

## *LISTE DES ABREVIATIONS*

**µl** : microlitre

**µm** : micromètre

**AFNOR** : Association Française de Normalisation

**CCL<sub>4</sub>** : tetrachloromethane

**CCM** : Chromatographie sur Couche Mince

**cm** : centimètre

**CPG** : Chromatographie Phase Gazeuse

**DCM** : dichlorométhane

**DMSO** : Diméthyle sulfoxyde

**EMAG** : Ester méthylique des acides gras

**EtOH** : Ethanol

**FeCl<sub>3</sub>** : Chlorure de fer III

**g** : gramme

**h** : heure

**HCl** : Acide chlorhydrique

**IPM** : Institut Pasteur de Madagascar

**KOH** : Hydroxyde de potassium

**LCE** : Longueur de chaînes équivalentes

**LHAE** : Laboratoire d'Hygiène d'Analyse et Environnemental

**m** : mètre

**mg** : milligramme

**MH** : Muller-Hinton

**mm** : millimètre

**NaCl** : Chlorure de sodium

**pH** : Potentiel hydrogène

**R ou Rdt** : Rendement

**TCS** : Triptone Caséine Soja

**UV** : Ultra-violet

## *GLOSSAIRE*

**Antibiotique** : se dit de substances médicamenteuses comme la pénicilline, les sulfamides etc., qui empêchent le développement de divers microorganismes.

**Antifongique** : un médicament utilisé pour traiter les mycoses.

**Antiseptique** : agent, médicament utilisé pour l'antisepsie (destruction des microorganismes pathogènes capable de provoquer des infections)

**Cathartique** : médicament aux propriétés laxatives

**Drupe** : fruit charnu ayant un noyau (abricot, cerise).

**Endocarpe** : partie la plus interne du fruit.

**Glabre** : dépourvu de poils.

**Hypogène** : terme qualifiant les fleurs dont l'androcée et le périanthe sont situés au-dessous de l'ovaire, c'est-à-dire directement sur le pédoncule

La **feuillaison** ou **foliaison** est un nom indénombrable qui désigne, pour les végétaux non persistants, l'apparition des feuilles, phase saisonnière concomitante au débourrement

**Limbe** : partie principale, élargie et étalée de la feuille.

**Lobé** : à découpures arrondies

**Macération** : opération consiste à laisser tremper à froid un corps ou une substance dans un liquide pour en extraire les constituants solubles.

**Mésocarpe** : zone médiane d'un fruit, entre l'épicarpe et le noyau ou les graines, charnue et sucrée chez les fruits comestibles.

**Penné (nervation)** : une nervure principale et des nervures secondaires régulièrement disposées de chaque côté..

**Péricarpe** : partie du fruit qui entoure et protège la graine. L'épicarpe + le mésocarpe + endocarpe = péricarpe.

**Pétiole** : partie rétrécie reliant le limbe d'une feuille à l'autre.

**Phénologie** : Etude de l'influence des climats sur les phénomènes biologiques saisonniers végétaux et animaux.

**Pinnules** : subdivisions des frondes de certaines fougères

**Rhytidome** : écorce externe crevassée recouvrant la surface des tiges et des racines âgées et s'exfoliant de diverses manières (écailles).

## *INTRODUCTION*

Les produits chimiques d'origine synthétique utilisés en médecine ou dans la lutte contre les insectes nuisibles suscitent de plus en plus de questionnements quant à la sécurité de leur utilisation. Ils peuvent, en effet, représenter un danger aussi bien pour l'environnement que pour la santé humaine. Ces dangers ont conduit l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à interdire l'usage de certains produits chimiques, d'autres vont être prohibés dans un futur proche [1].

L'utilisation des plantes comme source de molécules bioactives semble garantir plus de sécurité par le caractère naturel des produits qu'elles contiennent. Ainsi, le *neem* ou *Azadirachta indica* (Meliacées) constitue aujourd'hui une matière première importante pour la fabrication de bio insecticide puissant. D'après une source auprès de la Direction de la Protection des Végétaux de Nanisana, des extraits de cette plante sont régulièrement testés sur des insectes ravageurs de légumes.

*Melia azedarach* est une plante de la même famille que *Azadirachta indica*. Elle a été introduite à Madagascar, et l'espèce est largement distribuée sur les Hautes terres et dans le sud de Madagascar. La littérature scientifique signale que des extraits de la plante sont utilisés à des fins thérapeutiques, et également comme pesticides naturels. Cependant, peu de travaux sont rapportés concernant l'étude chimique et biologique de la plante qui pousse à Madagascar, et cela nous a incités à entreprendre une étude plus exhaustive sur les différents organes de la plante pour une caractérisation de leurs extraits.

Le présent ouvrage commence par une synthèse bibliographique sur *Melia azedarach* qui constitue la première partie de l'ouvrage.

La deuxième partie concerne nos travaux personnels : nous développons au premier chapitre l'étude phytochimique des différents organes de la plante ainsi qu'une évaluation de leurs activités antibactériennes. Dans un deuxième chapitre, nous procédons à une caractérisation chimique et physico chimique de l'huile renfermée dans l'amande de graines de *Melia azedarach*. Dans un troisième chapitre, nous évaluons l'effet insecticide de *Melia azedarach* sur un insecte ravageur de maïs en stock.

Enfin, nous présenterons une conclusion générale ainsi que les perspectives de l'étude.

# *PARTIE I*

## **PARTIE I) : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE SUR *Melia azedarach***

### **CHAPITRE I) : Généralités sur l'espèce *Melia azedarach***

L'espèce *Melia azedarach* appelée aussi lilas de Perse est un arbre à feuillage caduc. Elle est parfois confondue avec le margousier ou *Azadirachta indica*. Elle peut l'être aussi avec un hybride de lilas, *Syringa persica* également appelé « lilas de Perse ».

#### **1) Etymologie**

Le nom *Melia*, désignation grecque du frêne, fut donné au lilas de Perse à cause de la ressemblance entre les feuillages des deux arbres. La floraison mauve violette en panicules rappelle le lilas, d'où son nom vernaculaire.

Le nom spécifique « azedarach » provient de la contraction du nom persan de cette espèce, « azad-dhirakt » signifiant « arbre noble ».

Les arguments développés par WATT en 1889 [2] apparaissent plus convaincants. Selon sa thèse, “Aza” signifie en perse “amer” et “drakhat” signifie “arbre”. Ainsi le nom de *Melia azedarach* ou azadirakhat devient en perse “l’arbre amer”.

#### **2) Origine de l'espèce**

Plusieurs sources bibliographiques évoquent l'origine géographique de la plante, et la majorité des auteurs s'accorde à dire que l'arbre est originaire de l'Inde. Ainsi, selon NARDO, il est, tout comme le *Neem*, originaire de l'Inde [3].

#### **3) Répartition géographique de *Melia azedarach***

L'espèce a été introduite aux États-Unis vers 1830 comme plante ornementale, et a été largement cultivée dans la partie sud. Elle s'est répandue dans toute l'Amérique tropicale, du Mexique à l'Argentine, puis à certaines îles des Caraïbes comme à Porto Rico [4], et s'est également adaptée en Afrique du Sud [5].

Du fait qu'il s'adapte bien aux climats chauds et secs, *M. azedarach* est une espèce communément trouvée dans les régions tropicales sèches et subtropicales d'Océanie, d'Asie, d'Afrique et d'Amérique (figure 1).

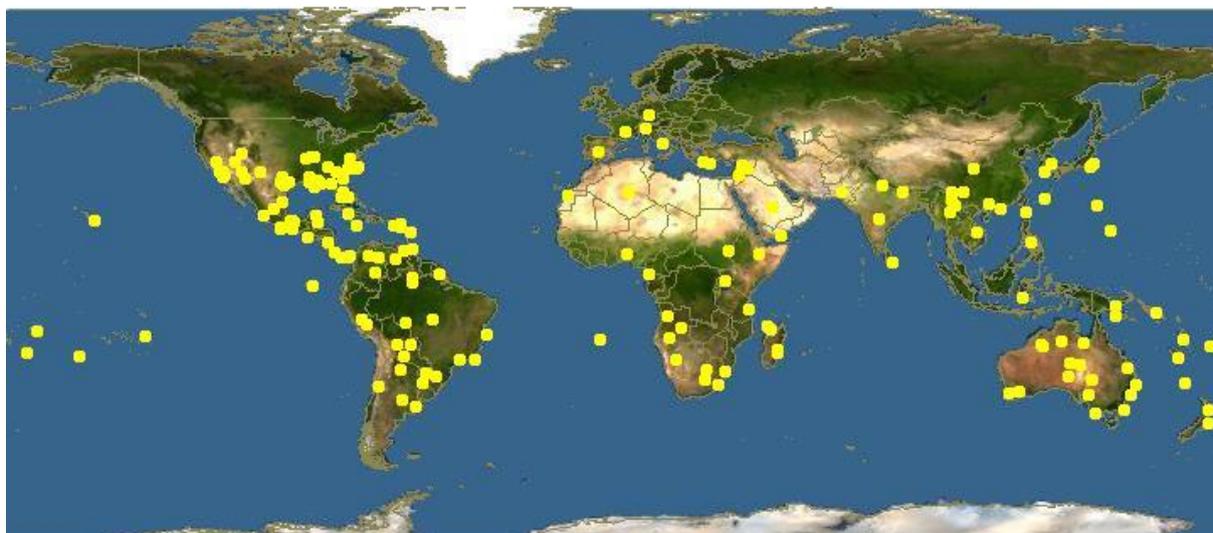


Figure 1 : Répartition géographique de *Melia azedarach* dans le monde [3]

A Madagascar, l'aire de répartition du Voandelaka est vaste. On le trouve plus fréquemment dans les régions des Hautes terres et du Sud (figure 2). L'histoire de l'introduction de *Melia azedarach* à Madagascar est assez mal connue. Des considérations liées à des proverbes ancestraux ont conduit à émettre l'hypothèse d'une introduction du Voandelaka à Madagascar vers le début du XX<sup>e</sup> siècle [6].

Quant à l'appellation « Voandelaka », elle viendrait de *voa* = fruit et *lelaka* qui est issu probablement du mot persan lilac. Cette dénomination ne viendrait pas en tout cas de *lelaka* qui signifie *lécher* en malgache, car la drupe ne se consomme pas, contrairement à la gousse de *Tamarindus indicus* appelé « Voamadilo ».

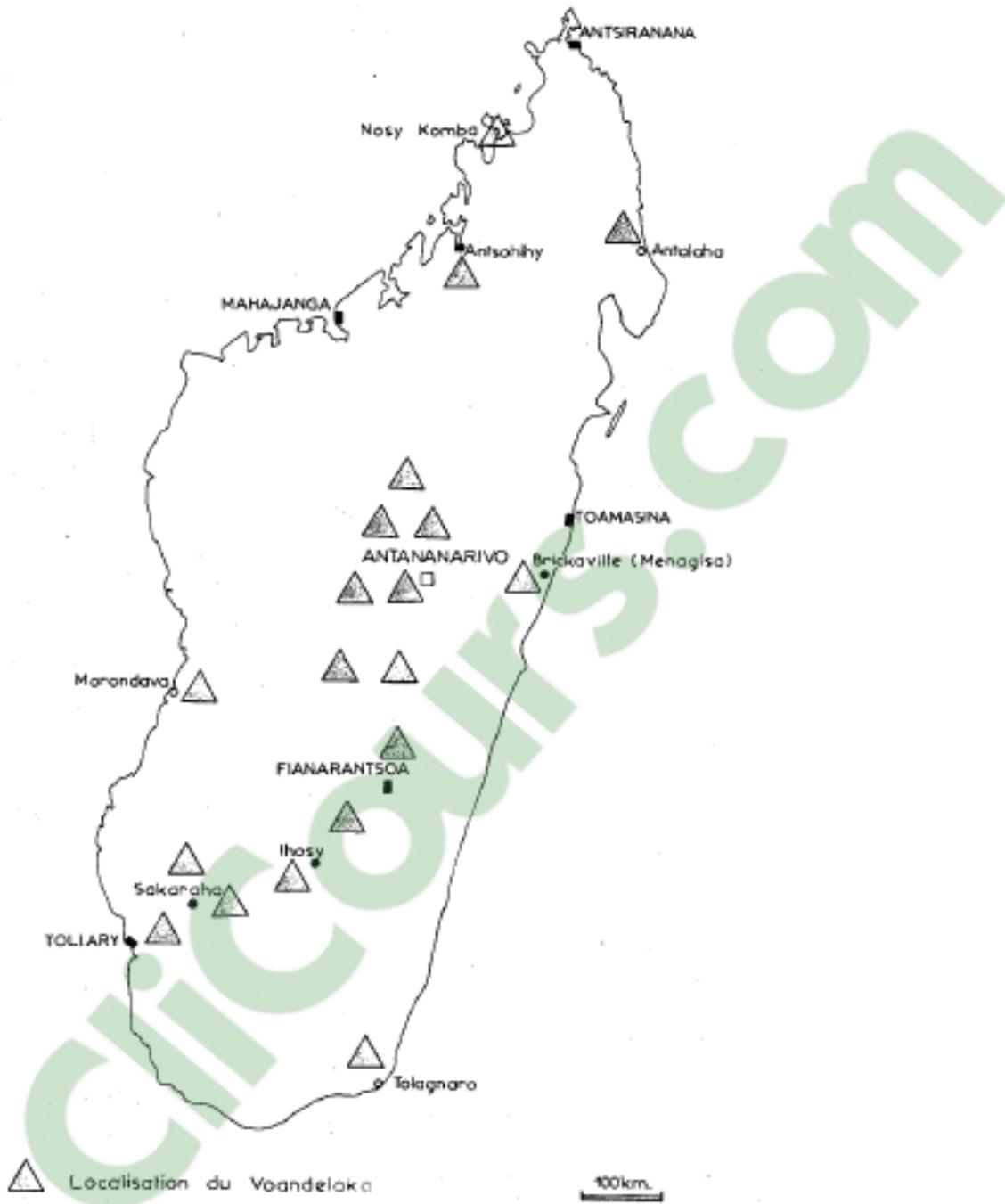


Figure 2 : Répartition géographique de *Melia azedarach* à Madagascar [6]

## CHAPITRE II) : Principales caractéristiques botaniques de *Melia azedarach*

### 1) Classification et nomenclature [7]

*Melia azedarach* est classé comme suit :

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidae

Division : Magnoliophyta

Ordre : Sapindales

Famille : Meliaceae

Genre : *Melia*

Espèce : *Melia azedarach*

*Melia azedarach* possède plusieurs noms vernaculaires selon la région géographique où évolue le végétal (Tableau 1).

Tableau 1 : Quelques noms vernaculaires de *Melia azedarach*

Zone géographique	Nom (s) vernaculaire(s)
<b>Asie, Australie, Sud du Pacifique</b> Indonésie Hindi Malaisie Inde [8][9] Bengali Iran Philippines	Marambung, mindi, gringging Betain, deikna,dek, drek, bakain, mallan nim, bakarja Mindi kecil Ghoda neem, Bakain, Ramyaka, Karmuka, Kalo neem Bakarjan, ghora nim, mahanim, mahnim Lilac Bagaluña, balagaño, paraiso
<b>Afrique</b> Afrique du Sud Madagascar	Syringa tree Voandelaka
<b>Amérique</b> Brésil Argentine	Cinarnorno Paraiso, giant paradise
<b>Europe</b> Italie [10] France Espagne Angleterre	Albero dei paternostri Lilas de perse, lilas des indes, mélia faux neem Arbol enano, Alilaila, Violeta, lila, Paraíso, lilayo Persian lilac, chinaberry

## 2) Description du végétal [4][6]

*Melia azedarach* est une plante verte attrayante. C'est un arbre feuillu, à feuillage caduc, à croissance rapide, qui peut atteindre 6 à 8 mètres de hauteur en quatre ou cinq ans. Sa hauteur maximale peut être de 12 à 16 mètres. Les différents organes de la plante sont présentés à la figure 3.

### 2-1) *L'écorce*

Au stade juvénile, l'écorce est lisse et est d'un vert noirâtre.

Quand l'arbre est adulte, l'écorce devient gris foncé avec de larges fissures ou crevasses longitudinales peu profondes. Elle n'a pas de rhytidome, et son épaisseur est plutôt faible, 2 à 3 centimètres.

### 2-2) *Les feuilles*

Les feuilles de l'arbre sont odorantes et caduques.

Elles sont alternées, bipennées ou tripennées, elles ont 2 à 3 paires de pinnules portant 2 à 4 paires de foliolules et une foliolule terminale.

Le limbe est glabre, à bord denté, quelquefois lobé. Ses dimensions sont plutôt faibles : 3 à 8cm de long sur 1 à 3cm de large.

Le pétiole est cylindrique à base renflée. Il a des dimensions moyennes de 10 à 20cm de long sur 2 à 3 cm de circonférence.

### 2-3) *Les fleurs*

Les inflorescences sont terminales et en panicules axillaires.

Les fleurs sont petites, mauves, odorantes, portées par des pédicelles articulées dépourvues de disque et sans stipules.

La corolle est formée par 5 pétales libres à préfloraison valvaire.

Le calice est formé par 5 sépales soudés à préfloraison valvaire.

Les étamines en nombre de 10 sont soudées et forment un tube staminal. Les anthères sont ethrorses sessiles au sommet du tube staminal. Les graines de pollen sortent par une fente longitudinale.

