



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

FACULTE DES SCIENCES

**DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE FONDAMENTALE
ET APPLIQUEE**



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du

DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES (DEA) DE BIOCHIMIE

Option : Biochimie appliquée aux sciences médicales

**ETUDES CHIMIQUE ET TOXICOLOGIQUE DES
EXTRAITS
DE FEUILLES DE *Crotalaria trichotoma* Bojer
récoltées à Iaroka
(FABACEAE)**

Présenté par :

RAZAFINORO Nadia

Maître ès-sciences

Soutenu publiquement le : 29 Avril 2015

Devant la commission du jury, composé de :

Président : Professeur JEANNODA Victor

Rapporteur : Professeur RAKOTO-RANOROMALALA Danielle A. Doll

Examineurs : Docteur RAMAROSON Roseline

Docteur RANDRIANARIVO Ranjàna

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	i
LISTE DES ABREVIATIONS	ii
GLOSSAIRE	iii
LISTE DES TABLEAUX	iv
LISTE DES FIGURES	v
INTRODUCTION GENERALE	7
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	5
Première partie : ETUDE CHIMIQUE	13
1 INTRODUCTION	14
2 MATERIELS ET METHODES	14
2.1 Matériels	14
2.1.1 MATERIEL VEGETAL.....	14
2.1.2 DATE ET LIEU DE RECOLTE	14
2.1.3 PREPARATION ET CONSERVATION DU MATERIEL VEGETAL	14
2.1.4 LES PRODUITS CHIMIQUES	14
2.2 Méthodes	15
2.2.1 METHODES D'EXTRACTION DES PRINCIPES ACTIFS	15
2.2.1.1 Extraction à froid	15
2.2.1.2 Extraction à chaud.....	15
2.2.2 METHODES DE PURIFICATION	15
2.2.2.1 Traitement par la chaleur	15
2.2.2.1.1 Principe	15
2.2.2.1.2 Mode opératoire	16
2.2.2.2 Précipitation par l'acétate neutre de plomb	16
2.2.2.2.1 Principe	16
2.2.2.2.2 Mode opératoire	16
2.2.2.3 Fractionnement par le n-butanol	16
2.2.2.3.1 Principe	16
2.2.2.3.2 Mode opératoire	16
2.2.2.4 Dialyse	17
2.2.2.4.1 Principe	17
2.2.2.4.1 Mode opératoire	17
2.2.3 METHODE DE CONCENTRATION	18
2.2.4 CALCUL DE RENDEMENT	18
2.2.5 METHODES D'ANALYSE.....	18
2.2.5.1 Chromatographie sur couche mince.....	18
2.2.5.1.1 Principe	18
2.2.5.1.2. Mode opératoire	19
2.2.5.2 Criblage phytochimique.....	19
2.2.5.2.1 Préparation des extraits à tester	20
a) Extrait aqueux	20
b) Extrait hydroéthanolique	20

c) Extrait éthanolique.....	20
d) Extrait chloroformique.....	20
e) Extrait acide.....	20
2.2.5.2.2 Méthodes de détection.....	20
a) Les alcaloïdes.....	20
b) Les saponosides (test de mousse).....	21
c) Les tanins et polyphénols.....	21
c ₁) Test à la gélatine.....	21
c ₂) Test à la gélatine salée.....	21
c ₃) Test au chlorure ferrique.....	21
d) Les stéroïdes, les triterpènes et les stérols insaturés.....	21
d ₁) Test de LIEBERMANN-BURCHARD.....	21
d ₂) Test de SALKOWSKI.....	22
e) Les flavonoïdes et les leucoanthocyanes.....	22
e ₁) Les flavonoïdes (test de WILLSTÄTTER).....	22
e ₂) Les leucoanthocyanes (test de BATE-SMITH).....	22
f) Les désoxyoses (test de KELLER-KILIANI).....	22
g) Les anthraquinones (test de BORNTRAGER).....	23
h) Les iridoïdes.....	23
i) Les coumarines.....	23
j) Les hétérosides cyanogénétiques : (TEST DE GRIGNARD).....	23
3 RESULTATS.....	24
3.1 Extraction.....	24
3.1.1 EXTRACTION A FROID.....	24
3.1.1.1 Extraction aqueuse.....	24
3.1.1.2 Extraction hydroéthanolique.....	24
3.1.2 EXTRACTION A CHAUD.....	24
3.2 Purification.....	25
3.2.1 METHODES RETENUES DANS LE PROTOCOLE DE PURIFICATION... 26	26
3.2.1.1 Traitement par la chaleur.....	26
3.2.1.2 Fractionnement par le n-butanol.....	26
3.2.2 METHODES NON RETENUES DANS LE PROTOCOLE DE	
PURIFICATION.....	26
3.2.2.1 Précipitation par l'acétate neutre de plomb (ANP).....	26
3.2.2.2 Dialyse.....	27
3.3 Rendements.....	28
3.4 Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince.....	28
3.5 Caractérisation chimique.....	29
3.5.1 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES.....	29
3.5.2 NATURE CHIMIQUE.....	29
4. DISCUSSION ET CONCLUSION.....	31

Deuxième partie : ETUDE TOXICOLOGIQUE	33
1 INTRODUCTION	34
2 MATERIELS ET METHODES	34
2.1 Matériels	34
2.1.1 LES ANIMAUX D'EXPERIMENTATION.....	34
2.1.1.1 Les animaux à sang chaud	34
2.1.1.1.1 <i>Les souris</i>	34
2.1.1.1.2 <i>Les poussins</i>	34
2.1.1.2 Les animaux à sang froid	34
2.1.1.2.1 <i>Les têtards de grenouille</i>	34
2.1.1.2.2 <i>Les larves de moustique</i>	35
2.1.2.2.3 <i>Les poissons</i>	35
2.1.2 LES VEGETAUX D'EXPERIMENTATION	35
2.1.3 MATERIELS DE MICROBIOLOGIE	36
2.1.3.1 Les microorganismes	36
2.1.3.2 Les milieux de culture.....	36
2.1.3.3 Les disques pour les tests d'antibiogramme.....	36
2.2 Méthodes	37
2.2.1 METHODES D'ETUDES DES EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG CHAUD	37
2.2.1.1 Estimation de la toxicité sur souris	37
2.2.1.1.1 <i>Test par voie orale</i>	37
2.2.1.1.2 <i>Test par voie intrapéritonéale</i>	37
a) Estimation de la toxicité.....	37
b) Détermination de la DL ₅₀ (24 h)	37
2.2.1.2 Estimation de la toxicité sur poussins.....	38
2.2.1.2.1 <i>Test par voie orale</i>	38
2.2.1.2.2 <i>Test par voie intrapéritonéale</i>	38
2.2.2 METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG FROID	38
2.2.2.1 Principe	38
2.2.2.2 Mode opératoire	38
2.2.2.3 Détermination de la CL ₅₀ (24 h)	39
2.2.3 METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES VEGETAUX.....	39
2.2.3.1 Etude des effets sur le pouvoir germinatif des graines	39
2.2.3.2 Etude des effets sur la croissance des jeunes plantules.....	40
2.2.4 METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES MICROORGANISMES... 40	
2.2.4.1 Stérilisation	40
2.2.4.2 Test d'activité antimicrobienne.....	40
2.2.4.2.1 <i>Méthode de diffusion en milieu solide</i>	41
a) Principe.....	41
b) Mode opératoire	41
2.2.4.2.2 <i>Détermination de la CMI</i>	42

