



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE

MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES (D.E.A)

Option : Biochimie appliquée aux sciences médicales

<h3>ETUDE CHIMIQUE ET TOXICOLOGIQUE DES ECORCES DE TIGE DE <i>Myrica spathulata</i> (MYRICACEAE)</h3>

Présenté par :

ANDRIAMIARIMANANA Fehivola Mandanirina
Maître ès Sciences

Le 13 septembre 2007

Devant la commission d'examen composé de :

Président du jury : Professeur ANDRIANARISOA Blandine

Rapporteur : Professeur JEANNODA Victor

**Examineurs : Professeur ANDRIANTSIMAHAVANDY Abel
Docteur RAVONINJATOVO Marc**

« Mets ta confiance en Jehovah de tout ton cœur et ne t'appuie pas sur ton intelligence. Dans toutes tes voies tiens compte de lui, et lui, il rendra droits tes sentiers ».

Proverbes 3 :5-6

A mes parents,

Pour leur dévouement et leur patience, en témoignage de mon affection. Qu'ils trouvent ici le fruit de tant d'années de sacrifices et d'efforts, pour me permettre de poursuivre mes études. Je leur adresse ma profonde gratitude.

A mes frères,

En témoignage de ma gratitude pour l'aide précieuse qu'ils ont apportée pour la réalisation de ce mémoire. Que ce travail soit un exemple pour votre avenir.

Je tiens aussi à exprimer mes chaleureux remerciements à tous ceux qui, de près ou de loin m'ont encouragée pour la réalisation de ce mémoire.

Merci !

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au LABASM ou Laboratoire de Biochimie Appliqué aux Sciences Médicales de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo.

Nous adressons nos sincères remerciements à Monsieur le Professeur Victor JEANNODA, Chef du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, Responsable de la formation en 3^{ème} cycle de Biochimie, encadreur de notre stage et rapporteur de ce travail. Nous tenons à le remercier pour ses conseils, son soutien et son aide dans l'élaboration et la finition de ce mémoire, malgré ses nombreuses responsabilités.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance à Madame le Docteur Danielle A. Doll RAKOTO-RANOROMALALA, Maître de Conférences, co-encadreur de notre stage pour les conseils et les suggestions qu'elle nous a prodigués tout au long de ce travail, ainsi que son apport précieux dans la réalisation du présent manuscrit, malgré ses nombreuses occupations.

Nous prions Madame le Professeur ANDRIANARISOA Blandine de trouver ici l'expression de notre gratitude, pour nous avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ce mémoire, malgré ses lourdes occupations.

Nous sommes très reconnaissante à Monsieur le Professeur ANDRIATSIMAHAVANDY Abel et à Monsieur le Docteur RAVONINJATO Marc, qui ont bien voulu d'accepter de siéger parmi les membres de jury.

Nos remerciements vont également à Monsieur le Docteur RANDRIANARIVO H. Ranjana ainsi que l'équipe du laboratoire de Biochimie Fondamentale et Appliquée de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo, pour leur aide et leur soutien.

TABLE DES MATIERES

	Page
ABREVIATIONS.....	vi
GLOSSAIRE.....	vii
LISTE DE TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
INTRODUCTION GENERALE.....	1
<u>PREMIERE PARTIE : ETUDE CHIMIQUE</u>	
1 Introduction	4
2 Matériels et méthodes	4
2.1. Matériels	4
2.1.1 La plante	
2.1.1.1- Description de la famille des MYRICACEAE	4
2.1.1.2- Description botanique de <i>Myrica spathulata</i>	4
2.1.1.3- Classification	5
2.1.1.4- Distribution géographique et lieu de récolte	5
2.1.1.5- Organe utilisé	5
2.1.1.6- Préparation et conservation du matériel végétal	5
2.1.2- Les produits chimiques.....	8
2.2. Méthodes	8
2.2.1. Méthode d'extraction.....	8
2.2.1.1. Extraction à froid	8
2.2.1.2. Extraction à chaud	8
2.2.2. Méthodes de purification	9
2.2.2.1 Précipitation par l'acétate neutre de plomb (ANP)	9
2.2.2.2.1. Principe	9
2.2.2.2.2. Mode opératoire.....	9
2.2.2.2. Précipitation par l'acétone 50%	9
2.2.2.2.1. Principe	9
2.2.2.2.2. Mode opératoire.....	9
2.2.2.3. Précipitation par l'éthanol 50%	10
2.2.2.3.1. Principe	10
2.2.2.3.2. Mode opératoire.....	10

2.2.2.4. Dialyse	10
2.2.2.4.1. Principe	10
2.2.2.4.2. Mode opératoire.....	11
2.2.2.5. Fractionnement par le n-butanol.....	11
2.2.2.5.1. Principe.....	11
2.2.2.5.2. Mode opératoire.....	11
2.2.3. Méthode de concentration	12
2.2.4. Détermination du rendement	12
2.2.5. Méthodes d'analyse.....	12
2.2.5.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	12
2.2.5.1.1. Principe	12
2.2.5.1.2. Mode opératoire.....	13
2.2.5.2. Criblage phytochimique.....	13
2.2.5.2.1. Les saponines.....	13
2.2.5.2.2. Les tanins et polyphénols.....	14
2.2.5.2.3. Les désoxyoses : Test de KELLER-KILIANI	14
2.2.5.2.4. Les iridoïdes	14
2.2.5.2.5. Les alcaloïdes	15
2.2.5.2.6. Les flavonoïdes et les leucoanthocyanes.....	15
- FLAVONOIDES : Test de WILSTATER.....	15
- LEUCOANTHOCYANES:Test de BATE-SMITH... ..	15
2.2.5.2.7. Les stéroïdes et triterpènes.....	16
- Test de LIEBERMANN-BURCHARD.....	16
-Test de SALKOWSKI.....	16
2.2.5.2.8. Les anthraquinones : Test de BORNTRÄGER.....	16
3. Résultats.....	16
3.1. Extraction.....	16
3.1.1. Extraction à froid.....	17
3.1.1.1. Extraction aqueuse	17
3.1.1.2. Extraction hydroalcoolique.....	17
3.1.2. Extraction à chaud.....	17
3.1.2.1. Extraction aqueuse.....	17
3.1.2.2. Extraction hydroalcoolique.....	17
3.2. Purification.....	18

3.2.1. Les méthodes non retenues dans le protocole de purification.....	19
3.2.1.1. Précipitation par l'acétate neutre de plomb (ANP)	19
3.2.1.2. Précipitation par l'acétone 50%	19
3.2.2. Les méthodes retenues dans le protocole de purification	19
3.2.2.1. Précipitation par l'éthanol 50%	19
3.2.2.2. Dialyse	20
3.2.2.3. Fractionnement par le n-butanol	20
3.2.3. Rendement de purification.....	20
3.2.4. Degré d'homogénéité des extraits	22
3.3. Caractérisation chimique	23
3.3.1. Propriétés physico-chimiques.....	23
3.3.2. Nature chimique	23
4. Discussion et conclusions	24

DEUXIEME PARTIE : ETUDE TOXICOLOGIQUE

1. Introduction.....	26.
2. Matériels et méthodes.....	26
2.1. Matériels	26
2.1.1. Les animaux d'expérimentation	26
2.1.1.1. Les souris.....	26
2.1.1.2. Les têtards.....	27
2.1.1.3. Les poissons.....	27
2.1.1.4. Les larves de moustiques.....	27
2.1.2. Les plantes d'expérimentation.....	27
2.1.3. Les germes utilisés	28
2.1.4. Les milieux de culture	28
2.1.4.1. Milieu liquide.....	28
2.1.4.2. Milieu solide.....	28
2.2. Méthodes.....	28
2.2.1. Méthodes d'étude des effets sur les animaux	28
2.2.1.1. Chez la souris.....	28
2.2.1.1.1. Estimation de la toxicité.....	28
2.2.1.1.2. Détermination de la DL50.....	28
2.2.1.2. Test hémolytique	29
2.2.1.2.1. Principe.....	29

2.2.1.2.2. Mode opératoire.....	29
2.2.1.3. Méthodes d'étude des effets sur les animaux à sang froid.....	31
2.2.1.3.1. Expérience sur les alevins de carpe	31
2.2.1.3.2. Expérience sur les têtards de grenouille.....	31
2.2.1.4. Méthode d'étude des effets sur les larves de moustique	31
2.2.2. Méthode d'étude des effets sur les végétaux	32
2.2.2.1. Effets sur la germination des graines.....	32
2.2.2.2. Effets sur la croissance des jeunes plantules	32
2.2.2.3. Test sur le développement des bourgeons axillaires	33
2.2.3. Méthodes d'étude des effets sur la croissance des micro-organismes.....	33
2.2.3.1. Identification.....	33
2.2.3.2. Etude de l'activité antimicrobienne des extraits.....	34
2.2.3.2.1. Principe.....	34
2.2.3.2.2. Mode opératoire	34
2.2.3.3. Détermination de la CMI.....	35
3. Résultats	36
3.1. Effets des extraits sur les animaux	36
3.1.1. Effets de l'extrait sur la souris.....	36
3.1.1.1. Description des symptômes d'intoxication... ..	36
3.1.1.2. Détermination de la DL 50.....	36
3.1.2. Effets des extraits sur les hématies de mouton.....	38
3.1.3. Effets de l'extrait brut sur les alevins de carpe.....	40
3.1.4. Effets de l'extrait brut sur les têtards de grenouille.....	40
3.1.5. Effets de l'extrait brut sur les larves de moustiques.....	41
3.2. Effets des extraits sur les végétaux.....	41
3.2.1. Effets de l'extrait brut sur la germination des graines.....	41
3.2.2. Effets de l'extrait brut sur la croissance des jeunes plantules	42
3.2.3. Effets des extraits sur le développement des bourgeons axillaires	47
3.3. Effets des extraits sur les micro-organismes	48
3.3.1. Identification des germes.....	48
3.3.2. Activité antimicrobienne des extraits	49

3.3.3. Détermination de la CMI.....	50
4. Discussion et conclusion	51
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	52
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	53

ABREVIATIONS

ANP	: acétate neutre de plomb
B/A/E	: butanol /acide acétique/eau
CCM	: chromatographie sur couche mince
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
CNARP	: Centre National d'Application des Recherches Pharmaceutiques
Da	: Dalton
DL 50	: Dose létale 50%
°C	: degré Celsius
EB	: extrait brut
E1	: extrait 1
E2	: extrait 2
E3	: extrait 3
i.p	: intrapéritonéale
IPM	: Institut Pasteur de Madagascar
LABASM	: Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales
min	: minute
PBS	: Phosphate Buffered Saline
p/p/p	: poids par poids par poids
p/v	: poids pour volume

GLOSSAIRE

- Antibiotique : substance capable d'empêcher le développement des micro-organismes
- Exophtalmie : grande ouverture des paupières et protubérance des yeux donnant l'impression d'une sortie des yeux de leurs orbites
- Ichtyotoxique : substance toxique pour les poissons
- Odontalgique^o : substance qui calme les douleurs dentaires
- Palpitations : battements rapides du cœur
- Piloérection : hérissément des poils
- Paralyse : privation complète ou partielle de mouvement

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
Tableau 1 : Caractéristiques des extraits bruts obtenus par les différentes méthodes d'extraction.....	18
Tableau 2 : Résultats du criblage phytochimique de l'extrait brut et de l'extrait E3.....	24
Tableau 3 : Composition du milieu pour le test hémolytique	30
Tableau 4 : Norme utilisée pour l'expression des résultats	35
Tableau 5 : Résultats expérimentaux de la détermination de la DL50 (24h) de l'extrait sur souris.....	37
Tableau 6 : Estimation de la DL 50 (24h) par la méthode des totaux cumulatifs de REED et MUENCH(1938).....	37
Tableau 7 : Effets de différentes concentrations des extraits sur les hématies de mouton	39
Tableau 8 : Effets de l'extrait brut à différentes concentrations sur les têtards de grenouilles	40
Tableau 9 : Effets de l'extrait brut à 1mg/ml sur le pouvoir germinatif de quelques graines. .	41
Tableau 10 : Taux d'inhibition de la croissance des hypocotyles et épicotyles de riz et de haricot au 14 ^{ème} jour de l'expérience	47
Tableau 11 : Caractères et formes des souches utilisées	49
Tableau 12 : Activité des extraits sur les germes-tests	49
Tableau 13 : Effets des extraits sur <i>Staphylococcus aureus</i>	50

LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure n°1	(a) Pied (b) Rameau feuillu (c) Ecorces de tige de <i>Myrica spathulata</i>6
Figure n°2	Répartition géographique de <i>Myrica spathulata</i>7
Figure n°3	Schéma récapitulatif du protocole de purification des principes actifs de l'écorce de tige de <i>Myrica spathalata</i>21
Figure n°4	Chromatographie sur couche mince 1) Extrait brut 2) Extrait E1 3) Extrait E 2) Extrait E3.....22
Figure n°5	Détermination graphique de la DL 50 (24h).....38
Figure n°6	Effets de différentes concentrations de l'extrait brut (a) et de l'extrait(b) sur les hématies de mouton.....39
Figure n°7	Courbes de croissance des épicotyles de haricot en présence de différentes concentrations de l'extrait brut.....44
Figure n°8	Courbes des croissance des hypocotyles de haricot en présence de différentes concentrations de l'extrait brut44
Figure n°9	Courbes de croissance des épicotyles de riz en présence de différentes concentrations de l'extrait brut.....45
Figure n°10	Courbe de croissance des hypocotyles de riz en présence de différentes concentrations de l'extrait brut45
Figure n°11	Courbes de développement des bourgeons axillaires sous l'effet de l'extrait brut, l'extrait, la gibérelline, et l'auxine48

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Un poison est une substance qui, introduite dans l'organisme ou absorbée par celui-ci, volontairement ou accidentellement, provoque une perturbation, voire la mort. La différence entre les poisons et les médicaments repose sur une question de dose. Une toxine est un poison d'origine naturelle provenant d'animaux, de végétaux ou de microorganismes.

Avec le développement des disciplines scientifiques comme la chimie, la physique, la médecine, et la biochimie, la toxicologie ou science des poisons a connu un grand essor. Elle est devenue une science sociale d'une utilité incontestée, mais ses rapports avec la physiologie et la pharmacologie en font une science biologique qui apporte une précieuse contribution à l'étude des phénomènes de la vie (FABRE, 1964).

Plusieurs toxines ont été déjà isolées et la connaissance de leur mode d'action a apporté une grande contribution au traitement des maladies et à la compréhension du fonctionnement des voies métaboliques.

A titre d'illustration, on peut citer :

- la colchicine venant de *Colchicum autumnale*, un alcaloïde toxique, utilisé en cancérologie car elle bloque la métaphase (FABRE, 1964) ;

- les antibiotiques qui aident à combattre les maladies infectieuses, comme la pénicilline qui est un peptide venant du champignon *Penicillium caudatum*(FABRE, 1964) ;

- la toxine cholérique isolée du bacille *Vibrio cholerae*, un activateur universel de l'adénylate cyclase. Cette toxine a été employée dans l'investigation des effets biologiques de l'AMP_c et du mécanisme de régulation de l'adénylate cyclase, et aussi dans la mise en évidence de la structure et de la fonction membranaire (BENNET et CUATRECASAS, 1977) ;

- la morphine, un alcaloïde isolé de *Papaver somniferum* et qui est utilisée comme analgésique (BRUNETON, 1993).