Le style est assez long ; il est terminé par un stigmate saillant et papilleux. L'ovaire est supère et est constitué par 5 carpelles soudées. L'ovule est orthotrope à placentation axiale.

Ces caractéristiques montrent que les fleurs sont hermaphrodites et hypogènes.

#### **2-4) Les racines**

Sur un jeune plant, les racines sont caractérisées par un pivot surmonté de racines latérales. Chez un arbre adulte, ces racines latérales se développent et s'enfoncent plus ou moins obliquement dans le sol. C'est un système racinaire superficiel qui se trouve généralement au sein de la couche supérieure de 70 cm du sol.

#### **2-5) Les fruits**

Le fruit est une drupe ovoïde, lisse et de couleur verte devenant jaune ocre, avec des rides correspondant à 5 sillons en maturité. Il est long de 12 à 15mm avec 8 à 10mm de diamètre.

L'endocarpe est dur. Les fruits peuvent persister sur l'arbre sous forme de grappes pendantes durant une année et même plus avant de tomber.

#### **2-6) Les graines**

Chaque fruit contient 4 à 5 graines non ailées, peu albuminées et oléagineuses.

Selon des essais effectués à DEHRADUN en Inde, les graines conservent leur pouvoir germinatif intact pendant une année. Il est même constaté que les graines stockées, âgées d'une année, ont donné une fertilité 4 fois supérieure à celles des graines fraîchement récoltées [11].

Quelques images des différents organes de la plante sont présentées à la figure 3.



Arbre(a)



Fruits(b)



Fruits(b)



Graines(c)



Fleurs(d)



Feuilles(e)

Figure 3 : Clichés de *Melia Azedarach* : arbre (a), fruits (b), graines (c), fleurs (d), feuilles (e)

### 3) Conditions de croissance de *Melia azedarach*

*Melia azedarach* est un arbre de la zone climatique subtropicale ; son l'habitat naturel est la forêt de saison, y compris les bosquets de bambou. L'arbre se développe rapidement dans de bonnes conditions climatiques et pédologiques et sur de nombreux types de sols, mais est mieux adapté aux sols bien drainés et sableux [4]. Il meurt rapidement si le site est saturé d'eau. Un sol de pH neutre semble bien convenir à l'arbre.

Enfin, la lumière est un facteur environnemental très important pour la croissance de la plante.

### 4) Observations phénologiques de *Melia azedarach* de Madagascar [6]

#### 4.1. Foliaison

Le cycle végétatif de l'espèce peut s'accommoder avec la saison des pluies à Madagascar. Ainsi, la feuillaison commence au mois d'Août et se termine en Mars-Avril. La foliaison est plutôt forte en Novembre, et la défoliaison s'opère au mois de Mars.

#### 4.2. Floraison

*Melia azedarach* commence à fleurir au mois de septembre. La floraison s'étale sur deux à trois mois.

#### 4.3. Fructification

Chaque floraison est suivie d'une abondante fructification. La durée de la fructification est assez étalée : 6 à 7 mois. Les fruits tombent juste avant ou pendant la saison des pluies, mais certains persistent sur l'arbre durant une année ; ce qui est d'ailleurs conforme aux observations faistes en Inde.

Ces différents phénomènes sont récapitulés dans le tableau 2.

Tableau 2: Phénologie du voandelaka

mois	Août	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J
Foliaison	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Floraison	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructification	X	X	x*	+*	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : période correspondant à la foliaison, à la floraison et à la fructification

- : période correspondant à la défoliaison, à l'arrêt de végétation

x: période correspondant à la pendaison des fruits

\* : période correspondant à la tombée des fruits

### CHAPITRE III) : Différentes propriétés de *Melia azedarach*

L'adaptation de *Melia azedarach* à des conditions pédoclimatiques difficiles fait de cette plante un candidat de choix dans la lutte contre la déforestation et l'érosion, et pour la stabilisation des sols. Outre l'ombre que procure cet arbre et qui a motivé certains projets de plantations, notamment en France et au Sénégal, il est aussi pourvoyeur de bois d'œuvre et de chauffage à Madagascar et dans certaines régions d'Afrique.

Mais ce sont sans aucun doute les propriétés pharmacologiques remarquables des extraits de la plante qui ont été à l'origine du développement de cet arbre. Certaines de ces propriétés sont connues depuis très longtemps, et toutes les parties de la plante ont ainsi été exploitées en médecine traditionnelle.

#### 1) Propriétés médicinales

*M. azedarach* est bien connu pour ses propriétés médicinales. Ainsi, la plante a été utilisée pour soigner la lèpre [12]. Dans ses utilisations traditionnelles, on signale que la margosine, alcaloïde de l'écorce est fébrifuge et tonifiant [13]. L'écorce des racines est vermifuge [14]. La méliacine, un peptide isolé de feuilles de *M. azedarach* présente une activité puissante contre l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) [15]. Des extraits de fruits ont été testés *in vivo* pour en évaluer les propriétés anticancéreuses sur des tumeurs du sarcome 180 et de l'adénocarcinome 755, donnant des résultats peu significatifs [15]. Il est aussi rapporté que le 28-déacétylsendanine extrait à partir de fruits de *Melia azedarach* entraîne une inhibition de la réplication du virus herpès simplex de type 1 [16]. *M. azedarach* a également été signalé comme abortif, antiseptique, purgatif et diurétique [17][18]. Ses différentes parties sont anthelminthiques, antipaludéennes, cathartiques, émétiques. Des extraits de feuilles ont été évalués pour leur activité antioxydante sur *Melia azedarach* d'Iran [19]. Le fruit mûr séché est utilisé comme antiparasitaire externe [20].

#### 2) Propriétés antifongiques

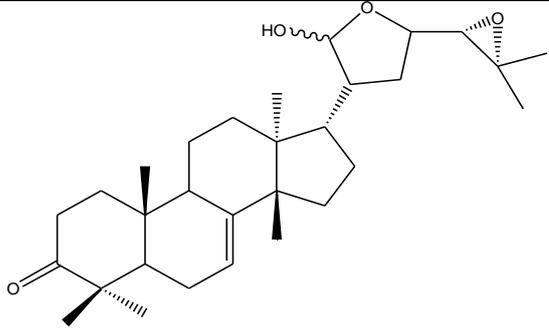
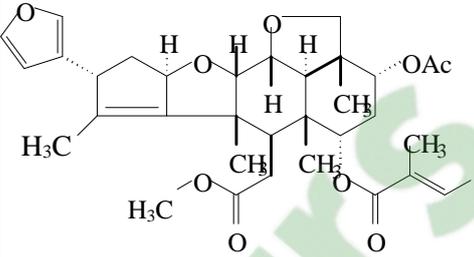
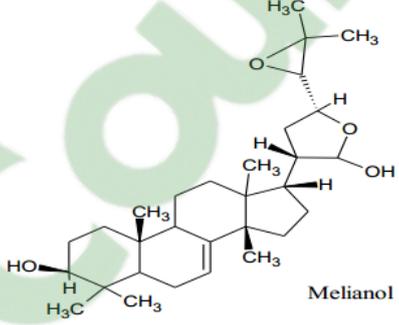
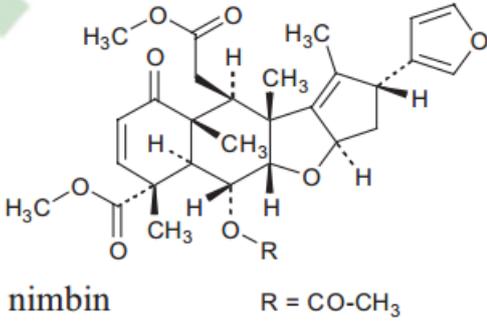
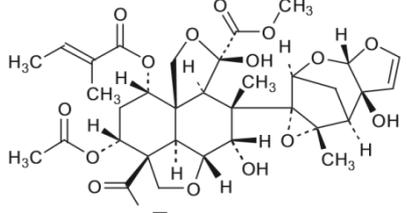
CARPINELLA *et al.* [21] ont démontré que les extraits éthanolique et hexanique de différentes parties de la plante (fruits, graines, feuilles) ont un effet fongistatique sur *Aspergillus flavus*, *Diaporthe phaseolorum var. meridionalis*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium solani* et *Sclerotinia sclerotiorum*, qui sont des phytopathogènes.

### 3) Propriétés insecticides

Les propriétés insectifuges de *M. azedarach* sont décrites par différents auteurs [22][23]. Ces propriétés sont attribuées aux limonoïdes contenus dans la plante, qui ont un effet antiappétant [24][25]. La molécule d'azadirachtine provoque une inhibition de croissance des insectes phytophages ainsi que des malformations chez les futures générations [26]. Elle peut aussi provoquer leur mort. La structure de cette molécule a été proposée dès les années 70 par NAKANISHI [27]. D'autres molécules ayant des propriétés similaires ont été identifiées par la suite [28] dont quelques structures moléculaires sont données dans le tableau 3.

Une activité larvicide de fruits de *M. azedarach* sur des moustiques vecteurs de dengue a été également rapportée [29].

Tableau 3 : Quelques structures de limonoïdes isolés à partir de *Melia azedarach*

Nom du composé	Structure	Organe	Références
Mélianone		Fruits	[30][31]
Salanine		Fruits Graines Racines Feuilles	[32][33]
Mélianol	 Melianol	Fruits	[34]
Nimbin	 nimbin      R = CO-CH <sub>3</sub>	Fruits	[8]
Azedarachin		Fruits, Racines	[35]



*PARTIE II*

## PARTIE II) TRAVAUX PERSONNELS SUR *Melia azedarach* DE MADAGASCAR

### CHAPITRE I) : Etude des extraits non volatiles de *Melia azedarach*

Le végétal étudié ici concerne l'espèce cultivée à Madagascar dont différents extraits issus de différents organes du végétal seront examinés : les fruits, les feuilles, les racines et l'écorce des tiges. Les échantillons végétaux ont été collectés dans le fokontany d'Ambohijanaka, commune Ambatomirahavavy, dans les environs du Campus Universitaire de Vontovorona.

#### 1) Préparation des extraits bruts

##### 1-1) Protocole

La méthode préconisée est celle de la macération à froid du végétal, qui est une technique d'extraction solide-liquide. Pour cela, l'échantillon végétal sous forme de poudre est mis en contact prolongé avec un solvant à la température ambiante [36].

Les feuilles, racines, écorce de tiges et fruits ont été récoltés au mois de décembre, puis séchées séparément à l'abri de la lumière et de l'humidité pour être réduite en poudre.

Chaque poudre végétale placée dans un bocal est soumise à une extraction par macération à froid avec de l'éthanol à 80° pendant 48 heures. La figure 4 montre une expérience réalisée avec de la poudre de racines..



Figure 4: Extraction par macération à froid de poudre de racines

Le contenu de chaque bocal est ensuite passé sur du papier filtre, puis le filtrat obtenu est traité de diverses façons selon l'organe végétal considéré :

-le filtrat provenant de la macération de feuilles et d'écorce de tiges subit une déchlorophyllation par ajout de 1,5g de charbon actif sous agitation manuelle pendant 10 minutes. On procède ensuite à une filtration, et la solution déchlorophyllée recueillie est soumise à une évaporation à sec. On obtient respectivement l'extrait hydroalcoolique ou extrait brut de feuilles et d'écorce de tiges.

- le filtrat provenant de la macération de racines et des fruits est directement évaporé à sec pour donner respectivement l'extrait hydroalcoolique ou extrait brut de racines et de fruits.

### 1-2) *Rendement en extrait brut*

Le rendement en chaque extrait brut est calculé par la formule ci-après :

$$R = \frac{\text{masse.de.l'extrait}}{\text{masse.de.la.poudre.végétale}} \times 100$$

Les valeurs calculées sont rapportées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Rendement en extrait brut des différents organes de *Melia azedarach*

Organe	Masse de la drogue (g)	Masse de l'extrait (g)	R(%)
Feuilles	400	71	17,75
Racines	300	30,6	10,20
Ecorce de tiges	200,5	21,6	10,77
Fruits	350	105,4	30,11

D'après les valeurs enregistrées, chaque organe a fourni un extrait brut supérieur à 10g pour 100 g de poudre végétale. Du point de vue rentabilité, l'extrait brut de fruits est le plus riche en substances (30,11%) suivi des feuilles (17,75%).

## 2) Fractionnement par partition liquide-liquide des extraits bruts

Cette étape constitue une pré purification de chaque extrait brut, l'objectif étant de cerner la fraction qui présentera la meilleure activité lors des tests biologiques.

### 2-1) *Protocole*

La méthode est une partition liquide-liquide dans deux solvants non miscibles, dont le protocole est schématisé à la figure 5. Il s'agit de séparer les substances contenues dans un extrait brut selon leur polarité, en mettant en œuvre le tandem eau/solvant organique de polarité croissante. Les solvants organiques utilisés ici sont l'hexane, le DCM, l'acétate d'éthyle, et le n-butanol.

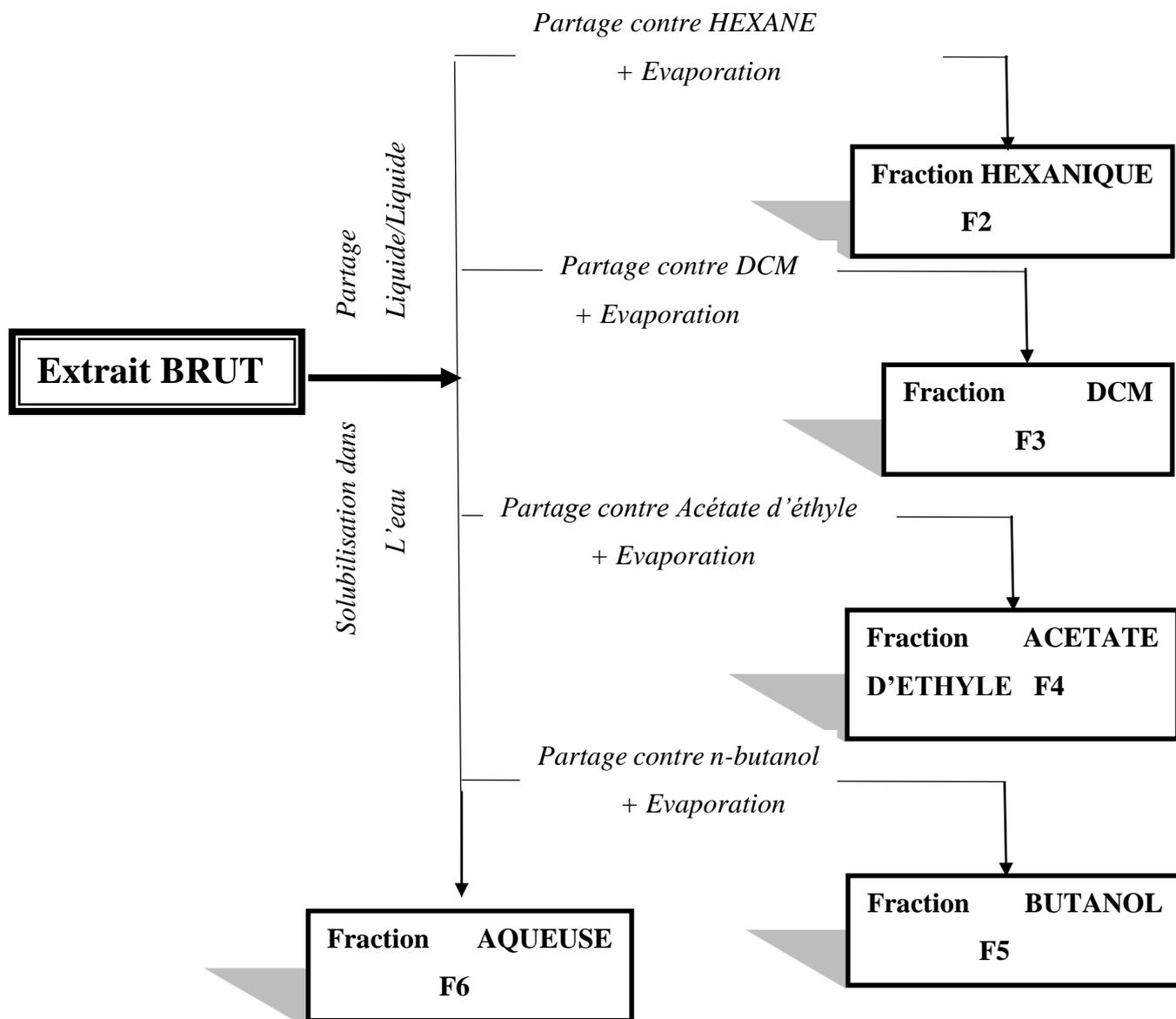


Figure 5: Schéma de fractionnement des extraits bruts végétaux

## 2-2) Rendement en fraction

Les fractions issues des opérations de partage liquide-liquide sont notées de F<sub>2</sub> à F<sub>6</sub>.

Le rendement en chaque fraction a été évalué par le calcul selon la formule ci-après :

$$R = \frac{\text{masse.de.la.fraction}}{\text{masse.de.l' extrait .brut}} \times 100$$

Le tableau 5 est une récapitulation des valeurs calculées de rendement.

