



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET

APPLIQUEE



MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES DE
BIOCHIMIE

Option : BIOCHIMIE APPLIQUEE AUX SCIENCES MEDICALES

Présenté par :

ANDRIAMIARINJO NOMENANTENAINA FARATIANA

Maître es Sciences

*Purification et caractérisation partielles des principes toxiques
des graines d'**Albizia aurisparsa** une Fabacée endémique de
Madagascar*

Soutenu publiquement le 05 Septembre 2014

Devant la commission d'examen composée de :

Président : Professeur JEANNODA Victor

Rapporteur : Docteur RANDRIANARIVO H. Ranjàna

Examineurs : Professeur RAKOTO-RANOROMALALA Danielle A. Doll

Docteur RAZAFINDRAZAKA Vonimanitra

<i>b) Déroulement de la dialyse</i>	16
II.2.2.4 Chromatographie sur gel Sephadex G25	16
II.2.2.4.1 Principe	16
II.2.2.4.2 Mode opératoire	17
II.2.3 Méthode de concentration	17
II.2.4 Calcul de rendement	17
II.2.5 Méthodes d'analyse	17
II.2.5.1 Chromatographie sur couche mince	17
II.2.5.1.1 Principe	17
II.2.5.1.2 Mode opératoire	18
<i>a) Dépôt des extraits</i>	18
<i>b) Développement de la plaque</i>	18
<i>c) Révélation du chromatogramme</i>	18
II.2.5.2 Criblage phytochimique	19
II.2.5.2.1 Préparation des extraits	19
<i>a) Extrait hydroéthanolique</i>	19
<i>b) Extrait acide</i>	19
<i>c) Extrait chloroformique</i>	19
<i>d) Extrait aqueux</i>	19
II.2.5.2.2 Tests de détection des familles chimiques	20
<i>a) Alcaloïdes</i>	20
<i>b) Flavonoïdes et leucoanthocyanes</i>	21
<i>c) Stéroïdes, triterpènes et stérols insaturés</i>	22
<i>d) Saponosides</i>	22
<i>e) Tanins et polyphénols</i>	22
<i>f) Désoxyoses</i>	23
<i>g) Iridoïdes</i>	23
<i>h) Quinones</i>	23
 III-RESULTATS	 24
III.1 EXTRACTION	24
III.1.1 Extraction aqueuse à froid	24
III.1.2 Extraction par épuisements successifs	24

III.2 PURIFICATION	25
III.2.1 Fractionnement avec l'acétate d'éthyle	26
III.2.2 Fractionnement avec le n-butanol	26
III.2.3 Dialyse	26
III.2.4 Chromatographie sur gel Sephadex	26
III.3 RENDEMENT	27
III.4 DEGRE D'HOMOGENEITE	28
III.5 CARACTERISATION CHIMIQUE	30
III.5.1 Propriétés physico-chimiques	30
III.5.2 Criblage phytochimique	30
IV-DISCUSSION	32
<u>Deuxième partie</u> : Etude toxicologique	34
I-INTRODUCTION	34
II-MATERIELS ET METHODES	34
II.1 MATERIELS	34
II.1.1 Les animaux d'expérimentation	34
II.1.1.1 Les animaux à sang chaud : les souris	34
II.1.1.2 Les animaux à sang froid	34
a) <i>Les alevins de poisson</i>	34
b) <i>Les têtards de grenouille</i>	35
c) <i>Les larves de moustique</i>	35
II.1.2 Les végétaux d'expérimentation	35
II.1.3 Les matériels utilisés pour la microbiologie	36
II.1.3.1 Les microorganismes	36
II.1.3.2 Les milieux de culture	37
II.1.3.3 Les disques pour les tests d'antibiogramme	37
II.2 METHODES	37
II.2.1 Méthode d'étude des effets sur les animaux	37
II.2.1.1 Estimation de la toxicité sur souris	37
II.2.1.2 Détermination de la DL ₅₀ (24h) sur souris	37
1) <i>Méthode de REED et MUENCH</i>	37
2) <i>Méthode de BOYD</i>	38

II.2.1.3 Méthodes d'étude des effets sur les animaux à sang froid	38
II.2.1.3.1 Principe	38
II.2.1.3.2 Mode opératoire	38
a) Test sur les alevins de poisson	38
b) Test sur les têtards de grenouille	38
c) Test sur les larves de moustique	39
II.2.2 Méthodes d'étude des effets sur les végétaux	39
II.2.2.1 Etude des effets sur le pouvoir germinatif des graines	39
II.2.2.2 Etude des effets sur les bourgeons axillaires	39
II.2.3 Méthode d'étude des effets sur les microorganismes	40
II.2.3.1 Stérilisation	40
II.2.3.2 Préculture	40
II.2.3.2.1 Principe	40
II.2.3.2.2 Test proprement dit	40
II.2.3.3 Détermination de la CMI	41
II.2.3.4 Détermination de la CMB	42
III-RESULTATS	43
III.1 EFFETS SUR LES ANIMAUX	43
III.1.1 Effets sur les souris	43
III.1.1.1 Description des symptômes d'intoxication	43
III.1.1.2 Détermination de la DL ₅₀ (24h)	43
III.1.2 Effets sur les animaux à sang froid	45
III.1.2.1 Effets sur les alevins de poisson	45
III.1.2.2 Effets sur les têtards de grenouille	45
III.1.2.3 Effets sur les larves de moustique	46
III.2 EFFETS SUR LES VEGETAUX	46
III.2.1 Effets sur le pouvoir germinatif	46
III.2.2 Effets sur le développement des bourgeons axillaires	47
III.3 EFFETS SUR LES MICROORGANISMES	47
III.3.1 Test d'antibiogramme	47
III.3.2 Détermination de la CMI	49

III.3.3 Détermination de la CMB	50
IV-DISCUSSION	51
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	55
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	56
ANNEXES	

Ce mémoire est dédié :

A Mon Père céleste qui a usé de sa patience et de sa bonté envers moi et qui m'a donné le courage et la persévérance pour terminer ce travail ;

A Mon Grand Ami Jésus-Christ qui m'a sauvé de la mort éternelle ;

A mes parents, que cet ouvrage soit le témoignage de ma reconnaissance pour votre affection et votre appui, je vous aime profondément ;

A mes sœurs, pour votre affection et votre compréhension ;

A toute ma famille de la ligue pour la lecture de la Bible, pour vos prières et votre soutien ;

A tous mes amis et collègues du laboratoire, ceci est le témoignage de vos conseils et votre aide ;

A mes cousins et cousines, que cet ouvrage vous donne le courage pour vos études ;

A tous ceux qui me sont chers.

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été réalisé au sein des laboratoires LABASM (Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales) et LM (Laboratoire de Microbiologie) du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée de la Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.

Ce travail ne serait jamais parvenu à terme sans l'appui et les conseils de nombreuses personnes.

Nous exprimons nos chaleureux remerciements à Monsieur le Professeur JEANNODA Victor, Responsable de la formation en 3^{ème} cycle, pour avoir accepté de présider ce mémoire. Nous tenons à le remercier pour ses conseils, son aide et son soutien, malgré ses lourdes et multiples responsabilités.

Nous adressons notre profonde gratitude à Madame le Professeur Danielle A. Doll RAKOTO-RANOROMALALA, pour ses conseils et suggestions, ainsi que son apport précieux dans la réalisation du manuscrit, malgré ses nombreux engagements. Nous tenons aussi à la remercier d'avoir bien voulu accepter de siéger parmi les examinateurs.

Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à Mr le Docteur Ranjana RANDRIANARIVO qui n'a pas ménagé son temps et ses conseils lors du stage et qui a bien voulu être le rapporteur de ce mémoire.

Nous remercions vivement Madame le Docteur RAZAFINDRAZAKA Vonimanitra pour nous avoir fait l'honneur de juger ce travail, malgré ses nombreuses occupations.

Nous remercions le Docteur RAMAMONJISOA Lolona, directeur du Silo National des Graines Forestières (SNGF) de nous avoir fourni les graines.

Nos plus vifs remerciements s'adressent également à M. Lovarintsoa J. RANDRIAMAMPIANINA, Mlle Anjarasoava Ravo RAZAFINDRAKOTO et Mme Holy Christiane RATSIMANOHATRA pour leur aide, leurs conseils et leur amitié, merci infiniment.

Enfin, nos remerciements s'adressent à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

« Je ne pourrai jamais assez vous remercier, que Dieu abonde Sa grâce envers vous ».

GLOSSAIRE

Analgésique ou antalgique : substance qui supprime ou atténue la douleur

Anthelminthique : qualifie le moyen qui permet à l'organisme humain ou animal de se débarrasser des vers intestinaux dits helminthes ou entozoaires

Antiplasmodial : substance ayant un effet capable d'inhiber la croissance ou la pathogénicité du plasmodium

Bactéricide : capable de tuer les bactéries.

Bactériostatique : capable d'inhiber la croissance bactérienne

Cholinergique : élément (neurone, récepteur d'un neurone) qui agit au niveau du système nerveux ou des muscles grâce à l'acétylcholine

Contorsion : torsion violente et anormale des muscles, des membres

Conjonctivite : inflammation de la membrane de l'œil

Décoction : cuisson dans l'eau bouillante

Emétique : capable de provoquer un vomissement

Endocardite: inflammation de l'endocarde

Entérocolite : inflammation qui touche à la fois l'intestin grêle et le côlon

Exophtalmie : une extrusion de l'œil hors de l'orbite

Hyperhémie Accumulation de sang dans les vaisseaux d'un organe qui se manifeste par une coloration rouge.

Méningite : inflammation des membranes qui enveloppent le système nerveux central

Onchocercose : maladie des yeux provoqués par un parasite nommé *Onchocerca volvulus*

Pubescence : caractéristique morphologique d'un organe recouvert de poils fins

Ulcère : désintégration de tissu

ABREVIATIONS

CCM : Chromatographie sur couche mince

CL₅₀ : Concentration létale 50%

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

Da : dalton

DBFA : Département de Biochimie fondamentale et appliquée

DL₅₀ : Dose létale 50%

EB : Extrait brut

E₂ : Extrait purifié

HCl : Acide chlorhydrique

H₂SO₄ : Acide sulfurique

ip : intrapéritonéale

LABASM : Laboratoire de Biochimie appliquée aux Sciences médicales

min : minute

NaCl : Chlorure de sodium

OMS : Organisation mondiale de la santé

p/p/p : poids par poids par poids

p/v : poids par volume

v/v : volume par volume

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : <i>Albizia aurisparsa</i> a) Rameau feuillu b) Graines	12
Figure 2 : Répartition géographique d' <i>Albizia aurisparsa</i>	13
Figure 3 : Chromatogramme des fractions obtenues lors de la chromatographie sur Sephadex G25	27
Figure 4 : Schéma récapitulatif des différentes étapes d'extraction et de purification à partir de la poudre de graines d' <i>Albizia aurisparsa</i>	28
Figure 5 : Chromatogramme récapitulatif des étapes d'extraction et de purification	29
Figure 6 : Détermination de la DL ₅₀ (24h) par la méthode graphique des totaux cumulatifs	45
Figure 7 : Effets des 3 extraits sur <i>Bacillus cereus</i> et <i>Escherichia coli</i>	48
Figure 8 : Effets de l'extrait hexanique sur <i>Escherichia coli</i>	49

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des <i>Albizia</i> étudiées au LABASM	2
Tableau 2 : Nature chimique des principes toxiques des <i>Albizia</i> étudiées au LABASM	7
Tableau 3 : Effets de différents extraits d' <i>Albizia</i> étudiées au LABASM sur les animaux	8
Tableau 4 : Effets des extraits issus des <i>Albizia</i> étudiées au LABASM sur les végétaux	8
Tableau 5 : Activité antimicrobienne de quelques espèces d' <i>Albizia</i> étudiées au LABASM	9
Tableau 6 : Caractéristiques des extraits bruts obtenus par les différentes méthodes d'extraction	25
Tableau 7 : Résultats du criblage phytochimique effectué sur la poudre végétale, EB et E ₂	31
Tableau 8 : Graines utilisées pour les tests sur les végétaux	35
Tableau 9 : Germes utilisés pour les tests antimicrobiens	36
Tableau 10 : Normes utilisées pour l'expression des résultats	41
Tableau 11 : Composition des tubes utilisés pour la détermination de la CMI	42
Tableau 12 : Résultats expérimentaux de la détermination de la DL ₅₀ (24h) de l'extrait purifié E ₂ chez la souris	44
Tableau 13 : Données utilisées pour la détermination de la DL ₅₀ (24h) de l'extrait purifié E ₂ par la méthode graphique des totaux cumulatifs	44
Tableau 14 : Effet de l'extrait EB à 1mg/ml sur la germination des différentes graines	46
Tableau 15 : Longueur des bourgeons axillaires (en mm) des plantules non traitées et traitées avec l'extrait brut, l'extrait purifié, l'auxine et la gibbérelline	47
Tableau 16 : Sensibilité des souches bactériennes aux différents extraits	48
Tableau 17 : Détermination de la CMI de E ₂ en milieu liquide sur <i>Escherichia coli</i> et <i>Bacillus cereus</i>	50
Tableau 18 : Comparaison de la DL ₅₀ (24h) de E ₂ avec celle des autres <i>Albizia</i>	51
Tableau 19 : CL ₅₀ (24h) en µg/ml sur les têtards de grenouille et les alevins de carpe des autres <i>Albizia</i>	52
Tableau 20 : Effets des extraits des plantes toxiques sur les larves de moustique	53



Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

De nombreux organismes animaux, végétaux et microbiens renferment des substances appelées toxines capables de provoquer un trouble physiologique ou d'entraîner la mort.

Depuis les temps les plus anciens, malgré les dangers que peuvent représenter ces substances pour l'homme, celui-ci a toujours su les utiliser à son profit. D'une part, elles sont utilisées pour la chasse, la pêche, la lutte contre les animaux nuisibles ou la justice populaire, d'autre part elles peuvent être destinées à des fins thérapeutiques. A titre d'illustration, nous pouvons citer :

- ✓ Les extraits de *Cadia rubra* Viguier (Famamobe) utilisés pour la chasse et la pêche (RASOANAIVO et coll., 1993) ;
- ✓ Les extraits de *Rhodocodon madagascariensis* (Famonontotozy) servant à tuer les rats (RAKOTO-RATSIMAMANGA, 1998) ;
- ✓ La morphine, extraite de *Papaver somniferum* utilisée contre la douleur (BRUNETON, 1993) ;
- ✓ la cobrotoxine du serpent *Naja naja*, ayant une activité analgésique puissante identique à celle de la morphine, utilisée dans le traitement du cancer au stade terminal (ROCHAT et coll., 1976).

Par ailleurs, les toxines constituent des outils efficaces qui ont été utilisés pour comprendre des phénomènes biologiques importants tels que le transport membranaire et diverses voies métaboliques. Ainsi, la toxine diphtérique provenant de la bactérie *Corynebacterium diphtheriae*, a contribué à élucider la voie de biosynthèse des protéines et son mécanisme de régulation (COLLIER, 1977). La roténone isolée de plusieurs Papilionacées a permis de comprendre la structure et le fonctionnement de la chaîne respiratoire (MORELAND, 1980).

Compte tenu du fait que plusieurs espèces de la flore malgache sont toxiques et que la plupart d'entre elles n'ont pas encore été étudiées, l'unité de recherche de Toxicologie du Laboratoire de la Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales (LABASM) du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée (DBFA) de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo s'est intéressée particulièrement à l'étude chimique et toxicologique des plantes toxiques. Bon nombre de plantes ont déjà été étudiées au LABASM. On peut citer :

- ✓ *Xerosicyos danguyi*, CUCURBITACEAE (RAKOTONDRAZANAKA, 1999) ;
- ✓ *Olox lanceata*, OLACACEAE, (RAHELINIAINAMANDIMBY, 2003) ;
- ✓ *Uapaca thouarsii*, EUPHORBIACEAE (RANDRIANANDRASANA, 2004)

- ✓ *Rhodocodon madagascariensis*, LILIACEAE (SOIFOINI, 2006) ;
- ✓ *Xylopia humblotiana*, ANNONACEAE (RASOLONDRAIBE, 2007) ;
- ✓ *Anacardium occidentale*, ANACARDIACEAE (ABOUBACAR, 2007) ;
- ✓ *Chassaliana bojeriana*, RUBIACEAE (RANDRIAMAMPIANINA, 2008) ;
- ✓ *Dialium unifoliatum*, FABACEAE (RANDRIAMBELOSON, 2013).

L'étude des principes actifs provenant des représentants du genre *Albizia*, des FABACEAE douées d'activité toxique et de propriétés biologiques intéressantes, constitue un des axes de recherche du LABASM. Les principes actifs sont principalement des saponines ou des alcaloïdes. Ils sont toxiques sur des animaux à sang froid et à sang chaud et inhibent la germination de graines de plantes Monocotylédones et Dicotylédones ainsi que la croissance de leurs jeunes plantules. Ils ont aussi une activité antimicrobienne (voir Synthèse bibliographique). La liste des *Albizia* ayant déjà fait l'objet d'études au LABASM est donnée dans le tableau 1 ci-après :

Tableau 1 : Liste des *Albizia* étudiées au LABASM

Espèce	Organe utilisé	Référence
<i>Albizia lebeck</i>	Graines	ANDRIANTSOA (1983)
<i>Albizia arenicola</i>	Graines (amande)	RANDRIANARIVO (1996)
<i>Albizia arenicola</i>	Graines	RANDRIANARIVO (2003)
<i>Albizia arenicola</i>	Téguments	MOUNIDATI (2009)
<i>Albizia arenicola</i>	Feuilles	RAKOTOMALALA (2012)
<i>Albizia polyphylla</i>	Graines	RAJEMIARIMOELISOA (1996)
<i>Albizia polyphylla</i>	Feuilles	RAKOTONDRAISOA (2000)
<i>Albizia sp.</i>	Graines	RAMAMONJISOA (1998)
<i>Albizia boivini</i>	Graines	RAHERINIAINA (1998)
<i>Albizia bernieri</i>	Graines	RAHARISOA (1999)
<i>Albizia odorata</i>	Graines	RAJEMIARIMOELISOA (2000)
<i>Albizia boivini</i>	Cosses	ARISOA (2001)
<i>Albizia tulearensis</i>	Graines	RAONIHARISOA (2003)
<i>Albizia boinensis</i>	Feuilles	AHMED (2009)
<i>Albizia mahalao</i>	Graines	RAKOTOARIVONY (2012)
<i>Albizia greveana</i>	Graines	RAHELIARISATA (2014)

Dans notre cas, l'étude a porté sur les principes toxiques des graines d'*Albizia aurisparsa*. En effet :

- aucune étude n'a encore été réalisée sur cette plante en dehors de la description botanique (CAPURON, 1971 ; DU PUY et coll., 2002) ;
- l'espèce est endémique de Madagascar et présente une grande disponibilité à l'ouest de la Grande île.

