

SOMMAIRE

INTRODUCTION

PARTIE I. GENERALITES

- CHAPITRE I. Les *Lauraceae*
- CHAPITRE II. Métabolites secondaires des *Lauraceae*
- CHAPITRE III. Méthodes d'extraction des métabolites secondaires
- CHAPITRE IV. Méthodes d'isolement des principes actifs.
- CHAPITRE V. Déterminations des caractéristiques physicochimiques des principes actifs
- CHAPITRE VI. Détermination des activités biologiques
- CHAPITRE VII. Identification des structures des principes actifs.
- Conclusion partielle

PARTIE II. RESULTATS

- CHAPITRE VIII. Etudes effectuées sur le genre *Ocotea*
- CHAPITRE IX. Etudes effectuées sur le genre *Ravensara*
- CHAPITRE X. Etudes effectuées sur le genre *Cryptocarya*
- Conclusion partielle

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 1: <i>Quelques souches de bactéries utilisées pour le test d'activité antibactérienne</i> | 28 |
| Tableau 2: <i>Norme pour la lecture des résultats des tests d'aromatogramme</i> | 29 |
| Tableau 3: <i>Noms scientifique et vernaculaire des espèces du genre Ocotea étudié</i> | 35 |
| Tableau 4 : <i>Date et lieu de récolte des matériels végétaux (genre Ocotea)</i> | 35 |
| Tableau 5: <i>Caractéristiques physiques des HE des espèces du genre Ocotea</i> | 36 |
| Tableau 6 : <i>Caractéristiques chimiques des HE des espèces du genre Ocotea</i> | 36 |
| Tableau 7 : <i>Résultat de l'analyse par CPG/DIF ou CPG/SM des espèce du genre Ocotea</i> | 37 |
| Tableau 8 : <i>Résultat du criblage phytochimique des espèces du genre Ocotea</i> | 39 |
| Tableau 9 : <i>Activité larvicide des métabolites secondaires (volatils) des espèces du genre Ocotea</i> | 40 |
| Tableau 10 : <i>Toxicité sur souris des métabolites secondaires volatil des espèces du genre Ocotea</i> | 40 |
| Tableau 11 : <i>Toxicité sur les têtards de grenouille des métabolites secondaire (extrait non volatil et volatil)</i> | 41 |
| Tableau 12 : <i>Activité antibactérienne des métabolites secondaires du genre Ocotea. (Diamètre des halos d'inhibition (mn) et sensibilité des germes)</i> | 42 |
| Tableau 13 : <i>Effets des constituants volatils des HE</i> | 43 |
| Tableau 14 : <i>CMI des HE des espèces du genre Ocotea</i> | 44 |
| Tableau 15 : <i>d'activité antioxydants des HE des espèces du genre Ocotea</i> | 44 |
| Tableau 16 : <i>Résultat du criblage phytochimique des espèces du genre Ravensara</i> | 52 |

| | |
|---|----|
| Tableau 17 : Caractères physico-chimiques des HE de <i>Ravensara laevis</i> | 53 |
| Tableau 18 : Activités antimicrobienne et antifongique des extraits <i>R. anisata</i> et de <i>R. laevis</i> (diamètre des halos en mm et sensibilité)..... | 54 |
| Tableau 19 : Résultats des criblages phytochimiques effectués sur les deux espèces..... | 56 |
| Tableau 20 : Caractéristiques physiques des HE des espèces du genre <i>Cryptocarya</i> | 57 |
| Tableau 21 : Caractéristiques chimiques des HE des espèces du genre <i>Cryptocarya</i> | 57 |
| Tableau 22 : Résultats des analyses par CPG des HE des espèces du genre <i>Cryptocarya</i> | 58 |
| Tableau 23 : Activité antimicrobienne des métabolites secondaire du genre <i>Cryptocarya</i> (Diamètre des halos d'inhibition (mm) et sensibilité des genres)..... | 60 |
| Tableau 24 : CMI des HE de <i>C. crassifolia</i> (écorce)..... | 61 |

LISTE DE FIGURE

| | |
|---|----|
| Figure 1 : <i>Distribution géographiques des Lauracées</i> | 06 |
| Figure 2 : <i>camphre</i> | 11 |
| Figure 3 : <i>camphernone</i> | 11 |
| Figure 4 : <i>campherenol</i> | 11 |
| Figure 5 : <i>estragole</i> | 11 |
| Figure 6 : <i>crykomizine</i> | 12 |
| Figure 7 : <i>laudanidine</i> | 12 |
| Figure 8 : <i>crychine</i> | 12 |
| Figure 9 : <i>(+)-piperitole</i> | 13 |
| Figure 10 : <i>licarine-B</i> | 13 |
| Figure 11 : <i>kurzilactone</i> | 14 |
| Figure 12 : <i>Structure des chémotypes des HE des feuilles de R. anisata</i> | 46 |
| Figure 13 : <i>Structure des composés isolés de l'extrait CH₂Cl₂ des écorces et des feuilles de R. anisata</i> | 47 |
| Figure 14 : <i>Structure des composés isolés de l'extrait MeOH des feuilles de R. anisata</i> | 48 |
| Figure 15 : <i>Structure des composés isolés de l'extrait MeOH des écorces de R. anisata</i> | 48 |
| Figure 16 : <i>Structure des composés isolés de l'extrait CH₂Cl₂ des écorces de tige de R. crassifolia</i> | 50 |
| Figure 17 : <i>Structure des composés isolés de l'extrait MeOH des écorces de tige de R. crassifolia</i> | 50 |

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN** : Acide DésoxyriboNucléique
- AFNOR** : Association Française de NORmalisation
- ANP** : Acétate Neutre de Plomb
- CO₂** : Dioxyde de Carbone
- CCM** : Chromatographie sur couche mince
- CL** : Concentration Létal
- CMI** : *Concentration Minimal d’Inhibition*
- CPC** : *Chromatographie de Partage Centrifuge*
- CPG** : *Chromatographie en Phase Gazeuse*
- CLHP** : *Chromatography Liquid High Performance*
- DIF** : *Détecteur à Ionisation de Flamme*
- DL** : *Dose Létal*
- HE** : *Huile Essentielle*
- HCl** : *Chlorure d’Hydrogène*
- HPLC** : *High Pressure Liquid Chromatography*
- IA** : *Indice d’acide*
- IE** : *Indice d’ester*
- IPM** : *Institut Pasteur de Madagascar*
- SM** : *Spectrométrie de Masse*
- LPLC** : *Low Pressure Liquid Chromatography*
- MeOH** : méthanol
- MPLC** : *Middle Pressure Liquid Chromatography*
- PPM** : *Partie Par Million*
- UV** : *Ultra-Violet*

GLOSSAIRES

Apicule : extrémité (d'une feuille par exemple)

Chémotypes : Plantes d'une même espèce végétale donnant des huiles essentielles de compositions différentes

Péricarpe : paroi du fruit

Décoction : procédé consistant à faire bouillir une substance dans un liquide, pour en extraire les principes solubles

Glabres : Dépourvu de poils

Penninerves : se dit d'une feuille dont la nervure principale porte, de part et d'autre, des nervures secondaires disposées comme les barbes d'une plume

Péricarpe : paroi du fruit

Staminodes : étamine stérile

Stipule : petit appendice foliacé ou membraneux, à la base du pétiole de certaines fleurs

Tomenteux : couvert d'un tomentum c'est à dire de poils nombreux, mous et enchevêtrés, cachant entièrement la surface comme un feutre

Verticille : ensemble d'organes disposés en cercle à un même niveau

LISTE DES ANNEXES

Annexe I : Description botanique des six espèces du genre *Ocotea*

Annexe II : Description botanique des trois espèces du genre *Ravensara*

Annexe III : Description botanique des deux espèces du genre *Cryptocarya*

ClicCartes.com

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Depuis l'apparition de l'homme sur terre et son contact accidentel avec la nature et sa lutte pour y survivre, l'être humain s'efforce d'essayer d'apprendre ses secrets. Ses motivations sont de satisfaire ses besoins vitaux comme manger, boire, se vêtir mais aussi ses besoins médicaux. Ainsi, il a trouvé dans cet espace le seul refuge pour y répondre.

Cependant, parmi les obstacles rencontrés à cette époque, il y a celui de savoir comment exploiter les choses existantes autour de soi pour faire face aux maladies.

L'homme a donc trouvé chez les plantes la seule manière de traiter certaines maladies : par des essais ou par leur utilisation à l'état naturel que ce soit par le goût ou à l'aide d'animaux possédant les caractères instinctifs envers les plantes.

Il est par ailleurs aujourd'hui reconnu que les plantes constituent une source importante de molécule bioactives.

Pour le cas de Madagascar qui est un pays en voie de développement mais fortement riche en flore, la valorisation de ces principes actifs d'origine naturelle représente un potentiel économique énorme.

Cependant, ces composés bioactifs doivent d'abord être séparés de leur matrice végétale d'origine. L'obtention de ces molécules nécessite de nombreuses étapes souvent longues et coûteuses, telles que l'extraction, l'isolement et des essais bio guidés ainsi que leur identification.

Notre travail consiste à faire un inventaire des études effectuées sur les plantes endémiques de Madagascar, afin de mettre à la disposition des chercheurs un outil de décision utile pour les recherches ultérieures. En effet, nous avons l'impression que chaque équipe fait des recherches sur une plante sans savoir vraiment ce que les autres ont déjà effectuées sur cette plante. Notre choix s'est porté sur la famille *Lauraceae*, pour les raisons suivantes :

- L'endémicité de la plante (espèce) de cette famille.

- L'importance de certaines plantes de cette famille tant au point de vue médicinale que commerciale.

Cette étude intitulée « LES LAURACEES ENDEMIQUES DE MADAGASCAR : ETAT DE LIEU DES ETUDES EFFECTUEES » comporte deux parties essentielles :

- La première partie est consacrée aux généralités où nous donnerons une description botanique succinctes des plantes de la famille des *Lauraceae* suivi des différentes méthodes d'extraction, de détermination des caractéristiques physico-chimiques, des activités biologiques et de détermination de structures des métabolites secondaires ;
- Et la seconde partie est réservée à l'énumération des études que nous avons recensées à partir des documents que nous avons eus à disposition et celle que nous avons trouvés sur le net.

PREMIERE PARTIE

GENERALITES

CHAPITRE I : LA FAMILLE DES LAURACEES

I-1- Description botaniques

Les *Lauraceae* dit Lauracées sont généralement des arbres ou arbrisseaux. Elles sont souvent toujours vertes et ces sont des bois reconnaissables par leur forte odeur aromatique [01].

Ils possèdent les caractéristiques botaniques suivantes :

- Feuilles alternes et disposé en spirales ou rarement opposés à subopposées, simple, entières penninerves au moins souvent triplinerves, portant parfois des domatiques aux aisselles des nervures secondaires, stipule nulle.
- Inflorescences généralement en pennicules axillaires.
- Fleurs petites (2-8 mm de diamètre), habituellement verdâtre, parfois jaune ou blanche, bi ou unisexuées et le plus souvent trimère.
- Etamine en quatre verticilles, la quatrième avec une paire de glande à la base
- Fruit est une grande baie charnue, à une graine [01], [02].

I-2-Classification systématique

Classification APG III 2009 [01 W] :

Clade : Angiosperme

Clade : Magnoliidées

Ordre : Laurales

Famille : Lauraceae

I-3-Répartition géographique [03].

Les *Lauraceae* est une famille de plantes angiospermes, comprenant 2 500 à 3 500 espèces réparties en 54 genres distribuées dans le monde.

La famille est pantropicale et quelques fois subtropicale.

Les zones colorées en rouge dans la figure suivante représentent les régions où on peut rencontrer les Lauracées.



Figure 1: Distribution géographique des Lauracées [03].

I-4- Les Lauracées de Madagascar [02] [03].

L'île de Madagascar abrite un bon nombre de genres et espèces de la famille des Lauraceae. Voici une récapitulation de six genres recensés dans notre flore.

- Fruits à base nue, ou à tépales persistants mais non accrescents : genre *Appolonias* (endémique, 6 espèces)
- Fruits mur à 6 cloisons (parfois incomplètes au sommet) ; cotylédons presque entièrement 6-partits : genre *Ravensara* (endémique, 27 espèces)
- Fruits mur non cloisonné, cotylédons indivis : genre *Cryptocarya* (endémique, 8 espèces)
- Fruit tétramères : genre *Potameia* (endémique, 4 espèces)
- Anthères à 4 logettes : genre *Ocotea* (endémique, 18 espèces)

- Lianes parasites, filiformes, à feuilles réduites à des petites éculles : genre *Cassytha* (1 espèce)

En outre, il existe d'autres espèces de cette famille qui sont cultivées ou parfois subspontanées dans la flore Malagasy comme le *Cinnamomum camphora*, *Persea americana*, ...

I-5- Description des trois genres de la famille de Lauracées étudiés dans la littérature [02] [03]

Lors de notre recensement, on a pu remarquer que trois genres de la famille des Lauracées sont souvent les plus étudiés.

Ces sont le genre *Cryptocarya*, le genre *Ravensara* ainsi que le genre *Ocotea*.

I-5-1- Le genre *Cryptocarya*

La forêt d'Analamazaotra regroupe la plupart de ces espèces, ainsi que sur les hautes terres, sur le plateau du Tampoketsa, à Diégo et dans le sud-est. Les rives de certaines rivières comme celle de Mangoro, de l'Onive abritent les autres espèces.

Arbres ou arbustes à feuille alternes ou opposées, coriaces et glabres chez les espèces Malagasy. Fleurs hermaphrodites, disposées en panicules axillaires-terminales, sans involucre, à tube distinct, ordinairement grêle et brusquement élargi en périanthe à 6 tépales égaux au subégaux, dressés-étalés, à 9 étamines fertiles, disposés en 3 rangs (les 3 étamines internes stériles, chez *Cryptocarya perrieri*), à anthères grandes, à 2 logettes ; les loges des 6 étamines externes introsses, celles des 3 étamines externes ou externes latérales ; les logettes s'ouvrant de bas en haut ; les connectifs souvent prolongés, à filets distincts ou nuls ; les filets des trois étamines internes à deux glandes sessiles ou stipitées, basilaires (souvent un peu séparées des filets). Staminodes du 4^{em} verticille ordinairement bien développés, ovales, aigus chez les espèces Malagasy, souvent stipités.

Ovaire inclus dans le tube, glabre chez les espèces Malagasy, généralement ellipsoïdal, à style long et grêle à stigmate distinct ou nul (chez les espèces Malagasy).

Fruit ellipsoïdal ou globuleux, complètement enveloppé par le tube élargi de la fleur ne laissant subsister qu'un petit trou au sommet.

Exocarpe généralement mince et crustacé, libre ou adhérent au réceptacle. Cotylédons plan-convexes, larges, plumule et radicule apicales (ou subapicales chez *Cryptocarya scintillans*), petites. Environ 100 espèces, de toutes les chaudes du globe.

I-5-2- Le genre *Ravensara*

Arbre ou arbrisseaux de feuille interne. Fleur hermaphrodites, groupées en panicules axillaire-subterminales (involucre nul), à tube distinct et ordinaire grêle. Brusquement élargi en périanthe à 6 tépales égaux ou subégaux, dressée-étalés, à 9 étamines fertiles, groupées en trois rangs, à anthère grandes, à 2 logettes ; les loges des 6 étamines externes introrses, celles des 3 étamines internes s'ouvrant à l'extérieur (les loges s'ouvrant par valves de bas en haut), à connectifs souvent prolonger, à filet distinct ou courts ; les filets des 3 étamines internes garnis de glande basilaires sessiles ou stipitées de chaque côté.

Staminode de 4^{èm} rang distinct, ovales-aigus, généralement stipités. Ovaire glabre, supère, ellipsoïdal ou ovoïde, à style et stigmat distincts.

Fruit globuleux ou presque, complètement entouré par le réceptacles accru et formant à l'intérieur 6 cloisons refoulant le péricarpe (les fausses cloisons n'atteignant pas toujours le sommet) ; péricarpe mince, entourant un embryon charnu à cotylédons trilobés (une partie dans chacune des fausses loges des fruits) ; radicules courte, supère.

Le genre *Ravensara* est utilisé comme remède contre la grippe et les diverses formes de maux de tête.

I-5-3- Le genre *Ocotea*

Arbre ou arbrisseaux de feuille alternes ou subopposées, glabres ou poilues, penninerves ou plus rarement subtriplinerves. Panicules, rarement grappes, axillaire ou subterminales, à fleur nombreuse ou peu nombreuses, à bractées petites et caduques.

Fleur hermaphrodites (chez les espèces Malagasy) ou dioïques, à réceptacle plus ou moins développé en tube, 6 tépales égaux ou subégaux. Etamine fertiles 9, en trois extrorsés latérale ou extrorsés, à filet minuscule de glabres sessiles ou subsessiles à la base.

Anthères à 4 loges superposées par paires. Staminodes petits, en forme de filets ou nuls. Ovaire ovoïde ou ellipsoïdal, glabre ou poilu, à style distinct et à stigmate discoïde ou capitellé.

Fruit entouré à la base d'une cupule ordinairement hémisphérique, à bord tronqué, rarement la cupule aplatie et à tépales persistant (*Ocotea madagascariensis*). Cotylédons plan-convexes ; larges, à plumule et radicule petites, incluses apicales. Environ 270 espèces, d'Amérique tropicale et subtropicale, d'Afrique tropicale et australe et de région Malagasy.

CHAPITRE II : METABOLITES SECONDAIRES DES LAURACEAE

Dans le monde végétal, les molécules naturellement synthétisées peuvent être classifiées en deux grandes catégories.

- Premièrement, il y a les composés qui sont produits dans toutes les cellules et qui jouent un rôle central dans le métabolisme et la reproduction de ces cellules, ces molécules comprennent en général les acides nucléiques, les acides aminés communs, les acides gras et les sucres. Ils sont connus sous le nom de métabolites primaires.
- Deuxièmement, il y a les molécules qui peuvent être parfois caractéristiques de certaines familles et/ou espèces végétales et qui ne sont pas indispensables à la survie de la plante. Ces molécules correspondent aux métabolites secondaires qui peuvent être classés en trois grandes groupes : les terpénoïdes, les composés phénoliques, les alcaloïdes. Ces métabolites secondaires, bio-synthétisés sont en réponse à un stress biotique et/ou abiotique. Elles ont la particularité d'avoir des effets biologiques sur d'autres organismes [04].

Comme mentionné dans les paragraphes précédents, ces molécules sont synthétisées par les plantes en réponse à la variation de leur environnement proche. Leur teneur peut donc être fortement influencée au sein de la plante avec parfois des localisations spécifiques.