Tableau 5 : Rendement en fraction de *Melia azedarach*

	Masse extraite (g)			
	Feuilles	Racines	Ecorce de tiges	Fruits
F <sub>2</sub> (Hexane)	4,24	5,69	-	-
F <sub>3</sub> (DCM)	11,26	22,40	32,37	9,27
F <sub>4</sub> (AE)	1,85	0,93	0,52	-
F <sub>5</sub> (Butanol)	15,99	18,36	21,00	7,20
F <sub>6</sub> (eau)	66,61	52,57	41,34	81,73

On constate que les composés hydrosolubles sont les plus abondants, quelque soit l'organe du végétal considéré. Ils constituent plus de 80% de l'extrait brut de fruits, et 40 à 67% de l'extrait brut des autres organes.

En revanche, la fraction à l'acétate d'éthyle est négligeable pour tous les organes, représentant moins de 2% de chaque extrait brut.

On remarque par ailleurs que l'écorce de tiges ainsi que les fruits n'ont pas donné d'extrait à l'hexane.

### 3) Pouvoir antibactérien des constituants non volatiles de *Melia azedarach*

Les fractions obtenues précédemment ont été évaluées pour leur potentiel antibactérien. Pour cela, un ensemble de 9 bactéries sélectionnées pour leur haute pathogénicité et leur multirésistance sont testées pour leur sensibilité à nos produits. Les germes ont été isolés à partir de la collection du LHAE de l'Institut Pasteur de Madagascar. Ces bactéries se répartissent comme suit :

-bactéries à Gram (-) : *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*

-bactéries à Gram (+) : *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*

Leurs caractéristiques sont données à l'annexe 4.

Les antibiotiques de références sont présentés dans le tableau suivant avec leur acronyme. Leur sélection est basée sur leur aptitude à inhiber spécifiquement la croissance d'un germe et selon leur disponibilité à l'IPM.

Tableau 6 : Les antibiotiques de références utilisés

ANTIBIOTIQUES	ACRONYMES
<i>Cefotaxime</i>	CTX
<i>Ampicilline</i>	AMPI
<i>Gentamicine</i>	GM <sub>10</sub>
<i>Cephalothine</i>	CF

#### 3-1) Méthodologie

Pour une évaluation préliminaire de sensibilité antibactérienne, la méthode de diffusion sur disque a été utilisée, dont le mode opératoire est décrit à l'annexe 5 [37].

### 3-2) Résultats

Le barème de sensibilité des germes pathogènes vis-à-vis des produits testés est indiqué ci-après :

**non sensible (-) ou résistante** : diamètre < 7mm.

**peu Sensible (+)** : diamètre compris entre 7 à 8 mm.

**sensible (++)** : diamètre compris entre 8 à 9 mm.

**très sensible (+++)** : diamètre > 9 mm.

Nous avons testé l'activité de quatre antibiotiques par la méthode standard des disques. Les mesures des zones d'inhibition figurant dans le tableau suivant.

Tableau 7:Antibiogramme des antibiotiques de référence

Antibiotique Souches	DMSO	CTX	AMPI	GM <sub>10</sub>	CF
<i>Escherichia coli,</i>	-	40	29	24	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	30	31	25	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	19	-
<i>Klebsiella pneumoniae.</i>	-	31	12	22	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	12	32	15
<i>Listeria monocytogenes,</i>	-	-	28	30	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	23	11	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	24	20	19-20	30
<i>Vibrio cholerae (no<sub>1</sub>)</i>	-	30	23	21	31
<i>Yersinia enterocolytica</i>	-	32	-	27	-

Diamètre de la zone d'inhibition en mm Le diamètre des disques est pris en considération, -(CTX : Cefotaxime ; AMPI : Ampicilline ; GM<sub>10</sub> : Gentamicine ; CF : Cephalothine)

Le **tableau 7** montre que les différents antibiotiques possèdent un effet presque similaire sur les bactéries. Il est évident de conclure que la plupart des souches bactériennes utilisées dans cette étude présentent des phénomènes de résistances aux antibiotiques.

Dans le tableau 8 sont regroupées les mesures de diamètre des halos d'inhibition provoqués par les différents extraits au contact des microorganismes.

Tableau 8: Sensibilité des germes pathogènes aux fractions issues de *Melia azedarach*

Souche	Organe de la plante																Huile
	Feuilles					Racines				Ecorce des tiges			Fruits				
	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub>	F <sub>7</sub>	F <sub>8</sub>	F <sub>9</sub>	F <sub>10</sub>	F <sub>11</sub>	F <sub>12</sub>	F <sub>13</sub>	F <sub>14</sub>	F <sub>15</sub>	F <sub>16</sub>	
<i>Escherichia coli</i>	-	-	8	-	8	9	8	8	9	9	10	-	10	11	-	9	12
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	-	-	-	-	8	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	-	-	-	-	8,5	10	-	9	7,5	8	-	9	8	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	-	-	-	7	-	-	8	-	-	8	-	7	-	-	7	7
<i>Bacillus cereus</i>	9	-	-	-	-	7,5	8	12	10	8	-	-	-	-	9	8	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	8	8	-	-	-	-	-	8	-	-	-	7	7	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	8	9	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> (no <sub>1</sub> )	-	-	-	-	-	7	9	-	8	-	-	-	8	8	-	-	-
<i>Yersinia enterocolytica</i>	7	-	-	-	11	9	7	8	9,5	9	8	8	-	-	8	-	10

Feuilles F<sub>1</sub> : Extrait BRUT

Racines

Ecorce des tiges

Fruits

F<sub>2</sub> : Extrait HEXANIQUEF<sub>6</sub> : Extrait BRUTF<sub>10</sub> : Extrait au DCMF<sub>13</sub> : Extrait BRUTF<sub>3</sub> : Extrait au DCMF<sub>7</sub> : Extrait au DCMF<sub>11</sub>:Extrait BUTANOLIQUEF<sub>14</sub>: Extrait au DCMF<sub>4</sub>: Extrait BUTANOLIQUEF<sub>8</sub>: Extrait BUTANOLIQUEF<sub>12</sub>: Extrait AQUEUSEF<sub>15</sub>: Extrait BUTANOLIQUEF<sub>5</sub> : Extrait AQUEUSEF<sub>9</sub>: Extrait AQUEUSEF<sub>16</sub>: Extrait AQUEUSE

Il apparait que les valeurs d'inhibition les plus élevées sont généralement enregistrées pour les fractions au butanol et à l'eau de chaque organe du végétal. Les activités antimicrobiennes de la plante étudiée sont ainsi attribuées à des substances de polarité élevée. Les fruits font exception, car ici, c'est la fraction au DCM, c'est-à-dire contenant les substances de polarité moyenne qui est la plus active avec un diamètre d'inhibition de 11mm.

Par ailleurs, il est intéressant de constater que la plupart des germes testés ont une sensibilité vis-à-vis des fractions issues de racines. En particulier, *Bacillus cereus* semble très sensible à la fraction butanolique de racines qui exerce l'inhibition de croissance la plus forte avec un diamètre de halo égal à 12mm. Pour cette raison, cette fraction fera l'objet d'une étude phytochimique et chromatographique afin d'avoir une meilleure connaissance des constituants qu'elle renferme.

Une revue de mise à jour des nombreuses données ethnomédicinales, phytochimiques et pharmacologiques concernant *Melia azedarach* rapporte en particulier les activités antibactériennes montrées par différents extraits de la plante [38]. Ce sont surtout les feuilles et les graines qui y sont décrites pour avoir des activités significatives [39].

#### 4) Criblage phytochimique de feuilles et de racines de *Melia azedarach*

C'est une méthode rapide de détection des principales familles de métabolites secondaires contenus dans un extrait brut végétal. Cette méthode préconisée par FONG *et al.* [40] exploite les propriétés des composés chimiques de réagir avec des réactifs appropriés pour former, soit des complexes insolubles (réaction de précipitation), soit des complexes colorés (réaction de coloration).

L'extrait brut de racines qui a montré une bonne activité antimicrobienne vis-à-vis de la plupart des germes testés a été sélectionné pour cette étude. A titre de comparaison, l'extrait de feuilles a été également examiné ici.

##### 4-1) Préparation de la solution d'extrait brut

Une quantité de 100g de poudre végétale est introduite dans un ballon de 1000 ml. On y ajoute 400 ml d'éthanol 80°, puis on laisse macérer pendant 24 heures. Le mélange est filtré, le marc est lavé avec 50ml d'éthanol 80°, et le volume de la solution hydroalcoolique ainsi obtenue est mesuré pour le calcul de l'équivalent en grammes de plante par millilitre d'extrait alcoolique.

Cette solution (figure 6) servira à la réalisation des divers tests phytochimiques dont le protocole est détaillé à l'annexe 6.



(a)

(b)

Figure 6: Solution hydro alcoolique d'extrait brut de feuilles (a) et de racines (b)

#### 4-2) *Résultats et discussion*

Les observations concernant le criblage phytochimique de feuilles et de racines sont récapitulées dans le tableau 9.

Tableau 9: Résultats de criblage phytochimique de feuilles et de racines de *Melia azedarach*

Famille chimique	Test	Observations			
		Feuilles		Racines	
Tanins et polyphénols	Gélatine	Pas de précipitation	-	Précipité blanc	++
	Gélatine salée	Précipité noir-bleuâtre	+++	Précipité blanc	++
	Chlorure ferrique	Bleu-vert	+++	Coloration bleu noir	++
Alcaloïdes	MAYER	Pas de précipitation	-	Trouble	+++
	WAGNER	Pas de précipitation	-	Précipité	+++
	DRANGEDORFF	Pas de précipitation	-	Précipité	+++
Flavonoïdes	WILLSTATER	Rouge violacée	+++	Rouge violacé	+
	WILLSTATER MODIFIE	Rouge	+++	Rouge	+
Leucoanthocyanes	BATE-SMITH	Aucun changement de couleur	-	Changement de couleur rouge violacée	+
Stéroïdes	LIEBERMANN-BURCHARD	Bleu-vert	++	Aucun changement de	-
Triterpènes	LIEBERMANN-BURCHARD	Aucun changement de couleur	-	Coloration rouge-violet	+++
Stérols insaturés	SALKOWSKI	Bleu-vert	++	Coloration rouge violet	++
Saponosides	Indice de mousse	Au moins 3,5cm	+++	Indice de mousse 4,5 cm	+++

(+++) forte abondance      (++) abondance moyenne      (+) faible abondance      (-) absence

D'après l'évaluation semi quantitative basée sur les barèmes indiqués, les feuilles et les racines contiennent en forte abondance des saponosides. Ces substances ont un grand pouvoir

tensio-actif dû à leur caractère amphotère, et qui est à l'origine de la formation de la mousse. Diverses activités biologiques leur sont attribuées, notamment d'avoir une activité hémolytique.

Les tanins sont aussi très présents dans les deux organes végétaux avec une présence plus accentuée dans les feuilles, tandis que les racines contiennent davantage de polyphénols. Des activités hémostatiques, astringentes et antiseptiques de la plante sont rapportées, et peuvent être dues à ces substances.

Des différences sont cependant constatées ; ainsi, les feuilles sont riches en flavonoïdes (flavanones et flavononols), alors que les racines en contiennent très peu, et inversement, les racines sont riches en alcaloïdes, tandis que les feuilles n'en contiennent pas. De plus, si les triterpènes se retrouvent en abondance dans les racines, c'est la présence de stéroïdes qui caractérise les feuilles. Ces différences de constituants chimiques de feuilles et de racines peuvent orienter vers des utilisations médicamenteuses spécifiques à chacun des extraits.

Toutes les familles chimiques que nous avons détectées dans les feuilles ont été citées par LUSAKIBANZA dans une étude antérieure sur des feuilles de *Melia azedarach* du Congo, à l'exception des stéroïdes [41]. Ceci dénote l'influence de facteurs variés sur le métabolisme des végétaux, et confère une certaine originalité à l'extrait de feuilles de *Melia azedarach* de Madagascar.

### **5) Séparation chromatographique de la fraction butanolique de racines**

La fraction butanolique de racines qui a montré une forte activité antimicrobienne présente un profil chromatographique CCM comportant des taches fluorescentes dans la région proche de la ligne de base par l'exposition à l'UV 365nm (figure 7). La migration des produits a nécessité l'utilisation du système d'éluant DCM/méthanol (85/15) relativement polaire.

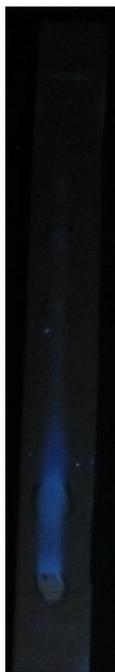


Figure 7 : CCM de l'extrait butanolique de racines de *Melia azedarach*

Révélation : UV à 365nm

Eluant : DCM/méthanol (85/15)

La séparation des constituants de la fraction butanolique a été réalisée par une chromatographie sur colonne de silice selon les conditions expérimentales suivantes :

- 1 g de prise d'essai pour 30g de silice
- gradient d'éluant : acétate d'éthyle/méthanol (4/1) à méthanol 100%, puis méthanol/acide acétique 7/3.

Un total de 97 fractions a été recueilli, et le regroupement selon la similarité de leur  $R_f$  sur CCM a conduit aux fractions finales notées E1 à E5 (tableau 10).

Tableau 10: Bilan massique de la séparation chromatographique de la fraction butanolique de racines

Fraction	Masse (g)	%
E <sub>1</sub>	0,16	16,83
E <sub>2</sub>	0,18	18,47
E <sub>3</sub>	0,07	7,18
E <sub>4</sub>	0,15	15,39
E <sub>5</sub>	0,41	42,13
TOTAL	0,97	100

La quasi-totalité de l'échantillon déposé sur la colonne a été récupérée lors de la chromatographie sur colonne, soit 0,97 mg pour une prise d'essai de 1g, c'est-à-dire que toutes les substances ont été éluées.

La fraction E<sub>5</sub> a la masse la plus importante, et représente 42,13% de l'échantillon ; c'est aussi la plus polaire. Le reste se répartit entre les fractions E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>4</sub> (15% à 18% environ) et la fraction E<sub>3</sub> (7,18%).

Une vérification par CCM du résultat de la séparation chromatographique est présentée à la figure 8 où les 5 fractions E<sub>1</sub> à E<sub>5</sub> sont analysées.

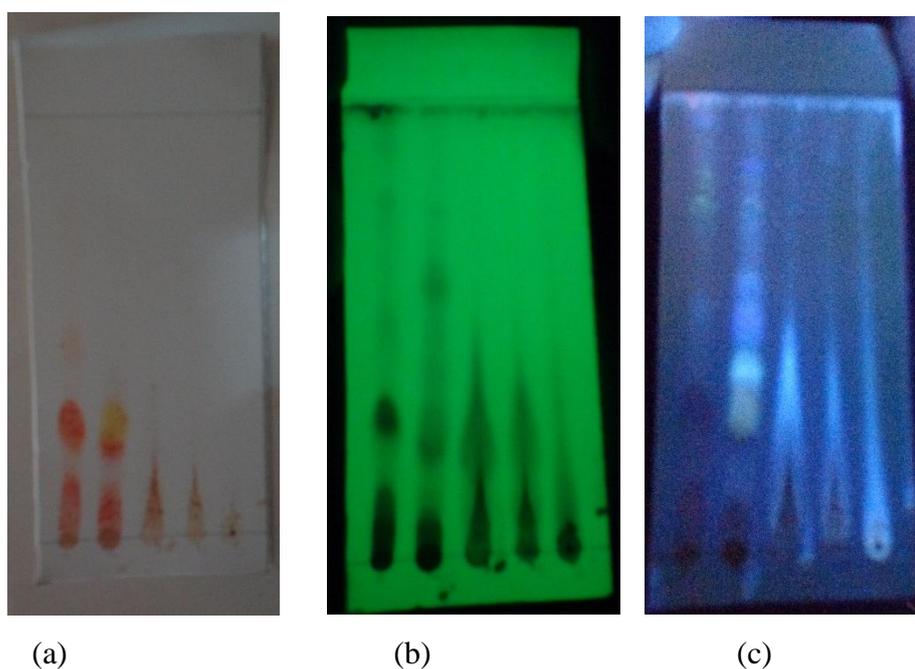


Figure 8: CCM des fractions E<sub>1</sub> à E<sub>5</sub>

Révélation : vanilline sulfurique (a) UV à 254nm (b) UV à 365nm (c)

**CHAPITRE II) : ÉTUDE CHIMIQUE DE L'HUILE D'AMANDE DE *Melia azedarach***

Chez les végétaux, l'huile est généralement contenue dans la substance dure et ligneuse des graines ou du noyau, et se trouve enfermée dans les cellules oléifères sous forme de gouttelettes. C'est le cas pour *Melia azedarach*. Les huiles d'olive et de palme comptent parmi les exceptions puisqu'elles sont contenues dans l'enveloppe charnue du fruit.

L'huile tirée de graines de *Melia azedarach* de Madagascar peut être valorisée à condition d'en connaître les caractéristiques physico-chimiques et la composition chimique. Une comparaison avec la qualité des huiles *Melia azedarach* d'autres provenances sera également intéressante à établir.

**1) Extraction de l'huile**

Les huiles végétales s'obtiennent à partir de graines ou de fruits écrasés, soit par expression à la presse hydraulique, soit par extraction à l'aide de solvant organique.

L'extraction de la fraction lipidique des amandes de *M. azedarach* est réalisée ici à l'aide d'un appareil Soxhlet (figure 9) qui permet un épuisement total du végétal grâce au mécanisme de siphonnage en continu.