Le but de notre travail est de préparer des extraits suffisamment purifiés et de caractériser les principes toxiques sur les plans chimique et biologique.

Nous présenterons notre travail en deux parties :

- La première sera consacrée à la purification et la caractérisation des principes toxiques ;
- la deuxième traitera l'étude des activités toxicologiques des principes actifs.

Synthèse bibliographique

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE SUR *ALBIZIA*

Albizia est un genre botanique de la famille des FABACEAE représenté par environ 150 espèces réparties dans les régions tropicales d'Asie, d'Afrique, de Madagascar, d'Amérique Centrale et du Sud et de l'Australie. Ce sont des petits arbres et arbustes de 6 à 12 m de haut et de 5 à 8 m de large.

Les *Albizia* sont souvent utilisées comme bois de construction et de chauffe, mais grâce à leurs propriétés pharmacologiques intéressantes, elles connaissent surtout des usages thérapeutiques.

Une synthèse des travaux effectués sur les *Albizia* étrangères et malgaches est présentée dans le présent chapitre.

Les Albizia étrangères

Usages traditionnels :

Plusieurs espèces d'*Albizia* sont utilisées dans la médecine traditionnelle. Nous pouvons citer :

- ✓ *Albizia julibrissin* dont l'écorce est utilisée en Chine contre les ulcères, les abcès et les hémorroïdes (HIGUCHI et coll., 1992) ;
- ✓ *Albizia odoratissima* utilisée en Inde pour le traitement de la lèpre et des ulcères (ZOU, 2000) ;
- ✓ *Albizia adianthifolia* dont la sève de l'écorce est appliquée sur les yeux pour traiter l'onchocercose et la conjonctivite (LEMMENS, 2007) ; ses feuilles sont employées au nord du Nigeria contre la diarrhée et la blennorragie (BURKILL, 1995) ;
- ✓ *Albizia lebeck* dont les écorces sont utilisées en infusion pour le traitement de pathologies inflammatoires comme l'asthme et les allergies (BABU et coll., 2009) et pour le traitement des maladies de la peau en Afrique du sud (SUJATHA et coll., 2013) ;
- ✓ *Albizia zygia* qui sert à traiter la malaria (ABDALLA et HARTMUT, 2012) ;
- ✓ *Albizia amara* qui est employé dans le traitement d'ulcères (RAJKUMAR et SINHA, 2010) ;
- ✓ *Albizia grandibracteata* dont les écorces sont utilisées contre le diabète en République Démocratique du Congo (MANGAMBU et coll., 2014).

Les principaux principes actifs :

Plusieurs composés ont pu être isolés des différentes espèces d'*Albizia*. Quelques-uns d'entre eux sont présentés ci-dessous selon leur nature chimique.

Saponines

- ✓ Albiziasaponines A, B, et C isolées de l'écorce d'*Albizia lebeck* (PAL et coll., 1995) ;
- ✓ Saponines triterpéniques isolées d'*Albizia gummifera* (DEBELLA et coll., 2000) ;
- ✓ Albiziatrioside A et B isolés d'*Albizia subdimidiata* (KADER et coll., 2001) ;
- ✓ Saponines triterpéniques de type julibroside isolées d'*Albizia julibrissin* (ZHENG et coll., 2006) ;
- ✓ Albiziosides A, B, et C saponines isolées d'*Albizia chinensis* (LIU et coll., 2009) ;
- ✓ Saponines triterpéniques de type oléanane isolées d'*Albizia inundata* (ZHANG et coll., 2011) ;
- ✓ Albiziasaponines A à E isolées de la tige d'*Albizia myriophylla* et Albiziasaponine A isolée d'*Albizia mollis* (SUJATHA et coll., 2013 ; CHENG et coll., 2011)

Alcaloïdes

- Alcaloïdes de type spermine : budmunchiamines L1 à L6 isolés des graines d'*Albizia lebeck* (DIXIT et MISRA, 1997) ;
- La spermine isolée d'*Albizia inopinata* (ASSIS et coll., 1999) ;
- Budmunchiamines L4 et L5 isolées d'*Albizia adinocephala* (OVENDEN et coll., 2002) ;
- Albizzine A isolée d'*Albizia myriophylla* (ITO et coll., 1994).

Glycosides

- ❖ Glycosides anthraquinones isolés d'*Albizia lebeck* (GANGULI et BHATT, 1993);
- ❖ Grandibractéosides A, B et C isolés des feuilles d'*Albizia grandibracteata* (KRIEF, 2005) ;
- ❖ Les glycosides isolés d'*Albizia coriaria* (NOTE et coll., 2009) et d'*Albizia julibrissin* (KANG et coll., 2007).

Propriétés pharmacologiques

Des investigations approfondies ont été entreprises concernant les propriétés pharmacologiques des *Albizia* étrangères. On peut citer :

- la cytotoxicité contre les cellules squameuses de la tête et du cou humain (JMAR and MDA1986 HNSCC) et des cellules du mélanome (B16F10, SKMEL28) d'*Albizia inundata* (ZHANG et coll., 2011) ;
- l'activité anti-trypanosomiale d'*Albizia gummifera* (RUKUNGA et WATERMAN, 1996) ;
- les effets sur le système nerveux central d'*Albizia inopinata* (ASSIS et coll., 1999);
- l'activité anthelminthique d'*Albizia anthelmintica* (GALAL et coll., 1991) ;
- l'activité inhibitrice de l'enzyme plasmepsine malariale II provenant d'*Albizia adinocephala* (OVENDEN et coll., 2002) ;
- l'activité cytotoxique d'*Albizia grandibracteata* sur les lignées cellulaires tumorales KB et MCF 7 (KRIEF, 2005) ;
- l'activité anti-plasmodiale et anti-*Candida* d'*Albizia saman* et d'*Albizia inundata* (GUPTA, 2006) ;
- la toxicité d'*Albizia julibrissin*, *Albizia subdimidiata* et *Albizia procera* contre les cellules cancéreuses (ZOU et coll., 2006 ; LAU, 2007 ; MELEK et coll., 2007) ;
- l'activité antimicrobienne d'*Albizia lebbeck* (SUDHARAMESHWARI et RADHIKA, 2007), *Albizia myriophylla* (RUKAYADI et coll., 2008), *Albizia gummifera* (MBOSSO et coll., 2010) ;
- l'activité cytotoxique d'*Albizia chinensis* contre des cellules tumorales et son pouvoir hémolytique sur les érythrocytes de lapins (LIU et coll., 2009).

Les Albizia malgaches

Trente espèces d'*Albizia* dont 24 endémiques, sont présentes à Madagascar. Douze d'entre elles ont déjà fait l'objet d'études chimiques et toxicologiques au LABASM (voir introduction générale). Les résultats obtenus sont résumés ci-dessous.

Principes actifs

La nature chimique des principes toxiques varie selon l'espèce et l'organe étudié. Ils sont montrés dans le tableau 2 (p.7) suivant :

Tableau 2 : Nature chimique des principes toxiques des *Albizia* étudiées au LABASM

Espèces		Nature du ou des principe(s) actif(s)	Référence
Nom	Organe		
<i>A. arenicola</i>	graines	saponines	RANDRIANARIVO (1996)
<i>A. polyphylla</i>	graines	alcaloïde	RAJEMIARIMOELISOA (1996)
	feuilles	alcaloïde et flavonoïde	RAKOTONDRASOA (2000)
<i>A. sp</i>	graines	alcaloïde	RAMAMONJISOA (1998)
<i>A. boivini</i>	graines	saponoside	RAHERINIAINA (1998)
	cosses	stéroïde	ARISOA (2001)
<i>A. bernieri</i>	graines	saponoside	RAHARISOA (1999)
<i>A. odorata</i>	graines	saponoside	RAJEMIARIMOELISOA (2000)
<i>A. tulearensis</i>	graines	saponoside	RAONIHARISOA (2003)
<i>A. boinensis</i>	feuilles	flavonoïde	AHMED (2009)
<i>A. mahalao</i>	graines	saponosides	RAKOTOARIVONY (2012)
<i>A. greveana</i>	graines	hétérosides	RAHELIARISATA (2014)

Les effets biologiques

Les différents extraits agissent sur des organismes animaux, végétaux et microbiens.

Effets sur les animaux

Les indices de toxicité sur souris et sur des animaux à sang froid (têtards de grenouille et alevins de poisson) des espèces d'*Albizia* étudiées au LABASM sont résumés dans le tableau 3 (p. 8).

Effets sur les végétaux

L'activité des extraits d'*Albizia* a été étudiée sur la germination de différentes graines de plantes Monocotylédones et Dicotylédones et sur la croissance des bourgeons axillaires. Les résultats sont récapitulés dans le tableau 4 (p. 8).

Tableau 3 : Effets de différents extraits d'*Albizia* étudiées au LABASM sur les animaux

Espèce et organe utilisé	DL50 (24h) sur souris (mg/kg)	CL50 sur les têtards (µg/ml)	CL50 sur les alevins (µg/ml)
<i>A. greveana</i>	1,13-2,02	nd	nd
<i>A. tullearensis</i> (graines)	2,92-3,2	15,04	2,29
<i>A. sp</i> (graines entières)	8,7	nd	nd
<i>A. odorata</i> (graines)	9	16,71	5,62
<i>A. mahalao</i> (graines)	22,22-24,4	21,87	Non testé
<i>A. arenicola</i> (feuilles)	41,42-41,44	103	Non testé
<i>A. arenicola</i> (amande de graines)	3,22	2,73	3,22
<i>A. boinensis</i> (feuilles)	51,2-51,6	46,08	21,20
<i>A. bernieri</i> (graines)	53,49-55	nd	nd
<i>A. boivini</i> (cosses)	57-60	541,39	190,30
<i>A. polyphylla</i> (feuilles)	63,14-63,49	369	174

nd : non déterminé

Tableau 4 : Effets des extraits issus des *Albizia* étudiées au LABASM sur les végétaux

Espèces	Extrait utilisé	Graines inhibées	Effet sur la croissance des bourgeons axillaires
<i>Albizia polyphylla</i>	extrait brut de feuilles	riz	nd
<i>Albizia boivini</i>	extrait brut de fruits	riz et haricot	nd
<i>Albizia tullearensis</i>	extrait brut de graines	petit pois	stimulateur
<i>Albizia boinensis</i>	extrait brut de feuilles	riz et haricot	stimulateur
<i>Albizia mahalao</i>	extrait brut de graines	riz, maïs, melon et « voanjobory » (pois bambara)	inhibiteur
<i>Albizia arenicola</i>	extrait brut de tégument	oignon	inhibiteur
<i>Albizia greveana</i>	extrait brut de graines	haricot, oignon, petit-pois	stimulateur

Effets sur les microorganismes

Les extraits d'*Albizia* sont actifs sur des bactéries Gram + et Gram -. L'activité de quelques espèces est présentée dans le tableau 5.

Tableau 5 : Activité antimicrobienne de quelques espèces d'*Albizia* étudiées au LABASM

Espèces	Germes sensibles	CMI	CMB
<i>Albizia arenicola</i> (tégument)	<i>Vibrio harveyi</i>	EB : 1,87 mg/ml EP : 0,62 mg/ml	nd
<i>Albizia arenicola</i> (graine)	<i>Streptococcus β hémolytique</i>	EB :12,5 µg/ml	EB :100 µg/ml
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EB :50 µg/ml	EB :800 µg/ml
	<i>Candida albicans</i>	EB :6,25 µg/ml	EB :100 µg/ml
<i>Albizia arenicola</i> (feuille)	<i>Candida albicans</i>	EP : 15,625 mg/ml	nd
<i>Albizia mahalao</i> (graine)	<i>Escherichia coli</i>	EP : 15 mg/ml	EP : 15 mg/ml
	<i>Staphylococcus aureus</i>	EP : 3,75 mg/ml	EP : 30 mg/ml
<i>Albizia odorata</i> (graine)	<i>Staphylococcus aureus</i>	320 µg/ml	2500 µg/ml
<i>Albizia boivini</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	625 µg/ml	10000 µg/ml
	<i>Escherichia coli</i>	1250 µg/ml	20000 µg/ml
<i>Albizia bernieri</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	780 µg/ml	1500 µg/ml
	<i>Escherichia coli</i>	12500 µg/ml	12500 µg/ml
<i>Albizia sp</i>	<i>Escherichia coli</i>	2500 µg/ml	10000 µg/ml
<i>Albizia tulearensis</i> (graine)	<i>Candida sp</i>	nd	nd
	<i>Pasteurella multocida</i>		
<i>Albizia greveana</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	nd	nd

EB : extrait brut

EP : extrait purifié

nd : non déterminé

Première partie :

Etude chimique

I-INTRODUCTION

D'après les données de littérature, aucune étude chimique approfondie n'a été réalisée sur les graines d'*Albizia aurisparsa*. D'après les tests préliminaires, les extraits de ces graines présentent une activité toxique sur souris. Ce qui nous a amené à :

- mettre au point un procédé d'extraction et de purification des principes toxiques de ces graines ;
- déterminer les propriétés physico-chimiques de ces composés ;
- tenter d'élucider leur nature chimique.

II-MATERIELS ET METHODES

II.1 MATERIELS

II.1.1 Le matériel végétal

II.1.1.1 Classification de la plante

(CAPURON, 1971 ; DU PUY et coll., 2002)

La plante appartient au :

Règne : VEGETAL

Embranchement : SPERMATOPHYTES

Sous-embranchement : ANGIOSPERMES

Classe : MAGNOLIOPSIDA

Ordre : FABALES

Famille : FABACEAE

Sous-famille : MIMOSOÏDEAE

Genre : *Albizia*

Espèce : *aurisparsa*

Noms vernaculaires : Mendoravy, Sandraha, Tainakanga, Tainakanga Lahy,

Tratamborondreo

II.1.1.2 Description botanique

Les descriptions détaillées de la famille des FABACEAE et du genre *Albizia* sont données en ANNEXE I.

Description de l'espèce *Albizia aurisparsa*

Albizia aurisparsa se présente comme un arbre de 8-10 m de hauteur à port en boule. Les parties jeunes (ramules, axes foliaires, folioles surtout à la face inférieure) sont recouvertes d'une pubescence soyeuse, à reflets dorés. Les feuilles ont une ou deux paires de pennes portant chacune 3 à 5 paires de folioles. En vieillissant, la face inférieure des folioles devient blanchâtre (avec parfois des reflets dorés). Les fleurs sont sessiles ou pédicellées à calice gamosépale dentelé ou peu lobé, corolle gamopétale. L'androcée comporte 23-33 étamines, longues de 18-22 mm rosées au sommet. Le fruit, en forme de gousse très aplati, est recouvert d'une dense pubescence fauve ou fauve grisâtre entremêlée de nombreuses glandules rougeâtres. Les graines ovales ou orbiculaires ont 0,3-0,4 cm de largeur et 0,7-1,2 cm de longueur.

La plante est présentée sur la figure 1 (p. 12).

II.1.1.3 Répartition géographique de l'espèce

Albizia aurisparsa est largement répandue dans la région occidentale de l'île. La répartition géographique est montrée sur la figure 2 (p. 13).

II.1.1.4 Date et lieu de récolte

Les graines d'*Albizia aurisparsa* ont été récoltées dans la région de Menabe, dans le district de Manja en octobre 2010.

II.1.1.5 Préparation et mode de conservation du matériel végétal

Les graines sèches ont été broyées au mortier et au pilon jusqu'à l'obtention d'une poudre fine qui a été conservée dans un récipient sec, sombre et hermétiquement fermé. Cette poudre constitue le matériel d'étude.

II.1.2 Les produits chimiques

Les produits chimiques utilisés pour notre étude sont de qualité pure ou « pour analyse ». Ils sont de marque Merck ou Prolabo.

Le support utilisé pour la chromatographie sur couche mince (CCM) est le gel de silice 60 F₂₅₄ de marque Merck, étalé sur des feuilles en plastique (plaques prêtes à l'emploi de 20 x 20 cm de dimensions, couche de 0,2 mm d'épaisseur, munie d'un indicateur de fluorescence).



(a)



(b)

Figure 1 : *Albizia aurisparsa*

a) Rameau feuillu

b) Graines

http://www.mobot.org/MOBOT/Madagasc/digital/CALLMANDER_496_MC_s.jpg



 : *Albizia aurisparsa*

Figure 2 : Répartition géographique d'*Albizia aurisparsa*

II.2 METHODES

II.2.1 Méthodes d'extraction

(KAMOUN, 1991)

II.2.1.1 Extraction aqueuse à froid

La poudre végétale est délayée dans de l'eau distillée suivant le rapport 1/10 (p/v) c'est-à-dire 1 g de poudre dans 10 ml d'eau distillée. Le mélange est agité pendant 3 h à la température ambiante puis laissé macérer pendant 12 h à + 4°C.

Le macérat obtenu est filtré sur quatre épaisseurs de gaze après avoir été agité de nouveau pendant 30 min. Le filtrat est ensuite centrifugé à 10 000 trs/min pendant 15 min à l'aide d'une centrifugeuse de marque Hettich (Universal II). Deux phases sont obtenues : une phase inférieure solide, le culot, qui est éliminé et une phase supérieure liquide, le surnageant qui est récupéré puis concentré jusqu'au rapport 1/1 (p/v) (voir méthode de concentration au §II.2.3, p. 17).

II.2.1.2 Extraction par épuisements successifs

Le but de cette méthode est d'extraire au maximum les molécules présentes dans le matériel végétal en épuisant celui-ci à l'aide de solvants de polarité croissante.

Les solvants utilisés sont successivement l'hexane, l'acétate d'éthyle et le méthanol. Les caractéristiques physico-chimiques de ces solvants sont données en **ANNEXE II**.

La poudre végétale est d'abord délayée dans le solvant le moins polaire, l'hexane, suivant le rapport 1/8 (p/v). Le mélange est soumis à une agitation magnétique pendant 3 h à la température ambiante puis laissé décanter jusqu'à ce que le marc se dépose au fond. Le mélange est ensuite filtré sur papier filtre. Le filtrat est récupéré tandis que le marc est repris avec le même solvant de même volume. L'extraction est répétée jusqu'à l'épuisement de la poudre qui se traduit par l'obtention d'un filtrat incolore.