a) Principe.....	42
b) Mode opératoire	42
2.2.4.2.3 Détermination de la CMB	44
3 RESULTATS.....	44
3.1 Effets sur les animaux.....	44
3.1.1 EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG CHAUD	44
3.1.1.1 Effets sur la souris.....	44
3.1.1.1.1 Test par voie orale (gavage)	44
3.1.1.1.2 Toxicité par voie intraperitonéale	44
a) Description des symptômes d'intoxication	44
b) Détermination de la DL ₅₀ (24 h)	45
3.1.1.2 Effets sur les poussins	47
3.1.2 EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG FROID	47
3.1.2.1 Effets de l'extrait brut sur les têtards de grenouille	47
3.1.2.2 Effets de l'extrait brut sur les larves de moustique.....	47
3.1.2.3 Effets de l'extrait brut sur les alevins de carpe	48
3.2 Effets sur les végétaux.....	49
3.2.1 EFFETS DE L'EXTRAIT BRUT SUR LE POUVOIR GERMINATIF DES GRAINES	49
3.2.2 EFFETS DE L'EXTRAIT BRUT SUR LA CROISSANCE DES JEUNES PLANTULES	50
3.3 Effets sur les microorganismes	54
3.2.1 ACTIVITE ANTIMICROBIENNE EN MILIEU SOLIDE	55
3.2.2 DETERMINATION DE LA CMI ET DE LA CMB	55
3.2.2.1 Détermination de la CMI	56
3.2.2.2 Détermination de la CMB	56
CONCLUSION GENERALE.....	60
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	62
REFERENCES WEBOGRAPHIQUES	62
ANNEXES	73

REMERCIEMENTS

Je voudrais adresser mes sincères remerciements :

A DIEU, pour m'avoir donné la force, le courage et la santé pour la réalisation de ce travail ;

A mes parents et mes sœurs, si ce travail a été mené à bien c'est grâce à vous, à vos conseils, à votre soutien et à votre compréhension. Que ce travail soit un témoignage de ma reconnaissance pour votre affection et vos sacrifices ;

A Monsieur le Professeur JEANNODA Victor, pour m'avoir accueillie dans son Laboratoire, pour ses nombreux conseils et pour l'honneur qu'il m'a fait de présider le jury de ce mémoire malgré ses nombreuses tâches. Qu'il trouve par le présent mémoire l'expression de ma profonde gratitude ;

A Madame le Professeur RAKOTO-RANOROMALALA Danielle A. Doll, rapporteur de ce mémoire, pour son encadrement et son aide précieuse dans la réalisation de ce manuscrit ;

A Madame le Docteur RAMAROSON Roseline et Monsieur le Docteur RANDRIANARIVO H. Ranjàna, qui ont eu l'aimabilité d'apporter leur compétence dans le jugement de ce travail, malgré leurs multiples obligations.

J'exprime ma sincère gratitude à l'équipe de Toxicologie du laboratoire de Biochimie appliquée aux Sciences médicales pour l'aide technique que ses membres ont fournie tout au long de ce travail ;

Aux étudiants de la promotion DEA 2014 et 2015, qui ont bien voulu apporter leur aide dans l'élaboration de ce mémoire.

LISTE DES ABREVIATIONS

ATCC	:	American Type Culture Collection
B/A/E	:	butanol/acide acétique/eau
CCM	:	chromatographique 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%
DO	:	densité optique
E1	:	extrait obtenu après traitement de l'extrait brut par la chaleur
E2	;	extrait obtenu après fractionnement par n-butanol
EB	:	extrait brut
ip	:	intrapéritonéale
IPM	:	Institut Pasteur de Madagascar
LABASM	:	Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicale
LMG	:	Laboratorium voor Microbiologie Universiteit Gent Belgium
min	:	minute
N	:	normal
p/p/p	:	poids par poids par poids
p/v	:	poids par volume
UV	:	ultraviolet
v/v	:	volume par volume

GLOSSAIRE

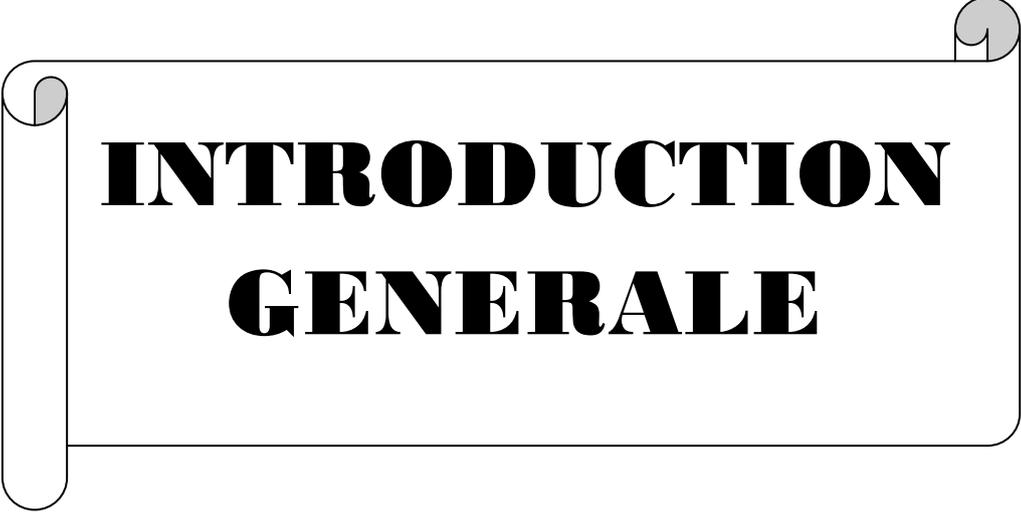
Artérite	:	ensemble des lésions touchant les artères
Contorsion abdominale	:	étirement de l'animal avec des torsions du corps
Convulsion	:	violente contraction musculaire incontrôlable
Convulsion clonique	:	alternance de contractions musculaires et de relâchements
Dicotylédones	:	plantes à fleurs issues de la germination d'une graine disposant de deux cotylédons
Enophthalmie	:	fermeture des globes oculaires
Epicotyle	:	partie de la jeune plantule en germination située au-dessus de l'insertion du ou des cotylédons
Hépatopathie	:	maladie du foie
Hyperhémie	:	augmentation de la quantité de sang tissulaire, se traduisant par une coloration rouge des oreilles suite à une dilatation artérielle et capillaire
Hypoactivité	:	baisse de l'activité motrice
Hypocotyle	:	partie de la tige située à la base de la plantule et qui émerge la première de la graine lors de la germination
Ichtyotoxique	:	toxique pour les poissons
Monocotylédones	:	plantes à fleurs et à feuilles aux nervures parallèles, dont les graines possèdent un seul cotylédon
Neurotoxine	:	toxine agissant sur le système nerveux
Pennes	:	dont la structure rappelle celle des plumes des oiseaux
Piloérection	:	hérissément des poils
Prolapsus anal	:	sortie du rectum lors de l'évacuation des selles
Pubescence apprimée	:	poils couchés et appliqués sur l'organe végétal qui les porte

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Résultats des différentes méthodes d'extraction	25
Tableau 2 : Résultats du criblage phytochimique	30
Tableau 3 : Les graines utilisées pour les tests sur les végétaux	35
Tableau 4 : Les germes utilisés	36
Tableau 5 : Normes utilisées pour les tests de sensibilité des microorganismes	42
Tableau 6 : Composition des différents milieux pour la détermination de la CMI.....	43
Tableau 7 : Résultats expérimentaux de la détermination de la DL ₅₀ (24 h)	45
Tableau 8 : Données utilisées pour l'estimation de la DL ₅₀ par la méthode graphique des totaux cumulatifs de REED et MUENCH (1938).....	46
Tableau 9 : Effets des différentes concentrations de l'extrait brut sur les têtards de grenouille.....	47
Tableau 10 : Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur les alevins de carpe	48
Tableau 11 : Effets de l'extrait brut sur le pouvoir germinatif de graines de Monocotylédones et de Dicotylédones	49
Tableau 12 : Effets des extraits brut, E1 et E2 sur les germes testés par la méthode des disques.....	55
Tableau 13 : Détermination de la CMI de l'EB en milieu liquide sur <i>Bacillus cereus</i>	56

