
Observation	: zone claire

Figure 6 : Test antibactérien sur l'extrait brut d'alcaloïdes des feuilles de *Carica papaya* L.

Tableau-5 : Résultats du test antibactérien sur l'extrait d'alcaloïdes totaux

SOUCHES			RESULTATS
			EXTRAIT D'ALCALOIDES
BACTERIES	Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	+
		<i>Bacillus subtilis</i>	-
		<i>Streptococcus faecalis</i>	+
	Gram -	<i>Salmonella typhi</i>	-
		<i>Escherichia coli</i>	-
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+
		<i>Citrobacter freundii</i>	+
CHAMPIGNON		<i>Candida albicans</i>	-

III-5- RESULTATS DU PREFRACTIONNEMENT DES ALCALOÏDES TOTAUX

(574,5 ± 0.1) mg des alcaloïdes totaux ont été fractionnés sur colonne de Sephadex LH-20 par élution isocratique en utilisant l'éluant CH₂Cl₂/MeOH [95/5] et 3 gouttes d'ammoniaque.

Colonne de verre : h= 60cm ; d= 1cm

Phase stationnaire : Gel de Sephadex LH-20

Echantillon : (574.4 ± 0.1) mg d'alcaloïdes totaux en dépôt liquide

Les fractions de même R_f ont été rassemblées ainsi l'extrait d'alcaloïdes totaux a donné 5 fractions rassemblées notées F₁ à F₅. Les résultats du préfractionnement sont indiqués par le Schéma 5 et résumé dans le Tableau 6.

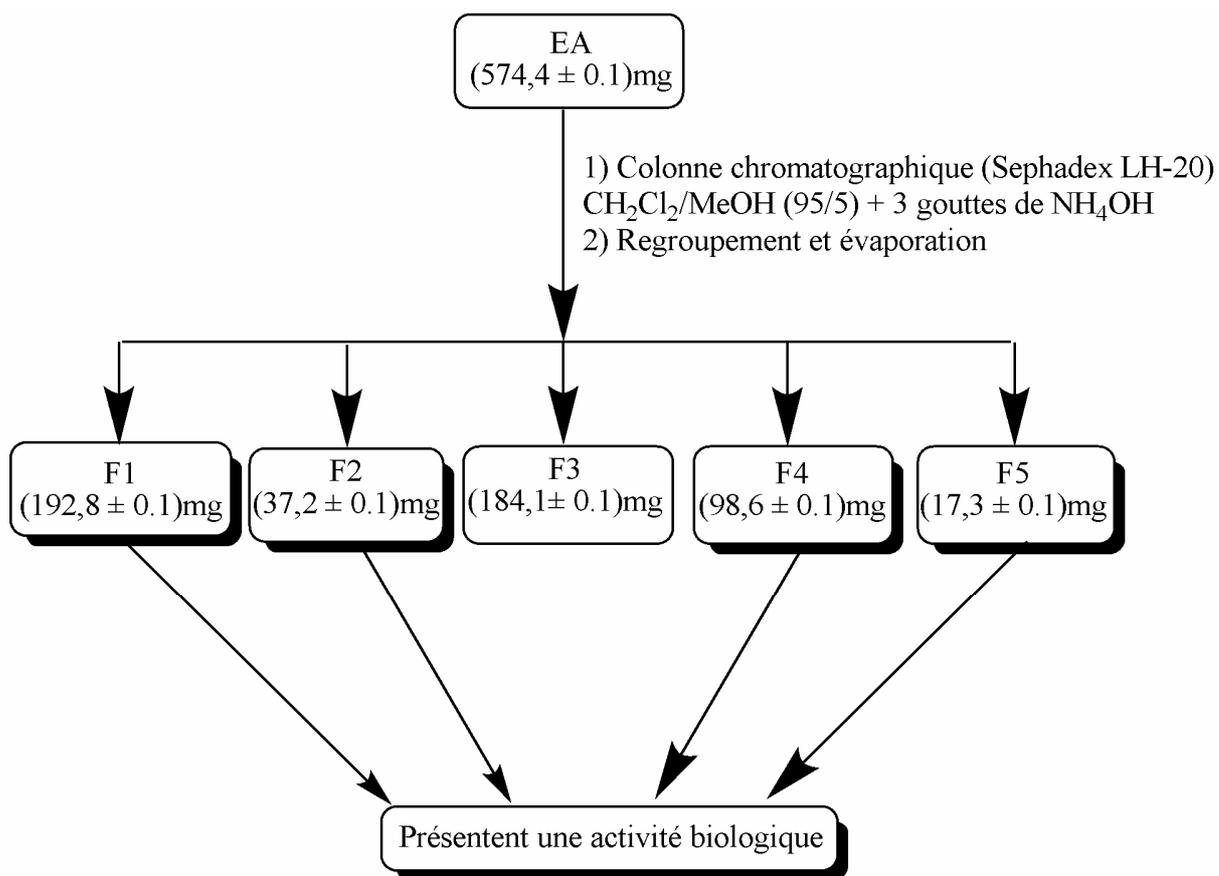


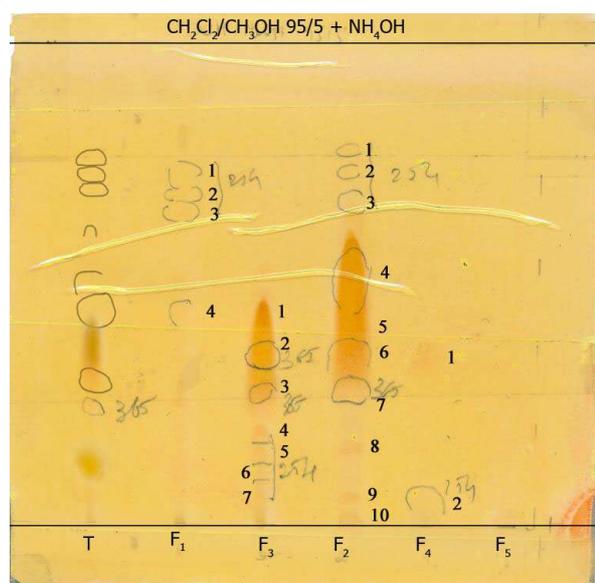
Schéma 5 : Protocole de préfractionnement

Tableau 6 : Résultats du préfractionnement des alcaloïdes totaux

Fraction	Masse (mg)	Rendement (%)
F ₁	(192,8 ± 0.1)	33.56
F ₂	(37,2 ± 0.1)	6.48
F ₃	(184,1 ± 0.1)	32.05
F ₄	(98,6 ± 0.1)	17.16
F ₅	(17,3 ± 0.1)	3.01

III-6- RESULTATS DES CCM DES FRACTIONS F₁ à F₅

Les cinq fractions rassemblées ont été développées sur CCM et la plaque CCM obtenue a été révélée par le réactif de Dragendorff (Munier et Macheboeuf) donnant une coloration rouge-orangée selon la Figure 7.

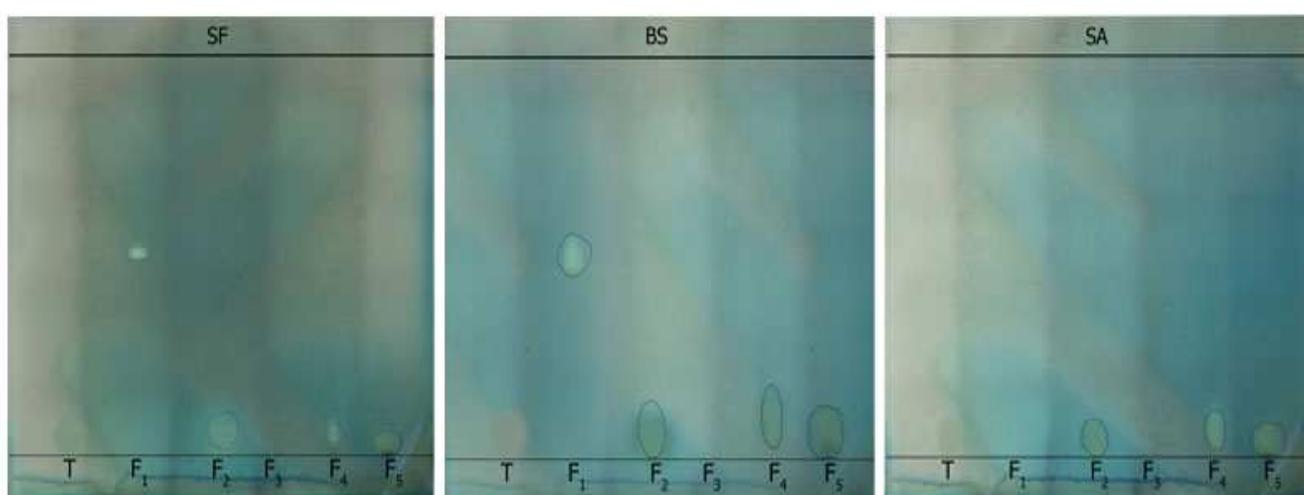


Système d'éluant	: CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH [95/5] avec 3 gouttes d'ammoniaque
Phase stationnaire	: Gel de silice 60
Révéléateur	: Réactif de Dragendorff (MUNIER et MACHEBOEUF)
Coloration observée	: rouge-orangée

Figure 7 : CCM des fractions F₁ à F₅ des alcaloïdes totaux

III-7- RESULTATS DU TEST ANTIBACTERIEN DES FRACTIONS F₁ A F₅

Les plaques développées contenant les cinq fractions ont été soumises au test antibactérien. Les fractions F₁, F₂, F₄ et F₅ ont présenté une activité biologique positive avec les souches bactériologiques à gram+ : *Streptococcus faecalis* (SF), *Bacillus subtilis* (BS), *Staphylococcus auréus* (SA) et négative avec les souches à gram-. Les résultats sont représentés par la Figure 8 et résumés dans le Tableau 7.



Système d'éluant	: CH ₂ Cl ₂ /MeOH [95/5]
Phase stationnaire	: gel de silice 60
Révélateur	: Colorant vital
Observation	: zone claire

Figure 8: Test antibactérien sur les 5 fractions

Tableau 7 : Résultats du test antibactérien sur les fractions F₁ à F₅

SOUCHES			RESULTATS				
			F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅
BACTERIES	Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	+	+
		<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	-	+	+
		<i>Streptococcus faecalis</i>	+	+	-	+	+
	Gram -	<i>Salmonella typhi</i>	-	-	-	-	-
		<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
		<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-	-
CHAMPIGNON	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	

(+) : positif

(-) : négatif

III-8- RESULTATS DU TEST ANTIOXYDANT DES FRACTIONS F₁ à F₅

Les fractions F₁ à F₅ ont été soumises au test antioxydant représenté par la Figure 9.

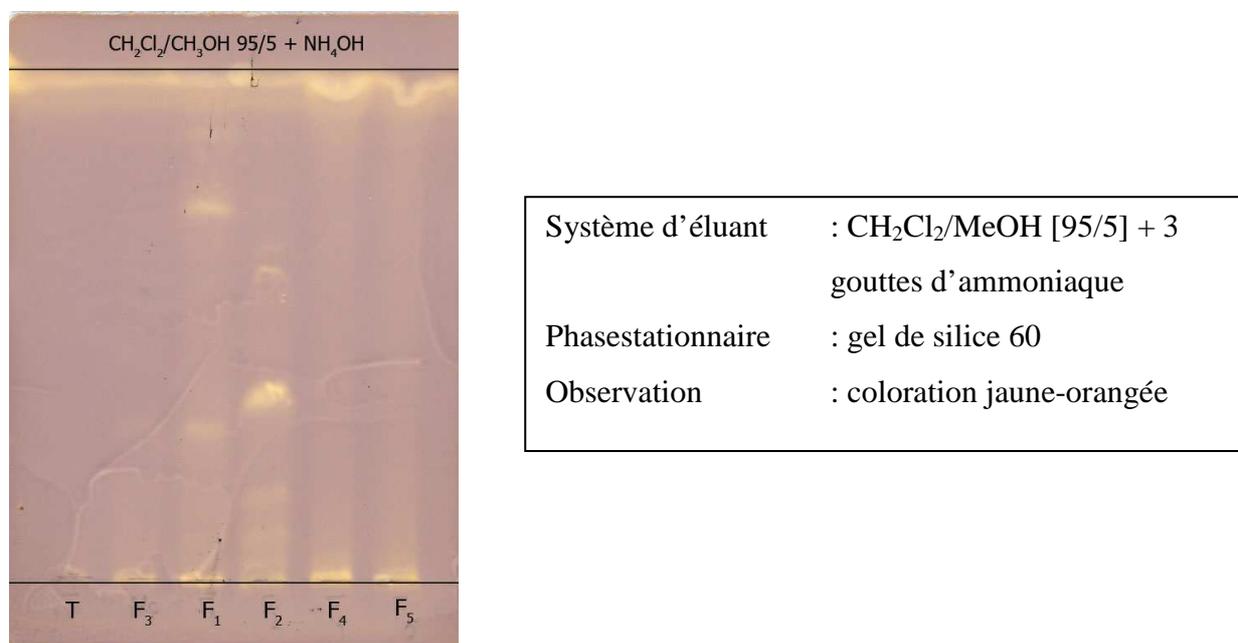


Figure 9: Résultats du test antioxydant

Toutes les fractions ont donné des résultats positifs selon le Tableau 8.

Tableau 8 : Résultats du test antioxydant sur les fractions

Fraction	Résultat
F ₁	+
F ₂	+
F ₃	+
F ₄	+
F ₅	+

(+) : positif

III-9- ISOLEMENT DE AR-011 ET AR-012

(22.3 ± 0.1) mg de la fraction F₂ ont été élués dans la colonne chromatographique sur Gel de Silice 60Mesh, de granulométrie [0,015-0,040mm] avec un système de solvant CH₂Cl₂/MeOH en mode d'éluéon par gradient de méthanol (98/2 à 80/20). Trois fractions F₂₁, F₂₂ et F₂₃ ont été obtenues.