Ainsi, cette partie de travail consiste à donner la description phytochimique des molécules qu'on rencontre souvent chez les *Lauraceae*, particulièrement ses principaux métabolites secondaires.

II -1- Les principaux métabolites secondaires des *Lauraceae*

II-1-1- Les constituants volatiles (huiles essentielles) [01] [04] [05] [06]

Presque tous les *Lauraceae* produisent des HE (Huile Essentielles) et les quantités produites sont variables en fonction de l'espèce et de l'organe étudiée. Il est essentiel de noter que la composition chimique des HE dépend du chémotype, de l'environnement, du cycle végétatif, de la partie de la plante utilisée et des procédés d'obtention de l'HE.

Il semble que les *Lauraceae* produisent des HE riches en monoterpènes et en dérivés du phénylpropane. Il est aussi possible de trouver les sesquiterpènes.

Dans ce chapitre, nous nous limiterons à citer les essences des espèces les plus connues ou contenant des composés caractéristiques de la famille.

La camphrier (*Cinnamomum camphora*) produit une HE contenant de nombreux monoterpènes dont le produit majoritaire est le camphre. Des sesquiterpènes ont été également isolés dont la camphérone et le campherenol. [01]

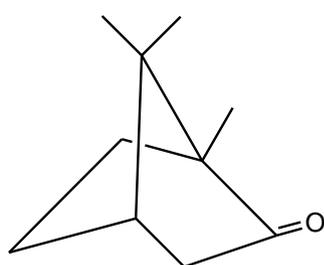


Figure 2 : Camphre

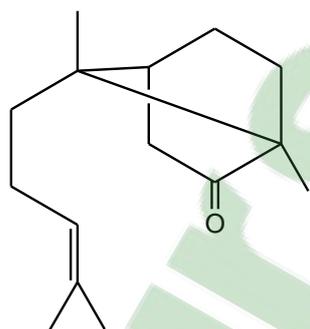


Figure 3 : Camphérone

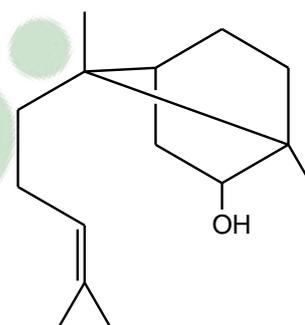


Figure 4: Campherenol

L'essence des feuilles de l'avocatier (*Persea americana*) présente une composition chimique variée selon les divers sous genre et espèce du genre *Persea* : on remarque que l'estragole est toujours présent dans ces essences, bien qu'à des teneurs variables. [01]

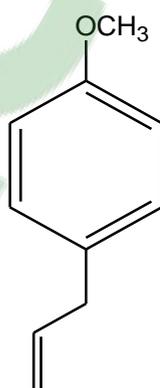


Figure 5 : estragole

L'essence du Laurier (*Laurus nobilis*) présente un mélange de monoterpènes classique (α - et β -pinène, cinéol, terpinéol, citral) et des sesquiterpènes [01]

Enfin, les feuilles de *Ravintsara* dont le nom scientifique est *Cinnamomum camphora* donne une HE caractérisée par sa forte teneur en 1,8 cinéole à une odeur fraîche et camphrée.

II-1-2-Les constituants non volatils

II-1-2-1- Les alcaloïdes [01] [07]

Les alcaloïdes sont des molécules organiques d'origine naturelle et de distribution restreinte. Elles contiennent un ou plusieurs atomes d'azotes, inclus dans un système hétérocyclique doué des propriétés toxiques et pharmacologiques.

Les alcaloïdes forment une classe importante de la famille des *Lauraceae*.

La crykonizine qui est une dérivée de benzylisoquinoléine est isolée de *Cryptocarya konishii* ainsi que la laudanidine dérivé du benzyltétrahydroisoquinoléine est obtenue à partir du *Cryptocarya amygdalina* Nees [01].

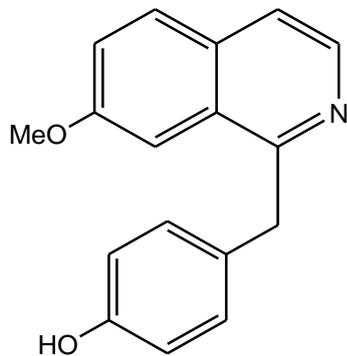


Figure 6 : Crykomizine

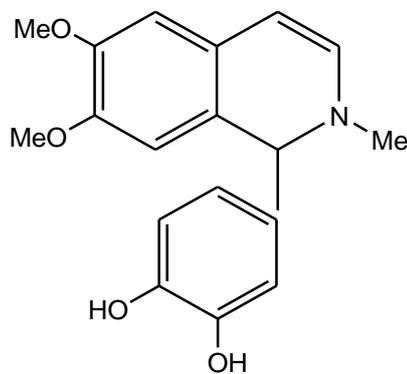


Figure 7 : laudanidine

La crychine isolée de *Cryptocarya chinensis* Hemsl est un alcaloïde de type pavine [08]

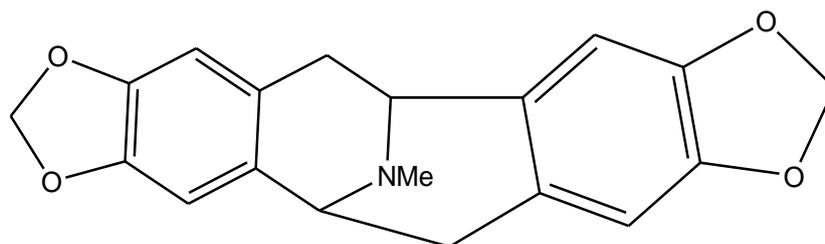


Figure 8 : Crychine

II-1-2-2- Les composés phénoliques

- Les flavonoïdes [01] [07]

Le flavonoïde est le terme générique pour des composés ayant un squelette à 15 carbones, qui, à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles.

Ils ne constituent pas une classe de substance typique de la famille des Lauraceae, mais ils y sont également présents. L'essence de *Laurus nobilis* est constituée par le kaempférol-3-O-d-(2',4'-di-Z-coumaroyl) –rhamnoside.

- Les lignanes et réolignanes [01]

Les lignanes constituent probablement une des classes chimiques les plus importantes de la famille des *Lauraceae*.

On a isolé à partir des essences des écorces d'*Ocotea usambarensis* le (+) - piperitol ainsi qu'à partir de *Nectandra turbacensis*.

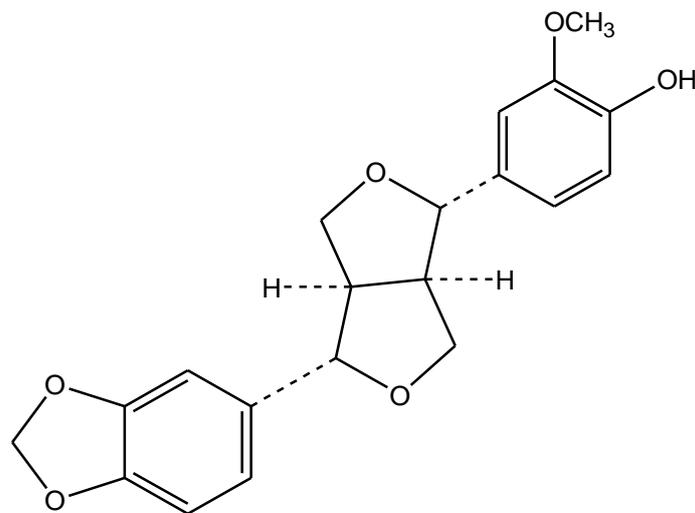


Figure 9 : (+)-piperitol

Les néolignanes sont également une classe chimique importante des Lauraceae.

La licarine-B, l'eusindérine et la méthoxycannelline-A sont des néolignanes isolés du genre *Aniba*.

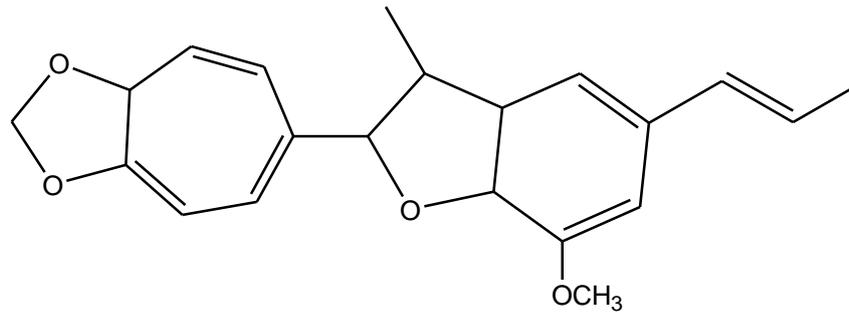


Figure 10 : Licarine-B

- Les tannins [01] [07]

Ce sont des composés complexes, hydrosolubles et à saveur astringente. On les trouve surtout dans les bois et l'écorce de nombreux arbres de la famille des *Lauraceae*.

II-1-2-3- Autres composés [01]

Différentes dérivées de benzophénones ou d' α -pyrones ont été isolées à partir des différentes espèces de *Cryptocarya*.

A titre d'illustration, la kurzilactone a été isolée de *Cryptocarya kurzii*.

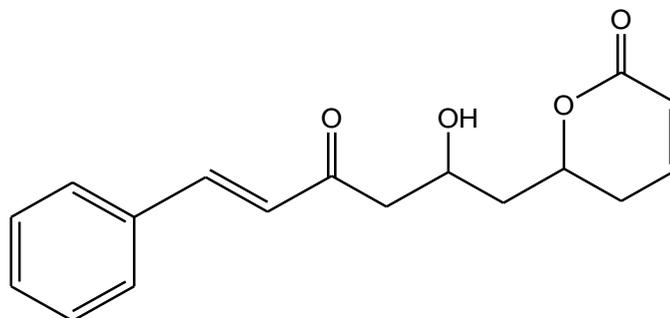


Figure 11 : Kurzilactone

II-2- Les activités biologiques [01]

Il est difficile de déceler des effets particuliers typiques de la famille car les activités biologiques décrites pour les extraits ou les substances pures isolées de *Lauraceae* sont nombreuses et tellement diverses.

On remarque que les HE ont souvent des activités antimicrobiennes ou antifongiques. A titre d'illustration, le (+)-pipéritol isolé de *Ocotea usambarensis* inhibe la croissance de *Cladosporium cucumerinum*.

CHAPITRE III : METHODE D'EXTRACTION DES METABOLITES SECONDAIRES

Dans cette parties, les méthodes d'extraction des métabolites secondaires sont exposées. Une étape commune primordiale est indispensable avant l'extraction des constituants volatils c'est-à-dire les HE et l'extraction des constituants non volatils. Ainsi il est essentiel de savoir que la méthode d'extraction des HE est différente à celui de l'extraction des constituants non volatils.

III-1- Préparation du matériel végétal

III-1-1- Indentification de la plante

L'indentification correcte de la plante doit être effectuées par des spécialistes. En effet, il est difficile de distinguer les espèces lorsqu'elles sont très proches ou se ressemblent. Il faut aussi avoir à disposition tout un arsenal et avoir recours à la compétence des botanistes.

III-1-2- Récolte et séchage du matériel végétal

Après l'identification de la plante, sa récolte ne pose pas de problème. Pour éviter la raréfaction de l'espèce même sa disparition au cas où sa culture serait difficile, il faut éviter une récolte à grande échelle.

Concernant le séchage, il convient de prendre certaines précautions pour limiter les risques d'altération des principes actifs et la formation d'artefacts : un séchage à l'ombre s'avère plus judicieux qu'une exposition au soleil. La température ne doit pas dépasser en général 40°C lors du séchage.

III-1-3- Préparation proprement dit du matériel végétal

- Pour l'extraction des constituants volatils : [09]

Le matériel végétal est préalablement réduit ou découpé en morceaux (que ce soit feuilles ou écorces)

- Pour l'extraction des constituants non volatils [01]

Le matériel végétal est préalablement réduit en poudre par un broyage mécanique afin d'obtenir un rendement maximum en extrait.

III-2- Extraction des huiles essentielles :

III-2-1- Définition et caractéristique de l'HE [09]

On appelle communément « essences » ou huiles essentielles des mélanges de composés organiques renfermant les principes odorants volatils contenus dans les plantes et conférant à celles-ci leurs odeurs.

Généralement, les huiles essentielles se présentent sous forme de liquides concentrés, faiblement colorés, lipophiles, hydrophobes, de densité inférieure à celle de l'eau à l'exception de quelques essences dites « huiles lourdes » comme celles du girofle.

Il faut distinguer les huiles essentielles des huiles fixes (huile de tournesol, de soja ...), ainsi que des graisses contenues dans les végétaux. Seules sont volatiles les huiles essentielles, qui s'opposent par ce caractère aux huiles fixes et aux graisses, dont elles diffèrent en outre par leurs propriétés organoleptiques (couleur, aspect, saveur, odeur), leurs caractères physiques (densité, indice de réfraction, pouvoir rotatoire, solubilité) et leurs propriétés chimiques (composition chimique, indice d'acide, indice d'ester, teneur en phénol).

III-2-2- Techniques d'extraction des HE [03] [09] [10] [11]

On distingue deux grandes catégories de méthode d'extraction :

- Les méthodes d'extraction classiques ou courants comme : l'expression, l'enfleurage, l'hydro distillation et l'entraînement à la vapeur ;
- Les méthodes des extractions modernes comprenant, l'extraction aux solvants volatils, l'extraction par le dioxyde de carbone supercritique et la distillation assisté au four à micro- onde

III-2-2-1- Méthodes d'extraction classiques

- L'expression [07]

C'est un technique la plus simple pour récupérer les HE notamment du l'écorce ou des fruits des Hespéridés (citron, orange, pamplemousse). Cette méthode consiste en un pressage mécanique du péricarpe frais des agrumes puis un courant d'eau

froide entraîne l'huile essentielle. Les huiles essentielles surnagent et sont recueillies par simple décantation ou par centrifugation.

- Enfleurage [02W]

C'est une méthode qui se rapproche de l'extraction par solvant volatils par son principe, mais ici à la place du solvant, on utilise des graisses qui représentent une forte affinité pour les composés odorants. Elles se reposent par l'absorption des HE par un corps gras. Elle est utilisée pour l'extraction des HE des fleurs très fragile.

On distingue l'enfleurage à froid et l'enfleurage à chaud. Pour la dernière, la graisse est portée à une température de 60°C et 70°C.

- L'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur [09]

Ces méthodes sont basées sur une codistillation d'huiles essentielles et de vapeur d'eau sous basse pression et sans détartrant chimique. Elles consistent à faire traverser une cuve remplie de plantes aromatiques par de la vapeur d'eau.

- Hydrodistillation :

Le matériel végétal est mis en contact avec de l'eau bouillante contenue dans un alambic relié à un condenseur au moyen d'un col de cygne. Le tout est porté à l'ébullition. L'essence de la plante et forme avec elle un mélange gazeux avec la vapeur d'eau et après passage au condenseur, l'huile de densité inférieure à celle de l'eau flotte sur l'hydrolat et se récupère par décantation ou débordement.

- L'entraînement à la vapeur

Le matériel végétal n'est pas immergé dans l'eau, mais est placé dans un panier perforé situé à une certaine distance du fond de l'alambic pour extraire les substances volatiles. On admet dans l'alambic un courant de vapeurs de haut en bas et on parle de hydrodiffusion ou percolation.

III-2-2-2- Les méthodes d'extraction moderne

- L'extraction aux solvants volatils [12]

Certaines HE contenant des substances thermolabiles ou hydrolysables sont avantageusement extraits à l'aide d'un solvant organique tel que le *n*-hexane, acétone, éther de pétrole, benzène ou le toluène. Plusieurs extractions successives sont réalisées pour augmenter le rendement.

- Extraction par le dioxyde de carbone supercritique [03W]

Le terme supercritique signifie que le CO₂ sous pression est égal à une température 31°C, se trouve dans l'état intermédiaire entre l'état liquide et l'état gazeux. Il acquiert les qualités d'un solvant, alliées à la fluidité d'un gaz. Le CO₂ est capable de dissoudre de nombreuses composées organiques lorsqu'il est dans cet état. Les matières premières ainsi obtenues sont proches du produit naturel d'origine, sans trace résiduels de solvant. De plus, le CO₂ est incolore, non toxique et inodore ainsi qu'inflammable

- Extraction au four à micro-onde [09]

Cette technique consiste à introduire de matériel végétale dans le four et soumis aux microondes. L'eau contenue dans les cellules végétales entre en ébullition et provoque la rupture des tissus, libérant ainsi les composés volatils. Le mélange de vapeur d'eau et d'huile essentielle est condensé puis laissé décanter, on récupère ensuite l'HE.

III-3- Extraction des constituants non volatils [07]

Les constituants non volatils du matériel végétal sont en général obtenus par la méthode d'extraction en cascade d'un extrait brut à l'aide de solvants organiques à polarité ascendante. C'est la méthode qui permet en particulier d'extraire le maximum des constituants non volatils contenus dans un matériel végétal ; les constituants sont dissous suivant leur polarité dans les solvants organiques utilisés durant l'extraction, et sont ensuite récupérés en évaporant les solvants de l'extraction.

III-3-1- Les méthodes d'obtention de l'extrait bouillies des principes actifs

- L'infusion :

C'est une méthode d'extraction des principes actifs d'un matériel végétal par dissolution dans un liquide initialement bouillant et que l'on laisse refroidir.

- La décoction :

C'est une opération dans laquelle le liquide d'extraction est maintenu bouillant.

- La macération :

C'est une opération effectuée à chaud ou à froid consiste à faire séjourner le matériel végétal dans un liquide (solvant).

CHAPITRE IV METHODES D'ISOLEMENT DES PRINCIPES ACTIFS

Pour l'isolement des principes actifs, il faut d'abord se faire une idée sur les types de composés qui constituent les extraits, leur proposition dans l'extrait ou encore leur polarité. Une analyse s'avère est donc nécessaire avant de procéder à l'isolement proprement dit.

Cette partie consiste à développer les différents méthodes d'analyse préliminaires, les tests biologiques, les fractionnements ainsi que l'isolement proprement dit.

IV-1- Méthodes d'analyse préliminaires [01][04W] [08][13]

Différentes méthodes peuvent être envisagées pour avoir des idées sur les types de constituants ou composé qui constituent un extrait.