Les végétaux constituent une source importante de toxines. En effet, l'homme les a de tous temps utilisés pour :

- chasser : il confectionne des flèches empoisonnées à partir de végétaux toxiques, tels que *Chondrodendron tomentosum* (VERBENACEAE) (SAMYN, 2001) ;

- pêcher : à titre d'exemple des poisons de pêche sont préparés à partir de plantes comme le « Famamo » ou *Crotalaria coursii* (PAPILIONACEAE) (SAMYN, 2001) ;

- rendre la justice : c'est le cas du « Tangena » ou *Cerbera venenifera* (APOCYNACEAE) utilisé comme poison d'épreuve à Madagascar au 18^e siècle (SAMYN, 2001) ;

- se soigner, par exemple : le « Fandoabola » ou *Pittosporum ambrense* (PITTOSPORACEAE), dont les fruits écrasés sont un antidote des piqûres de sangsues (BOITEAU, 1986) ;

- lutter contre des animaux nuisibles, avec le « Hazongoaika » ou *Cussonia bojeri* Seem (ARALIACEAE) qui a des propriétés insectifuges (SAMYN, 2001).

La flore de Madagascar est riche en plantes médicinales et en plantes toxiques. C'est pour cette raison que le Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales (LABASM), du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo, a orienté depuis quelques années ses recherches vers les principes actifs de plantes malgaches. Beaucoup de plantes ont déjà été étudiées de manière approfondie dans ce laboratoire.

On peut distinguer, à titre d'exemples :

- *Rourea orientalis* (CONNARACEAE) (RAKOTO-RANOROMALALA, 1984)

- *Cnestis glabra* (CONNARACEAE) (JEANNODA, 1986)

- *Croton mongue* (EUPHORBIACEAE) (RALISON, 1987)

- *Boletus affinis* Peck (BOLETACEAE) (RAZANAMPARANY, 1987)

- *Tachiadenus longiflorus* (GENTIANACEAE) (RAKOTO-RANOROMALALA, 1989)

- *Albizia polyphylla* (FABACEAE) (RAJEMARIMOELISOA, 1996)

- *Albizia arenicola* (FABACEAE) (RANDRIANARIVO, 1996)

- *Uapaca thouarsii* (EUPHORBIACEAE) (RANDRIANANDRASANA, 2004)

- *Mimusops commersonii* (SAPOTACEAE) (RAMAMONJISOA-RAKOTOARIVELO, 2004)

- *Physena madagascariensis* (PHYSENACEAE) (ANDRIANJAKANIRINA, 2004)

- *Rhodocodon madagascariensis* (LILIACEAE) (SOIFOINI, 2006)

-*Cantharellus cf congolensis* (CANTHARELLACEAE) (TONIMALALA, 2003)

Pour notre part, nous avons étudié les principes toxiques de l'écorce de tige de *Myrica spathulata* (MYRICACEAE). Différentes raisons nous ont incitée à nous orienter vers cette plante :

- elle est endémique de Madagascar ;
- elle n'a pas encore fait l'objet d'une étude chimique et toxicologique approfondie ;
- d'après la littérature (DEBRAY et JACQUEMIN, 1971) et les enquêtes auprès des villageois pendant la récolte, le décocté de l'écorce de tige de *Myrica spathulata* pris en bain de bouche sans jamais l'avaler, est odontalgique,

Pour cela, notre travail est divisé en 2 grandes parties. Après l'introduction générale,

➤ la première partie comprend l'étude chimique des principes toxiques de l'écorce de tige ;

➤ la deuxième partie est consacrée à l'étude toxicologique des extraits toxiques.

Nous terminerons par la conclusion générale et les perspectives.

ETUDE CHIMIQUE

I-INTRODUCTION

D'après la littérature, la plante *Myrica spathulata* n'a pas encore fait l'objet d'une étude chimique approfondie. La toxicité de l'écorce de tige de cette plante a été mise en évidence par des tests préliminaires sur souris.

Dans cette première partie, nous avons essayé :

- de mettre au point un protocole d'extraction et de purification dans le but d'obtenir un extrait toxique suffisamment purifié à partir des écorces de tige ;
- d'étudier les propriétés physico-chimiques des principes toxiques ;
- de rechercher leur nature chimique.

II-MATERIELS et METHODES

2.1. MATERIELS

2.1.1. LA PLANTE

2.1.1.1. Caractéristiques de la famille des MYRICACEAE

Ce sont des arbres ou buissons aromatiques qui renferment des terpènes et des tannins. Les racines sont généralement à nodules symbiotiques avec des bactéries fixatrices d'azote (JUDD et coll, 2002).

2.1.1.2. Description botanique de *Myrica spathulata*

Myrica spathulata (figure n° 1) est un arbuste ou arbre atteignant jusqu'à 12m de hauteur, à rameaux et ramules jeunes, glabres et glanduleux. Les feuilles sont longuement pétiolées, simples et alternes. Le limbe obovale-spatulé, atténué décurrent à la base, arrondi obtus au sommet, un peu coriace et lisse, est souvent brillant sur le dessus, parsemé de nombreuses glandes, surtout au stade juvénile. Les inflorescences sont en chatons axillaires. Les chatons mâles sont à fleurs tétrandres, à filets soudés, en colonne à la base. Les chatons femelles sont à fleurs avec ovaire muni de quelques émergences basales. Les fruits sont sphériques ou ovoïdes (HUMBERT et LEROY, 1952 ; RABESA, 1986).

2.1.1.3. Classification (BREMER et coll., 1999)

La classification de la plante est la suivante :

Règne :	VEGETAL
Embranchement :	SPERMATOPHYTES
Sous-embranchement :	ANGIOSPERMES
Classe :	DICOTYLEDONES
Sous – classe :	ROSIDAE
Ordre :	FAGALES
Famille :	MYRICACEAE
Genre :	<i>Myrica</i>
Espèce :	<i>spathulata</i> Mirb
Noms vernaculaires :	Andravola (Alaotra) Laka, Tsilakana, Silaka (Betsimisaraka) Sarindriaka (Betsileo)

L'espèce est endémique de Madagascar.

2.1.1.4. Distribution géographique et lieu de récolte

Myrica spathulata pousse dans la forêt littorale orientale de Madagascar, sur les sables côtiers et sur les collines (HUMBERT et LEROY, 1952) (figure n°2).

Le matériel végétal a été récolté dans la forêt littorale d'Amparafana, commune de Mahatsara, région de Mahanoro, en Avril 2006.

2.1.1.5. Organe utilisé

La partie de la plante utilisée dans notre recherche est l'écorce de tige, en raison de son utilisation thérapeutique traditionnelle en tant qu'odontalgique.

2.1.1.6. Préparation et conservation du matériel végétal

Les tiges sont écorcées puis les écorces obtenues sont lavées et séchées au soleil pendant 24h. Le matériel sec est ensuite broyé à l'aide d'un mortier.

La poudre obtenue est tamisée et conservée à la température ambiante. Elle constitue notre matériel d'étude.



(a)



(b)



(c)

Figure n° 1 : *Myrica spathulata* : (a) Pied (b) Rameau feuillu (c) Ecorces de tige

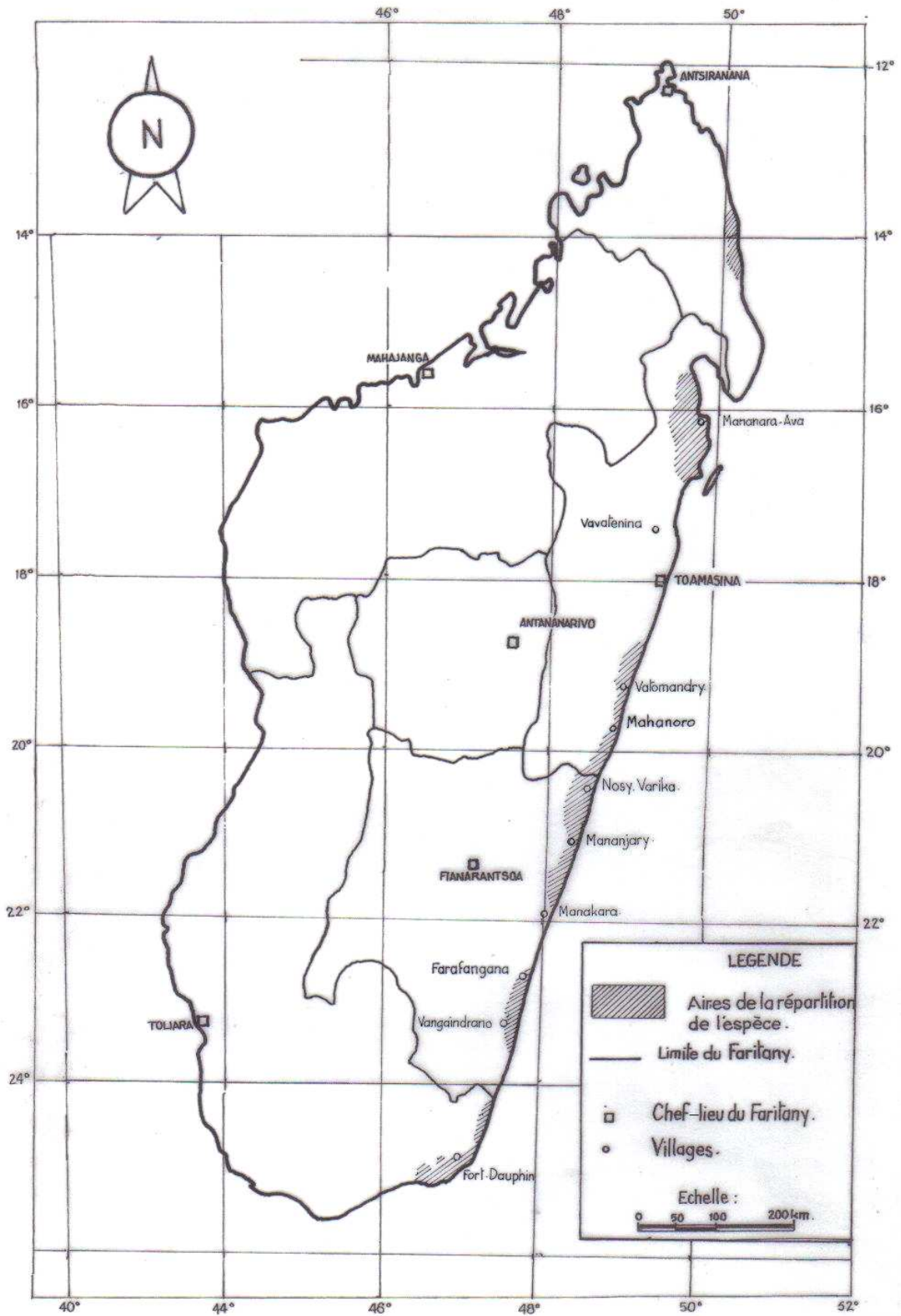


Figure n°2 : Répartition géographique de *Myrica spathulata*

(Source : Carte des limites administratives de Madagascar, FTM- 1984)

2.1.2. LES PRODUITS CHIMIQUES

La plupart des produits chimiques utilisés sont purs et de qualité pour analyse (marque MERCK ou PROLABO).

Les plaques de gel silice utilisées pour la chromatographie sur couche mince sont de marque MERCK (60F₂₅₄, de dimensions 20 x 20 cm). Le gel de silice d'épaisseur 0,2 mm est étalé sur feuille plastique.

2.2. METHODES

2.2.1. METHODES D'EXTRACTION

2.2.1.1. Extraction à froid

La poudre d'écorces est mélangée avec le solvant d'extraction (eau distillée ou mélange hydroalcoolique 75%) suivant le rapport 1/10 (p/v), c'est-à-dire 10 ml de solvant d'extraction pour 1g de poudre. Le tout est homogénéisé sous agitation magnétique pendant 3 h à la température ambiante. La suspension est laissée macérer à + 4°C pendant 24 h. Après une nouvelle agitation de 1 h pour bien mélanger le tout, le macérat est filtré sur 4 épaisseurs de gaze pour éliminer les tourteaux. Le filtrat est centrifugé pendant 30 min à 10000 tours/min à l'aide d'une centrifugeuse de marque JOUAN (modèle TH12).

Le surnageant obtenu est évaporé jusqu'au rapport 1/1 (p/v), c'est-à-dire 1 g de poudre pour 1 ml d'extrait, puis centrifugé pendant 15 min à 12000 tours/min à l'aide d'une centrifugeuse de marque BREMSE pour éliminer la précipitation apparue au cours de l'évaporation.

L'extrait obtenu constitue l'extrait brut (EB).

2.2.1.2. Extraction à chaud

La poudre d'écorces est délayée dans le solvant d'extraction (eau distillée ou mélange hydroalcoolique 75%) suivant le rapport 1/10 (p/v). Le tout est soumis à un chauffage à reflux à 60°C pendant 3 h sous agitation magnétique.

Après refroidissement, la suspension est laissée macérer à + 4°C pendant 24h. Après une réagitation de 1h, le macérat est filtré sur 4 épaisseurs de gaze pour éliminer les tourteaux. La suite du procédé est la même que dans l'extraction à froid.

2.2.2 METHODES DE PURIFICATION

2.2.2.1. Précipitation par l'acétate neutre de plomb (ANP)

2.2.2.1.1. Principe

Ce sel de métal lourd à la propriété de précipiter, sous forme de sels insolubles, certains composés comme les acides nucléiques, les acides organiques, les polysaccharides, ou les protéines.

2.2.2.1.2 Mode opératoire

L'extrait dilué au 1/6 est additionné, sous agitation magnétique, d'une solution aqueuse d'ANP 20% (p/v) de volume déterminé. Le précipité qui se forme est éliminé par centrifugation à 12000 tours/min à l'aide d'une centrifugeuse de marque BREMSE pendant 5 min. Le traitement est répété jusqu'à ce qu'il n'apparaisse plus de précipité.

Une solution de phosphate disodique 10% (p/v) est additionnée au surnageant pour éliminer l'excès de plomb par précipitation. Le précipité apparu est écarté par centrifugation dans les mêmes conditions que précédemment. Le traitement est aussi répété jusqu'à ce qu'il n'apparaisse plus de précipité.

Le volume du dernier surnageant est ramené à sa valeur initiale par évaporation.

2.2.2.2. Précipitation par l'acétone 50%

2.2.2.2.1 Principe

La méthode repose sur la diminution du pouvoir dissolvant d'un milieu aqueux par addition d'un solvant organique miscible à l'eau. Ceci entraîne la précipitation des substances peu solubles.

2.2.2.2.2 Mode opératoire

Un volume déterminé d'acétone est versé petit à petit, sous agitation magnétique, dans le même volume d'extrait à traiter. Le mélange formé est laissé au repos à + 4°C pendant 15 min. Le précipité formé est écarté par centrifugation à 12000tours /min pendant 15 min (BREMSE). L'alcool dans le surnageant est éliminé par évaporation, et le culot est repris dans de l'eau distillée.

2.2.2.3. Précipitation par l'éthanol 50%

2.2.2.3.1. Principe

Le principe est le même que pour la précipitation par l'acétone 50%.

