

DEUXIEME PARTIE : METHODES ET RESULTATS

I. Méthodes

Cette section permet de présenter les matériels et méthodes utilisés dans cette étude. Toutes les manipulations ont été réalisées par RABAOVONISON Yvon Martial avec la collaboration et l'aide du personnel des différents laboratoires d'accueil. Les travaux effectués peuvent être divisés en deux parties : la partie chimique et la partie biologique ; La partie chimique comprend l'extraction et l'identification de la composition des HE obtenues, et la partie biologique concerne les méthodes pour la détermination des effets vasorelaxant et anti-radicalaire des HE.

Type de l'étude

Il s'agit d'une étude prospective et analytique

Cadre de l'étude

Elle entre dans le cadre du programme de recherche de composés naturels d'origine végétale à visée antihypertensive par la valorisation des plantes aromatiques au laboratoire de contrôle qualité et standardisation des phytomédicaments (IMRA). Tous les travaux chimiques et biologiques effectués ont eu lieu à l'Institut Malgache de Recherches Appliquées (IMRA) à travers,

- le laboratoire de contrôle qualité et standardisation des phytomédicaments (LCQSP) pour la partie extraction et analyse par CPG/DIF ;
- le laboratoire de pharmacologie expérimentale pour l'étude de l'activité vasorelaxante;
- le département Phytochimie et standardisation des phytomédicaments pour l'étude de l'activité anti-radicalaire.

Période de l'étude

De la collecte de la plante aux différents tests biologiques et chimiques, l'étude s'était étalée de mai 2013 à avril 2014.

Population d'étude

Le matériel végétal étudié était les huiles essentielles (HE) issues des feuilles fraîches de *E. globulus* et de *E. cinerea* aux stades juvénile et adulte.

Ces feuilles ont été collectées par RABAOVONISON Yvon Martial :

- à Sabotsy Namehana, Antananarivo, le 10 mai 2013, pour les feuilles de *E. globulus* juvéniles
- à Ambohibato Andohanimandroseza, Antananarivo, le 16 juillet 2013, pour les feuilles de *E. globulus* adultes
- à Lazaina, Antananarivo, le 30 avril 2013, pour les feuilles de *E. cinerea* juvéniles
- à Antsobolo, Antananarivo, le 18 juillet 2013, pour les feuilles de *E. cinerea* adultes.

Variables étudiées

Les variables étudiées sont :

- le rendement d'extraction de HE;
- l'indice d'ester I(x) pour identifier et comparer les différents constituants de chaque HE ;
- la concentration efficace donnant 50% de relaxation notée CE₅₀ pour évaluer et comparer l'activité vasorelaxante des HE ;
- la concentration donnant 50% d'effet réducteur de DPPH· notée CI₅₀ pour évaluer et comparer l'activité anti radicalaire des HE.

Mode d'analyse des données

- Le rendement R (exprimé en %) en huile essentielle est calculé selon la formule :

$$R (\%) = \left(\frac{MH}{MV} \right) \times 100$$

Avec :

MH : masse de l'huile essentielle obtenue

MV : masse du matériel végétal utilisé pour l'extraction

-La détermination des indices d'ester I(x) des différents constituants est donnée par formule suivante selon la méthode décrite par Tilquin [26] :

$$I(x) = 100 \times \left[n + \left(\frac{T_x - T_n}{T_{n+1} - T_n} \right) \right]$$

Avec :

x : composé à identifier

I(x): indice d'ester du composé x

n : nombre de carbone d'ester méthylique d'acide gras élué avant x

n+1 : nombre de carbone d'ester méthylique d'acide gras élué après x

T_x, T_n, T_{n+1} : température de sortie du composé x et des esters méthyliques élués avant et après x ; elles sont obtenues à partir de la relation

$$Tr(^{\circ}C) = 50 + 5tr(x) \text{ où } tr(x) : \text{ temps de rétention du composé } x$$

- La concentration efficace donnant 50% de relaxation (CE_{50}) est déterminée par régression linéaire au niveau de la phase exponentielle du pourcentage de relaxation [27, 28]. Les résultats obtenus lors de l'étude sont exprimés en moyenne \pm écart-type. L'analyse statistique est réalisée avec le test « t » de Student. Les valeurs de $p \geq 0,05$ sont considérées comme non significative (ns), celles de $p < 0,05$ sont considérées comme significative et celles de $p < 0,01$ sont considérées comme hautement significative.