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : <i>Crotalaria trichotoma</i> Bojer	13
Figure 2 : Distribution géographique de <i>Crotalaria trichotoma</i> Bojer	14
Figure 3 : Schéma résumant l'extraction et les étapes de purification des principes toxiques de feuilles de <i>Crotalaria trichotoma</i>	27
Figure 4 : Chromatographie sur couche mince dans le système BAE 60/20/20 (p/p/p) des différents extraits obtenus lors du procédé de purification.....	28
Figure 5 : Détermination graphique de la DL ₅₀ par la méthode de REED et MUENCH	46
Figure 6 : Schéma récapitulatif des différentes étapes des expériences sur la croissance des jeunes plantules.....	50
Figure 7a : Croissance des épicotyles de riz en présence de différentes concentrations de l'extrait brut.....	51
Figure 7b : Croissance des hypocotyles de riz en présence de différentes concentrations de l'extrait brut	51
Figure 8a : Croissance des épicotyles de maïs en présence de différentes concentrations de l'extrait brut	52
Figure 8b : Croissance des hypocotyles de maïs en présence de différentes concentrations de l'extrait brut	52
Figure 9a : Croissance des épicotyles de petit pois en présence de différentes concentrations de l'extrait brut	53
Figure 9b : Croissance des hypocotyles de petit pois en présence de différentes concentrations de l'extrait brut	53
Figure 10a : Croissance des épicotyles de haricot en présence de différentes concentrations de l'extrait brut.....	54
Figure 10b : Croissance des hypocotyles de haricot en présence de différentes concentrations de l'extrait brut.....	54
Figure 11 : Effets des extraits brut (1), E1 (2) et E2 (3) à 100 mg/ml sur <i>Bacillus</i> <i>cereus</i>	55



INTRODUCTION
GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Depuis les temps les plus reculés, la principale préoccupation de l'homme a été l'amélioration de ses conditions de vie. Il a développé une relation étroite avec la nature en exploitant les ressources animales et végétales nécessaires à sa survie. Dans ce cadre, les plantes occupent une place importante dans les activités humaines : elles sont utilisées pour satisfaire les besoins de base tels que la nourriture, les vêtements la construction de logement, les soins,....

Cependant, ces plantes qui ont le pouvoir de vie, ont aussi le pouvoir de mort en élaborant des substances toxiques (LEMOINE, 2004). Ces substances appelées toxines ou poisons naturels, provoquent après leur administration accidentelle ou volontaire des perturbations ou même la mort de l'organisme.

Mais les poisons d'origine animale, végétale, et microbienne peuvent être utilisés comme remèdes s'ils sont employés de manière adéquate (KOKKALI et coll., 2011). Malgré les risques liés à leur manipulation, l'homme a toujours su exploiter leurs propriétés. Ainsi, il les utilise :

- pour pêcher : cas des appâts préparés à partir des extraits des tiges de « famatalaro », *Euphorbia laro* (EUPHORBIACEAE) et les extraits de tubercule de « faganga », *Dioscorea sansibarensis* Pax (DIOSCOREACEAE), qui sont très toxiques pour les poissons (RAKOTO-RATSIMAMANGA, 1998 ; RAHERINIAINA, 2004) ;
- pour chasser : à titre d'exemple, la confection de flèches empoisonnées avec *Chondrodendron tomentosum* (MENISPERMACEAE), chez les Indiens d'Amérique (BRUNETON, 1993) ;
- pour lutter contre les animaux nuisibles : les bulbes de *Rhodocodon madagascariensis* (famontotozy) ou les écorces de *Rauwolfia media* Pichon (antalihazo) servent à tuer les rats et les chiens errants ; les feuilles, les fruits ou les racines de *Paullinia pinnata* (famahivala), *Mandulea grandidieri* (arangoaika) et *Melia azedarach* (voandelaka) sont utilisées contre les insectes ; les bulbes de *Dipcadii cowani* (tongolomboalavo) servent à protéger les cultures contre les rats ; les feuilles fraîches de *Buddleia axillaris* (fanotrokotro) ont des propriétés insectifuges qui permettent d'éloigner les poux et les puces (RAKOTO-RATSIMAMANGA, 1998) ;

- pour rendre la justice : à Madagascar, les extraits de « tangena » *Cerbera venenifera* (APOCYNACEAE) sont utilisés comme poisons d'épreuve (RAKOTO-RATSIMAMANGA, 1998).

Actuellement, grâce au développement de la toxicologie, science qui étudie les poisons, associé au progrès des autres disciplines scientifiques telles que la biologie, la chimie, la biochimie, la physiologie et la pharmacologie, les connaissances sur les toxines n'ont cessé d'être approfondies (ANDRIANTSOANIRINA, 2006). Plusieurs molécules ont été isolées et caractérisées sur les plans chimique et biologique. Elles ont été employées à des fins thérapeutiques et ont aussi permis d'élucider des phénomènes biologiques et les mécanismes de fonctionnement des voies métaboliques. On peut citer, à titre d'exemples :

- la roténone, principe toxique de plusieurs Papilionacées, inhibitrice du complexe I de la chaîne respiratoire (MORELAND, 1980) ;
- la toxine tétanique ou tétanospasme, protéine toxique d'origine bactérienne (*Clostridium tetani*) qui a contribué à l'élucidation du fonctionnement du système nerveux central (BIZZINI, 1977) ;
- la toxine diphtérique, une exotoxine sécrétée par le bacille *Corynebacterium diphtheria*, qui a permis d'apporter des explications sur la voie de biosynthèse des protéines et son mécanisme de régulation (COLLIER, 1977) ;
- la toxine botulinique, une neurotoxine isolée de *Clostridium botulinum* qui est commercialisée sous le nom de « botox » et qui est utilisée dans le traitement des troubles dus à une hyperactivité musculaire, tel le strabisme en inhibant la libération du neurotransmetteur acétylcholine. Elle entraîne aussi une réduction de l'activité musculaire (SINGLETON, 1994 ; GRAVEL et BOUDREAULT, 2000) ;
- le venin d'abeille qui est utilisé pour soigner les douleurs musculaires et le venin de crapaud pour soigner les ascites et les maladies du cœur (HABERMEHL, 1981) ;
- la cobrotoxine du serpent *Naja naja* utilisée dans le traitement du cancer au stade terminal, grâce à son activité analgésique puissante (ROCHAT et coll., 1976 ; HABERMEHL, 1981) ;

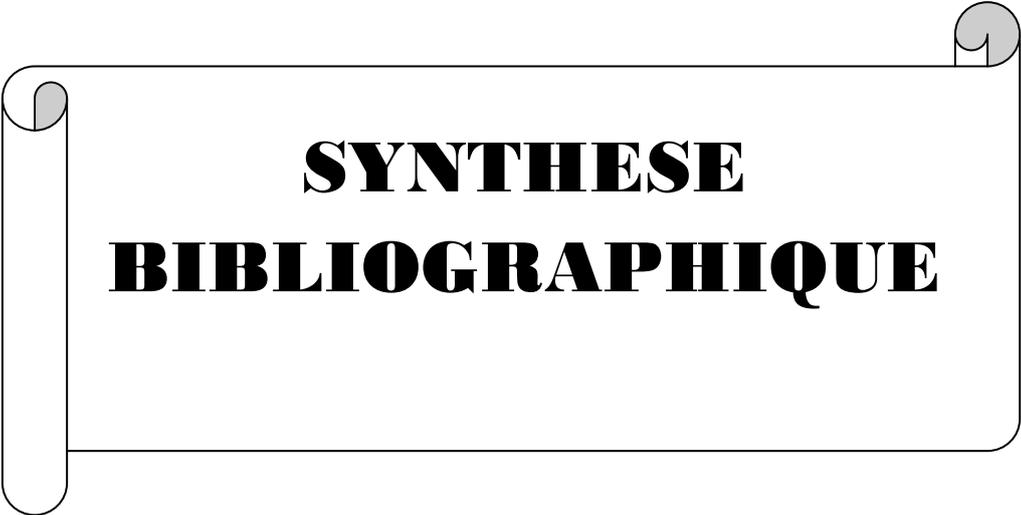
- la digitaline, un hétéroside extrait de *Digitalis purpurea* (SCROFULARIACEAE) qui guérit les insuffisances cardiaques chroniques (BRUNETON, 1993 ; http://www.lemonde.fr/planete/visuel/2014/10/11/de-la- plante-au-medicament_4504158_3244.html#bJwmkR2fO7s2.99) ;
- la morphine extraite de la plante *Papaver somniferum* (PAPAVERACEAE), utilisée comme analgésique et qui constitue un outil biomédical important (BRUNETON, 1993).