2.2.2.3.2. Mode opératoire

Un volume d'éthanol absolu est versé goutte à goutte dans le même volume d'extrait à traiter, soumis à une agitation magnétique. Le mélange est laissé au repos à + 4°C pendant 15 min. Il se forme un précipité qui est écarté par centrifugation à 12000 tours/min à l'aide de BREMSE pendant 15 min. Le surnageant est mis à évaporer pour éliminer l'alcool tandis que le culot est repris dans de l'eau distillée.

2.2.2.4. Dialyse

Il s'agit d'une technique qui permet de séparer les substances en fonction de leur poids moléculaire, en utilisant leur capacité respective à franchir les pores calibrées d'une membrane appelée membrane de dialyse.

2.2.2.4.1. Principe (KAMOUN, 1991 ; AUDIGIER et coll, 1989)

La membrane de dialyse se présente sous forme d'un cylindre allongé appelé boudin de dialyse. Son seuil de filtration est de 15000 Da.

Lors de la dialyse, 2 phénomènes sont observés : la diffusion et l'osmose. La diffusion est le passage des solutés de la solution la plus concentrée vers la solution la plus diluée ; celle des grosses molécules est lente ou nulle, celle des petites étant peu freinée par les frottements sur les parois. L'osmose est caractérisée par le déplacement du solvant, du compartiment hypotonique (le plus dilué) vers le compartiment hypertonique (le plus concentré).

Ces phénomènes s'arrêtent dès que les concentrations dans les 2 compartiments sont égales.

Différents facteurs peuvent influencer la vitesse de la dialyse :

- le diamètre des pores de la membrane ;
- le temps de contact ;
- la différence de concentration entre les deux milieux ;
- le pH.

2.2.2.4.2 Mode opératoire

Préparation du boudin de dialyse

La membrane de dialyse contient de la glycérine, des métaux lourds et des composés sulfurés qu'il faut éliminer. Pour ce faire, elle est bouillie dans de l'eau distillée pendant 15 min. Cette opération est répétée 3 fois. La membrane ainsi obtenue est conservée à +4°C dans la dernière eau bouillie.

Avant utilisation, la membrane est de nouveau rincée à l'eau distillée.

Mise en œuvre de la dialyse

L'extrait à dialyser est versé dans une portion de boudin de 15 à 20 cm de longueur, fermé à chaque extrémité par un nœud. Le boudin est introduit dans le liquide de contre-dialyse qui est l'eau distillée (100 fois le volume de l'extrait à dialyser). Le tout est soumis à une agitation magnétique pour éviter la formation d'un gradient de concentration autour du boudin. Le liquide de contre-dialyse est renouvelé plusieurs fois pour accélérer la diffusion et maintenir la différence de concentration entre les deux milieux.

2.2.2.5. Fractionnement par le n-butanol

2.2.2.5.1. Principe (KAMOUN, 1991)

Il s'agit d'une méthode d'extraction liquide-liquide consistant à faire passer une substance dissoute d'une phase à extraire (phase aqueuse) dans une phase extractive non miscible à la précédente (phase organique).

2.2.2.5.2. Mode opératoire

Dans une ampoule à décanter, sont introduits un volume de l'extrait à purifier et le même volume de solvant organique qui est le n-butanol.

L'opération comporte plusieurs temps : une agitation manuelle énergique qui permet d'obtenir la plus grande surface d'échanges possible entre les 2 liquides, puis une décantation et une séparation.

L'extraction est répétée 2 fois en renouvelant chaque fois le n-butanol. De ce fait, la phase aqueuse subit des fractionnements successifs.

Les phases organiques obtenues sont rassemblées, puis le n-butanol est évaporé après addition d'eau.

2.2.3. METHODE DE CONCENTRATION

Les opérations de réduction de volume des extraits et d'élimination des solvants sont réalisées par évaporation à l'aide d'un évaporateur rotatif HEIDOLPH à la température 50 – 60 °C. La pression est réduite à l'aide d'une pompe à vide.

2.2.4. DETERMINATION DU RENDEMENT

Pour pouvoir déterminer le rendement à chaque étape de purification, chaque extrait est évaporé à sec dans un ballon préalablement taré. Le ballon contenant le résidu est ensuite pesé.

Le rendement est calculé à l'aide de la formule

$R = \frac{(P_c - P_v)}{Q} \times 100$	<p>R : rendement en %</p> <p>P_c : poids du ballon avec le résidu sec (g)</p> <p>P_v : poids du ballon vide (g)</p> <p>Q : poids de la poudre d'extraction de départ (g)</p>
--	--

2.2.5. METHODES D'ANALYSE

2.2.5.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

2.2.5.1.1. Principe (AUDIGIER et coll., 1989)

C'est une méthode basée sur la migration différentielle des substances contenues dans un mélange. Leur vitesse de migration dépend de la force de rétention venant du support d'une part et de la solubilité dans la phase mobile organique d'autre part.

2.2.5.1.2 Mode opératoire

- *Dépôt des échantillons*

-

Les extraits sont analysés sur une plaque de gel de silice MERCK découpée aux dimensions voulues. Les extraits sont déposés à l'aide d'un capillaire fin, à 1,5 cm du bord inférieur et à partir de 1,3 cm des bords latéraux. Les dépôts se présentent en tirets de 7 mm, espacés de 6 mm. Ils sont séchés immédiatement à l'aide d'un séchoir à main.

- *Développement*

-

La plaque ainsi préparée est placée dans une cuve à chromatographie DESAGA, contenant le système de solvants: Butanol/Acide acétique/Eau ou B/A/E 60/20/20 (p/p/p) dont les vapeurs saturent l'intérieur de la cuve. Quand le front du solvant est à 0,5 cm du bord supérieur de la plaque, la chromatographie est arrêtée. Le chromatogramme est ensuite révélé.

- *Révélation*

La révélation du chromatogramme se fait par 2 méthodes :

- visualisation des substances sous lumière ultra-violette de longueurs d'onde 254 nm et 366 nm ;

- révélation des taches apparues par pulvérisation d'un réactif spécifique : le réactif à la vanilline sulfurique dont la composition est donnée à l'annexe 1. La pulvérisation de ce réactif entraîne l'apparition des taches roses qui deviennent noires après chauffage à l'étuve à 120°C pendant 5 min.

2.2.5.2. Criblage phytochimique

Pour chaque test, 1 ml d'extrait à étudier est évaporé à sec.

2.2.5.2.1. Les saponines

Le résidu d'évaporation à sec de l'extrait à tester est repris dans 1 ml d'eau distillée. La solution obtenue est soumise à une agitation énergique pendant 30 s. L'apparition d'une mousse de 3 cm de hauteur, persistant pendant 30 min traduit la présence de saponines dans l'extrait.

2.2.5.2.2. Les tannins et polyphénols

3 ml d'eau distillée chaude sont mélangés avec le résidu sec. La solution obtenue est ensuite distribuée dans 4 tubes à essai dont le premier sert de témoin et les 3 autres sont destinés à 3 différents tests.

⇒ Test à la gélatine salée

4 gouttes de gélatine salée 1% dans une solution de chlorure de sodium (NaCl) à 10% sont versées dans le deuxième tube. L'apparition d'un précipité indique la présence de tanins condensés de type pyrogallique dans l'extrait à tester.

⇒ Test au chlorure ferrique

4 gouttes de chlorure ferrique 10% en solution dans du méthanol sont ajoutées dans le troisième tube. La présence de tanins de type catéchol se traduit par l'apparition d'un précipité bleu verdâtre ; pour les tanins de type pyrogallique, il y a apparition d'une coloration bleuâtre.

⇒ Test à la gélatine 1%

Le quatrième tube est additionné de 4 gouttes de gélatine 1%. La formation d'un précipité blanc indique la présence de tanins hydrosolubles de type catéchique dans l'extrait à étudier.

2.2.5.2.3. Les désoxyoses

⇒ Test de KELLER – KILIANI

Le résidu sec est repris dans 0,5ml de solution de chlorure ferrique à 10% additionné d'acide acétique glacial. Après une agitation légère, 0,3 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré est ajouté volume à volume en inclinant le tube. Une réaction positive se traduit par la formation d'un anneau pourpre à l'interface.

2.2.5.2.4. Les iridoïdes

1ml d'eau distillée est ajouté au résidu d'évaporation. Après agitation, 0,5 ml d'acide chlorhydrique (HCl) 12N est additionné au mélange. Le tout est chauffé au bain-marie bouillant pendant 30 min. La présence d'iridoïdes dans l'extrait se manifeste par l'apparition d'une coloration bleue après refroidissement.

2.2.5.2.5. Les alcaloïdes

Avant les tests, le résidu sec est macéré dans 3ml de HCl 2N. Le macérat est ensuite filtré sur papier filtre ; le filtrat obtenu est réparti dans 4 tubes à essai dont le premier sert de témoin. Les 3 autres sont destinés aux tests de MAYER, de WAGNER et de DRAGENDORFF.

Dans le deuxième tube sont ajoutées 5 gouttes de réactif de MAYER, dans le troisième 5 gouttes de réactif de WAGNER et dans le quatrième 5 gouttes de réactif de DRAGENDORFF. La formation d'un précipité ou d'une floculation dans les 3 tubes traduit la présence d'alcaloïdes dans l'extrait.

2.2.5.2.6. Les flavonoides et les leucoanthocyanes

⇒ FLAVONOÏDES (Test de WILSTATER)

Le résidu d'évaporation à sec est dissous dans 3 ml d'éthanol 30% puis la solution est filtrée sur papier filtre. Le filtrat est distribué dans 4 tubes à essai dont le premier sert de témoin.

Dans le deuxième tube, 2 tournures de magnésium et 0,5 ml de HCl 12N sont ajoutés.

En plus des réactifs mis dans le deuxième tube, 1ml d'eau distillée et 1 ml d'alcool isoamylique sont versés dans le troisième tube.

Le changement de la coloration dans les 2 tubes indique la présence de flavonoïdes :

- une coloration rouge-violacé pour les flavonones ;
- une coloration rouge pour les flavones ;
- une coloration pourpre pour les flavonols.

⇒ LEUCOANTHOCYANES (Test de BATE – SMITH)

Pour le quatrième tube de l'expérience précédente, 0,5 ml de HCl 12N est versé. Le mélange est porté dans un bain-marie bouillant pendant 30min. La présence d'une coloration rouge après refroidissement, traduit la présence de leucoanthocyanes.

2.2.5.2.7. Les stéroïdes et les triterpènes

Le résidu sec est repris dans 3ml de chloroforme. Après filtration du mélange, celui-ci est distribué dans 3 tubes à essai dont l'un sert du témoin.

⇒ Test de LIEBERMANN-BURCHARD

2 gouttes d'anhydride acétique sont versées dans le deuxième tube. Une agitation légère est effectuée avant l'ajout de quelques gouttes de H₂SO₄.

La formation d'un anneau rouge ou violet marque la présence de triterpènes. Pour les stéroïdes, le développement d'une coloration verdâtre dans la phase aqueuse indique leur présence.

Ces 2 phénomènes peuvent apparaître en même temps.

⇒ Test de SALKOWSKI

Le troisième tube incliné est additionné de 1ml de H₂SO₄. Si l'extrait contient des stéroïdes insaturés, il y a formation d'un anneau rouge, violet ou mauve.

2.2.5.2.8. Les anthraquinones Test de BORNTRÄGER

Dans une ampoule à décanter, sont mélangés volume à volume de la solution aqueuse du résidu sec et du benzène. Ce mélange est laissé au repos après une forte agitation. Il apparaît 2 phases: la phase inférieure et la phase supérieure benzénique qui est recueillie puis ajoutée de 5 gouttes d'ammoniaque 25%. La présence d'anthraquinones dans l'extrait est marquée par le virage de la coloration de la phase alcaline (phase inférieure) en rouge, après agitation.

III- RESULTATS

3.1. EXTRACTION

Nous avons essayé 2 types de méthodes d'extraction : l'un à chaud et l'autre à froid.

Pour chaque extraction, 10g de poudre d'écorce sont mélangés avec 100ml de solvant (eau distillée ou mélange hydroalcoolique à 75%). Le volume final est ramené à 10ml.

3.1.1. Extraction à froid

3.1.1.1 Extraction aqueuse

En appliquant la méthode décrite au paragraphe 2.2.1.1. (p. 8), un extrait brut (EB) aqueux, de couleur marron foncé, d'aspect limpide, à goût piquant, a été obtenu. Son pH est égal à 4,65. Il est toxique sur souris.

3.1.1.2 Extraction hydroalcoolique

En utilisant la méthode décrite au paragraphe 2.2.1.1. (p. 8), un extrait brut trouble avec une mousse persistante, de couleur rouge sang, à goût piquant, a été obtenu. Son pH est égal à 5,42. Il est toxique sur souris.

3.1.2 Extraction à chaud

3.1.2.1 Extraction aqueuse

La méthode décrite au paragraphe 2.2.1.2. (p. 8), nous a permis d'obtenir un extrait brut toxique, limpide, de couleur marron foncé, de pH 4,75, de goût piquant.

3.1.2.2. Extraction hydroalcoolique

Selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.1.2. (p. 8), un extrait toxique trouble, rouge, avec un goût piquant a été obtenu. Son pH est de 4,95.

Le tableau 1 résume les caractéristiques des extraits bruts obtenus par ces 4 techniques d'extraction.

Tableau 1 : Caractéristiques des extraits bruts obtenus par les différentes méthodes d'extraction

EXTRACTION	AQUEUSE à FROID	HYDROALCOOLIQUE 75% à FROID	AQUEUSE à CHAUD	HYDROALCOOLIQUE 75% à CHAUD
pH	4,65	5,42	4,75	4,95
Aspect	Limpide	Trouble avec mousse persistante	Limpide	Trouble
Couleur	Marron foncé	Rouge sang	Marron foncé	Rouge
Goût	Piquant	Piquant	Piquant	Piquant
Toxicité (temps de survie)	2 à 3h	2 à 3h	3h à 4h	Entre 4h à 10h

D'après ce tableau, les extraits alcooliques sont difficiles à manipuler à cause de leur aspect trouble. L'extrait brut aqueux à froid semble présenter les meilleures caractéristiques du point de vue physico-chimique et de la toxicité. **Or lors de la purification, cet extrait n'a pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants et reproductibles.**

Compte tenu de tout ces faits, nous avons adopté la méthode d'extraction aqueuse à chaud pour extraire les principes toxiques des écorces de tiges.

3.2. PURIFICATION

Différentes propriétés physico-chimiques telles que la solubilité ou le poids moléculaire, sont à la base de techniques de purification du ou des principes toxiques.

La performance de chaque étape est vérifiée par des tests sur souris (paragraphe 2.2.1.1.1. p. 28) et la chromatographie sur couche mince permet d'apprécier l'homogénéité des extraits obtenus.

3.2.1. LES METHODES NON RETENUES DANS LE PROTOCOLE DE PURIFICATION

3.2.1.1. PRECIPITATION PAR L'ACETATE NEUTRE DE PLOMB (ANP)

L'extrait brut dilué au 1/6, de volume 6 ml, est traité par 0,5 ml d'ANP à 20%, (voir paragraphe 2.2.2.1.2., p. 9). L'excès de plomb est éliminé par 0,9 ml de phosphate disodique 10%. L'extrait issu de cette purification est limpide, incolore. Il n'est pas toxique sur souris.

Cette méthode n'a pas été adoptée dans le protocole définitif, parce que l'ANP précipite les toxines.