On distingue :

- La chromatographie sur couche mince (CCM) avec les divers réactifs qui caractérisent une famille chimique donné.
- La chromatographie liquide à haute performance (CLHP° couplée à d'autres méthodes spectroscopiques comme l'ultraviolet (UV) ;
- La chromatographie en phase gazeuse (CPG) elle est utilisée lorsque les produits ont une volatilité suffisante, elle est à la fois couplée à la spectrométrie de masse(SM) ou à un détecteur à ionisation de flamme DIF.
- Le criblage phytochimique qui est un ensemble de test ayant pour but de déterminer qualitativement les grandes familles des principes actifs contenues dans une plante.

L'identification d'une famille chimique dans un extrait se fait en présence de réactifs spécifiques pour donner naissance à des réactions de précipitation, de floculation, de complexation, ou des troubles caractéristiques permettant de mettre en évidence la présence de la famille chimique.

IV-2- Tests biologiques [01]

Il est difficile d'isoler tous les constituants d'un extrait végétal car il est généralement constitué par un mélange complexe. Il est essentiel de savoir qu'une ou quelques-unes parmi ces milliers de substances sont responsables de l'effet thérapeutique ou toxique de la plante. Il est donc indispensable d'avoir à la disposition des tests biologiques ou pharmacologiques relativement simple pour localiser l'activité

recherchée d'abord dans l'extrait de départ, ensuite dans les nombreuses fractions issues des différentes étapes de la purification qui mèneront jusqu'au(x) principe(s) actif(s).

Exemples de tests biologiques :

- Test des activités antifongiques sur *Cladosporium cucumnerinum* (responsable de la cladosporiose du concombre) ou sur *Candida albicans* (responsable de certaines mycoses chez l'homme) ;
- Test des activités microbiennes sur différentes souches de microbes
- Test larvicide contre *Aedes aegypti*, une larve vectrice de la fièvre jaune
- Test radicalaire et antioxydant.

IV-3- Fractionnement de l'extrait et isolement des composés purs [07]

Méthodes de purification de l'extrait (pour qu'il ne reste que des mélanges de principe actifs dans l'extrait) pour faciliter le fractionnement.

Traitement par la chaleur

Il consiste à chauffer au bain marie bouillant l'extrait et après refroidissement, le précipité formé est éliminé par centrifugation.

Fractionnement par le *n*-butanol

Il consiste à additionner de *n*-butanol dans l'extrait aqueux dans une ampoule à décanter. Après agitation, il y a apparition de la phase aqueuse inférieure et de la phase organique supérieure.

La phase organique est filtrée sur papier filtre, puis évaporées sous vide après addition de grand volume d'eau distillée.

Précipitation par l'acétate neutre de plomb (ANP)

L'ANP est un sel de métal lourd qui a la propriété de précipiter certains composés comme les acides nucléiques, les acides organiques, les polysaccharides et les protéines.

Filtration sur charbon actif

Le charbon actif est un adsorbant qui adsorbe de nombreuses substances, en particulier les composés aromatiques à structure cyclique. Ce traitement est utilisé pour décolorer les extraits par déchlorophyllation.

L'extrait qui a montré une importante activité sur une souche biologique sera sélectionné par un fractionnement ultérieur. On distingue plusieurs méthodes chromatographiques préparatives.

- La chromatographie sur couche mince (CCM)
- La chromatographie sur colonne ouverte
- La chromatographie flash
- La chromatographie liquide à basse pression (LPLC : Low pressure Liquid Chromatography)
- La chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC : Medium pressure Liquid Chromatography)
- La chromatographie liquide : Haute performance (HPLC : High Pressure Liquid Chromatography)
- La chromatographie de partage centrifuge(CPC).

C'est en fonction de la quantité de l'extrait ou de la fraction à purifier, du type de molécules et de leur comportement vis-à-vis des supports et du système de solvant utilisé qu'on fait le choix entre l'une de ces méthodes.

Les fractions obtenues lors d'un premier fractionnement sont soumises au test biologique afin de localiser l'activité. Les fractions actives seront à leur tour soumises à des procédés chromatographiques jusqu'à l'obtention des produits purs.

CHAPITRE V : DETERMINATION DES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUE DES PRINCIPES ACTIFS

Dans ce chapitre, nous énumérons les caractéristiques physico-chimiques souvent déterminés dans les études des métabolites secondaires des plantes spécifiquement les composantes volatiles c'est-à-dire l'HE (huile essentielle). Elle concerne :

- Les indices physiques : densité, indice de réfraction, pouvoir rotatoire.
- Les indices chimiques : indice d'acide, indice d'ester.

V.1. Caractéristiques physique

V.1.1. Détermination de la densité relative [03][14][15]

➤ Définition

La densité relative à 20°C d'une huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle à 20°C, à la masse d'un égal volume d'eau distillée à 20°C.

➤ Principe

Elle consiste à peser successivement à l'aide d'un pycnomètre deux volumes égaux d'HE et d'eau à 20°C.

➤ Matériels

- Pycnomètre en verre, adaptée au volume d'huile essentielle disponible
- Bain thermostatique, maintenu à la température t=20°C
- Thermomètre de précision graduée de 10°C à 30°C et divisé en 0,2°C.
- Balance analytique

➤ Traitement des résultats

La densité à la température de détermination t est donné par la formule suivante

$$d_t = \frac{(m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)}$$

Avec m_0 : masse du pycnomètre à vide

m_1 : masse du pycnomètre remplie d'eau

m_2 : masse du pycnomètre remplie d'huile essentielle

✓ Remarque

Si la température de détermination est différente de 20°C, la densité relative à 20°C est donnée par la formule de correction suivante :

$$d_{20} = d_t + 0,0008 * (t - 20)$$

V.1.2. Détermination de l'indice de réfraction

✓ Définition [03][08][09]

L'indice de réfraction d'une HE est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence à celui de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE maintenue à une température constante.

La température de référence est de 20°C, sauf pour les HE qui ne sont pas à l'état liquide à cette température. L'adaptation des températures de 25°C ou 30°C suivant les points de fusion des HE considérés est nécessaire.

✓ Appareillage

Refractomètre muni d'un thermomètre.

✓ Traitement de résultat

La lumière polarisée et la température entraîne la variation de l'indice de réfraction.

L'indice de réfraction des HE varie de 0,0004 par degré autour de 20°C la formule suivante permet de calculer sa valeur à 20°C.

$$[n_D^t] = n_D^{t'} + 0,0004(t' - t)$$

Avec n_D^t : valeur de l'indice de réfraction à la température de référence t : 20°C
 $n_D^{t'}$: valeur lue, obtenue à la température t' , à laquelle a été effectuée la lecture

V.1.3. Détermination du pouvoir rotatoire

Il consiste à rechercher l'activité optique d'un produit en solution ou d'un liquide.

➤ Principe [09][16]

Le pouvoir rotatoire d'une huile essentielle est l'angle selon lequel tourne le plan de polarisation de la lumière.

Lorsqu'un faisceau de lumière rectilignement polarisée traverse un échantillon, il se produit une déviation du plan de vibration de la lumière.

Les substances dotées d'une telle propriété sont qualifiées d'optiquement actives.

La capacité de la substance à dévier la lumière se présente comme suit :

- si la substance est lévogyre, le plan de vibration bascule vers la gauche ;
- si la substance est dextrogyre, le plan de vibration est dévié du côté droit.

➤ Traitement de résultat [03]

Le pouvoir rotatoire, exprimé en milliradians et/ou degrés d'angle, est donné par la formule :

$$\alpha_D^t = \frac{A}{l} \times 100$$

Avec : A : valeur de l'angle de rotation exprimée en milliradians et /ou degrés d'angle

l : longueur du tube utilisé en exprimé en millimètres.

Remarquons qu'il faut signaler les pouvoirs rotatoires dextrogyres par le signe positif (+) et les pouvoirs rotatoires lévogyres par le signe négatif (-).

➤ Pouvoir rotatoire dit « spécifique apparent »

Si la quantité de l'HE est insuffisante pour une mesure directe de son pouvoir rotatoire, le pouvoir rotatoire de l'HE en solution éthanolique dit « pouvoir rotatoire spécifique apparent » est déterminé.

Il est exprimé en milliradians et/ou degrés d'angle, est donné par la formule :

$$\alpha_D^t = \frac{\alpha}{c}$$

Avec : α_D^t : pouvoir rotatoire de la solution d'huile essentielle

C : concentration de la solution d'huile essentielle, exprimée en gramme d'huile essentielle par millilitre de solution.

➤ Pouvoir rotatoire à 20°C

Le pouvoir rotatoire des échantillons à 20°C est donné par la formule de correction suivante :

$$\alpha_D^{20} = \alpha_D^t + 0,0004(t - 20)$$

Avec : α_D^t : valeur du pouvoir rotatoire observé à la température t de la salle pendant la lecture

α_D^{20} : valeur de pouvoir rotatoire à 20°C.

V.2. Caractéristiques chimiques des HE

V.2.1. Détermination de l'indice d'acide (IA) [03] [09] [16]

✓ Définition

Il s'agit du nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaires à la neutralisation des acides libres contenus dans 1 g d'HE.

✓ Principe

Les acides libres de l'huile sont neutralisés par de l'hydroxyde de sodium en solution éthanolique titrée.

On ajoute quelques gouttes d'indicateur coloré (phénolphtaléine à 1 %) dans la solution éthanolique. Cette échantillon est ensuite titré avec une solution éthanolique de KOH, la fin de la réaction est indiqué par le virage de la solution et on note le volume de KOH versé.

✓ Traitement de résultat

L'indice d'acide est calculé par la formule ci-après

$$IA = \frac{5,61 V}{m}$$

Avec : V= volume de KOH (en ml) utilisé pour le titrage.

m= masse en gramme (g) de la prise d'essai.

V-2-2- Détermination de l'indice d'ester (IE) [08] [09] [16]

✓ Définition

C'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1 gramme d'huile essentielle.

✓ Principe

Les esters contenus dans l'huile essentielle sont hydrolysés par chauffage en présence d'une solution éthanolique titrée de KOH (qui n'a pas été fixé par les acides libérés) est ensuite dosé avec une solution titrée de HCl.

✓ Traitement de résultat

La valeur de l'indice d'ester est obtenue à partir de la formule suivante.

$$IE = \frac{28,05}{m} (V_0 - V_1) - IA$$

Avec : V_0 : volume de HCl utilisé pour l'essai à blanc (ml)

V_1 : volume de HCl utilisé pour la détermination (ml)

m : masse de la prise d'essai(g).

IA : indice d'acide

CHAPITRE VI : DETERMINATION DES ACTIVITES BIOLOGIQUES

Cette chapitre consiste à donner des méthodes de détermination des activités biologiques des métabolites secondaires des *Lauraceae*, ainsi que de décrire le matériel biologique utilisé.

Il s'agit d'étudier les propriétés biologiques des espèces de *Lauraceae* concernant :

- L'activité larvicide sur les larves de moustique
- La toxicité aiguë de l'extrait sur les souris ainsi que sur les têtards de grenouille
- L'activité antibactérienne sur plusieurs souches de bactéries
- L'activité antioxydant

VI-1- Les matériels biologiques

VI-1-1- Les larves de Moustiques

Les larves de moustique « *Culex quinquefasciatus* » au stade III de leur développement ont été utilisés dans les littérature pour évaluer l'activité larvicide des métabolites secondaires des espèces de *Lauraceae* sauf pour [08] (étude polytochimique de *Ravensara Aromatica*) qui utilise la larve de moustique « *Aedes aegypti* ».

VI-1-2- Les souris

Dans tous les littératures étudiées, les souris « *Mus musculus* » de race TANA-SWISS ont été utilisés. Ces souris sont stabilisées depuis plusieurs années à l'Institut pasteur de Madagascar (IPM).

VI-1-3- Les têtards

Ce sont les têtards de grenouille de *Ptychadena mascariensis* qui sont utilisés (ils ont été pris dans les rizières).

VI-1-4- Les souches de bactéries

Plusieurs souches de bactéries à Gram négatif et à Gram positif ont été utilisées.

Le tableau ci-dessous indique quelques souches de bactéries utilisées avec leur pouvoir pathogène.

Tableau 1 : quelques souches de bactéries utilisées pour le test d'activité antibactérienne.

| Nom de la souche | Caractères morphologiques et pouvoir pathogène |
|------------------------------|--|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Cellules en coque groupées en amas responsables d'intoxication alimentaire d'infection localisées suppurées et plus rarement septicémies |
| <i>Bacillus cereus</i> | Grandes bacilles en forme de bâtonnet, mobile-A l'origine d'intoxication alimentaire opportuniste bénigne. |

VI-2- Les méthodes

VI-2-1- Test d'activité larvicide [17]

Les larves sont mises en contact avec l'extrait afin d'apprécier leur susceptibilité. Si ce premier test se relève positif, l'essai se poursuit par l'estimation de la CL₅₀ ou la concentration létale à 50% qui est la concentration qui tue 50% de larves après 24 heures d'exposition. Sa valeur exprime la toxicité de l'HE vis-à-vis des larves.

VI-2-2- Test de toxicité aigüe sur les souris [13] [17]

Les souris testées possèdent des poids différents mais comprise entre 18 et 25 gramme. La toxicité est estimée par injection par voie intrapéritonéale de quelque volume de l'extrait. La dose létale 50% (DL₅₀) ou la dose tuant 50% des animaux testé pendant 24 heures exprimer la toxicité de l'extrait vis-à-vis des souris.

VI-2-3- Test de toxicité sur le têtard de grenouille [01]

L'expérience consiste à tester la résistance de têtard de grenouille vis-à-vis l'une intoxication de leur milieu. La CL₁₀₀ ou concentration minimale donnant 100% de mortalité exprime la toxicité de l'extrait sur le têtard de grenouille.

VI-2-4- Test d'activité antibactérienne

- Méthode des disques sur le milieu solide ou aromatoگرامme [01]

Pour les HE, l'aromatoگرامme est l'équivalent de l'antibiogramme. Il permet de déterminer la réaction des souches à l'HE à étudier et leur sensibilité. Cette méthode consiste à mettre l'huile à étudier en contact avec les bactéries ensemencées en nappe. L'extrait diffuse sur le milieu d'une façon radial, sa concentration diminuant à mesure qu'il s'éloigne de la source. Il se forme ainsi un gradient de concentration.

Dans le cas où la souche testée est sensible à l'HE, une zone circulaire appelée « halo d'inhibition » apparaît autour des disques. Dans cette zone, les bactéries ne poussent pas. Son diamètre traduit directement le degré de sensibilité de la souche à l'HE ; plus elle est sensible, plus le diamètre est grand.

Les résultats sont lus en mesurant le diamètre d'inhibition. Les normes utilisées selon la littérature pour la lecture des résultats sont préconisées par l'IPM.

Tableau 2 : Normes pour la lecture des résultats des tests d'aromatoگرامme (norme IPM).

| Diamètre du halo d'inhibition (d) | Degré de sensibilité des germes | Résultat |
|-----------------------------------|---------------------------------|----------|
| $d < 7\text{mm}$ | insensible | - |
| $7\text{mm} < d < 8\text{mm}$ | Assez sensible | + |
| $8\text{mm} < d < 9\text{mm}$ | sensible | ++ |
| $d > 9\text{mm}$ | Très sensible | +++ |

- Evaluation de la CMI concentration minimale d'inhibition en milieu solide [17] [18]

La CMI est la concentration minimale d'HE pour laquelle il n'y a pas de croissance microbienne visible à l'œil nu après un temps d'incubation de 24 h.

Toutes les méthodes pour la détermination du CMI sont le même que celle de l'aromatogramme mais différentes concentrations de l'échantillon ont été testé sur les germes.

VI-2-5- Evaluation de l'activité antioxydante [01] [14][19]

Les antioxydants sont des produits naturels ou synthétiques entraînant la neutralisation des radicaux libres qui sont les vecteurs de stress oxydatif. En effet, les radicaux libres sont des espèces chimiques qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires. De ce fait, ils sont très instables, très réactifs et peuvent s'attaquer à des molécules biologiques en les oxydant. Il s'agit des ions oxygénés, l'hydroxyde et de l'eau oxygéné qui sont libérés lors des réactions biochimiques. Mais, avant d'être neutralisés, ils provoquent des lésions sur tous les éléments qu'ils côtoient.

Exemple : ils peuvent induire des effets mutagènes ou l'arrêt des réplifications de l'ADN. Ainsi, les radicaux libres sont à l'origine de nombreuses maladies comme le cancer, la maladie d'Alzheimer.

Le mécanisme d'action d'un antioxydant est de débloquent, retarder ou prévenir les réactions d'oxydoréduction rencontrées au niveau de l'organisme. C'est un donneur d'électron, il possède donc un pouvoir réducteur élevé. Il, agit en compétition avec les molécules du métabolisme primaire et se fait oxyder à leur place.

Le DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazil) est un radical stable de couleur violette intense. Il est utilisé pour l'évaluation de l'activité antioxydant des HE.

Lorsqu'une solution de DPPH est mélangée à une substance qui peut donner un hydrogène, le composé perd sa coloration violette et est réduit en jaune, l'intensité de la coloration étant proportionnelle au nombre de radicaux libre réduits.

CHAPITRE VII : METHODES D'IDENTIFICATION DES STRUCTURES DES PRINCIPES ACTIFS

Après isolement du produit et après avoir vérifiée sa pureté, on peut commencer le travail de « détective » pour déterminer la structure des principes actifs. Une panoplie de technique spectroscopiques est utilisée dont les plus courantes sont :

- La spectroscopie Ultraviolet (UV)
- La spectroscopie Infrarouge (IR)
- La résonance magnétique nucléaire (RMN)
- La spectroscopie de Masse (MS)
- La diffraction aux rayons X

VII-1- La spectroscopie Ultraviolet (UV) [01]

L'UV est une spectroscopie d'absorption qui dépend de la structure électronique de la molécule. Le passage des électrons des orbitales de l'état fondamental vers l'orbitales d'un état excité d'énergie supérieur est le résultat d'absorption d'énergie qui est quantifiée. L'obtention d'un spectre UV peut être directement à partir d'un instrument de mesure est simplement un graphique représentant l'intensité d'absorption en fonction de la longueur d'onde ou de la fréquence d'absorption.

Dans la pratique, la spectroscopie UV se limite normalement aux molécules qui ont des systèmes conjugués. Il y a cependant un avantage à la sélectivité de l'absorption UV : des groupes caractéristiques peuvent être reconnus dans la molécule de complexités très variable, autrement dit, chaque type de molécule a son spectre caractéristique.

VII-2- La spectroscopie Infrarouge (IR) [01]

C'est une technique utilisé pour l'identification des groupes fonctionnels dans une molécule donnée. La présence ou l'absence de certains groupes fonctionnels dans une molécule est prouvée par la présence ou l'absence de bandes d'absorption spécifiques.