- La concentration donnant 50% d'effet réducteur de DPPH• initial notée CI_{50} est définie comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer de 50% la concentration du DPPH• initiale. Elle est déterminée par régression linéaire. L'activité antioxydante exprimée en taux d'inhibition du DPPH•, est donnée par la formule suivante [29-31] :

$$\% \text{Inhibition} = \left[\frac{(A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}})}{A_{\text{blanc}}} \right] \times 100$$

avec :

A_{blanc} : Absorbance du blanc (matrice sans l'analyte)

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance de l'échantillon.

I.1. Méthode chimique

La partie chimique comprend l'extraction des HE par hydrodistillation sur un appareil de type Clevenger, et l'identification de la composition chimique des HE par un chromatographe en phase gazeuse équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (CPG/DIF).

I.1.1. Extraction des huiles essentielles

Elle est effectuée à l'aide d'un distillateur de laboratoire (figure 7).

L'appareillage comporte les éléments suivants :

- un autocuiseur modifié,
- un essencier,
- un réfrigérant ascendant pour la condensation de la vapeur contenant le mélange HE-Eau.



Figure 7 : Autocuiseur transformé en extracteur de HE type Clevenger
(Crédit photo : RABAOVONISON Yvon Martial, prise le 10 mai 2013 au laboratoire de contrôle qualité des phytomédicaments, IMRA)

Les autres matériels et appareils utilisés pour l'extraction des HE sont :

- Tubes à essai,
- Flacons teintés et hermétiquement fermés,
- Balance de précision,
- Balance de précision METTLER® PE163,
- Centrifugeuse Sigma 302-K.

L'extraction de toutes les HE, objet de cette étude, est faite par hydrodistillation à l'échelle de laboratoire [32, 33]. C'est une méthode d'extraction dont le rôle est d'entraîner les composés volatiles des produits naturels avec la vapeur d'eau. Après pesage des matériels végétaux, on porte à ébullition un mélange eau dans laquelle est plongé le matériel végétal durant trois heures [34, 35] ; les cellules du végétal éclatent et libèrent alors les espèces chimiques odorantes qui sont entraînées par la vapeur d'eau, puis récupérées dans un autre récipient après condensation. L'hydrodistillat obtenu est constitué de deux phases non miscibles, une phase inférieure aqueuse et une phase supérieure organique constituée par la HE. La HE récupérée est ensuite stockée à 4°C dans des vials de couleur brune hermétiquement fermés à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation, ceci afin d'éviter toutes réactions susceptibles de modifier la composition de l'extrait [36, 37]

I.1.2. Identification de la composition chimique des HE sur CPG/DIF

Chromatographe en Phase Gazeuse équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (CPG/DIF)

De manière simplifiée, un appareil CPG/DIF comprend une source de gaz vecteur, une chambre d'injection, un four dans lequel sont placés une colonne capillaire, un détecteur DIF et un système d'acquisition des données.