3.2.1.2. PRECIPITATION PAR L'ACETONE 50%

En traitant 2 ml de EB par l'acétone 50%, un surnageant toxique, limpide, de couleur marron foncé, est obtenue (paragraphe 2.2.2.2.2. p. 9).

Cette méthode, même si l'extrait est toxique, n'a pas été retenue dans le protocole de purification, étant donné le nombre encore important des contaminants détectés en CCM, et aussi pour des raisons économiques (coût élevé de l'acétone).

3.2.2. LES METHODES RETENUES DANS LE PROTOCOLE DE PURIFICATION

3.2.2.1. PRECIPITATION PAR L'ETHANOL 50%

En appliquant la méthode de précipitation présentée au paragraphe 2.2.2.3.2 (p.10), à partir de 50 ml de EB nous avons obtenu un surnageant toxique limpide, de couleur rouge sang. Ce traitement constitue la première étape de notre protocole de purification et l'extrait obtenu est dénommé : extrait E₁.

3.2.2.2. DIALYSE

40 ml de E₁ sont dialysés contre 4000ml d'eau distillée (voir paragraphe 2.2.2.4.2 ; p.10).

Le dialysat (liquide à l'extérieur du boudin) est concentré jusqu'à 40 ml par évaporation. Il donne un extrait toxique de couleur marron clair, limpide. Mais comme son évaporation prend beaucoup de temps, nous ne l'avons pas retenu.

Le volume de l'adialysat (liquide dans le boudin) est réduit jusqu'à 40 ml par évaporation. L'adialysat est toxique de couleur marron, limpide. Il constitue notre deuxième étape de purification, et est nommé : extrait E₂.

Cette étape de purification permet de se débarrasser de plusieurs contaminants.

3.2.2.3. FRACTIONNEMENT PAR LE n – BUTANOL

Selon la méthode présentée au paragraphe 2.2.2.5.2, p.11, 35 ml de E₂ sont soumis à 3 fractionnements successifs, autrement dit, 105 ml de n – butanol sont utilisés au total.

Deux phases ont été obtenues :

- Une phase organique limpide, de couleur orange, mais qui ne provoque la mort des souris qu'après 24h.
- Une phase aqueuse toxique marron et limpide.

Ce traitement constitue notre troisième étape de protocole de purification, et la phase aqueuse est appelée : extrait E₃.

Le protocole de purification adopté définitivement comprend 3 étapes qui sont :

- une précipitation par l'éthanol 50%
- une dialyse
- un fractionnement par le n-butanol

Il est résumé sur la figure n°3.

3.2.3. RENDEMENT DE PURIFICATION

Après l'extraction et à chaque étape de la purification, l'extrait obtenu est évaporé à sec et le résidu est pesé (paragraphe 2.2.4. p 12).

A partir de 50g de poudre d'écorces de tiges, le résidu d'évaporation à sec de l'extrait E₃ pèse 3,51g. Cela correspond à un rendement en toxines de 7,02%.

Le rendement de purification par rapport au poids du résidu d'évaporation à sec de EB (11,75g), est de 29,87%.

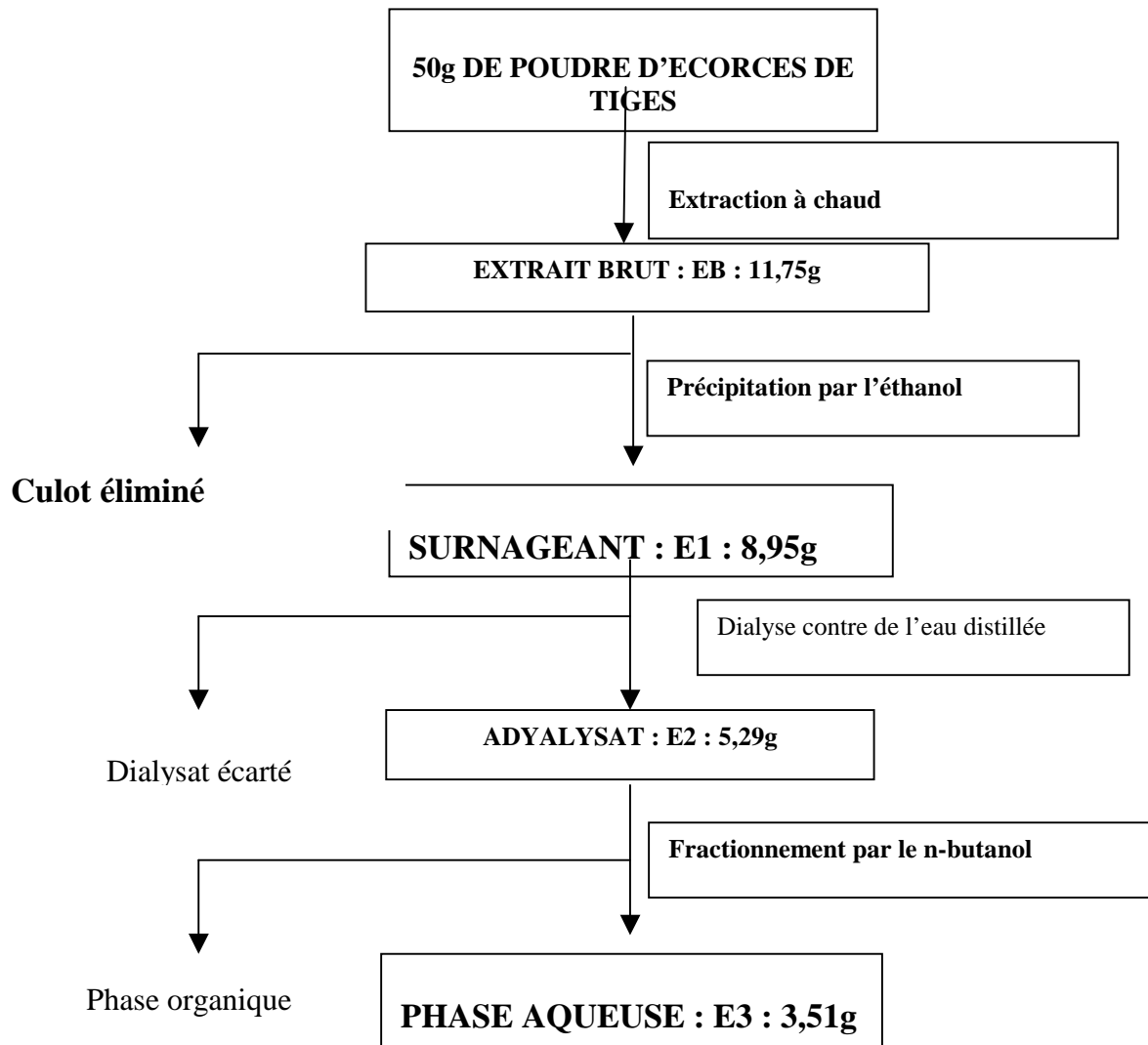


Figure n° 3 : Schéma récapitulatif du protocole de purification des principes actifs des écorces de tiges de *Myrica spathulata*.

Les chiffres indiquent le poids du résidu d'évaporation à sec.

3.2.4. DEGRE D'HOMOGENEITE DES EXTRAITS

Le chromatogramme de la figure n°4, révélé par le réactif à la vanilline sulfurique, présente l'évolution de l'homogénéité des extraits toxiques obtenus aux différentes étapes de purification.

L'extrait brut comporte huit bandes majeures alors que l'extrait E3 n'en comporte que deux. Ce protocole de purification nous a donc permis d'éliminer six bandes majeures.

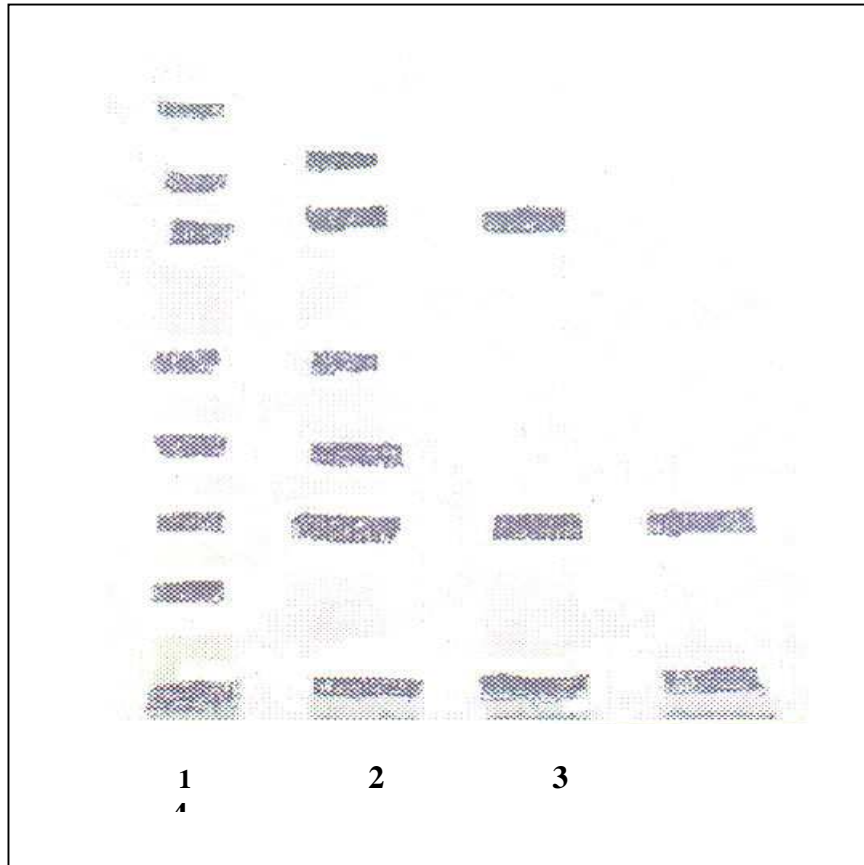


Figure n°4 : Chromatographie sur couche mince des extraits obtenus aux différentes étapes de purification.

1) *Extrait brut*, 2) *Extrait E1* ; 3) *Extrait E2* ; 4) *Extrait E3*

Solvant : Butanol/Acétique/Eau (60/60/20, p/p/p)

Révélateur : réactif à la vanilline sulfurique

3.3. CARACTERISATION CHIMIQUE

3.3.1. Propriétés physico-chimiques

Les différentes techniques testées lors de la mise au point du procédé de purification ont permis d'obtenir des informations intéressantes sur les propriétés physico-chimiques des principes toxiques des écorces de tiges de *Myrica spathulata*. Ainsi,

- ils résistent à de hautes températures (100°C);
- les opérations de congélation et de décongélation ne les affectent pas ;
- ils sont solubles dans l'eau, dans l'éthanol, dans l'acétone ; ils sont insolubles dans le butanol ;
- ils sont précipitable par l'ANP ;
- ils ne traversent pas la membrane de dialyse dont le seuil est de 15000 Dalton ;
- ils ont une couleur marron foncé .

3.3.2. Nature chimique

La détermination de la nature chimique des principes toxiques a été effectuée à l'aide d'un criblage phytochimique de l'extrait brut et l'extrait E3 (voir paragraphe 2.2.5.2, p. 13).

Les résultats sont résumés dans le tableau 2.

D'après ce tableau, l'extrait brut contient des tanins et polyphénols, des désoxyoses, des flavonoïdes et leucoanthocyanes, ainsi que des stérols insaturés. L'extrait E3 contient les mêmes composants que EB, sauf les flavonoïdes. Ceux-ci ont donc été éliminés lors de la purification.

Tableau 2 : Résultats du criblage phytochimique de l'extrait EB et de l'extrait E3

FAMILLES CHIMIQUES	TESTS	RESULTATS	
		EB	E3
SAPONINES	Test de mousse	- *	- *
TANINS ET POLYPHENOLS	Gélatine 1%	-	-
	Gélatine salée	+	+
	Chlorure ferrique	+	+
DESOXYOSES	KELLER – KILIANI	+	+
IRIDOÏDES		-	-
ALCALOÏDES	WAGNER	-	-
	MAYER	-	-
	DRAGENDORFF	-	-
FLAVONOÏDES ET LEUCOANTHOCYANES	WILSTATER	+	-
	BATE-SMITH	+	+
STEROÏDES ET TRITERPENES	LIEBERMAN-BURCHARD	-	-
	SALKOWSKI (stérols insaturés)	+	+
ANTHRAQUINONES	BORNTRÄGER	-	-

+ : test positif

- : test négatif

* : Le test hémolytique montre que EB et E3 ont une activité hémolytique.

IV-DICUSSION ET CONCLUSION

Les écorces de tiges de *Myrica spathulata* montrent une activité toxique sur souris. La méthode d'extraction aqueuse à chaud s'est avérée la plus avantageuse pour extraire les principes toxiques de ces écorces.

Après avoir testé différentes techniques de purification, nous avons adopté un protocole de purification partant de l'extrait brut aqueux à chaud. Il comporte une précipitation par l'éthanol 50%, une dialyse contre de l'eau distillée, et un fractionnement par le n-butanol. Le rendement en toxines est de 7,02% et le rendement de purification est de 29,87%.

A propos des propriétés physico-chimiques des principes actifs, nous avons trouvé qu'ils sont thermostables. Ils sont précipitables par l'ANP, donc les toxines ont un caractère acide. Ils sont solubles dans les solvants polaires (éthanol). Par contre, ils sont insolubles dans le butanol. Le poids moléculaire des principes actifs peut être élevé étant donné qu'ils ne traversent pas la membrane de dialyse, à moins d'interférer avec celle-ci.

D'après les travaux de l'O.R.S.T.O.M (DEBRAY et JACQUEMIN, 1971), les écorces de tiges récoltées au mois de Juin présenteraient des saponines, des tanins et polyphénols et des stérols. Or, les écorces que nous avons récoltées en mois d'Avril montrent la présence de tanins et polyphénols, de désoxyoses, de flavonoïdes et leucoanthocyanes et de stérols, dans l'extrait brut. Ceci montre que certaines familles chimiques comme les flavonoïdes et leucoanthocyanes, les désoxyoses et les saponines seraient présentes dans l'écorce de tige suivant la saison. Dans l'extrait E3, seuls les tanins et polyphénols, les leucoanthocyanes, stérols insaturés et désoxyoses sont trouvés. Ces résultats suggèrent que les flavonoïdes ont été éliminés au cours de la purification.

En conclusion, les écorces de tige de *Myrica spathulata* Mirb contiennent des principes toxiques qui pourraient être des leucoanthocyanes ou des hétérosides.

ETUDE TOXICOLOGIQUE

I- INTRODUCTION

L'étude chimique nous a permis de confirmer la toxicité des écorces de tiges de *Myrica spathulata* par des tests sur souris, et d'obtenir un extrait suffisamment purifié appelé extrait E3. Pour l'étude toxicologique, notre travail s'est concentré sur l'étude des effets des extraits envers des organismes animaux, végétaux, microbiens.

Ainsi, nous avons pour objectifs :

- d'approfondir la toxicité des extraits sur souris ;
- d'étudier leur pouvoir hémolytique *in vitro*, sur les hématies de mouton ;
- d'étudier leurs effets sur les animaux à sang froid (alevins de carpe, têtards et larves de moustique) ;
- de tester leurs effets sur la germination des graines de différentes plantes et la croissance de leurs plantules ;
- de chercher leur activité vis-à-vis de micro-organismes.