Les filtrats issus de ces opérations sont rassemblés puis évaporés sous pression réduite (voir § II.2.3, p. 17). Le marc est séché puis épuisé de nouveau de la même façon avec le solvant suivant. À la fin de l'extraction trois solutions sont obtenues : l'extrait hexanique, l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait méthanolique. Les deux premiers sont concentrés puis les résidus correspondants sont laissés à l'air libre jusqu'à la disparition complète de l'odeur de solvant. L'extrait méthanolique est évaporé à sec. Afin de déterminer les rendements d'extraction, le résidu sec de chaque extrait est pesé (voir § II.2.4, p. 17).

II.2.2 Méthodes de purification

II.2.2.1. Fractionnement par l'acétate d'éthyle

(KAMOUN, 1987)

Cette méthode permet de séparer les substances selon leur solubilité vis-à-vis de deux solvants non miscibles et de polarités différentes.

L'extrait aqueux est mélangé volume à volume à l'acétate d'éthyle dans une ampoule à décanter. Le mélange est agité énergiquement et laissé reposer jusqu'à séparation nette de deux phases: la phase supérieure organique et la phase inférieure aqueuse. La phase organique est récupérée et la phase aqueuse est traitée de nouveau avec l'acétate d'éthyle. L'opération est répétée trois fois. Les phases organiques obtenues par ces trois traitements sont rassemblées. Les deux phases obtenues (organique et aqueuse) sont évaporées jusqu'à élimination de solvant organique (voir §II.2.3, p. 17). Leur volume est ramené au volume initial de l'extrait à traiter.

II.2.2.2 Fractionnement par le n-butanol

(MAHUZIER et HAMON, 1990)

La technique est identique à celle décrite ci-dessus mais l'acétate d'éthyle est remplacé par le n-butanol.

II.2.2.3 Dialyse

(MAHUZIER et HAMON, 1990 ; KAMOUN, 1987)

II.2.2.3.1 Principe

Il s'agit d'une méthode permettant de séparer des molécules en fonction de leur poids moléculaire. Cette séparation dépend de la capacité de ces molécules à traverser les pores d'une membrane héli-perméable jouant le rôle de tamis moléculaire. Elle fait intervenir deux phénomènes :

- la diffusion : échange de solutés en fonction de leur taille. Les molécules de taille inférieure au diamètre des pores de la membrane traversent facilement celle-ci tandis que les grosses molécules ne la franchissent pas ; elle se fait de l'adialysat vers le dialysat ;
- l'osmose : mouvement d'eau qui diffuse du milieu le moins concentré vers le plus concentré.

II.2.2.3.2. Mode opératoire

a) Préparation de la membrane

La membrane de dialyse ou boudin à dialyse est constituée de cellophane de forme cylindrique dont la largeur à plat est de 33 mm. Son seuil de filtration est de 12000 à 14000 Da.

Afin de la débarrasser de la couche protectrice composée de glycérine, de métaux lourds et de composés sulfuriques, la membrane est bouillie trois fois pendant 15 min dans de l'eau distillée en renouvelant chaque fois celle-ci. Elle est ensuite conservée à + 4°C dans la dernière eau bouillie. Avant son utilisation elle est rincée de nouveau avec de l'eau distillée.

b) Déroutement de la dialyse

Le boudin à dialyse est noué à l'une de ses extrémités par un nœud simple, puis il est rempli au tiers de son volume avec l'extrait. Après avoir été noué à son autre extrémité, le boudin est complètement immergé dans le liquide de contre-dialyse dont le volume est 100 fois celui de l'extrait. Ce liquide est soumis à une agitation magnétique afin d'éviter la formation d'un gradient de concentration des substances diffusibles autour du boudin. Il est aussi renouvelé plusieurs fois pour accélérer les échanges. L'opération dure 72 h.

Le dialysat (liquide à l'extérieur du boudin) et l'adialysat (liquide à l'intérieur du boudin) sont concentrés jusqu'au rapport 1/1 (p/v).

II.2.2.4 Chromatographie sur gel Sephadex G25

(KAMOUN, 1987)

II.2.2.4.1. Principe

Le Sephadex est un gel de dextran polymérisé sous forme de billes ou de perles poreuses parfaitement calibrées. Il s'agit d'un support chromatographique qui permet de fractionner les molécules selon leur taille et dans une certaine mesure selon leur poids moléculaire. Ainsi les molécules de dimensions inférieures au diamètre des mailles du réseau, diffusent à l'intérieur des grains du gel et sont éluées dans l'ordre décroissant de leur poids moléculaire. Par contre, les molécules plus volumineuses restent à l'extérieur et sont éluées rapidement.

Le gel Sephadex G25, dont le domaine de fractionnement se situe entre 1 500 et 5 000 Da, a été utilisé.

II.2.2.4.2. Mode opératoire

Les grains de Sephadex sont mis à gonfler dans l'eau distillée à la température ambiante. Le gel obtenu est dégazé sous vide avant d'être coulé dans une colonne en plastique de 1,5 cm de diamètre. Ensuite, un disque de papier filtre est déposé à la surface supérieure du gel afin de le stabiliser. Le gel est équilibré par percolation avec trois volumes de colonne de solvant de chromatographie (eau distillée). L'échantillon est déposé avec précaution au sommet du gel qui est ensuite élué par trois volumes de colonne d'eau distillée. L'éluat est récupéré à volume constant (1 ml) au moyen d'un collecteur de fractions (LKB).

La même colonne peut être réutilisée mais après chaque usage elle doit être lavée avec une solution de chlorure de sodium NaCl 1 M puis de l'eau distillée (3 volumes de colonne).

II.2.3 Méthode de concentration

Toutes les opérations de concentration d'extrait et d'évaporation de solvants sont effectuées à l'aide d'un évaporateur rotatif de marque Büchi (Rotavapor R 110) à la température de 50 à 55°C, la pression étant réduite au moyen d'une pompe à vide.

II.2.4 Calcul du rendement

Le rendement est déterminé après chaque étape d'extraction et de purification en utilisant la formule ci-après :

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

II.2.5 Méthodes d'analyse

II.2.5.1 Chromatographie sur couche mince (VERNIN, 1970)

II.2.5.1.1. Principe

La chromatographie sur couche mince (CCM) est un procédé de microanalyse basé sur les phénomènes physico-chimiques de partage et d'adsorption. La séparation des molécules

dépend de leur affinité pour l'adsorbant d'une part, et de leur solubilité dans les solvants utilisés d'autre part. Ainsi, chaque composé est soumis :

- à des échanges entre la phase organique mobile (le solvant de migration) et la phase polaire fixe (le support solide) ;
- aux forces d'adsorption dues au support chromatographique.

II.2.5.1.2. Mode opératoire

a) Dépôt des extraits

Les extraits à analyser sont déposés à l'aide d'un capillaire sur une plaque découpée aux dimensions voulues. Les dépôts sont effectués en points ou en traits fins horizontaux de 7 mm de long, espacés de 6 mm. Ils sont situés à 1,5 cm du bord inférieur de la plaque et à 1,3 cm des bords latéraux. Trois à quatre gouttes sont déposées par extrait et chaque dépôt est immédiatement séché à l'aide d'un séchoir à main.

b) Développement de la plaque

La plaque précédemment préparée est plongée dans une cuve à chromatographie préalablement saturée par les vapeurs du solvant de migration.

Selon le type de substance à analyser plusieurs solvants peuvent être utilisés. Dans notre étude, le solvant de migration utilisé est le système butanol / acide acétique / eau distillée ou BAE, selon le rapport 60 / 20 / 20 (p/ p/ p).

La chromatographie est arrêtée lorsque le front du solvant arrive à 0,5 cm du bord supérieur de la plaque. Celle-ci est alors retirée de la cuve et séchée au séchoir à main.

c) Révélation du chromatogramme

Deux méthodes de révélation sont utilisées :

- ✓ 1^{ère} méthode : visualisation sous lumière ultraviolette à 254 nm et à 366 nm. Il apparait des bandes fluorescentes;
- ✓ 2^{ème} méthode : pulvérisation du réactif à la vanilline sulfurique. La vanilline est un réactif permettant de révéler des substances présentant une chaîne carbonée suffisamment longue. La pulvérisation entraîne la mise en évidence des substances sous formes de taches rose-violacé, devenant noires après chauffage à 100°C.

La composition du réactif est donnée en **ANNEXE III**.

II.2.5.2 Criblage phytochimique

(DALTON, 1989 ; CORDELL, 1981 ; HEMINGWAY et KARCHESY, 1989 ; FONG et coll., 1977 ; BRUNETON, 1993)

Le criblage phytochimique est une méthode permettant de déterminer les différentes familles chimiques présentes dans un matériel végétal. Il est réalisé avec des réactifs spécifiques en présence desquels les composés réagissent en donnant naissance à des changements de coloration, des précipitations ou des floculations.

II.2.5.2.1 Préparation des extraits

Le criblage nécessite quatre extraits préparés la veille du test, chacun à partir de 500 mg de poudre végétale ou de résidu d'évaporation à sec d'extrait.

a) Extrait hydroéthanolique

La poudre végétale ou le résidu d'évaporation à sec de l'extrait à analyser est délayé dans 10 ml de mélange hydroéthanolique 80% (80 ml d'éthanol avec 20 ml d'eau distillée). La solution est laissée macérer pendant une nuit à +4° C puis filtrée sur du coton hydrophile. Le filtrat constitue l'extrait hydroéthanolique.

b) Extrait acide

La poudre végétale ou le résidu d'évaporation à sec de l'extrait à analyser est mis à macérer pendant une nuit à + 4° C dans 10 ml d'acide chlorhydrique (HCl) 12 N. Le mélange est ensuite filtré sur du coton hydrophile pour donner l'extrait acide.

c) Extrait chloroformique

La poudre végétale ou le résidu sec de l'extrait à analyser est mis en suspension dans 10 ml de chloroforme puis le mélange est laissée macérer pendant une nuit à + 4° C. Le macérat est filtré sur du coton hydrophile pour obtenir l'extrait chloroformique.

d) Extrait aqueux

A la poudre végétale ou au résidu sec de l'extrait à analyser sont ajoutés 10 ml d'eau distillée. Après macération pendant une nuit à + 4°C, le mélange est filtré sur du coton hydrophile. Le filtrat constitue l'extrait aqueux.

II.2.5.2.2 Tests de détection des familles chimiques

a) Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques azotés présentant des propriétés alcalines plus ou moins marquées. Ils forment des précipités avec les sels de métaux lourds tels que le mercure, le bismuth et l'iode.

L'extrait acide est utilisé pour la détection des alcaloïdes. Trois réactifs sont utilisés : les réactifs de MAYER, WAGNER et DRAGENDORFF dont la composition est donnée en **ANNEXE IV**.

L'extrait acide est réparti dans quatre tubes à essai à raison de 1 ml par tube. Le premier sert de témoin et les trois autres sont utilisés pour les tests.

Test de MAYER

L'extrait acide contenu dans le deuxième tube est additionné de 4 à 5 gouttes de réactif de MAYER. La présence d'alcaloïdes est mise en évidence par la formation d'un précipité ou d'une floculation.

Test de WAGNER

Quatre à cinq gouttes de réactif de WAGNER sont ajoutées dans le troisième tube. L'apparition d'une floculation indique la présence d'alcaloïdes.

Test de DRAGENDORFF

L'apparition d'une floculation après ajout de 2 à 3 gouttes du réactif de DRAGENDORFF dans le dernier tube démontre la présence d'alcaloïdes.

Test de confirmation

Si les tests de détection des alcaloïdes sont positifs, un test de confirmation est nécessaire.

Ceci consiste à solubiliser le précipité ou la floculation obtenu avec 0,5 ml d'éthanol 80% (80 ml d'éthanol absolu dans 100 ml de solution).

b) Flavonoïdes et leucoanthocyanes

La présence de flavonoïdes et leucoanthocyanes est détectée dans l'extrait hydroéthanolique.

Quatre tubes à essai contenant chacun 1ml d'extrait à tester sont utilisés. Le premier sert de témoin et les trois autres sont utilisés pour les tests.

Flavonoïdes: TEST DE WILLSTÄTER

Les flavonoïdes sont réduits en présence d'acide chlorhydrique concentré et de magnésium.

Un volume de 0,5 ml de HCl 6 N et 2 tournures de magnésium sont ajoutés dans le deuxième tube. Le changement de couleur est noté après 10 min : une coloration rouge indique la présence de flavones, une coloration rouge pourpre celle de flavonols et une coloration rouge violacé celle des flavonones.

La même opération est répétée dans le troisième tube. Le mélange est ensuite additionné de 1ml d'eau distillée et 0,5 ml d'alcool isoamylique. Après 10 min, 2 phases apparaissent. Le changement de couleur est observé au niveau de la phase supérieure. Les résultats se lisent de la même façon que ceux du deuxième tube.

Leucoanthocyanes : TEST DE BATE-SMITH

Les leucoanthocyanes forment en milieu acide des composés de coloration rouge.

L'extrait du quatrième tube est mélangé à 0,5 ml de HCl 6 N. La solution est ensuite chauffée au bain-marie bouillant pendant 30 min. L'apparition d'une coloration rouge après refroidissement marque la présence des leucoanthocyanes.

c) Stéroïdes, triterpènes et stérols insaturés

Stéroïdes et triterpènes : Test de LIEBERMANN-BURCHARD

Ces composés possèdent un groupement OH en 3 protégé par addition d'anhydride acétique. Cette réaction est suivie soit d'une isomérisation soit d'une transposition moléculaire, provoquant un changement de coloration.

L'extrait chloroformique est utilisé pour les tests.

Trois gouttes d'anhydride acétique sont ajoutées à un 1 ml de l'extrait. Après une légère agitation, 1 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) 36 N sont versées le long de la paroi du tube incliné de 45° contenant le mélange.

Le changement de la coloration est observé pendant 1 h. La coloration bleu-vert de la phase inférieure indique la présence de stéroïdes et l'apparition d'un anneau rouge violacé à l'interface marque la présence de triterpènes.

Les deux résultats peuvent être simultanément observés, indiquant la présence des deux composés.

Stérols insaturés : Test de SALKOWSKI

Les stérols insaturés forment une insaturation supplémentaire en présence d'un acide concentré, provoquant un virage de couleur en rouge.

Un millilitre de H_2SO_4 36 N est versé le long de la paroi du tube à essai incliné de 45° contenant 1 ml d'extrait chloroformique. La réaction est positive s'il y a apparition d'un anneau rouge à l'interface.

d) Saponosides

Les saponosides se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes après agitation. L'extrait aqueux est utilisé pour leur détection.

L'extrait à analyser est agité énergiquement pendant 30 s. Une mousse alvéolée apparaît. Si celle-ci atteint une hauteur de 3 cm et persiste pendant au moins 30 min, l'extrait contient des saponines.

e) Tanins et polyphénols

Les tanins sont des composés pouvant précipiter les protéines comme la gélatine.

L'extrait aqueux qui est utilisé, est réparti dans quatre tubes à essai à raison de 1 ml par tube. Le premier sert de témoin et les trois autres sont destinés aux tests.

Test à la gélatine

L'extrait dans le second tube est additionné de 5 gouttes de gélatine à 1% (p/v). La présence de tanins hydrosolubles est indiquée par l'apparition d'un précipité blanc.

Test à la gélatine salée

La formation d'un précipité après ajout de 5 gouttes de gélatine salée (10 g de NaCl dans 100 ml de gélatine aqueuse 1%) dans le troisième tube indique la présence de tanins condensés.

Test au chlorure ferrique

Quatre à cinq gouttes de chlorure ferrique en solution méthanolique sont ajoutées dans le quatrième tube. La présence de tanins est montrée par la formation d'un précipité.

Si le test à la gélatine est négatif alors qu'il y a apparition de coloration vert-noir ou bleu-noir lors du test avec le chlorure ferrique, cela signifie que d'autres composés polyphénoliques sont présents.

f) Désoxyoses : test de KELLER-KILIANI

Un millilitre d'extrait aqueux est additionné de 2 à 3 gouttes de chlorure ferrique en solution aqueuse 10%, puis 2 à 3 gouttes d'acide acétique glacial sont ajoutées. Après agitation, 0,3 ml de H₂SO₄ 36 N est versé dans le tube incliné de 45°. La formation d'un anneau pourpre indique la présence de désoxyoses.

g) Iridoïdes

Un millilitre de HCl 6 N est ajouté à 1ml d'extrait aqueux. Le mélange est chauffé au bain-marie bouillant à 100°C pendant 30 min. Le virage de la coloration au bleu indique la présence d'iridoïdes dans l'extrait.

h) Quinones : test de BORNTRAGER

L'extrait aqueux de volume 1 ml est mélangé à 0,5 ml de benzène. Le mélange est agité énergiquement puis laissé décanter jusqu'à ce que deux phases soient nettement séparées. Ensuite, 0,5 ml d'ammoniaque (NH₄OH) 25% est ajouté. La présence des quinones est montrée par la coloration de la phase inférieure en rouge.

III-RESULTATS

Les expériences préliminaires ont permis de constater que les principes toxiques d'*Albizia aurisparsa* résistent à des hautes températures et à des opérations de congélation et de décongélation répétées.

Ainsi :

- toutes les manipulations sont effectuées à la température ambiante ;
- les opérations de concentration et d'évaporation se déroulent à +55°C ;
- les extraits sont conservés dans des flacons en plastique à -20°C.

III.1 EXTRACTION

Deux méthodes, à savoir l'extraction aqueuse à froid et l'extraction par épuisements successifs, ont été utilisées pour extraire les principes toxiques de la poudre de graines d'*Albizia aurisparsa*.

La toxicité a été appréciée par des tests de toxicité sur souris selon la méthode décrite au § II.2.1.1 de la deuxième partie (p. 37).

III.1.1 Extraction aqueuse à froid

Cinquante grammes de poudre sont mis en suspension dans 500 ml d'eau distillée. L'extraction se fait selon la méthode décrite au § II.2.1.1 (p. 14). 50 ml d'extrait brut d'aspect fluide, de couleur jaune foncé sont obtenus. D'après les tests, cet extrait de concentration 197mg/ml (rapport 1/1) est toxique sur souris (temps de survie : 20 min). Il est dénommé extrait brut aqueux à froid.