Colonne de verre : h=40cm ; d=0,5cm

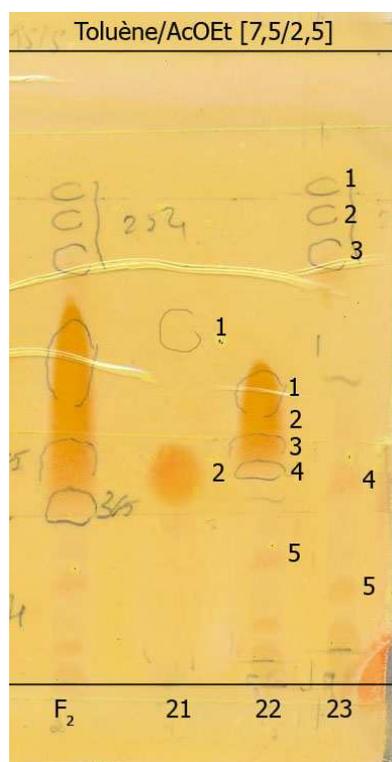
Phase stationnaire: gel de silice 60

Echantillon : (22.3 ± 0.1) mg de F₂ en dépôt liquide

Volume mort : (10.0 ± 0.1) mL

Eluant	Volume (±0.1 mL)	Fractions
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (98/2)	30	F ₂₁
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95/5)	30	
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (90/10)	30	F ₂₂
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (85/15)	30	F ₂₃
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (80/20)	30	

En analyse sur CCM, la fraction F₂₁ a présenté deux taches selon la Figure 10.



Système d'éluant : Toluène/AcOEt 7,5/2,5
Phase stationnaire : gel de silice 60
Révélateur : Réactif de Dragendorff (MUNIER et MACHEBOEUF)
Coloration observée : rouge-orangée

Figure 10 : CCM des fractions F₂₁, F₂₂ et F₂₃

La fraction F₂₁ a été ensuite séparée sur chromatographie sur couche mince préparative dans un système de solvant Toluène/AcOEt [7,5/2,5] avec deux migrations. Après grattage des bandes de silice, elles ont été dissoutes dans un solvant CH₂Cl₂/MeOH (9/1) pour obtenir le produit, puis filtrées et évaporées à sécheresse. Deux produits purs AR-011 (2,1 ± 0.1mg) et AR-012 (4,5 ± 0.1mg) ont été obtenus. L'isolement de AR-011 et AR-012 est consigné dans le Schéma 6.

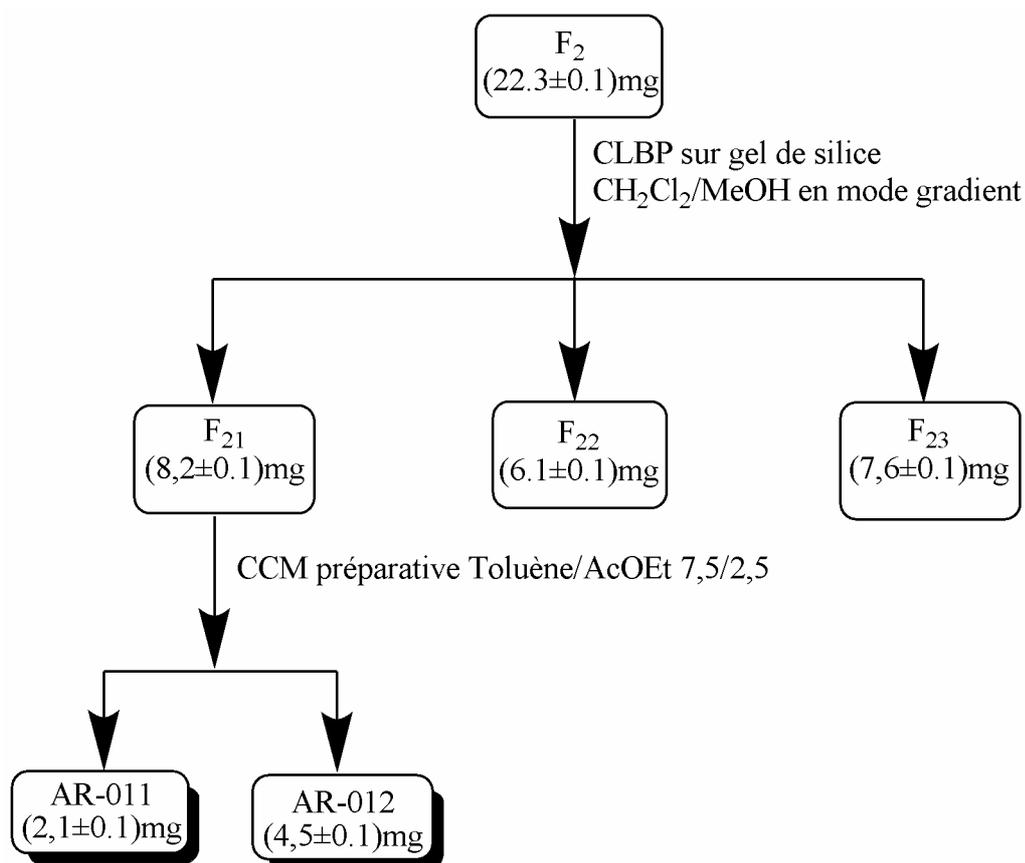


Schéma 6 : Protocole d'isolement des produits AR-011 et AR-012

III-10- ISOLEMENT DE AR-013 ET AR-014

(86.2 ± 0.1) mg de la fraction F₄ ont été passés sur colonne chromatographique sur Gel de Silice 60Mesh, de granulométrie [0,040-0,063mm] avec un système de solvant CH₂Cl₂/CH₃OH en mode gradient d'éluion (95/5 à 70/30). L'éluât a été recueilli par fraction de 10mL. A la fin de la colonne, on a eu quatre fractions F₄₁, F₄₂, F₄₃ et F₄₄, une formation de cristaux a été observée dans la fraction F₄₃. Ces cristaux ont été purifiés à l'aide du méthanol absolu, cristallisé à froid (-20°C) pendant 24heures et récupérés. Ensuite, les cristaux ont été de nouveau dissous dans le méthanol mais à la température 35°C sous ultrason puis analysés sur CCM.

Colonne de verre : h=40cm ; d=0,5cm

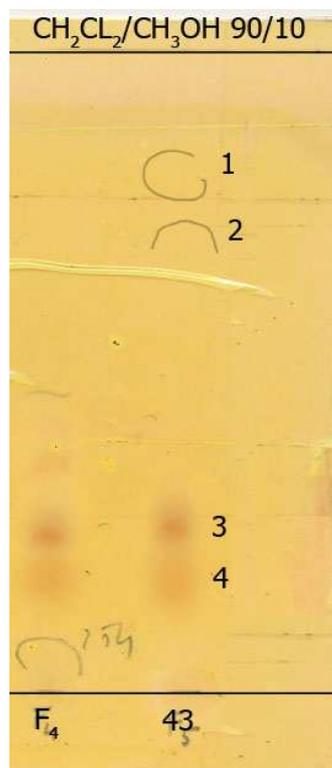
Phase stationnaire: gel de silice 60

Echantillon : (86.2 ± 0.1) mg de F₄ en dépôt liquide

Volume mort : (10,0 ± 0.1) mL

Eluant	Volume (± 0.1 mL)	Fractions
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95/5)	10	F ₄₁
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (90/10)	10	
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (85/15)	10	F ₄₂
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (80/20)	10	F ₄₃
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (70/30)	10	F ₄₄

Le profil chromatographique est représenté par la Figure 11.



Système d'éluant	: CH ₂ Cl ₂ /MeOH [90/10] + 3 gouttes d'ammoniaque
Phase fixe	: gel de silice 60
Révélateur	: Réactif de Dragendorff (MUNIER et MACHEBOEUF)

Figure 11: CCM de la fraction F₄₃

La fraction F₄₃ a été purifiée à l'aide d'une chromatographie sur couche mince préparative dans un système de solvant CH₂Cl₂/MeOH [90/10] avec 3 gouttes d'ammoniaque, deux produits purs notés AR-013 (14,2 ± 0.1) mg et AR-014 (2,6 ± 0.1) mg ont été obtenus selon le Schéma 7.

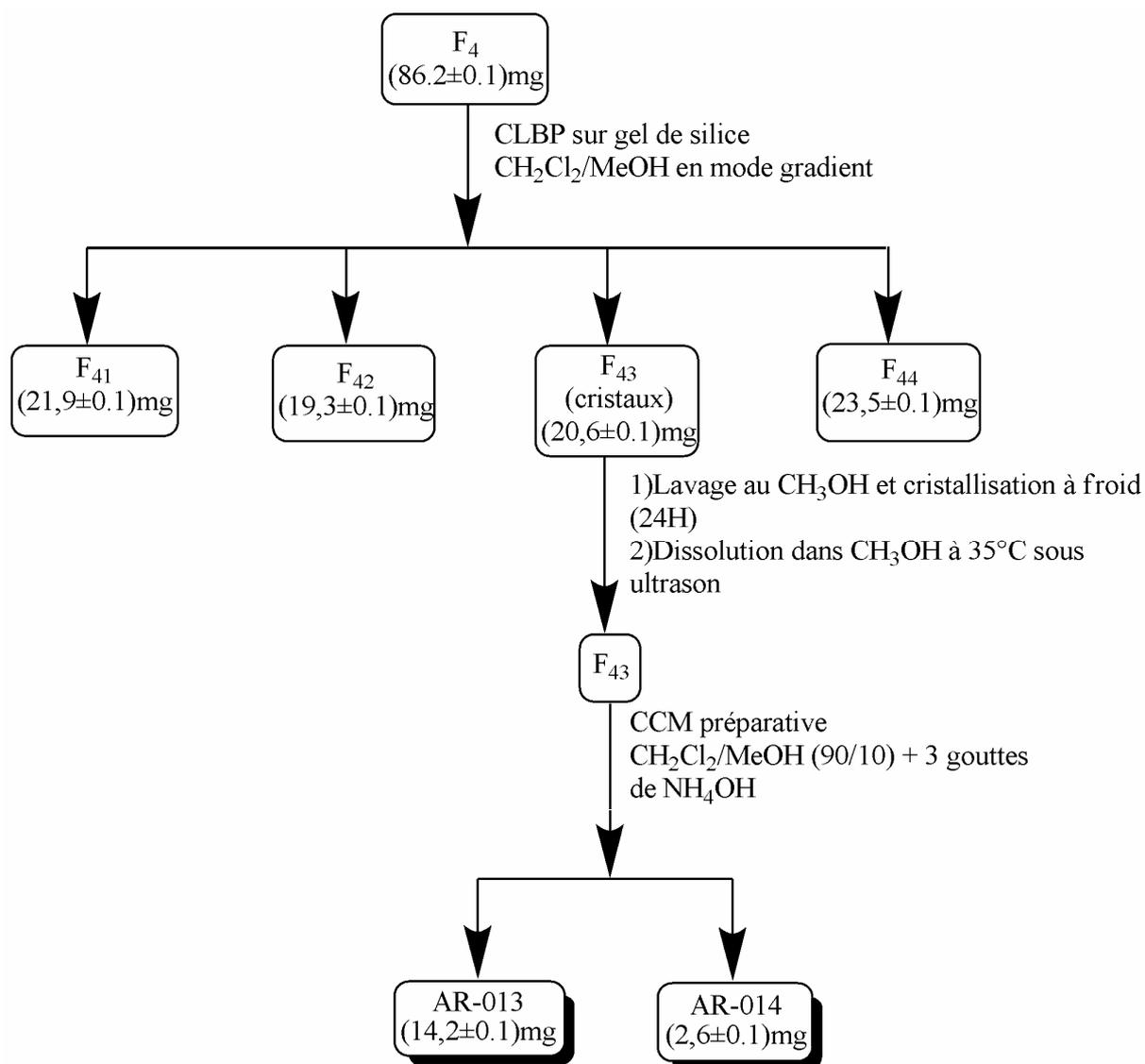


Schéma 7 : Protocole d'isolement des produits AR-013 et AR-014

III-11- RESULTATS DES CCM DES PRODUITS ISOLES

Les quatre produits isolés AR-011, AR-012, AR-013 et AR-014 ont été développés sur une même plaque CCM selon la Figure 12 afin de vérifier en CCM leur pureté et en déduire leurs caractéristiques.

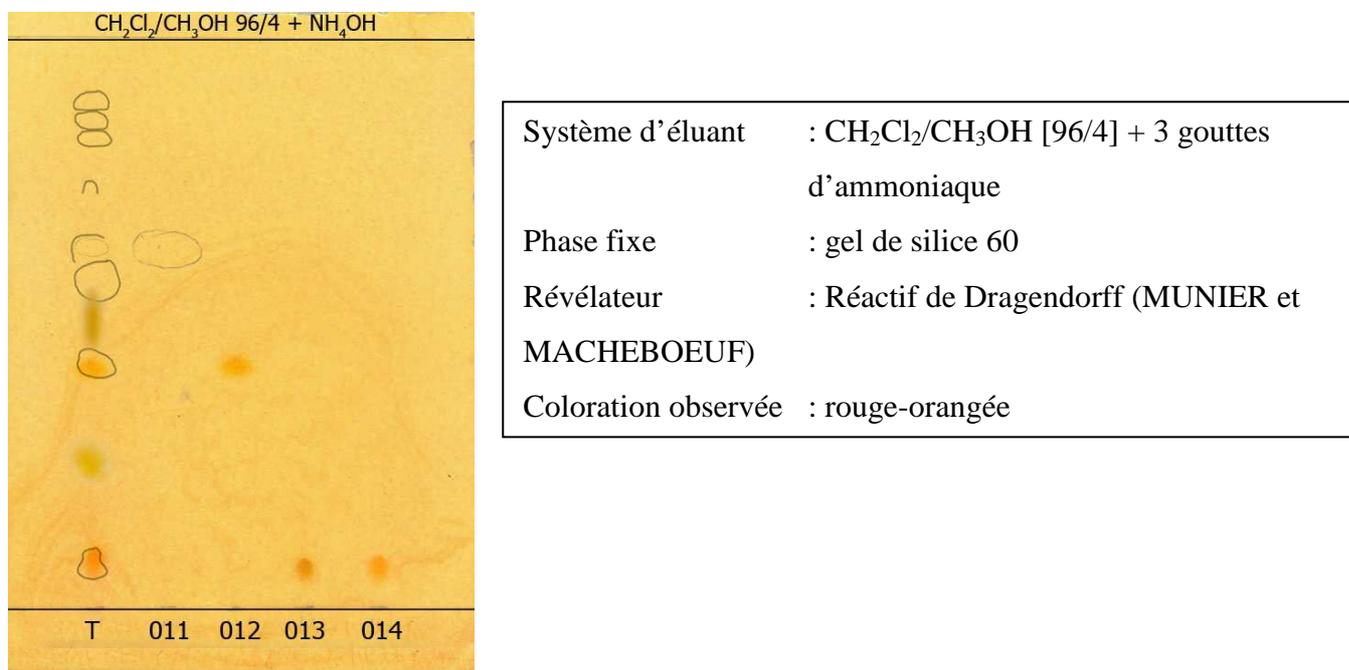


Figure 12 : CCM des produits isolés

Les caractéristiques des produits isolés sont résumées dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Caractéristiques des produits isolés

Produit	Masse (mg)	Aspect	R_f
AR-011	(2,1 ± 0.1)	Amorphe	0,638
AR-012	(4,5 ± 0.1)	Amorphe	0,425
AR-013	(14,2 ± 0.1)	Cristaux blancs	0,063
AR-014	(2,6 ± 0.1)	Amorphe	0,075

III-12- RESULTATS DES TESTS ANTIBACTERIENS DES PRODUITS ISOLES

Les produits isolés AR-011, AR-012, AR-013 et AR-014 ont été soumis à des tests antibactériens par la méthode de bio-autographie directe. Les résultats des tests sont positifs sur des souches à gram+ *Streptococcus faecalis* (SF) et *Staphylococcus auréus* (SA). Les quatre produits ont donné les mêmes résultats selon la Figure 13 et le Tableau 10.