Les expériences qui nécessitent une quantité importante d'extrait toxique sont réalisées à l'aide de l'extrait brut (EB). Tous les autres tests sont effectués avec l'extrait E3 que nous appellerons par la suite « extrait » pour des raisons de commodité.

II- MATERIELS ET METHODES

2.1. MATERIELS

2.1.1. LES ANIMAUX D'EXPERIMENTATION

2.1.1.1. Les souris

Nous avons utilisé des souris *Mus musculus*, de race Swiss stabilisée depuis plusieurs années à l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM). Ces souris proviennent de l'élevage du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée.

2.1.1.2. Les têtards

Des têtards sans patte de grenouille *Ptychadena mascareniensis* sont utilisés. Ils ont été capturés le jour du test dans les rizières du campus universitaire.

2.1.1.3. Les poissons

Les alevins de carpe *Cyprinus carpio* âgés de 2 mois ont été fournis par un pisciculteur à Manjakandriana. Ces alevins doivent être stabilisés dans un aquarium aéré, 24h avant le test.

2.1.1.4. Les larves de moustique

Des larves de moustique *Culex quinquefasciatus* au stade 3 sont utilisées. Ces larves sont issues des eaux stagnantes situées aux alentours du Campus Universitaire d'Antananarivo.

2.1.2. LES PLANTES D'EXPERIMENTATION

L'étude des effets sur les végétaux a été faite sur des graines sèches de plantes potagères, provenant du FOFIFA. Ce sont :

DICOTYLEDONES :

APIACEAE : *Daucus carotta* (carotte)

BRASSICACEAE : *Brassica sp.* (tissam white)

COMPOSITAE: *Lactuca sativa* (laitue)

CUCURBITACEAE: *Cucumis sp.* (concombre)

FABACEAE : *Phaseolus vulgaris* (haricot)

FABACEAE : *Pisum sativum* (petits pois)

SOLANACEAE : *Lycopersicum esculentum* (tomate)

MONOCOTYLEDONES :

POACEAE : *Zea mays* (maïs)

POACEAE : *Oryza sativa* (riz)

2.1.3. LES GERMES UTILISES

Les micro-organismes qui ont été utilisés pour le test sont des bactéries GRAM négatif et GRAM positif. Ces germes purs proviennent du Centre National d'Application des Recherches Pharmaceutiques (CNARP).

2.1.4. LES MILIEUX DE CULTURE

2.1.4.1. Milieu liquide

Bouillon nutritif

Ce milieu est utilisé pour relancer la culture avant les tests.

2.1.4.2. Milieu solide

Gélose de Müller-Hinton

Elle est utilisée pour l'étude de la sensibilité des germes aux antibiotiques.

La composition de ces milieux est donnée en annexe.4.

2.2. METHODES

2.2.1. METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES ANIMAUX

2.2.1.1. Chez la souris

2.2.1.1.1. Estimation de la toxicité

La toxicité des extraits est évaluée sur des souris de 25 ± 2 g, en administrant par voie intraperitonéale (i.p) un volume constant de 0,3 ml par souris.

Pour chaque solution à tester, un lot de 4 souris est utilisé. Un autre lot de 4 souris recevant du sérum physiologique (0,3 ml par souris) sert de témoin.

2.2.1.1.2. Détermination de la DL50

La DL_{50} (24h) est la dose qui tue 50% des animaux testés en 24 h.

Elle est déterminée de deux manières par la méthode de REED et MUENCH (1938) :

- l'une par la formule :

$$\text{Log DL}_{50} = \log B + \frac{(0,5-N) \log R}{(M-N)}$$

B : dose immédiatement inférieure à la DL₅₀

N : mortalité provoquée par la dose B

M : mortalité provoquée par la dose immédiatement supérieure à la DL₅₀

R : raison de la progression géométrique

- l'autre par la méthode graphique, c'est-à-dire que la valeur de la DL₅₀ (24 h) est donnée par l'intersection de la courbe des totaux cumulatifs des survivantes et celle des totaux cumulatifs des mortes en fonction des doses injectées.

5 lots de 5 souris de 25±2g sont testés. Cinq doses d'extrait, en progression géométrique de raison déterminée sont utilisées. Les souris sont à jeun 24h avant le test.

2.2.1.2. Test hémolitique

2.2.1.2.1.Principe

En présence d'une substance hémolitique, le surnageant d'une suspension d'hématies se colore en rouge, montrant une réaction positive (cas d'hémolyse). La réaction est négative si les hématies intactes sédimentent (absence d'hémolyse).

2.2.1.2.2. Mode opératoire

Du sang frais citraté de mouton est additionné volume à volume de sérum physiologique. Le tout est centrifugé à 3000 tours/min pendant 5min à l'aide d'une centrifugeuse JOUAN (modèle TH2). Le surnageant est écarté et le culot est de nouveau mélangé avec du sérum physiologique puis centrifugé comme précédemment. Cette opération de lavage se fait 3 fois.

A la fin du troisième lavage, le culot obtenu constitue la suspension d'hématies à 100%. Elle est diluée 2 fois pour avoir une suspension à 50 %. A partir de cette dernière, une suspension d'hématies à 2% est préparée. Toutes les dilutions se font à l'aide du tampon « Phosphate Buffered Saline » (PBS) dont la composition est donnée en annexe 1.

La suspension d'hématies à 2% est distribuée dans 48 puits d'une microplaque à fond U, à raison de 50µl par puits.

L'extrait à tester est également dilué pour obtenir 2mg/ml. Puis, la solution obtenue est diluée en cascade (coefficient de dilution 0,5, volume final 50 µl).

L'expérience est réalisée suivant le tableau 3.

Tableau 3 : Composition du milieu pour le test hémolytique

Puits n°	1(T+)	2(T-)	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Extrait à tester 2mg/ml(µl)	0	0	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78	0,39	0,196	0,097
PBS(µl)	0	50	0	25	37,5	43,75	46,87	48,44	49,22	49,61	49,805	49,903
Suspension d'hématies à 2%(µl)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Eau distillée(µl)	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Concentration finale de l'extrait (mg/ml)	0	0	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	0,0156	0,0078	0,0039
Volume final du mélange (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

T⁺ : témoin positif : PBS avec la suspension d'hématies

T⁻ : témoin négatif : eau distillée avec la suspension d'hématies

La microplaque est recouverte, puis incubée dans l'étuve à 37°C pendant 3h, après une légère agitation. Avant de faire la lecture, la plaque doit être placée à + 4°C pendant une nuit. Le résultat est apprécié par rapport aux témoins :

- si le test est positif, le contenu des puits se colore en rouge ;
- si le test est négatif, le surnageant reste incolore et les hématies se déposent au fond de chaque puits.
- une hémolyse partielle se traduit par la coloration en rouge du surnageant et le dépôt des hématies intactes au fond de chaque puits.

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

Des lots d'animaux de même âge sont placés dans des cristallisoirs contenant chacun un volume total de 200ml d'eau de pluie et d'extrait à étudier à différentes concentrations. L'expérience dure 24h.

La méthode graphique de régression linéaire (BOYD,1966) est utilisée pour déterminer la CL₅₀ (24h) ou concentration létale qui tue 50% des animaux testés en 24h.

Pour cette méthode, on a :

$$\% \text{ de mortalité} = f(\log C)$$

Avec C : concentration en mg/ml.

L'équation de la droite de la régression linéaire de cette relation est:

$$Y = A + BX$$

Où : Y : pourcentage de mortalité

A : constante

B : le coefficient de régression

X : logarithme décimal de la concentration (log C)

2.2.1.3.1. Expérience sur les alevins de carpe

Six lots de 6 alevins de carpe ont été testés avec 6 concentrations d'extrait à étudier.

2.2.1.3.2. Expérience sur les têtards de grenouille

Neuf lots de 10 têtards ont été testés avec 9 concentrations d'extrait à étudier en progression géométrique.

2.2.1.4. Expérience sur les larves de moustique

Huit lots de 10 larves sont placés dans des cristallisoirs contenant chacun un volume final de 200ml d'eau de pluie et d'extrait à tester à différentes concentrations.

Après 24h, les larves mortes et les larves morbides sont comptées.

Les larves sont mortes si, touchées dans leur région cervicale à l'aide d'une aiguille, elles ne bougent plus. Les larves morbides ne peuvent pas plonger ou remonter en surface quand l'eau est agitée.

Pour chaque concentration, le pourcentage de mortalité est calculé en faisant la somme des larves mortes et des larves morbides.

2.2.2.METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES VEGETAUX

Cette étude comprend 3 parties :

- l'expérience sur la germination des graines ;
- l'expérience sur la croissance des jeunes plantules ;
- le test sur le développement des bourgeons axillaires.

2.2.2.1. Expérience sur la germination des graines

Deux lots de 10 graines de chaque espèce (voir §2.1.2. p. 27) sont testés.

Après trempage dans l'eau pendant 24h (48h pour les haricots), les graines trempées sont décontaminées avec l'eau de javel à 10%, puis elles sont rincées avec de l'eau.

Pour chaque espèce, les graines sont mises à germer dans des boites de Petri, sur du coton imbibé d'eau (témoin) ou d'extrait à étudier, soit 10 graines par boîte. Après toutes ces opérations, les boites de Pétri sont mises à l'obscurité. La germination des graines est observée 48h après.

2.2.2.2. Expérience sur la croissance des jeunes plantules

Neuf lots de 10 graines sont trempés dans l'eau pendant 48 h. Deux lots sont ensuite trempés dans l'extrait à étudier de concentration déterminée et les 7 autres dans l'eau. Le trempage dure 48 h.

Après lavage, les 2 lots trempés dans l'extrait brut sont répartis comme suit : 1lot est mis à germer dans des boites de Petri avec du coton imbibé d'extrait à tester à même concentration, l'autre lot sur du coton imbibé d'eau.

Les 7 autres lots sont répartis dans des boites de Pétri avec du coton imbibé d'eau. Ils sont arrosés avec différentes concentrations de solution à tester.

L'observation et la mesure des épicotyles et des hypocotyles se font tous les 2 jours pendant 2 semaines, en les arrosant avec de l'extrait brut à différentes concentrations.

2.2.2.3. Test sur le développement des bourgeons axillaires

Les effets sur la croissance des bourgeons axillaires sont comparés avec 2 hormones végétales : la gibbérelline et l'auxine.

La gibbérelline stimule la croissance du bourgeon axillaire tandis que l'auxine l'inhibe.

Les plantules sont décapitées au -dessus du deuxième bourgeon axillaire après 10 jours de germination.

Un µl de produit à tester, mélangé avec de la lanoline est déposé sur la partie sectionnée. Chaque test est réalisé en double, c'est-à-dire 2 plantules pour chaque produit.

2.2.3. METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LA CROISSANCE DES MICROORGANISMES

(MARCHAL et coll., 1991)

2.2.3.1. Identification

La méthode utilisée pour l'identification des souches pures est l'observation microscopique par la méthode de coloration Gram (SINGLETON, 1994).

Pour ce faire, une colonie isolée est prélevée à l'aide d'une anse de platine. Ce prélèvement est déposé sur une lame de verre en frottis concentrique. Ce frottis est ensuite fixé par passage à la flamme d'un bec Bunsen. Cette coloration permet d'observer la morphologie des bactéries et de les classer en 2 groupes : les bactéries Gram positif (Gram+) et les bactéries Gram négatif (Gram-).

La méthode de coloration Gram proprement dite comprend les étapes suivantes :

(a) traitement par la solution Cristal violet pendant 60s, suivi d'un lavage avec de l'eau ;

(b) traitement par la solution Lugol-Polyvinylpyrrolidone (PVP) pendant 60s, suivi d'un rinçage à l'eau ;

(c) traitement par la solution Décolorante jusqu'à ce que la préparation libère un colorant, pendant environ 30 à 60s, suivi aussi d'un lavage avec de l'eau.

La lame est recolorée en faisant agir pendant 30 à 60s la solution Safranine, rincée ensuite avec de l'eau de robinet, puis séchée entre deux feuilles de papier filtre.

Avant l'observation au microscope optique (grossissement x 100), le frottis est recouvert d'une goutte d'huile d'immersion.

Les bactéries Gram + sont colorées en bleu, les bactéries Gram - sont colorées en rouge.

2.2.3.2. Etude de l'activité antimicrobienne des extraits

Pour déterminer l'activité antimicrobienne d'une substance, la méthode des disques en milieu solide (milieu de MUELLER-HINTON dont la composition est donnée en annexe 5, est utilisée.

2.2.3.2.1. Principe (DUVAL et SOUSSY, 1990)

Ce principe repose sur l'évaluation de la croissance des bactéries en présence d'un agent antimicrobien. L'activité de celui-ci est appréciée en fonction du diamètre d'une zone d'inhibition qui apparaît autour du disque imprégné de la substance active.

2.2.3.2.2. Mode opératoire

Une colonie de la souche à étudier est mise en suspension dans 10ml de bouillon nutritif (préculture 24h). Après une dilution (10^{-3}) pour avoir 10^5 cellules/ml, l'inoculum estensemencé dans des boites de Petri contenant du milieu de MUELLER-HINTON, par la technique d'inondation.

L'excès de la suspension est éliminé par aspiration à l'aide d'une pipette. L'imprégnation des germes se fait ensuite pendant 15 min à l'incubateur.

Des disques d'antibiogramme de diamètre 6mm, chargés chacun de 20 μ l d'extrait à tester, sont appliquées sur la géloseensemencée.

La lecture des résultats est effectuée après incubation des boites de Pétri à 37°C pendant 24h. Le diamètre des halos d'inhibition est mesuré.

La norme utilisée pour l'expression des résultats est celle de l'IPM, présentée dans le tableau 4.

Tableau 4 : Norme utilisée pour l'expression des résultats

Diamètre de l'halo d'inhibition(X)	Résultats	
	Sensibilité des germes	Symbole
$X < 7\text{mm}$	Insensible	-
$7\text{mm} < x < 8\text{mm}$	Assez sensible	+
$8\text{mm} < x < 9\text{mm}$	Sensible	++
$x > 9\text{mm}$	Très sensible	+++

X : diamètre du halo

2.2.3.3. Détermination de la CMI

La CMI ou Concentration Minimale Inhibitrice est la plus faible concentration d'extrait à tester pour laquelle une inhibition de la croissance bactérienne est observée.

La technique utilisée est la même que celle utilisée pour l'étude de l'activité.

La CMI correspond à la plus faible concentration qui provoque l'apparition d'un halo d'inhibition de diamètre compris entre 7mm et 8mm.

III-RESULTATS

3.1. EFFETS DES EXTRAITS SUR LES ANIMAUX

3.1.1. Effets de l'extrait sur souris

3.1.1.1. Description des symptômes d'intoxication

-Dix minutes après l'injection de l'extrait E3 (ou extrait), à la dose létale 1087,8mg/kg, une fatigue est observée chez les souris ; elle s'aggrave progressivement.

-Au bout de 1h, les souris perdent l'équilibre et ne peuvent plus marcher.

-Une exophtalmie est observée chez les souris, 1h 30min après l'injection, accompagnée de palpitations.

-Après 4h, la fatigue est totale et les membres inférieurs commencent à être paralysés.

-Pendant tout ce temps et jusqu'à leur mort au bout de 6h, aucune urine n'est observée. Des convulsions apparaissent quelques minutes avant leur mort.