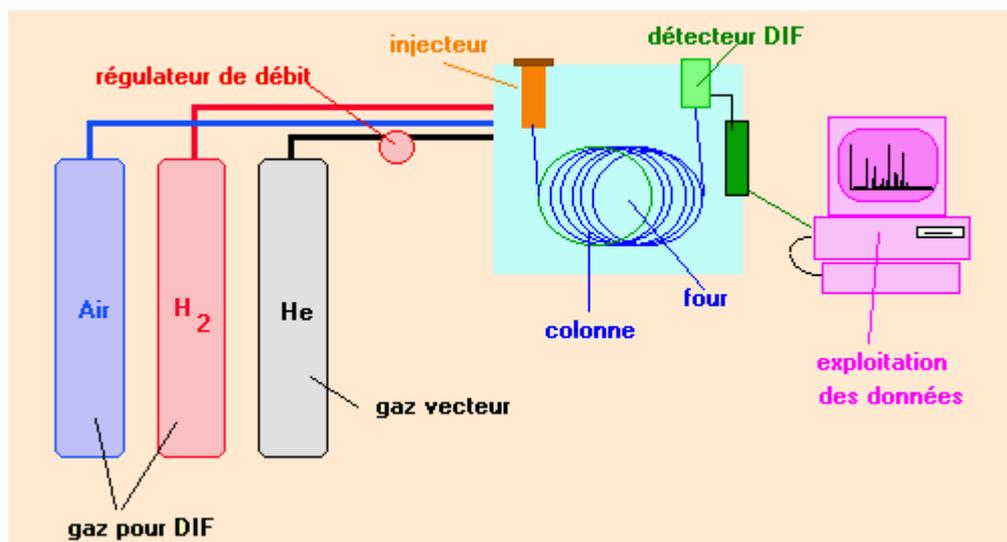


Figure 8 : schéma général d'un chromatographe en phase gazeuse (CPG) couplé à un détecteur à ionisation de flamme (DIF)

http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosart/imgArt/chromato/chromato_gaz1.html consulté le 20 mars 2013

Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée d'une colonne, qui renferme une substance active solide ou liquide appelée phase stationnaire ; ce mélange est transporté à travers la phase stationnaire à l'aide d'un gaz porteur (ou gaz vecteur). Les différentes molécules du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres selon leur temps de rétention. Le principe de la séparation repose sur la différence d'affinité des composés pour la phase mobile et pour la phase stationnaire. Un composé qui a plus d'affinité pour la phase mobile, aura moins d'interaction avec la phase stationnaire et sera ainsi élué plus rapidement. À l'inverse, un composé ayant plus d'affinité pour la phase stationnaire sera retenu par celle-ci et mettra beaucoup plus de temps avant de sortir de la colonne. Chaque composé sorti est analysé par un détecteur. Ce détecteur évalue en continu la quantité de chacun des constituants séparés au sein du gaz porteur grâce à la mesure de différentes propriétés physiques du mélange gazeux et envoie un signal électronique vers un enregistreur.

Les analyses des échantillons des HE dans notre étude sont effectuées au moyen d'un CPG (GC TRACE 1300) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (DIF) lui-même équipé d'un injecteur automatique AI 1310. L'appareil est piloté par le logiciel Chrom-Card.

La séparation des constituants est effectuée sur une colonne capillaire Rtx-WAX, en silice fondue, contenant une phase stationnaire en polyéthylène glycol. Le gaz vecteur utilisé est l'hydrogène. Un volume de 1µl de HE à 1% diluée dans l'hexane (PROLABO lot : 11Z3009) est injecté pour l'identification [38].

La CPG/DIF est une méthode chromatographique qui permet de séparer des molécules dans un mélange très complexe comme HE ; la CPG s'applique principalement aux analyses des composés volatiles. La nécessité de maintenir les molécules à l'état gazeux implique donc que toute l'opération chromatographique se réalise à une température compatible avec cet état sans provoquer leur destruction [39].

Le laboratoire LCQSP de l'IMRA utilise les Esters Méthyliques d'Acide Gras (EMAG) constitués de C5 à C25 à la place des alcanes linéaires comme produits de références pour calculer les indices de rétention (IR) [40] ; L'IMRA a constitué une banque de données à partir des différentes analyses de HE et témoins effectués par son laboratoire depuis sa création, les études de reproductibilités qu'il a effectuées ont permis de montrer que ces indices d'EMAG notés $I(x)$ ne présentent aucune variation significative par rapport aux divers facteurs [26].

Conditions opératoires de l'analyse sur CPG :

- le gaz vecteur est sous une pression constante de 33 Kpa (ou 0,33 bar) en tête de la colonne,
- la colonne utilisée a une longueur de 30 m, un diamètre interne de 0,32 mm, et l'épaisseur du film est de 0,25 µm,
- la température du four est un gradient allant de 50°C à 250°C à raison de 5°C/min,
- les détecteur et injecteur sont maintenus à 255°C,
- le volume d'injection est fixé à 1µl, en mode split 1/75.