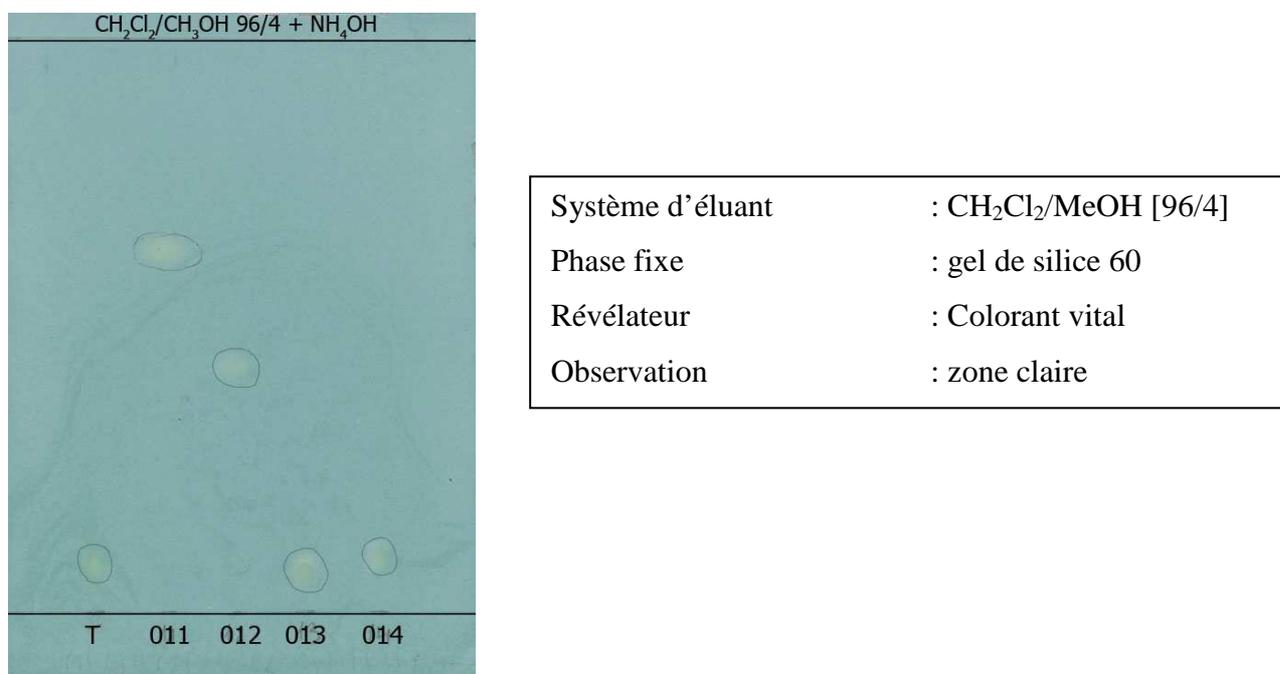


Figure 13 : Tests antibactériens sur les produits isolés

Le Tableau 10 résume les résultats obtenus.

Tableau 10 : Résultats du test antibactérien sur les produits isolés

Produit	Résultat
AR-011	+
AR-012	+
AR-013	+
AR-014	+

III-13- RESULTATS DES ANALYSES SPECTRALES

A cause de leur faible quantité, seuls les spectres RMN ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMBC, ^1H - ^{13}C HSQC et le spectre de masse du produit AR-013 de masse 14,3mg ont été enregistrés.

III-13- 1- Spectrométrie de Résonance Magnétique (RMN)

L'étude concertée des spectres RMN ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, HSQC et HMBC enregistrés sur le produit AR-013 a permis de tirer les informations suivantes sur sa structure.

Spectre RMN ^1H

L'analyse du spectre RMN ^1H a permis de dresser le tableau des valeurs des déplacements chimiques des protons, ainsi que la multiplicité des divers signaux. Les valeurs s'étendent de 1,08 à 4,80ppm et elles sont résumées dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Résultats des analyses en RMN ¹H du produit AR-013

δ (ppm)	δ (ppm) pour chaque site	Allure des signaux
4.79	4.79	singulet
2.91	2.89	triplet
2.89		
2.87		
2.62	2.61	doublet
2.60		
2.49	2.46	quintuplet
2.47		
2.46		
2.44		
2.42		
2.38	2.35	quintuplet
2.37		
2.35		
2.33		
2.33		
2.06	2.04	doublet
2.03		
1.71	1.69	triplet
1.70		
1.68		
1.63	1.61	doublet
1.60		
1.55	1.53	doublet
1.52		
1.47	1.47	singulet
1.25	1.21	quadruplet
1.23		
1.19		
1.17		
1.09	1.08	doublet
1.07		

Spectre RMN ¹³C

Le spectre totalement découplé sur une large bande (Broadband) a donné le résultat illustré dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Déplacements chimiques des ¹³C du produit AR-013

δ (ppm)	Type de carbone
173.57	-COOR
70.39	-O-CH
56.04	-N-CH-
53.61	
37.47	-CH ₂ -
34.64	
29.79	
29.15	
28.78	
28.73	
26.44	
25.53	
25.42	
18.76	

Nous remarquons la présence d'un pic à δ 173,57 ppm indiquant la présence d'un carbonyle lactonique à cause de la faible valeur par rapport aux autres carbonyles. L'analyse concertée de ces deux spectres Broadband et DEPT indique l'existence de 14 atomes de carbone dont un méthyle -CH₃, 9 méthylènes -CH₂- et 3 méthines CH. L'un des protons des méthines est en α de l'oxygène et les 2 autres en α de l'azote.

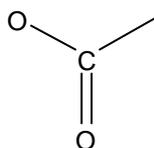
Spectre DEPT 135°

L'expérience DEPT 135° pour les ^{13}C totalement découplés montre des pics sous forme de singulets représentant les signaux de méthylènes ($-\text{CH}_2-$) avec des intensités positives et ceux de méthines (CH) et méthyles ($-\text{CH}_3$) présentant des intensités négatives ; le seul C quaternaire à δ 173,57ppm donne aucun signal dans cette expérience DEPT. Il est présent en Broadband. Les résultats sont mentionnés dans le Tableau 13.

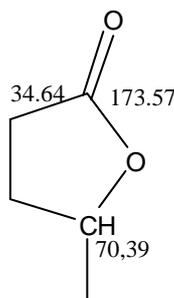
Tableau 13: Résumé des déplacements chimiques des ^{13}C pour le spectre DEPT

Signaux	δ (ppm)	Type de site protonique
Intensité positive	37.47	CH_2
	34.64	
	29.80	
	29.16	
	28.79	
	28.73	
	26.45	
	25.53	
	25.42	
Intensité négative	70.40	CH
	56.04	
	53.61	
	18.77	CH_3

La présence de 13 pics (DEPT) et de 14 pics (Broadband) confirment la présence d'un carbone quaternaire à δ 173,57ppm attribué à



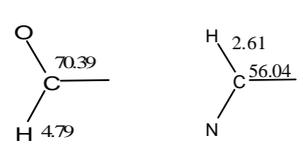
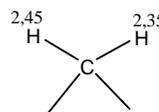
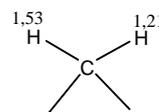
La valeur 173,57ppm est proche des valeurs du déplacement chimique dans une lactone saturée [22].



Spectre RMN ^1H - ^{13}C : HSQC

L'expérience de corrélation HSQC indique les corrélations des protons avec les carbones qui les portent. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Résultats des expérimentations en HSQC sur produit AR-013

δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H	Observation
70.39	4.79	Un proton à côté d'un hétéroatome 
56.04	2.61	
53.61	2.89	
37.47	1.47	-CH ₂ -
34.64	2.45	Deux protons non équivalents 
	2.35	
29.79	1.60	-CH ₂ -
29.15	2.04	-CH ₂ -
28.78	1.60	-CH ₂ -
28.73	1.47	-CH ₂ -
26.44	1.53	Les protons présentent des environnements chimiques différents ce sont deux protons non équivalents 
	1.21	
25.53	1.47	-CH ₂ -
25.42	1.69	-CH ₂ -
18.76	1.08	-CH ₃

L'analyse du spectre RMN ^1H nous a permis de répartir les valeurs des déplacements chimiques situées entre 1,08ppm et 4,80ppm en 3 zones bien distinctes.

- Zone 1, 08 - 1,70ppm
- Zone 2,05 - 3,00ppm
- Zone >4ppm

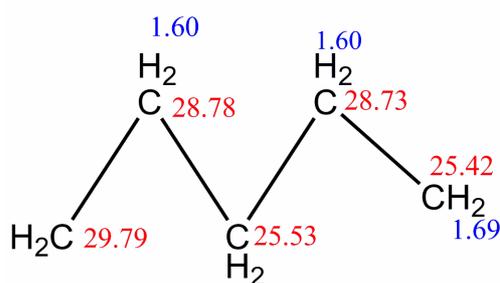
a- Zone 1, 08 - 1,70ppm

La valeur 1.08 est attribuée au seul méthyle.

Les valeurs comprises entre 1,21 et 1,69ppm laissent supposer que le produit est cyclique et qu'il porte des chaînons $\text{C-CH}_2\text{-CH}$ que les déplacements chimiques des ^{13}C compris entre 20 et 30 ppm correspondants. Le Tableau 15 rapporte l'ensemble de ces résultats.

Tableau 15 : Déplacements chimiques des carbones méthyléniques de AR-013

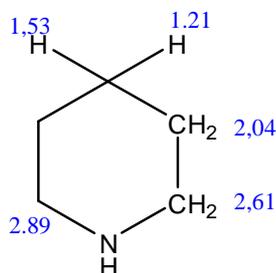
δ (ppm) ^{13}C	Type de site protonique
37.47	-CH ₂ -
29.79	
29.15	
28.78	
28.73	
26.44	
25.53	
25.42	



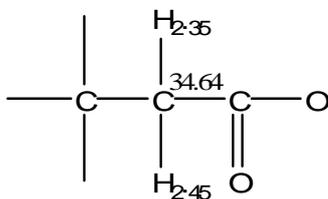
Toutefois les protons dont les déplacements chimiques à δ 1,53 et à δ 1,21ppm, portés par le carbone à 26,44ppm sont géminés et ce carbone est en γ d'un cycle pipéridine (Silverstein, Morill et Basler) [22]. Etant donné que le cycle est saturé, il est évident que leur orientation dans le cycle est différente (au dessus et en dessous du cycle), c'est la raison pour laquelle les déplacements chimiques sont différents. La valeur du déplacement chimique à 1,53ppm corrobore le noyau pipéridine.

b- Zone 2,05 - 3,00ppm

Le déplacement chimique à 2,04ppm est attribué à deux protons méthyléniques en β par rapport à l'azote du noyau pipéridine. La littérature indique que cette valeur est peut-être due à la présence d'une longue chaîne en α de l'azote.



- Dans cette zone figurent deux déplacements chimiques à 2,89 et 2,61 ppm, qui peuvent être attribués à deux groupements méthines en α de l'azote du pipéridine. Les protons méthiniques à δ 2,89 ppm sont portés par le carbone à δ 53,61 ppm et ceux à δ 2,6 ppm sont portés par celui à δ 56,04 ppm.
- Les déplacements chimiques respectivement à 2,46 et 2,35 ppm sont attribués deux protons portés par le même carbone résonnant à 34,64 ppm.



c- Zone >4ppm

C'est la zone des protons en α de l'oxygène. Ainsi, on peut avancer que le proton à δ 4,80 ppm porté par le carbone à δ 70,39 ppm est en α de l'oxygène.

Les différences entre les déplacements chimiques des protons en α de l'azote et en α de l'oxygène sont en parfait accord avec le fait que les déplacements chimiques dépendent de la densité électronique- entraînant un glissement vers le champ fort (blindage, soit δ faible) ou vers le champ faible (déblindage, δ élevé), l'oxygène étant plus électronégatif que l'azote.

Spectre RMN ^1H - ^{13}C : HMBC

Le spectre de corrélation hétéronucléaire HMBC donne les corrélations entre ^1H et ^{13}C séparés par 2 ou plusieurs liaisons. L'interprétation de spectre HMBC du produit AR-013 donne les résultats présentés dans le Tableau 16. La jonction de ces différentes séquences a été effectuée grâce au spectre HMBC.

Tableau 16 : Corrélations ^1H - ^{13}C HMBC observées pour la structure du produit AR-013

δ (ppm) ^1H	δ (ppm) ^{13}C porteur	Corrélation ^1H - ^{13}C	Observation
4.79	70.39	26.44	
2.89	53.6	18.77 56.04 70.39	
2.35 2.45	34.64	25.42 28.78 173.60	
2.04	29.15	26.44 56.04 70.39	

δ (ppm) ^1H	δ (ppm) ^{13}C porteur	Corrélation ^1H - ^{13}C	Observation
1.69	25.42	28.73 25.53 34.64	
1.61	28.78	25.53	
1.47	25.53	28.78 29.79	
1.08	18.77	53.61 70.39	

Les corrélations ^1H - ^{13}C HMBC observées nous ont permis de présenter l'ébauche de structure de AR-013 selon la Figure 14.