III.1.2 Extraction par épuisements successifs

Cinquante grammes de poudre sont épuisés successivement par l'hexane, l'acétate d'éthyle et le méthanol (volume de chaque solvant : 400 ml). L'extraction se déroule selon la méthode donnée au § II.2.1.2 (p. 14). Trois extraits sont obtenus :

- l'extrait hexanique : visqueux de couleur jaune ;
- l'extrait acétate d'éthyle : visqueux de couleur marron ;
- l'extrait méthanolique : fluide de couleur jaune pâle.

Comme les résidus d'évaporation à sec des extraits hexanique et acétate d'éthyle ne sont pas solubles dans l'eau distillée, seul l'extrait méthanolique repris dans l'eau distillée a été testé sur souris. A 98,5 mg/ml (rapport 1/1), il est toxique, le temps de survie étant de 20 min.

Les caractéristiques des différents extraits obtenus sont résumées dans le tableau 6 suivant :

Tableau 6 : Caractéristiques des extraits bruts obtenus par les différentes méthodes d'extraction

EXTRAITS CARACTE RISTIQUES	AQUEUX A FROID	HEXANIQUE	ACETATE D'ETHYLE	METHANOLIQUE
COULEUR	jaune foncé	jaune vif	marron	jaune pâle
ASPECT	limpide	trouble	trouble	limpide
CONSISTANCE	fluide	visqueux	visqueux	fluide
RENDEMENT	19,70%	0,93%	1,26%	15,37%
TOXICITE SUR SOURIS	toxique	non testé	non testé	toxique
TEMPS DE SURVIE	20 min			20 min
CONCENTRATION TESTEE	197 mg/ml			98,5 mg/ml

D'après ce tableau, les extraits aqueux à froid et méthanolique sont toxiques sur souris. Cependant, l'extrait méthanolique est le plus toxique, provoquant la mort de souris au bout de 20 min à une concentration de 98,5 mg/ml. De plus, il est plus clarifié que l'extrait aqueux et peu coloré. Ainsi, l'extrait méthanolique a été choisi pour la suite de notre travail. Il est dénommé extrait brut ou EB.

III.2 PURIFICATION

Plusieurs méthodes ont été testées en vue d'établir un procédé adéquat pour purifier les principes toxiques. Elles sont basées sur les différences de propriétés telles que le poids moléculaire et la solubilité.

Les méthodes peu performantes n'ont pas été retenues mais elles sont décrites ici parce qu'elles ont permis de caractériser les principes toxiques sur le plan physico-chimique.

Toutes les étapes de purification ont été guidées par des tests sur souris (voir méthode au deuxième partie §II.2.1.1, p. 37). L'homogénéité des extraits obtenus après chaque étape est appréciée par chromatographie sur couche mince (voir §II.2.5.1, p. 17)

III.2.1 Fractionnement par l'acétate d'éthyle

L'extrait brut (EB) de volume 40 ml est fractionné par l'acétate d'éthyle selon la méthode décrite au §II.2.2.1 (p. 15). Deux phases sont obtenues : une phase organique et une phase aqueuse. Elles sont récupérées, puis concentrées et chacune est testée sur souris. Seule la phase aqueuse est toxique sur souris. Elle est dénommée extrait E₁.

III.2.2 Fractionnement par le n-butanol

L'extrait E₁ subit un fractionnement par le n-butanol (voir §II.2.2.2, p. 15). Deux phases sont obtenues : la phase organique et la phase aqueuse. D'après les tests sur souris, seule la phase organique est toxique. Dénommée extrait E₂, elle est utilisée pour la suite des travaux.

III.2.3 Dialyse

L'extrait E₂ est dialysé 3 fois contre 100 fois son volume d'eau distillée pendant 72 h (voir § II.2.3, p. 17). D'après les tests sur souris, l'adialysat n'est pas toxique et le dialysat ne provoque la mort de souris qu'au bout de 48 h.

La dialyse n'a pas été adoptée dans le protocole de purification car cette méthode n'est pas performante.

III.2.4 Chromatographie d'exclusion sur colonne de gel de Sephadex G25

L'extrait E₂ de volume 1 ml est déposé sur une colonne de Sephadex G25 (1,5 cm x 5,7cm). L'éluat est récolté dans des tubes à essai à raison de 1 ml par tube et les fractions sont analysées par CCM. Le résultat est montré sur la figure 3 (p. 27). Les fractions montrant des chromatogrammes similaires sont rassemblées et ont été testées sur souris.

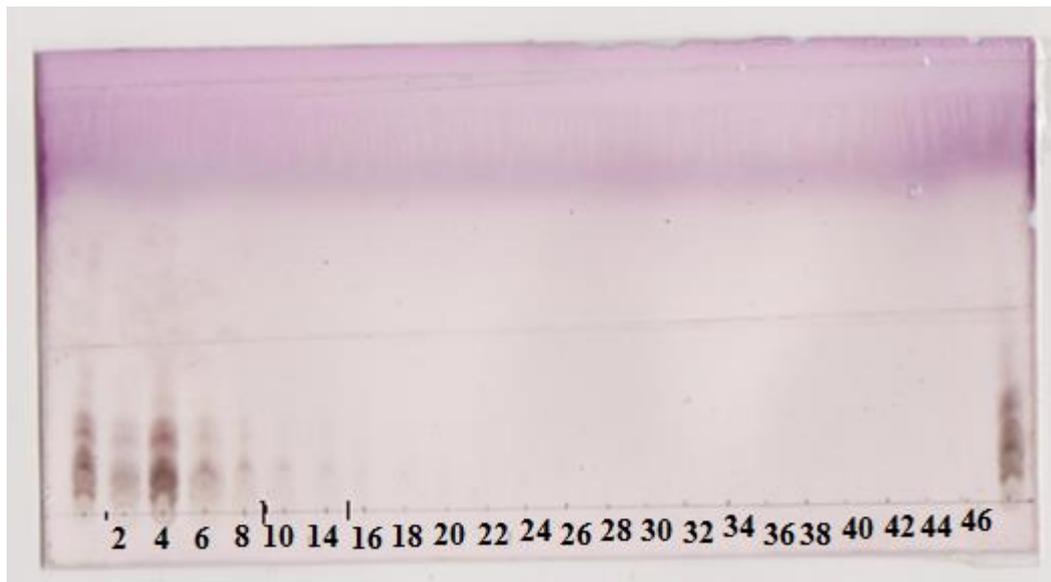


Figure 3 : Chromatogramme des fractions obtenues lors de la chromatographie sur Sephadex G25

Quatre fractions ont été obtenues. La fraction F1 correspond au volume mort (6 ml), la fraction F2 regroupe les tubes n°2 à 9, la fraction F3 les tubes n°10 à 14 et la fraction F4 les tubes n°15 à 46. Ces extraits sont testés sur souris après concentration. Seule la fraction F2 est toxique sur souris.

Trois méthodes ont été retenues dans le protocole de purification définitif, à savoir successivement un fractionnement par l'acétate d'éthyle, un fractionnement par le n-butanol et une chromatographie d'exclusion sur colonne de gel de Sephadex G25.

Les différentes étapes d'extraction et de purification adoptées sont récapitulées sur la figure 4 (p. 28).

III.3 RENDEMENT

Après chaque étape de purification, les extraits obtenus sont évaporés à sec et pesés. Ainsi à partir de 50 g de poudre de graines d'*Albizia aurisparsa* 7,69 g d'EB ont été obtenus. Le résidu d'évaporation de l'extrait purifié E₂ pèse 3,24 g. Les rendements calculés selon la formule donnée au § II.2.4 (p. 17) sont donc :

- rendement d'extraction : 15,37%
- rendement de purification calculé à partir de l'extrait brut : 7,93%
- rendement en toxines calculé à partir de la poudre de graines : 1,22%

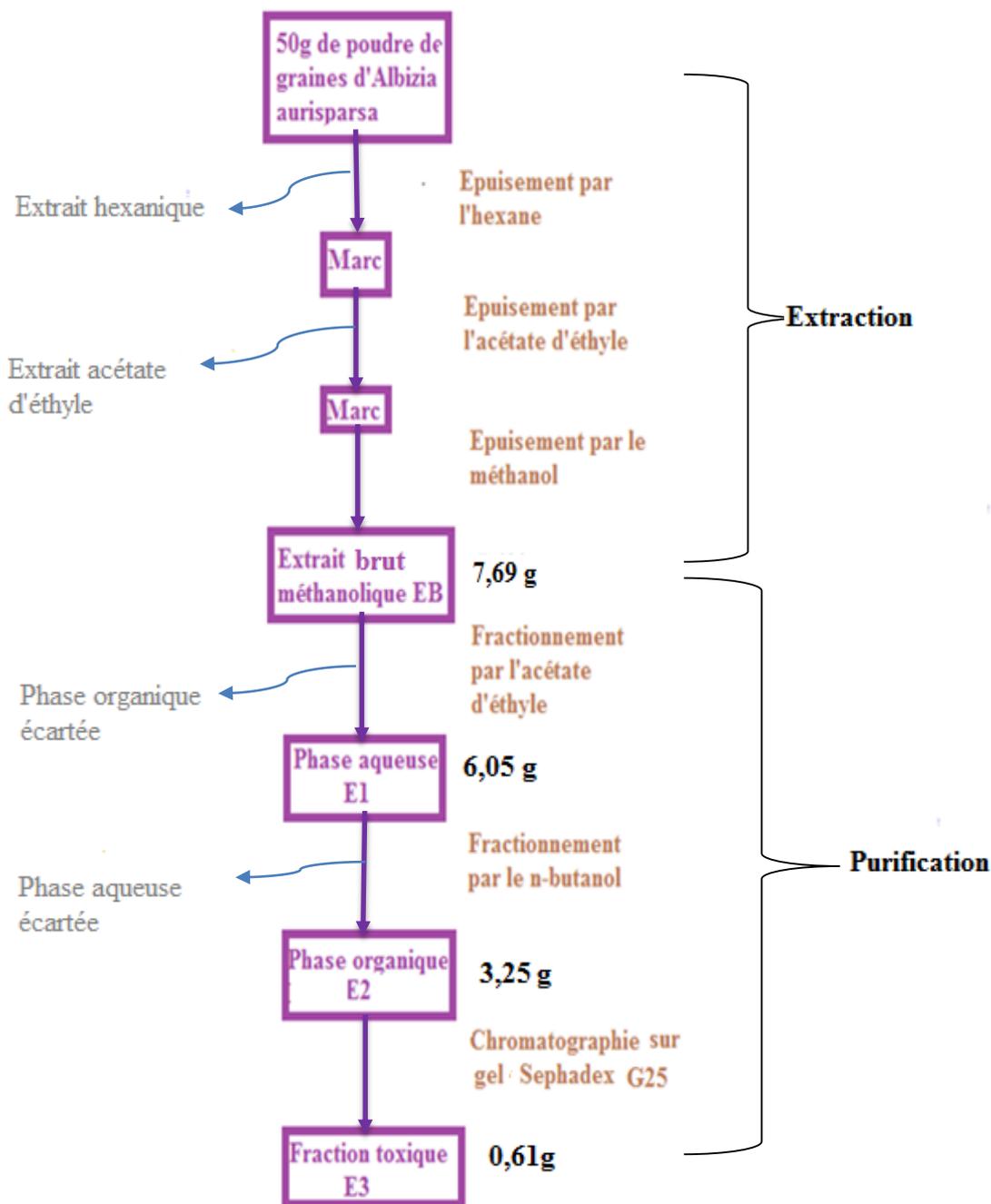


Figure 4 : Schéma récapitulatif des différentes étapes d'extraction et de purification à partir de la poudre de graines d'*Albizia aurisparsa*.

Les chiffres représentent les poids des résidus d'évaporation à sec des extraits.

III.4 DEGRE D' HOMOGENEITE

L'homogénéité des extraits obtenus au cours des différentes étapes de la purification a été appréciée par CCM (voir § II.2.5.1, p. 17). Après observation sous lumière ultra-violette de

longueurs d'ondes 254 nm et 366 nm, le chromatogramme est révélé par le réactif à la vanilline sulfurique.

Le chromatogramme des différents extraits toxiques est montré sur la figure 5 ci-dessous :

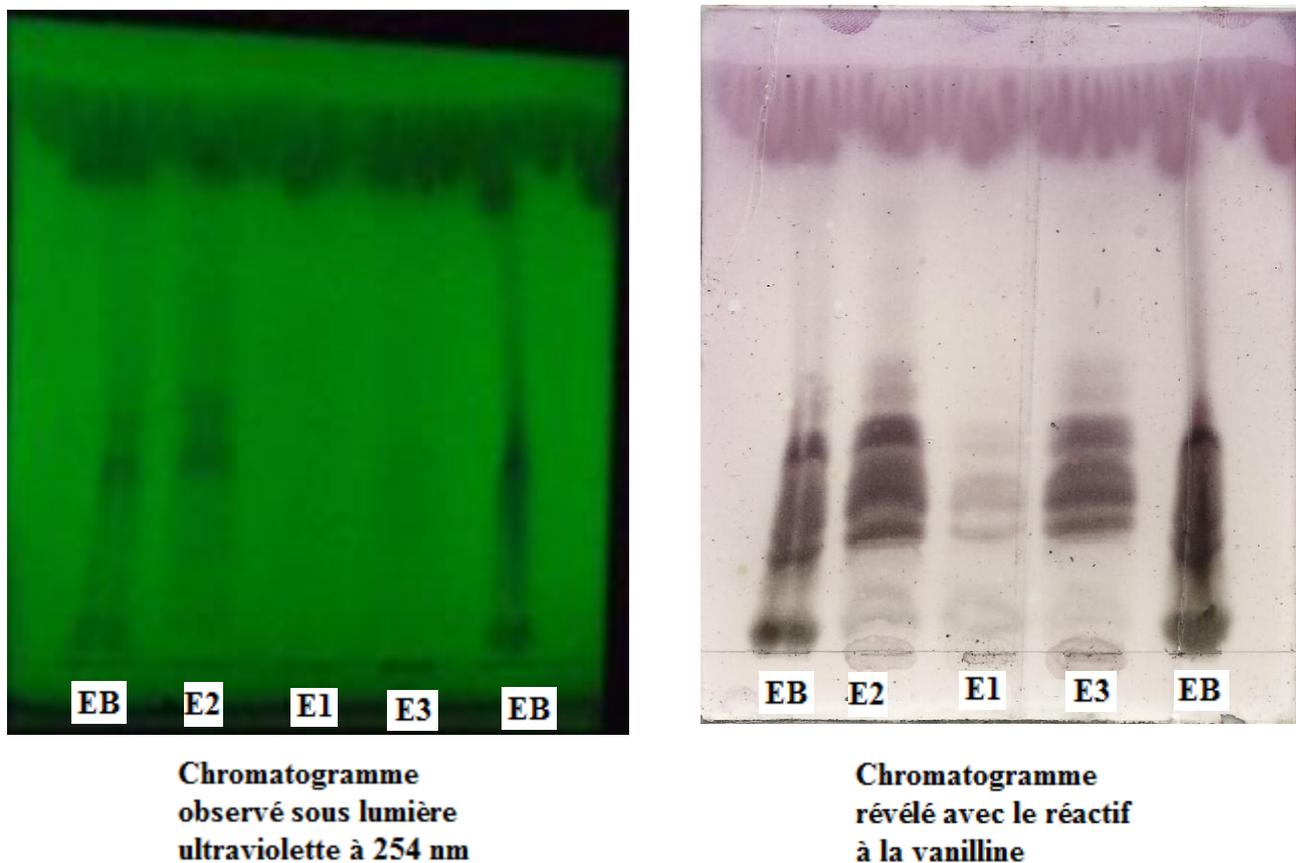


Figure 5 : Chromatogramme récapitulatif des étapes d'extraction et de purification avec :

EB : extrait brut méthanolique

E₁ : phase aqueuse du fractionnement par l'acétate d'éthyle

E₂ : phase organique du fractionnement par le n-butanol

E₃ : fraction toxique de la chromatographie sur G25

D'après ces résultats, l'extrait EB présente 8 bandes majeures alors que E₃ ne présente que 6 bandes. La purification a donc permis d'éliminer 2 contaminants majeurs.

III.5 CARACTERISATION CHIMIQUE

III.5.1 Propriétés physico-chimiques

Le comportement des substances toxiques des graines d'*Albizia aurisparsa* au cours de toutes les manipulations a permis de déduire certaines de leurs propriétés physico-chimiques.

Ainsi :

- ✓ le résidu d'évaporation de EB se présente comme une poudre hygroscopique de couleur jaune ;
- ✓ les principes toxiques sont thermostables ;
- ✓ leur activité n'est pas modifiée par les opérations de congélation et de décongélation répétées ;
- ✓ ils sont solubles dans l'eau et certains solvants organiques tels que le méthanol et le n-butanol ;
- ✓ ils traversent la membrane de dialyse de seuil de filtration 12000-14000 Da ;
- ✓ ils sont élués dans le domaine de fractionnement de Sephadex G25 compris entre 1500-5000 Da ; ils ont donc un faible poids moléculaire.

III.5.2 Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique (voir méthode au § II.2.5.2, p. 19) permet de déterminer la nature chimique du ou des principes toxiques. Il a été réalisé sur la poudre végétale, les extraits EB et E₂. Les résultats sont présentés dans le tableau 7 (p. 31).

D'après les résultats, des alcaloïdes, des leucoanthocyanes, des triterpènes, des stérols insaturés, des saponines, des désoxyoses et des iridoïdes sont présents dans la poudre de graines d'*Albizia aurisparsa*.

Après l'extraction par épuisements successifs, seuls les alcaloïdes et les triterpènes ont pu être détectés dans l'extrait méthanolique. Après l'étape de purification, il ne reste plus que des alcaloïdes dans l'extrait purifié E₂.

Tableau 7 : Résultats du criblage phytochimique effectué sur la poudre végétale, EB, E₂

FAMILLE CHIMIQUE	TEST	Poudre végétale	EB	E₂
ALCALOIDES	MAYER	+	+	+
	WAGNER	+	+	+
	DRAGENDORFF	+	+	+
FLAVONOIDES	WILLSTÄTER	-	-	-
LEUCOANTHOCYANES	BATE-SMITH	+	-	-
TRITERPENES	LIEBERMANN-BURCHARD	+	+	-
STEROIDES	SALKOWSKI	+	-	-
TANINS ET POLYPHENOLS	Gélatine 1%	-	-	-
	Gélatine salée	-	-	-
	Chlorure ferrique	-	-	-
SAPONINES	Test de mousse	+	-	-
DESOXYOSES	KELLER-KILIANI	+	-	-
IRIDOIDES	HCl à chaud	+	-	-
QUINONES	BORNTRAGER	-	-	-

IV-DISCUSSION

L'étude chimique a permis de montrer que les graines *d'Albizia aurisparsa* contiennent des principes toxiques.