A la dose sub-létale 770,64mg/kg, les souris montrent de la fatigue avec une piloérection 15min après injection. Mais elles peuvent encore marcher pendant 3h.

Au bout de 3h, une perte d'équilibre est observée chez les souris, avec une exophtalmie. Elles ne peuvent pas marcher et restent immobiles pendant quelques heures. Mais au bout de 6h, les souris se remettent très progressivement.

3.1.1.2. Détermination de la DL₅₀ 24h

Cinq doses de l'extrait, en progression géométrique de raison $r = 1,09$, allant de 770,64mg/kg (0% de mortalité) à 1087,8mg/kg (100% de mortalité), sont injectées par voie i.p à des lots de 5 souris (voir méthode au paragraphe 2.2.1.1.2 p. 28). Un lot de 5 souris sert de témoin.

Les résultats sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Résultats expérimentaux de la détermination de la DL 50 (24h) de l'extrait sur souris

Dose en mg/kg	Nombre de décès après					Total des décès	Total des survivants	% de mortalité
	6h	8h	12h	20h	24h			
770,64	0	0	0	0	0	0	5	0
840	0	0	1	1	0	2	3	40
915,6	0	0	3	0	0	3	2	60
997,72	0	2	2	0	0	4	1	80
1087,8	2	1	2	0	0	5	0	100

En utilisant la relation de REED et MUENCH (1938) (paragraphe 2.2.1.1.2.. p.28) ;
 $B = 840 \text{ mg/kg}$; $N = 40\%$ soit 0,4 ; $M = 60\%$ soit 0,6 ; $R = 1,09$.

La valeur de la DL_{50} est donc estimée à 875,99ml/kg de souris

Par la méthode graphique des totaux cumulatifs (tableau 6), la DL_{50} est de 877,8 mg/kg de souris (figure n° 5).

Tableau 6 : Données pour l'estimation de la DL 50 (24h) par la méthode de totaux cumulatifs de REED et MUENCH(1938)

Dose en mg/kg	Nombre de souris à tester	Nombre de souris		Totaux cumulatifs des	
		Mortes	Survivantes	Mortes	Survivantes
770,64	5	0	5	0	11
840	5	2	3	2	6
915,6	5	3	2	5	3
997,92	5	4	1	9	1
1087,8	5	5	0	14	0

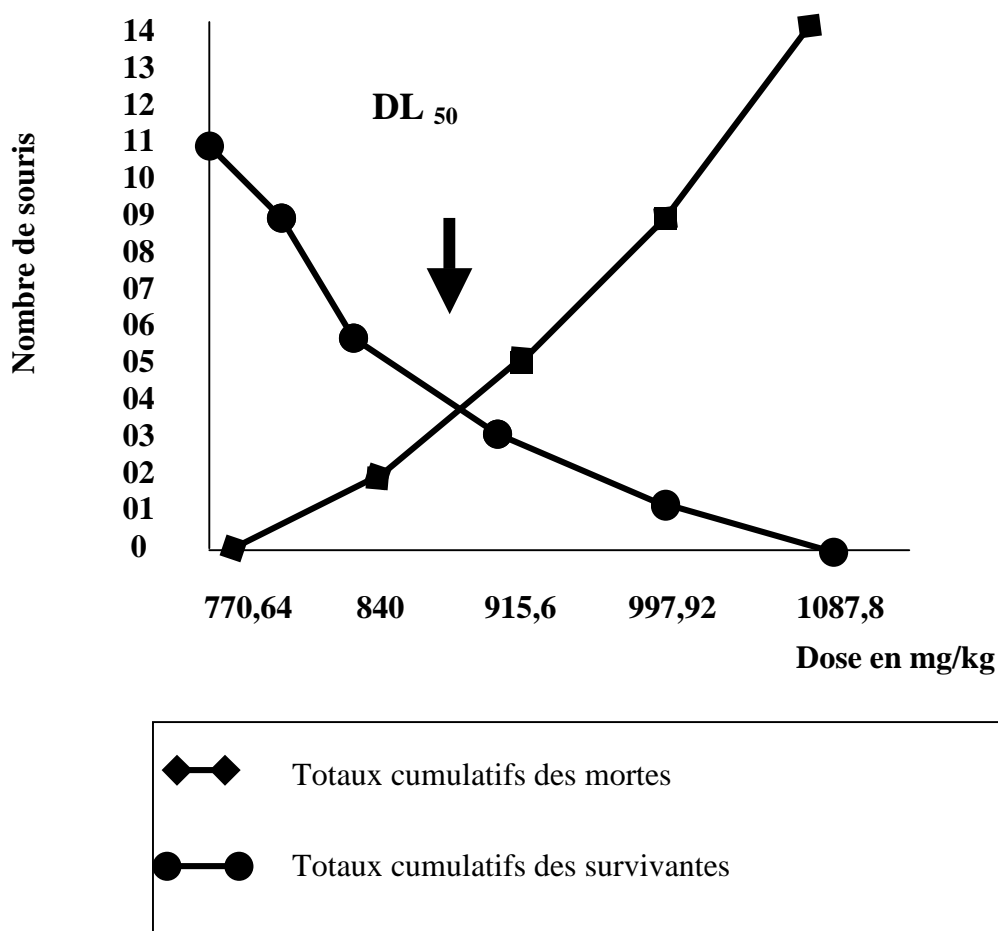


Figure n°5 : Détermination graphique de la DL 50 (24h)

3.1.2.Effets des extraits sur les hématies de mouton

Le pouvoir hémolytique des extraits est testé sur une suspension d'hématies de mouton à 2% (voir méthode au paragraphe 2.2.1.2.2. p. 29). Les effets de l'extrait brut et de l'extrait sont comparés, et les résultats sont lus par référence aux 2 témoins : témoin négatif et témoin positif.

Les résultats sont présentés dans le tableau 6 et la figure n° 6 montre le test hémolytique effectué sur la microplaque.

Tableau 7 : Effets des différentes concentrations des extraits sur les hématies de mouton

Concentration en mg/ml	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,008	0,004
EB	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-
Extrait	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-

+++ : hémolyse totale

+ : hémolyse partielle

- : absence d'hémolyse

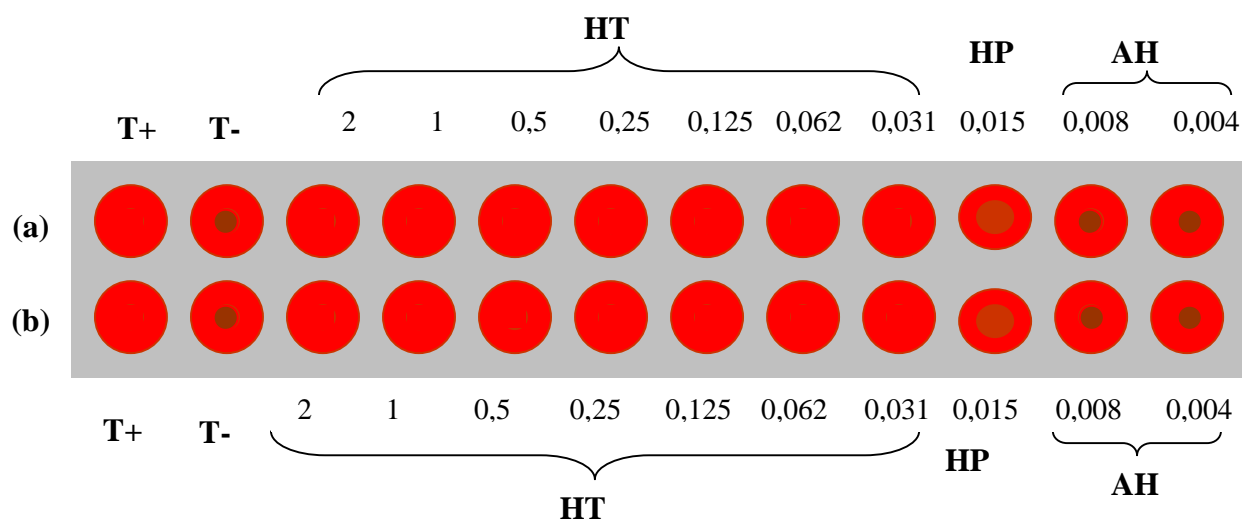
-

L'extrait brut et l'extrait ont les mêmes effets sur les hématies de mouton. Ces effets varient en fonction de la concentration :

- une hémolyse totale est observée à des concentrations supérieures ou égales à 0,031 mg/ml ;

- une hémolyse partielle est observée à 0,015mg/ml ;

- à des concentrations inférieures ou égales à 0,008 mg/ml, aucune hémolyse n'est observée.



HT : Hémolyse totale

HP : Hémolyse partielle

AH : Aucune hémolyse

Figure n°6 : Effets des différentes concentrations de EB(a) et E3(b) sur les hématies de mouton. Les chiffres indiquent la concentration en mg/ml.

3.1.3. Effets de l'extrait brut sur les alevins de carpe

Six concentrations de EB allant de 0,12 µg/ml à 3,9 µg/ml, ont été testées sur 6 lots de 6 alevins (voir paragraphe 2. 2.1.3.1.p. 31).

Toutes les solutions testées provoquent la mort des alevins en moins de 24h.

Les alevins sont donc très sensibles à l'extrait brut car à la concentration 120ng/ml (0,12µg/ml), on observe toujours 100% de mortalité.

3 1 4- Effets de l'extrait brut sur les têtards de grenouille

Neuf concentrations de EB en progression géométrique de raison 1,19, ont été testées sur 9 lots de 10 têtards (voir paragraphe 2.2.1.3.2.p. 31).

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Effets de l'extrait brut à différentes concentrations sur les têtards de grenouille

Lot n°	Concentrations		Nombre des têtards		% mortalité
	en mg/ml	log C	Mortes	Survivantes	
1	0,3	-0,096	0	10	0
2	0,1	-1	2	8	20
3	1,2	0,079	3	7	30
4	1,4	0,146	3	7	30
5	1,7	0,230	4	6	40
6	2	0,301	6	4	60
7	2,4	0,380	6	4	60
8	2,9	0,462	8	2	80
9	3,5	0,544	10	0	100

D'après ces résultats, l'extrait brut a une activité toxique sur les têtards de grenouille. Un effet-dose est observé.

L'équation de droite de la régression linéaire est de $Y = -2,65 + 27,74 X$ avec un coefficient de corrélation $r = 0,93$.

Ainsi $\log CL_{50} = 77,624$ d'où $CL_{50} = 1,89$ mg/ml.

3.1.5. Effets de l'extrait brut sur les larves de moustique

Huit concentrations de EB allant de 0,015mg/ml à 2 mg/ml, ont été testées sur les larves de moustique (voir paragraphe 2.2.1.4.p. 31).

Aucune mortalité ni morbidité n'est observée au bout de 24 h.

L'extrait brut ne provoque aucun effet sur ces larves à la concentration 2mg/ml.

3.2. EFFETS DES EXTRAITS SUR LES VEGETAUX

3.2.1. Effets de l'extrait brut sur la germination des graines

Le but de cette expérience est de déterminer l'effet de EB sur le pouvoir germinatif des graines.

D'après la méthode décrite au paragraphe 2.2.2.1.p. 32, les graines sont mises à germer en présence de EB à la concentration 1mg/ml. Les résultats sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 9 : Effets de l'extrait brut à 1mg/ml sur le pouvoir germinatif de quelques graines

Famille	Nom vernaculaire	Espèce	% germination	% d'inhibition
APIACEAE	Carotte	<i>Daucus carotta</i>	30	70
BRASSICACEAE	Tissam white	<i>Brassica sp</i>	60	40
COMPOSITEAE	Laitue	<i>Lactuca sativa</i>	10	90
CUCURBITACEAE	Concombre	<i>Cucumis sp</i>	90	10
FABACEAE	Haricot	<i>Phaseolus vulgaris</i>	100	0
FABACEAE	Petits pois	<i>Pisum sativum</i>	70	30
SOLANACEAE	Tomate	<i>Lycopersicum esculentum</i>	20	80
POACEAE	Riz	<i>Oryza sativa</i>	80	20
POACEAE	Maïs	<i>Zea mays</i>	70	30

L'extrait n'affecte pas la germination des graines de haricot (0% d'inhibition)

Pour les autres graines, une inhibition allant de 10%(concombre) à 90% (laitue) est observée.

3.2.2. Effets de l'extrait brut sur la croissance des jeunes plantules

Dans cette expérience, nous avons testé une concentration plus élevée (14,69 mg/ml) de EB sur 2 des plantes : une Monocotylédone qui est le riz (80% de germination) et une Dicotylédone qui est le haricot (100% de germination).

Par ce test nous avons vérifié si l'absence ou le peu d'effet de EB à 1mg/ml ne repose que sur une question de dose.

Le déroulement de cette expérience est décrit au paragraphe 2.2.2.2.p.32 et résumé sur la figure n°7 (p. 42).

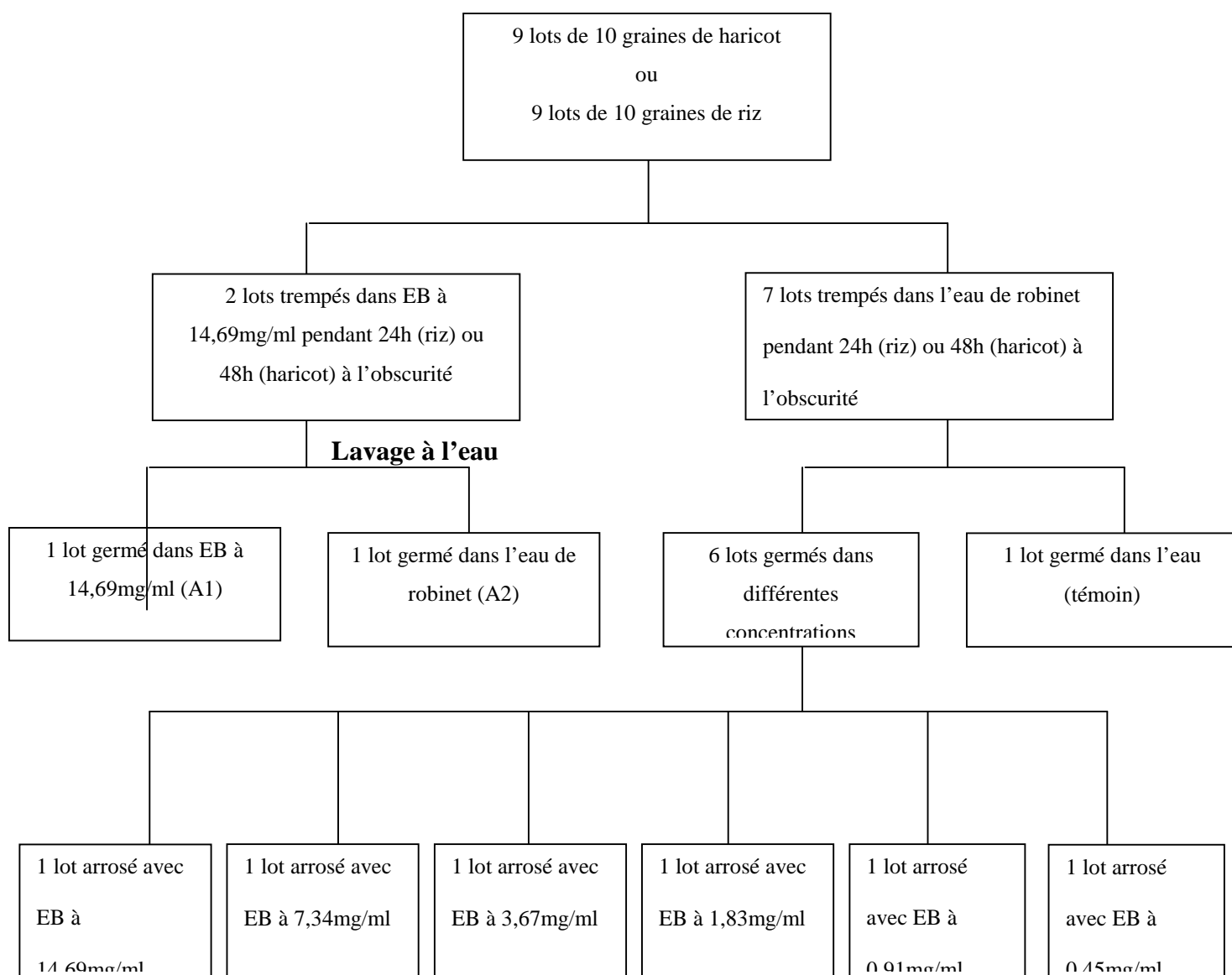


Figure n°7: Schéma récapitulatif des étapes des expériences sur les effets de l'extrait brut sur la croissance des jeunes plantules de riz et de haricot.