La flore malgache comporte plusieurs espèces toxiques, qu'elles soient endémiques ou introduites (DEBRAY et JAQUEMIN, 1971). Cependant, les connaissances sur la plupart d'entre elles sont encore incomplètes (ANGENOT, 1970).

C'est pour cette raison que le Laboratoire de 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 intéressé à l'étude chimique et toxicologique de plantes douées d'activité biologique. Plusieurs plantes toxiques ont ainsi fait l'objet de recherches approfondies. On peut citer parmi elles :

- *Cnestis glabra* et *Cnestis polyphylla* (CONNARACEAE) (JEANNODA, 1986) ;
- *Tachadenus longiflorus* (GENTIANACEAE) (RAKOTO-RANOROMALALA, 1989) ;
- *Xerosicyos danguyi* (RAKOTONDRAZANAKA, 1999) et *Xerosicyos perrieri* (CUCURBITACEAE) (RANDRIAMIHARISOA, 2000) ;
- *Ravensara anisata* (LAURACEAE) (RAHANTARINORO, 2004) ;
- *Shefflera longipedicellata* (ARALIACEAE) (RASOLOHARIJAONA, 2008) ;
- *Albizia arenicola* (FABACEAE) (RAKOTOMALALA, 2012).

Pour notre part, nous avons travaillé sur les feuilles de *Crotalaria trichotoma* Bojer (FABACEAE) car à notre connaissance aucune étude de leurs principes actifs n'a encore été effectuée. De plus, cette plante est très répandue à Madagascar et très utilisée dans différents domaines tels que l'agriculture, la médecine et l'élevage. Ce travail est divisé en deux parties : la première partie rapporte les résultats de l'étude chimique des extraits de feuilles de la plante et la deuxième est consacrée à l'étude toxicologique de ces extraits sur quelques animaux à sang chaud, à sang froid, sur des végétaux et sur des bactéries. Ces deux parties sont précédées d'une étude bibliographique et suivies d'une conclusion générale ainsi que des perspectives d'avenir.



**SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE**

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Les plantes du genre *Crotalaria* appartiennent à la famille des FABACEAE. Cette famille constitue un des groupes de végétaux supérieurs les plus abondants et les plus diversifiés avec plus de 1 800 espèces. D'après la littérature, plusieurs espèces contiennent des principes toxiques (RATOVONIRINA, 2009). En outre, ces plantes sont utilisées traditionnellement dans le monde pour différents usages, et certaines d'entre elles ont fait l'objet d'études approfondies. Nous allons résumer dans ce chapitre les données importantes sur la famille des FABACEAE et le genre *Crotalaria*.

1 GENERALITES SUR LA FAMILLE DES FABACEAE

(MOUELET, 2004)

Cette famille qui comporte les sous-familles des *Caesalpinioideae*, des *Mimosoideae* et des *Papilionoideae* est fort importante par le nombre de genres (700) et d'espèces (1 800) (www.afleurdepau.com/.../fabaceae/f.htm). Elle comporte aussi bien des arbres que des arbustes, des lianes et des herbes. Toutes ces plantes vivent en forêt dense et humide, en savane ou en steppe sahélienne. Les feuilles composées imparipennées avec des folioles alternes ou opposées sont en général garnies de stipules à la base des folioles. Les fleurs sont zygomorphes, presque toujours hermaphrodites et parfois assez grandes. Elles peuvent atteindre plus de 20 cm dans le genre *Camoensia* d'Afrique centrale et comportent ordinairement 5 pétales et 5 sépales. Le fruit est une gousse déhiscente ou non, renfermant une seule ou en général plusieurs graines avec ou sans albumen. Parfois le fruit est renflé en articles successifs au niveau des graines (*Erytrina*), parfois le fruit est ailé, ou encore soufflé (LETOUZEY, 1982).

Notons que plusieurs représentants de cette famille ont une grande importance économique, comme par exemple *Pterocarpus erinaceus* Lamk. et *Pterocarpus lucens* Lepr. qui sont utilisées dans l'alimentation du bétail, *Indigofera tinctoria* Chev., utilisée dans la teinture et *Vigna sinensis* Savi. ou *Phaseolus vulgaris* qui sont comestibles.

2 GENERALITES SUR LE GENRE *Crotalaria*

Il s'agit d'un genre assez vaste comprenant aussi bien des herbes que des arbustes. Il contient environ 600 espèces dont 500 sont africaines (POLHILL, 1982). Ainsi, 43 espèces se trouvent à Madagascar, 34 d'entre eux étant endémiques (DU PUY et coll., 2002). Il est représenté par des herbes plus ou moins lignifiées à la base (suffrutescentes), ou des arbustes à feuilles simples, trifoliolées ou à 5 folioles et composées palmées. Les fleurs sont

groupées en grappes, parfois réunies elles-mêmes en panicules, terminales ou axiales (RAKOTO-RATSIMAMANGA et coll., 1969).

Ce genre a également une grande importance économique à cause non seulement de sa richesse en fibres, mais aussi de l'utilisation de certaines de ses espèces comme engrais verts.

3 UTILISATIONS TRADITIONNELLES DES *Crotalaria*

Plusieurs espèces de *Crotalaria* ont une importance agricole et d'autres sont utilisées comme remèdes. A titre d'exemples, on peut citer :

- *Crotalaria uncinella* Lam., de nom vernaculaire Lakamisy, est employée en décoction comme antidysentérique (PERNET et coll., 1957) ;
- *Crotalaria berteriana* D.C, synonyme de *Crotalaria fulva* Roxb., connue sous les noms vernaculaires d'Ambarivatrindolo, Amberivatrindolo ou Ranomanga, est utilisée contre les affections galeuses et les tumeurs blanches. Elle est cultivée comme engrais vert ou plante de couverture dans les plantations de canne à sucre. Cette plante fournit également une belle fibre ; elle a été utilisée pendant la seconde guerre mondiale pour la production de pâte à papier (HECKEL, 1910 ; RAKOTO-RATSIMAMANGA et coll., 1969) ;
- *Crotalaria cytisoides* Hils. et Boj. connue sous le nom de Lakamisy, employée en infusion antidysentérique. Elle est également utilisée contre la gale. Sa tisane permet de traiter les personnes atteintes de troubles plus ou moins psychiques. Cet arbuste est également utilisé comme poison de pêche (PERNET et coll., 1957 ; RAKOTO-RATSIMAMANGA et coll. 1969) ;
- *Crotalaria diosmaefolia* Benth., dont la décoction des feuilles est utilisée pour traiter l'empoisonnement par quelques plantes toxiques (RAKOTO-RATSIMAMANGA et coll., 1969) ;
- *Crotalaria retusa* L., est utilisée comme engrais vert grâce à sa capacité à fixer l'azote atmosphérique. Elle est aussi employée en médecine empirique dans le traitement du cœur (DHOLE et coll., 2011 ; http://www.barbadine.com/pages/crotalaria_retusa_lien.html);

- *Crotalaria naragutensis* Hutch., dont les écorces de racine en association avec d'autres plantes sont utilisées sous forme de décoction dans le traitement du prolapsus anal (ADJONOHOUN et coll., 1996) ;
- *Crotalaria juncea* Linn. utilisé dans la purification du sang et le traitement de l'anémie (KIRTIKAR et coll., 1935 ; NADKAMI et coll., 1954 ; SHARMA et coll., 2001 ; BHATT et coll., 2009). Sa graine présente des activités antispermatogénique, antiovulatoire et contraceptive (BALA et coll., 1973 ; RAO et coll., 1979 ; PRAKASH, 1985 ; VIJAYKUMAR et coll., 2004 ; MALASHETTY et coll., 2007).