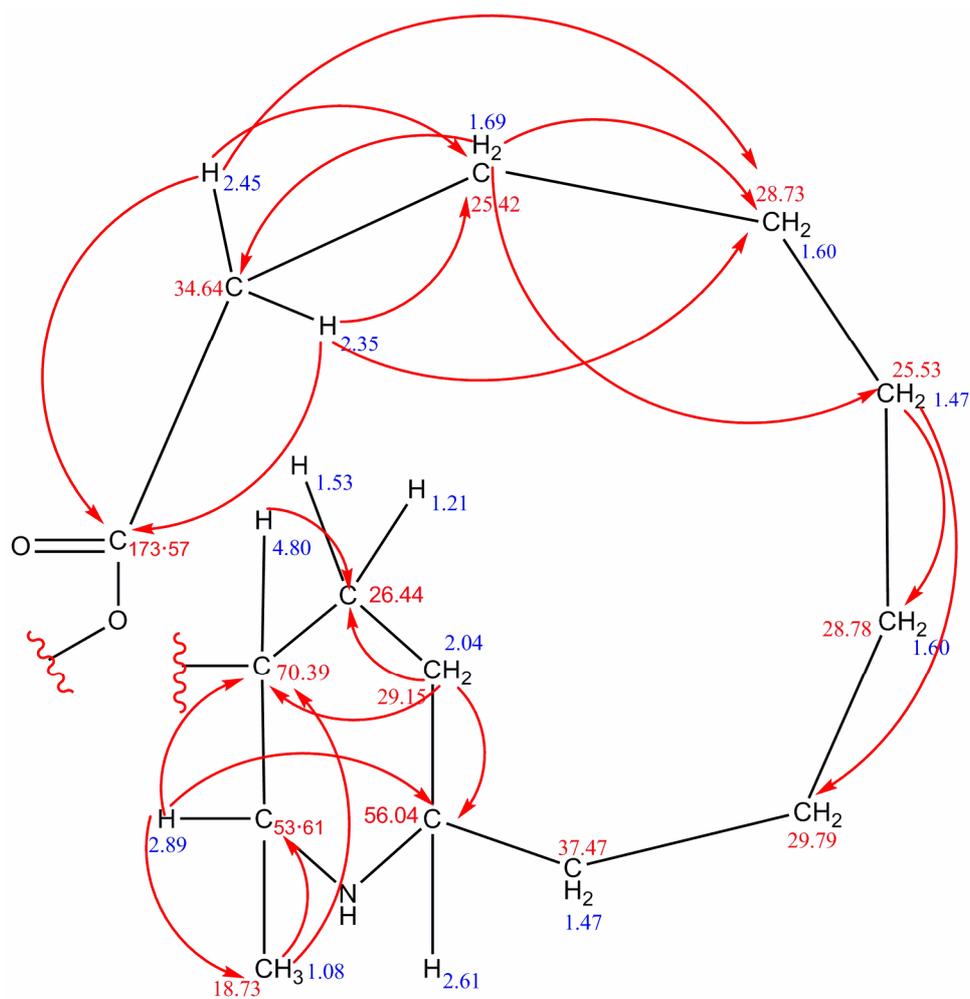
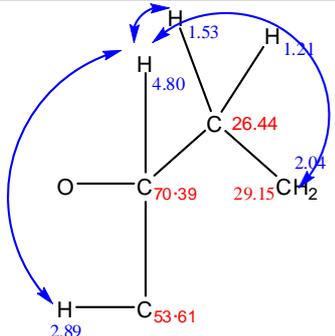
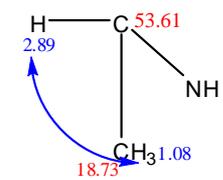
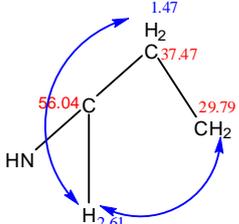
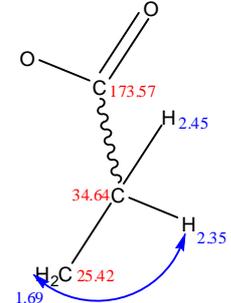
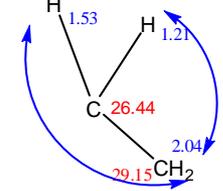
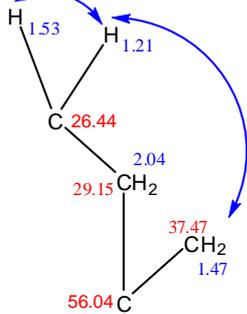


Figure 14: Corrélations ^1H - ^{13}C HMBC observées sur le produit AR-013

Spectre RMN ^1H - ^1H : COSY

Les corrélations protons observées sur le spectre RMN ^1H - ^1H COSY confirme la structure proposée pour le produit AR-013 selon le Tableau 17 et la Figure 15.

Tableau 17 : Corrélations ^1H - ^1H COSY observées sur AR-013

δ (ppm) ^1H	δ (ppm) ^1H corrélés	Corrélation
4.80	2.89 2.04 1.53	
2.89	1.08	
2.61	1.47	
2.35	1.69	
2.04	1.53 1.21	
1.21	1.53 1.47	

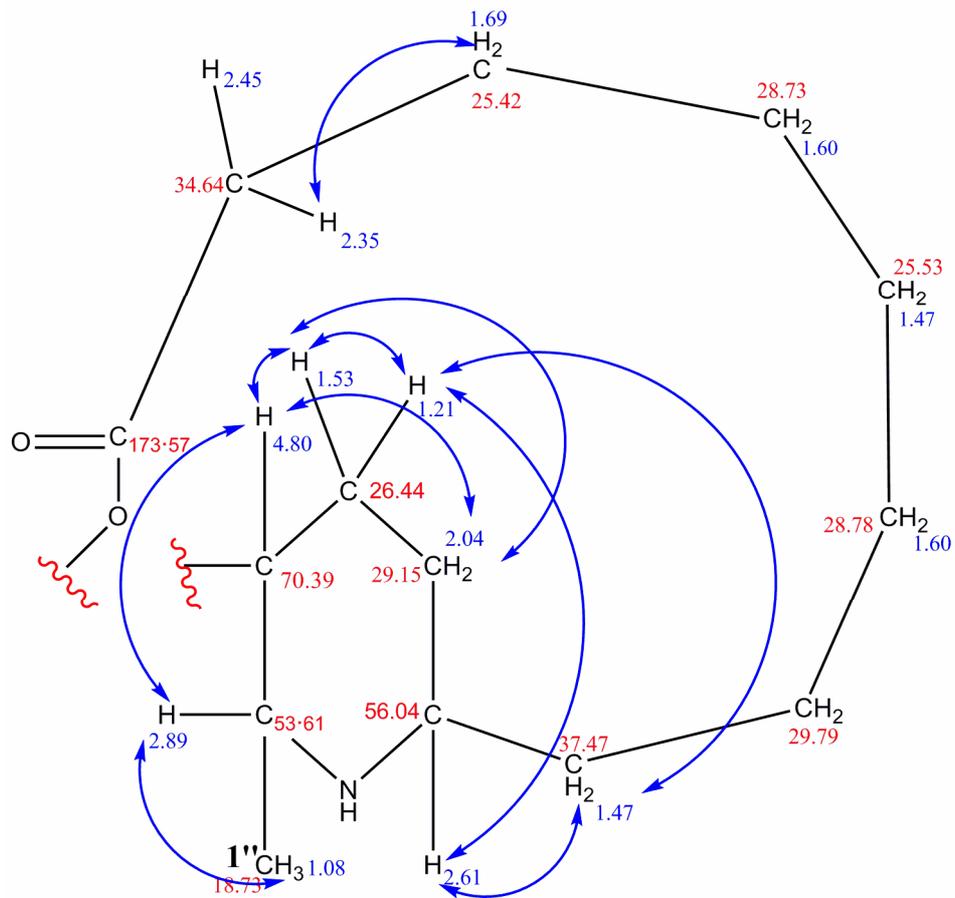
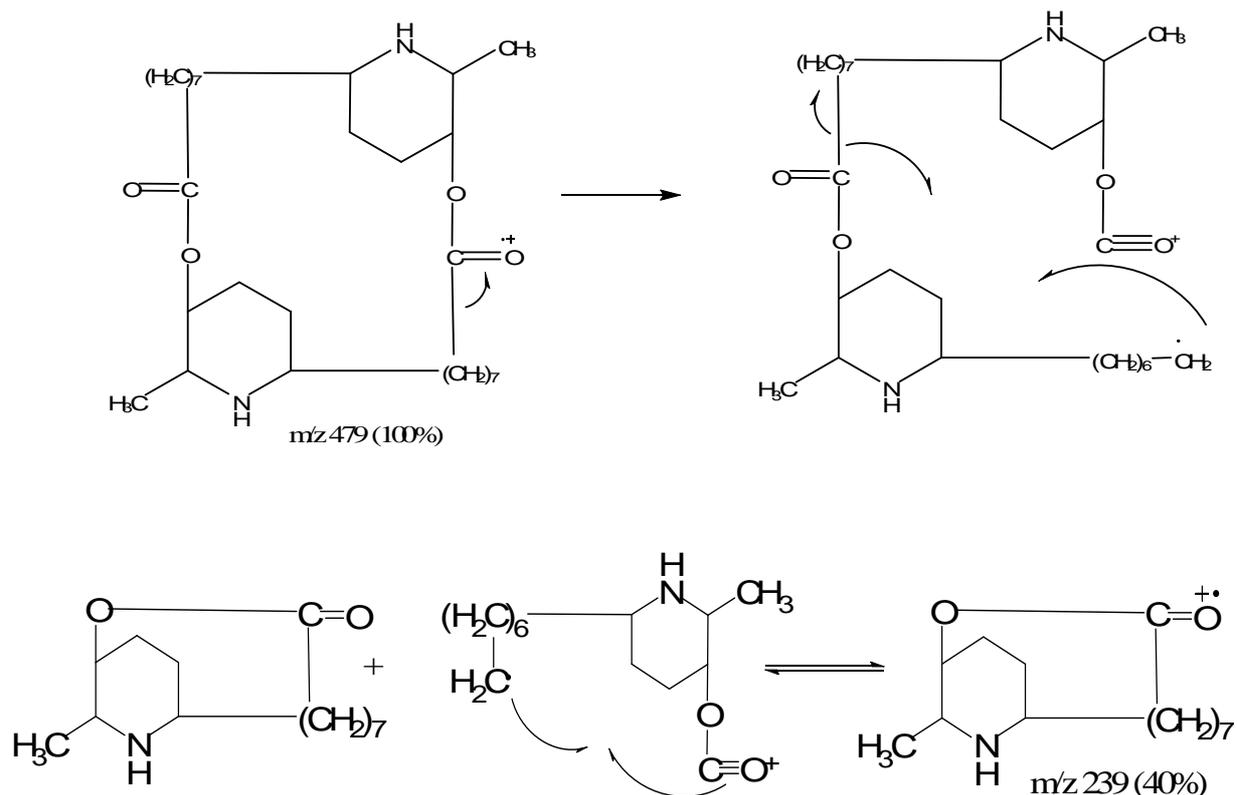


Figure 15 : Corrélations ^1H - ^1H COSY observées sur AR-013

III-13-2- Spectrométrie de Masse (SM)

Le spectre « FAB mass » en mode positif donne comme pic parent le pic $(M+H)^+$ à m/z 479, or $(M+H)^+$ est un pseudo pic moléculaire, il donne sans ambiguïté la masse du produit qui est donc 478.

Ainsi, d'après les données collectées dans les spectres RMN on a une molécule formée de 2 unités $C_{14}H_{25}O_2N$ car $478 = 2 \times 239$ donc AR-013 est une molécule symétrique formée de deux « Structure A » dont nous avons donné l'ébauche.



Ainsi, la structure du produit AR-013 est donnée par la Figure 17.

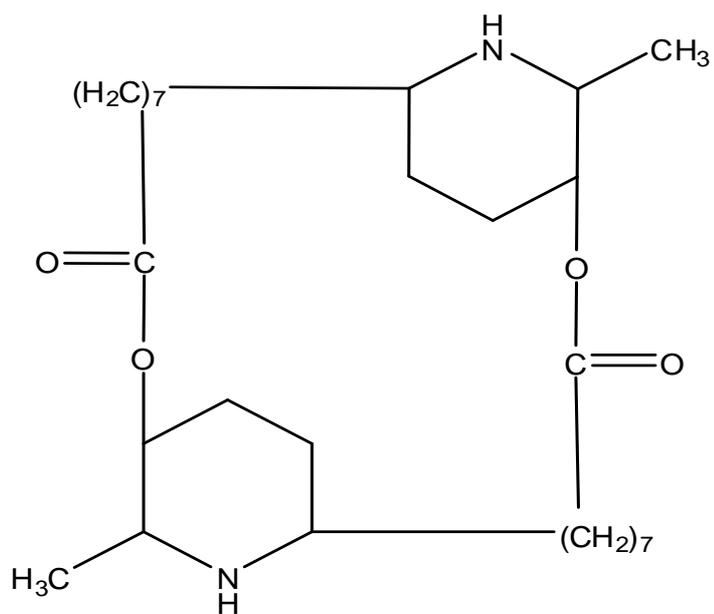


Figure 17 : Structure plane de AR-013

L'analyse des diverses données en RMN et en masse apporte la preuve que la molécule AR-01 3 est bien la Carpaïne.