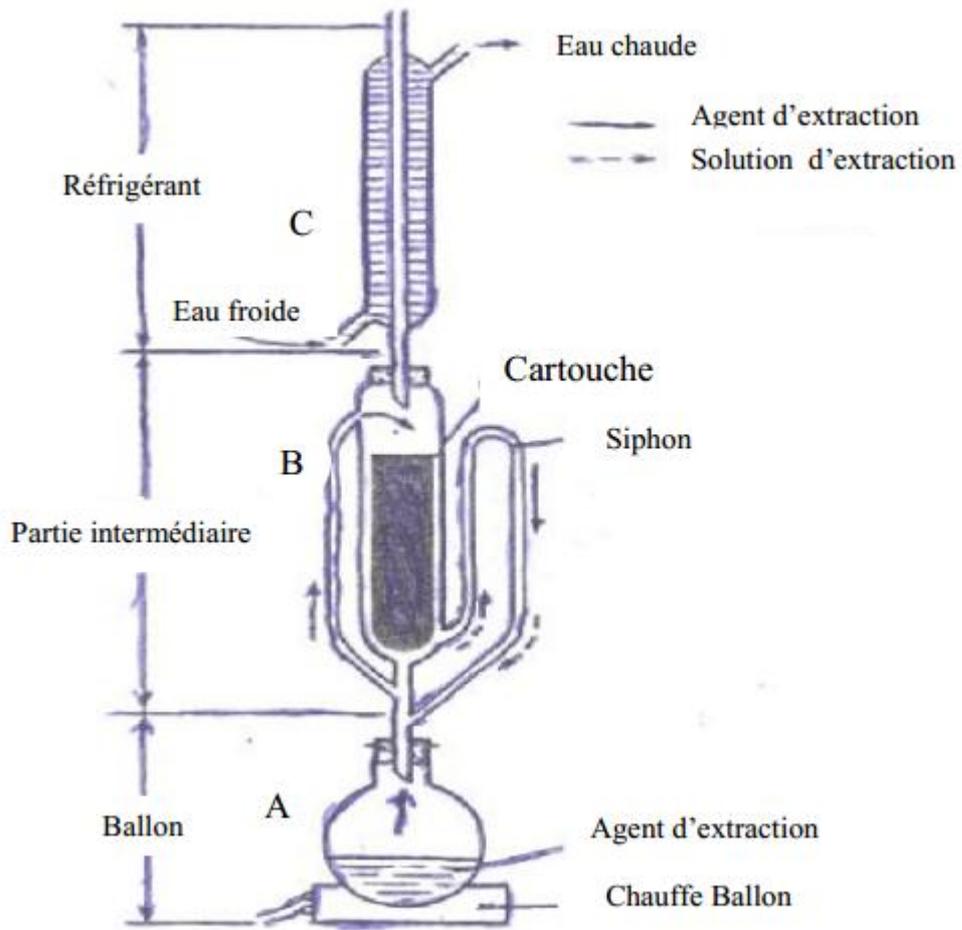


Figure 9 : Schéma de fonctionnement d'un extracteur Soxhlet

Des fruits secs de *Melia azedarach* ont été préalablement soumis à une série de traitements : triage, dépulpage et séchage à l'air libre jusqu'à obtention d'un poids constant.

Les graines sont ensuite décortiquées afin d'obtenir les amandes (figure 10) qui sont ensuite broyées à l'aide d'un mixer de cuisine jusqu'à l'obtention d'une poudre.

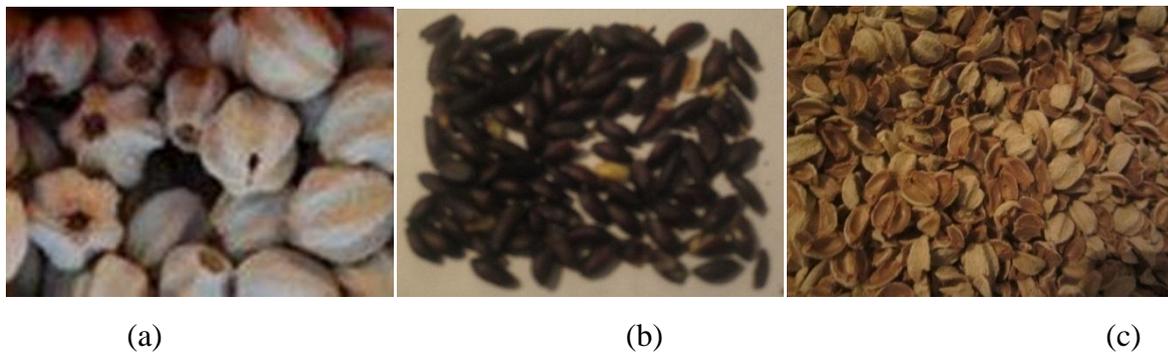


Figure 10: Graines (a), amandes (b) et coques (c) de *Melia azedarach*

### ***1-1) Mode opératoire***

La poudre d'amandes est introduite dans la cartouche du Soxhlet, tandis que le ballon est rempli avec 1,5L d'hexane. L'extraction a duré 2 heures, et la solution hexanique obtenue a été évaporée à sec.

L'ensemble de ces étapes est résumé à la figure 11.

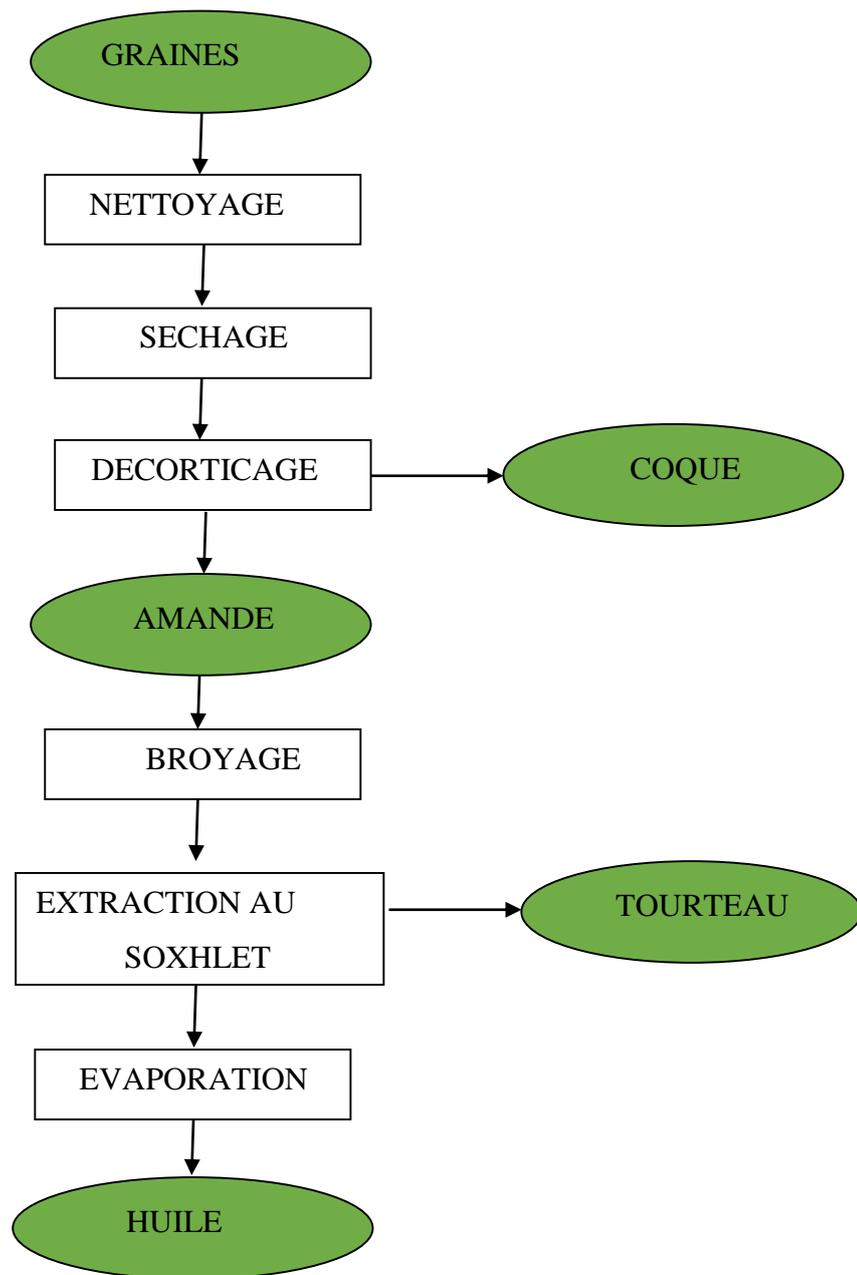


Figure 11 : Schéma du protocole d'extraction de l'huile d'amandes de *Melia azedarach*

### 1-2) Résultats

L'huile recueillie est présentée à la figure 12 ; elle a les caractéristiques organoleptiques suivantes :

- aspect huileux
- couleur jaune doré
- odeur forte



Figure 12 : Cliché d'huile d'amandes de *Melia azedarach*

### 2) Rendement en huile

C'est le pourcentage d'huile obtenue par rapport à la quantité d'amandes extraites. Le rendement est calculé selon la formule suivante :

$$Rdt\% = \frac{H}{A} \times 100$$

H : quantité, en grammes, d'huile obtenue par extraction

A : prise d'essai, en grammes, d'amandes utilisées

### 2-1) Résultats

Les données expérimentales ainsi que la valeur de rendement sont figurées dans le tableau 11.

Tableau 11 : Rendement en huile de *Melia azedarach*

Prise d'essai d'amandes (g)	Quantité d'huile obtenue (g)	Rendement (%)
241	98,14	<b>40,72</b>

## 2-2) *Interprétation et discussion*

D'après la valeur calculée qui est de 40,72%, on peut dire que les amandes de *Melia azedarach* de Madagascar sont riches en huile. C'est un rendement comparable à celui de l'arachide qui est de 40%, et c'est une valeur très élevée comparé à l'huile d'autres graines oléagineuses telles que le coton (16 à 28 %) ou les graines de baobab (12,2 %) [42].

SAGOUA a trouvé un rendement de 13,5% pour *Melia azedarach* par le procédé de pression mécanique à froid [43].

## 3) Caractérisation physico-chimique de l'huile

Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physico-chimiques sont celles indiquées dans le recueil de normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) [44].

### Densité

La densité de l'huile est donnée par la formule suivante :

$$d_t = \frac{m_1 - m_o}{m_2 - m_o}$$

avec

$d_t$  : la densité de l'huile à la température t

$m_o$ : la masse du pycnomètre

$m_1$  : la masse du pycnomètre rempli d'huile de *Melia*

$m_2$  : la masse du pycnomètre rempli d'eau distillée

Les valeurs expérimentales sont rapportées dans le tableau 12.

Tableau 12: Mesure de la densité de l'huile à 25°C

$m_0$ (g)	$m_1$ (g)	$m_2$ (g)	$d_t$
12,356	21,571	22,431	0,914

La valeur de 0,914 de notre huile correspond à la densité des huiles végétales qui varie généralement de 0,915 à 0,964. Elle est comparable à celle de l'huile d'olive (0,910 à 0,916).

### Indice de réfraction

L'indice de réfraction ou réfringence de l'huile est le rapport de la vitesse de la raie D du sodium (589nm) dans le vide à sa vitesse dans l'huile.

L'indice de réfraction de notre huile a été mesuré sur un réfractomètre d'ABBE de marque KRUSS 90 173 relié à un bain thermostaté. La valeur de l'indice de réfraction est donnée par la formule :

$$n_t = n_{t'} + 0,004 (t' - t)$$

avec

$n_t$  : indice de réfraction ramené à 20°C

$n_{t'}$  : indice de réfraction à la température de lecture (25°C)

$t'$  : 25°C

$t$  : 20°C

D'après le résultat de lecture rapporté dans le tableau 13, notre huile a un indice de réfraction de 1,4705. Cette valeur est proche de celles rapportées par KARLESKIND [45] concernant les huiles d'olive, de palme et d'avocat, qui sont respectivement dans les intervalles (1,468-1,470), (1,453- 1,458) et (1,465-1,474).

Tableau 13: Mesure de l'indice de réfraction de l'huile

t (°C)	n <sub>t</sub>
20	1,4705

L'indice de réfraction permet aussi de classer les huiles en huile siccative, semi siccative ou non siccative. De plus, c'est une propriété physique qui permet d'évaluer leur pureté ; généralement, l'indice augmente avec la présence de produits secondaires [45].

### Indice d'acide IA

L'indice d'acide renseigne sur la quantité d'acides gras libres contenus dans l'huile. Il est exprimé en mg de KOH par gramme d'huile. La méthode de détermination consiste à titrer les acides gras libres à l'aide d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium.

L'expression de IA est donnée par la formule suivante :

$$IA = \frac{56,1 \times N \times V}{m}$$

avec

- V : volume de la solution de potasse éthanolique (ml)

- m : masse d'huile (g)

-N: normalité de la solution de potasse éthanolique

-56,1 : masse molaire de KOH

La détermination de l'indice d'acide de notre huile a donné les résultats figurés dans le tableau 14.

Tableau 14: Indice d'acide de l'huile

N° d'essai	N	V (ml)	m (g)	IA
Essai n°1	0,076	1	2,026	2,104
Essai n°2	0,076	0,9	2,027	1,893
Valeur moyenne				1,998

L'huile présente un faible indice d'acidité. La valeur trouvée est inférieure à celle de certaines huiles alimentaires usuelles telles que le soja (IA=6) et le tournesol (IA=4) [45]. Les acides gras libres dérivent de l'hydrolyse des triglycérides via l'activité des lipases, et la faible valeur d'indice d'acide caractérise la pureté de l'huile, c'est-à-dire sa stabilité. Dans l'industrie des lubrifiants, cette stabilité ainsi que la faible oxydation des acides gras conviennent parfaitement pour la confection des huiles moteurs.

### Indice de saponification IS

L'indice de saponification est le nombre en milligrammes de potasse nécessaire pour transformer en savon les acides gras des triglycérides à partir d'un gramme d'huile.

L'échantillon d'huile est porté à reflux avec une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium à 0,5N. L'excès d'hydroxyde de potassium est titré par une solution d'acide chlorhydrique.

L'indice de saponification est déterminé selon la formule :

$$IS = \frac{56,1 \times N \times (V_0 - V_1)}{m}$$

avec :

- $V_0$  : volume de HCl pour l'essai à blanc (ml)
- $V_1$  : volume de HCl dans la détermination (ml)
- $m$  : masse d'huile (g)
- $N$  : normalité de la solution d'acide chlorhydrique
- 56,1 : masse molaire de KOH

Dans le tableau 15 est présenté les résultats de la détermination réalisée sur notre huile.

Tableau 15 : Indice de saponification de l'huile

N° d'essais	$V_0$ (ml)	$V_1$ (ml)	$m$ (g)	$N$	$IS$
Essai n°1	25,3	11,8	2,008	0,5	188,58
Essai n°2	25,1	11,6	2,011	0,5	188,30
Valeur moyenne					188,44

La valeur obtenue de 188 est comparable à celle des huiles de soja (189-195), de coton (189-198), d'arachide (187-196) [46] et de Neem (185 à 197).

L'indice de saponification renseigne sur la longueur de chaîne des acides gras; il décroît avec l'augmentation de la longueur des chaînes. C'est un indice qui est utile dans l'industrie des savons, car une huile qui se caractérise par un indice de saponification important est une huile qui convient à la fabrication de savon.

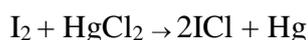
### Indice d'iode II (méthode de Hübl-Waller)

C'est une méthode d'évaluation de l'insaturation globale d'un acide gras. Les liaisons éthyléniques des acides gras insaturés présentes dans l'huile donnent avec l'iode des dérivés d'addition iodés. La réaction est quantitative en présence de chlorure mercurique.

Le principe est basé sur le titrage à l'aide d'une solution de thiosulfate de sodium de l'iode libéré.

Les réactions mises en jeu sont les suivantes :

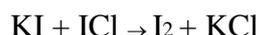
Préparation des réactifs de Hübl :



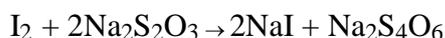
Réaction entre l'huile et le réactif de Hübl



Titration de l'excès de chlorure d'iode



Titration de l'iode libéré par le thiosulfate de sodium



Les conditions expérimentales sont détaillées à l'annexe 1, et l'indice d'iode est donné par l'expression :

$$\mathbf{II} = \mathbf{12,69 \times \frac{(V_1 - V_2)}{m} \times T}$$

avec

-T : normalité de la solution de thiosulfate de sodium utilisée 0,1N

-V<sub>1</sub> : volume de la solution de thiosulfate de sodium pour l'essai à blanc (ml)

- $V_2$  : volume de la solution de thiosulfate de sodium pour la détermination (ml)

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

Les valeurs expérimentales concernant notre huile sont consignées dans le tableau 16.

Tableau 16: Indice d'iode de l'huile

N° d'essai	$V_1$ (ml)	$V_2$ (ml)	M (g)	T(N)	II
Essai n°1	12,95	0,35	0,2024	0,1	79,00
Essai n°2	12,95	0,40	0,2067	0,1	77,11
Valeur moyenne					78,05

De toutes les caractéristiques des corps gras, l'indice d'iode est la constante la plus utile. En effet, c'est sur sa valeur que repose l'importante division des huiles végétales en huiles siccatives, semi siccatives et non siccatives selon le tableau 17 [47].