4 LES COMPOSES ISOLEES CHEZ LES *Crotalaria*

Plusieurs composés chimiques ont été isolés chez les *Crotalaria*. Citons quelques exemples :

- des stéroïdes, triterpènes, flavonoïdes, composés phénoliques et glycosides chez *C. juncea* Linn. (HEMENDRA et coll., 2010) ;
- des alcaloïdes, saponines, tanins et glycosides cardiotoniques chez *C. retusa* L. (DHOLE et coll., 2011) ;
- des flavonoïdes et acides phénoliques chez *C. pallida* (BOLDRIN et coll., 2013) ;
- des alcaloïdes qui sont des dérivés de pyrrolizidine et des saponosides pour *C. cystisoides* Hils. et Boj., *C. diosmaefolia* Benth., *C. fulva* Roxb (RAKOTORATSIMAMANGA et coll., 1969 ; FAO, 2011).

5 LES PROPRIETES TOXICOLOGIQUES DES *Crotalaria*

Les espèces de *Crotalaria* présentent des toxicités variées. A titre d'exemples :

- *Crotalaria fulva* Roxb. est une plante hépatotoxique. Des cas très sévères d'atteintes hépatiques en Jamaïque ont été constatés chez les jeunes enfants à cause de l'administration inconsidérée de tisanes préparées avec cette plante. Des chercheurs (Mac Lean, Bras et Gyorgy) ont réussi à reproduire les symptômes constatés chez les enfants Jamaïcains, à savoir la nécrose des régions centrales des lobules hépatiques, la dégénérescence des cellules nobles, l'apparition de mégaloocytes, l'occlusion des veines hépatiques, l'ascite, l'augmentation de l'activité glutamique-pyruvique transaminase (pouvant atteindre jusqu'à 20 fois

sa valeur normale dans le sérum) en administrant expérimentalement au rat l'extrait aqueux. Cet effet hépatotoxique est provoqué par les alcaloïdes dérivés de la pyrrolizidine (RAKOTO-RATSIMAMANGA et coll., 1969) ;

- *Crotalaria retusa* provoque chez certaines lignées de rats une hépatopathie, des hémorragies pulmonaires, l'apparition d'une artérite pulmonaire ainsi qu'une hyperplasie épithéliale (RAKOTO-RATSIMAMANGA, 1969). Cette toxicité est liée à la transformation d'alcaloïdes insaturés en métabolites réactifs toxiques (dérivés pyrroliques) à l'intérieur des cellules hépatiques et des cellules endothéliales (<http://www.fmcgastro.org/htdocs/postu98/larrey.html> ; BURKILL, 1995). Sur le plan biochimique, ces alcaloïdes provoquent aussi une élévation du taux des transaminases, de la phosphatase alcaline et de la gamma-GT.

(http://www.caryenne.ird.fr/database/web_elodie/symptomes/crotalaria/html);

- *Crotalaria juncea* Linn. est une plante hépatotoxique (PRAKASH et coll., 1995). Mais l'extrait éthanolique des graines et des fleurs a une activité antimicrobienne vis-à-vis d'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* (HEMENDRA et coll., 2010) et antifongique (GOUN et coll., 2003).

6 POSITION SYSTEMATIQUE DE *Crotalaria trichotoma*

(POLHILL, 1982 ; DU PUY et coll., 2002)

Règne	:	PLANTEA
Embranchement	:	TRACHEOPHYTA
Classe	:	MAGNOLIOPSIDA
Ordre	:	FABALES
Famille	:	FABACEAE
Sous-famille	:	PAPILIONOIDEAE
Genre	:	<i>Crotalaria</i>
Espèce	:	<i>trichotoma</i> Bojer

Synonymes: *Crotalaria zanzibarica* Benth, *Crotalaria usaramoensis* Baker

Noms vernaculaires : Ahimatavy, Marofolehana, Tsigirigiry

7 DESCRIPTION BOTANIQUE DU *Crotalaria trichotoma* Bojer

(POLHILL, 1982 ; DU PUY et coll., 2002)

Crotalaria trichotoma Bojer est une herbe annuelle ou pérenne de courte longévité qui peut atteindre 2,70 m de hauteur. Elle est rameuse dans la partie supérieure, à pubescence apprimée. Les feuilles sont trifoliolées, sans stipule, avec des pétioles plus courts que les folioles. Les folioles sont étroitement ovales à elliptiques oblongues, pubérulentes en dessous. Les racèmes atteignent 40 cm de longueur et sont multiflores. Les feuilles ont des bractées linéaires et caudées, de longueur 2,4 mm. Les bractéoles sont petites et insérées à la base du calice. Ce dernier, tronqué à la base, est de longueur 4-6 mm. L'étendard est obovale, elliptique, strié et de couleur pourpre rougeâtre sur le dos. La carène est courtement bombée vers le milieu, à bec aigu légèrement incurvé et plus longue que les ailes. Elle mesure environ 1,2 à 1,4 cm. Les gousses noires sont courtement stipitées, subcylindriques, pubérulentes et de longueur 3,5 à 4,5 cm. Chaque gousse contient environ 50-70 graines de longueur 2,2 à 2,8 mm. Ces graines sont cordiformes, obliques, lisses et de couleur chamois orangé ou terre cuite.



(a) Plante entière



(b) Feuilles



(c) Fleurs



(e) Gousses

Figure 1 : *Crotalaria trichotoma* Bojer

Source : Auteur

8 UTILISATIONS EMPIRIQUES DE LA PLANTE

(ORWA, 2009)

Les feuilles et les tiges sont très nutritives et facilement consommées par le bétail et les chevaux.

L'écorce contient des fibres qui peuvent être utilisées pour les cordages.

La plante est utilisée comme engrais vert et plante de couverture dans les plantations de thé, de café, de caoutchouc et d'agrumes.

Elle est également utilisée en tant que culture intercalaire avec des cultures annuelles telles que le maïs.

9 DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE

(PERLTIER, 1959 ; DU PUY et coll., 2002)

Crotalaria trichotoma a été introduite dans la région de l'Alaotra (Est de Madagascar). Actuellement, elle est largement répartie sur les Hauts-plateaux et à l'Est de Madagascar (Figure 2, p. 12).