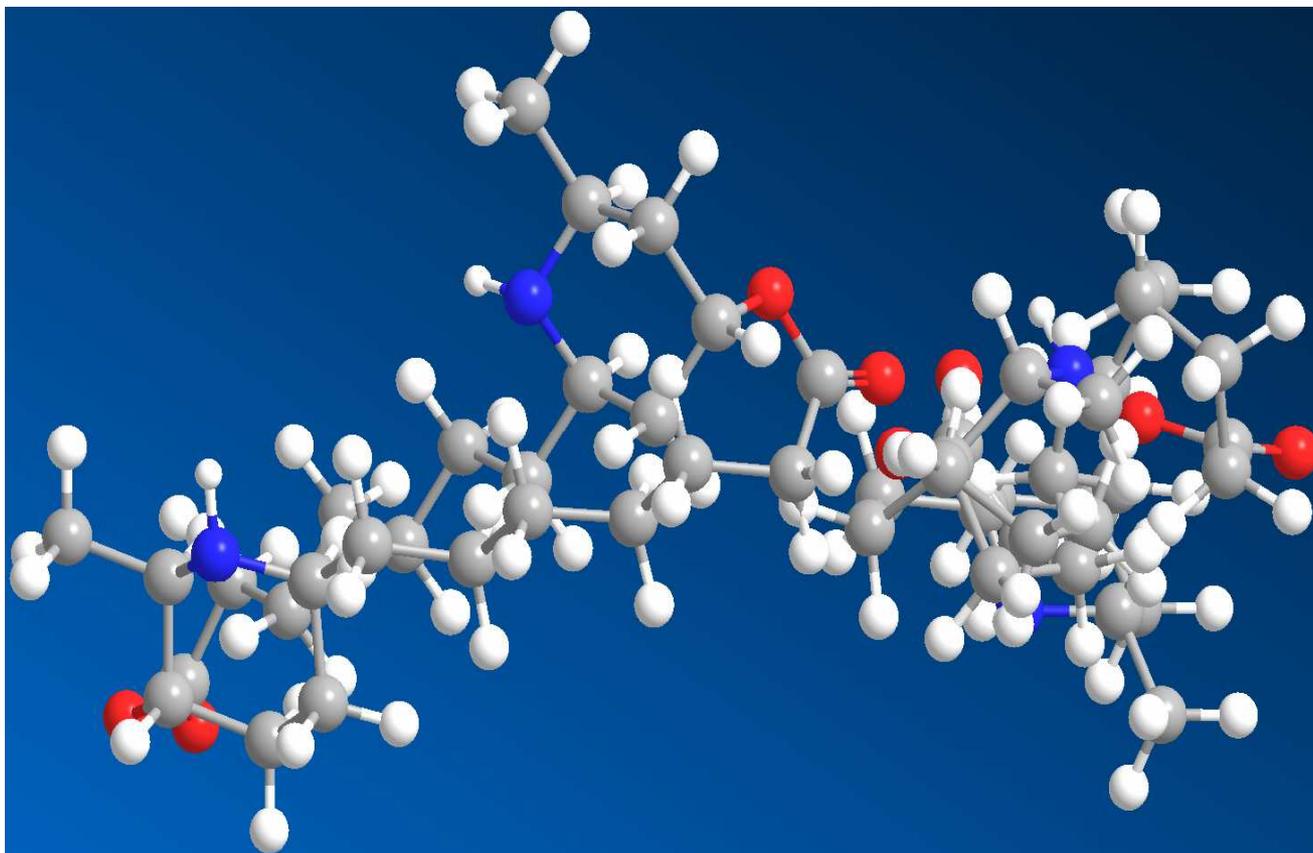


Figure 18 : Structure 3D de AR-013

CONCLUSION

Pour notre initiation à la recherche, nous avons pu mettre en pratique non seulement les enseignements dispensés en AEA telles que les méthodes d'extraction d'une famille chimique, le criblage phytochimique, les méthodes d'analyse chromatographique, les méthodes spectrales de détermination de structure mais aussi les tests biologiques nécessaires pour que le produit obtenu soit actif. C'est une opportunité de nous familiariser avec les méthodologies de recherches en Chimie des Produits Naturels aussi que les bonnes pratiques du laboratoire.

Les résultats obtenus au screening phytochimique confirment la présence d'alcaloïdes, le goût amer des feuilles du papayer vient en appui à cette affirmation.

Nous avons effectué une extraction à deux reprises afin d'obtenir un maximum de rendement en extrait hydroalcoolique, soit 35,52%. L'utilisation de l'ammoniaque pour la première extraction a permis de rendre les alcaloïdes contenus dans la plante sous forme de base et par conséquent faciliterait l'extraction par partage. Le rendement en extrait d'alcaloïdes totaux était de 0,12%. En effet, si les alcaloïdes existaient sous forme de sels, l'action de l'ammoniaque les transformerait en bases susceptibles d'être extraites par des solvants organiques de polarité moyenne tels : le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle ou l'éther éthylique.

Un test antioxydant a été aussi effectué sur les fractions. Ce test a donné des résultats positifs sur les fractions F₁ et F₂ des produits alcaloïdiques, on peut en déduire une activité antioxydant des feuilles du papayer.

L'extrait hydroalcoolique ainsi que l'extrait brut d'alcaloïdes ont été soumis à des tests antibactériens : l'extrait hydroalcoolique a donné un résultat négatif alors que l'extrait brut d'alcaloïdes a montré plusieurs zones d'inhibition sur des souches à gram + et gram -. On peut en déduire que la présence de composés autres que les alcaloïdes dans l'extrait hydroalcoolique a masqué l'activité des alcaloïdes contenus dans les feuilles du papayer. Les tests effectués sur les fractions ont indiqué que certains alcaloïdes de la plante présentent des activités antibactériennes sur uniquement des souches à gram+. De même, les tests sur les produits isolés ont confirmé que les quatre alcaloïdes isolés sont actifs et les tests ont été positifs sur les souches à gram+.

La Carpaïne est présente dans les feuilles et les graines du papayer. Elle a fait l'objet de nombreux travaux chimiques et biologiques. Toutefois, sa structure n'a pu être élucidée de façon définitive.

Elle a été isolée pour la première fois en 1890 par Greshoff [4] et son activité physiologique était déterminée. En 1965, soit 75ans plus tard, la formule brute $C_{28}H_{50}N_2O_4$ a été proposée de Coke et Rice [4].

Entre temps, Merck et Compagnie proposait une formule brute $C_{14}H_{27}NO_2$ que Van Rijn avait corrigée en $C_{14}H_{25}NO_2$.

Par ailleurs, Barger et ses collaborateurs travaillaient sur les dérivés de la Carpaïne et obtenaient l'acide carpamique [4].

Enfin, Spiteller-Friedmann et Spiteller en utilisant le spectre de masse, ont trouvé que le Carpaïne a une masse égale à 478 qui correspond à deux molécules identiques de $C_{14}H_{25}NO_2$ [4].

Pour notre part, l'analyse des données en spectrométries de masse et de RMN monodimensionnelle et bidimensionnelle a permis de confirmer la structure récemment proposée pour la Carpaïne. Au cours de ce travail, nous avons pu présenter pour la première fois les corrélations homonucléaires (COSY), hétéronucléaires (HSQC, HMBC) pour la Carpaïne.

C'est notre première contribution à l'élaboration et la confirmation de structure de composé naturel.

C'est une première expérience pour une étude phytochimique, biologique de produits naturels.

En perspective, nous nous proposons de poursuivre l'étude des autres alcaloïdes contenus dans les feuilles de *Carica papaya* L.

REFERENCES

1. ACEBEY CASTELLON I.L. Caractérisation de terpènes antileishmaniens isolés par bioguidage d'une plante bolivienne *Hedyosmum angustifolium* (Ruiz et Pavon) Solms. Toulouse (FRA), Toulouse : Université de Toulouse, IRD, Th. : Chimie Biol. Santé, Université de Toulouse, **2007**, 194.
2. BLIGH E. G., DYER W. J., *Biochem. Cell Biol.*, NRC Canada, **1959**, 37 (8) : 911–917.
3. BRUNETON J., Pharmacognosie - Phytochimie, Plantes médicinales, Editions Tec & Doc, Editions médicales internationales, **1999**, 1120.
4. BURDICK E. M., "Carpaine. An alkaloid of *Carica papaya*. Chemistry and pharmacology." *Economic Botany*, **1971**, 25(4), 363-365.
5. FLUCK H., Petit guide panoramique des Herbes Médicinales, Ed. Delachaux et Niestle, **1977**, 60-63.
6. FONG H., TIN WA M., FARNSWORTH N. R., Phytochemical screening plants, Documents of Pharmacognosy and Pharmacology, **1977**.
7. FOURNET J., Flore illustrée des phanérogames de Guadeloupe et de Martinique, Gondwana éditions, Cirad, **2002**, 489-492.
8. GEISSMAN T. A., Principe de Chimie Organique, Dunod, Paris, **1965**, 729-730.
9. GUETTE C., Les alcaloïdes, *Journal of Molecular Biology*, Laboratoire d'Oncopharmacologie, Centre de Lutte contre le Cancer Paul Papin, Angers, **2004**, 10.
10. HAMON M., PELLERIN F., GUERNET M., MAHUZIER G., Chimie analytique, Tome 3, Méthodes spectrales et analyse organique, Masson 2è Edition, **1990**, 152-189 ; 198-228.
11. HESSE M., Alkaloids – Nature's Curse or Blessing, Wiley – VCH, **2002**.
12. HORNICK C. A., SANDERS L. I., LIN Y. C. "Effect of carpaine, a papaya alkaloid, on the circulatory function in the rat." *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, **1978**, 22(2), 277-289.
13. MERCK E., DARMSTADT AG., Révélateur pour la chromatographie sur couche mince et sur papier, 21.
14. MORRISON G. H., FREISER H., Solvent extraction in analytical chemistry, John Wiley sons, **1957**, 157.
15. OPENSHAW H. T., A laboratory manual of quantitative organic analysis, HT. QJ 4145 Ope. W/D. Cambridge second edition, **1951**, 12-15.

16. PACHON G., RASOANAIVO H., AZQUETA A., RAKOTOZAFY J. C., RAHARISOLOLALAO A., LOPEZ DE CERAIN A., DE LAPUENTE J., BORRAS M., MOUKHA S., CENTELLES J. J., CREPPY E. E., CASCANTE M., Anticancer Effect of a New Benzophenanthridine Isolated from *Zanthoxylum madagascariense* (Rutaceline), *in vivo* 21, **2007**, 417-422.
17. PELLETIER S. W., Chemistry of the alkaloids, Van Nostrand Reinhold, **1969**, 2-9; 669.
18. POUSSET J. L., Plante médicinales d'Afriques, Edisud, **2004**, 65.
19. RANDEKATH K., Chromatographie sur couche mince, Editeur: Gauthier-Villars, 2è Edition revue et augmentée, **1971**, 63, 87,280.
20. RASOANAIVO H. L., Etude chimique et activité sur les mollusques de *Zanthoxylum madagascariense* Baker, mémoire de DEA Chimie Organique, option Produits Naturels, Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo, **1998**, 31-33.
21. RATIANKAVANA B. L. P., Contribution à l'étude chimique de *Cnestis polyphylla* Lamk. (Connaraceae), mémoire de DEA Chimie Organique, option Produits Naturels, Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo, **2008**, 14-16.
22. SILVERSTEIN R. M., BASLER G. C., MORILL T. C., Identification spectroscopique de composés organique, DC Boeck 5è édition, **1998**.
23. WALDI D., SCHANCKERZ K., MUNTER F., Chromatographie, **1961**, 6, 61.
24. SACRAMENTO Isabelle T., Etude de l'effet antiparasitaire des graines de papaya (*Carica papaya* L.) chez l'auclacode d'élevage : cas des aulacodicultures installées au Sud du Bénin, mémoire de DEA en Sciences Agronomiques, Université Aboney-Calavi, Cotonou, Bénin, **Août 2009**.
25. ANDRIAMAHARAVO Rabe Nirina, Studies of Biologically Active Alkaloids from the skin of *Mantella* frogs, Endemic to Madagascar, Thèse de Doctorat de 3ème cycle, option Chimie Organique "Produits Naturels", **26 Février 2003**.

WEBOGRAPHIE

26. chezmarie.nuxit.net/plantes/papayer.html
27. fr.encarta.msn.com/encyclopedia_761561181/alcaloides.html
28. fr.encarta.msn.com/encyclopedia_761561181/plantes_medicinales.html
29. fr.wikipedia.org/wiki/Papayer
30. fr.wikipedia.org/wiki/Plantes_medicinales
31. [fr.wikipedia.org/wiki/Résonance_magnétique_nucléaire_](http://fr.wikipedia.org/wiki/R%C3%A9sonance_magn%C3%A9tique_nucl%C3%A9aire_)
32. gardenbreizh.org/modules/gbdb/plante-298-carica-papaya.html
33. gfev.univ-tln.fr/Spectro/09Spectro.html –
34. http://fr.wikipedia.org/wiki/Antioxydant#L.27importance_des_antioxydants
35. [http://fr.wikipedia.org/wiki/Bactérie](http://fr.wikipedia.org/wiki/Bact%C3%A9rie)
36. <http://www.latisaniere.com/plantes/histoire-plantes-medicinales.html>
37. <http://www.refer.mg/cours/yr/pages/>
38. <http://www.refer.mg/cours/yr/pages/m1.html>
39. pedagogie.ac-montpellier.fr:8080/disciplines/scphysiques/academie/ABCDORGA/FAMILLE/RMN.html
40. [www.ac-nancy-metz.fr/enseign/physique/CHIM/Jumber/SPECTRO_RMN/Resonance...nucléaire.../Spectro_rm.html](http://www.ac-nancy-metz.fr/enseign/physique/CHIM/Jumber/SPECTRO_RMN/Resonance...nucl%C3%A9aire.../Spectro_rm.html)
41. www.cosmovisions.com/bacteries.htm
42. www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/methodes/chromato.html
43. www.katrafay.com
44. www.krissnature.net/article-24577355.html
45. www.lrmh.fr/lrmh/w_publications/microbio/bact.htm
46. www.madagascar-island.com/.../flore-phytotherapie-pharmacopee-traditionnelle-malagasy.html
47. www.maep.gov.mg/filtechpapay.html -
48. www.med.univ-angers.fr/discipline/bio_cel/M1%20TVPS%20et%20BV1/cours.ppt -
49. www.pasteur.fr/ip/easysite/go/03b-00000m-005/recherche/departements...et.../unite-des-agents-antibacteriens
50. www.phytomania.com/papaye.html
51. www.rocler.qc.ca/pdubreui/masse/Ms1/spectro_masse1.html -

52. www.synergiashop.com/a44/anti-oxydants/

53. www2.ulg.ac.be/cedevit/french/tests_antioxydants.htm

ANNEXES

Annexes I - Screening phytochimique

Annexes II - Préparation des réactifs

Annexes III - Partie microbiologie

Annexes IV - Différentes formules chimiques

Annexes V - Spectres RMN (^1H , ^{13}C , DEPT, HMBC, HSQC, COSY) de AR-013

Spectre de masse de AR-013

ANNEXES 1

SCREENING PHYTOCHIMIQUE

Préparation des extraits bruts pour le screening phytochimique

- 1- Placer 50g de plante séchées, broyées dans un ballon de 500mL.
- 2- Additionner 200mL d'éthanol 80%.
- 3- Porter le ballon dans un bain marie bouillant pendant une heure.
- 4- Refroidir le contenu du ballon avec 50mL d'éthanol 80% et réunir les solutions alcooliques.

Screening des alcaloïdes

Macérer 5g de plantes séchées, broyées dans 50mL d'acide chlorhydrique 12% pendant 15mn.

Filtrer éventuellement sur coton.

Répartir le filtrat dans 4 tubes à essais.