Pour le lot (A₁) : les graines de riz et de haricot ont le même comportement, c'est-à-dire qu'elles arrivent à pousser mais très peu.

Pour le lot (A₂) : les graines de riz poussent mais les plantules se fanent au bout du 6ème jour. Les plantules de haricot arrivent à croître mais leur développement n'est pas satisfaisant.

Pour les 6 lots germés et arrosés avec différentes concentrations de EB, allant de 0,45 mg/ml à 14,69mg/ml, les résultats sont exprimés sous formes de courbes présentées sur les figures n°8 à 11.



Figure n° 8 : Courbes de croissance des épicotyles de haricot en présence de différentes concentrations de EB.

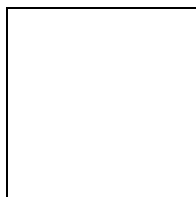


Figure n° 9 : Courbes de croissance des hypocotyles de haricots en présence de différentes concentrations de EB.

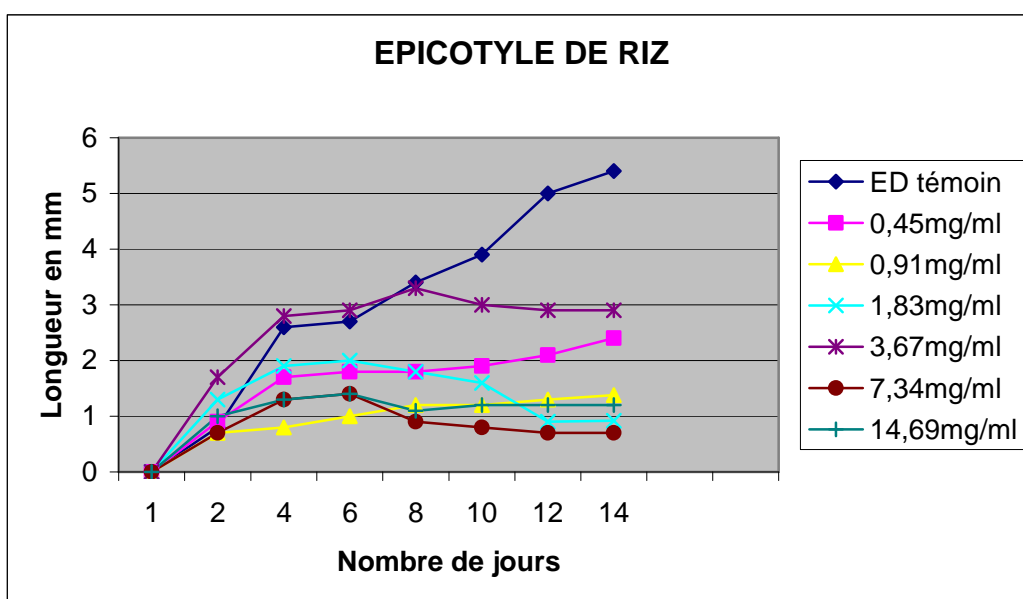


Figure n°10 : Courbes de croissance des épicotyles de riz en présence de différentes concentrations de EB

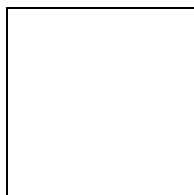


Figure n° 11 : Courbes de croissance des hypocotyles de riz en présence de différentes concentrations de EB.

Pour le haricot, à des concentrations supérieures ou égales à 1,83mg/ml, une inhibition de la croissance des épicotyles et des hypocotyles est observée. Celle des épicotyles est plus marquée par rapport aux hypocotyles. A 0,45mg/ml, la croissance des deux organes est plus ou moins identique à celle des témoins.

Pour le riz, à des concentrations supérieures ou égales à 0,91mg/ml, la croissance des épicotyles et des hypocotyles est inhibée. A des concentrations inférieures à 0,91mg/ml, la croissance des deux organes est presque identique à celle des témoins.

Les taux d'inhibition en fonction de la concentration de EB au 14^{ème} jour sont présentés dans le tableau10. Notons que les plantules de haricot sont plus sensibles à EB que celles de riz.

Tableau 10 : Taux d'inhibition de la concentration des hypocotyles et épicotyles de riz et de haricot au 14^{ème} jour de l'expérience

		Témoin (eau)	Extrait brut (mg/ml)					
			0,45	0,91	1,83	3,67	7,34	14,69
RIZ	Longueur de l'épicotyle (cm)	5,4	2,4	1,38	0,92	0,9	0,7	0,1
	Inhibition (%)	0	55,55	74,44	82,96	83,33	87,03	98,14
	Longueur de l'hypocotyle (cm)	6,2	5,9	2,6	3,4	3,2	1,7	1,9
	Inhibition (%)	0	4,83	58,06	45,16	48,38	72,58	69,35
HARICOT	Longueur de l'épicotyle (cm)	250	210	106	24	6,9	3,9	3,4
	Inhibition (%)	0	16	70,24	90,4	97,24	98,44	98,64
	Longueur de l'hypocotyle (cm)	86	98	56	22	20,8	17,1	8,62
	Inhibition (%)	0	0	34,88	74,41	75,81	80,11	89,97

3.2.3. Effets des extraits sur le développement des bourgeons axillaires

Cette expérience a pour but de déterminer les effets des 2 extraits sur le développement des bourgeons axillaires, par rapport aux phytohormones classiques (gibbérelline et auxine).

Pour cela, des plantules de petits pois âgées de 10 jours ont été utilisées. La méthode est décrite au paragraphe 2.2.2.3. (p. 33).

CROISSANCE DU BOURGEON AXILLAIRE DE PETIT POIS

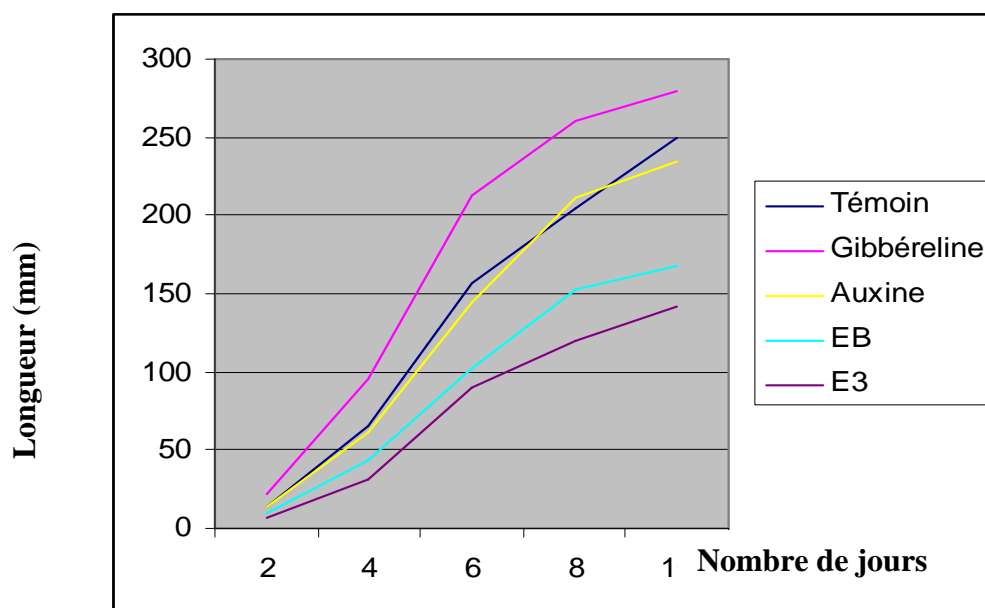


Figure n°12 : Courbe de développement des bourgeons axillaires sous l'effet de EB, E3, la gibbérelline et l'auxine.

A la dose 50 μ g, EB et l'extrait présentent les mêmes effets sur le développement des bourgeons axillaires, c'est-à-dire qu'ils inhibent leur croissance. Ils sont plus inhibiteurs que l'auxine.

3.3. EFFETS DES EXTRAITS SUR LES MICROORGANISMES

3.3.1. Identification des germes

Les caractéristiques des souches utilisées, déterminées (paragraphe 2.2.3.1.p. 33) par coloration Gram sont indiquées dans le tableau 11.

Tableau 11 : *Caractères et formes des souches utilisées*

NOM DES SOUCHES	FAMILLE	GRAM	FORME
<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae	-	Bacille
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae	-	Bacille
<i>Salmonella typhi</i>	Enterobacteriaceae	-	Bacille
<i>Staphylococcus aureus</i>	Micrococcaceae	+	Coque

3.3.2. Activité antimicrobienne des extraits

L'activité de EB (235,19mg/ml) et de l'extrait (90mg/ml) (concentrations initiales) à été testée sur les 4 souches ci-dessus par la méthode des disques en milieu solide (voir paragraphe 2.2.3.2.2. p.34). Les résultats sont donnés dans le tableau 12.

Tableau 12 : *Activité des extraits sur les germes-tests*

NOMS DES SOUCHES	GRAM	SENSIBILITE			
		EB	Diamètre (mm)	EXTRAIT	Diamètre (mm)
<i>Escherichia coli</i>	-	+	7	+	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+++	16	+++	11
<i>Salmonella typhi</i>	-	+	8	++	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+++	25	+++	21

+ : assez sensible

++ : sensible

+++ : très sensible

Escherichia coli et *Salmonella typhi* sont assez sensibles ou sensibles à EB et l'extrait. Par contre, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* sont très sensibles aux concentrations utilisées.

Notons que :-pour *Klebsiella pneumoniae*, avec EB (235,19mg/ml) le halo d'inhibition obtenu est de 16mm de diamètre, avec l'extrait (90 mg/ml) le diamètre du halo est de 11mm.

-pour *Staphylococcus aureus*, avec EB (235,5mg/ml), le halo d'inhibition obtenu est de 25mm de diamètre, avec l'extrait (90mg/ml), le diamètre est de 21mm.

3.3.3. Détermination de la CMI

La CMI pour EB et extrait, a été déterminée (voir paragraphe 2.2.3.3.p.35) sur *Staphylococcus aureus* à cause de la grande sensibilité de ce germe vis-à-vis des 2 extraits. Pour cela, différentes concentrations en progression géométrique de raison $r = 0,5$ ont été préparées. Pour EB, ces concentrations vont de 7,32 mg/ml à 235,19mg/ml; et pour l'extrait, elles vont de 7,32 mg/ml à 117,5mg/ml.

Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau 13

Tableau 13 : Effets des extraits sur *Staphylococcus aureus*

	Concentrations (mg/ml)	Diamètre des halos (mm)
Extrait brut	235,19	25
	117,59	19
	58,79	15
	29,39	11
	14,69	10
	7,34	6
Extrait	117,15	16
	58,57	15
	29,28	13
	14,64	10
	7,32	6

D'après ce tableau, la CMI : -pour EB, est située entre 14,69mg/ml et 7,34mg/ml

-pour l'extrait, elle est comprise entre 14,62mg/ml et 7,32mg/ml

IV- DISCUSSION ET CONCLUSION

L'extrait brut et l'extrait purifié des écorces de tiges de *Myrica spathulata* se sont avérés toxiques pour des organismes d'origine animale, végétale et microbienne.

Chez la souris, l'injection par voie i.p provoque une intoxication caractérisée essentiellement par une fatigue, une paralysie des membres inférieurs, un déséquilibre et l'absence d'urine. Tous ces symptômes amènent à penser qu'il y a atteinte du système nerveux et des reins.

La valeur de la DL 50 (24h) est située entre 875,99mg/kg et 877,8mg/kg. Ceci montre que l'extrait est faiblement toxique par rapport à ceux qui ont déjà été étudiés au LABASM : par exemple les toxines d'écorces de tige de *Uapaca thouarsii* (DL 50 comprise entre 398,56mg/kg et 396,12mg/kg) (RANDRIANANDRASANA, 2005) ou les toxines des graines de *Albizia arenicola* (DL50 comprise entre 50 et 55mg/kg) (RANDRIANARIVO, 1996).

EB et l'extrait lysent les hématies de mouton et présentent les mêmes effets sur elles. Ce qui suggère la présence des saponosides, même si le test de mousse s'est avéré négatif, à moins que les principes ne soient pas des saponosides.

Les principes actifs des écorces de tiges de *Myrica spathulata* ont aussi des effets sur les animaux à sang froid :

- les alevins de carpe sont très sensibles même à des concentrations très faibles (0,12µg/ml)

- pour les têtards, la CL₅₀ (24h) est estimée à 1,89µg/ml.

Les poissons sont donc plus sensibles que les têtards aux effets de l'extrait brut. Ceci pourrait être dû au fait que les principes actifs pénètrent facilement dans les branchies. La spécificité d'action et la différence entre les espèces peuvent aussi être avancées.

Par contre, les larves de moustiques sont insensibles à la concentration de 2 mg/ml de EB.

La sensibilité des graines vis-à-vis de EB à 1 mg/ml est très variable. L'inhibition de la germination pourrait être due à la destruction des embryons ou à l'inactivation des enzymes nécessaire à la germination par les principes actifs.

Pour la croissance des jeunes plantules, à des concentrations supérieures ou égales à 1,83 mg/ml, la croissance des épicotyles et hypocotyles de haricot est inhibée. A des concentrations supérieures ou égales à 0,91 mg/ml, celle du riz est inhibée. Une relation effet-dose est observée.

Le développement des bourgeons axillaires est inhibé par EB et l'extrait. Comme ils sont plus inhibiteurs que l'auxine à la même dose, on pourrait envisager leur utilisation comme inhibiteurs expérimentaux de la croissance.

Pour les microorganismes, la croissance des 4 souches testées est affectée par EB et l'extrait. Ceci est remarqué surtout chez *Staphylococcus aureus*. La CMI pour les 2 extraits est la même : elle est située entre 14,69 mg/ml et 7,34 mg/ml vis-à-vis de ce germe. Cette similarité des CMI pourrait être due à des molécules présentes dans l'extrait brut, qui agiraient en synergie avec les principes toxiques pour inhiber la croissance du germe. Ces substances auraient été éliminées au cours de la purification.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVE

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

En conclusion, nos résultats bien que préliminaires, ont permis de :

- mettre en évidence la toxicité des écorces de tiges de *Myrica spathulata* ;
- donner les premières informations sur les propriétés physico-chimiques et la nature chimique des principes toxiques ;
- déterminer leurs propriétés toxicologiques sur des organismes animaux, végétaux et microbiens.