Tableau 17 : Classification des huiles suivant leur indice d'iode

Classe	Type	Indice d'Iode
Huile non siccative	Huile saturée telle que : -laurique : coprah, palmiste, babassu -palmitique : palme, buruti -stéarique : karité	<100
Huile semi siccative	Huile mono insaturée telle que : -oléique : olive, arachide, colza, sésame huile di-insaturée telle que : -linoléique : tournesol, coton, maïs, soja	100 à 130
Huile siccative	Huile tri-insaturée telle que : -linolénique : lin -éléostéarique : huile de bois de Chine	>130

La valeur de 78,05 obtenue pour notre huile devrait lui conférer un caractère non siccatif.

Des données bibliographiques concernant les caractéristiques physicochimiques de quelques huiles de *Melia azedarach* sont récapitulées dans le tableau 18.

Tableau 18: Caractéristiques physico-chimiques de l'huile de *Melia azedarach*.

	[48]	[49]
Densité	0,930	0,9192
Indice de réfraction	1,4691	1,4766
L'indice d'iode	134,7	135,4
Indice d'acide	4,45	3,62
Indice de saponification	190,8	191,1
Matière insaponifiable		1,6%

On constate une similitude avec certains de nos résultats, notamment en ce qui concerne l'indice d'acide faible (moins de 5), l'indice de saponification élevé (proche de 190), l'indice de réfraction (environ 1,4700) et la densité (0,92 à 0,93). Cependant, une différence importante est remarquée concernant l'indice d'iode, 78 pour notre huile et 135 pour les huiles décrites dans la littérature, soit une valeur deux fois plus élevée, ce qui confère une certaine particularité à l'huile de *Melia azedarach* de Madagascar.

#### 4) Détermination de la composition en acides gras de l'huile par la CPG

Une huile végétale est constituée majoritairement de triglycérides d'acides gras [50]. Les triglycérides résultent de l'estérification des trois fonctions alcool du glycérol par trois acides gras. Ils peuvent être homogènes lorsque les acides gras qui estérifient le glycérol sont identiques, ou hétérogènes (ou mixtes) dans le cas contraire.

La grande majorité des acides gras des huiles végétales se répartissent en deux groupes : les acides gras saturés et les gras insaturés. Dans les deux groupes, les plus fréquents sont à 16 et 18 atomes de carbone.

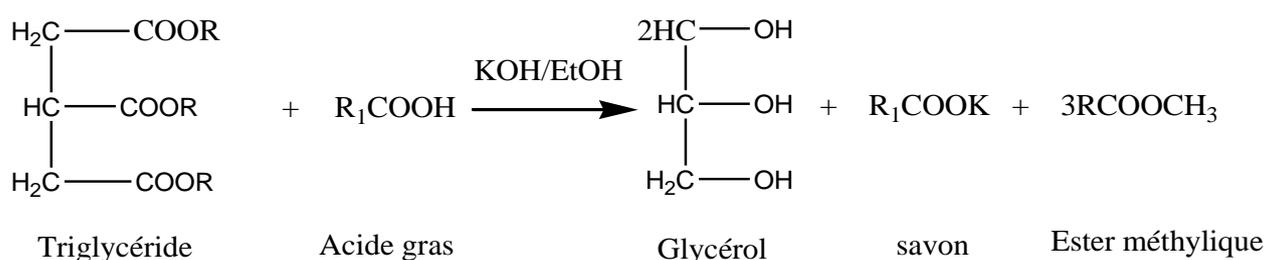
Les principaux acides gras saturés des huiles végétales sont l'acide myristique(C<sub>14</sub>), l'acide laurique(C<sub>12</sub>), l'acide palmitique(C<sub>16</sub>) et l'acide stéarique(C<sub>18</sub>).

Les acides gras insaturés sont soit mono-insaturés, par exemple, l'acide palmitoléique(C<sub>16</sub>) ou l'acide oléique(C<sub>18</sub>), soit polyinsaturés, comme l'acide linoléique (C<sub>18</sub> :2) ou l'acide linoléique(C<sub>18</sub> :3).

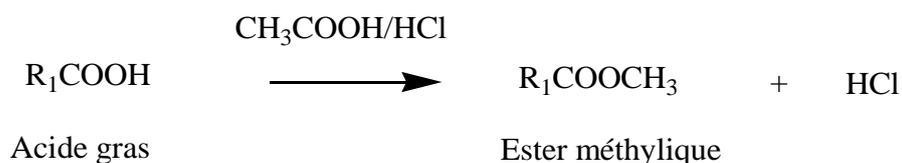
##### Principe

Les acides gras de l'huile sont libérés par saponification éthanolique des triglycérides selon l'équation 1 suivie d'acidification, puis transformés en présence de méthanol chlorhydrique en esters méthyliques volatilisables pour être analysés par chromatographie en phase gazeuse.

Equation de la saponification :



Equation de l'estérification des acides gras en présence de méthanol chlorhydrique



Les conditions expérimentales sont présentées à l'annexe 2.

### Analyse des esters méthyliques

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse parfaitement adaptée à l'analyse des esters méthyliques d'acides gras (EMAG) de végétaux qui sont des composés susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Le mélange d'esters est transporté à travers la colonne chromatographique par un gaz porteur (ou gaz vecteur), et les différentes molécules du mélange se séparent et sortent de la colonne les unes après les autres après un certain intervalle de temps appelé temps de rétention ( $t_r$ ), qui dépend de l'affinité de la phase stationnaire avec chaque molécule.

A la sortie de la colonne, les composés rencontrent un élément essentiel qui est le détecteur; ce dernier évalue en continu la quantité de chacun des constituants séparés grâce à la mesure de différentes propriétés physiques du mélange gazeux, et envoie un signal électronique sous forme de pic vers un enregistreur [51]. Le détecteur FID (détecteur à ionisation de flamme) s'est imposé comme un détecteur universel de choix en CPG. En effet, il possède de nombreux avantages ; il est très sensible à presque tous les composés organiques, sa réponse est linéaire en concentration, il montre une bonne stabilité de la ligne de base, son temps de réponse est rapide et il est simple d'usage et d'entretien.

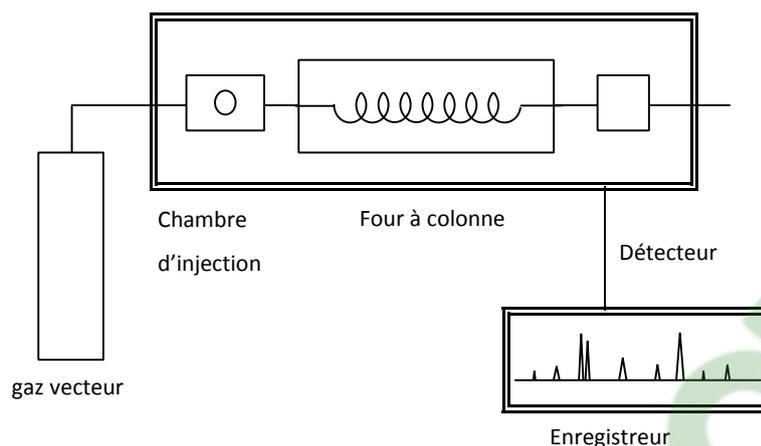


Figure 13 : Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse

Une représentation schématique de l'appareillage de CPG est donné à la figure 13.

L'analyse des esters méthyliques de notre huile a été effectuée sur un appareil SHIMADZU WC14A équipé d'une colonne capillaire de longueur 30m et de diamètre intérieur 0,32mm, munie de phase polaire BP 20 polyéthylène glycol de 0,25 $\mu$ m d'épaisseur. Les conditions d'analyse sont les suivantes :

- four à colonne : 190°C isotherme
- détecteur FID : 260°C
- injecteur : 240°C
- gaz vecteur : Azote U, débit : 3ml/mn

Le chromatogramme de l'huile est présenté à la figure 14. Il comporte 4 pics qui correspondent à quatre acides gras.

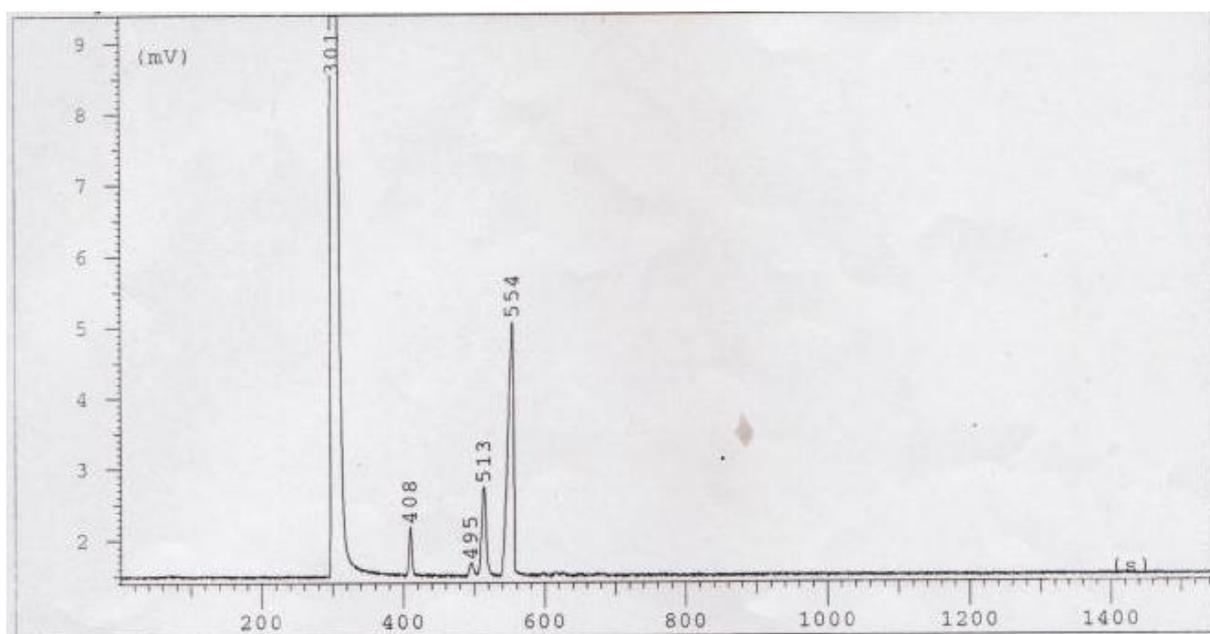


Figure 14 : Chromatogramme des EMAG d'huile d'amande de *Melia azedarach*

Leur teneur est consignée dans le tableau 19 où figure également l'attribution des structures moléculaires. Les acides gras ont été identifiés selon la méthode de calcul donnée à l'annexe 3 de LCE (longueur de chaîne équivalente) basée sur la mesure de temps de rétention ( $t_r$ ).

Tableau 19 : Composition en acides gras d'huile d'amande de *Melia azedarach*

$T_r$	AG	Symbole	Surface	%
408	Acide palmitique	16 :0	3084	6,90
495	Acide stéarique	18 :0	1432	3,20
513	Acide oléique	18 :1w9	8904	19,93
554	Acide linoléique	18 :2w6	31260	69,97

L'huile étudiée est constituée principalement d'acides gras insaturés, l'acide oléique et l'acide linoléique qui représentent une teneur totale de près de 90%. La richesse en acide linoléique, soit environ 70%, confère à l'huile des valeurs nutritionnelles et nutraceutiques ; cet acide gras est dit essentiel car il ne peut être synthétisé par l'organisme et doit être apporté par l'alimentation, notamment par les huiles végétales (tournesol, maïs, soja, arachide, colza, olive, palme ...). De plus, avec un faible taux de 10% d'acides gras saturés constitués par l'acide palmitique et l'acide stéarique, la composition de notre huile est très proche de celle de l'huile de

tournesol [52], ce qui permettrait d'envisager une valorisation alimentaire de cette huile, si elle n'était pas contaminée par l'azadirachtine.

Des études anciennes décrivent la composition en acides gras d'huile de *Melia azedarach* qui contient 88,43% d'acide gras insaturés se répartissant en acide linoléique et acide oléique, et 11,45% d'acides gras saturés constitués de l'acide palmitique et de l'acide stéarique [53].

Plus récemment, TROUP et JOHSHI [48] ont décrit des huiles de *Melia azedarach* d'un goût très amer et de couleur jaune verdâtre, contenant 65 à 82% d'acides linoléique et oléique.

Si l'on tient compte des autres résultats rapportés dans le tableau 20 [48][54], on peut dire que l'huile de *Melia azedarach* possède une composition en acides gras assez stable quelle que soit l'origine géographique du végétal, et l'huile est de type oléique-linoléique.

Tableau 20 : Teneur en acides gras de l'huile de *Melia azedarach* de Chine et d'Egypte

Origine	Chine	Egypte
Constituants	Teneur(%)	
Acide palmitique	7,17	6,77
Acide linoléique	62,47	67,17
Acide stéarique	4,16	6,83
Acide oléique	25,72	15,16
Acide arachidique	0,24	-
Acide éicosanoïque	0,23	-
Hexadecanol	-	3,07
Acide myristique	-	1,00

### CHAPITRE III) : ETUDE DE L'ACTIVITE INSECTICIDE DE *Melia azedarach* sur *Sitophilus zeamais*

#### 1) Objectif

Les insectes ravageurs des denrées alimentaires stockées peuvent causer des pertes importantes en réduisant la qualité et/ou la quantité des produits stockés. D'après l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'Agriculture (FAO), les pertes dues aux insectes nuisibles correspondent à 35% de la production agricole mondiale [55]. On estime qu'il est plus utile et plus rentable d'assurer une bonne conservation des récoltes que de compenser les pertes par une augmentation de la production.

En raison de son efficacité et de son application facile et pratique, l'utilisation d'insecticides chimiques constitue à l'heure actuelle la technique la plus utilisée pour lutter contre les insectes nuisibles. Cependant, l'emploi intensif et inconsidéré de ces insecticides a provoqué une contamination de la biosphère et de la chaîne alimentaire, une éradication des espèces non cibles telle que la faune auxiliaire, ainsi que l'apparition d'insectes résistants. Fort de ce constat, les bio-insecticides d'origine végétale apparaissent comme une alternative de lutte propre contre les insectes parasites [56].

L'espèce *Melia azedarach* est connue et utilisée pour ses propriétés biologiques vis-à-vis de certains insectes. Des extraits de fruits, de feuilles, de tiges et d'écorces ont montré un effet insecticide sur la blatte germanique, le puceron du laiteron et le moustique *Aedes aegypti* vecteur de la dengue. Une action répulsive des extraits de feuilles sur les criquets migrateurs a aussi été observée [14].

En revanche, des tests insecticides de *Melia azedarach* vis-à-vis de *Sitophilus zeamais* n'ont pas encore été rapportés. Or, *Sitophilus zeamais* est l'un des insectes les plus actifs dans les greniers des paysans et dans les magasins de stockage [57][58], causant des dégâts importants sur le maïs (figure 15). La femelle dépose ses oeufs au fond de cavités creusées dans l'endosperme du grain et rebouche à l'aide d'un tampon mucilagineux. L'insecte peut aussi infester le blé, le riz, l'orge, le sorgho, le millet, l'igname, le manioc, et même les pâtes alimentaires [59].



Figure 15: Stock de maïs ravagés par *Sitophilus zeamais*

Notre but est d'évaluer l'effet de la plante sur cet insecte par l'administration d'une poudre de feuilles, d'une poudre d'amande, et d'une préparation à base d'huile d'amande de graines de *Melia azedarach*.

## 2) Matériels et méthodes

### 2-1) L'insecte

La classification systématique de *Sitophilus zeamais* est la suivante :

Règne : Animal

Phylum : Arthropodes

Classe: Hexapodes (Insectes)

Ordre : Coléoptères

Famille : Curculionidées

Genre : *Sitophilus*

Espèce : *Sitophilus zeamais* (Motsch.)

*Sitophilus zeamais* ou charançon du maïs (figure 16) est un insecte cosmopolite qui s'adapte aux températures et aux humidités élevées ; une température comprise entre 25°C et 27 °C et une humidité relative de 70 % sont nécessaires pour son développement. Elle peut pondre jusqu'à 350 à 450 œufs. Le cycle de développement de *S. zeamais* peut durer 5 semaines, et la durée de vie de l'adulte est comprise entre 3 à 5 mois [60].

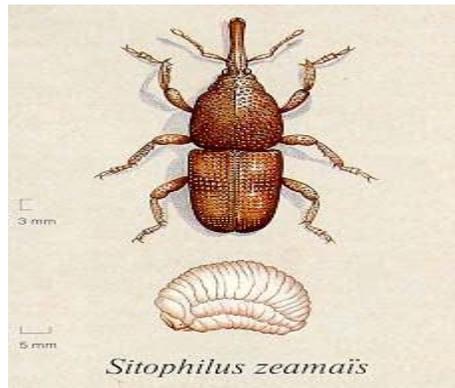


Figure 16: Larve de *Sitophilus zeamais* et insecte adulte

Les insectes utilisés dans notre étude ont été fournis par un paysan ayant un stockage de maïs dans la commune de Tsiroanomandidy.

## 2-2) 2.2. Les végétaux

La préparation de la poudre de feuilles et de la poudre d'amande est décrite selon le protocole donné à la figure 16.