Les différentes étapes de l'identification des composants consistent successivement à :

- injecter les esters méthyliques d'acide gras (C₅ à C₂₅)
- injecter 1µl d'échantillon à analyser
- calculer l'indice d'ester $I(x)$ de chaque pic détecté sur le chromatogramme selon la formule décrite par Tilquin [26]

- comparer la valeur des I(x) calculés pour chaque pic à celle de la banque de composés témoins constituée par le laboratoire, analysés dans les mêmes conditions opératoires.
- attribuer le nom de chaque composé

I.2. Méthode biologique

L'étude des activités biologiques des HE de *E. globulus* et de *E. cinerea* au stade juvénile et au stade adulte dans ce travail comprend l'étude de l'activité vasorelaxante et celle de l'activité anti-radicalaire.

I.2.1. Etude de l'activité vasorelaxante

Animaux d'expériences

Un test randomisé est effectué sur des rats de souche WISTAR âgés de 6 mois, sans distinction de sexe, pesant entre 250 à 300g. Les rats sont élevés, nourris et conditionnés à l'animalerie de l'IMRA, leur état de santé est conforme aux constantes biologiques concernant les animaux de laboratoire [41-44].

Les appareils et matériels utilisés pour l'étude de l'activité vasorelaxante sont :

- Tubes à essai,
- Bechers,
- Micropipettes
- Balance de précision METTLER® PE163,
- Appareil à organes isolés (capteurs de tension AIRPAX®, enregistreur de tension de marque BUXCO®),
- Agitateur vortex EDMUND BEHLER,
- Agitateur magnétique.

Les produits témoins et solvant sont :

- Phényléphrine ,
- Acétylcholine ,
- Tween 20.

Dans cette étude, l'activité vasorelaxante des quatre HE notées EC juv, EC adt, EG juv, et EG adt, et du produit majoritaire dans les HE étudiées identifié comme le 1,8-cinéole

noté CT a été étudiée et comparée. Les HE et le CT sont dissous dans du tween 20 puis dans de l'eau distillée à la proportion finale de 10/90 (v/v). Ensuite les échantillons sont agités afin d'obtenir des solutions homogènes.

Le rat adulte est sacrifié. L'aorte thoracique est prélevée, nettoyée délicatement puis coupée transversalement en plusieurs anneaux de 3 à 4 mm de longueur [27,42-44].

Les anneaux ainsi préparés sont montés dans des cuves à organe isolé de 20 ml remplies de liquide physiologique de Krebs Henseleit maintenue à une température de 37°C et aérée avec du carbogène (O₂ à 95% et CO₂ à 5%) permettant l'obtention d'un pH égal à 7,4 [41-44, 28]. Dans la cuve, les anneaux sont suspendus à des tiges métalliques reliées à des capteurs de tension AIRPAX[®] eux-mêmes reliés à un enregistreur de tension de marque BUXCO[®]. La solution de Krebs Henseleit est constituée (en mM/l) par du KCl (4,75), du NaCl (118,5), du NaHCO₃ (25), du glucose (11,1), du MgSO₄ (1,2), du KH₂PO₄ (1,2), et du CaCl₂ (1,36).

Chaque anneau d'aorte monté dans la cuve à organe isolé est tendu à une tension isométrique de 2 g [27], puis laissé se stabiliser pendant deux heures durant lesquelles la solution de Krebs Henseleit est renouvelée toutes les 30 min.

Passée cette période d'équilibration, chaque anneau est ensuite sensibilisé par l'injection de phényléphrine à 10⁻⁵M dans la cuve. Au plateau de contraction, la présence d'endothélium fonctionnel sur les aortes est mise en évidence par l'effet relaxant provoqué par l'injection de l'acétylcholine à 10⁻⁶ M dans la cuve [41-43, 28].

Ensuite, les anneaux sont rincés immédiatement toutes les 10 min pendant 30 min et laissés au repos durant 30 min.

Après la phase d'équilibration de 30 min, tous les anneaux d'aorte sont précontractés par l'injection de la phényléphrine à 10⁻⁶ M. Puis au plateau de contraction, les préparations de HE (EC juv, EC adt, EG juv, EG adt), le 1,8 cinéole (CT) et le Tween 20 à 10% sont injectées dans la cuve aux concentrations croissantes et cumulatives allant de 0,25 mg/ml à 1mg/ml. Le pourcentage de relaxation respectivement induite par les différentes concentrations des préparations de HE est calculé en prenant comme 100 % de contraction, la contraction provoquée par la phényléphrine à 10⁻⁶ M. La valeur de CE₅₀ calculée pour chaque préparation de HE se déduit par régression linéaire en considérant les concentrations de HE dans la cuve et le pourcentage de relaxation obtenu.