Même si le spectre IR est une caractéristique de la molécule entière, il est possible que certains groupes d'atomes donnent lieu à des bandes de même fréquence

quelques soit le reste de la molécule. Il est probable alors que deux composés donnent exactement le même spectre IR excepté les énantiomères.

VII-3- La Résonance Magnétique Nucléaires (RMN) [01] [07]

Le RMN est une autre forme de spectre d'absorption apparentée à la spectroscopie UV et IR. Depuis les débuts des années 70, grâce au développement remarquable des aimants destinés à la RMN, de l'électronique et des logiciels, la spectroscopie du carbone (^{13}C) a pris un essor après l'étude de la RMN du proton (^1H) qui a débuté à la fin des années 50.

Actuellement, on peut obtenir des spectres unidimensionnels (1D) ou bidimensionnels (2D), ce qui donne beaucoup des informations sur la structure des molécules organiques et facilite ainsi leur identification.

Le spectre RMN est un graphe de l'intensité des pics en fonction de leur fréquence d'absorption d'après la définition. L'interprétation des spectres RMN peut être faite d'une manière plus détaillée qu'un spectre IR ou UV.

VII-4- la spectrométrie de masse (SM) [01]

C'est une technique analytique permettant de mesurer le poids moléculaire d'une substance. En outre, elle fournit des renseignements sur la disposition des groupes spécifiques de la molécule.

Son principe consiste à ioniser la molécule en question par divers mode d'ionisation. Les ions ou fragment ainsi formé sont séparés par un analyseur de masse en fonction du rapport masse/ charge (m/Z), puis détecté et enregistrés.

Dans le cas pratique, un spectre de masse est une présentation des masses de fragments chargés positivement (incluant l'ion moléculaire) en fonction de leur concentration relative. Elle permet aussi de déterminer une formule moléculaire unique dans le cas d'un spectromètre de masse de haute résolution.

CONCLUSION PARTIELLE

Dans cette première partie nous avons décrit la famille de *Lauraceae*, leur caractéristique spécifique ainsi que les genres le plus étudiés selon la littérature. La recherche montre la richesse des *Lauraceae* en métabolites secondaires. En outre cette richesse en composition chimique, les espèces de cette famille apparaissent comme des plantes très intéressantes pour développer des méthodologies. Ainsi différentes méthodes sont à la disposition des phytochimistes pour l'extraction de ces métabolites secondaires suivant leur volatilité comme l'hydrodistillation, l'extraction par solvant ou l'extraction au four micro-onde.

Il existe aussi différentes méthodes chromatographiques possibles pour l'isolement des principes actifs comme la CCM ou chromatographie sur couche mince la chromatographie sur colonne, le HPLC etc...

Plusieurs tests biologiques peuvent être également envisagés pour la détermination des activités biologiques des principes actifs à savoir les tests antifongiques, larvicides, antimicrobiens, antioxydants...

L'identification structurale des principes actifs au cas où on arrive à isoler des produits purs est facilitée par les différentes méthodes techniques spectroscopiques et spectrométriques (UV, IR, SM, RMN...).

DEUXIEME PARTIE :

RESULTATS

CHAPITRE VIII : ETUDES EFFECTUEES SUR LE GENRE OCOTEA

Cette partie de travail est consacrée à la révélation des résultats d'études effectuées sur les six (6) espèces du genre *Ocotea* selon la littérature. Les études sont axées sur les huiles essentielles des feuilles des six espèces.

VIII.1. Les espèces étudiées

VIII.1.1. Description du matériel végétal

Six (6) espèces du genre *Ocotea* ont été étudiées selon la littérature dont leur description respective et donner en annexe I, mais leur nom scientifique et vernaculaire sont données par le tableau ci-dessous.

Tableau 3 : Noms scientifique et vernaculaire des espèces du genre *Ocotea* étudié.

| Nom scientifique | <i>Ocotea</i> | | | | | |
|--------------------|-----------------------------|-------------------|---------------|-------------------------|---------------------|------------------------|
| | <i>auriculiformis</i> | <i>cymosa</i> | <i>laevis</i> | <i>madagascariensis</i> | <i>trichoplébia</i> | <i>zahamenensis</i> |
| Noms vernaculaires | Tavolomanitra, tavolomerina | Varongy kataikana | Varongy fotsy | Varongy | Varongy | Varongy, manitrakondro |

VIII.1.2. Date et lieu de récolte de matériel utilisé

Les feuilles des 06 espèces mentionnées dans le tableau 1 ont été collectées dans la forêt de Mandraka (1300 m d'altitude, à 70 Km d'Antananarivo). Les huiles essentielles ont été obtenues après hydrodistillation. Notons qu'il est essentiel de savoir que les métabolites secondaires (HE, composés non volatils) extraite d'une même espèce peut varier selon un grand nombre de facteur y compris la période et le lieu de récolte.

Tableau 4 : Date et lieu de récolte de matériel végétale (genre *Ocotea*)

| | <i>O.auriculiformis</i> [08] | <i>O.Cymosa</i> [09] | <i>O.laevis</i> [16] | <i>O.madagascariensis</i> [20] | <i>O.trichoplébia</i> [03] | <i>O.zahamenensis</i> [12] |
|-----------------|---------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Date de récolte | Juillet 2009 | Septembre 2010 Février 2011 | Juillet et Septembre 2009 | Mai 2002 | Août et Octobre 2014 | Juin 2010 |

VIII.2. Caractéristiques physico-chimiques des Huiles essentielles obtenues

VIII.2.1. Les caractéristiques physiques

Les caractéristiques physiques des HE sont données par le tableau ci-dessous :

Tableau 5 : Caractéristiques physiques des HE des espèces du genre *Ocotea*

| | <i>O.auriculiformis</i> [08] | <i>O.cymosa</i> [09] | <i>O.laevis</i> [16] | <i>O.trichoplébia</i> [03] | <i>O.zahamenensis</i> [12] |
|---|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Densité à 20°C d^{20} | 0,960 | 0,861 | 0,911 | 0,931 | 1,054 |
| Indice de réfraction à 20°C n_D^{20} | 1,506 | 1,447 | 1,494 | 1,505 | 1,532 |
| Pouvoir rotatoire α_D^{20} | opaque | +0°55 | illisible | +0°81 | +0°63 |

VIII.2.2. Caractéristiques chimiques

Le tableau rapporte les résultats de la caractérisation chimique des HE selon la littérature.

Tableau 6 : caractéristique chimiques des HE des espèces du genre *Ocotea*

| | <i>O.auriculiformis</i> [08] | <i>O.cymosa</i> [09] | <i>O. laevis</i> [16] | <i>O. trichoplébia</i> [03] | <i>O.zahamenensis</i> [12] |
|-------------------|---------------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Indice d'acide | 1,399 | 1,82 | 2,805 | 0,28 | 0,560 |
| Indice d'ester | 30,813 | 33,24 | 12,622 | 12,89 | 6,413 |

Remarque : aucune extraction d'HE a été faite sur l'*Ocotea madagascariensis*.

VIII-3- identification des constituants

VIII-3-1- Résultat de l'analyse par CPG/DIF ou CPG/SM

La composition chimique majoritaire des extraits avec leur teneur en % est donnée dans le tableau

Tableau 7 : Résultat de l'analyse par CPG ; CPG/DIF ou CPG/SM des extraits des espèces du genre *Ocotea*

| | <i>Ocotea</i> | | | | |
|--------------------------|-------------------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | <i>auriculiformis</i> [08] | <i>cymosa</i> [09] | <i>laevis</i> [16] | <i>trichoplébia</i> [03] | <i>zahamenensis</i> [12] |
| | CPG/SM | CPG | CPG/DIF | CPG | CPG/SM |
| α -selinene | 0,354 | | | | |
| Myristicina | 5,20 | | | | |
| β -Eudesmol | 4,38 | | | | |
| α -chamigrène | 2,49 | | | | |
| α -pinène | | 23,78 | 11,08 | | 1,02 |
| β -pinène | | 8,83 | 14,81 | | |
| Limonène | | 16,54 | 1,24 | | 0,19 |
| 1-8 cinéole | | 13,35 | | | |
| β -caryophyllène | 5,36 | 1,69 | 6,56 | 0,97 | |
| α -terpinéol | | 2,03 | 6,90 | | |
| Eugénol | | 0,83 | 4,80 | | 0,65 |
| Acétate de géranyle | | | | 4,04 | |
| β -ionone | | | | 5,36 | |
| α -sélénène | | | | 7,00 | |
| α -ionone époxyde | | | | 6,61 | |
| α -calacorene | | | | 4,23 | |

| | | | | | |
|----------------------|------|-------|------|------|-------|
| Butyrate de géranyle | | | | 4,10 | |
| Viridiflorol | | | | 4,90 | |
| Safrole | | | | | 83,17 |
| linalol | 0,11 | | 3,95 | 0,25 | 0,22 |
| α -copaène | 1,31 | 0,561 | | | |
| β -cariofilène | 1,25 | | | | |
| Maaliol | 1,13 | | | | |
| δ -elemène | 0,86 | | | | |
| δ -cadinène | 3,48 | | | | |
| Humulène | 0,82 | | | | |
| α -humulènes | | 1,356 | 2,42 | 0,41 | |
| Camphre | | 0,10 | 1,93 | | |
| Acétate de geranyl | | | | 4,04 | |
| β -myrcène | | | 3,12 | | |

Dans ce tableau, les produits majoritaires ont été surlignés en bleu, on peut voir qu'ils sont tous différents d'un genre à un autre.

VIII-3-2- Résultat du criblage phytochimique

Les résultats du criblage phytochimique des poudres de feuilles sèches sont donnés par le tableau ci-dessous.

On remarque que l'*O. cymosa* et l'*O. Madagascariensis* et *O. trichoplèbia* ont été subit le criblage phytochimique.

Tableau 8 : Résultat du criblage phytochimique.

| extrait utilisé | Famille chimique | test | <i>O. cymosa</i> [28] | <i>O. trichoplébia</i> [25] | <i>O. madagascariensis</i> [22] |
|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| Extrait acide | Alcaloïdes | MAYER | - | - | - |
| | | WAGNER | - | - | - |
| | | DRAGENDORFF | - | - | - |
| Extrait hydroéthanolique | Anthraquinones | BORNTRANGER | - | - | - |
| | Flavonoïdes | WILSTATER | - | + | - |
| | Leucoanthocyanes | BATE-SMITH | + | + | - |
| Extrait aqueux | Tanins et polyphénols | FeCl ₃ | - | + | + |
| | | Gélatine | - | - | + |
| | | Gélatine salée | - | - | + |
| Extrait chloroformique | Triterpènes et stéroïdes | LIGRERMAN BORCHARD | + | - | + |
| | | SALKOWSKI | + | - | + |
| | | DESOXYOSE KELLER-KILIANI | - | | + |
| Extrait aqueux | Saponines | Indice de mouse | - | - | - |
| | Iridoïdes | HCl à chaud | - | | |

(-) réaction négatif

(+) réaction positif

VIII-3-3- Résultats des études biologiques

VIII-3-3-1- Résultat de l'activité larvicide

Les larves de moustiques utilisés étaient le « *Culex quinquefasciatus* » et ils sont tous au stade III de leur développement. (Vecteur de la filariose bovine)

L'activité larvicide de métabolite secondaire des espèces du genre *Ocotea* et indiqué par le tableau ci-dessous.

Tableau 9 : Activité larvicide des métabolites secondaires (volatils) des espèces du genre *Ocotea*.

| | <i>O. auriculiformis</i> [08] | <i>O. cymosa</i> [09] | <i>O. laevis</i> [16] | <i>O. madagascariensis</i> [20] | <i>O. Trichoplébia</i> [03] | <i>O. zahamenensis</i> [12] |
|---------------------------|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Concentration HE (en ppm) | 12 | 75 | 100 | 2 | | 50 |
| Résultat | larvicide | larvicide | larvicide | Non larvicide | Non testé | larvicide |

VIII-3-3-2- Résultat d'étude de la toxicité sur la souris

Les souris utilisées étaient les souris mus-muscles de race TANA-SWISS dans les quatre tests.

Le tableau ci-dessous rapporte les résultats de la toxicité des métabolites secondaires (volatils)

Tableau 10 : toxicité sur souris des métabolites secondaire volatil des espèces du genre *ocotea*.

| | <i>O. Madagascariensis</i> [20] | <i>O. zahamenensis</i> [12] | <i>O. auriculiformis</i> [08] | <i>O. laevis</i> [16] |
|----------------------------------|---|--------------------------------|--|-----------------------|
| Symptôme après administration HE | Pour les doses de 250mg/kg et 230mg/kg -Elles présentent un état de surexcité -Hyperpnée -Convulsion clonique -Mort | | Pour des doses différent -les souris se frottent le museau -Après quelques temps, elles présentent une hypoactivité -Avec dose forte (500mg/kg), elles traînent les pattes postérieures | |
| Résultat | toxique | | Non toxique | |

VIII-3-3-3- Résultat d'étude des toxicités sur les têtards de grenouille

Seulement l'*O. madagascariensis* et l'*O. auriculiformis* ont été testé sur le têtard de grenouille (*Ptychadena mascareniensis*) .

Tableau 11 : Toxicité sur les têtards de grenouille des métabolites secondaire (non volatil et volatil) des especes du genre *Ocotea*

| | <i>O. madagascariensis</i> [20] | <i>O. auriculiformis</i> [08] |
|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Concentration utilisée (µg/ml) | 72 | 14,25 |
| Résultat | toxique | toxique |

VIII-3-3-4- Résultat d'étude sur les souches des bactéries

VIII-3-3-4-1- Diamètre halos d'inhibition et sensibilité des germes

Le tableau ci-dessous indique l'activité antibactérienne des métabolites secondaires (HE et extrait toxique) des espèces du genre *Ocotea*.

Tableau 12 : activité antibactérienne des métabolites secondaires des espèces du genre *Ocotea*. (Diamètre des halos d'inhibition (mn) et sensibilité des germes)

| | O. <i>auriculiformis</i> [08] | | O. <i>cymosa</i> [09] | | O. <i>laevis</i> [16] | | O. <i>trichoplébia</i> [03] | | O. <i>zahamenensis</i> [12] | |
|---------------------------------|-------------------------------------|-----|-----------------------------|----|--------------------------|-----|-----------------------------------|-----|-----------------------------------|-----|
| <i>Bacillus cereus</i> | | | | | 13,5 | +++ | 12 | +++ | | |
| <i>Bacillus megatonium</i> | | | | | | +++ | | | | |
| <i>Candida albicans</i> | | | | | | | 6 | - | | |
| <i>Enterobactercloacae</i> | | | | | | | 6 | - | | |
| <i>Enterococcus faeculis</i> | | +++ | 6 | - | 10 | +++ | | | 25 | +++ |
| <i>Escherichia coli</i> | 11 | +++ | 12 | ++ | 10 | + | 6 | - | | |
| <i>Pseudonas aeruginosa</i> | | | | | 6 | - | 6 | - | | |
| <i>Salmonella typhimuriun</i> | | | 6 | - | 6 | - | | | | - |
| <i>Salmonella typhi</i> | 7 | ++ | | | | | | | | |
| <i>Salmonella antantica</i> | | | | | 6 | - | | | | |
| <i>Salmonella enetridis</i> | | | | | | | 6 | - | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 10 | ++ | 6 | - | 9 | ++ | 10 | +++ | 10 | +++ |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | | | | | | | 9 | ++ | | |
| <i>Klebriella oxytoca</i> | | | | | | | 9 | ++ | | |
| <i>Klebriella pneumoniae</i> | 7 | ++ | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | |
|------------------------|--|-----|----|-----|--|-----|--|--|----|-----|
| <i>Vibrio fischeri</i> | | +++ | 25 | +++ | | +++ | | | 16 | +++ |
| <i>Vibrio harvey</i> | | +++ | 22 | +++ | | +++ | | | | +++ |

(-) : si la couche est insensible

(+) : si la couche est sensible

(++) : si la couche est très sensible

VIII-3-3-4-2- Effet des constituants volatils des HE

Tableau 13 : Effets des constituants volatils des HE

| | | | | |
|-----------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| | O. <i>auriculiformis</i> [08] | O. <i>cymosa</i> [09] | O. <i>laevis</i> [16] | O. <i>zahamenensis</i> [12] |
| Souches testées | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Vibrio harvey</i> |
| Résultat | - | - | - | + |

(-) : si aucune différence n'a été constaté entre la croissance en présence HE et celle du témoin sans huile.

(+) : si la source est sensible aux HE (activité similaire à celle de l'HE entière)

VIII-3-3-4-3- Résultats des études des CMI (concentration minimale inhibitrice)

La CMI a été déterminée sur différentes souches. Elle est différente d'un genre à un autre.

Tableau 14 : CMI des HE des espèces du genre *Ocotea*.

| | <i>O. auriculiformis</i> [08] | <i>O. cymosa</i> [09] | <i>O. laevis</i> [16] | <i>O. madagascariensis</i> [20] | <i>O. zahamenensis</i> [12] |
|--------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|------------------------------|--|------------------------------------|
| Concentration minimale (mg/ml) | 2,4 | 1,07 | 0,57 | 1,44 | 0,66 |
| Diamètre des halos (mm) | 8 | - | 7 | - | 7 |
| Souches utilisés | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Vibrio fischeri</i> | <i>Vibrio harvey</i> | <i>Yersinia pestis</i> | <i>Vibrio harvey</i> |
| Milieu de détermination | solide | liquide | solide | liquide | solide |

VIII-3-3-5- Activités antioxydantes

Le tableau ci-dessous montre les résultats d'étude d'activités oxydantes des HE des différentes espèces du genre *Ocotea*.

Tableau 15 : Activité antioxydants des HE des espèces du genre *Ocotea*.

| | <i>O. auriculiformis</i> [07] | <i>O. cymosa</i> [09] | <i>O. laevis</i> [16] | <i>O. zahamenensis</i> [12] |
|-----------------------|--------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| Activité antioxydants | + | - | + | + |

(-) : s'il ne possède pas d'activité antioxydants (il ne piège pas le DPPH)

(+) : s'il possède d'activité antioxydants (piège le DPPH).

CHAPITRE IX : RESULTATS D'ETUDES EFFECTUEES SUR LE GENRE RAVENSARA

Ce chapitre récapitule les résultats d'études effectuées sur les espèces du genre *Ravensara*. Elle concerne les parties des plantes étudiées, les modes d'extraction des métabolites secondaires, les caractéristiques physico-chimiques des HE extraite des espèces ainsi que les résultats d'isolement et d'indentification des structures des principes actifs. Elle est achevée par l'énumération de résultats de test d'activités biologiques de ces principes actifs.