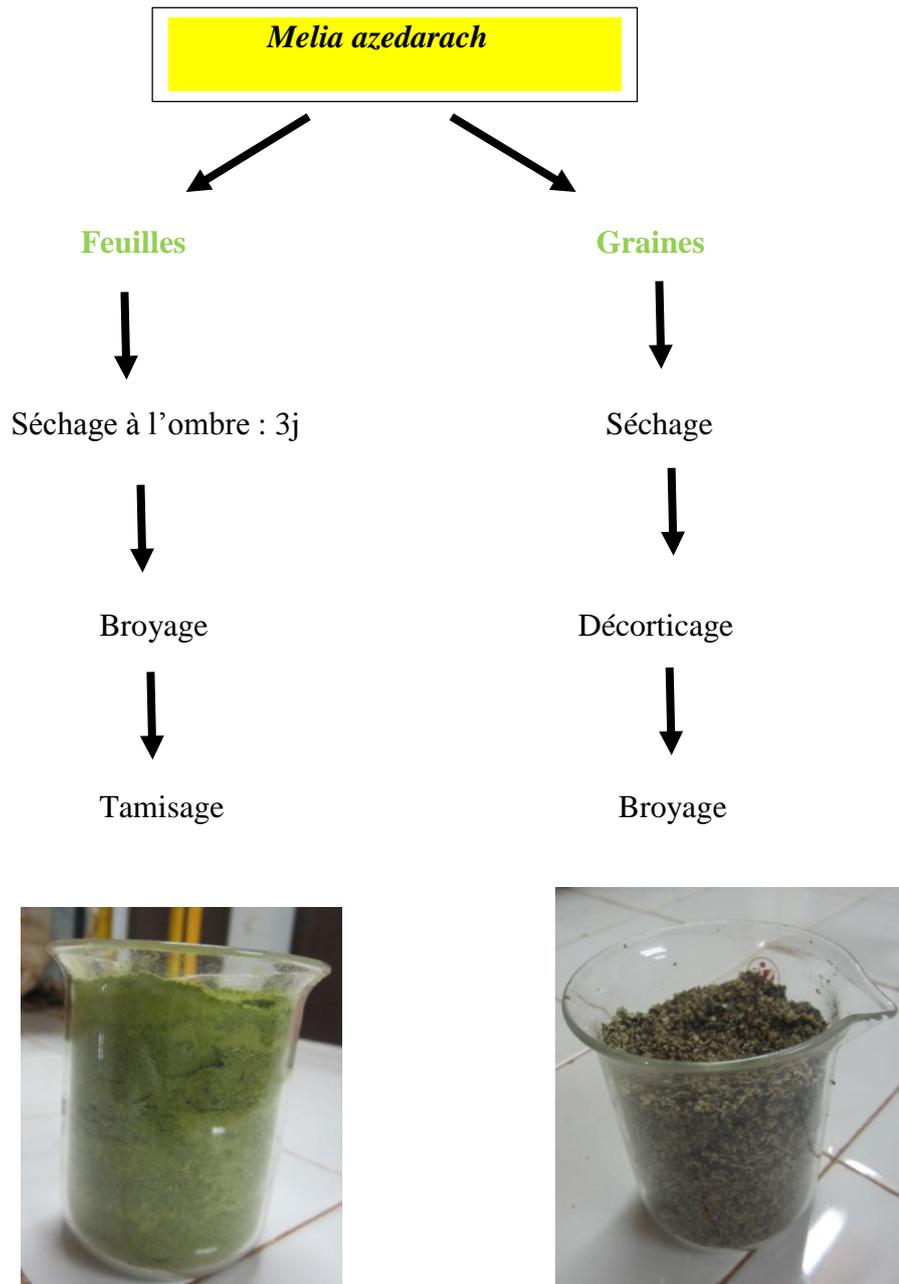


Figure 17 : Préparation des poudres de *Melia azedarach*

Pour l'huile, on prépare un mélange composé de 100ml d'eau distillée, 1g de savon dur et 2g d'huile.

### 2-3) *Tests d'activité*

Chaque poudre végétale obtenue est mélangée aux graines de maïs contenues dans un bocal à des doses de 10g, 15g et 30g pour 100g de maïs. Le test témoin correspond à 100g de maïs sans ajout de produit. Chaque test est réalisé en duplicate.

Un lot de 50 insectes est introduit dans chaque bocal. Les comptages des insectes morts sont effectués toutes les 24 heures jusqu'à la disparition de tous les individus.

Le test de l'huile s'effectue par une pulvérisation de 4 à 5 mL de la solution sur un lot de 20 insectes.

### 2-4) *2.4. Calcul du TL<sub>50</sub>*

Le temps léthal 50 ou TL<sub>50</sub> est le temps nécessaire pour que meurent 50% de la population d'insectes qui a reçu une dose déterminée de produit.

Pour estimer le TL<sub>50</sub>, on trace des droites de régression en exprimant le taux de mortalité corrigé (en probits) en fonction du logarithme du temps de traitement [61] :

$$Y = f[\log(\text{temps})] = ax + b$$

Le taux de mortalité corrigé M<sub>C</sub> est obtenu par la formule d'ABOTT [62] qui donne des valeurs en pourcentage de mortalité des échantillons traités par rapport à la mortalité des échantillons témoin. Cette correction permet d'exclure le biais dû à la mortalité naturelle observée dans nos conditions expérimentales.

$$M_C = \frac{M_T - M_{T_0}}{100 - M_{T_0}} \times 100$$

avec :

M<sub>C</sub> : la mortalité corrigée

M<sub>T</sub> : la mortalité des insectes traités

M<sub>T<sub>0</sub></sub> : la mortalité des insectes témoin

Le tableau 21 est utilisé pour transformer les taux de mortalité en valeurs exprimées en probits selon la méthode préconisée par FINNEY [61].

Tableau 21: Table des probits

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

### 3) Résultats

En utilisant la formule d'Abbot pour la correction, on obtient les pourcentages de mortalité qui sont donnés dans le tableau 22.

Tableau 22 : Taux de mortalité journalière des insectes au contact de maïs traité

Durée de contact (jrs)	Témoin	Dose de poudre de feuilles (%)			Dose de poudre de graines (%)		
		10	15	30	10	15	30
		Taux de mortalité en %					
1	0	0	0	0	0	0	2
2	0	0	0	3	0	4	8
3	0	1	3	14	3	16	25
4	0	8	14	27	8	26	46
5	2	13,26	23,46	36,73	18,36	41,83	64,28
6	2	25,51	39,79	54,08	31,63	55,10	85,71
7	6	35,10	58,51	79,78	44,68	73,40	100
8	6	54,25	70,21	96,8	61,70	91,48	
9	10	76,66	84,44	100	80	100	
10	10	83,33	91,11		100		
11	10	96,66	100				
12	12	98,86					
13	12	100					

Il apparaît que le taux de mortalité chez les individus traités avec les feuilles et les graines de *Melia azedarach* est nettement supérieur à celui observé chez les témoins. Une mortalité de 100% est atteinte au bout de 13, 11 et 9 jours aux doses respectives 10, 15 et 30% de poudre de feuilles, et au bout de 10, 9 et 7 jours aux doses respectives de 10, 15 et 30% de poudre de graines.

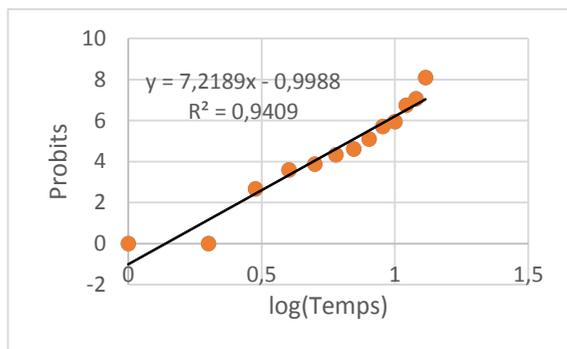
La mortalité la plus élevée est observée pour la dose de 30 % quelle que soit la durée de traitement.

Les droites de régression de la figure 18 permettent d'évaluer les  $TL_{50}$  relatifs aux différents tests réalisés. Nous en donnons une illustration par l'exemple de la courbe de la figure 18 a) obtenue avec les valeurs du tableau 23.

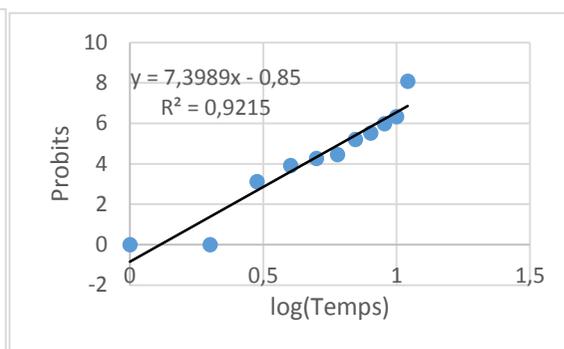
Tableau 23 : Valeurs expérimentales relatives à un traitement avec 10% de poudre de feuilles

Temps (jrs)	Log(Temps)	Taux de mortalité	Valeur en probits (Y)
1	0	0	0
2	0,30	0	0
3	0,47	1	2,67
4	0,60	8	3,59
5	0,69	13,26	3,87
6	0,77	25,51	4,33
7	0,84	35,10	4,61
8	0,90	54,25	5,10
9	0,95	76,66	5,71
10	1	83,33	5,95
11	1,04	96,66	6,75
12	1,07	98,86	7,05
13	1,11	100	8,09

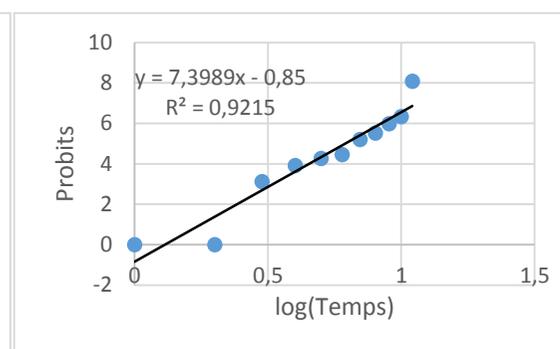
Le traitement de ces données sur Excel délivre l'équation de la droite de régression arithmétique suivante :  $Y=7,2189x - 0,9988$ , et le  $TL_{50}$  correspond à  $Y= 5$ .



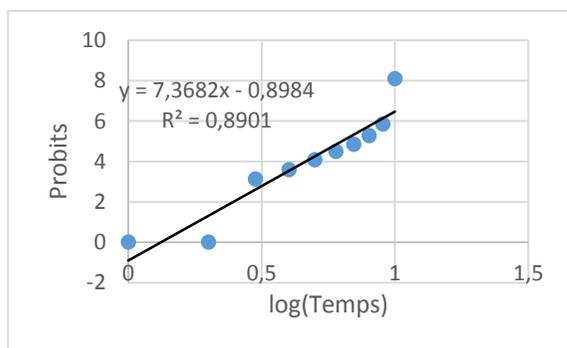
a) dose : 10% de poudre de feuilles



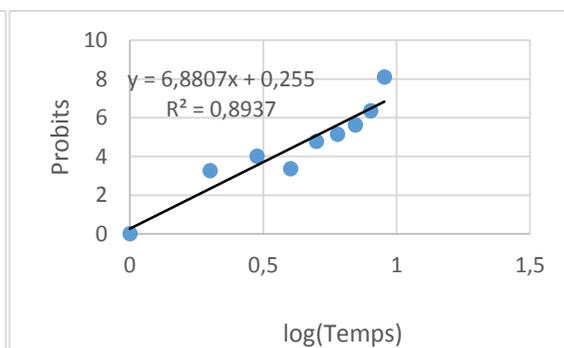
b) dose : 15% de poudre de feuilles



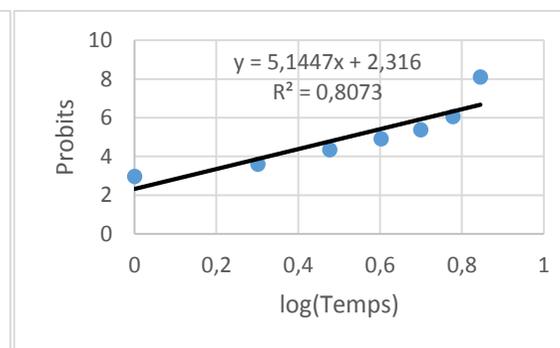
c) dose : 30% de poudre de feuilles



a) dose : 10% de poudre de graines



b) dose : 15% de poudre de graines



c) dose : 30% de poudre de graines

Figure 18: Variation du taux de mortalité en fonction du temps

De chacune des courbes de la figure 18, on déduit le temps léthal 50 pour chacun des tests réalisés. Les valeurs de TL<sub>50</sub> à différentes doses sont rassemblées dans le tableau 24.

Tableau 24: Valeurs de TL<sub>50</sub> en fonction de la dose testée

Dose (%)	TL <sub>50</sub> (jour)	
	Poudre de feuilles	Poudre de graines
10	6,31	6,77
15	4,89	6,17
30	4,64	3,32

D'après les valeurs du tableau 24, le temps léthal 50 le plus court est observé pour la dose la plus élevée de 30% ; il est de 3,32 jours de traitement avec la poudre de graines, et de 4,64 jours de traitement avec la poudre de feuilles. La poudre de graines semble ainsi plus efficace dans la lutte contre l'insecte ravageur *Sitophilus zeamais*. Ceci est vérifié également aux doses plus faibles qui donnent un TL<sub>50</sub> de 4,89 jours avec les graines contre 6,17 jours avec les feuilles à la dose de 15%, et un TL<sub>50</sub> respectivement de 6,31 et 6,77 jours avec les graines et les feuilles à la dose de 10%.

Des études ultérieures préciseront si les molécules actives sont les mêmes que celles qui ont été identifiées dans les extraits de *Melia azedarach*, à savoir les limonoïdes et les composés apparentés aux limonoïdes.

En ce qui concerne l'huile de graines de *Melia azedarach*, il est constaté que le taux de mortalité de 100% est atteint après 5mn de traitement. Des tests plus affinés sont nécessaires pour confirmer que l'huile contient effectivement des molécules à effet insecticide.

## CONCLUSION

*Melia azedarach* de Madagascar connu sous le nom vernaculaire de Voandelaka est un végétal qui pousse à l'état sauvage dans différentes régions de Madagascar, notamment sur les Hautes Terres et dans les régions du Sud. Les populations locales s'en servent surtout comme bois de chauffe et de menuiserie. Notre étude a pour but de démontrer que la plante présente bien d'autres intérêts qui méritent d'être valorisés.

Les amandes du fruit se révèlent riches en huile qui est obtenue avec un rendement de 40,72%. D'après l'analyse effectuée sur les acides gras, l'huile est constituée principalement d'acides gras insaturés : acide linoléique (69,96%) et acide oléique (19,93%). L'huile est de type oléique/linoléique, et la teneur élevée en acide linoléique qui est un acide gras essentiel démontre l'intérêt de cette huile sur le plan nutritionnel.

De plus, par la valeur élevée de l'indice de saponification de l'huile, celle-ci peut être proposée dans l'industrie du savon.

Par ailleurs, l'huile a été évaluée pour ses activités sur des bactéries pathogènes. Les effets d'inhibition de croissance sur *Escherichia coli* et sur *Yersinia enterocolytica* sont intéressants.

De même, dans une expérience préliminaire, une préparation à base d'huile de *Melia azedarach* a provoqué une mortalité immédiate de 100% de *Sitophilus zeamais* qui est un insecte ravageur de maïs en stockage.

Une étude phytochimique réalisée sur les autres organes du végétal nous a permis de mettre en évidence la présence en abondance dans les feuilles et racines de saponosides, de tanins et polyphénols. Les feuilles renferment également beaucoup de flavonoïdes et de stéroïdes, tandis que les racines sont riches en alcaloïdes et triterpènes. Ceci destine les feuilles et les racines à des domaines d'applications thérapeutiques différentes.

Une attention particulière a été accordée à l'extrait de racines dont les fractions polaires ont montré les meilleures activités antibactériennes, notamment vis-à-vis de *Bacillus cereus*. Les substances actives seront recherchées dans les différentes fractions issues de la séparation chromatographique qui a été réalisée sur l'extrait butanolique des racines.

L'effet insecticide de feuilles et de graines de *Melia azedarach* sur *Sitophilus zeamais* a montré que le taux de mortalité des insectes est variable selon la dose utilisée. Le temps létal (TL<sub>50</sub>)

le plus court correspond à la dose la plus forte qui est de 30g de poudre pour 100g de maïs, soit 3,32 jours au contact de poudre de graines, et 4,64 jours au contact de poudre de feuilles. Les graines semblent donc plus efficaces que les feuilles, mais dans les deux cas, les résultats indiquent la présence de substances toxiques dans ces produits.

Au terme de cette étude, nous constatons que la plante *Melia azedarach* de Madagascar offre un domaine de recherche très motivant. Les perspectives à court terme que nous proposons sont d'une part, l'étude de l'insaponifiable de l'huile d'amandes qui pourrait aboutir à des applications en cosmétologie, et d'autre part, la purification des fractions qui ont montré une bonne activité antibactérienne et insecticide afin d'affiner les tests biologiques.

# BIBLIOGRAPHIE

[1] J. MORNER, R. BOS et M. FREDRIX, Réduire et éliminer l'usage des pesticides organiques persistants. Documents d'orientation sur des stratégies alternatives de gestion durable des déprédateurs et des vecteurs, 2002, p. 94.