I.2.2. Etude de l'activité anti-radicalaire :

Les matériels utilisés pour cette étude sont :

- Balance de précision METTLER® PE163,
- Spectrophotomètre Awareness technology INC,
- Microplaques 96 puits,
- Agitateur vortex EDMUND BEHLER,
- Flacons en verre,
- Micropipettes,
- Bain ultra-son de marque GEN-PROBE,
- Verreries (Béchers ; Tubes à essai ; pipettes),
- Spatule en acier inoxydable.

Les réactifs et produits de référence utilisés sont :

- Acide gallique SIGMA lot N°046K0131,
- Méthanol pour analyse,
- 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) Sigma Aldrich

Dans cette étude, l'activité anti-radicalaire des quatre HE et l'acide gallique pris comme témoin positif a été étudiée et comparée. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour évaluer l'activité anti-radicalaire d'un mélange. La plus utilisée est le piégeage du radical stable DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) selon la méthode décrite par Blois avec quelques modifications [45]. Le principe de la réaction est colorimétrique. En effet, le radical stable DPPH• (violet) se lie à un radical libre d'hydrogène et se présente sous sa forme réduite DPPH-H (jaune). Les antioxydants peuvent réduire les radicaux primaires par deux mécanismes : par transfert d'électron singulet ou par transfert d'atome d'hydrogène. Au contact d'une entité donneur d'électron ou de proton, le DPPH réduit se décolore en jaune ; cette décoloration sera proportionnelle à la réduction relative du radical DPPH•.

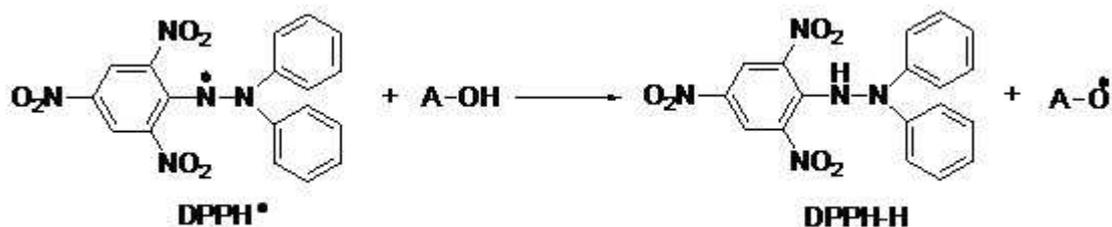
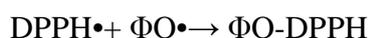
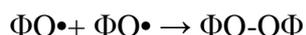
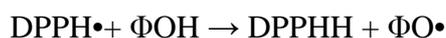


Figure 9 : Réaction de réduction de DPPH•

Source : Giweli A. Dzamic A. Sokovic M. Ristic M. Marin P. Antimicrobial and Antioxydant Activities of Essential Oils of *Satureja thymbra* Growing Wild in Lybia. *Molecules*, 2012; 17(5): 4836-50 [46].

Plusieurs voies réactionnelles sont alors possibles qui forment des structures plus ou moins stables :



L'activité antioxydante *in vitro* est évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH•, où 50 µL de chacune des solutions méthanoliques des HE testées à différentes concentrations (20 mg/ml, 40 mg/ml, 60 mg/ml, 80 mg/ml) sont mélangées avec 5 ml d'une solution méthanolique de DPPH• (0,032 %). Après une période d'incubation de 30 min à la température de la salle, l'absorbance est lue à 517 nm.

Des solutions du DPPH• à différentes concentrations sont préparées pour vérifier la stabilité et la proportionnalité entre la concentration en DPPH• et l'absorbance respective de chaque solution ; cette vérification consiste à faire une lecture de l'absorbance à T₀ (immédiatement après la préparation) et à T₃₀ (après 30 min).

Pour chaque concentration de préparation de HE testée et du témoin positif, le pouvoir anti-radicalaire est exprimé en pourcentage d'inhibition (%_{inhibition}). La CI₅₀ est calculée par régression linéaire en considérant les concentrations testées et le pourcentage d'inhibition respectif. Tous les essais sont effectués en triplicat [47].