Tube n°1 : témoin

Tube n°2 : addition de 5 gouttes de réactif de Wagner

Tube n°3 : addition de 5 gouttes de réactif de Mayer

Tube n°3 : addition de 5 gouttes de réactif de Dragendorff

Screening des flavonoïdes et leucoanthocyanes

Evaporer une solution alcoolique équivalente à 3g de drogues végétales dans un cristalliseur sur bain marie.

Refroidir à température ambiante.

Traiter avec 5ml de cyclohexane. Filtrer. Répéter l'opération jusqu'à élimination des pigments.

Dissoudre le résidu avec 30mL d'éthanol 80% puis filtrer.

Placer 3mL du filtrat respectivement dans 4 tubes à essais.

Tube n°1 : témoin

Tube n°2 : additionner quelques gouttes de NH_4OH et observer la coloration.

1- Test de Wilstater

Dans le tube n°3, additionner 0,5mL de HCl concentré, puis 3 ou 4 tournures de magnésium. Observer le changement de coloration après 10mn.

2- Test de Bate Smith

Dans le tube n°4, additionner 0,5mL de HCl concentré et porter au bain marie pendant 30mn. Laisser refroidir. Noter la coloration.

Screening des tanins et polyphénols

Evaporer la solution hydroalcoolique équivalente à 10g de drogue dans un cristalliseur.

Additionner 25mL d'eau distillée chaude. Agiter et filtrer.

Ajouter 4 gouttes de NaCl 10%.

Filtrer la solution et introduire 3mL du filtrat respectivement dans 4 tubes à essais.

Tube n°1 : témoin

Tube n°2: additionner 4 à 5 gouttes de gélatine 1% et observer l'apparition d'un précipité éventuel.

Tube n°3: additionner 4 à 5 gouttes de gélatine salée (1% de gélatine + NaCl 10%) et observer la précipitation.

Tube n°4: additionner 3 à 4 gouttes de FeCl₃ en solution méthanolique et observer le changement de coloration.

Screening des stéroïdes et triterpènes

Evaporer complètement la solution hydroalcoolique équivalente à 10g de drogue dans un cristalliseur, en utilisant un bain marie 60°C. Laisser refroidir.

Additionner 10mL d'éther de pétrole, agiter 5mn et décanner le surnageant. Répéter l'opération jusqu'à élimination des pigments.

Additionner 10mL de chloroforme et agiter pendant 5 à 10mn.

Décanner et sécher la solution avec Na₂SO₄ anhydre. Filtrer et recueillir le filtrat dans un tube à essai propre.

Diviser la solution dans 4 tubes à essais.

Tube n°1 : témoin

Tube n°2 : additionner 1 à 2ml de MeOH + 3gouttes de KOH 1N + quelques grains d'acide

1- Test de Badjet Kedde

Tube n°3 : additionner 1ml de KOH + 3gouttes d'acide 3,5-dinitrobenzoïque

2- Test de Liebermann-Burschard

Dans le tube n°4, additionner 3 gouttes d'anhydride acétique.

Agiter légèrement et ajouter une goutte de H₂SO₄ concentré.

Observer le changement de coloration immédiatement et après une heure.

Screening des saponines

Test de mousse

Mettre 1g de drogue dans un tube à essai.

Additionner 10mL d'eau distillée et agiter vigoureusement pendant 30 secondes. Placer le tube verticalement pendant 30mn.

Si la mousse mesure 30cm après 30mn, la drogue contient des saponines.

ANNEXES 2

PREPARATION DES REACTIFS

1- Réactif de Dragendorff

Solution A

Peser 1,7g de sous-nitrate de bismuth et 20g d'acide tartrique, les dissoudre dans 30ml d'eau distillée.

Solution B

Peser 16g d'iodure de potassium et les dissoudre dans 40ml d'eau distillée.

Révélation

Au moment de l'emploi, mélanger 2,5ml de A et 2,5ml de B. Ajouter 10g d'acide tartrique dissous dans 50ml d'eau distillée.

2- Réactif de Wagner

Peser 2g d'iodure de potassium et 1,27g d'iode.

Mélanger ces produits dans un erlenmeyer de 250ml et ajouter 100ml d'eau distillée.

Agiter jusqu'à dissolution complète des réactifs.

3- Réactif de Mayer

Dissoudre 1,35g de chlorure mercurique (II) dans 94ml d'eau. Ajouter 5g d'iodure de potassium. Bien agiter jusqu'à dissolution complète. Ramener à 100ml le volume total avec de l'eau distillée.

4- Gélatine

Mettre 1g de gélatine en suspension dans 100ml d'eau.

5- Chlorure de sodium à 10%

Dissoudre 10g de NaCl dans 100ml d'eau distillée.

6- Gélatine salée

Mélanger un volume de la solution de la gélatine à un volume égal de la solution de chlorure de sodium à 10%.

7- Acide chlorhydrique à 5%

Verser 95ml d'eau distillée dans une éprouvette et compléter à 100ml avec de l'acide chlorhydrique.

8- Réactif de Kedde

Peser 2g d'acide 3,5-DNTB et les dissoudre dans 100ml de MeOH.

Préparer une solution potasse normale (5,6g de KOH dans 100ml d'eau distillée)

Pulvérisation

Au moment de l'emploi, mélanger à volume égal la solution d'acide et de potasse.

9- Réactif de Keller-Killiani

Dissoudre 10g de FeCl_3 dans 100ml d'eau.

Au moment de l'emploi, mélanger 0,3ml de la solution précédente de FeCl_3 dans 50ml d'acide acétique glacial.

On prélève 3ml du mélange pour le test de Keller-Killiani

10- Chlorure ferrique à 10% dans le MeOH

Dissoudre 1g de FeCl_3 dans 10ml de MeOH en agitant et en chauffant au bain-marie jusqu'à dissolution complète.

11- Réactif de Dragendorff (MUNIER et MACHEBOEUF) [13]

Solution A

Peser 0,85g de sous-nitrate de bismuth et 10g d'acide tartrique, les dissoudre dans 40ml d'eau distillée.

Solution B

Peser 8g d'iodure de potassium et les dissoudre dans 20ml d'eau distillée.

Révélation

Au moment de l'emploi, mélanger 5ml de A et 5ml de B. Ajouter 20mL d'acide acétique puis compléter par 100mL d'eau distillée.

ANNEXES 3

PARTIE MICROBIOLOGIE

Milieu Mueller Hinton Gélosé (MHA)

- | | |
|-----------------------|------------|
| - Extrait de bœuf | 3g/l |
| - Caséine hydrolysate | 17,5g/l |
| - Amidon | 1,5g/l |
| - Agar | 15 à 20g/l |

Le mélange est agité et porté à ébullition, puis stérilisé dans un autoclave à 121°C pendant 15mn.

Colorant vital

0,7mg de thiazolyl bleu tétrazolium bromide par mL d'eau distillée.

Description des souches

- *Candida albicans* (champignon)

C'est l'espèce de levure la plus importante et la plus connue du genre *Candida*. Elle provoque des infections fongiques (candidiase ou candidose), essentiellement au niveau des muqueuses digestives et gynécologiques. C'est un organisme vivant à l'état naturel sur la peau, dans la bouche et dans le tube digestif de l'être humain.

- Bactéries à gram+

Staphylococcus aureus

C'est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Elle est responsable d'intoxication alimentaire, d'infection localisée suppurée et dans certains cas extrême, de septicémie chez les sujets débilisés (greffes, prothèses cardiaques). Elle se présente comme une coque en amas (grappe de raisin).

Bacillus subtilis

C'est une bactérie que l'on trouve habituellement dans le sol mais c'est surtout une espèce ubiquitaire. Elle n'est pas considérée comme pathogène pour l'homme mais elle peut contaminer des aliments et peut exceptionnellement, provoquer une intoxication alimentaire.

Streptococcus faecalis

C'est une bactérie commensale à Gram positif, habitant le tube digestif des humains et d'autres mammifères. Elle peut causer des infections mortelles chez l'homme et le singe, particulièrement dans un environnement hospitalier : le haut niveau de résistance naturelle aux antibiotiques de la bactérie contribue à sa pathogénicité

- **Bactéries à gram-**

Escherichia coli

C'est une bactérie intestinale des mammifères très commune chez l'être humain. Certaines de ses souches peuvent être pathogènes, entraînant des gastro-entérites, des infections urinaires, des méningites ou des septicémies.

Pseudomonas aeruginosa

Elle est pathogène, très résistante et, avec d'autres bactéries à gram-, de plus en plus souvent responsable d'infections nosocomiales. Les formes de pathologie qu'elle engendre sont diverses : infection de l'œil ; des plaies, surtout brûlure et plaies opératoires ; des urines ; gastro-intestinales et des poumons ; des méningites d'inoculation ; des septicémies.

Citrobacter freundii

Elles sont considérées comme des bactéries pathogènes opportunistes et la plupart de ces infections sont d'origine nosocomiale.

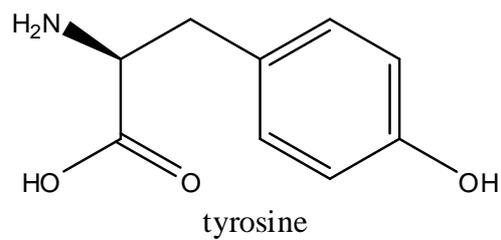
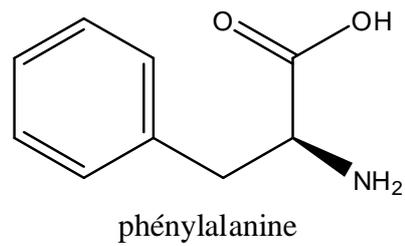
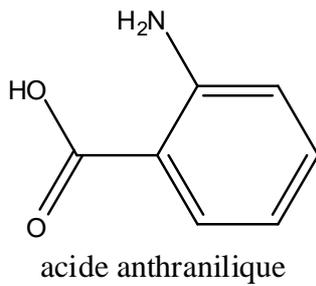
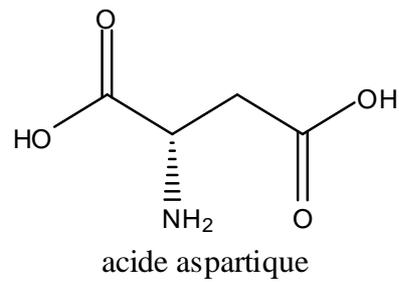
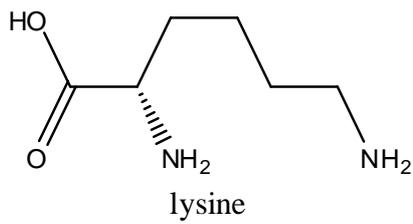
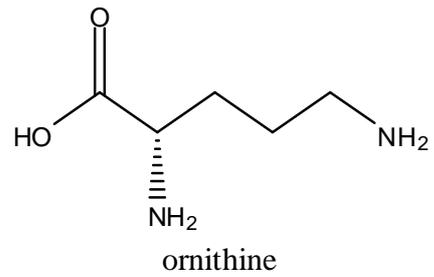
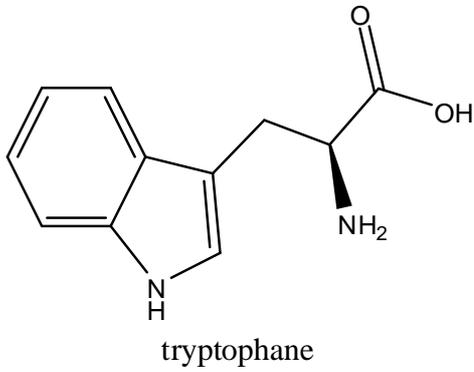
Salmonella typhi

Ce sont des entérobactéries bacilles responsables de gastro-entérites, toxi-infections alimentaires et des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes chez l'homme.