Deux méthodes, à savoir l'extraction aqueuse à froid et l'extraction par épuisements successifs ont été réalisées pour extraire ces principes toxiques des graines. La technique d'extraction par épuisement successifs avec l'hexane, l'acétate d'éthyle et le méthanol a été choisie car elle permet d'obtenir des extraits plus clarifiés que l'extraction aqueuse à froid. Le rendement d'extraction méthanolique est de 15,37%, rendement plus élevé que ceux des extraits hexanique (0,93%) et acétate d'éthyle (1,26%). L'extrait méthanolique repris dans l'eau distillée a été adopté comme extrait brut. Cette méthode d'extraction a été aussi adoptée pour l'extraction des graines *d'Albizia mahalao* (RAKOTOARIVONY, 2012) et des feuilles *d'Albizia arenicola* (RAKOTOMALALA, 2012). Cependant, le rendement d'extraction à partir des graines *d'Albizia aurisparsa* est nettement plus élevé que celui des feuilles *d'Albizia arenicola* de l'ordre de 6,549% (RAKOTOMALALA, 2012) mais moins élevé que celui des graines *d'Albizia mahalao* de l'ordre 22,84% (RAKOTOARIVONY, 2012).

Trois sur les quatre techniques essayées ont été adoptées pour purifier EB, à savoir un fractionnement par l'acétate d'éthyle, un fractionnement par le n-butanol et une chromatographie d'exclusion sur colonne de Sephadex G25.

La dialyse n'a pas été retenue car l'adialysat n'est pas toxique sur souris et le dialysat ne provoque la mort qu'au bout de 40 h, ce qui porte à penser qu'il y a une perte d'activité toxique. En effet, le temps de survie de la souris a beaucoup augmenté par rapport à celui de l'extrait purifié avec le n-butanol. Les principes actifs se sont probablement distribués entre le dialysat et l'adialysat.

Ces différentes méthodes d'extraction et de purification ont permis de connaître certaines propriétés physico-chimiques des principes toxiques telles que leur solubilité dans le méthanol, le n-butanol et l'eau, et leur insolubilité dans l'acétate d'éthyle, leur stabilité à une température élevée de l'ordre de 55° C. Ils traversent les pores du boudin à dialyse. Ils ont donc un poids moléculaire inférieur à 12000-14000 Da (seuil de filtration du boudin). Ils sont aussi élués dans le domaine de fractionnement de gel de Sephadex G25 (1000-5000Da). Ce dernier comportement, identique à celui des principes toxiques des feuilles *d'Albizia boinensis* (AHMED, 2009) indique qu'ils ont un faible poids moléculaire et explique leur comportement lors de la dialyse.

Le criblage phytochimique a montré la présence d'alcaloïdes dans l'extrait purifié E₂. Les autres composés présents dans EB tels que les triterpènes ont été sûrement éliminés au cours de la purification. Les principes toxiques pourraient donc être des alcaloïdes.

Plusieurs espèces d'*Albizia* renferment des principes toxiques de nature chimique analogue à ceux des graines d'*Albizia aurisparsa*. Il s'agit des graines d'*Albizia polyphylla* (RAJEMIARIMOELISOA, 1996), des feuilles d'*Albizia polyphylla* (RAKOTONDRASOA, 2000) des téguments des graines d'*Albizia arenicola* (MOUNIDATI, 2009), des graines d'*Albizia lebbeck* (RAHMAN et coll., 1986) et des feuilles d'*Albizia inopinata* (ASSIS et coll., 2001).

Les alcaloïdes sont connus pour leurs effets thérapeutiques très intéressants. Il a été rapporté qu'ils ont des vertus antalgiques majeures (morphine), antipaludéennes (quinine), paralysantes (curare, caféine), anesthésiantes (cocaïne, mescaline), cholinergiques (pilocarpine), anticancéreuses (vinblastine, vincristine), hypertenseurs (caféine), ou anti-hypertenseurs (réserpine). Cependant, ils peuvent aussi s'avérer toxiques (strychnine, nicotine) (<http://www.ecosociosystemes.fr/alcaloide.html>).

Deuxième partie :

Etude toxicologique.

INTRODUCTION

A l'issue de l'étude chimique, les principes toxiques ont été partiellement purifiés à partir des graines d'*Albizia aurisparsa*. Dans cette deuxième partie, nous avons approfondi l'étude des effets des principes toxiques sur la souris puis procédé à l'étude toxicologique des extraits sur d'autres organismes vivants tels que :

- les animaux à sang froid (alevins de poisson, têtards de grenouille, larves de moustique) ;
- les graines de diverses plantes Monocotylédones et Dicotylédones ;
- les souches bactériennes.

L'extrait partiellement purifié E₂, disponible en quantité suffisante, a été utilisé pour les différentes expériences. Pour les tests qui nécessitent une grande quantité de produit (tests sur les animaux à sang froid, tests sur la germination des graines) l'extrait brut méthanolique (EB) a été utilisé.

II-MATERIELS ET METHODES

II.1 MATERIELS

II.1.1 Les animaux d'expérimentation

II.1.1.1 Les animaux à sang chaud : les souris

Les souris *Mus musculus* utilisées sont de race Tana-Swiss, stabilisée depuis plusieurs années à l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM). Elles proviennent de l'élevage du Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales (LABASM) du (DBFA) de la Faculté des Sciences.

II.1.1.2 Les animaux à sang froid

a) Les alevins de poisson

Les alevins de poisson âgés de 6 semaines appartenant à l'espèce *Cyprinus carpio* proviennent d'une maison d'élevage à Ambohimangakely. Ces alevins ont été élevés quelques jours avant leur utilisation dans un aquarium bien aéré contenant de l'eau de pluie.

b) Les têtards

Les têtards de grenouille sans patte appartenant à l'espèce *Ptychadena mascareniensis* ont été capturés dans les rizières des alentours du campus 2 jours avant le test pour les adapter aux conditions du laboratoire.

c) Les larves de moustique

Les larves du moustique *Culex quinquefasciatus* au 4^{ème} stade de développement ont été récoltées 2 jours avant le test dans les eaux stagnantes situées aux alentours du campus universitaire.

II.1.2 Les végétaux d'expérimentation

Les graines utilisées pour les tests sur les végétaux appartiennent à différentes plantes potagères Dicotylédones et Monocotylédones. Certaines proviennent de la collection du Ministère de l'Agriculture et d'autres ont été achetées auprès de fournisseurs de semences à Analakely, Antananarivo.

La liste de ces graines est donnée dans le tableau 8

Tableau 8 : Graines utilisées pour les tests sur les végétaux

CLASSE	FAMILLE CHIMIQUE	NOM SCIENTIFIQUE	NOM COMMUN
DICOTYLEDONES	APIACEAE	<i>Daucus carotta</i>	Carotte
	BRASSICACEAE	<i>Brassica sp</i>	Tissam white
	CUCURBITACEAE	<i>Cucumis sp</i>	Concombre
	FABACEAE	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Petit pois
		<i>Pisum sativum</i>	Haricot
	SOLANACEAE	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Tomate
<i>Capsicum annum</i>		Poivron	
MONOCOTYLEDONES	AMARYLLIDACEAE	<i>Allium ampeloprasum</i>	Poireau
	LILIACEAE	<i>Allium cepa</i>	Oignon
	POACEAE	<i>Zea mays</i>	Mais
		<i>Oryza sativa</i>	Riz

II.1.3 Les matériels utilisés pour la microbiologie

II.1.3.1 Les microorganismes

Les microorganismes utilisés pour les tests antimicrobiens appartiennent à des souches pures déjà disponibles au sein du Laboratoire de Microbiologie du DBFA.

La liste de ces germes avec leur référence est donnée dans le tableau 9 suivant.

Tableau 9 : Germes utilisés pour les tests antimicrobiens

NOM	TYPE	REFERENCE	Caractères morphologiques et pouvoir pathogène
<i>Bacillus cereus</i>	Gram+	LMG 6910	Grands bacilles en bâtonnet, mobiles, responsables d'intoxication alimentaire opportuniste à symptômes émétiques ou diarrhéiques.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram+	ATCC 6538	Cellules en forme de coques disposées en grappes, immobile, responsable d'intoxication alimentaire et pouvant provoquer le syndrome du choc toxique (SCT)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Gram-	ATCC 29212	Bactérie habitant le tube digestif humain et d'autres Mammifères, immobiles, très résistants pouvant causer des endocardites, des infections de la vessie ou de la prostate
<i>Escherichia coli</i>	Gram -	CCM 4516	Bacille de la flore intestinale humaine et d'autres animaux à sang chaud pouvant provoquer des troubles intestinaux, des infections urinaires, et des méningites
<i>Salmonella typhimurium</i>	Gram -	ATCC 14028	Cellules en forme de bacille responsable d'intoxication alimentaires, d'infection intestinale, d'entéocolite aiguë, de fièvre et de gastro-entérite

ATCC : American Type Culture Collection

CCM : Microbial Culture Collection

LMG : Laboratorium Voor Microbiologie Universiteit Gent, Belgium

II.1.3.2 Les milieux de culture

Le milieu solide de MUELLER-HINTON, de marque Biorad est utilisé pour étudier l'activité antibactérienne des extraits.

Le milieu liquide Nutrient-Broth sert à la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

La composition de ces milieux est donnée en **ANNEXE V**.

II.1.4 Les disques pour les tests d'antibiogramme

Pour les tests d'antibiogramme (voir §II.2.3.3, p. 40) des disques de papier stérile de 6 mm de diamètre, produits par Biomérieux, sont utilisés.

II.2 METHODES

II.2.1 Méthodes d'étude des effets sur les animaux

II.2.1.1 Estimation de la toxicité sur souris

La toxicité aiguë sur souris est estimée par injection par voie intrapéritonéale (ip) de 0,3ml d'extrait à tester pour 25 g de souris. Pour chaque test, un lot de 3 souris de 25 ± 2 g chacune est utilisé. Un autre lot de 3 souris de même poids, recevant du sérum physiologique, sert de témoin.

II.2.1.2 Détermination de la DL_{50} (24h) sur souris

La DL_{50} (24 h) ou dose létale 50% (24 h) est la dose qui entraîne la mort de la moitié des animaux testés pendant 24 h. Elle est estimée selon 3 méthodes :

1) Méthode de REED et MUENCH (1938) :

- par calcul utilisant la formule :

$$\log DL_{50} = \log B + \frac{(0,5-N)}{(M-N)} \log R$$

avec :

B : la dose immédiatement inférieure à la DL_{50}

N : mortalité provoquée par la dose B

M : mortalité provoquée par la dose immédiatement supérieure à la DL_{50}

R : raison de la progression géométrique

- par la méthode graphique, où la valeur de la DL_{50} est déterminée à partir de l'intersection de la courbe des totaux cumulatifs des souris survivantes et celle des totaux cumulatifs des souris mortes en fonction des doses injectées.

Cinq doses d'extraits à tester, en progression géométrique de raison R, sont utilisées sur 5 lots de 5 souris de 25 ± 2 g. Les souris sont laissées à jeun 24h avant le test.

2) Méthode de BOYD (1966) : à partir de la droite de la régression linéaire de la relation % mortalité = f (doses en mg/kg). L'équation de la droite est $Y = A + BX$

Avec A et B : constante

Y : pourcentage des morts

X : dose en mg/kg

II.2.1.3. Méthodes d'étude des effets sur les animaux à sang froid

(BARBIER et coll. ,1974)

II.2.1.2.1. Principe

Le principe consiste à tester la résistance des animaux à sang froid vis-à-vis de l'extrait à étudier ajouté dans leur milieu.

II.2.1.2.2. Mode opératoire

Des lots d'animaux sont sélectionnés, puis placés dans des cristallisoirs contenant 250ml d'eau de pluie. L'extrait à étudier y est ajouté de façon à avoir une concentration bien définie. Le comportement des animaux est observé pendant 24 h.

a) Test sur les alevins

Différentes concentrations de l'extrait à tester ont été utilisées sur des lots de 5 alevins afin de déterminer la concentration donnant 0% de mortalité et la concentration donnant 100% de mortalité.

b) Test sur les têtards

Une concentration de 2 mg/ml de l'extrait à étudier a été testée sur un lot de 5 têtards sans patte *Ptychadena mascareniensis*. Un autre lot placé dans de l'eau de pluie sert de témoin.

c) Test sur les larves de moustique

(OMS, 1970)

Un lot de 20 larves de *Culex quinquefasciatus* au stade 4 de leur développement (avant le stade nymphal) est testé avec une concentration de 2 mg/ml d'extrait à étudier. Un autre lot placé dans de l'eau de pluie sert de témoin.

II.2.2 Méthodes d'étude des effets sur les végétaux

(DAVID, 1952 ; HELLER et coll., 1955)

II.2.2.1 Etude des effets sur le pouvoir germinatif des graines

Les graines de différentes espèces sont désinfectées par trempage dans l'eau de javel 5% pendant 5 min puis rincées à l'eau du robinet. Deux lots de 20 graines sont trempés en parallèle, le premier dans l'eau de robinet et le deuxième dans l'extrait à étudier de concentration déterminée. Le trempage dure 48 h et se fait à l'obscurité à 30°C. Le premier lot qui sert de témoin est ensuite transféré sur du coton imbibé d'eau tandis que le deuxième lot est transféré sur du coton imbibé de l'extrait de même concentration.

Les résultats sont observés au bout de 24 h après le transfert.

II.2.2.2 Etude des effets sur les bourgeons axillaires

Les effets de l'extrait à tester sur le développement des bourgeons axillaires de jeune plantule sont étudiés par comparaison avec l'activité de 2 hormones végétales : la gibbérelline et l'auxine.

La gibbérelline a une action positive sur le métabolisme et les synthèses. Elle stimule la croissance des bourgeons axillaires. Quant à l'auxine, elle inhibe la croissance de ces bourgeons.

L'expérience est réalisée sur 5 lots de 3 jeunes plantules de petit pois âgés de 6 j. Elles sont obtenues après trempage, germination et croissance des graines en présence d'eau du robinet. Elles sont ensuite décapitées au-dessus du deuxième bourgeon axillaire. La solution à étudier est mélangée avec de la lanoline pour permettre sa fixation, puis déposée sur la partie sectionnée sous un volume de 1 µl :

- ✓ le premier lot qui sert de témoin reçoit 1µl d'eau ;
- ✓ le deuxième lot reçoit 50 µg d'auxine (témoin négatif ou T⁻) ;
- ✓ le troisième lot reçoit 50 µg de gibbérelline (témoin positif ou T⁺) ;
- ✓ le quatrième et le cinquième lot reçoivent 50 µg d'extrait à étudier.

Les plantules sont arrosées quotidiennement avec de l'eau de robinet. Les résultats sont observés pendant 14 j en mesurant la croissance des bourgeons axillaires tous les 2 jours.

II.2.3 Méthodes d'étude des effets sur les microorganismes

(FERRON, 1994 ; DUVAL et SOUSSY, 1991)

II.2.3.1 Stérilisation

Avant toute manipulation en microbiologie, tous les matériels utilisés et l'espace de travail doivent être stérilisés pour éviter toute contamination.

Ainsi, la verrerie, les tubes vissés, les boîtes de Petri, sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 min. L'eau physiologique, les milieux de culture, et les disques sont étuvés à 180°C.

Les mains du manipulateur et l'espace de travail sont lavés avec du savon puis désinfectés avec de l'alcool.

II.2.3.2 Préculture

Une ansée de germe prélevée dans une culture sur gélose inclinée estensemencée en stries dans une boîte de Petri contenant du milieu de MUELLER HINTON. La boîte est ensuite incubée à 37°C pendant 24 h.

II.2.3.3 Test d'antibiogramme

II.2.3.3.1 Principe

Une substance inhibe la croissance d'un germe quand après incubation en milieu solide, il y a apparition d'une zone circulaire sans croissance appelé halo d'inhibition autour des disques d'antibiogramme imprégnés de cette substance.

II.2.3.3.2 Test proprement dit

Une ansée de préculture est prélevée et mise en suspension dans de l'eau physiologique. La suspension bactérienne est diluée de manière à avoir 10^6 cellules/ml, c'est-à-dire ayant une densité optique de 0,125 mesurée à 600 nm.

La suspension est ensuite inoculée dans une boîte de Petri contenant du milieu de MUELLER-HINTON selon la technique d'inondation. L'excès d'inoculum est aspiré à l'aide d'une pipette stérile.

Les extraits à tester stérilisés par filtration sur filtre Millipore (diamètre des pores 0,22µm), sont déposés sur les disques à raison de 10 µl par disque. Les disques ainsi chargés sont placés à la surface du milieu déjà ensemencé.

Le tout est incubé à 37°C pendant 24 h.

Les résultats sont observés au bout de 24 h. Les halos sont mesurés et les valeurs sont interprétées par référence aux normes présentées dans le tableau 10.

Tableau 10 : Normes utilisées pour l'expression des résultats

Diamètre de la zone d'inhibition (X)	Résultat	Sensibilité
$X < 7 \text{ mm}$	-	insensible
$7 \text{ mm} < X < 8 \text{ mm}$	+	Assez sensible
$8 \text{ mm} < X < 9 \text{ mm}$	++	sensible
$X > 9 \text{ mm}$	+++	Très sensible

II.2.3.4 Détermination de la CMI

La CMI ou concentration minimale inhibitrice est la plus faible concentration d'extrait testé provoquant 100% d'inhibition de la croissance microbienne au bout de 24 h. Elle est déterminée en milieu liquide.

La croissance microbienne se traduit par un trouble dans le milieu. L'inhibition de la croissance est marquée par un aspect limpide de celui-ci.

La CMI est donc la plus faible concentration de l'extrait à étudier pour laquelle le milieu reste limpide au bout de 24 h de culture.

Le germe à étudier est mis en suspension dans le milieu liquide Nutrient Broth puis incubé à 37°C pendant 24 h. La culture obtenue qui sert d'inoculum est diluée de façon à avoir 10^6 cellules/ml (DO : 0,125 à 600 nm).