[2] J. WATT, Dictionary of Economic Plants of India, Superintendent, Government printing Press, India, 1889.

[3] E. NARDO, A. COSTA et A. LOURENCAO, *Melia azedarach* extract as an antifeedant to *Bemisia tabaci* (Homoptera : Aleyrodidae), Florida Entomologist, 1997, 80 , pp. 92-94.

[4] M. S. BATCHER, Element Stewardship Abstract for *Melia azedarach*. The Nature Conservancy, Arlington, USA. <http://www.invasive.org/weedcd/pdfs/tncweeds/meliaze.pdf> consulté en août 2016

[5] L. HENDERSON, Alien Weeds and Invasive Plants. Plant Protection Research Institute Handbook No. 12. Cape Town, South Africa: Paarl Printers., 2001.

[6] A. RAZAFITSIAFAJATO, Contribution à l'étude de *Melia azedarach* à Madagascar, mémoire ingéniorat EESA, Département Eaux et Forêts, 1983.

[7] P. JOY, J. THOMAS, S. MATHEWS et B. SKARIA, Medicinal Plants, Kerala Agriculture University, Aromatic and medical plants research station, 1998, pp. 193-194.

[8] K. RISHI et R. SINGH, Chemical components and insecticidal properties of Bakain (*Melia azedarach* L.), A Review. Agri. Rev. 2003, 24(2), pp. 101-115.

[9] B. YOGENDER, P. KALPANA, M. SINGH, M. RAWAT, S. JALALPURE et S. UNIYAL, Antiulcer activity of *Melia azedarach* L. in aspirin induced and pylorus ligated rats, J. Pharm. Res. 2009, 2(9), pp. 1456-1459.

[10] L. LUNGU, C. V. POPA, J. MORRIS et M. SAVOIU, Evaluation of phytotoxic activity of *Melia azedarach* L. extracts on *Lactucam sativa* L., Romanian Biotech. Letters, 2011, 16(2), pp. 6089-6095.

[11] R. TROUP, The Silviculture of Indian Forest Trees, Vol. I, Claredon Press, Oxford, UK., 1981.

[12] H. KATARIA, Medicinal plant *Melia azedarach* used in leprosy control, Oriental Journal of Chemistry, 1994, 10, pp. 178-180.

[13] A. BOUQUET et M. DEBRAY, Plantes médicinales de la côte d'ivoire, 1974, pp. 111-114.

- [14] J. KHERARO et J. ADAM, La Pharmacopée Sénégalaise Traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques. Paris, Vigot., 1974, pp. 545-546.
- [15] S. A. VILLIMIL et C. COTO, Inhibition of herpes simplex virus type-1 multiplication by meliacine, a peptide of plant origin. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 1995, 6(4), pp. 239-244.
- [16] M. KIM, S. KIM, B. PARK., K. LEE, G. MIM, J. SEOH, C. PARK, E. H. WANG, C. CHA et H. KOOKY, Antiviral effects of 28-deacetylSENDANIN on herpes simplex virus I replication, *Antiviral Research*, 1999, 43, pp. 103-112.
- [17] W. DYMOCK, Hamdard Pharmacographics, India. The Institute of Health and Tibbi Research, Pakistan, 1890, vol.1.
- [18] I. CHOPRA, Indigenous Drugs of India. U.N. Dhar and Sons (Private) Ltd., Calcutta, India, 1958, pp. 363-364.
- [19] F. AHMED, A. ASHWAQ, H. THAYYIL, K. ZAMEERUDDIN et IBRAHIM, Antioxidative activity of *Melia azedarach* Linn leaf extract. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics* 7:, 2008, pp. 31-34.
- [20] M. V. MACIEL, M. S.M. MORAIS, C.M. BEVILAQUA, A.L. CAMURCA-VASCONCELOS, F., C.T. COSTA et C.M. CASTRO, Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*, *Vet. Parasitol.*, 2006, 140 (1-2), pp. 98-104.
- [21] M. CARPINELLA, L. GIORDA, C. FERRAYOLI et S. PALACIOS, Antifungal effects of different organic extracts from *Melia azedarach* L. on phytopathogenic fungi and their isolated active components. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, pp. 2506-2511.
- [22] G. VALLADARES, M. DEFAGO, S. PALACIOS et M. CARPINELLA, Laboratory evaluation of *Melia azedarach* (Meliaceae) extracts against the Elm leaf Beetle (Coleoptera : Chrysomelidae), *J. Econ. Entomol.*, 1997, 90, p. 747-750.
- [23] G. VALLADARES, D. FERREYRA, M. DEFAGO, M. CARPINELLA et S. PALACIOS, Effects of *Melia azedarach* on *Triatoma infestans*. *Fitoterapia*, 1999, 70, pp. 421-424.
- [24] R. C. HUANG, J-B. ZHOU, H. SUENAGA, K. TAKEZAKI, K. TADERA et M. NAKATANI, Insect antifeedant property of limonoids from Okinawan and Chinese *Melia azedarach* L. and from Chinese *Melia toosendan* (Meliaceae), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1995, 59, pp. 1755-1757.

- [25] M. CARPINELLA, D. FERREYRA, G. VALLADARES, M. DEFAGO et S. PALACIOS, Potent limonoid insect antifeedant from *Melia azedarach*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 2002, 66, pp. 1731-1736.
- [26] M. NAKATANI, M. ADEL et F. SEHNAL, "Azadirachtin potentiates the action of ecdysteroid agonist RH-2485 in *Spodoptera littoralis*". *Journal of Insect Physiology*, vol. 46, 1995, p. 267-274.
- [27] K. NAKANISHI, Structure of azadirachtin, *Natural products chemistry*, Kodansha University Science books, Tokyo, 1983, vol. 3 , pp. 207-208.
- [28] F.I. BOHNENSTENGEL, V. WRAY, L. WITTE, R. P. SRIVASTAVA et P. PROKSCH, Insecticidal meliacarpins (C-seco limonoids) from *Melia azedarach*, *Phytochemistry*, 50, 1999, pp. 977-982.
- [29] C. B. WANDSCHEER, J.E. DUQUE, d. S. M.A.N. da SILVA et J.D. FONTANA, Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. *Toxicon*, 2005, 44(8), 829-35.
- [30] J. HAN, W. LIN, R. XU, W. WANG et S. ZHAO, Studies on the chemical constituents of *Melia azedarach*, *Acta Pharm. Sin.* (In china), 1991, pp. 426-429.
- [31] H. ITOKAWA, Z. QIAO, C. HIROBE et K. TAKEYA, Cytotoxic limonoids and tetranortriterpenoids from *Melia azedarach*, *Chem. Pharm. Bull.*, 1995, 43(7), 1171-5.
- [32] L. XIAODONG, Recent studies on insecticidal activities of limonoids from Meliaceae plants, *Entomol. Sin* ,1999, 6(3), pp. 283-288.
- [33] R. HUANG, K. TADERA, F. YAGI, Y. MINAMI, H. OKAMURA, T. IWAGAWA et M. NAKATANI, Limonoids from *Melia azedarach*, *Phytochemistry*, 1996, 43, pp. 581-583.
- [34] J. HAN, W. LIN, R. S. XU, W. L. WANG et S. ZHAO, Studies on the chemical constituents of *Melia azedarach*, *Acta Pharm.Sin.* (In china), 1991, pp. 426-429.
- [35] R. C. HUANG, H. OKAMURA, T. IWAGAWA et M. NAKATANI, The structures of azedarachins, limonoid antifeedants from Chinese *Melia azedarach* Linn. *Bull. Chem. Soc. Japan*,1994, pp. 2468-2472.
- [36] J. HARBORNE, *Phytochemicals methods*, Chapman and Hall, 1973, pp. 33-119; 188-191.
- [37] H. LECLERC, M. SIMONET et J. GAILLARD, *Microbiologie générale*, 2e éd., D. Editeurs, Éd., Paris, 1983, p. 369.

- [38] M. ARSHAD , A. AKRAM , N. I. RAJA , S. FATIMA et M. S. AMJAD, Ethnopharmacological and phytochemical account of paradise tree (*Melia azedarach* L.: Meliaceae), Pure Appl. Biol., 2016, 5(1), 5-14.
- [39] A. V. KHAN, Q. AHMED, M.R. MIR, I. SHUKLA et A. A. KHAN , Antibacterial efficacy of the seed extracts of *Melia azedarach* against some hospital isolated human pathogenic bacterial strains. Asian Pac. J. Trop. Biomed., 2011, 1(16), 452-455.
- [40] E.H.S. FONG, M. Tin-Wa, R. R. FARNSWORTH et R.H. DOBBERSTEIN, Phytochemical screening methods, Rev. Department of Pharmacognosy and Pharmacology, College of pharmacy, University of Illinois (Chicago), 1977.
- [41] M. LUSAKIBANZA, Etude phytochimique et pharmacologique de plantes antipaludiques utilisées en médecine traditionnelle congolaise, Thèse de doctorat en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques, Université de Liège, 2012.
- [42] A. MAGDI et OSMAN, Chemical and nutrient analysis of baobab (*Adansonia digita*) fruit and seed protein solubility, Plant Food for Human Nutrition, 2004, vol. 59, pp. 20-33.
- [43] W. SAGOUA, Etude synergique du couplage du système lactoperoxydase avec d'autres molécules naturelles actives ayant des propriétés antifongiques pour l'amélioration de la conservation en frais des bananes, Thèse de doctorat en sciences agronomiques, 2009, Université d'Avignon.
- [44] AFNOR, Recueil de normes françaises. Corps gras, graines oléagineuses, produits dérivés, 5è ed., afnor, Paris, 1993.
- [45] A. KARLESKIND, Manuel des corps gras Tome II, Ed Tec et doc., Paris, 1992, pp. 1556.
- [46] C. KAPSEU et M. PARMENTIER, Composition en acides gras de quelques huiles végétales du Cameroun. Sciences des aliments, 1997, 17 (3), pp. 325-331.
- [47] J. MARCUSSON, Manuel de Laboratoire pour l'industrie des Huiles et Graisses. Librairie polytechnique Ch. Béranger, 1929.
- [48] I. A. CHIFFELLE, F. HUERTA et R. LIZANA, Physical and chemicals characterization of *Melia azedarach* L. fruit and leaf for use as botanical insecticide. Chilean J. Agric. Res., 2009, 69, pp. 38-45.
- [49] R. TROUP et H. JOSHI, The Silviculture of Indian Trees. Vol. III, Claredon Press, Oxford, UK, 1981.
- [50] M. NAUDET, Principaux constituants chimiques des corps gras, Ed. Lavoisier Tec et Doc., Paris, 1992, pp. 65-94.

- [51] J. F. GARDAIS, Ph. GORIN, A. PREVOT, J. SERPINET, J. TRANCHANT et G. UNTZ, Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, 3è ed., Ed. Masson, 1982.
- [52] J. HARWOOD et R. APARICIO, Handbook of olive oil – Analysis and properties, An Aspen publication, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland,, 2000, pp. 1-513.
- [53] R. BOST et D. FORE, The chemical composition of the chinaberry (*Melia azedarach*), <http://dc.lib.unc.edu/cdm/ref/collection/jncas/id/1633> consulté en août 2016, 1935, pp. 135-142.
- [54] F. MOHAMED, H. M. A. MOHAMED, Y. HEBA et A. A.-H. ABDEL-RAHMAN, Repellent and Insecticidal Activities of *Melia azedarach* L. against cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.), Z. Naturforsch., 2011, 66c, pp. 129-135.
- [55] J. GWINNER, R. HARNISCH et O. MÜCK, Manuel sur la manutention et la conservation des grains après récolte, Projet de production des stocks et des récoltes, GTZ, 1996, p. 388.
- [56] P. KOSMA, Z. AMBANG, B. ADB, H. TEN, J. KUATE et A. AKOA, Assessment of nemacidal properties and phytochemical screening of neem seed formulation using *Radopholus similis*, parasitic nematode of plantain in Cameroun. Crop Protection, 2011, vol. 30 , pp. 733-738.
- [57] A. DELOBEL et M. TRAN, Les coléoptères des denrées alimentaires entreposées dans les régions chaudes, ORSTOM, Paris, 1993.
- [58] S. GARCIA-LARA et D. BERGVINSON, Programa integral para reducir pérdidas poscosecha en maíz. Agricultura Técnica en México, 2007, 33, pp. 181-189.
- [59] [www.cabi.org/cpc](http://www.cabi.org/cpc). Accessed on 28 Jan 2010, consulté en août 2016
- [60] R. URRELO et V. WRIGHT, Oviposition performance of *Sitophilus zeamais* (Motsch.) on resistant and susceptible maize accessions. J. Kansas Entomol. Soc., 1989, 62, vol. 66, pp. 23-31.
- [61] D. FINNEY, Probit analysis, 3rd Ed. Cambridge University Press, 1971, p 333.
- [62] W. ABBOTT, A method for computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol., 1925, 18, pp. 265-267.

**Annexe1) : Détermination de l'indice d'iode selon la méthode Hübl-Waller****Réactifs**

- Eau distillée
- Iodure de Potassium 30%
- Empois d'amidon : 5g d'amidon dans 1l d'eau bouillante
- $\text{CCl}_4$
- Réactif de Hübl
- Thiosulfate de Sodium : 0,1 mol/l

**Préparation de réactif de Hübl**

- Dissoudre 25g d'iode dans 500ml d'alcool éthylique à 96°
- Dissoudre 20g de chlorure mercureux dans 500ml d'alcool éthylique
- Mélanger ces deux solutions 24h avant l'utilisation

**Mode opératoire**

- Dans une fiole de 500 ml, dissoudre 0,2g d'huile avec 10ml de  $\text{CCl}_4$  ou de chloroforme
- Ajouter 25ml de réactif de Hübl
- Boucher, agiter et placer à l'obscurité pendant 12h
- Ajouter 20ml d'une solution d'iodure de potassium à 30% et 100ml d'eau distillée
- Titrer avec la solution de thiosulfate jusqu'à ce que la couleur jaune due à l'iode disparaisse
- Ajouter quelques gouttes d'empois d'amidon et poursuivre le dosage jusqu'à disparition complète de la couleur bleue
- Effectuer un essai à blanc dans les mêmes conditions

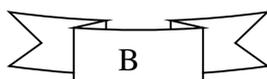
**Annexe2) : Préparation des esters méthyliques d'acides gras**

a) Phase de saponification : méthode à la potasse éthanolique NF ISO 3961 (1996)

- introduire 0,1 g d'huile dans un petit flacon
- ajouter 2 ml de solution de potasse éthanolique 2N
- placer à l'étuve à 85°C pendant 1h, puis laisser refroidir
- ajouter 2 ml d'eau distillée, puis transvaser dans une ampoule à décanter
- extraire avec 2x4 ml d'hexane les matières insaponifiables
- ajouter 2 ml de l'acide chlorhydrique à la phase aqueuse, puis extraire avec 2x2ml d'hexane les acides gras
- évaporer à sec

b) Phase de méthylation :

- additionner 2ml de méthanol chlorhydrique 2N aux acides gras, puis porter le mélange à ébullition au bain marie pendant 20 min
- ajouter 4 ml d'eau distillée, puis transvaser dans une ampoule à décanter
- extraire avec 8ml d'hexane
- soutirer la phase hexanique, sécher sur sulfate anhydre de sodium, puis filtrer.



**Annexe3) : Technique de calcul de la LCE**

Par définition la longueur de chaîne équivalente ou LCE est le nombre d'atomes de carbone d'un acide gras saturé linéaire fictif qui aurait la même rétention que l'acide gras considéré. Elle est calculée par extrapolation linéaire à partir de deux acides gras saturés pairs successifs de référence, généralement 16 :0 et 18 :0.

Les valeurs obtenues servent à l'identification des pics d'un chromatogramme par comparaison avec les valeurs données dans la littérature.

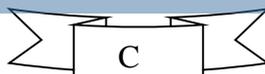
L'expression donnant la LCE est donnée par la relation suivante :

$$LCE = n - a \frac{\log \frac{t'_{Ri}}{t'_{Rn}}}{\log \frac{t'_{R(n-a)}}{t'_{Rn}}}$$

avec :

- n: nombre d'atomes de carbone de l'acide gras saturé linéaire pris comme référence généralement n=18
- a : différence entre les LCE des 2 acides gras de référence, généralement égal à 2
- $t'_{Ri}$  : temps de rétention corrigé de l'acide gras à déterminer
- $t'_{Rn}$  : temps de rétention corrigé de l'acide gras saturé linéaire à n atomes de carbone
- $t'_{R(n-a)}$  : temps de rétention corrigé de l'acide gras saturé linéaire à (n-2) atomes de carbone

Clicours.COM



**Annexe4) : Caractéristiques des bactéries****Bactéries Gram (-) :***Escherichia coli* (CIP 103914)

C'est un bacille de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles. Sa longueur varie de 2 à 6  $\mu\text{m}$ , et sa largeur est de 1,1 à 1,5  $\mu\text{m}$ . Les bactéries de type *E. coli* constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou chez certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néo-natales.

*Salmonella typhi* (ATCC 14028)

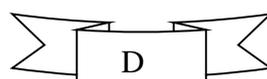
Ce sont des bactéries sous forme de bâtonnets, aérobies facultatives, très mobiles, découvertes en 1880 par Eberth ; elles sont présentes dans les selles des malades, des convalescents ou des porteurs sains. On les trouve aussi dans l'eau et dans les huîtres ; elles peuvent survivre plusieurs semaines en milieu sec. Elles sont responsables de maladies telles que fièvre typhoïde, infections urinaires, méningites et infections pulmonaires.