IX.1. Espèces étudiés

Parmi les 27 espèces constituant le genre *Ravensara*, seulement trois espèces ont été étudiées à notre connaissance dont le *R. anisata* (syn. *R. aromatica*), *R. crassifolia* et le *R. laevis*

IX.1.1. *Ravensara anisata*

Ravensara anisata (syn *R. aromatica*) est connu sous le nom vernaculaire de Havozo, Avozo, Ravintsara, Voaravintsara, Lamposity [21], Hazomanitra, Hazomangidy, Manitranjety, Havozo mangidy [22]. La description botanique de l'espèce est donnée en annexe II.

C'est l'espèce la plus étudiée dans le genre *Ravensara*. En effet, plusieurs études ont été effectuées sur cette espèce dont la plupart ont abouti à des mémoires ou de thèse de doctorat.

La plupart de ces études sont axées sur les extraits volatils (huiles essentielles) des feuilles et des écorces de *R. anisata* [23] [24] [26] [27]. Deux études seulement concernent les extraits non volatils des feuilles et des écorces. [01][22]

IX.1.1.1. Criblage phytochimique [22]

Les résultats ont montré la présence d'alcaloïdes, des terpènes, des stéroïdes et des polyphénols dans *R. anisata*. (voir Tableau 16,p 52)

IX.1.1.2. Huiles essentielles [23] [24] [25] [26] [27]

Bien qu'il y ait une certaine confusion sur l'appellation *R. aromatica* ou *R. anisata*, la plupart des résultats confirment que les écorces fournissent toujours une huile essentielle riche en méthylchavicol.

Cependant, une étude plus poussée de la variabilité chimique au sein de cette espèce a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse sur 550 échantillons d'huiles essentielles extraites des différents organes de 320 arbres séparés. L'impact de différents facteurs sur cette variabilité a été examiné : conditions de distillation, séchage du matériel végétal, date de récolte, partie de la plante, origine géographique. Les analyses statistiques des données ont permis la classification des huiles essentielles des feuilles en cinq chémotypes, dominés respectivement par le méthylchavicol, le méthyl eugénol, l' α -terpinène, le sabinène et le limonène [23].

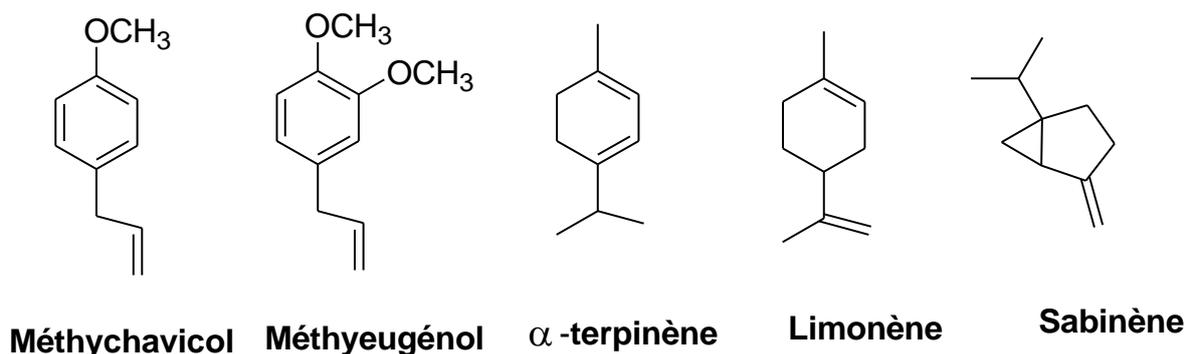


Figure 12 : Structure des chémotypes des HE des feuilles de *R. anisata*

IX.1.1.3. Extraits non volatils [01]

Les fractionnements bio guidés des extraits dichlorométhanique et méthanolique des feuilles et des écorces de *R. anisata* ont conduit à l'isolement de 12 composés, dont :

- 2 composés de l'extrait dichlorométhanique des feuilles qui sont des nouveaux α -pyrones {6-(4-acétoxy, 2-hydroxy, 8-phényloctyl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one et le 6-(2-acétoxy, 4R-hydroxy, 8-phényloctyl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one ;
- 3 composés de l'extrait dichlorométhanique des écorces : l'estragole, le 3-(4-méthoxyphényl)-2-propen-1-ol et le β -sitosterol ;
- 4 composés (flavonoïdes) de l'extrait méthanolique des feuilles : Isorhamnetine-3-O- β -(D)-glucose⁽¹⁻²⁾- β -(D) glucose-7-O- α -(L)-rhamnose; Kaempferol-3-O- β -

(D)-glucose⁻⁽¹⁻²⁾-β-(D) glucose-7-O-α-(L)-rhamnose; Kaempferol -3,7-O-dirhamnoside ; Isorhamnetine -3-O-β-(D)-glucose -7-O-α-(L)-rhamnose.

- 3 composés de l'extrait méthanolique des écorces : le (3,4,5-Triméthoxyphénol)-O-β-(D)-glucose-(1-6)-α-(L)-rhamnose qui est un nouveau produit naturel, (N-p-coumaroyl)-Tryptamine et le Bis-(2-éthylhexyl)-téréphtalate .

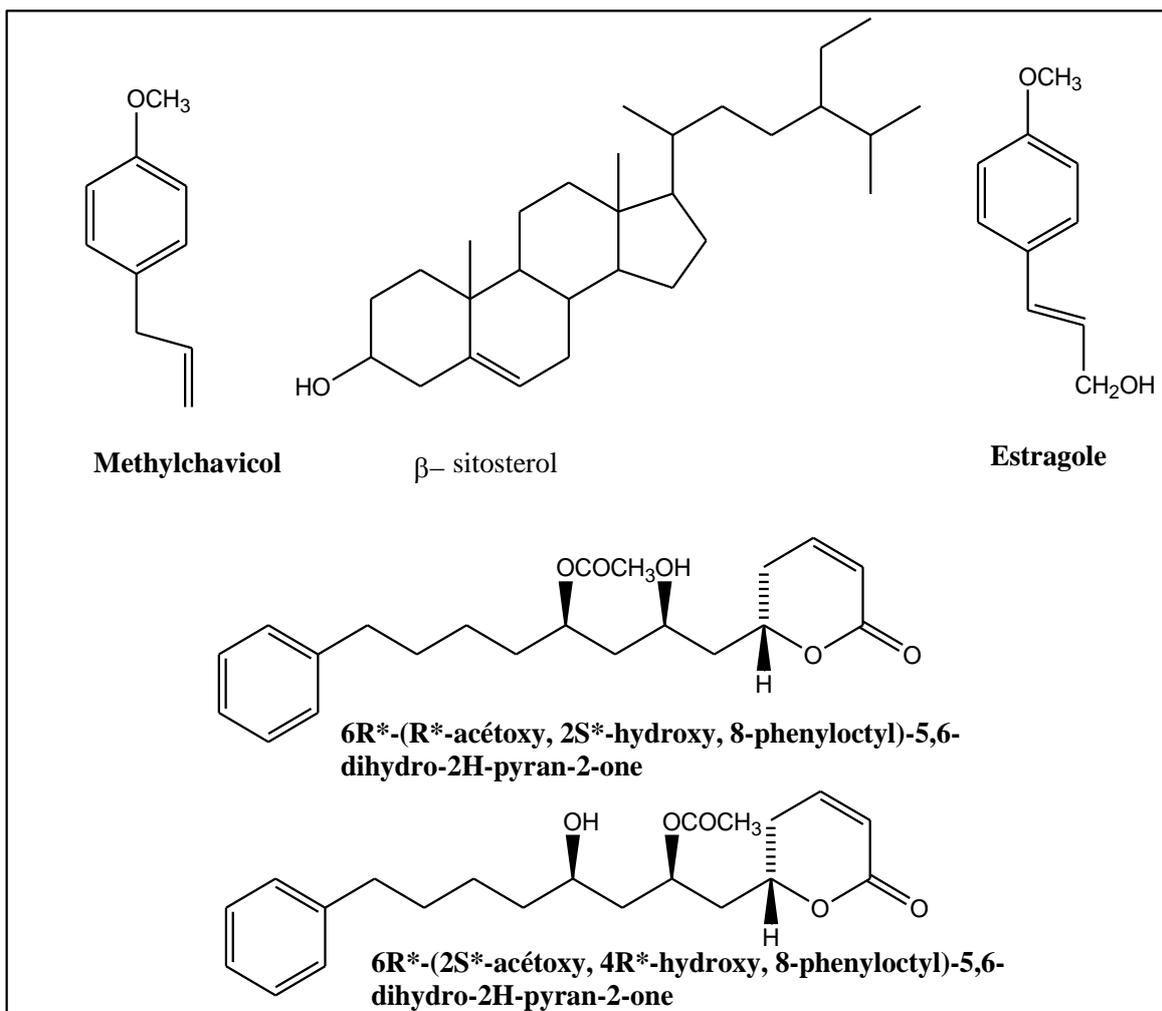


Figure 13 : Structure des composés isolés de l'extrait CH₂Cl₂ des écorces et des feuilles [28]

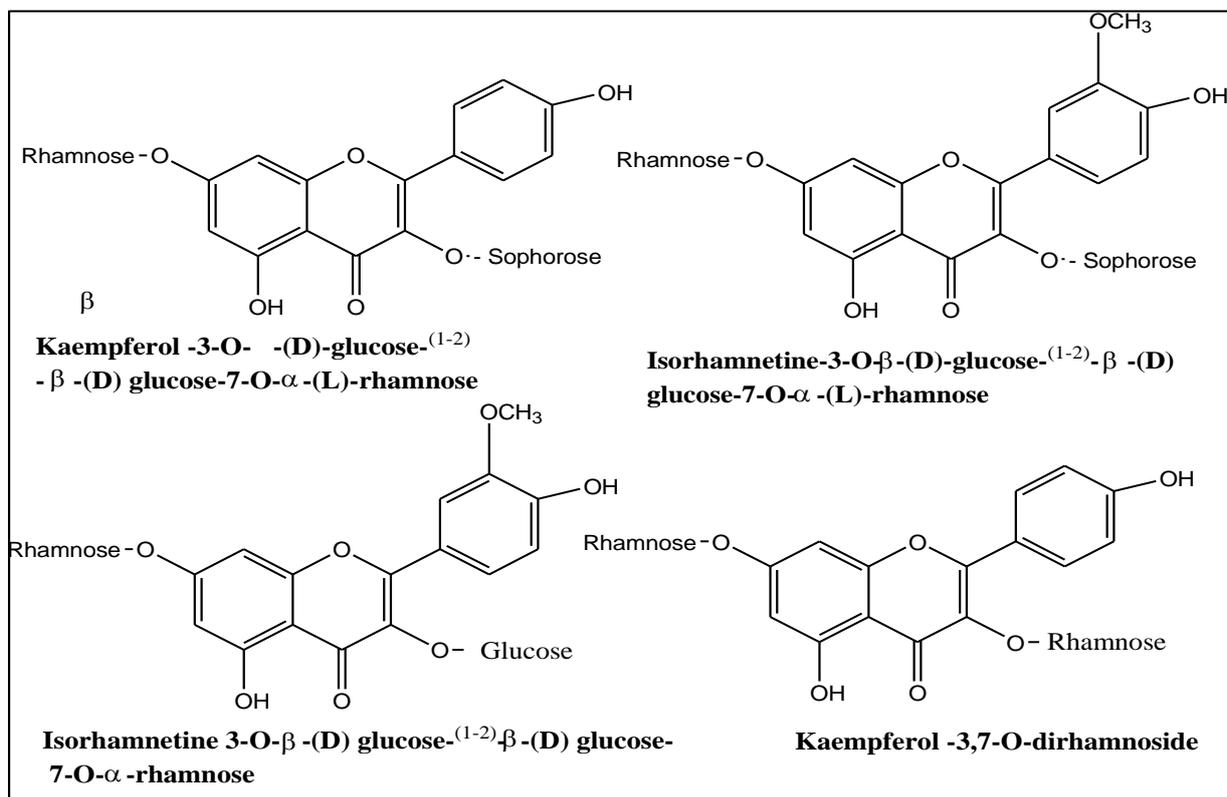


Figure 14 : Structure des composés isolés de l'extrait MeOH des feuilles [28]

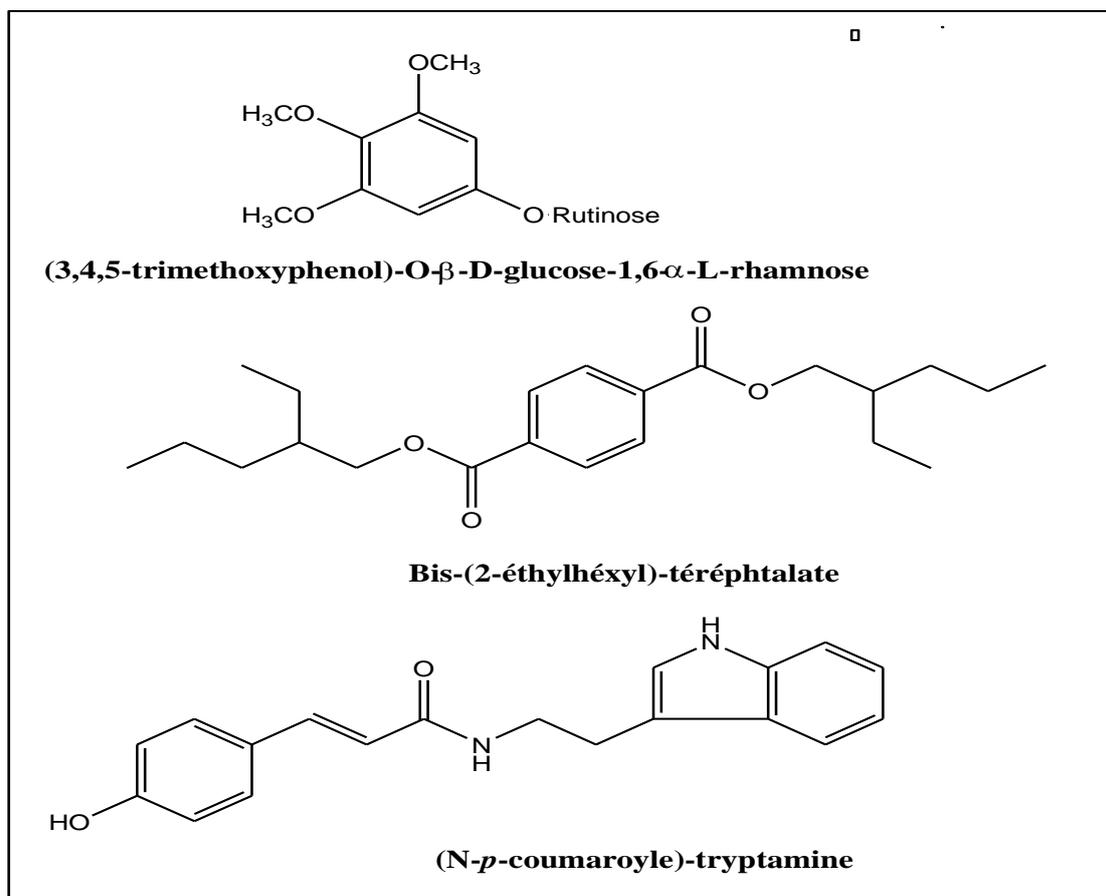


Figure 15 : Structure des composés isolés de l'extrait MeOH des écorces [28]

Les déterminations des structures de ces composés isolés ont été effectuées par les méthodes de détermination des structures des principes actifs décrites au chapitre VII de la première partie de ce travail (p :31).

IX-1-1-4- Activités biologiques

Les extraits dichlorométhaniques des feuilles et des écorces de *R. ansata* sont actifs sur *Cladosporium cucumerinum* et sur *Candida albicans*. Les composés responsables de ces activités sont les 2 α -pyrones isolés de ces extraits. [01]

L'extrait lipophile et aqueux des feuilles et des écorces de *Ravensara ansata* possède une activité larvicide contre *Aedes aegypti*. Cette activité est due à la présence du β -asarone (à concentration 15 $\mu\text{g/ml}$) dans l'extrait.

Les huiles essentielles de *R. ansata* possèdent également des activités sur des diverses souches microbiennes dont le *Listeria welshimeri* et le *Neisseria gonorrhoeae*. (voir Tableau 18, p :53).

Le *Ravensara ansata* possède une activité antioxydante.

IX-1-2- Ravensara crassifolia

Une seule étude a été recensée concernant cette espèce, celle de Raelison [28]. Elle concerne l'extrait au dichlorométhane et méthanolique des écorces de tige de *R. crassifolia*. Le matériel végétal étudié a été récolté en 1998 dans la région Atsinanana (sans précision).