ANNEXES 4

DIFFERENTES FORMULES

Formules des acides aminés

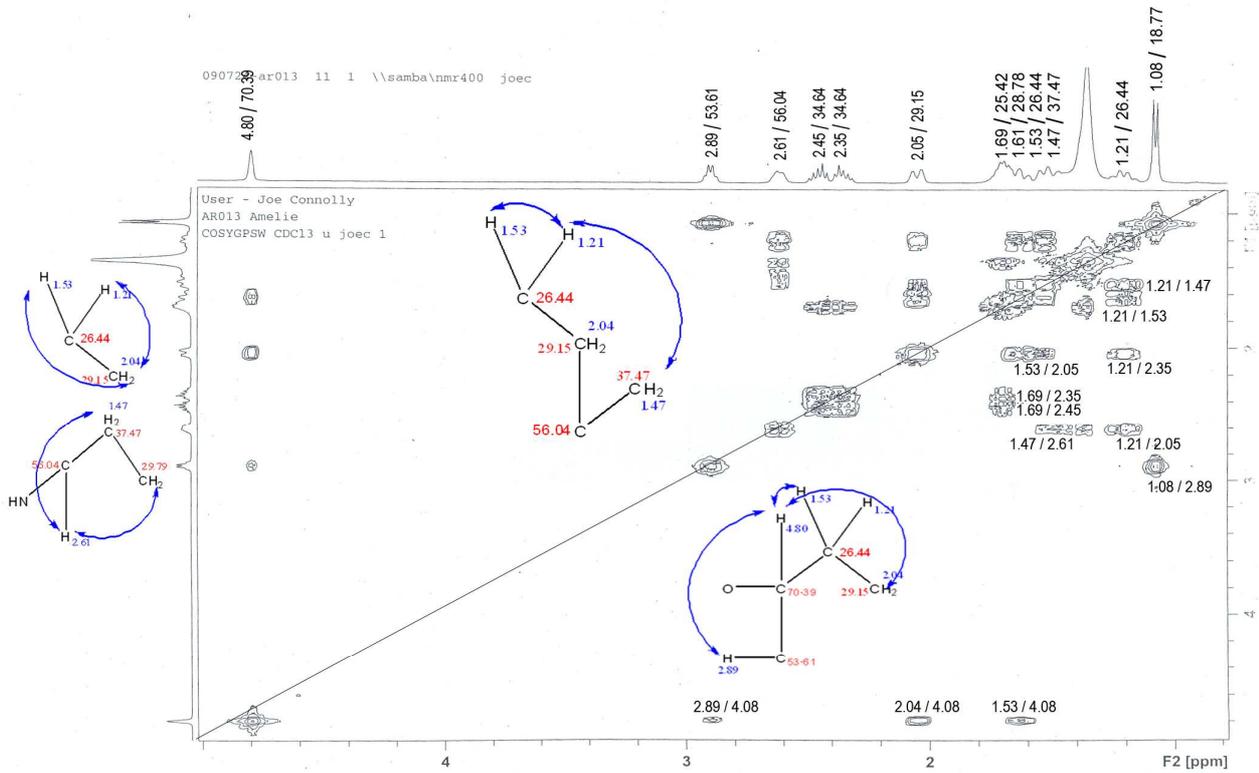


ANNEXES 5

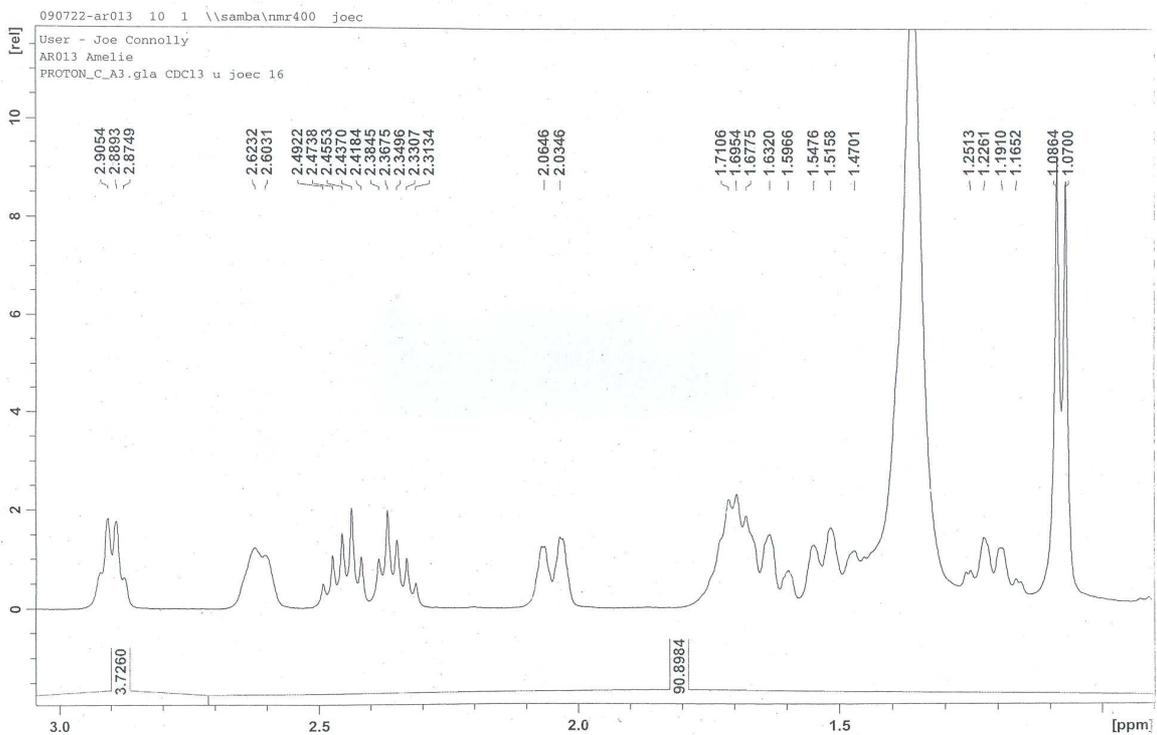
SPECTRES RMN

- ^1H
- ^{13}C
- HMBC
- HSQC
- COSY

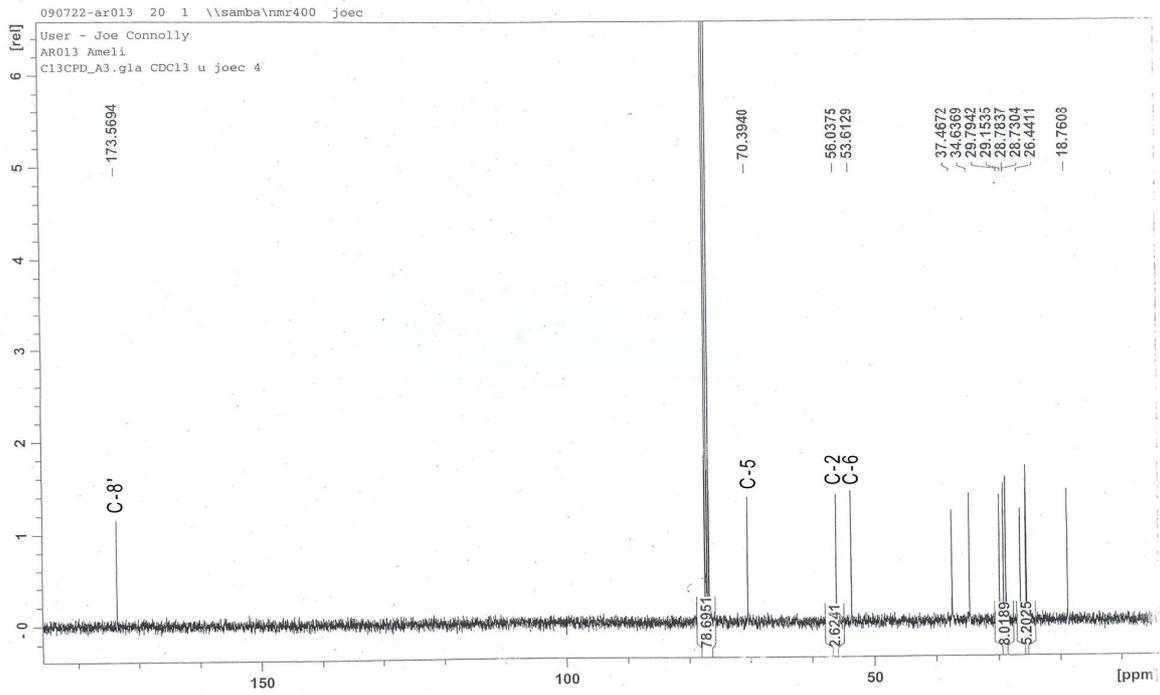
SPECTRE DE MASSE



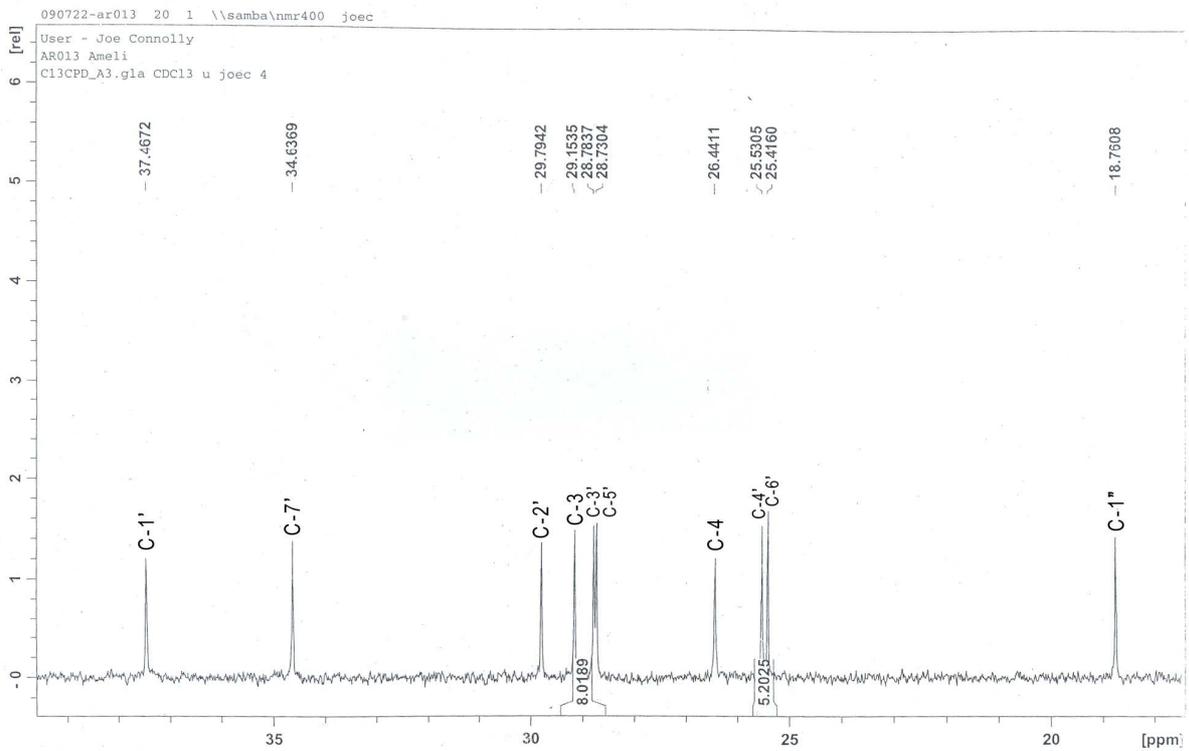
Spectre de corrélation $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY



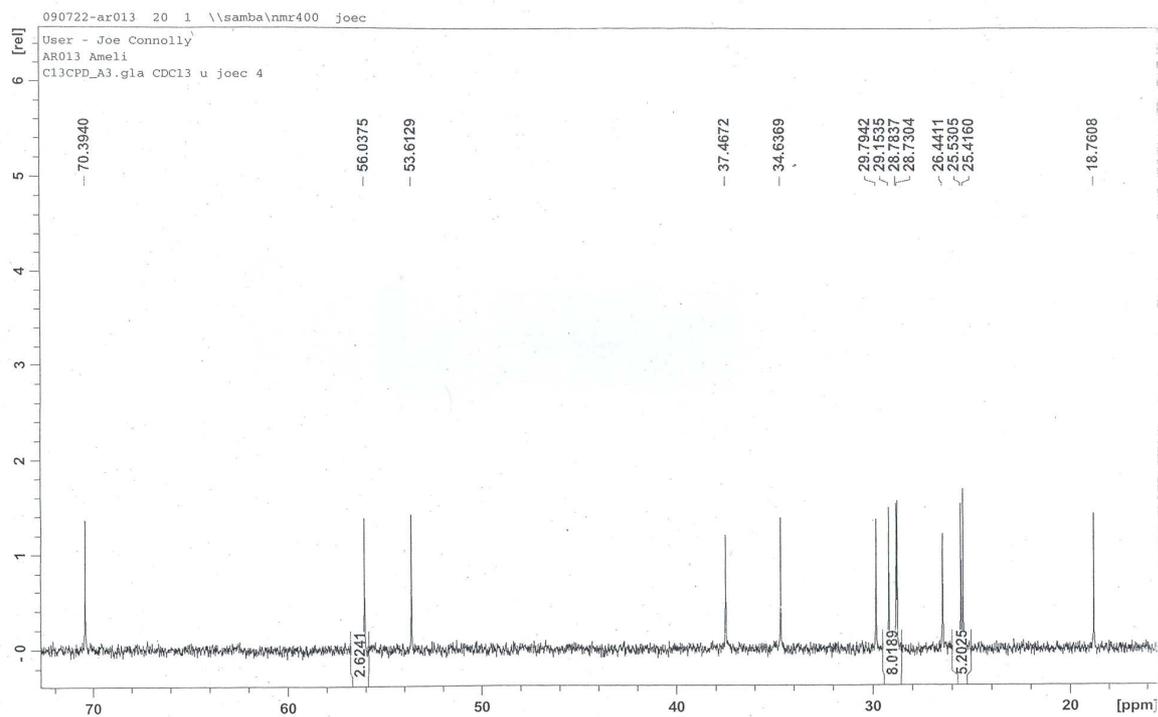
Spectre RMN ^1H zones agrandies 1,08 - 1,70ppm et 2,05 - 3,00ppm