*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

Ces bactéries fines sont de 1.5 à 3  $\mu\text{m}$  de long et 0.5 à 0.8  $\mu\text{m}$  de large. Elles sont mobiles grâce à une ciliature de type polaire monotriche. Ce type de bactéries possède un aspect de « vol moucheron », et ne forme ni spores ni sphéropastes. Elles sont responsables de 10 % de l'ensemble des infections nosocomiales, occupant le troisième rang après *E. coli* et *S. aureus*, et le premier rang pour les infections pulmonaires basses. Elles sont également la cause d'infections urinaires.

*Klebsiella pneumoniae* (LHAE 3)

Ce sont des cellules isolées ou se présentant par paires, regroupées en courtes chaînes, capsulées, non mobiles ; on peut les trouver dans le sol, l'eau et les végétaux. Elles provoquent des infections urinaires, des infections pulmonaires, des pneumonies lobaires, et sont à l'origine d'abcès et parfois de septicémies.



*Vibrio cholerae* (LHAE 1)

Encore appelée vibrion cholérique ou bacille virgule, c'est une bactérie en forme de bâtonnet incurvé, mobile et responsable du choléra chez l'homme, une maladie épidémique contagieuse. Le choléra est une maladie exclusivement humaine avec pour seul réservoir, semble-t-il, l'être humain. Il touche les zones surpeuplées et défavorisées, car l'absence d'hygiène hydrique et la dénutrition favorise la contraction de la maladie.

*Yersinia enterocolitica* (LHAE)

Ce sont des bacilles appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, découverts par SCHLEIFSTEIN et COLEMAN en 1939 aux USA. Chez l'homme, *Yersinia enterocolitica* entraîne des gastro-entérites fébriles et chez l'adulte des septicémies, des adénites et des polyarthrites. La gastro-entérite est parfois suivie de séquelles rhumatoïdes inflammatoires.

Les animaux carnivores domestiques peuvent héberger des sérovars pathogènes pour l'homme. Des cas de gastro-entérites ont été décrits chez les chiots, et les animaux malades semblent susceptibles de transmettre l'infection à l'homme et tout particulièrement aux enfants.

**Bactéries à Gram (+) :***Bacillus cereus* (CIP 642)

Ce sont des bactéries en forme de bâtonnets, généralement mobiles et sporulés, et aérobies. Elles provoquent des pathologies suivantes : intoxications alimentaires, septicémies, méningites, infections respiratoires et myonécroses.

*Listeria monocytogenes* (ATCC 19111)

Ce sont des bacilles, c'est-à-dire des bactéries en forme de bâtonnets, qui se regroupent pour former des chaînettes ou de minces filaments ; elles sont très résistantes et peuvent se développer à une température de + 4°C, ce qui leur permet de se multiplier dans des aliments contaminés même conservés au réfrigérateur. C'est une bactérie opportuniste (elle touche plus facilement les organismes affaiblis par une autre maladie). Elles sont à l'origine de pathologies telles que la listériose et la septicémie, et sont responsables de l'avortement. Les nouveau-nés et les personnes âgées sont les plus gravement atteints.

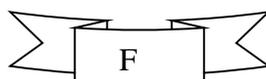


*Enterococcus faecalis* (ATCC 29219)

Ce sont des bactéries aérobies arrondies. Elles se présentent en chaînettes ou par paires, et certains groupes sont pathogènes pour l'homme. Elles sont la cause d'angine, de scarlatine, d'érysipèle, de fièvre puerpérale et de certaines pneumonies.

*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

Ce sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1  $\mu\text{m}$ . Ces bactéries sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin), immobiles, asporulées, et habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré. Elles sont la cause de méningite, d'ostéomyélite et de diarrhée.



## **Annexe5) : Méthodologie de tests antibactériens**

### **Milieux de culture**

- Gélose de Mueller Hinton pour la croissance des germes
- Bouillon TCS pour la relance des souches bactériennes
- eau physiologique stérile pour la dilution des suspensions bactériennes
- DMSO pour solubiliser les extraits

### **Préparation des extraits**

Les méthodes d'extraction sont présentées dans le Partie II, Chapitre I. Les solutions des extraits sont préparées dans le Diméthyle sulfoxyde ou DMSO avec une concentration 20g/l.

### **Préparation de pré culture**

La culture des différentes souches en stock à l'IPM se fait dans un bouillon de culture, le bouillon TCS, à 37°C pendant 24 heures; c'est la revivification des souches.

Après l'incubation, une suspension microbienne dont la turbidité est de 0,5 Macfarland est préparée, correspondant à  $10^8$  ufc/ml de bactéries. Pour cela, une vérification sur un densimètre est nécessaire. Des dilutions successives au 1/ 10<sup>e</sup> dans l'eau physiologique sont ensuite effectuées jusqu'à obtenir un inoculum de  $10^7$  ufc/ml de germes.

### **Mode opératoire**

Des disques stérilisés de papier Whatman de 6 mm de diamètre sont imbibés de 10µl d'extrait à tester. Par ailleurs, la gélose de Mueller-Hinton stérile est coulée dans des boîtes de Pétri jusqu'à une épaisseur de 4 mm.

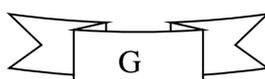
Une suspension bactérienne de 18 à 24h est préparée avec le bouillon nutritif.

L'ensemencement de la souche à tester sur la gélose est réalisé par écouvillonnage à l'aide d'un coton-tige stérile en tournant la boîte d'environ 60°.

La dernière étape consiste à déposer à l'aide d'une pince stérile à la surface de la gélose ensemencée le disque imbibé d'extrait. L'incubation dure de 18 à 24h à 37 °C.

Durant cette période, l'extrait diffuse dans la gélose à partir du disque, déterminant ainsi une zone d'inhibition autour du disque.

A la fin du temps d'incubation, le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré afin d'apprécier la sensibilité de la souche qui sera qualifiée de peu sensible, sensible, très sensible ou résistante selon la valeur trouvée comparée à un barème conventionnel.



## Annexe6) : Protocole des tests de criblage phytochimique

### ✓ Tests des alcaloïdes

A 0.3g de poudre de chaque espèce (feuilles et racines), ajouter 3ml de HCl dilué à 5%, et laisser sous agitation pendant 30 minutes puis filtrer. 1ml du filtrat est prélevé et reparti dans 4 tubes :

- ❖ Tube n°1 : Témoin
- ❖ Tube n°2 : Ajouter 5 gouttes de réactif de Mayer.
- ❖ Tube n°3 : Ajouter 5 gouttes de réactif de Wagner
- ❖ Tube n°4 : Ajouter 5 gouttes de réactif de Drangendorff

**Observations** : S'il y a formation de trouble, floculation ou précipitation, alors les alcaloïdes sont présents dans le matériel végétal.

### ✓ Tests des flavonoïdes et des leucoanthocyanes

Prélever l'équivalent de 3 g de poudre, puis évaporer à sec. Traiter avec 15 ml d'hexane jusqu'à élimination des pigments qui est la cause des faux positifs. Dissoudre le résidu avec 30 ml de MeOH à 80% puis filtrer et placer 3ml de filtrat respectivement dans 4 tubes à essais.

#### Test de WILLSTATER :

Tube n°1: Témoin

Tube n°2 : ajouter 4 tournures de Mg et 0.5ml de HCl concentré, puis laisser 10 minutes

**Observations** : la présence des flavonoïdes donnent une coloration rouge ou pourpre

#### Test de WILLSTATER modifié :

Tube n°3 : ajouter 0.5 ml de HCl concentré et quelques tournures de Mg. Après dissolution de Mg, verser 1ml d'eau distillée et 1ml d'alcool isoamylique, puis laisser réagir pendant 10 minutes.

**Observations** : En présence de flavonoïdes, une coloration rouge (flavones); rouge à pourpre (flavonols) ; rouge-violacée (flavanones et flavanols) apparaît dans la phase alcoolique.

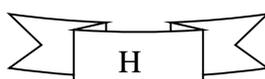
#### Test de BATE-SMITH :

Tube n°4 : introduire 0.5 ml de HCl concentré, puis porter au bain-marie à 100°C pendant 30 minutes.

**Observations** : Une coloration rouge violet dénote la présence de leucoanthocyanes.

### ✓ Tests des tanins et polyphénols

Évaporer la solution hydroalcoolique équivalente à 10 g. Additionner 25 ml d'eau distillée chaude, agiter, verser ensuite 3 à 4 gouttes de NaCl 10%.



Le filtrat est partagé dans 4 tubes à essai :

- ❖ Tube n°1 : Témoin
- ❖ Tube n°2 : Ajout de 5 gouttes de gélatine à 1%.
- ❖ Tube n°3 : Ajout de 5 gouttes de gélatine salée (gélatine 1% + NaCl 10% 50/50)
- ❖ Tube 4 : Ajout de 5 gouttes de FeCl<sub>3</sub> 10% en solution méthanolique.

**Observations :** En présence de gélatine, l'apparition de précipité indique la présence de polyphénols, en présence de gélatine salée, l'apparition de précipité indique la présence de tanins

En présence de FeCl<sub>3</sub>, les tanins hydrolysables donnent une coloration noir bleuâtre, et les tanins condensés donnent une coloration une coloration bleu vert.

#### ✓ Tests des stéroïdes et des triterpénoïdes

Evaporer la solution hydroalcoolique équivalente à 10 g de poudre, puis traiter le résidu avec 10 ml d'hexane jusqu'à élimination des pigments. Le résidu dépigmenté est dissous dans 10ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, puis la solution obtenue est séchée avec Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre. Le filtrat est réparti à volume égal dans 3 tubes à essai numéroté de 1 à 3.

##### Test de LIEBERMANN-BURSCHARD

- ❖ Tube n°1 : témoin
- ❖ Tube n°2 : ajouter 4 gouttes d'anhydride acétique et 5 gouttes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré, puis agiter le mélange.

Le test de LIEBERMANN-BURSCHARD donne une coloration rouge-violet-rose aux triterpènes et une coloration bleu-vert aux stéroïdes.

##### Test de SALKOWSKI

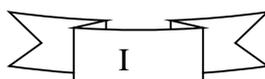
- ❖ Tube n°3 : verser lentement 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré dans le tube incliné d'un angle de 45°.

Le test de SALKOWSKY permet de détecter les stérols insaturés par la formation d'un anneau rouge.

#### ✓ Test des saponines (saponosides)

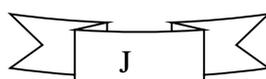
Une quantité de 10 mg de poudre est placée dans un tube à essai, puis additionnée de 10ml d'eau distillée. Le mélange est agité énergiquement pendant 30 secondes, puis laissé reposer 30 minutes. On mesure la hauteur de la mousse.

**Observations :** La présence de saponosides est confirmée par une hauteur de mousse de plus de 3cm.



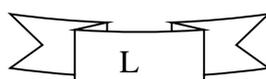
*TABLE DE MATIERES*

SOMMAIRE.....	i
REMERCIEMENTS .....	ii
LISTE DES TABLEAUX .....	iv
LISTE DES FIGURES .....	v
LISTE DES ABREVIATIONS .....	vi
GLOSSAIRES .....	vii
INTRODUCTION.....	1
<b>PARTIE I) : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE SUR <i>Melia azedarach</i>.....</b>	<b>3</b>
CHAPITRE I) : Généralités sur l'espèce <i>Melia azedarach</i> .....	3
1) Etymologie.....	3
2) Origine de l'espèce.....	3
3) Répartition géographique de <i>Melia azedarach</i> .....	3
CHAPITRE II) : Principales caractéristiques botaniques de <i>Melia azedarach</i> .....	6
1) Classification et nomenclature .....	6
2) Description du végétal .....	8
2-1) L'écorce.....	8
2-2) Les feuilles .....	8
2-3) Les fleurs.....	8
2-4) Les racines.....	9
2-5) Les fruits.....	9
2-6) Les graines .....	9
3) Conditions de croissance de <i>Melia azedarach</i> .....	11
4) Observations phénologiques de <i>Melia azedarach</i> de Madagascar .....	11
4.1. Foliaison .....	11
4.2. Floraison .....	11



4.3. Fructification .....	11
CHAPITRE III) : Différentes propriétés de <i>Melia azedarach</i> .....	13
1) Propriétés médicinales .....	13
2) Propriétés antifongiques.....	13
3) Propriétés insecticides.....	14
<b>PARTIE II) TRAVAUX PERSONNELS SUR <i>Melia azedarach</i> DE MADAGASCAR</b>	
<b>17</b>	
CHAPITRE I) : Etude des extraits non volatiles de <i>Melia azedarach</i> .....	17
1) Préparation des extraits bruts .....	17
1-1) Protocole .....	17
1-2) Rendement en extrait brut.....	18
2) Fractionnement par partition liquide-liquide des extraits bruts .....	19
2-1) Protocole .....	19
2-2) Rendement en fraction .....	21
3) Pouvoir antibactérien des constituants non volatiles de <i>Melia azedarach</i> .....	22
3-1) Méthodologie .....	22
3-2) Résultats .....	23
4) Criblage phytochimique de feuilles et de racines de <i>Melia azedarach</i> .....	25
4-1) Préparation de la solution d'extrait brut.....	25
4-2) Résultats et discussion.....	26
5) Séparation chromatographique de la fraction butanolique de racines .....	28
CHAPITRE II) : ÉTUDE CHIMIQUE DE L'HUILE D'AMANDE DE <i>Melia azedarach</i>	
<b>31</b>	
1) Extraction de l'huile.....	31
1-1) Mode opératoire .....	33
1-2) Résultats .....	35
2) Rendement en huile.....	35

2-1) Résultats .....	35
2-2) Interprétation et discussion .....	36
3) Caractérisation physico-chimique de l'huile.....	36
4) Détermination de la composition en acides gras de l'huile par la CPG.....	43
CHAPITRE III) : ETUDE DE L'ACTIVITE INSECTICIDE DE <i>Melia azedarach</i> sur <i>Sitophilus zeamais</i> .....	48
1) Objectif .....	48
2) Matériels et méthodes .....	49
2-1) L'insecte .....	49
2-2) 2.2. Les végétaux.....	50
2-3) Tests d'activité .....	52
2-4) 2.4. Calcul du TL <sub>50</sub> .....	52
3) Résultats .....	53
CONCLUSION .....	58
BIBLIOGRAPHIE .....	60
Annexe1) : Détermination de l'indice d'iode selon la méthode Hübl-Waller ..	A
Annexe2) : Préparation des esters méthyliques d'acides gras .....	B
Annexe3) : Technique de calcul de la LCE .....	C
Annexe4) : Caractéristiques des bactéries .....	D
Annexe5) : Méthodologie de tests antibactériens .....	G
Annexe6) : Protocole des tests de criblage phytochimique .....	H
TABLE DE MATIERES .....	J



**Titre du mémoire** : ETUDE DE *Melia azedarach* (Meliaceae)

de Madagascar en vue de sa valorisation

**Nombre de pages** : 83 ;

**Nombre de figures** : 18 ;

**Nombre des tableaux** : 23



## RESUME

Les caractéristiques physico-chimiques et la composition de l'huile extraite des amandes de graines de *Melia azedarach* de Madagascar ont été déterminées. La teneur en huile est de 40,72%. La composition en acides gras permet de la classer parmi les huiles de type linoléique/oléique.

Le criblage phytochimique de la plante indique une abondance de saponosides et des tanins dans les feuilles et les racines, beaucoup de flavonoïdes et de stéroïdes dans les feuilles et beaucoup d'alcaloïdes et de triterpénoïdes dans les racines.

L'étude biologique de la plante a montré que les fractions polaires de racines et l'huile d'amandes sont les produits les plus actifs contre les bactéries pathogènes testés. Les feuilles et les graines sont aussi montrées une activité insecticide de dose dépendante vis-à-vis de *Sitophilus zeamais* lorsqu'elles sont administrées sous forme de poudre avec une efficacité plus élevée pour les graines.

**Mots clés** : *Melia azedarach* ; voandelaka ; acides gras ; criblage phytochimique ; activités biologiques

## SUMMARY

The physical and chemical composition of the oil extracted from *Melia azedarach* seeds was determined. The oil was obtained in 40.72% yield and it is classified as linoleic/oleic type.

High amount of saponins and tanins was found in the leaves and roots as a result of the phytochemical screening of their crude extracts. Moreover the leaves contain significant amount of flavonoids and steroids whereas roots are rich in alkaloids and triterpenes.

Biological studies of the plant revealed the potent antibacterial activities of both the seeds oil and the polar fractions of the roots. When used as powder, the leaves and the seeds showed concentration dependant toxicity on *Sitophilus zeamais*, the seeds being more active.

**Keywords**: *Melia azedarach*; voandelaka; fatty acids; phytochemical screening; biological activities

**Encadreur**: Mr **RAZAFIMANDEFITRA André**, Enseignant chercheur à l'ESPA

**Rapporteur**: Mme **RASOLONDRAMANITRA VALISOLALAO Jocelyne**, Professeur titulaire à l'ESPA

**Auteur**: **HARINAVALONA Andriantsitohaina A.**

0330453635/harinav.andriantsitohaina@gmail.com