IX-1-2-1- Produits isolés

Le fractionnement bio guidé de l'extrait dichlorométhanique a conduit à l'isolement des 5 nouveaux nouveaux α -pyrones dont :

- 6S-(2'S-hydroxy-6'-phénylhexyl) - 5,6-dihydro-2H-pyran-2-one,
- 6R-(4'S,6'S-dihydroxy-10'-phényl-1'-décényl) -5,6-dihydro-2H-pyran-2-one,
- 6-(2'-hydroxy-6'-phénylhexyl) -5-hydroxy-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one
- 6-(2'-hydroxy-3',5'-diène-6'-phénylhexyl) -5,6-dihydro-2H-pyran-2-one
- 6-(2'-hydroxy-3',5'-diène-6'- phénylhexyl) -5-hydroxy-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one

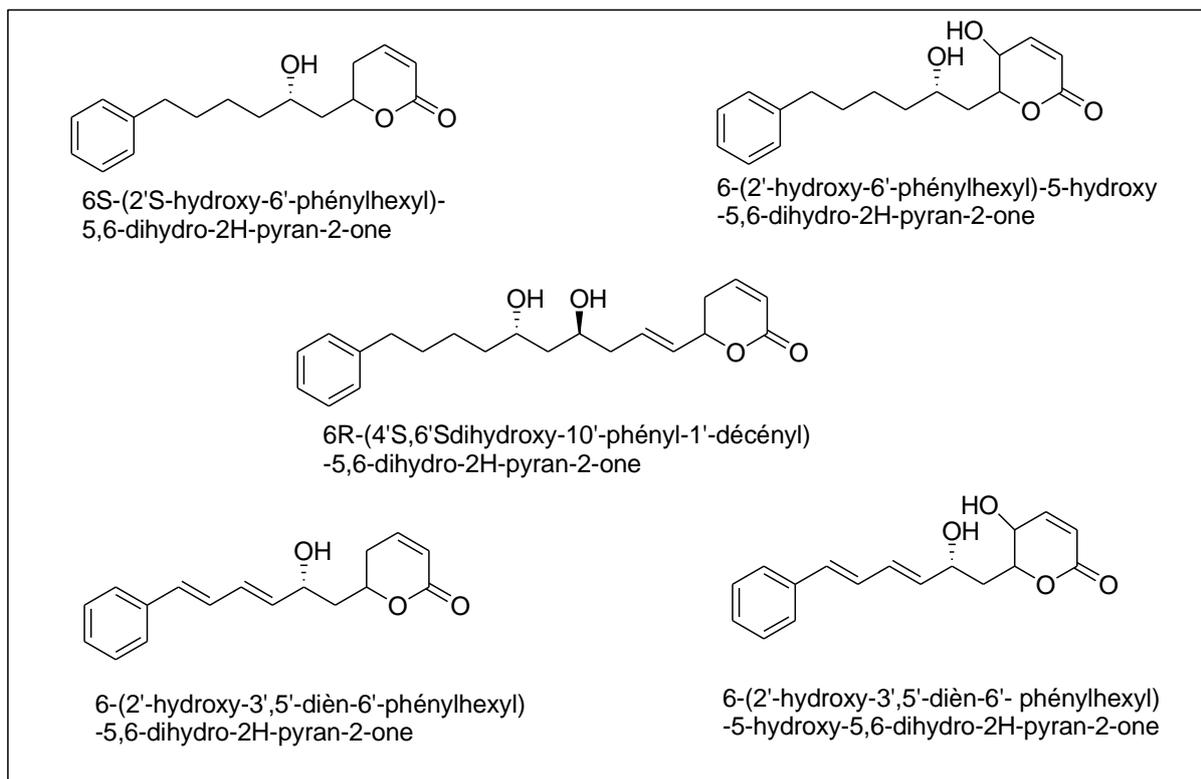


Figure 16 : Structure des composés isolés de l'extrait CH_2Cl_2 des écorces de tige de *R. crassifolia* [28]

De l'extrait méthanolique des écorces de tige, on a isolé deux énantiomères dont :

- 1β -(4'-hydroxy-3',5'-diméthoxyphényl)-2-(β -xylopyranosyloxyméthyl)-3-(hydroxyméthyl)-6,8-diméthoxy-7-hydroxy-1,2,3,4- tétrahydronaphthalène ;
- 1α -(4'-hydroxy- 3',5'-diméthoxyphényl)-2-(β -xylopyranosyloxyméthyl)-3-(hydroxyméthyl)-6,8- diméthoxy-7-hydroxy-1,2,3,4-tétrahydronaphthalène.

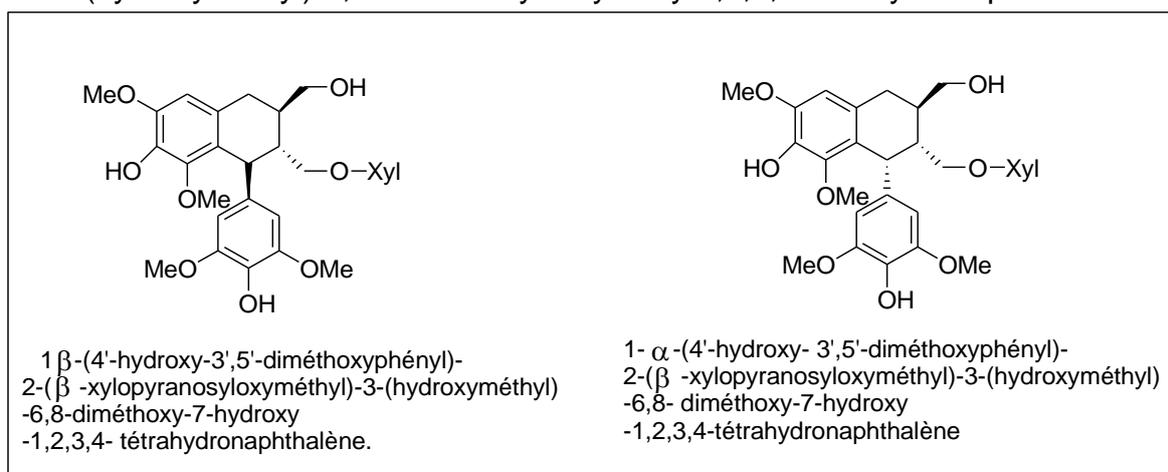


Figure 17 : Structure des composés isolés de l'extrait MeOH des écorces de tige de *R. crassifolia* [28]

IX-1-2-2- Activités biologiques

Les extraits dichloromethaniques des écorces de tige de *R. crassifolia* sont actifs sur *Cladosporium cucumerinum* et sur *Candida albicans*. Les composés responsables de ces activités sont les 5 α -pyrones isolés de ces extraits.

IX-1-3- *Ravensara laevis* [22]

Ravensara laevis est connue sous le nom vernaculaire Tavolopina. Seule une étude a été faite selon notre connaissance. Cette étude s'est portée le criblage phytochimique des feuilles de *R. laevis* et sur son huile essentielle ainsi que sur ses activités biologiques.

Le matériel végétal utilise dans cette étude a été collecté en 2013 dans la région d'Analamazaotra.

IX.1-3-1. Criblage phytochimique

Les résultats du criblage phytochimique des feuilles de *R. laevis* sont rassemblés dans le tableau suivant

Tableau 16 : Résultat du criblage phytochimique des espèces du genre *Ravensara*

| Famille chimique | Test | <i>R. anisata</i> [18] | <i>R. laevis</i> [25] |
|---------------------------------|-------------------|------------------------|-----------------------|
| Alcaloïdes | WAGNER | + | - |
| | DRAGENDORFF | + | - |
| | MAYER | + | - |
| Flavonoïdes et leucoanthocyanes | WILSTATER | - | + |
| | BATE-SMITH | - | + |
| Désoxyose | KELLER-KILIANI | - | |
| Tanins et polyphenols | Gelatine | - | - |
| | Gélatine salée | - | - |
| | FeCl ₃ | + | + |
| Antharquinone | BORNTRANGER | - | - |
| Steroides et triterpènes | LIGRERMAN | - | - |
| | BURCHARD | + | |
| | SALKOWSKI | + | + |
| Saponines | Indice de mousse | - | - |

(-) : Si la réaction est négatifs

(+) : Si la réaction est positifs

IX-1-3-2- Huile essentielle

L'HE extraite des feuilles de *R. laevis* est riche en linalol (7,00% teneur), en β -sélinène (10,48% teneur), en α -muurolène (15,79% teneur) et en β -sesquiphéllandrène (5,93% teneur)

Leurs caractéristiques caractères physico-chimiques sont décrits dans le tableau suivant.

Tableau 17 : Caractéristiques physico-chimiques des HE de *Ravensara laevis*

| Caractéristiques physiques | | | Caractéristiques chimiques | | |
|----------------------------|---|-----------------------------------|----------------------------|-------------------|-------------------------|
| Densité d_{20} | Indice de réfraction à 20°C n_D^{20} | Pouvoir rotatoire α_D^{20} | Indice d'acide IA | Indice d'ester IE | Miscibilité à l'éthanol |
| 0,941 | 1,500 | -0°878 | 1,49 | 90,80 | - |

IX-1-3-3-Activites biologiques [22]

Le *Ravensara laevis* est toxique pour la souris. Avant de mourir, les souris présentent des symptômes comme immobilité, hyperexcitation, exophtalmie, cyanose, diminution progressive du rythme respiratoire, enophtalmie, ataxie, et la convulsion clonique. (Dose utilisée 198,24 mg/kg)

Les activités antimicrobiennes et antifongiques des extraits de *R. anisata* et de *R. laevis* est donnée par le tableau ci-dessous.

Tableau 18 : Activités antimicrobienne et antifongique des extraits *R. anisata* et de *R. laevis* (diamètre des halos en mm et sensibilité)

| Souches | <i>Ravensara</i> | | | |
|---------------------------------|---------------------|-----|--------------------|-----|
| | <i>anisata</i> [22] | | <i>laevis</i> [03] | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 8 | + | 10,5 | +++ |
| <i>Streptococcus D</i> | 9 | ++ | | |
| <i>Llisteria ivanovii</i> | 10 | +++ | | |
| <i>listeria seelyeri</i> | 8 | + | | |
| <i>Listeria welshimeri</i> | 9 | ++ | | |
| <i>Rhodococcus</i> | 9 | ++ | | |
| <i>Alcalescens dispar</i> | 6 | - | | |
| <i>Gardrerella vaginalis</i> | 7 | + | | |
| <i>Neisseria gonomhaeae</i> | 10 | +++ | | |
| <i>Salmonella typhi</i> | 8 | + | | |
| <i>Shigella sonnei</i> | 6 | - | | |
| <i>Serratia marcescens</i> | 9 | ++ | | |
| <i>Escherichia coli</i> | 7 | + | 6 | - |
| <i>Pasteunella multicode</i> | 8 | + | | |
| <i>Candida albicans</i> | 7 | + | 6,5 | - |
| <i>Cladosporium cucumerinum</i> | | +++ | | |
| <i>Bacillus cereus</i> | | +++ | 10,5 | +++ |
| <i>Enterobactecloacae</i> | | | 6,5 | - |
| <i>Staphylococcus aurus</i> | | | 10,5 | +++ |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | | | 12 | +++ |

(-) : Insensible

(+) : Sensible

(+++) : Très sensible

CHAPITRE X : ETUDES EFFECTUEES SUR LE GENRE *CRYPTOCARYA*

Dans ce chapitre nous allons donner les résultats obtenus après diverses études sur les espèces du genre *Cryptocarya* selon la littérature. Ces études se sont portées sur le criblage phytochimique des plantes du genre *Cryptocarya*, des caractéristiques physico-chimiques des extraits obtenus ainsi que de leurs activités biologiques

X-1- Les espèces étudiées dans le genre *Cryptocarya*:

Deux espèces du genre *Cryptocarya* ont été étudiées selon la littérature. Il s'agit de *C. crassifolia* (Tavolo menaravina, Tavolo longotra) et de *C. thouvenotii* (Tavolo manitra, tavolo lahy) [03]. Leur description respective est donnée en annexe III.

Les matériels végétaux ont été récoltés en Juillet 2009, Janvier, avril et aout 2010 dans la Foret de Mandraka.

Les études sont axées sur les huiles essentielles des feuilles et des écorces pour *R. crassifolia* et des feuilles seulement pour *C. thouvenotii*.

X-1-1- Criblages phytochimiques

Le tableau 19 : les résultats des criblages phytochimiques effectués sur les deux espèces.

| Extrait utilisé | Famille chimique | Test | <i>C. crassifolia</i> (feuille) [03] | <i>C. Thouvenotii</i> (feuille) [03] |
|--------------------------|--------------------------|-----------------------|---|---|
| Extrait acide | Alcaloïdes | MAYER | - | - |
| | | WAGNER | - | - |
| | | DRAGENDORFF | - | - |
| Extrait hydroéthanolique | Anthraquinones | BORNTRANGER | + | + |
| | Flavonoïde | WILSTATER | + | + |
| | Leucoanthocyanines | BATE-SMITH | + | + |
| Extrait aqueux | Tanins et polyphénols | FeCl ₃ | + | + |
| | | Gélatine | - | - |
| | | Gélatine salée | - | - |
| Extrait chloroformique | Triterpènes et stéroïdes | LIGRERMAN BORCHARD | + | + |
| | | SALKOWSKI | + | - |
| | DESOXYOSE | KELLER-KILIANI | | |
| Extrait aqueux | Saponines | Indice de mouse | - | - |
| | Iridoïdes | HCl à chaud | | |

(-) : Réaction négatif

(+) : Réaction positif

X-1-2 Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles

X-1-2-1- Les caractéristiques physiques

Les caractéristiques physiques des huiles essentielles extraites de ces espèces sont données par le tableau suivant.

Tableau 20 : Caractéristiques physiques des HE des espèces du genre *Cryptocarya*

| | <i>C. crassifolia</i> (feuille) [03] | <i>C. crassifolia</i> (écorce) [10] | <i>C. Thouvenotii</i> (feuille) [03] |
|---|---|--|---|
| Densité à 20°C d^{20} | 0,928 | 0,925 | 0,916 |
| Indice de réfraction à 20°C n_D^{20} | 1,497 | 1,334 | 1,495 |
| pouvoir rotatoire α_D^{20} | 0°428 | - | +1°668 |

X-1-2-2- Les caractéristiques chimiques

Les résultats des caractéristiques chimiques des HE des deux espèces sont indiqués dans le tableau suivant.

Tableau 21 : Caractéristique chimique des HE des espèces du genre *Cryptocarya*.

| | <i>C. crassifolia</i> (feuille) [03] | <i>C. crassifolia</i> (écorce) [10] | <i>C. thouvenotii</i> (feuille) [03] |
|----------------------------|---|--|---|
| Indice d'acide (IA) | 0,79 | 5,3 | 1,67 |
| Indice d'ester (IE) | 228,06 | 18,54 | 210,83 |
| Miscibilité à l'éthanol | - | Miscible à l'éthanol | - |

X-2- Identification des constituants

Les résultats des analyses par chromatographie en phase gazeuse des huiles essentielles de ces deux espèces sont donnés par le tableau 23.

Tableau 22 : Résultats des analyses par CPG des HE des espèces du genre *Cryptocarya*.

| | <i>C. crassifolia</i> (feuille) [03] | <i>C. crassifolia</i> (écorce) [10] | <i>C. Thouvenotii</i> (feuille) [03] |
|---------------------------|---|--|---|
| α -pinène | 3,18 | | 10,67 |
| β -pinène | 2,86 | | 5,14 |
| E- β -caryophyllène | 33,50 | | 41,97 |
| Linalol | 3,49 | 12,35 | 0,19 |
| Méthyl chavicol | | 4,30 | |
| Méthyleugénol | 0,53 | 35,69 | 3,49 |
| Eugénol | | 8,89 | |
| Germacrène-D | 5,03 | 0,19 | 2,47 |
| Zingiberène | 5,06 | | 1,40 |
| β -himachalol | 7,14 | | 2,3 |

Nous remarquons dans ce tableau que les huiles essentielles des feuilles de deux espèces possèdent comme produit majoritaires le β -caryophyllène, alors que dans celle des écorces de *C. crassifolia*, le méthyleugénol (35,36%) constitue plus des tiers de la teneur en constituant

X-3- Activités biologiques

X-3-1- Résultat d'activité larvicide

Le test est effectué sur des larves de « *Culex quinquefasciatus* » ; vecteur de la filariose bovine.

Seulement le métabolite secondaire extrait du *C crassifolia* (écorce) a été utilisé lors de ce test d'activité larvicide.

Résultat : à concentration C= 40mg/ml, l'HE de *C. crassifolia* (écorce) possède une activité larvicide.

X-3-2- Résultat d'étude de la toxicité sur la souris

L'HE de *C. crassifolia* (écorce) n'est pas le toxique pour la souris. Après administration de l'HE, les souris présentent seulement des symptômes différents selon les doses utilisées.

- Pour la dose 100mg/kg : les souris sont immobiles et on note une enophtalmie suivit de la diminution de l'activité motrice.
- Pour la dose 1500mg/kg : symptôme identiques à celui du dose 100mg/kg.
- Par la dose 3000mg/kg : même symptôme que précédemment avec une difficulté à marcher.

X-3-3- Evaluation de l'activité antimicrobienne

X-3-3-1- Diamètre des halos d'inhibition et sensibilité des germes

L'activité antimicrobienne des HE extrait du *Cryptocarya crassifolia* feuille et écorce et du *Cryptocarya thouvenotii* (feuille) est indiqué dans le tableau ci-dessous

Tableau 23 : Activité antimicrobienne des métabolites secondaire du genre *Cryptocarya* (Diamètre des halos d'inhibition (mm) et sensibilité des genres)

| | <i>C. crassifolia</i> (feuille) [03] | | <i>C. crassifolia</i> (écorce) [10] | | <i>C. Thouvenotii</i> (feuille) [03] | |
|---------------------------------|---|-----|--|-----|---|-----|
| | | | | | | |
| <i>Bacillus cereus</i> | 10 | +++ | 11 | +++ | 10 | +++ |
| <i>Bacillus megatonium</i> | | | 14 | +++ | | |
| <i>Candida albicans</i> | 7,5 | + | | | 6 | - |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 6 | - | 16 | +++ | 6 | - |
| <i>Escherichia coli</i> | 6 | - | 16 | +++ | 6 | - |
| <i>Enterococcus farcalis</i> | | | 14 | +++ | | |
| <i>Salmonella eterminidis</i> | 6 | - | | | 6 | - |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | | | 0 | - | | |
| <i>Salmonella antartica</i> | | | 0 | - | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 11 | +++ | | | 8 | + |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 12 | +++ | | | 11 | +++ |
| <i>Pseudonas aeruginosa</i> | | | 8 | ++ | | |
| <i>Vibrio harveyi</i> | | | culture | +++ | | |
| <i>Vibrio fischeri</i> | | | invisible | +++ | | |

(-) : insensible

(++) : sensible

(+++) : très sensible

X-3-3-2- Résultat d'étude des CMI (concentration minimales inhibitrices)

La CMI a été déterminée sur la souche *Staphylococcus aureus*, pour les HE de *C. crassifolia* (écorce).

Tableau 24 : CMI des HE de *C. crassifolia* (écorce)

| | Concentration minimal (ml/dm ³ d'air) | Taux d'inhibition | Souches utilisées |
|-------------------------------------|--|-------------------|------------------------------|
| <i>C. crassifolia</i> (écorce) [18] | 0,0568 | 90% | <i>Staphylococcus aureus</i> |

XI-3-4- Activité antioxydant

L'HE extrait du *C. crassifolia* écorce possède une légère activité antioxydant. Aucun test d'activité antioxydant n'a été effectué sur la *C. crassifolia* (feuille) et le *C. Thouvenotii*.

CONCLUSION PARTIELLE

En guise de conclusion de cette deuxième partie de notre manuscrit, la connaissance des caractéristiques physico-chimiques d'une HE est primordiale puisqu'elle permet de la caractériser ou même de l'identifier.

Ainsi, notre travail a permis de regrouper les propriétés des métabolites secondaires des quelques espèces des (3) trois genres de la famille de *Lauraceae*.

En ce qui concerne les propriétés physiques, les résultats montrent que la densité des HE des (5) cinq espèces du genre *Ocotea* est comprise entre 0,861 et 1,054 ; pour le genre *Ravensara*, la densité du *Ravensara Laevis* est de 0,91 ; ainsi pour le genre *Cryptocarya*, sa densité est comprise entre 0,91 et 0,92. Elles ont toutes une densité supérieure à celle de l'eau ($d_{\text{eau}}^{20}=0,8618$), elles sont alors considérées comme des huiles légères.