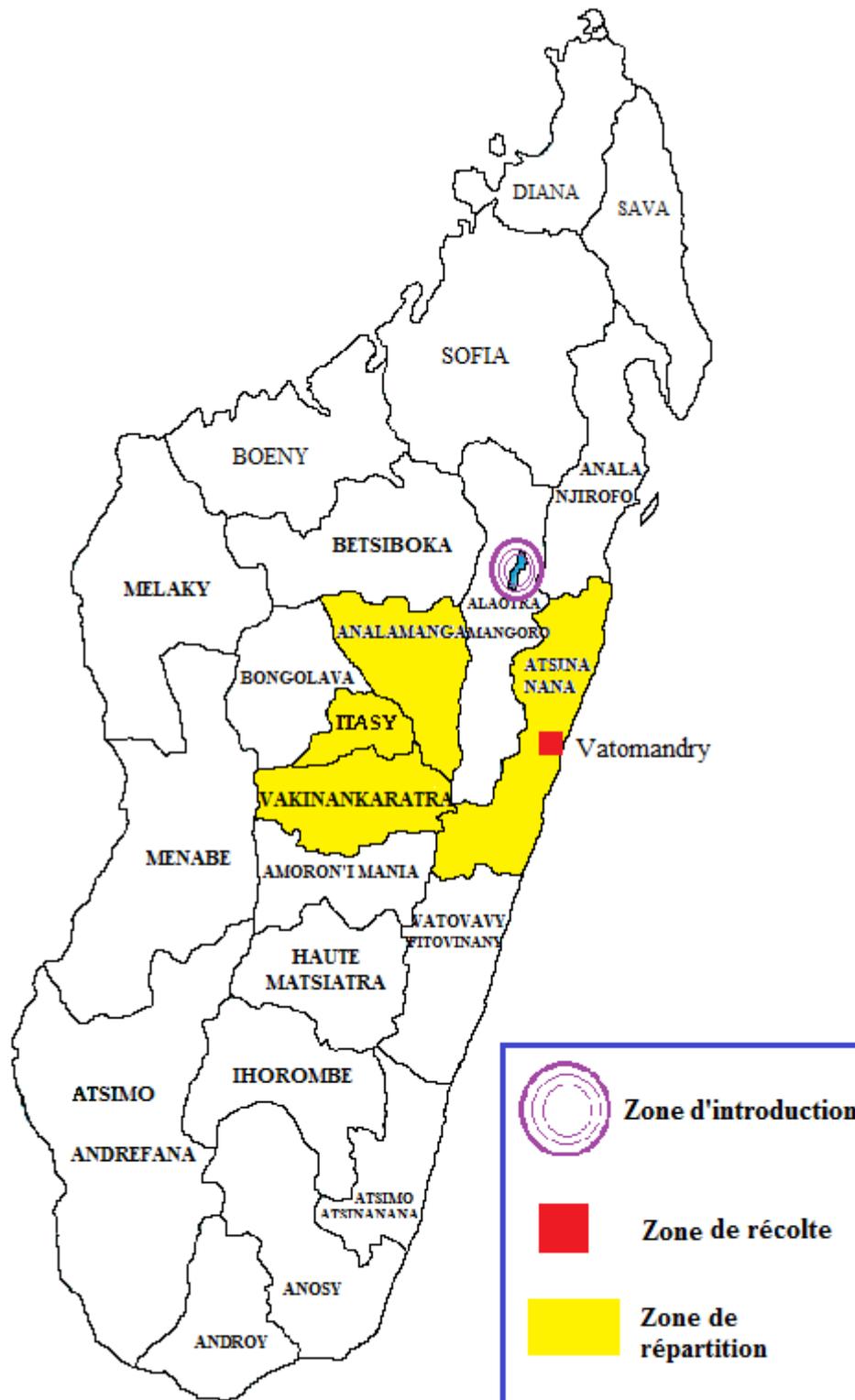


Figure 2: Distribution géographique de *Crotalaria trichotoma* Bojer

Source : FTM 2006, Auteur



PREMIERE PARTIE
ETUDE CHIMIQUE

1 INTRODUCTION

D'après la littérature, aucune étude chimique n'a été effectuée sur *Crotalaria trichotoma* Bojer récoltée à Iaroka.

La toxicité des feuilles de cette plante a été mise en évidence par des tests préliminaires sur souris.

Cette étude chimique a donc pour buts de :

- mettre au point un procédé d'extraction et de purification du ou des principe(s) actif(s) permettant d'obtenir un extrait suffisamment purifié ;
- étudier les propriétés physico-chimiques du ou des principe(s) toxique(s) ;
- déterminer sa ou leur nature(s) chimique(s).

2 MATERIELS ET METHODES

2.1 MATERIELS

2.1.1 MATERIEL VEGETAL

Les données concernant le matériel végétal sont données dans la partie Synthèse bibliographique.

2.1.2 DATE ET LIEU DE RECOLTE

La plante a été récoltée dans la région d'Atsinanana, commune Ampitabe (1km d'Antsapanana, route de Vatomandry), le long du fleuve Iaroka, le 21 septembre 2013. Au moment de la récolte, la plante était en fleurs.

2.1.3 PREPARATION ET DE CONSERVATION DU MATERIEL VEGETAL

Les feuilles qui sont les organes utilisés sont séchées dans un endroit aéré à l'abri du soleil pendant quelques jours, puis elles sont broyées au moyen d'un broyeur de marque BLENDER (Robot coupe GT550), jusqu'à pulvérisation. La poudre fine obtenue est conservée dans un bocal hermétiquement fermé, à la température ambiante. Elle constitue le matériel végétal de départ.

2.1.4 LES PRODUITS CHIMIQUES

Les produits chimiques utilisés sont de qualité pour analyse. Ils sont essentiellement de marque Merck ou Prolabo.

Le support chromatographique utilisé pour la chromatographie sur couche mince (CCM) est le gel de silice de marque Merck, de dimensions 20 x 20 cm ; l'épaisseur de la couche est de 0,2 mm.

2.2 METHODES

2.2.1 METHODES D'EXTRACTION DES PRINCIPES ACTIFS

2.2.1.1 Extraction à froid

Le matériel végétal sous forme de poudre est mis en suspension dans le solvant d'extraction qui est soit l'eau distillée, soit le mélange hydroéthanolique 75% (75 ml d'éthanol absolu additionnés de 25 ml d'eau distillée), selon le rapport 1/10 (p/v), c'est-à-dire 1 g de poudre additionné de 10 ml d'eau distillée. La suspension est homogénéisée à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 3 h à la température ambiante, puis laissée macérer à +4°C pendant une nuit. Le macérat est ensuite agité de nouveau pendant 30 min avant d'être filtré sur 4 épaisseurs de gaze pour éliminer les tourteaux. Le filtrat obtenu est centrifugé à 10 000 tours/min pendant 15 min à l'aide d'une centrifugeuse Hettich (Universal II). Le surnageant est récupéré et concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif Büchi (Rotavapor R110) (voir méthode de concentration, paragraphe 2.2.3, p.18), tandis que le culot est éliminé. Une deuxième centrifugation pendant 15 min dans les mêmes conditions que précédemment permet d'éliminer le trouble apparu au cours de la concentration.

2.2.1.2 Extraction à chaud

La poudre de feuilles est délayée dans l'eau distillée suivant le rapport 1/10 (p/v). Le mélange est soumis à un chauffage à 96°C pendant 3 h sous agitation magnétique, puis laissé macérer à +4°C pendant une nuit. Le macérat est filtré sur 4 épaisseurs de gaze et le filtrat obtenu est centrifugé à 10 000 tours/min (Hettich, Universal II) pendant 15 min. Le surnageant est concentré par évaporation, tandis que le culot est éliminé.

2.2.2 METHODES DE PURIFICATION

2.2.2.1 Traitement par la chaleur

2.2.2.1.1 Principe

Cette méthode est utilisée dans le but d'éliminer les macromolécules telles que les protéines qui coagulent sous l'effet de la chaleur.

2.2.2.1.2 Mode opératoire

L'extrait à tester est chauffé dans un bain-marie bouillant pendant 15 min à 96°C. Une centrifugation à 10 000 tours/min pendant 15 min (Hettich, Universal II) est ensuite effectuée pour éliminer le précipité formé.

2.2.2.2 Précipitation par l'acétate neutre de plomb

(BRUNETON, 1993)

2.2.2.2.1 Principe

L'acétate neutre de plomb (ANP) est un sel de métal lourd ayant la capacité de précipiter sous forme de sels insolubles de nombreux composés tels que les polysaccharides, les protéines, les acides nucléiques, les acides organiques, permettant ainsi de clarifier les extraits.

2.2.2.2.2 Mode opératoire

Un volume bien déterminé d'une solution aqueuse d'ANP à 20% (p/v) est versé goutte à goutte sous agitation magnétique dans l'extrait à tester. Le précipité formé est éliminé par une centrifugation à 10 000 tours/min pendant 15 min (Hettich, Universal II). Le surnageant est récupéré tandis que le culot est éliminé.