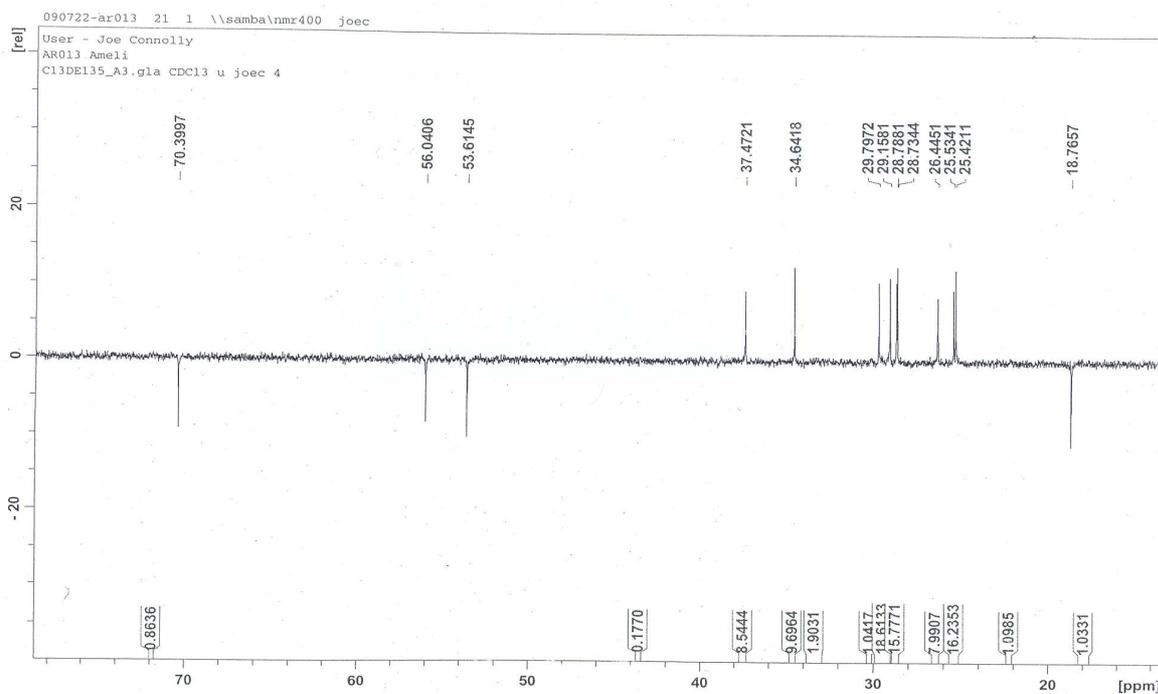
Spectre Broadband RMN ^{13}C



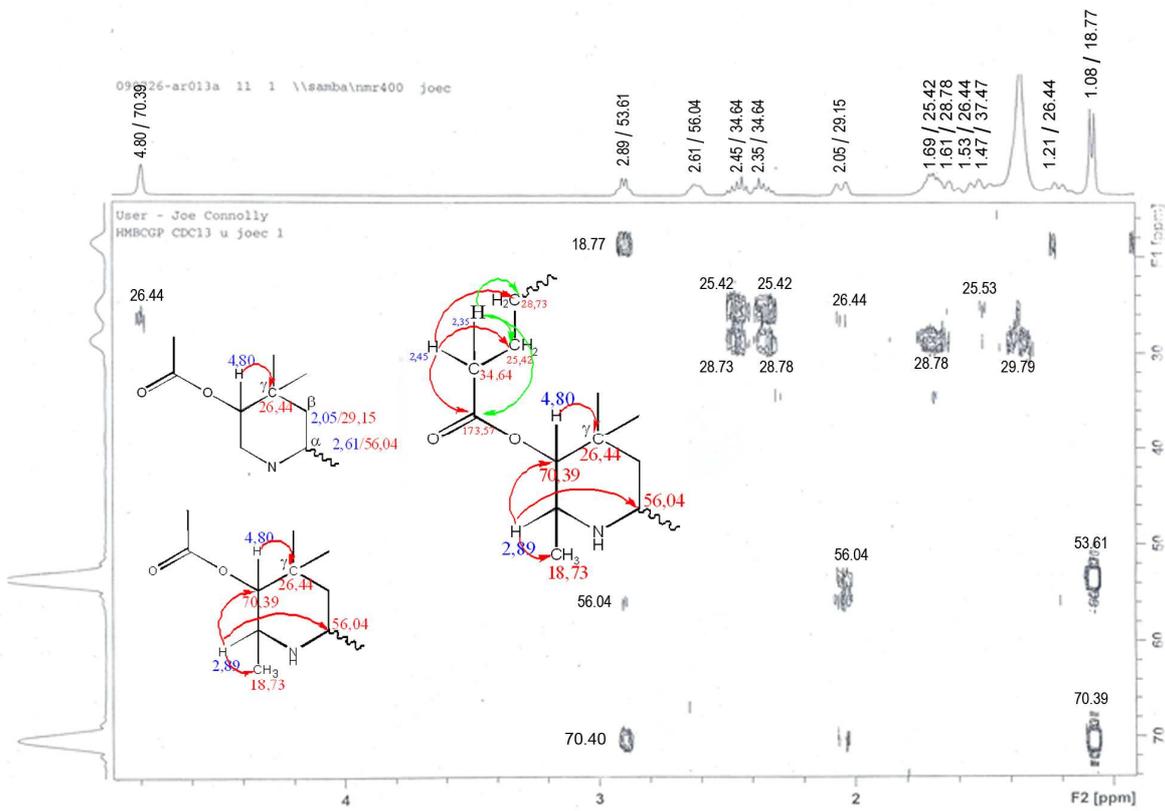
Spectre Broadband RMN ^{13}C zone agrandie 0-40 ppm



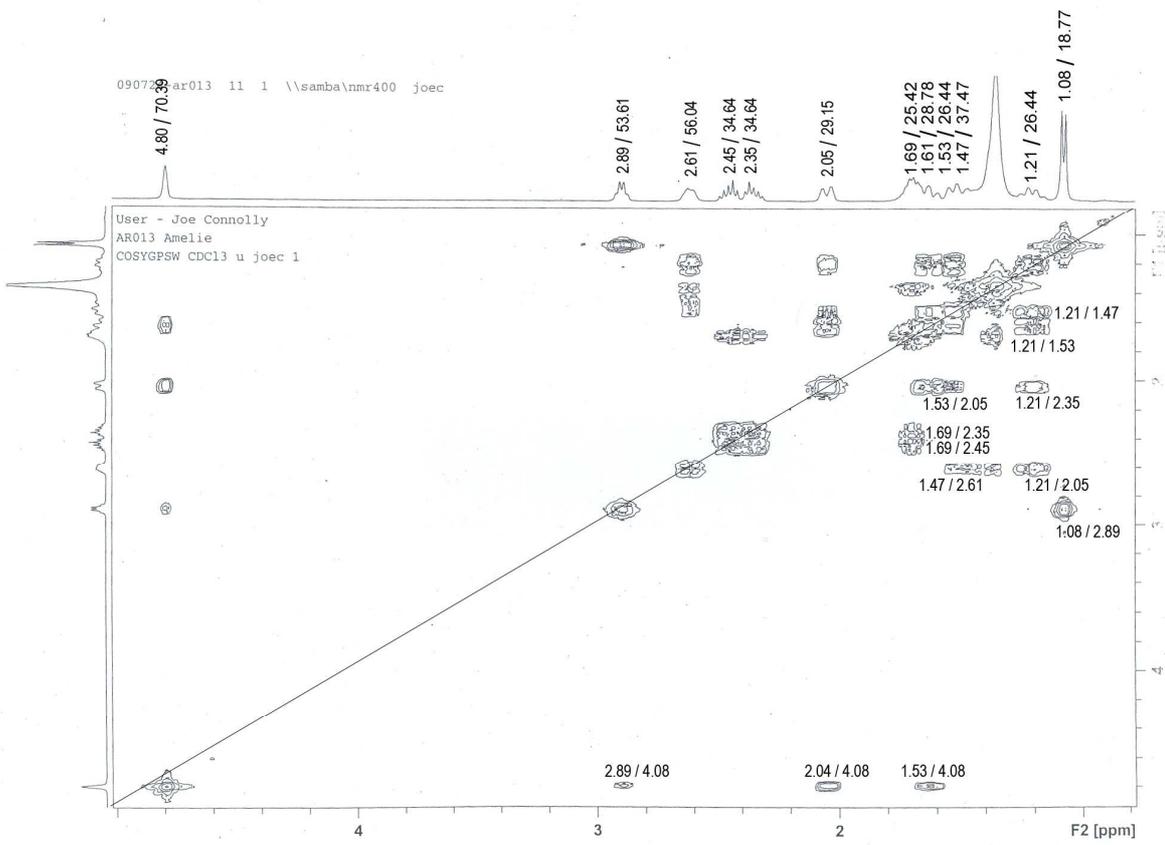
Spectre Broadband RMN ^{13}C zone agrandie 0-70 ppm



Spectre DEPT ^{13}C 135°

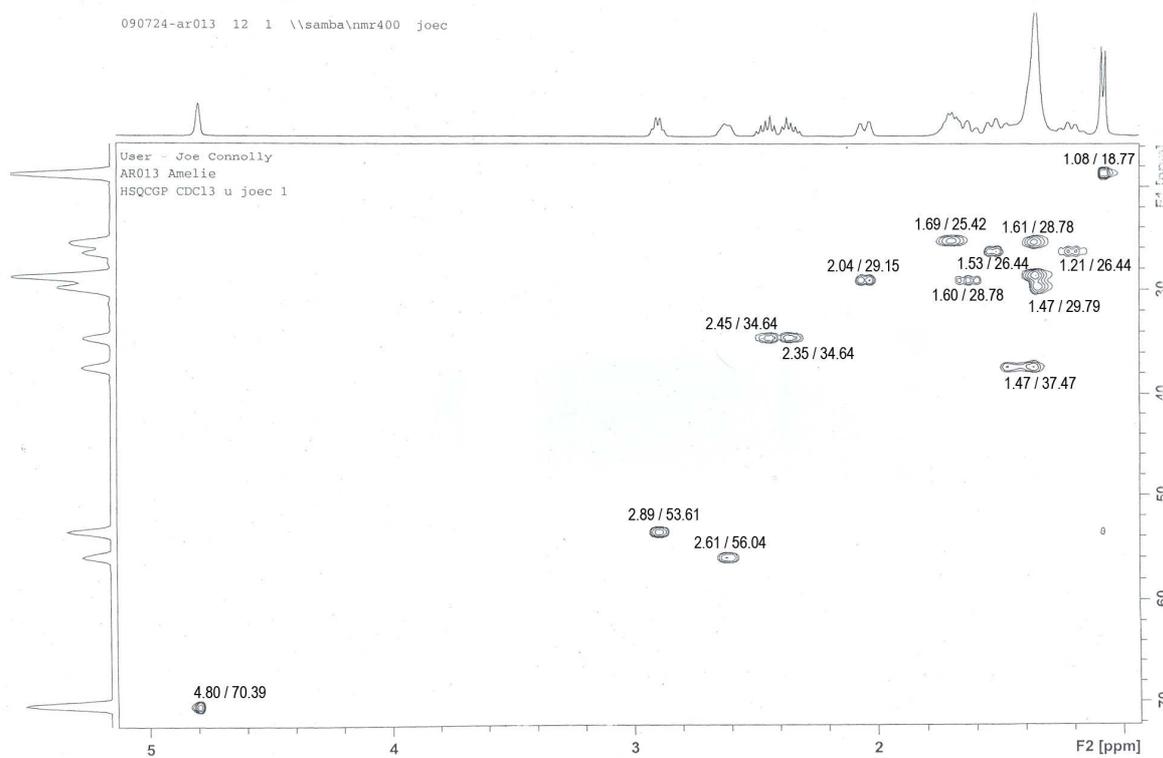


Spectre de corrélation $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMBC



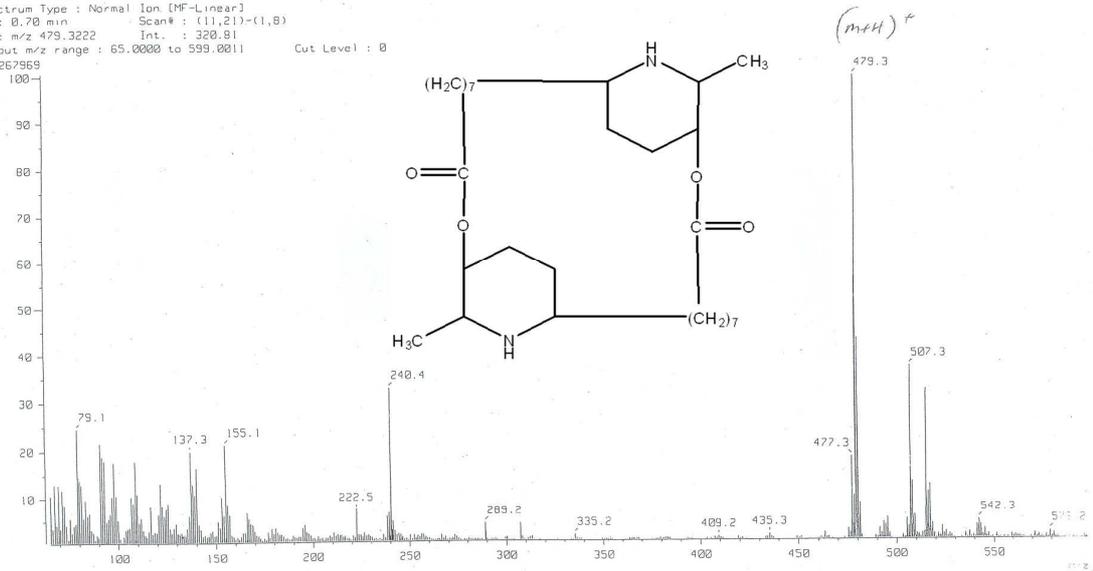
Spectre de corrélation $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY

090724-ar013 12 1 \\samba\nmr400 joe



Spectre de corrélation $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HSQC

[Mass Spectrum]
 Data : 48959-J.CONNOLLY-PR103002 Date : 28-Jul-2009 11:37
 Sample :
 Note : POSITIVE ION FAB
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
 Spectrum Type : Normal Ion. [MF-Linear]
 RT : 0.70 min Scan# : (11,21)-(1,8)
 BP : m/z 479.3222 Int. : 320.81
 Output m/z range : 65.0000 to 599.0011 Cut Level : 0
 37267969



Spectre de masse en mode FAB positif

Auteur : ANDRIANARISON Jeriarisoa Miarana

LCSN/COB - Département de Chimie Organique- Faculté des Sciences- BP 906- Université d'Antananarivo

Téléphone : +261 33 03 437 73

e-mail : anjmiarana@yahoo.fr

Titre : Contribution à l'étude chimique et biologique des feuilles de *Carica papaya* L. (Caricaceae)

Nombre de pages : 73

Nombre de tableaux : 17

Nombre de figures : 17

Nombre de schémas : 7

Mots clés : Caricaceae, *Carica papaya*, Carpaïne, Alcaloïdes, Criblage phytochimique, Fractionnement bioguidé, Spectrométrie.

Résumé : Les feuilles de *Carica papaya* L., Caricaceae, sont utilisées à Madagascar pour attendrir la viande et enlever les taches de sang sur les vêtements. Les feuilles de la plante ont été récoltées dans la commune rurale d'Itaosy, Région d'Analamanga. Les résultats des tests antibactériens et antioxydants sur l'extrait brut, l'extrait d'alcaloïdes totaux et sur certaines fractions ont été positifs. Le criblage phytochimique a permis de détecter la présence d'alcaloïdes, de triterpènes, de flavonoïdes et de tanins catéchiques. Après un fractionnement bioguidé, quatre produits notés AR-011, AR-012, AR-013 et AR-014 ont été isolés. Seuls les spectres RMN ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMBC, ^1H - ^{13}C HSQC et le spectre de masse du produit AR-013 de masse 14,3mg ont été enregistrés. Ces spectres ont permis d'établir la structure complète du produit.

Key words: Caricaceae, *Carica papaya*, Carpaïn, Alkaloids, Phytochemical screening, Bioguided fractionnement, Spectrometry.

Abstract: leaves of *Carica papaya* L. are used in Madagascar to tenderize meat and to take off blood stain on the clothes. The leaves of the plant were collected at Itaosy, Analamanga area.

The antibacterial and antioxidant test on the extracts and some fractions have shown positive results. The phytochemical screening allowed detecting the presence of alkaloids, terpens, flavonoids and tannins. Four pure products: AR-011, AR-012, AR-013 and AR-014, were isolated from the leaves of *Carica papaya*. Only the spectrometer NMR ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMBC, ^1H - ^{13}C HSQC and the mass spectrometer of AR-013 were recorded. Thus, the complete structure of the molecule has been established.

Encadreur: Madame RAHARISOLOLALAO Amélie

Professeur Titulaire

Laboratoire de Chimie des Substances Naturels et Chimie Organique Biologique (LCSN/ COB)- Département de Chimie Organique- Faculté des Sciences- BP 906- Université d'Antananarivo

Téléphone : +261 32 02 577 54. E-mail : amelie_raharisololalao@yahoo.fr