L'indice de réfraction varie de 1,447 à 1,532 pour le genre *Ocotea* et égale à 1,5 pour celui de *Ravensara Laevis* ainsi pour le genre *Cryptocarya*. Ces HE ont des indices de réfraction généralement élevés, supérieurs à celui de l'eau (1,33) selon la littérature. L'indice de réfraction donne une idée de la pureté de l'huile.

Le pouvoir rotatoire des HE des espèces de chaque genre sont tous différents. Par exemple, celui de l'*Ocotea zahamenensis* est de $+0^{\circ}63$. Le signe positif signifie que les composés que son HE contient sont en majorité dextrogyres. Contrairement, celui de *Ravensara Laevis* est de $-0^{\circ}87$, ce qui signifie que l'HE de cette espèce contient en majorité des composés lévogyres, indiquée par le signe négatif. D'après la littérature, la plupart des HE est douée d'un pouvoir rotatoire et selon les normes plus récentes, une HE est de bonne qualité si son pouvoir rotatoire est positif [12].

Concernant les propriétés chimiques, l'indice d'acide des espèces étudiées du genre *Ocotea* varie de 0,28 à 2,80 tandis que pour celui du *Ravensara Laevis*, l'indice d'acide est de 1,49 et pour le genre *Cryptocarya*, l'indice d'acide varie de 0,79 à 1,67. On voit d'après les résultats que l'indice d'acide de l'*Ocotea trichophlebia* est très faible (0,28), comparé à celui des autres HE des espèces de la famille de *Lauraceae* comme l'*Ocotea laevis Kost* (2,805). Ceci signifie que l'*Ocotea trichophlebia* contient moins d'acide libre que l'*Ocotea laevis Kost*. L'indice d'ester du *Ravensara Laevis* égale à 90,80 tandis que celui du genre *Ocotea* varie de 6,41 à 33,24 et pour le genre

Cryptocarya, cet indice d'ester varie de 18 à 228. L'espèce *Cryptocarya crassifolia* (IE : 228) signifie qu'elle contient plus d'acides libérés par hydrolyse.

D'autre part, l'identification des constituants est aussi importante car les propriétés biologiques sont directement liées à la composition chimique des métabolites secondaires (volatils ou non volatils).

Ainsi, le chromatogramme couplé à la spectrométrie de masse (CPG/SM) ou couplé au détecteur à ionisation de flamme renseigne sur les constituants majoritaires ou non dans chaque HE des espèces de ces (3) trois genres on constate que les constituants majoritaires dans les espèces de ces (3) trois genres sont : le α -pinène 23,78% pour l'*Ocotea cymosa*, le β -pinène 14,81% pour l'*Ocotea laevis* Kost, le β -caryophyllène 33,5% pour le *Cryptocarya crassifolia* tandis que 41,97% pour le *Cryptocarya thouvenotii*.

Le criblage phytochimique de la poudre de feuille de l'*Ocotea cymosa*, l'*Ocotea trichophlébia*, l'*Ocotea madagascariensis*, le *Ravensara anisata*, le *Ravensara laevis*, le *Cryptocarya laevis*, le *Cryptocarya crassifolia* et le *Cryptocarya thouvenotii* a révélé la présence des anthraquinone, des tanins et polyphénols, des triterpènes et stéroïdes, des flavonoïdes ainsi que des leucoanthocyanes.

L'étude biologique a montré la propriété larvicide des métabolites secondaires des espèces du genre *Ocotea*, genre *Ravensara*, genre *Cryptocarya* sauf l'*Ocotea madagascariensis*, qui sont toxiques pour les souris *Culex quinquefasciatus* et ils sont toxiques aussi pour le têtard de grenouille. Les tests sur les souches de bactéries et des champignons montrent que les espèces de la famille de *Lauraceae* étudiées selon la littérature possèdent des propriétés antibactérienne et antifongique.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La science moderne, en étudiant et analysant les effets thérapeutiques des plantes, n'a pas pour but de diminuer leur valeur mais, elle veut préciser, comparer et classer leurs diverses propriétés pour qu'elles soient bénéfiques ou non. Ce travail sur les *Lauraceae* endémiques de Madagascar a pour but de grouper dans un seul recueil études chimiques et biologiques effectuées sur jusqu'ici sur cette famille.

Ainsi le présent travail intitulé « Les *Lauraceae* endémiques de Madagascar : état de lieu des études effectuées » nous a permis de :

- Améliorer notre connaissance sur les familles des *Lauraceae*.
- Connaître les métabolites secondaires de cette famille ainsi que les différentes méthodes de leurs extractions.
- Savoir des méthodes de détermination des caractéristiques physico-chimiques des principes actifs et la détermination de leurs activités biologiques et aussi les méthodes d'identification des structures des principes actifs.
- Apporter des informations sur les caractéristiques physico-chimiques et la structure des principes actifs des trois (3) genres de *Lauraceae* endémiques de Madagascar.
- Mettre en évidence l'activité des extraits des métabolites secondaires des *Lauraceae* sur des bactéries et sur des animaux.
- Déterminer les familles chimiques de l'extrait actif.

Nous avons montré dans cette étude que les espèces du genre *Ocotea*, *Cryptocarya* et *Ravensara* de la famille des *Lauraceae* ont des activités diverses aussi bien sur les bactéries, les larves de moustiques et les souris.

Le genre *Ocotea* est le mieux étudié parmi la Famille des *Lauraceae* (06 espèces, parmi les 18 recensées à Madagascar). Les études se sont portées sur les huiles essentielles de ces espèces.

Parmi les 27 espèces du genre *Ravensara* seulement trois ont fait l'objet d'études poussées : *R. anisata* et *R. crassifolia* et *R. laevis*. De ces études, nous avons remarqué que le genre *Ravensara* est une source potentielle de nouveaux produits naturels. En effet de *R. anisata* et *R. crassifolia*, on a pu isoler et identifier 6 nouveaux produits naturels dont 5- α -pyrones et un phénol glucoside. Sachant que ces 5- α -

pyrones sont aussi ces composés cytotoxiques, nous pensons qu'il faut continuer les études sur les 25 autres espèces de *Ravensara*. Dans ce cas les études des extraits non volatils seraient à prioriser et prometteuses de nouveaux produits naturels.

Etant donné que le genre *Ravensara* et *Cryptocarya* sont également des espèces très voisines, les études sur le genre *Cryptocarya* ne doivent pas être négligées. Jusqu'ici deux espèces sur les 8 constituant le genre *Cryptocarya* ont fait l'objet d'études sur leurs constituants volatiles.

Les genres *Cassytha* (01 espèce) et *Appolinias* (06 espèces) et *Potameia* (04 espèces) minoritaires n'ont fait l'objet d'aucune étude chimique ni biologique à notre connaissance. Des études sur les espèces de ces genres devront être initiées pour avoir une idée de leurs activités biologiques et les métabolites secondaires qui les composent.

On peut dire alors que l'ensemble de ces résultats montre que les ressources naturelles peuvent être un réservoir de molécule originale susceptible d'être proposées comme modèle pour des travaux de chimie médicinale. Le champ de recherche est donc particulièrement étendu et prometteur.

REFERENCES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[01] : ANDRIANAIVORAVELONA Jaconnet Oliva

Études phytochimique des deux plantes malgaches : Vepris décarpella (Rutaceae) ; Ravensara anisata (Lauraceae)

Thèse docteur-ingénieur en Génie Chimique, Département Génie Chimique, Ecole Supérieures Polytechnique Antananarivo, 2000.

[02] : KOSTERMANS A.J.H

Dans les flores de Madagascar et des Comores

Les lauracées, 81 familles, édition F Didot Paris, (1950).

[03] : RASOLOFO-ARIZAKA Tsiriniaina

Contribution à l'étude des quatre plantes de la famille des Lauraceae : Cryptocarya crassifolia, Cryptocarya thouvenotii, Ravensara laevis, Ocotea trichophlébia

Mémoire DEA chimie appliqué à l'industrie et à l'environnement, Département Génie Chimique, Ecole Supérieure Polytechnique Antananarivo, Université d'Antananarivo. (2015)

[04] : THOMAS Michel

Nouvelles méthodologies d'extractions, de fractionnements, applications aux molécules bioactives de l'argousier (Hippophae thamnoides)

Thèse de doctorat en chimie analytique phytochimie, Université d'Orléans, (2011) .

[05] : RAMIANDRISOA Diamondra Fara Tojonilaina

Étude des effets de traitement sylvicole sur l'évolution des chémotypes d'HE de Ravensara Aromatica des forêts dans le corridor Zakamenamantadia

Mémoire d'ingénieur en Agronomie, Ecole Supérieure de Science Agronomique, Université d'Antananarivo, (2008).

[06] : FEKNOUS Souad, SAIDI Fairouz, MOHAMED SAID Ramadhans

Extraction, caractérisation et identification de quelque métabolite secondaire actif de la mélisse (Melissa officinalis L.)

Revue « Nature et technologie » A-sciences fondamentale et engineering, n°11 / juin 2014 (13p).

[07] : RAZAFIMAHATRATRA Anja Jean Ella

Contribution à l'étude chimique et biologique des feuilles de Tambourissa purpurea (Tul) A.DC (MONOMIACEAE) plante endémique de Madagascar

Mémoire d'ingénieur en Génie Chimique, Département Génie chimique, Ecole Supérieure Polytechnique Antananarivo, Université d'Antananarivo, (2011).

[08] : ANDRIANANTENAINA Rigobert

Caractérisation physico-chimique et biologique d'huile essentielle et de la fraction hydrosoluble des feuilles d'Ocotea auriculiformis kost, une lauracée, endémique de Madagascar

Mémoire DEA Biochimie, Département Biochimie Fondamental Appliqué, Faculté de Sciences, Université d'Antananarivo, (2012).

[09] : SEHENOASPIERA Mihaja Nandrianina

Caractérisation physicochimique et biologique de l'HE extrait des feuilles d'Ocotea cymosa

Mémoire DEA Biochimie, Département Biochimie Fondamentale Appliquée, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, (2011).

[10] : NOURACHANI Ibrahim

Caractérisation physicochimique et biologique de l'HE des écorces de Cryptocarya crassifolia (Lauraceae)

Mémoire DEA biochimie, Département Biochimie Fondamentale Appliquée, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, (2010).

[11] : RAKOTOMALALA H.

Étude des HE de Cedrelopsis greveii, caractérisation- identification des constituants-activités biologiques

Thèse de Doctorat, Université de La Réunion, St Denis, La Réunion, (2004).

[12] : NAOMY RALIDERA Bakoliarimisa

Caractérisation physicochimique et biologique de l'HE extraite des feuilles d'Ocotea zahamenensis

Mémoire DEA biochimie, département biochimie fondamentale appliquée, faculté des sciences, université d'Antananarivo, (2012).

[13] : ALKHATB R.

Etude phytochimique et activité cytotoxique des métabolites secondaire de Ferula elaeochoytris Korovin et Ferula lycia Boiss (Apiacées)

Thèse de doctorat en science de médicament, Université Lille Nord de France, 2010.

[14] : AFNOR (Association Française de Normalisation).

Recueil des normes françaises sur les huiles essentielles paris : Afnor, (1982).

[15] : AFNOR (Association Française de Normalisation).

HE. Echantillonnage et méthodes d'analyse (Tome 1) monographies relatives aux HE (Tome 2. Volume 1 et 2), (2000).

[16] : RAZAFIDRAKOTO Anjarasoa Ravo

Caractérisation physicochimique et biologique de l'HE de feuille d'Ocotea Laevis Kost (Lauraceae)

Mémoire DEA Biochimie, Département Biochimie Fondamentale Appliquée, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, (2010).

[17] : Henk Van du Werff

A synopsis of the genus Beilschmiedia (Lauracéae) in Madagascar, (2003).

[18] : ANDRIAMIALIHARISOA Ravaka Fanoharantsoa

Métabolites secondaires particuliers des feuilles des cinq populations de Mascarocoffea et des endophytes des feuilles de Coffea sp a315

Mémoire DEA en science de la vie, Faculté de science, Université d'Antananarivo, (2011).

[19] : ANDRIAMBOLOLONA Tokiniaina

Etude biologique et chimique des métabolites secondaires des actinomycètes telluriques cas de la forêt d'Ankafobe

Mémoire de DEA en Biologie et écologie végétale, Faculté de Science, Université d'Antananarivo, (2010).

[20] : RANDRIAMAHAVALISOA Tiana F.

Études chimique et toxicologique des extraits toxiques de feuille d'Ocotea madagascariensis

Mémoire DEA Biochimie, Département Biochimie Fondamentale Appliquée, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, (2003).

[21] : ANDRIANJAFINANDRASANA Soloniony Navalonamanitra

Evaluation des propriétés allopathiques de Ravensara aromatica Sonnerat ou Cryptocarya sp. Schatz (Lauraceae).

Mémoire DEA en biologie et écologie végétal, Faculté de Science, Université d'Antananarivo, (2008).

[22] : RAHANTARINORO Josiane

Étude chimique et toxicologique des extraits toxiques de feuilles de Ravensara anisata (Lauraceae)

Mémoire DEA Biochimie, Département Biochimie Fondamentale Appliquée, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, (2004).

[23] MENUT C., ANDRIANOELISOA H., CHAIX G., DANTHU P.

Caractérisation chimique et olfactive des chémotypes de l'espèce endémique malgache Ravensara aromatica. Communication aux 29^{èmes} Journées Internationales Huiles Essentielles & Extraits DIGNE LES BAINS – 24 & 25 juin

Available from:

https://www.researchgate.net/publication/281917484_Caracterisation_chimique_et_olfactive_des_chemotypes_de_l%27espece_endemique_malgache_Ravensara_aromatica [accessed Mar 18, 2017], (2010).

[24] DE MEDICI D., PIERETTI. I, SALVATORE G., NICOLETTI M., RASOANAIVO P.

Chemical analysis of essential oils of malagasy medicinal plants by gas chromatography and NMR spectroscopy Flavour and Fragrance Journal Volume 7, Issue 5 Pages 275–28, (1992).

[25] RAMANOELINA P.A.R., RASOARAHONA J.R.E., & EMILE M. GAYDOU

Chemical Composition of Ravensara aromatica Sonn. Leaf essential oils from Madagascar. J. Essent. Oil Res.,; 18, 215-217, (2006).

[26] THERON E., HOLEMAN M., POTIN-GAUTIER M., PINEL R.

Authentification of Ravensara aromatica and Ravensara anisata Planta Medica, 60, 489-491, (1994).

[27] TUCKER A.O., MACIARELLO M.J.

Two commercial oils of Ravensara from Madagascar: R. anisata and R. aromatica Sonn. (Lauraceae). J. Essent. Oil Res.,, 7,327-328, (1995).

[28] RAOELISON Guy

Investigation phytochimique de plantes de Madagascar : Ravensara crassifolia (Lauraceae), Helichrysum faradifani (Asteraceae) et mise au point de méthodes de détection et de dosage par LC/UV/MS de l'acide aristolochique I.

Thèse de doctorat, Université de Lausanne, Faculté des sciences, (2002).

[29] : BOUDERHEM AIDA

Effet des HE de la plante Laurus nobilis sur l'aspect toxicologiques et morphométrique des larves de moustiques (culex pipiens et culiseta langiarealata)

Mémoire de master académique en biochimie appliquée, université Echahid Hamma Lakhdar D'El-Oued, (2015).

[30] : BRUNETON J.

Elément de phytochimie et pharmacognosie. Paris : Lavoisier Tech et Doc, 1987 (585p).

[31] : George S. O.

Les HE, généralités et définition, dans traités de phytothérapie et d'aromathérapie

Ed Maloine, 1979 (p141-144).

[32] : KOLLI EI-hadj

Recherche et détermination structurale de métabolite secondaire d'espèce du genre Centaurea-activité cytotoxique

Mémoire de doctorat en sciences en chimie Organique, Université de Constantine I, (République Algérienne Démocratique et Populaire), (2013).

[33] : Luicita LAGUNEZ RIVERA

Etude de l'extraction des métabolites secondaire des différent matière végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe

Thèse de Doctorat en sciences des agro-ressources. Institut national polytechnique, (2006).

[34] : RAKOTORAVELOMANALINA Andry

Distribution spatiales de type chimique et diversité génétique de Ravensara aromatica Sonnerat (Lauraceae) dans le centre est de Madagascar

Mémoire DEA en Biologie et Ecologie Végétale, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, (2007).

[35] : RANDRIANTSOA D. R.

Etude comparative des deux HE antibactérienne extrait des plante Cinnamosma fragrans et Citrus sinensis dans l'élevage de la crevette : Panaeus monodon

Mémoire DEA Biochimie, Département Biochimie Fondamentale Appliquée, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, (2004).

[36] : RAOELIARIMANANA H. L.

Contribution à la valorisation des HE de Madagascar par leur utilisation en cosmétique

Mémoire d'ingénieur en industrie agricole et alimentaire, Ecole Supérieure de Science Agronomie, Université d'Antananarivo, (1995).

[37] RAKOTONIAINA H.

Etude de la dynamique de la reconstitution foliaire et des potentialités en huiles essentielles de l'espèce Ravensara aromatica Sonnerat en vue d'une gestion durable, Mémoire d'ingénieur en Agronomie option Eaux et Forêts, ESSA, Université d'Antananarivo, (2004).

REFERENCES WEBOGRAPHIES

[01W] http://1fr.wikipedia.org/wiki/APG_III_2009 [consulter le: 23 Mars 2017]

[02W] <http://1fr.wikipedia.org/wiki/enfleurage> [consulter le: 14 Novembre 2016]

[03W] <http://tpeparfum.tripod.com/id33.html> [consulter le: 27 Novembre 2016]

[04W] http://dalmeyda.chez.com/cours/spectro_de_masse/principe.html [consulter le: 13 janvier 2017]

ANNEXES

Annexe I

Description botanique des six (6) espèces du genre Ocotéa

a) ***O. auriculiformis* Kost (*Tavolomanitra & Tavolomerina*)**[02][08]



Elle possède une ramille feuillée à cicatrices foliaires rapprochées, espacées de 3 à 5mm sur 1 à 2cm de la base de ramification ; longue de 10 à 15cm de long, à poils raides et blancs.