L'opération est répétée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus formation de précipité.

L'excès de plomb dans le surnageant est éliminé par ajout d'une solution aqueuse de phosphate disodique 10% (p/v) suivi d'une centrifugation à 10 000 tours/min pendant 15 min (Hettich, Universal II). Le surnageant est recueilli et concentré par évaporation jusqu'au volume initial de l'extrait.

2.2.2.3 Fractionnement par le n-butanol

(MAHUZIER et HAMON, 1990 ; KAMOUN, 1997 ; BRUNETON, 1993)

2.2.2.3.1 Principe

La méthode est basée sur la partition de solutés entre 2 solvants non miscibles tels que le n-butanol et l'eau distillée.

2.2.2.3.2 Mode opératoire

L'extrait à tester et le n-butanol de même volume sont versés dans une ampoule à décanter. Le mélange est agité énergiquement, puis laissé au repos jusqu'à la décantation totale des deux liquides, formant deux phases bien distinctes (phase supérieure organique et

phase inférieure aqueuse). La phase organique est recueillie tandis que la phase aqueuse est encore traitée deux fois de la même manière.

Les trois phases organiques rassemblées, ainsi que la phase aqueuse sont filtrées séparément pour éliminer les éléments insolubles. Chaque filtrat obtenu est évaporé afin d'éliminer le butanol après avoir ajouté un excès d'eau.

2.2.2.4 Dialyse

2.2.2.4.1 Principe

(AUDIGIE et coll., 1989 ; MAHUZIER et HAMON, 1990 ; KAMOUN, 1997)

La dialyse est une technique de séparation des molécules en fonction de leur taille, à l'aide d'une membrane à pores calibrés, appelée membrane de dialyse. Cette membrane à perméabilité sélective permet de séparer les grosses molécules des petites.

Deux phénomènes importants sont mis en jeu lors de la dialyse :

- la diffusion : les molécules diffusent à travers la membrane de dialyse vers le liquide de contre-dialyse (à l'extérieur de la membrane). La diffusion des grosses molécules est lente ou nulle, celle des petites est rapide et se fait selon un gradient de concentration ;
- l'osmose : l'eau diffuse de la solution la moins concentrée (liquide de contre-dialyse) vers la plus concentrée (extrait à dialyser).

2.2.2.4.1 Mode opératoire

La membrane de dialyse utilisée est un cylindre en cellophane de 3,3 cm de largeur à plat, appelé aussi boudin ou sac à dialyse. Elle laisse passer toutes les substances ayant un poids moléculaire inférieur à 12 000-14 000 Da.

Préparation de la membrane de dialyse :

La membrane présente à sa surface une couche protectrice formée de glycérine, de métaux lourds et de composés sulfurés qui doit être éliminée par trempage dans l'eau distillée bouillante pendant 15 min. Cette opération est répétée 3 fois en renouvelant l'eau distillée. Après refroidissement, la membrane ainsi préparée est conservée à +4°C dans la dernière eau bouillie pendant quelque jours. La membrane est de nouveau rincée avec de l'eau distillée avant son utilisation.

Déroulement de la dialyse :

Le boudin à dialyse est rempli aux 2/3 de son volume d'extrait à dialyser. Il est fermé à ses deux extrémités par un nœud en laissant assez d'espace pour éviter l'éclatement de la membrane par l'augmentation du volume de l'extrait. Ensuite, il est immergé totalement dans le liquide de contre-dialyse (eau distillée de volume égal à 100 fois celui de l'extrait à traiter). Une légère agitation magnétique est nécessaire pour éviter la formation d'un gradient de concentration de substances diffusibles autour du boudin.

Le liquide de contre-dialyse doit être renouvelé fréquemment afin d'accélérer les échanges. A la fin de la dialyse, le dialysat (solution à l'extérieur du boudin) ainsi que l'adialysat (solution à l'intérieur) sont concentrés par évaporation jusqu'au rapport 1/1 (p/v).

2.2.3 METHODE DE CONCENTRATION

Toutes les opérations d'évaporation de solvant et de réduction de volume d'extraits sont effectuées à l'aide d'un évaporateur rotatif Büchi (Rotavapor R110), à la température 50-55°C. La pression est réduite au moyen d'une pompe à vide.

2.2.4 CALCUL DE RENDEMENT

Après l'extraction et à chaque étape de la purification, l'extrait obtenu est évaporé à sec et le résidu correspondant est pesé. Le rendement, exprimé en pourcentage du poids du résidu par rapport à celui du matériel de départ, est calculé par la formule suivante :

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

2.2.5 METHODES D'ANALYSE

2.2.5.1 Chromatographie sur couche mince

2.2.5.1.1 Principe

(RANDERATH, 1964 ; BOREL et RANDOUX, 1987 ; AUDIGIE et coll., 1989 ; MAHUZIER et HAMON, 1990)

Cette méthode est basée sur la séparation des substances en fonction de leur affinité pour la phase liquide mobile d'une part, et des forces d'adsorption dues au support d'autre part.

2.2.5.1.2. Mode opératoire

Dépôt des échantillons :

Chaque extrait à analyser est déposé à l'aide d'un fin capillaire sur une plaque de gel de silice Merck (voir paragraphe 2.1.4, p. 13) découpée aux dimensions voulues.

Ces dépôts sont effectués le long de tirets de 0,7 cm espacés de 0,6 cm situés à 1,5 cm du bord inférieur de la plaque et à 1,4 cm des bords latéraux. Chaque dépôt est séché immédiatement à l'aide d'un séchoir à main.

Développement de la plaque :

La plaque ainsi préparée est placée dans une cuve chromatographique (Desaga) dont les parois sont tapissées de papier filtre pour saturer l'atmosphère intérieure en vapeurs du solvant qui est le système B/A/E (n-butanol/ acide acétique/ eau) dans le rapport 60/20/20 (p/p/p).

La migration ascendante est arrêtée lorsque le front de solvant atteint 0,5 cm du bord supérieur. La plaque est alors retirée de la cuve, puis séchée immédiatement avec un séchoir à main.

Révélation du chromatogramme :

Les molécules ayant migré peuvent être révélées par deux méthodes :

- par visualisation de la plaque sous lumière ultraviolette (UV), à 254 nm et à 366 nm ;
- par pulvérisation du réactif à la vanilline sulfurique (0,5 g de vanilline dans 100 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄ 36 N). Les substances apparaissent sous forme de taches noires après séchage à l'air chaud.

2.2.5.2 Criblage phytochimique

(FONG et coll., 1977 ; DALTON, 1989 ; CORDELL, 1981 ; RIZK, 1982 ; HEMINGWAY et KARCHESY, 1989 ; NOHARA, 1989 ; BRUNETON, 1993 ; BEKRO et coll., 2007)

Un criblage phytochimique est effectué pour déterminer les familles chimiques présentes dans la plante. Cette méthode est réalisée à partir de différents extraits.