Trois tubes servent de témoin :

- Témoin positif (T+) contenant 25 µl d'inoculum et 975 µl de milieu liquide, présentant une croissance microbienne (aspect trouble) ;
- Témoin négatif (T-1) contenant 1000 µl de milieu liquide, ne présentant aucune croissance microbienne (aspect limpide) ;
- Témoin négatif (T-2) : 500 µl d'extrait et 500 µl de milieu liquide, montrant l'absence de croissance microbienne (aspect limpide).

La composition des 9 tubes utilisés pour le test est donnée dans le tableau 11.

Tableau 11 : Composition des tubes utilisés pour la détermination de la CMI

Tube n°	T+	T-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	T-2
Concentration initiale d'extrait (mg/ml)	0	0	0,25	0,49	0,99	1,98	3,96	7,92	15,85	31,72	63,44	63,44
Volume d'extrait (µl)	0	0	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Volume de l'inoculum (µl)	25	0	25	25	25	25	25	25	25	25	25	0
Volume du milieu de culture (µl)	975	1000	475	475	475	475	475	475	475	475	475	500
Volume final du mélange (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Concentration finale d'extrait (mg/ml)	0	0	0,12	0,25	0,49	0,99	1,98	3,96	7,92	15,85	31,72	31,72

II.2.3.5 Détermination de la CMB

La CMB ou concentration minimale bactéricide est la plus petite concentration provoquant la mort des bactéries. Elle est déterminée en milieu solide.

Une oëse de colonie est prélevée des tubes utilisés pour la détermination de CMI qui ne présentaient pas de croissance visible à l'œil nu (aspect limpide). Le prélèvement est ensemencé en stries transversales sur dans des boites de Petri sur du milieu de MUELLER-HINTON. La culture est incubée à 37°C pendant 24 h. La CMB correspond à la plus faible concentration de l'extrait à tester pour lequel il n'y a plus de colonie visible à l'œil nu.

III-RESULTATS

III.1 EFFETS SUR LES ANIMAUX

III.1.1 Effets sur les souris

III.1.1.1 Description des symptômes d'intoxication

L'administration par voie ip de l'extrait E₂ sur souris à la dose létale de 50,57 mg/kg provoque les symptômes suivants :

- juste après l'injection, une contorsion abdominale apparait ;
- 10 min après l'injection un rougissement des oreilles est observé suite à la dilatation des capillaires, et les souris se déplacent rarement ;
- au bout de 20 min une exophtalmie est notée ;
- les animaux ont du mal à respirer, une diminution du rythme respiratoire est notée. La mort survient après 15 à 20 h.

III.1.1.2 Détermination de la DL₅₀ (24 h)

La DL₅₀ (24 h) est déterminée selon 3 méthodes (voir § II.2.1.2, p. 37).

Cinq doses en progression géométrique de raison R=1,2 ont été utilisées. La première dose (24 mg /kg) est la plus forte provoquant 0% de mortalité et la dernière dose (50,57 mg/kg) est la plus faible donnant 100% de mortalité.

Les résultats expérimentaux sont résumés dans le tableau 12 (p. 44).

A partir de la formule de REED et MUENCH, avec B=34,83 dose immédiatement inférieure à la DL₅₀; N=0,02 mortalité provoquée par B, M=0,06 mortalité provoquée par la dose immédiatement supérieure à la DL₅₀ et R=1,2 raison de la progression géométrique, la valeur de la DL₅₀ est estimée à **39,71 mg/kg**.

Les données utilisées pour la détermination graphique sont présentés dans le tableau 13 (p. 44)

Tableau 12 : Résultats expérimentaux de la détermination de la DL₅₀ (24h) de l'extrait purifié E₂ chez la souris

Dose en mg/kg	Nombre de décès après							Nombre de		Pourcentage de décès
	3 h	4 h	5 h	10 h	15 h	20 h	24 h	souris mortes	souris survivantes	
24	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0%
28,91	0	0	0	0	0	1	0	1	4	20%
34,83	1	0	0	0	0	0	0	1	4	20%
41,97	1	1	0	0	0	1	0	3	2	60%
50,57	1	1	1	0	0	2	0	5	0	100%

Tableau 13 : Données utilisées pour la détermination de la DL₅₀ (24h) de l'extrait purifié E₂ par la méthode graphique des totaux cumulatifs

Dose en mg/kg	Nombre de souris à tester	Nombres de souris		Totaux cumulatifs	
		mortes	survivantes	mortes	survivantes
24	5	0	5	0	15
28,91	5	1	4	1	10
34,83	5	1	4	2	6
41,97	5	3	2	5	2
50,57	5	5	0	10	0

La courbe de la détermination graphique est présentée sur la figure 6 (p. 45).

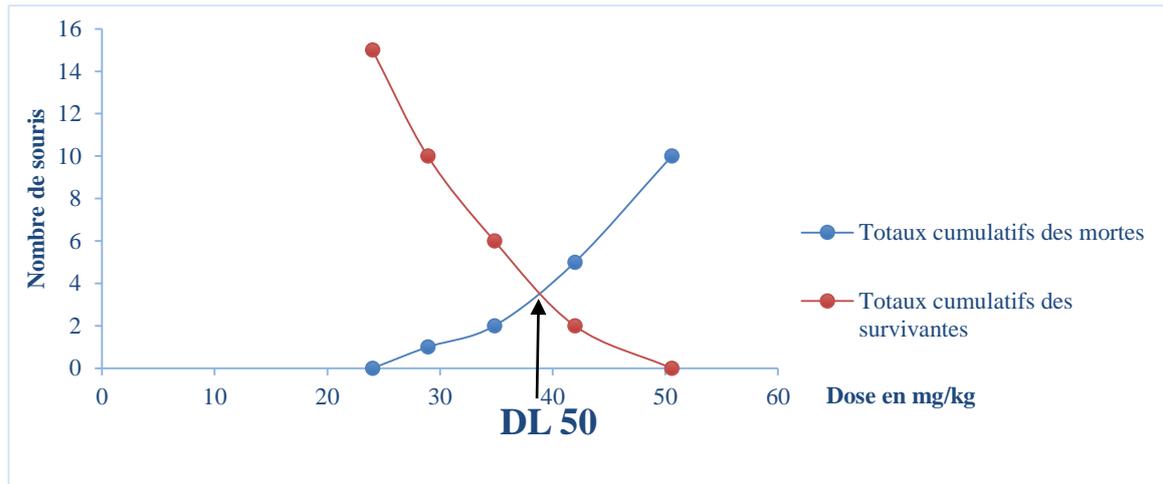


Figure 6: Détermination de la DL₅₀ (24 h) par la méthode graphique des totaux cumulatifs

D'après la méthode graphique la DL₅₀ est estimée à **38,90 mg/kg**.

Selon la méthode de BOYD à partir de la droite de régression linéaire avec $A = -93,21$ et $B = 3,69$ l'équation de la droite étant $Y = -93,21 + 3,69 \log X$, la DL₅₀ est de l'ordre de **38,76 mg/kg**.

D'après ces 3 méthodes la DL₅₀ (24 h) serait comprise entre 38,76 mg/kg et 39,71 mg/kg.

III.1.2 Effets sur les animaux à sang froid

Puisque le test sur les animaux à sang froid nécessite une quantité importante d'extrait, une concentration unique de 2 mg/ml de l'EB a pu être testée sur les têtards de grenouille et les larves de moustique faute d'extrait en quantité suffisante.

III.1.2.1 Effets sur les alevins de carpe

Faute d'extrait, seules les concentrations CL₀ et CL₁₀₀ ont pu être déterminées. Ainsi, la plus faible concentration ne provoquant pas la mort des alevins a été estimée à 10 µg/ml et la plus faible concentration donnant 100% de mortalité à 20 µg/ml. La CL₅₀ reste à déterminer.

III.1.2.2 Effets sur les têtards de grenouille

EB à 2 mg/ml a provoqué au bout d'une heure 100% de mortalité sur les têtards de grenouille.

III.1.2.3 Effets sur les larves de moustique

Le taux de mortalité des larves de moustique en présence de EB à 2 mg/ml est de 80%.

III.2 EFFETS SUR LES VEGETAUX

III.2.1 Effets sur le pouvoir germinatif

Pour l'étude des effets sur le pouvoir germinatif des graines, EB à la concentration unique 1 mg/ml a été utilisé selon la méthode décrite au § II.2.2.1 (p. 39).

Les résultats sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Effet de l'extrait EB à 1mg/ml sur la germination des différentes graines

CLASSE	FAMILLE	NOM SCIENTIFIQUE	NOM COMMUN	% de germination	% d'inhibition
DICOTYLEDONES	APIACEAE	<i>Daucus carotta</i>	Carotte	30	70
	BRASSICACEAE	<i>Brassica sp</i>	Tissam white	80	20
	CUCURBITACEAE	<i>Cucumis sp</i>	Concombre	60	40
	FABACEAE	<i>Pisum sativum</i>	Petis pois	35	65
		<i>Phaseolus vulgaris</i>	Haricot	15	85
	SOLANACEAE	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Tomate	100	0
		<i>Capsicum annum</i>	Poivron	75	25
MONOCOTYLEDONES	AMARYLLIDACEAE	<i>Allium ampeloprasum</i>	Poireau	60	40
	LILIACEAE	<i>Allium cepa</i>	Oignon	55	45
	POACEAE	<i>Zea mays</i>	Maïs	45	55
		<i>Oryza sativa</i>	Riz	30	70

Seule la germination des graines de tomate n'est pas affectée par l'EB. Les autres graines sont inhibées à un taux allant de 20% pour le tissam à 85% pour le haricot.

Notons que tous les lots témoins germent à 100%.

III.2.2 Effets sur le développement des bourgeons axillaires

Les extraits EB et E₂ ont été utilisés pour l'étude des effets sur le développement des bourgeons axillaires (voir II.2.2.2, p. 39) par comparaison avec ceux de la gibbérelline et de l'auxine.

Les résultats sont récapitulés dans le tableau 15 suivant.

Tableau 15 : Longueur des bourgeons axillaires (en mm) des plantules non traitées et traitées avec l'extrait brut, l'extrait purifié, l'auxine et la gibbérelline

Jour	ED	Auxine	Gibbérelline	EB	E ₂
J ₂	1,2	2,4	0,8	0,2	0,34
J ₄	3,2	6,6	3,2	0,52	0,7
J ₆	8,6	16,8	8	1,22	1,1
J ₈	18,2	23,8	17,2	2,1	1,72
J ₁₀	36,4	29,8	36,8	3,64	4,38
J ₁₂	47,6	34,2	55,4	5,16	5,14
J ₁₄	58,2	40,8	74,8	6,22	6

ED : eau distillée

EB : extrait brut méthanolique

E₂ : extrait purifié

D'après ces résultats, EB et E₂ ont des effets nettement inhibiteurs sur la croissance des bourgeons axillaires. Leur activité est plus importante que celle de l'auxine qui est une hormone inhibitrice de croissance.

III.3 EFFETS DES EXTRAITS SUR LES MICROORGANISMES

III.3.1 Test d'antibiogramme

EB et l'extrait E₂ à la même concentration 31,72 mg/ml (rapport 1/1 de l'extrait purifié E₂) ont été testées sur 5 souches bactériennes selon la méthode au § II.2.3.3 (p. 40). L'activité de l'extrait brut aqueux à froid été évalué dans les mêmes conditions à titre comparatif. Le volume d'extrait déposé sur chaque disque est de 10 µl, soit une quantité de toxine de 31,72 µg.

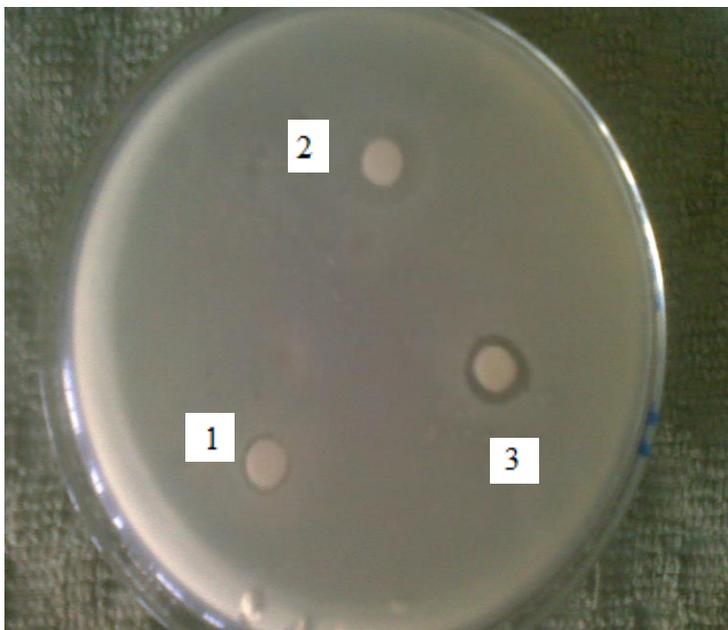
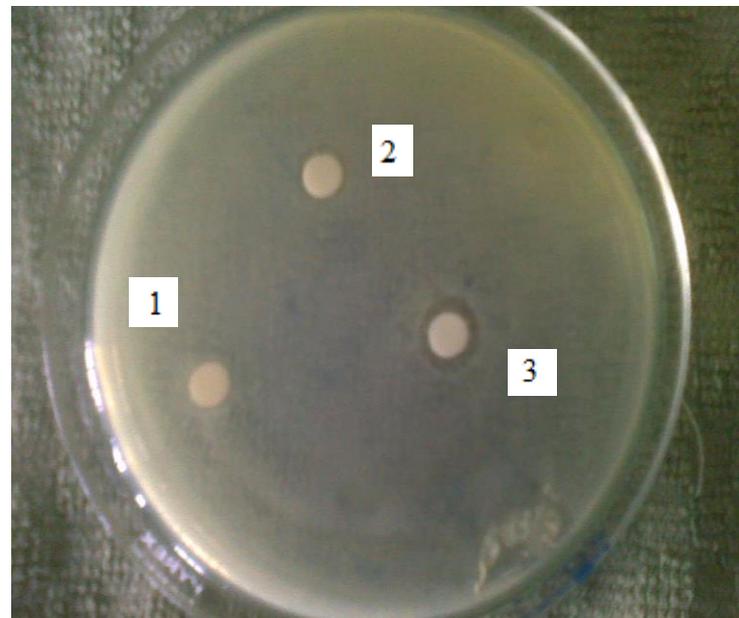
Le résultat est présenté dans le tableau 16 (p. 48).

Tableau 16 : Sensibilité des souches bactériennes aux différents extraits

Germe	Type	Halo d'inhibition (mm)		
		Extrait brut aqueux	EB	E ₂
<i>Bacillus cereus</i>	Gram+	8	8	13
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram+	6	6	9
<i>Enterococcus faecalis</i>	Gram-	6	6	6
<i>Escherichia coli</i>	Gram -	8	8	11
<i>Salmonella typhimurium</i>	Gram -	6	6	7

D'après ces résultats, *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* sont sensibles aux 3 extraits en particulier à l'extrait purifié E₂ *Enterococcus faecalis* est insensible aux 3 extraits tandis que *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhimurium* ne sont sensibles qu'à l'extrait E₂.

Les effets des 3 extraits sur *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* sont montrés sur la figure 7.

Effets sur *Bacillus cereus*Effets sur *Escherichia coli***Figure 7** : Effets des 3 extraits sur *Bacillus cereus* et *Escherichia coli*

Avec : 1 : extrait aqueux à froid ; 2 : extrait EB ; 3 : extrait E₂

Pour obtenir plus d'informations sur l'activité antimicrobienne des graines d'*Albizia aurisparsa*, nous avons testé les extraits hexanique et acétate d'éthyle sur *Bacillus cereus* et *Escherichia coli*, souches sensibles aux 3 extraits bruts (résultats ci-dessus). Les résultats montrent que l'extrait acétate d'éthyle n'est pas actif sur les 2 souches. Par contre, l'extrait hexanique est très actif, surtout sur *Escherichia coli*, donnant un halo de 52 mm. Le résultat est montré sur la figure 8 suivante.

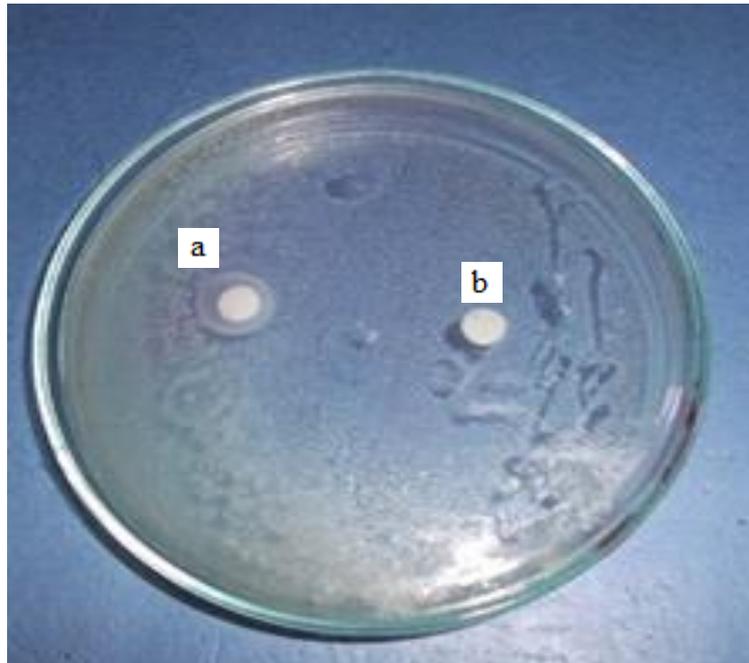


Figure 8 : Effets de l'extrait hexanique sur *Escherichia coli*

a : témoin

b : extrait hexanique

III.3.2 Détermination de la CMI

La CMI a été déterminée pour E₂ sur *Bacillus cereus* (Gram+) et *Escherichia coli* (Gram-) en milieu liquide selon la technique donnée au §II.2.3.4 (p. 41). Les résultats sont donnés dans le tableau 17 (p. 50)

Tableau 17 : Détermination de la CMI de E₂ en milieu liquide sur *Escherichia coli* et *Bacillus cereus*

Tube n°	T+	T-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	T-2
Concentration finale de l'extrait (mg/ml)	0	0	0,12	0,25	0,49	0,99	1,98	3,96	7,92	15,85	31,72	31,72
Turbidité avec <i>E.coli</i>	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
Turbidité avec <i>B.cereus</i>	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-

++ : Présence de trouble abondant (croissance microbienne)

+ : présence de trouble peu abondant (croissance microbienne)

- : absence de trouble (pas de croissance microbienne visible)

D'après ces résultats la CMI de l'extrait E₂ sur les deux souches est estimée à 1,98mg/ml.