Feuilles pétiolées, à pétiole long de 10 à 20mm, large de 2,5 à 4mm, légèrement aplatie. Limbe foliaire est ovale-elliptique, de largeur plus grande au tiers inférieur, à bord peu récurvé, obtus à la base, aigu, parfois courtement acuminé au sommet. Il persiste 3 à 5 fruits

seulement par grappe. Les jeunes fruits sont enveloppés entièrement par les cupules réceptaculaires (source [08] p19)

b) ***O. cymosa* (Varongy *Kataikana*)**[02][09]

Arbre de taille moyenne atteignant 25 m de haut. Plante aromatique dans toutes ses parties. Les rameaux sont légèrement anguleux, glabres, gris, obscurément striés en long à pilosité dense et poudreuse. Feuilles alternes, peu saillantes sur les deux faces, elliptiques, couleur vert lustré, glabre, stipules absentes. Inflorescence d'environ 6 cm de long à pubescence courte et dense, fleurs bisexuées, régulières et odorantes. Fruits ayant la forme de baies drupacées ovoïdes atteignant 2 cm de long. (source [09] p21)



c) ***O. Laevis Kost Varongy fotsy*** [02][16]



Grands arbres (jusqu'à 25 m) à rameaux grisâtres. Feuilles opposées ou alternes, les faces supérieures sont vertes et brillantes à nervure médiane, les faces inférieures sont plus claires nervures médianes saillantes. Fleurs garnies à l'extérieur de très petits poils (sous la loupe), à sépales assez étalées. Les baies sont ellipsoïdales, apiculées à cupules rouges, hémisphériques, presque lisses.

d) ***O. Madagascariensis (Varongy)*** [20]

Grand arbre (d'après Bernier) à ramilles sillonnées, lisse, brillante, grisâtre, glabre, à rameaux cylindriques d'un gris foncé et bruns, à bourgeons glabres ou presque glabres. Feuilles alternes ou les apicales subopposées, rigides-coriaces, glabres, un peu brillantes, la face supérieure lisse, ou à réseau obscur, lâche, un peu saillant, à nervure médiane plane, élargie vers la base, à côte un peu saillante, la face inférieure un peu plus pâle, à nervure médiane peu saillante,

Fleurs encore incomplètement épanouies couvertes de poils très petits (source [20] p5)



a) ***O. Trichoplébia baker (Varongy)*** [03]



Petit arbre, haut de 7 à 10 m, de 35 à 45 cm. de diamètre, à ramilles cylindriques, subanguleuses vers le sommet, lisses, à poils petits lanugineux, serrés, de couleur ferrugineuse-jaunâtre. Feuilles alternes, parcheminées, à la fin rigide parcheminées, face supérieure ordinairement subovéolée, brillante, verte, glabre à la fin. Face inférieure à réseau saillant distinct, Fleurs blanches ou d'un vert jaunâtre, patériformes à l'anthèse, à tépales réfléchis après l'anthèse (source [03] p33)

b) ***O. Zahamenensis (Varongy matrakondro)*** [12]

Grand arbre hermaphrodite à feuilles alternes à rarement subopposées, penninerves et portant souvent des domaties aux aisselles des nervures secondaires.

Fruits ellipsoïdes à ovales, sont assis dans une cupule distincte (source [12] p15)



Annexe II

Description botanique des trois espèces du genre *Ravensara* étudiées

a) **Ravensara anisata** [02] [22]

C'est un arbre de 18 à 20 m de haut qu'on retrouve dans la forêt primaire à l'altitude de 1000-1400 m (forêt de Mandraka) et peu répandu vers 950 m (forêt d'Analamazaotra).

Ses feuilles glabres, alternes, coriaces ou rigides-coriaces sont elliptiques ou obovales elliptiques à face supérieure verte brillante et face inférieure grisâtre terne.

Ses fleurs de couleur verte, de forme campanulée comportant un tube glabre, à tépales subégaux, dressés étalés, à sommet incurvé, un peu concaves, elliptiques, longs de 2 mm environ, à base poilue.

L'écorce grisâtre, épaisse de 6 à 8 mm, finement crevassée en long, dégage une odeur pénétrante d'anis.

b) **Ravensara laevis** [03]

C'est un Arbre de 15 à 20 m., à ramilles grêles, glabres ou garnies vers le sommet de très petits poils ferrugineux pulvérulents et serrés.

Feuilles alternes, raides-coriaces, glabres, lisses, obovales-elliptiques, de 3 à 8 cm. face supérieure brillante, à nervure médiane et côtes planes ; face inférieure terne, apparaissant sous la loupe marquée de très petits points blancs, à nervure médiane.

Fleurs (vues seulement jeunes) sessiles, subcampanulées, couvertes d'un tomentum ferrugineux de poils très petits et serrés.

c) **Ravensara crassifolia**

Arbre de 18 à 22 m. de haut, à fût de 10 à 12 m. à contreforts nuls ou à peine marqués. Ramilles épaisses, anguleuses, sillonnées, sublanugineuses-tomenteuses, à poils très serrés, ferrugineux, à bourgeons densément ferrugineux tomenteux, à rameaux glabres, d'un brun foncé, garnis de plusieurs lenticelles rondes, petites.

Feuilles alternes, rigides-coriaces, elliptiques ou largement elliptiques sur 2 à 7 cm, à base contractée en pétiole, obtusément aiguë ou obtuse, à bords nettement récurvés, à sommet obtus ou plus rarement subacuminé

Fruit globuleux-déprimé, rouge, lisse, à 6 côtes obscures, atteignant 1,5 cm. de haut sur 2 cm. de diamètre, à sommet apiculés, à réceptacle épais de 1mm.environ.
[03]

Annexe III

Description botanique des (2) espèces du genre *Cryptocarya*.

a) *C. crassifolia* (Tavolo menaravina) [03]



C'est un arbre de 18 à 22 m de haut, sur 60 cm de diamètre à la base, à contreforts nuls ou à peine marqués.

Feuilles alternes, rigides-coriaces, elliptiques ou largement elliptiques, de 4 à 13 cm. sur 2 à 7 cm.

Feuilles adultes glabres, à face supérieure verte, brillante, face inférieure terne, souvent

pruineuse. (source [03] p :30)

b) *C. thouvenotii* (Tavolo manitra, Tavolo lahy) [03]

Arbre de 20 à 25 m, à ramilles raides, subanguleuses, à poils très petits et serrés.

Feuilles alternes, raides coriaces, jeunes feuilles couvertes d'un tomentum dense et fin, bientôt glabres, elliptiques, de 4,5 à 11cm sur 2 à 4 cm.

Face supérieure verte, un peu brillante tandis que la face inférieure pruineuse, un peu rosée à l'état sec.



Fleurs de 3 à 3,5 mm de diamètre à l'anthere, Fruit mûr ellipsoïdal, lisse, d'un rouge noirâtre sur le sec, atteignant 25 mm de long sur 15 à 20 mm de diamètre (source [03], p29)

TABLES DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| REMERCIEMENTS..... | I |
| SOMMAIRE..... | II |
| LISTE DES TABLEAUX..... | III |
| LISTE DES FIGURES..... | IV |
| LISTE DES ABREVIATIONS..... | V |
| GLOSSAIRE..... | VI |
| INTRODUCTION | |
| PARTIE I. GENERALITES | |
| CHAPITRE I. LES <i>LAURACEAE</i> | |
| I.1 Répartition géographique..... | 5 |
| I.2 Description botanique..... | 5 |
| I.3 Classification systématique..... | 5 |
| I.4 Les <i>Lauraceae</i> endémiques de Madagascar..... | 6 |
| I-5 Description des trois genres de la famille de lauracées étudié dans les littératures..... | 7 |
| I-5-1 Le genre <i>cryptocaria</i> | 7 |
| I-5-2 Le genre <i>Ravensara</i> | 8 |
| I-5-3 Le genre <i>Ocotéa</i> | 8 |
| CHAPITRE II. METABOLITES SECONDAIRES DES <i>LAURACEAE</i> | |
| II-1- Les principaux métabolites secondaires des <i>Lauraceae</i>..... | 10 |
| II-1-1-Les constituants volatiles (huiles essentielles)..... | 10 |
| II-1-2-Les constituants non volatiles..... | 12 |
| II-1-2-1- Les alcaloïdes..... | 12 |
| II-1-2-2- Les composés phénoliques..... | 13 |
| II-1-2-3- Rutres composés..... | 14 |
| II-2- Les activités biologiques..... | 14 |

CHAPITRE III. METHODES D'EXTRACTION DES METABOLITES SECONDAIRES

| | |
|--|----|
| III-1- Préparation du matériel végétal | 15 |
| III-1-1- identification de la plante..... | 15 |
| III-1-2- Récolte et séchage du matériel végétal | 15 |
| III-1-3- préparation proprement dit du matériel végétal..... | 15 |
| III-2- Extraction des huiles essentielles | 16 |
| III-2-1- Définition et caractéristique de l'HE | 16 |
| III-2-2- Technique d'extraction des HE | 16 |
| III-2-2-1- Méthodes d'extraction classiques..... | 16 |
| III-2-2-2- les méthode d'extraction moderne..... | 17 |
| III-3- Extraction des constituant non Volatiles | 18 |
| III-3-1- Les méthodes d'obtention de l'extrait bouillies des principes actifs..... | 18 |

CHAPITRE IV. METHODES D'ISOLEMENT DES PRINCIPES ACTIFS.

| | |
|---|----|
| IV-1- Méthodes d'analyse préliminaires | 19 |
| IV-2- Tests Biologiques | 19 |
| IV-3- Fractionnement de l'extrait et isolement des composés purs | 20 |

CHAPITRE V. DETERMINATIONS DES CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DES PRINCIPES ACTIFS

| | |
|---|----|
| V-1- Caractérisation physique | 22 |
| V-1-1- Détermination de la densité relative | 22 |
| V-1-2- Détermination de l'indice de réfraction..... | 23 |
| V-1-3- Détermination du pouvoir rotatoire | 23 |
| V-2- Caractérisation chimique des HE | 25 |
| V-2-1- Détermination de l'indice d'acide (IA)..... | 25 |
| V-2-2- Détermination de l'indice d'ester (IE) | 25 |

CHAPITRE VI. DETERMINATION DES ACTIVITES BIOLOGIQUES

| | |
|--|----|
| VI-1- Les matériels biologiques | 27 |
| VI-1-1- Les larves de Moustiques..... | 27 |
| VI-1-2- Les souris..... | 27 |
| VI-1-3- Les têtards..... | 27 |
| VI-1-4- Les souches de bactéries..... | 27 |
| VI-2- les méthodes | 28 |
| VI-2-1- Test d'activité larvicide | 28 |
| VI-2-2- test de toxicité aigüe sur les souris | 28 |
| VI-2-3- Test de toxicité sur le têtard de grenouille | 28 |
| VI-2-4- test d'activité antibactérienne | 29 |
| VI-2-5- élévation de l'activité antioxydants..... | 30 |

CHAPITRE VII. IDENTIFICATION DES STRUCTURES DES PRINCIPES ACTIFS.

| | |
|--|----|
| VII-1- La spectroscopie Ultraviolet (UV) | 31 |
| VII-2- La spectroscopie Infrarouge (IR) | 31 |
| VII-3- La résonance magnétique nucléaires (RMN) | 32 |
| VII-4- la spectrométrie de masse (SM) | 32 |
| CONCLUSION PARTIELLE..... | 33 |

PARTIE II. RESULTATS

CHAPITRE VIII. ETUDES EFFECTUEES SUR LE GENRE *OCOTEA*

| | |
|---|----|
| VIII-1- Les espèce du genre <i>Ocotea</i> étudiées | 35 |
| VIII-1-1- Description du matériel végétal..... | 35 |
| VIII -1-2- Date et lieu de récolte de matériel utilisé..... | 35 |
| VIII -2- Résultats des caractérisation physico-chimiques | 36 |
| VIII -2-1- Les caractéristiques physiques..... | 36 |
| VIII -2-2- Caractéristiques chimiques..... | 36 |
| VIII-3- identification des constituants | 37 |

| | |
|--|-----------|
| VIII-3-1- Résultat de l'analyse par CPG/DIF ou CPG/SM..... | 37 |
| VIII-3-2- Résultat du criblage phytochimique..... | 38 |
| VIII-3-3- Résultat d'étude biologique..... | 39 |
| VIII-3-3-1- Résultat de l'activité larvicide..... | 39 |
| VIII-3-3-2- Résultat d'étude de la toxicité sur la souris..... | 40 |
| VIII-3-3-3- Résultat d'étude des toxicités sur les têtards de grenouille..... | 41 |
| VIII-3-3-4- Résultat d'études sur les souches des bactéries..... | 41 |
| VIII-3-3-4-1- Diamètre halos d'inhibition et sensibilité des germes..... | 41 |
| VIII-3-3-4-2- Effet des constituants volatils des HE..... | 43 |
| VIII-3-3-4-3- Résultats des études des CMI (concentration minimale inhibitrices).... | 43 |
| VIII-3-3-5- Activités antioxydantes..... | 44 |
| CHAPITRE IX. ETUDES EFFECTUEES SUR LE GENRE <i>RAVENSARA</i> | |
| IX.1. Espèces étudiés..... | 45 |
| IX.1.1. <i>Ravensara anisata</i> | 45 |
| IX.1.1.1. Criblage phytochimique | 45 |
| IX.1.1.2. <i>Huiles essentielles</i> | 46 |
| IX.1.1.3. Extraits non volatils | 46 |
| IX-1-1-4- Activités biologiques..... | 49 |
| IX-1.2. <i>Ravensara crassifolia</i> | 49 |
| IX-1.2-1- Produits isolés | 49 |
| IX-1.2-2- Activités biologiques..... | 51 |
| IX-1.3.- <i>Ravensara laevis</i> | 51 |
| IX.1.3.1. Criblage phytochimique..... | 51 |
| IX.1.3-2- Huile essentielle..... | 52 |

| | |
|---|----|
| IX-3-3-Activites biologiques..... | 52 |
| | |
| CHAPITRE X. ETUDES EFFECTUEES SUR LE GENRE <i>CRYPTOCARYA</i> | |
| X-1- Les espèces étudiées dans le genre <i>Cryptocarya</i> | 55 |
| X-1-1- Criblages phytochimiques | 56 |
| X-1-2 Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles | 57 |
| X-1-2-1- Les caractéristiques physiques..... | 57 |
| X-1-2-2- Les caractéristiques chimiques..... | 57 |
| X-2- Identification des constituants | 58 |
| X-3- Activités biologiques | 59 |
| X-3-1- Résultat d'activité larvicide..... | 59 |
| X-3-2- Résultat d'étude de la toxicité sur la souris..... | 59 |
| X-3-3- Evaluation de l'activité antimicrobienne..... | 59 |
| X-3-3-1- Diamètre des halos d'inhibition et sensibilité des germes..... | 59 |
| X-3-3-2- Résultat d'étude des CMI (concentration minimale inhibitrice)..... | 61 |
| XI-3-4- Activité antioxydante..... | 61 |
| CONCLUSION PARTIELLE | 62 |
| CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES..... | 65 |

Auteurs : RAFALINIRINA Mamy Herisata
RAFARALAHY Niaina Fenosoa
Titre : « Les Lauraceae endémiques de Madagascar : état de lieu des études effectuées ».
Nombre de page : 74 **Nombre de tableau** : 24 **Nombre de figure** : 17

RESUME

Dans le cadre de cette étude, nous avons recensé (11) espèces endémiques des (3) genres (genre *Ocotea*, *Ravensara*, *Cryptocarya*) de la famille des *Lauraceae* qui ont été fait l'objet des études chimiques et biologiques. La détermination des métabolites secondaires des *Lauraceae* montre la présence des alcaloïdes, flavonoïdes et d'autres composés. Les résultats relevés à partir des études sur le genre *Ocotea* qui est le mieux étudié parmi cette famille (6 espèces, parmi les 18 espèces recensées à Madagascar) montrent particulièrement que l'huile essentielle extraite par hydro distillation de *Ocotea azahamenensis* est riche en safrôle (83,17%) d'après l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM). Pour le genre *Ravensara* 3 espèces (*R.anisata*, *R.crassifolia* et *R.laevis*) ont été étudiées. La littérature montre l'isolement et l'identification des 3 nouveaux produits naturels dont deux sont des α -pyrones et un phénol glucoside à partir du *R.anisata* et 6 nouveaux α -pyrones de *R.crassifolia*. L'étude des (2) deux espèces du genre *Cryptocarya* à savoir le *C.crassifolia* et le *C.thouvenotii* montre que le méthyl eugénol et le E- β -caryophyllène sont respectivement les produits majoritaires. Les études biologiques révèlent la propriété larvicide des métabolites secondaires des espèces du genre *Ocotea*, *Ravensara* et *Cryptocarya* sauf *O. madagascariensis*. Ce dernier possède des activités toxiques pour la souris et le têtard de grenouille. Les tests d'activités antifongiques et ou antibactérienne sur les espèces de ces trois genres montrent qu'ils sont différents d'une espèce à une autre. *O. zahamenensis* inhibe le *Vibrio Harvey* tandis que *O. trichoplébia* ne l'est pas.

Mots-clés : *Lauraceae*. endémique, *Ocotea*, *Cryptocarya*, *Ravensara* ; métabolites secondaires ; activités biologiques.

ABSTRACT

In the setting of this survey, we counted (11) endemic species of them (3) kinds (*Ocotea* kind, *Ravensara*, *Cryptocarya*) of the family of the *Lauraceae*s that have been been the subject of the chemical and biologic studies. The determination of the secondary métabolites of the *Lauraceae*s watches the presence of the alkaloids, flavonoïdes and of other compounds. The results raised from the studies on the *Ocotea* kind that is studied best among this family (6 species, among the 18 recorded species to Madagascar) especially show that the essential oil extracted by hydro distillation of the *Ocotea azahamenensis* and rich in safrôle (83, 17%) according to the analysis by chromatographie in sparkling phase coupled to the spectrométrie of mass (CPG / SM). For the *Ravensara* kind 3 species (*R.anisata*, *R.crassifolia* and *R.laevis*) have been studied. The literature shows the isolation and the identification of the 3 new natural products of which two are the α -pyrones and a phenol glucoside from the *R.anisata* and 6 new α -pyrones of *R.crassifolia*. The survey of them (2) two species of the *Cryptocarya* kind to know the *C.crassifolia* and the *C.thouvenotii* shows that the méthyl eugénol and the E- β -caryophyllène are respectively the majority products. The biologic studies reveal the property larvicide of the secondary métabolites of the species of the *Ocotea* kind, *Ravensara* and *Cryptocarya* except the *O. madagascariensis*. This last possesses toxic activities for the mouse and the tadpole of frog. The tests of activities antifongiques and or antibacterial on the species of these three kinds show that they are different from a species to another. The *O. zahamenensis* inhibits the *Vibrio Harvey* while the *O. trichoplébia* is not.

Keys-words : *Lauraceae* ; genus *Ocotea*, *Cryptocarya*, *Ravensara* ; secondary metabolits ; biologic activity.

Encadreur : Dr ANDRIANAVORAVELONA Jaonnet Oliva, HDR