Toutefois, ce travail est loin d'être parfait. De ce fait dans l'avenir, nous envisageons:

- d'améliorer le procédé d'extraction et de purification afin d'isoler des principes toxiques à l'état pur ;
- d'approfondir leurs propriétés physico-chimiques, et d'élucider leur nature chimique ;
- d'approfondir les propriétés biologiques déjà mises en évidence, surtout la propriété antimicrobienne ;
- de préciser leur mécanisme d'action ;
- d'entreprendre l'étude des autres parties de la plante, comme les feuilles et les graines.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- ANDRIAMIHAJA S. Essai d'inventaire des plantes médicino-dentaire malgaches, 1986 ; Tome 1 : 319 p.
- 2- ANDRIANJAKANIRINA L. Etude chimique et toxicologique d'extraits de graines de *Physena madagascariensis* (PHYSENACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2004 ; 67p.
- 3- AUDIGIER C., DUPONT G., ZONZAIN F. Principes des méthodes d'analyse biochimique. Paris : Doin, 1989 ; Tome 1 : 190p.
- 4- BENNET V., CUATRECASAS P. Cholera toxin ; membrane gangliosides and activation of adenylate cyclase. In : the specificity and action of animal, bacterial and plant toxins (Receptors and recognition, series B). London : Cuatrecasas P. Chapman and Hall, 1977 ; 1-66.
- 5- BISMUTH C., CONSO F., FREJAVILLE J-P. Toxicologie clinique. 3^{ème} édition. Paris : Flammarion, 1984 ; 199 p.
- 6- BOITEAU P., BOITEAU M., BOITEAU L. Index des noms scientifiques avec leurs équivalents malgaches (extrait du Dictionnaires des noms malgaches de végétaux). Paris : ALZIEUC, 1952 ; 70 p.
- 7- BOITEAU P. Médecine traditionnelle et pharmacopée précis de matière médicale malgache. Paris, 1986 ; 141 p.
- 8- BOURDON J.L., MARCHAL N., RICHARD C. L. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Paris : Doin, 1991 ; 487 p.
- 9- BONNET H. NEVROT A. Travaux pratiques de bactériologie, 4^{ème} éd. Paris : Masson et Cie, 1955 ; 210 p.
- 10- BOYD. Fundamentals of immunology, 4^{ème} éd. New York: Wiley and Sons, 1966.
- 11- BRUNETON J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 2^{ème} éd. Paris : Technique et Documentation, 1993 ; 893 p.
- 12- BREMER K., BREMER B., THULIN M. Introduction to Phylogeny and Systematics of Flowering Plantes. Uppsala University, 1999 ; 102 p.

- 13- BRUNETON J. Eléments de Phytochimie et de pharmacognosie. Paris : Lavoisier, 1987 ; 585 p.
- 14- CAMPBELL, JUDD, KELLOGG, STEVENS. Botanique systématique, une perspective Phylogénétique. De Boeck University, 2002 ; 467 p.
- 15- COTONA J. La toxicologie, 1^{ère} éd. Paris : 1996 ; 126 p.
- 16- DAVID R. les hormones végétales, Paris, 1952 ; 125 p.
- 17- DEIANA J., MEYER A. Cours de microbiologie générale. Paris : Doin , 1984 ; 309p.
- 18- DEBRAY M., JACQUEMIN H. Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de la côte Est de Madagascar. O.R.S.T.O.M., 1971 ; 150 p.
- 19- DUVAL J., SOUSSY C.J. Antibiothérapie. Paris : Masson et Cie, 1990 : 37-38.
- 20- FABRE R. La toxicologie. Paris : Presses universitaires de France, 1964 ; 123 p.
- 21- GAGNAIRE G. Extraction et purification des espèces chimiques. Paris : Masson et Cie, 1969 ; 560 p.
- 22- HECKEL E. Les plantes toxiques de Madagascar avec leur nom et leurs emplois indigènes. Paris : Challamel, 1993 ; 372 p.
- 23- HUMBERT H., LEROY J-F. Flore de Madagascar et des Comores. Paris : TYPOGRAPHIE FIRMIN-DIDOT ET CIE, 1952 ; 75 p.
- 24- HUSSON M.O, LECLERC H, IZARD D., JAKUBOZAKE., WATTRE P. Microbiologie générale. Paris : Doin, 1992 ; 369 p.
- 25- IBRAHIM S.A. Etude chimique, biochimique et biologique des feuilles de *Phyllarthron madagascariense* (BIGNONIACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2005 ; 68 p.
- 26- JAMET A. Les tannins. Lyon : Ecole Française de Tannerie, 1956 ; 87 p.
- 27- JEANNODA V. Etude chimique, biochimique et toxicologique du principe convulsivant des Connaracées de Madagascar. [Thèse de doctorat : Sciences]. Strasbourg : Université Louis Pasteur de Strasbourg, 1986 ; 273 p.

- 28- KAMOUN P. Appareils et méthodes en Biochimie. Paris : Flammarion, 1987 ; 373 p.
- 29- KAMOUN P. Appareils et méthodes en biochimie. Paris : Flammarion, 1991 ; 373p.
- 30- LE MINOR L. et VERON M. Bactériologie Médicale. Paris : Flammarion, 1989 ; 1107 p.
- 31- MAHUZIER G., et HAMON M. Abrégé de chimie analytique : méthodes de séparation, T2, 2^{ème} éd. Paris : Masson, 1990 ; 262 p.
- 32- MULLER J.H. et HINTON J. Milieux de culture. Pro.Soc.Exp. Biol.Méd.1941, 48 ; 330 – 339.
- 33- MORELAND D.E. Effects of toxicants on oxidative and photophosphorylation. In: Introduction to Biochemical Toxicology. HODSON E. and GUTHRIE E.F., 1980: 245-260.
- 34- NOHARA T. Analysis of steroid and another biologically significant steroids. San Diégo : Nes.W.D. et Parish E.J., 1989 ; 119- 132.
- 35- OLSNES S. et PIHL A. Abrin, ricin and their associated agglutinins. In: The specificity and actions of animal, bacterial, and plant toxins (Receptors and recognition series B,1). London : Cuatrecasas P., Chapman and Hall, 1977 : 129 – 173.
- 36- PERNET R. Les Plantes médicinales de Madagascar (suite de notes analytiques). Mém. Inst. Sc. Madagascar, 1959 ; 9 ; 217 – 303.
- 37- RABESA A. Pharmacopée de l'Alaotra, Antananarivo, 1986 ; 288 p
- 38- RAHELINIAINAMANDIMBY L. Etude chimique et biologique d'extraits toxiques de *Olax lanceolata* (OLACACEAE) ; [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003 ; 69 p.
- 39- RAJEMIARIMOELISOA C. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes actifs d' *Albizia polyphylla* (FABACEAE, MIMOSOIDEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1996.
- 40- RAMAMONJISOA-RAKOTOARIVELO N.S. Etude chimique et toxilogique des principes toxiques de graines de *Mimusops commersonii* (SAPOTACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2004 ; 81p.

- 41- RAMADE E. Ecotoxicologie. Paris : Masson, 1979 ; 228 p.
- 42- RALISON C. Isolement et études biochimiques, toxicologiques, et biologiques de la monguine, principe toxique du *Croton mongue* (EUPHORBIACEAE). [Thèse de Doctorat d'Etat : Sciences]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1987 ; 261p.
- 43- RANDRIANANDRASANA J. Etude chimique et toxicologique des extraits toxique d'écorces de tige de *Uapaca thouarsii* (EUPHORBIACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003 ; 69 p.
- 44- RANDRIAMAHAVALISOA F. Etude chimique et biologique d'extrait toxique de feuilles de *Ocotea madagascariensis* (LAURACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003 ; 68 p.
- 45- RANDRIANARIVO H.R. Isolement, caractérisation chimique et biologique des principes toxiques de *Albizia arenicola* (MIMOSOÏDEAE, FABACEAE). [Thèse de Doctorat : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003 ; 159 p.
- 46- RANDEATH K. Chromatographie sur couches minces, Paris : édition GAUTHIER-VILLARS, 1964 ; 296 p.
- 47- RAKOTO-RATSIMAMANGA A. Un inventaire des pesticides naturels d'origines végétales à Madagascar. Madagascar : VOARISOA, l'environnement et les produits toxiques, 1998 ; 291 p.
- 48- RAKOTONDRA SOA A. Etude chimique et toxicologique des tubercules de *Discorea esculenta* (DIOSCOREACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2005 ; 70p.
- 49- RAKOTONDRAZANAKA L. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes toxiques de *Xerosicyos danguyi* (CUCURBITACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1999 ; 67p.
- 50- RAKOTO-RANOROMALALA D.A.D. Purification et étude des propriétés physico-chimiques et biologiques des principes toxiques de *Tachiadenus longiflorus* (GENTIANACEAE). [Thèse de doctorat de 3è cycle : Biochimie]. Antananarivo ; Université d'Antananarivo, 1989 ; 88 p.

- 51- RAKOTO-RANOROMALALA D.A.D. Isolement et caractérisation partielle du principe toxique de *Rourea orientalis* (CONNARACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1984 ; 44 p.
- 52- RASOATAHINA V. Etude chimique et toxicologique des principes toxiques des feuilles de *Gambeya boiviniana* (SAPOTACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2005 ; 75p.
- 53- RAZANAMPARANY L. Purification et étude des propriétés physico-chimiques et biologiques de la bolaffinine, toxine protéique de *Boletus affinis* Peck (BOLETACEAE). [Thèse de doctorat d'Etat : Sciences]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1987 ; 216 p.
- 54- REED L. et MUENCH H.A Simple method of estimating fifty per cent point. Am.J.Hyg. 1938, 27 ; 293 p.
- 55- SAMYN J.M. Plantes utiles des hautes terres de Madagascar. La réunion : Petit jean A, 2001 ; 81 p.
- 56- SINGLETON P. Bactériologie. 2^{ème} éd. Paris : Masson, 1994 ; 247 p.
- 57- SCHATZ G. Flore Générique des arbres de Madagascar. Botanical Garden : LINKLATER R, 2001 ; 503 p.
- 58- TONIMALALA M.H. Etude chimique et toxicologique des extraits toxiques du champignon *Cantharellus cf congolensis* (CANTHARELLACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003 ; 68 p

ANNEXES

Annexe 1 : Composition du réactif à la vanilline sulfurique :

- Vanilline 0,5 g
- Acide sulfurique concentré..... 100 ml

Annexe 2 : Composition des réactifs pour les tests des alcaloïdes :

Réactif de MAYER :

- Chlorure mercurique 13,5 g
- Iodure de potassium 60 ml
- Eau distillée qsp 1000 ml

Réactif de DRAGENDORFF :

Solution A :

- Silicate de bismuth 1,7 g
- Acide tartrique concentré 20 g
- Eau distillée qsp 30 ml

Solution B :

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

Un mélange volume à volume des solutions A et B est préparé, 10g d'acide tartrique et de l'eau distillée (qsp 100 ml) sont ajoutés à ce mélange.

Réactif de WAGNER :

- Iodure de potassium 2 g
- Iode 1,27 g
- Eau distillée qsp 1000 ml

Annexe 3 : Composition du PBS(Solution Bufferd Saline) :

- Chlorure de sodium	7,650 g
- Phosphate disodique	0,724 g
- Phosphate monopotassique	0,210 g
- Eau distillée qsp	1000 ml
- pH	7,2

Annexe 4 : Composition des différents milieux de cultures :

Bouillon nutritif :

- Peptone	10 g
- Chlorure de sodium	5 g
- Eau distillée qsp	1000 ml
- pH	7,2

Gélose ordinaire

- Peptone	5 g
- Extrait de viande	1 g
- Chlorure de sodium	5 g
- Extrait de levure	2 g
- Agar	15 g
- Eau distillée qsp.....	1000 ml
- pH	7,4

Milieu de MUELLER-HINTON

- Infusion de viande de bœuf deshydratée300 g
- Hydrolysate acide de caséine	17,5 g
- Amidon de maïs	1,5 g
- Agar	10 g
- Eau distillée qsp	1000 ml
- pH	7,4

Annexe 5 : Composition des réactifs utilisés pour la coloration GRAM :

	Contenu	Pourcentage
Solution Cristal Violet	Cristal violet	2
	Alcool éthylique	20
	Oxalate d'ammonium	0,8
Solution Lugol-PVP	Iode	1,3
	Iodure de potassium	2
	PVP (polyvinylpyrrolidone)	7
Solution Décolorante	Alcool 95°C	50
	Acétone	50
Solution Safranine	Safranine	0,25
	Alcool éthylique	10

Nom : ANDRIAMIARIMANANA

Prénoms : Fehivola Mandanirina

Titre du mémoire : Etude chimique et toxicologique des extraits toxiques d'écorces de tiges de *Myrica spathulata* (MYRICACEAE).

RESUME

Une activité toxique a été mise en évidence dans les extraits d'écorces de tiges de *Myrica spathulata*, une Myricacée endémique de Madagascar. Un procédé de purification comportant une précipitation par l'éthanol, une dialyse et un fractionnement par le n-butanol a permis d'obtenir un extrait partiellement purifié, à partir d'un extrait brut aqueux à chaud. Le rendement de purification est de 29,87%.

Les principes actifs sont thermostables, solubles dans l'eau, l'éthanol et l'acétone, mais ils sont insolubles dans le butanol. Ils sont précipitables par l'acétate neutre de plomb et ne traversent pas la membrane de dialyse. Ils ont une couleur marron foncé.

Un criblage phytochimique réalisé sur l'extrait partiellement purifié, révèle la présence de composées phénoliques, de désoxyoses, de leucoanthocyanes et de stérols insaturés.

Les souris ayant reçu l'extrait partiellement purifié à la dose létale 1087,8mg/kg par voie intrapéritonéale, développent des symptômes qui suggèrent une atteinte du système nerveux et des reins. La DL50 (24h) est évaluée entre 875,99 mg/kg et 877,8 mg/kg.

In vitro, les principes actifs lysent les hématies de mouton.

L'extrait brut est aussi toxique pour les têtards (CL 50 (24h) = 1,89µg/ml). Les poissons sont très sensibles même à des concentrations très faibles (0,12µg/ml).

L'extrait brut inhibe la germination de diverses graines, et la croissance des jeunes plantules d'une Monocotylédone (riz) et d'une Dicotylédone (haricot). Sur le développement des bourgeons axillaires, l'extrait brut et l'extrait partiellement purifié sont plus inhibiteurs que l'auxine.

L'extrait partiellement purifié et l'extrait brut sont actifs sur *Staphylococcus aureus*, avec une CMI située entre 14,69 mg/ml et 7,34 mg/ml.

Mots clés : MYRICACEAE, *Myrica spathulata*, toxique, activité hémolytique, inhibition de la germination, propriété antimicrobienne.

Encadreurs :

- Professeur JEANNODA Victor
- Docteur RAKOTO-RANOROMALALA Danielle Aurore Doll.