III.3.3 Détermination de la CMB

Une ansée de colonie est prélevée de chacun des tubes contenant de l'extrait E₂ de concentration supérieure ou égale à la CMI c'est-à-dire des tubes n° 5 à 9 et est ensemencée chacun en stries dans une boîte de Petri (voir §II.2.3.5, p. 42). D'après les résultats la concentration de E₂ correspondant à la CMB c'est-à-dire ne donnant plus de croissance visible est estimée à 15,85 mg/ml pour *Bacillus cereus* et 31,72 mg/ml pour *Escherichia coli*.

IV-DISCUSSION

Dans cette deuxième partie, la toxicité de l'extrait brut EB et de l'extrait purifié E₂ a pu être évaluée sur divers organismes vivants :

Chez la souris les principaux symptômes d'intoxication provoqués par E₂ par voie ip à la dose létale 50,57 mg/kg sont surtout : une contorsion abdominale, une hyperhémie, une exophtalmie et une diminution du rythme respiratoire, ce qui porte à penser que les principes toxiques agissent sur divers organes mais surtout au niveau du système nerveux. Ces effets correspondent bien à ceux des alcaloïdes (<http://www.ecosociosystemes.fr/alcaloide.html>) dont la présence a été détectée dans ces extraits.

La DL₅₀ (24 h) de E₂ est comprise entre 38,76 mg/kg et 39,71 mg/kg. L'extrait E₂ peut être qualifié de moyennement toxique. En effet, il est plus toxique que celui d'*Albizia arenicola*, *Albizia boinensis*, *Albizia bernieri*, *Albizia boivini*, et *Albizia polyphylla* et moins toxique que celui d'*Albizia greveana*, *Albizia tuleariensis*, *Albizia sp* et *Albizia mahalao*. Les valeurs de la DL₅₀ des extraits d'autres représentants d'*Albizia* étudiés au LABASM sont présentées dans le tableau 18 suivant.

Tableau 18 : Comparaison de la DL₅₀ (24 h) de E₂ avec celle des autres *Albizia*

Espèce et organe utilisé	DL ₅₀ (24h) en mg/kg	Référence
<i>A. greveana</i>	1,13-2,02	RAHELIARISATA, 2014
<i>A. tuleariensis</i> (graines)	2,92-3,2	RAONIHARISOA, 2003
<i>A. sp</i> (graines entières)	8,7	RAMAMONJISOA, 1998
<i>A. mahalao</i> (graines)	22,22-24,4	RAKOTOARIVONY, 2012
<i>A. aurisparsa</i> (graines)	38,76-39,71	Auteur
<i>A. arenicola</i> (feuilles)	41,42-41,44	RAKOTOMALALA, 2012
<i>A. boinensis</i> (feuilles)	51,2-51,6	AHMED, 2009
<i>A. bernieri</i> (graines)	53,49-55	RAHARISOA, 1999
<i>A. boivini</i> (cosses)	57-60	ARISOA, 2001
<i>A. polyphylla</i> (feuilles)	63,14-63,49	RAKOTONDRA SOA, 2000

Chez les animaux à sang froid, EB à 2 mg/ml est toxique sur les têtards de grenouille et les larves de moustique. Pour les têtards, la valeur de la CL₅₀ (24h) reste à déterminer en

utilisant différentes concentrations inférieures à 2 mg/ml (valeur déjà considérée comme élevée). Pour les alevins les résultats obtenus indiquent que la CL₅₀ (24h) est située entre 10 µg/ml (CL₀) et 20 µg/ml (CL₁₀₀).

La valeur des CL₅₀ pour les têtards de grenouille et pour les alevins de carpe des autres *Albizia* sont résumés dans le tableau 19.

Tableau 19 : CL₅₀ (24h) en µg/ml sur les têtards de grenouille et les alevins de carpe des autres *Albizia*

Espèce	CL50 sur les têtards	CL50 sur les alevins	Référence
<i>A.tuleariensis</i> (graines)	15,04	2,29	RAONIHARISOA, 2003
<i>A.mahalao</i> (graines)	21,87	Non testé	RAKOTOARIVONY, 2012
<i>A.boinensis</i> (feuilles)	46,08	21,20	AHMED, 2009
<i>A.arenicola</i> (amande de graines)	3,22	2,73	RANDRIANARIVO, 2003
<i>A.arenicola</i> (feuilles)	103	Non testé	RAKOTOMALALA, 2012
<i>A.polyphylla</i> (feuilles)	369	174	RAKOTONDRA SOA, 2000
<i>A.boivini</i> (cosses)	541,39	190,30	ARISOA, 2001
<i>A.aurisparsa</i> (graines)	Toxique à 2mg/ml	Entre 10 µg et 20µg	Auteur

Albizia aurisparsa fait partie des plantes qui présentent une activité toxique sur les larves de moustique à l'instar d'*Albizia arenicola* (RANDRIANARIVO, 2003), *Albizia greveana* (RAHELIARISATA, 2014), *Deinbollia boinensis* (RAKOTOBE, 2003) et *Schefflera longipedicellata* (RASOLOHARIJAONA, 2008). Les effets de ces extraits sur les larves de moustique sont donnés dans le tableau 20 (p. 53).

Il est à noter qu'une activité larvicide sur *Culex quinquefasciatus* a aussi été trouvée chez des plantes étrangères telles que *Euphorbia tirucalli* (RAHUMAN et al., 2007) et *Ocimum basilicum* (MANZOR, SAMREEN et PARVEEN, 2013).

Tableau 20 : Effets des extraits des plantes toxiques sur les larves de moustique

Espèce	Concentration utilisé en mg/ml	Taux de mortalité
<i>Albizia arenicola</i>	0,7	100%
<i>Albizia greveana</i>	0,15	50%
<i>A.aurisparsa</i>	2	80%
<i>Deinbollia boinensis</i>	2	50%
<i>Schefflera longipedicellata</i>	1,60	50%

Chez les végétaux la germination des diverses graines de Monocotylédones et de Dicotylédones étudiés est inhibée par EB à 1mg/ml avec un taux variable mais la graine la plus sensible est celle du haricot avec un taux d'inhibition de 85% et la moins sensible est celle de la tomate avec 0% d'inhibition. Cette différence pourrait s'expliquer par la différence physiologique des graines testées. En outre, l'inhibition de la germination pourrait être dû soit à un effet direct sur les embryons en entraînant leur destruction soit à un effet indirect par inactivation des enzymes responsables de la germination (WESTON et DUKE, 2003 ; BERRY et coll., 2008).

EB et E₂ ont un effet inhibiteur sur la croissance des bourgeons axillaires, effet plus important que celui de l'auxine (hormone inhibitrice de la croissance des bourgeons axillaires) d'après nos résultats. Cet effet est comparable à celui des extraits purifiés des feuilles d'*Albizia boinensis* (AHMED, 2009), *Albizia arenicola* (RAKOTOMALALA, 2012) et *Pittosporum ochrosiaefolium* (ANDRIANTSOANIRINA, 2006) qui figure parmi les plantes les plus actives sur la croissance des végétaux supérieurs (RAKOTO-RANOROMALALA, 2012).

Les tests sur **les microorganismes** ont montré que EB et E₂ sont actifs sur des bactéries Gram – et Gram +. Cependant EB n'est actif que sur deux souches à savoir *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* parmi les cinq testés, tandis que E₂ agit sur 4 souches, à savoir *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhimurium*. Il est possible que des constituants de EB interagissent de manière négative avec les principes antibactériens.

La CMI de E₂ est la même sur *Bacillus cereus* (Gram +) et sur *Escherichia coli* (Gram -), c'est-à-dire 1,98 mg/ml. E₂ est nettement plus actif sur *Bacillus cereus* que les extraits des feuilles de *Gambeya boiviniana* (CMI = 50 mg/ml) (RASOATAHIANA, 2005) et sur

Escherichia coli que les extraits des graines d'*Albizia mahalao* (CMI = 15 mg/ml) (RAKOTOARIVONY, 2012).

Les valeurs de CMB sur *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* sont respectivement 15,85mg/ml et 31,72 mg/ml. E₂ est donc bactériostatique pour les 2 souches étant donné que les rapports CMB/CMI respectifs sont supérieurs à 4 (MARMONIER, 1990). Cette propriété pourrait être exploitée dans l'élaboration d'un antiseptique.

Par ailleurs, l'extrait hexanique montre une activité très importante sur *Escherichia coli* (halo d'inhibition : 52 mm). L'étude de ces activités antibactériennes de l'extrait E₂ et l'extrait hexanique devrait être étendue à d'autres souches bactériennes afin de rechercher un effet bactéricide éventuel. Ceci est très important dans la lutte contre les maladies infectieuses.



*Conclusion générale et
perspectives*

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Pour conclure, les travaux préliminaires ainsi réalisés sur *Albizia aurisparsa*, une FABACEE endémique de Madagascar, nous ont permis :

- ✓ de démontrer l'activité toxique sur souris des graines d'*Albizia aurisparsa* ;
- ✓ d'établir un procédé d'extraction et de purification de ces principes toxiques ;
- ✓ de fournir des informations sur leurs propriétés physico-chimiques ainsi que leur nature chimique ;
- ✓ de mettre en évidence quelques-unes de leurs propriétés biologiques ;
- ✓ de contribuer à la valorisation de la biodiversité endémique de Madagascar.

Dans l'avenir, nous nous proposons :

- d'améliorer les procédés d'extraction et de purification pour obtenir un extrait totalement purifié ;
- d'approfondir l'étude de leurs propriétés physico-chimiques et déterminer leur nature chimique exacte ;
- d'étudier leur mécanisme d'action ;
- de prospecter leurs effets sur d'autres organismes afin de les utiliser en tant qu'anti-vectoriel ou anti-infectieux ;
- d'approfondir les propriétés antimicrobiennes de l'extrait hexanique.



*Références
bibliographiques*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABDALLA M.A., HERTMUT L. Flavonoids from sudanese *Albizia zygia* (LEGUMINOSAE), a plant with antimalarial potency. *Afr. J. Trad. Complement. Altern. Med.* 2012, 9(1) : 56-58.

ABOUBACAR M.M. Etude chimique et toxicologique des extraits de feuilles d'*Anacardium occidentale*. [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2007 ; 96 p.

AHMED A. Etudes chimique et toxicologique des extraits de feuilles d'*Albizia boinensis* (FABACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2009 ; 63 p.

ANDRIANTSOA H. Contribution à la purification et à la caractérisation d'un principe antimicrobien des graines d'une Légumineuse, *Albizia lebbeck*. [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1983 ; 42 p.

ANDRIANTSOANIRINA L.V. Etude chimique et toxicologique des principes toxiques des feuilles de *Pittosporum ochrosiaefolium* (PITTOSPORACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2006 ; 70 p.

ARISOA A.A. Etude chimique et biologique d'extraits toxiques de fruits d'*Albizia boivini* (MIMOSOÏDEAE, FABACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2001 ; 67 p.

ASSIS T.S., ALMEIDA R.N., CUNHA E.V.L., MEDEIROS J.A., LIMA A.M., SAUZA F.V.M., SILVA M.S., BRAZFILHO R., BARBOSAFILHO J.M. Two new macrocyclic alkaloids from *Albizia inopinata*. *Lat. Am. J. of Pharm.* 1999, 18 : 271-275.

ASSIS T.S., ALMEIDA R.N., BARBOSA-FILHO J.M., MEDEIROS I.A. CNS pharmacological effects of the total alkaloidal fraction from *Albizia inopinata* leaves. *Fitoterapia* 2001, 72(2) : 124-130.

BABU N.P., PANDIKUMAR P., IGNACIMUTHU S. Anti-inflammatory activity of *Albizia lebbeck* Benth, an ethnomedicinal plant in acute and chronic animal models of inflammation, *J. Ethnopharmacol.* 2009, 125 : 356-360.

BARBIER B., LEYNAUD G., CHAMP P. Les tests de toxicité sur les poissons. Techniques et sciences municipales, 1974, 69(6), 346-350.

BERRY J.P., GANTAR M., PEREZ M.H., BERRY G., NORIEGA F.G. Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algaecides, herbicides and insecticides. *Mar. Drugs* 2008, 6 : 117-146.

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

BRUNETON J. Pharmacognosie et phytochimie, plantes médicinales 2^{ème} Edition. Paris, France : Lavoisier, 1993 ; 915 p.

BURKILL, H.M. The useful plants of West Tropical Africa 2nd Edition. Volume 3, Families J–L. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, United Kingdom, 1995 ; 857 p.

CAPURON R. Le genre *Albizia* Durazz (Légumineuses, Mimosoïdées). In : Matériaux pour l'étude de la flore de Madagascar, 1970.

CHENG Z.K., YANG D., MA Q.Y., YI X.H., ZHANG N.L., ZOU J., ZHAO Y.X. Triterpenoid saponins from *Albizia mollis*. *Bull. Korean chem. Soc.* 2011, 32(4) : 1403-1406.

COLLIER R. J. Inhibition of protein synthesis by exotoxins from *Corynebacterium diphtheriae*. In: The specificity and action of animal, bacterial and plant toxins. (Receptors and recognition, series B, vol. D). London : CUATRECASAS P., Chapman and Hall, 1977 ; 69-98.

CORDELL G.A. Introduction to alkaloids, a biogenetic approach. New York : John Wiley, 1981 ; 441 p.

DALTON D.R. The alkaloids. The fundamental chemistry, a biogenetic approach. New York : Plenum Press, 1989 ; 565 p.

DAVID R. Les hormones végétales. Paris, 1952 ; 125 p.

DEBELLA A., HASLINGER E., SCHMID M. G., BUCAR F., MICHL G., ABEBE D., KUNERT G. Triterpenoid saponins and sapogenin lactones from *Albizia gummifera*. *Phytochemistry* 2000, 53 : 885-892.

DIXIT, A.K., MISRA, L.N. Macrocyclic budmunchiamine alkaloids from *Albizia lebbek*. *J. Nat. Prod.* 1997, 60 : 1036-1037.

DU PUY D.J., LABAT J.N., RABEVOHITRA R., VILLIERS J.F., BOSSER J., MOAT J. The Leguminosae of Madagascar. Kew : Royal Botanic Garden, 2002 ; 243-270 p.

DUVAL J., SOUSSY C.J. Antibiothérapie 4^{ème} Edition. Paris : Masson, 1991 ; 188 p.

FERRON A. Bactériologie médicale 15^{ème} Edition. Paris, 1994 ; 472 p.

FONG H.H.J., TIN W.A.M. and FARNSWORTH N.R. Phytochemical screening. Chicago: Review University of Illinois, 1977 ; 73-126.

GALAL M., BASHIR A.K., SALIH A.M., ADAM S.E.I. Activity of water extracts of *Albizzia anthelmintica* and *Albizzia lebbek* barks against experimental *Hymenolepis diminuta* infection in rats. *J. Ethnopharmacol.* 1991, 31 : 333-337.

GANGULI N.B., BHATT R.M. Mode of action of active principles from stem bark of *Albizia lebbek*. *Indian J. Experiment. Biol.* 1993, 31 : 125-129.

GUPTA R.S., KACHHAWA J.B., CHAUDHARY R. Antispermatic, antiandrogenic activities of *Albizia lebbek* (L.) Benth bark extract in male albino rats. *Phytomed.* 2006, 13 : 277-283.

HELLER R., ESNAULT T.R., LANCE C. Abrégé de physiologie végétale: Développement 5^{ème} Edition. Paris : Masson, 1955 ; 90-126.

HEMINGWAY R.W., KARCHESY J.J. Chemistry and significance of condensed tannins. New York : Plenum Press, 1989 ; 249-264.

HIGUCHI H., KINJO J., NOHARA T. An arrhythmic-inducing glycoside from *Albizia julibrissin* Durazz IV. *Chem. Pharm. Bull.* 1992, 40 : 829-831.

ITO A., KASAI R., DUC N.M., OHTANI K., NHAM N.T., YAMASAKI K. Alkaloid from bark of *Albizia myriophylla*. *Chem. Pharm. Bull.* 1994, 42(9) : 1966-1967.

KADER M., HOCH J., JOHN M., EVANS R., JAMES S., STEPHEN W., DALTON, JAMES M., KINGSTON G.I. Two biologically active saponins from *Albizia subdimidiata* from the Suriname rainforest. *J. Nat. Prod.* 2001, 64 : 536-539.

KAMOUM P. Appareils et méthodes en biochimie 3^{ème} Edition. Paris : Flammarion, 1987 ; 373 p.

KAMOUM P. Appareils et méthodes en biochimie. 3^{ème} Edition. Paris : Médecine-Sciences Flammarion, 1991 ; 363 p.

KANG J., HUO C.H., LI Z., LI Z.P. New ceramides from the flower of *Albizia julibrissin*. *Chinese chem. Let.* 2007, 18 : 181-184.

KAVIRIRI D. Inventaire et description des FABACEAE arbres (MIMOSOIDAE ET FABOIDAE) de Kinshasa et ses environs, 2009.

KRIEF S., THOISON O., SEVENET T., WRANGHAM R.W., LAVAUD C. Anthranilates saponines triterpénoïdes d'*Albizia grandibracteata*, feuilles ingérées par les Primates en Ouganda. *J. Nat. Prod.* 2005, 68 (6) : 897-903.

LAU, C.S., CARRIER D.J., BEITLÉ R.R., BRANSBY D.I., HOWARD L.R., LAY J.J., LIYANAGE R., CLAUSEN E.C. Identification and quantification of glycoside flavonoids in the energy crop *Albizia julibrissin*. *Bioresour. Technol.* 2007, 98 : 429-435.

LEMMENS, R.H.M.J. *Albizia adianthifolia* (Schumach.) W.Wight. In : Louppe, D., Oteng-Amoako, A.A. & Brink, M. (Editeurs). Protas 7(1) : Timbers/Bois d'œuvre 1. [CD-Rom]. PROTA, Wageningen, Pays Bas ; 2007.

LIU R., SHUANGGANG M., SHISHAN Y., YUEHU P., SEN Z., XIAO GUANG C., JIANJUN Z. Cytotoxic oleanane triterpene saponins from *Albizia chinensis*. *J. Nat. Prod.* 2009, 72 : 632-663.

MAHUZIER G., HAMON M. Méthodes de séparation (Abrégé de chimie analytique, T2) 2^{ème} Edition. Paris : Masson, 1990 ; 262 p.

MANGAMBU M.J., MUSHAGALUSA K.F., KADIMA N.J. Contribution à l'étude phytochimique de quelques plantes médicinales antidiabétiques de la ville de Bukavu et ses environs (Sud-Kivu, RD de Congo). *J. Appl. Biosci.* 2014, 75 : 6211-6220.

MANZOOR F, SAMREEN K.B., PARVEEN Z. Larvicidal activity of essential oils against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae (DIPTERA: CULICIDAE). *J. Anim. Plant Sci.* 2013, 23(2) : 420-424.

MARMONIER A.A. Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. In : Bactériologie médicale, techniques usuelles 3^{ème} Edition. Paris : Doin, 1990 ; 227-236.

MBOSSO E.J.T., NGOUELA S., NGUEDIA J.C.A., BEN, V.P., ROHMER M., TSAMO E. *In vitro* antimicrobial activity of extracts and compounds of some selected medicinal plants from Cameroon. *J. Ethnopharmacol.* 2010, 128 : 476-481.

MELEK F.R., MIYASE T., GHALY N.S., NABIL M. Triterpenoid saponins with N-acetyl sugar from the bark of *Albizia procera*. *Phytochemistry* 2007, 68 : 1261-1266.

MORELAND D.E. Effets of toxicants on oxydative and photophosphorylation. In : Introduction to Biochemical Toxicology. Edited by HODGSON E. and GUTHRIE E.F. 1980 ; 245-260.

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

NOTE O.P., MITAINE-OFFER A.C., MIYAMOTO T., PAULULAT T., MIRJOLET J.F., DUCHAMP O., PEGNYEMB D.E., LACAILLE-DUBOIS M.A. Cytotoxic acacic acides glycosides from the roots of *Albizia coriaria*. *J. Nat. Prod.* 2009, 72(10) : 1725-1730.

OMS. Rapport technique n°443 : Résistance aux insecticides et lutte antivectorielle. Genève: 17^{ème} rapport du comité OMS d'experts des insecticides de Serbie, 1970 ; 306 p.

OVENDEN S.P.B., CAO S., LEONG C., FLOTOW H., GUPTA M.P., BUSS A.D., BUTLER M.S. Spermone alkaloids from *Albizia adinocephala* with activity against *Plasmodium falciparum*. *Phytochemistry* 2002, 60 : 175-177.

- PAL B.C., ACHARI B., YOSHIKAWA K., ARIHARA S. Saponins from *Albizia lebbek*. *Phytochemistry* 1995, 38(5) : 1287–1291.
- RAHARISOA N. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes toxiques d'*Albizia bernieri* (FABACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1999 ; 72 p.
- RAHELARISATA V.A. Purification et caractérisation partielle des principes toxiques de graines d'*Albizia greveana* (FABACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2014 ; 90 p.
- RAHELINAINAMANDIMBY L. Etude chimique et biologique d'extraits toxiques d'*Olex lanceolata* (OLACACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003 ; 69 p.
- RAHERINAINA C.E. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes toxiques d'*Albizia boivini* (FABACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1998 ; 74 p.
- RAHMAN N.N., AKTAR S., HASAN C.M., JABBAR A. Anticancer agent from *Albizia lebbek*. *Acta Horticulturae* 1986 : 69-81.
- RAHUMAN A.A., GOPALAKRISHNAN G., VENKATESAN P., GEETHA K. Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Ethnopharmacol.* 2005, 97(2) : 199-206.
- RAJEMIARIMOELISOA C.F. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes actifs d'*Albizia polyphylla* (MIMOSOÏDEAE-LEGUMINOSEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1996 ; 76 p.
- RAJEMIARIMOELISOA C.F. Isolement, caractérisation chimique et biologique du principe actif d'*Albizia odorata* (MIMOSOÏDEE-FABACEE). [Thèse de Doctorat : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2000 ; 113 p.
- RAJKUMAR T., SINHA B.N. Chromatographic finger print analysis of budmunchiamines in *Albizia amara* by HPTLC technique. *Int. J. Res. Pharm. Sci.* 2010, 1(3) : 313-316.

RAKOTOARIVONY R.F. Etudes chimique et toxicologique des extraits de graines entières d'*Albizia mahalao*, une Fabacée endémique de Madagascar. [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2012 ; 59 p.

RAKOTOBE L. Etude chimique et toxicologique des extraits toxiques de feuilles de *Deinbollia boinensis* (SAPINDACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003 ; 105 p.

RAKOTOMALALA A.T. Etudes chimique et toxicologique des extraits de feuilles d'*Albizia arenicola* (FABACEAE), endémique de Madagascar. [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2012 ; 63 p.

RAKOTONDRA SOA N.S. Etude chimique et biologique des extraits toxiques de feuilles d'*Albizia polyphylla* (MIMOSOÏDAE, FABACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2000 ; 72 p.

RAKOTONDRAZANAKA L. Contribution à l'étude chimique et toxicologique des principes toxiques de *Xerosicyos danguyi* (CUCURBITACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1999 ; 61 p.

RAKOTO-RANOROMALALA D.A.D. Synthèse des travaux : Etude de plantes toxiques malgaches. [Habilitation à Diriger des Recherches en Sciences de la vie : Biochimie], vol II. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2012 ; 149 p.

RAKOTO-RATSIMAMANGA A. Inventaire des pesticides naturels d'origine végétale à Madagascar. Madagascar : VOARISOA, L'environnement et les produits toxiques, 1998 ; 291 p.

RAMAMONJISOA E.D. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes toxiques d'*Albizia sp.* [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1998 ; 66 p.

RAMBELOHARINTSOA N.M. Etudes chimique et toxicologique des extraits de feuilles de *Dialium unifoliatum*. [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2013 ; 91 p.

RANDRIANANDRASANA J. Etudes chimique et toxicologique des extraits toxiques d'écorces de tige d'*Uapaca thouarsii* (EUPHORBIACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2004 ; 68 p.

RANDRIAMAMPIANINA L. J. Etudes chimique et biologique des extraits de feuilles d'une plante médicinale malgache *Chassalia bojeriana* (RUBIACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2008 ; 59 p.

RANDRIANARIVO H.R. Isolement, caractérisation chimique et biologique des principes toxiques d'*Albizia arenicola* (MIMOSOIDEAE-FABACEAE). [Thèse de Doctorat : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003 ; 159 p.

RANDRIANARIVO H.R. Purification et caractérisation partielles des principes actifs d'*Albizia arenicola* (MIMOSOIDEAE-FABACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1996 ; 83 p.

RAONIHARISOA P. Etude chimique et toxicologique des extraits toxiques de graines d'*Albizia tulearensis* (MIMOSOIDEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003 ; 78 p.

RASOATAHINA V. Etude chimique et toxicologique des principes toxiques de feuilles de *Gambeya boiviniana* (SAPOTACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2005 ; 64 p.

RASOLOHARIJAONA F.Y. Etudes chimique et toxicologique d'une plante médicinale malgache, *Schefflera longipedicellata* (ARALIACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2008 ; 82 p.

RASOLONDRAIBE O.N. Etudes chimique et toxicologique des extraits toxiques de feuilles de *Xylopi humblotiana* (ANNONACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2007 ; 67 p.

REED L., MUENCH H.A. Simple method of estimating fifty per cent points. *Am. J. Hyg.* 1938, 27 : 293.

ROCHAT H., KOPEYANA C., GARCIA L.C., MARTINEZ G., ROSOS J.P., PAKARIS A., MARTIN M.F., GARCIA A., MARTIN-MOUTOT N., GREGOIRE J., MIRANDA F. Recent results on the structure of scorpion and snake toxins. *In* : Animal, plant and microbial toxins (Chemistry, Pharmacology and Immunology, vol. 2). Edited by Hayashia and Saway, 1976 ; 79-87.

RUKAYADI Y., SHIM J.S., HWANG J.K. Screening of Thai medicinal plants for anticandidal activity. *Mycoses* 2008, 51 : 308-312.

RUKUNGA G.M., WATERMAN P.G. Spermine alkaloids from *Albizia schimperana*. *Phytochemistry* 1996, 42 (4) : 1211-1215.

RASOANAIVO P., PETITJEAN A., CONAN J.Y. Toxic and poisonous plants of Madagascar : an ethnopharmacological survey. *Fitoterapia* 1993, 64(2) : 114-129.

SOIFOINI T. Etude chimique et toxicologique des extraits de racines de *Rhodocodon madagascariensis* (LILIACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2006 ; 99 p.

SUDHARAMESHWARI K., RHADIKA J. Antibacterial screening of *Aegle marmelos*, *Lawsonia inermis* and *Albizia lebbek*. *Afr. J. Trad. CAM.* 2007, 4 (2) : 199-204.

SUJATHA V., SUBRAMANIAN D.P., KARUPPANNIAN K., Phytopharmacological properties of *Albizia* species : a review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2013, 5 (3) : 70-73.

THOITHI G.N., MAINGI N., KARUME D., GATHUMBI P.K., MWANGI JW, KIBWAGE IO. Anthelmintic and other pharmacological activities of the root bark extracts of *Albizia anthelmintica* Brongn. *East Cent. Afr. J. Pharm. Sc.* 2002, 5(3) : 60-66.

VERNIN G. La chromatographie sur couche mince, techniques et applications en chimie organique. Paris : Dunod, 1970 ; 178 p.

WESTON L.A., DUKE S.O. Weed and crop allelopathy. *Critical Reviews in Plant Sciences* 2003, 22, 367-389.

ZHANG H., SAMADI A.K., RAO K.V., COHEN M.S., TIMMERMANN B.N. Cytotoxic oleanane-type saponins from *Albizia inundata*. *J. Nat. Prod.* 2011, 74(3) : 477-482.

ZHENG L., ZHENG J., ZHOO Y., WANG B., LIJUN W., LIANG H. Three antitumor saponins from *Albizia julibrissin*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 16 : 2765-2768.

ZOU K., ZHAO Y., TU G., CUI J. JIA Z., ZHANG R. Two diastereomeric saponins with cytotoxic activity from *Albizia julibrissin*. *Carbohydr Res.* 2000, 324 (3) : 182-188.

ZOU K., ZHAO Y.Y., ZHANG R.Z. A cytotoxic saponin from *Albizia julibrissin*. *Chem. Pharm. Bull.* 2006, 54 (8) : 1211-1212.

REFERENCES WEBOGRAPHIQUES

<http://www.ecosociosystemes.fr/alcaloide.html>

http://www.mobot.org/MOBOT/Madagasc/digital/CALLMANDER_496_MC_s.jpg



Annexes

ANNEXES

ANNEXE I

Description botanique de la famille des FABACEAE

(KAVIRIRI, 2009)

La famille des FABACEAE ou Légumineuses est une très grande famille de plantes comprenant 12000 espèces réparties en plus de 650 genres. Elle est très cosmopolite et est subdivisée en trois sous-familles :

- Les *Faboideae* anciennement appelée *Papilionaceae*, avec une fleur typique en forme de papillon ;
- Les *Caesalpinioideae* autrefois appelée *Caesalpinaceae* avec une fleur pseudo-papilionacée ;
- Les *Mimosoideae*, ancienne famille de *Mimosaceae* avec une fleur régulière.

Les FABACEAE peuvent être des plantes herbacées, des arbustes, des arbres ou des lianes.

Caractéristiques générales des FABACEAE

- Feuilles alternes normalement composées pennées rarement bipennées, folioles toujours à bord entier ;
- Racines généralement pivotantes ;
- Fleur hermaphrodite à caractère zygomorphe ;
- Fruit se présentant en gousse coriace ou ligneuse, déhiscente ou indéhiscente s'ouvrant à maturité ;
- Ovaire constitué d'un seul carpelle avec plusieurs ovules.

Description botanique du genre *Albizia*

Albizia est un genre botanique d'environ 150 espèces de petits arbres et arbustes tropicaux ou sub-tropicaux à croissance rapide.

Il appartient à la sous-famille des *Mimosoideae* selon la classification phylogénétique. Le genre doit son nom à Filippo del Albizzi, un italien qui l'introduisit en Europe au milieu du XVIII^e siècle.

Il est courant dans les régions tropicales d'Asie, d'Afrique, de Madagascar, d'Amérique centrale et du sud et en Australie.

Les feuilles, finement découpées, sont composés de petites folioles qui se replient sur elles-mêmes lorsque la plante manque de lumière.

Les fleurs, petites et en pompon, exhibent des étamines souvent spectaculaires et plus longues que les pétales. Certaines espèces sont considérées comme envahissantes.

Les fruits sont indéhiscents pouvant être ligneux, ou coriaces, cylindriques ou épais ou fortement aplatis ; ils peuvent être droits, ou courbes.

Les graines peuvent être très aplaties ou cylindriques ou très comprimées.

ANNEXE II

Caractéristiques des solvants utilisés pour l'extraction par épuisement

Solvant	Polarité	Température d'ébullition
Hexane CH ₃ -(CH ₂) ₄ -CH ₃	0,001	68 à 69°C
Acétate d'éthyle CH ₃ COOC ₂ H ₅	0,44	64,9 °C
Méthanol CH ₃ -OH	0,95	64,9 °C

ANNEXE III

Composition du réactif à la vanilline sulfurique

Vanilline	0,5g
Acide sulfurique H ₂ SO ₄	36 N

ANNEXE IV

Composition des réactifs généraux pour les alcaloïdes

Réactif de MAYER :

Chlorure de mercure	1,36 g
Iodure de potassium	5 g
Eau distillée	qsp 100 ml

Réactif de WAGNER :

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

Réactif de DRAGENDORFF :

Il s'agit d'un mélange (v/v) de deux solutions, A et B.

Solution A :

Nitrate de bismuth	1,7 g
Acide tartrique concentré	20 g
Eau distillée	qsp 100 ml

Solution B :

Iodure de potassium.....	10 g
Eau distillée	qsp 40 ml

Le mélange est ensuite additionné de 10 g d'acide tartrique et son volume est ramené à 100 ml par de l'eau distillée.

ANNEXE V**Composition des milieux de culture****Milieu de MUELLER-HINTON (milieu solide)***Formule-type (g/l)*

Extrait de viande.....	2,0
Peptone tryptique de caséine	17,5
Amidon	1,5
Agar	15,0
pH 7,3 ± 0,1 à 25°C	

Milieu NUTRIENT BROTH (milieu liquide)*Formule-type (g/l)*

Peptone	5
Chlorure de sodium	5
Extrait de viande	1
Extrait de levure	2

Name : ANDRIAMIARINJO

First names : Nomenantenaina Faratiana

Title : Purification et caractérisation partielles des principes toxiques des graines d'*Albizia aurisparsa* une FABACEAE endémique de Madagascar

ABSTRACT

The seed extracts of *Albizia aurisparsa* an endemic FABACEAE of Madagascar showed a toxic activity on mouse.

The toxic principles were purified starting from methanolic crude extract (EB) thanks to a process including two successive fractionations respectively with the ethyl acetate and n-butanol and a chromatography of exclusion on Sephadex G25 support.

The toxic principles were thermostable, soluble in distilled water, methanol and n-butanol but insoluble in ethyl acetate. According to their behaviour on Sephadex G25 their molecular weight should be situated between 1500 and 5000 Da.

The phytochemical screening revealed the presence of alkaloids in the purified extract.

The symptoms of intoxication on mouse by IP route of the purified extract E₂ suggested that the active ingredients acted on the central nervous system. The DL₅₀ lies between 38.76mg/kg and 39.71 mg/kg.

At 2 mg/ml, EB was toxic on the frog tadpoles and the larvae of mosquito. In addition, CL₅₀ of EB on fish alevins ranked from 10 µg/ml to 20 µg/ml.

EB inhibited the seed germination of several species of Monocotyledones and Dicotyledones. Moreover EB and E₂ inhibited the growth of the pea seedlings axillary buds.

In addition, EB, E₂ and the hexanic crude extract were active on *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. The extract E₂ CMI on the two germs was the same i.e. 1.98 mg/ml and the respective CMB were 15.85 mg/ml and 31.72 mg/ml. E₂ was thus bacteriostatic.

Key words : *Albizia aurisparsa*, FABACEAE, poison, inhibition, DL₅₀, CL₅₀, antibacterial, CMI, CMB

Nom : ANDRIAMIARINJO

Prénoms : Nomenantenaina Faratiana

Titre : Purification et caractérisation partielles des principes toxiques des graines d'*Albizia aurisparsa* une FABACEAE endémique de Madagascar

RESUME

Les extraits de graines d'*Albizia aurisparsa*, une FABACEAE endémique de Madagascar ont montré une activité toxique sur souris.

Les principes toxiques ont été purifiés à partir de l'extrait brut méthanolique (EB) grâce à un procédé comprenant deux fractionnements successifs, respectivement avec l'acétate d'éthyle et le n-butanol et une chromatographie d'exclusion sur gel Sephadex G25.

Les principes toxiques sont thermostables, solubles dans l'eau distillée, le méthanol et le n-butanol mais insolubles dans l'acétate d'éthyle. D'après leur comportement sur gel Sephadex G25, leur poids moléculaire serait compris entre 1500 et 5000 Da.

Le criblage phytochimique révèle la présence d'alcaloïdes dans l'extrait purifié.

Les symptômes d'intoxication sur souris par voie ip de l'extrait purifié E₂ suggèrent que les principes actifs agissent au niveau du système nerveux central. La DL₅₀ est comprise entre 38,76 mg/kg et 39,71mg/kg.

A 2 mg/ml, EB est toxique sur les têtards de grenouille et les larves de moustique. Par ailleurs, la CL₅₀ de EB sur les alevins de poisson est située entre 10 µg/ml et 20 µg/ml.

EB inhibe la germination de graines de plusieurs plantes Monocotylédones et Dicotylédones. De plus, EB et E₂ inhibent la croissance des bourgeons axillaires des plantules de petit pois.

Par ailleurs, EB, E₂ et l'extrait brut hexanique sont actifs sur *Bacillus cereus* et *Escherichia coli*. La CMI de l'extrait E₂ sur les deux souches est la même, c'est-à-dire 1,98 mg/ml et les CMB respectives sont de 15,85 mg/ml et 31,72 mg/ml. E₂ est donc bactériostatique.

Mots clés : *Albizia aurisparsa*, FABACEAE, toxique, inhibition, DL₅₀, CL₅₀, antibactérien, CMI, CMB