2.2.5.2.1 Préparation des extraits à tester

a) Extrait aqueux

La poudre de feuilles ou le résidu d'évaporation à sec de l'extrait à analyser pesant 2 g, est délayé dans 10 ml d'eau distillée. Le mélange est chauffé au bain-marie bouillant jusqu'à l'ébullition, puis laissé macérer à +4°C pendant une nuit avant d'être filtré. Le filtrat constitue l'extrait aqueux.

b) Extrait hydroéthanolique

Le mélange hydroéthanolique 75% (10 ml) est mélangé avec 2 g de poudre de feuilles ou du résidu sec. Le mélange est laissé macérer à +4°C pendant une nuit puis filtré. Le filtrat obtenu constitue l'extrait hydroéthanolique.

c) Extrait éthanolique

La poudre de feuilles ou le résidu d'évaporation à sec de l'extrait à tester (2 g) sont dissous dans 10 ml d'éthanol absolu. Le mélange est laissé macérer pendant une nuit à +4°C, puis filtré sur du coton pour avoir l'extrait éthanolique.

d) Extrait chloroformique

Cet extrait est obtenu en mélangeant 2 g de poudre de feuilles ou de résidu d'évaporation à sec avec 10 ml de chloroforme. Le tout est laissé macérer à +4°C pendant une nuit. Le macérat est filtré et le filtrat obtenu constitue l'extrait chloroformique.

e) Extrait acide

La poudre de feuilles ou le résidu d'évaporation à sec de l'extrait à analyser pesant 2 g sont mélangés avec 10 ml d'acide chlorhydrique (HCl) 2 N. Ce mélange est ensuite laissé macérer à +4°C pendant une nuit, puis filtré. Le filtrat obtenu constitue l'extrait acide.

2.2.5.2.2 Méthodes de détection

a) Les alcaloïdes

L'extrait acide est réparti dans 4 tubes à essai à raison de 1 ml par tube. Le premier tube sert de témoin et les trois autres sont utilisés pour le test en utilisant respectivement les réactifs de MAYER, WAGNER et DRAGENDORFF.

La composition de ces réactifs est donnée en Annexe I.

Les trois tubes sont additionnés de 5 gouttes des réactifs de MAYER, de WAGNER et de DRAGENDORFF, respectivement.

L'apparition d'un précipité ou d'une floculation indique la présence d'alcaloïdes dans l'extrait à tester. Ces précipités sont solubilisés dans 4 gouttes d'éthanol absolu.

b) Les saponosides (test de mousse)

L'extrait aqueux de volume 1 ml est agité fortement pendant 30 s. La présence d'une mousse de 3 cm de hauteur, persistant pendant 30 min montre la présence de saponosides dans l'extrait.

c) Les tanins et polyphénols

L'extrait aqueux est distribué dans 4 tubes à essai à raison de 1 ml par tube. Le premier tube servira de témoin tandis que les trois autres sont utilisés pour les différents tests.

c₁) Test à la gélatine

L'extrait du deuxième tube est additionné de 4 gouttes de gélatine 1% (p/v). La formation d'un précipité blanc montre la présence de polyphénols.

c₂) Test à la gélatine salée

Dans le troisième tube, 4 gouttes de gélatine salée 10% (gélatine 1% dans NaCl 10%) sont ajoutées. L'apparition d'un précipité indique la présence de tanins dans l'extrait.

c₃) Test au chlorure ferrique

Quatre gouttes de chlorure ferrique 10% en solution méthanolique sont versées dans le quatrième tube. Le virage de la solution au bleu-vert prouve la présence des tanins condensés et au noir bleuâtre celle des tanins hydrolysables.

d) Les stéroïdes, les triterpènes et les stérols insaturés

L'extrait chloroformique est réparti dans 3 tubes à essai à raison de 1 ml par tube. Le premier tube est utilisé comme témoin et les deux autres sont destinés aux tests.

d₁) Test de LIEBERMANN-BURCHARD

Le deuxième tube est ajouté de 4 gouttes d'anhydride acétique, puis agité légèrement. Ensuite, quelques gouttes de H₂SO₄ 36 N sont ajoutées.

La coloration de la phase supérieure en vert montre la présence de stéroïdes dans l'extrait et l'apparition d'un anneau rouge violacé caractérise celle des triterpènes.

d₂) Test de SALKOWSKI

Quelques gouttes de H₂SO₄ 36 N sont versées dans le troisième tube incliné. La formation d'un anneau de séparation rouge indique la présence de stérols insaturés dans l'extrait à tester.

e) Les flavonoïdes et les leucoanthocyanes

L'extrait hydroéthanolique est distribué 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.

e₁) Les flavonoïdes (test de WILLSTÄTTER)

Le deuxième tube est additionné de 0,5 ml de HCl 2 N et de deux tournures de magnésium.

La présence de flavonoïdes se traduit par le virage de la coloration en :

- rouge pour les flavones ;
- rouge pourpre pour les flavonols ;
- rouge violacé pour les flavonones et les flavonols.

Dans le troisième tube, 0,5 ml de HCl 2 N, deux tournures de magnésium, 0,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'alcool isoamylique sont versés.

Le virage au rouge de la phase supérieure indique la présence de flavones et au vert celle des flavonols.

e₂) Les leucoanthocyanes (test de BATE-SMITH)

Le quatrième tube est additionné de 0,5 ml de HCl 2 N, puis porté au bain-marie bouillant pendant 30 min.

Après refroidissement, l'apparition d'une coloration rouge montre la présence de leucoanthocyanes.

f) Les désoxyoses (test de KELLER-KILIANI)

Dans un tube à essai, 0,5 ml d'extrait aqueux est additionné de 0,5 ml d'acide acétique glacial, de 0,5 ml de chlorure ferrique et de 0,5 ml de H₂SO₄ 36 N.

La formation d'un anneau pourpre à l'interface indique la présence de désoxyoses.

g) Les anthraquinones (test de BORNTRAGER)

Le benzène de volume 0,5 ml est versé dans 0,5 ml d'extrait aqueux. Le mélange est agité énergiquement, puis 0,5 ml d'ammoniaque est additionné. Après une légère agitation, la solution est laissée se décanter.

La présence d'anthraquinones se traduit par la coloration de la phase alcaline (phase inférieure) en rouge.

h) Les iridoïdes

L'extrait aqueux (0,5 ml) est mélangé avec 0,5 ml de HCl 2 N. Le tout est porté au bain-marie bouillant pendant 30 min.

La formation d'un précipité vert foncé ou bleu foncé après refroidissement, marque la présence d'iridoïdes.

i) Les coumarines

Deux tubes à essai reçoivent chacun 2 ml d'extrait éthanolique. Le premier tube sert de témoin tandis que dans le deuxième, 0,5 ml de NaOH à 10% est versé. Les 2 tubes sont chauffés jusqu'à l'ébullition, puis 4 ml d'eau distillée y sont ajoutés.

La réaction est positive si le liquide du tube qui a servi au test est plus transparent que celui du tube à essai témoin. Par addition de quelques gouttes de HCl 2 N, la solution transparente devient trouble, ou bien il y a formation d'un précipité.

j) Les hétérosides cyanogénétiques : (TEST DE GRIGNARD)

Un papier filtre imprégné de picrate de sodium (composition donnée en Annexe II) est séché et suspendu dans un tube à essai contenant 1 ml d'extrait chloroformique. La distance entre le bout du papier filtre et l'extrait est d'environ 5 mm. L'expérience dure 3 h à la température ambiante.

La réaction est positive si le papier filtre se colore en rouge orangé.

3 RESULTATS

Les expériences préliminaires sur les feuilles de *Crotalaria trichotoma* Bojer ont montré que les principes toxiques sont stables à haute température. Par conséquent, toutes les manipulations ont été effectuées à la température ambiante.

3.1 EXTRACTION

Deux types d'extraction ont été effectués au cours de cette étude : extraction à froid et extraction à chaud. La toxicité des extraits bruts obtenus a été testée sur souris (voir méthode au paragraphe 2.2.1, p. 15).

3.1.1 EXTRACTION A FROID

Deux solvants ont été utilisés : l'eau et le mélange hydroéthanolique 75%.

3.1.1.1 Extraction aqueuse

Vingt grammes de poudre de feuilles ont été délayés dans 200 ml d'eau distillée. La suite des opérations est décrite au paragraphe 2.2.1.1 (p. 15). Nous avons obtenu 20 ml d'extrait brut aqueux (rapport 1/1, p/v). Cet extrait a un aspect limpide, une couleur marron, un pH 5,37. Il est non toxique sur souris.

3.1.1.2 Extraction hydroéthanolique

Les étapes de cette extraction sont les mêmes que celles de l'extraction aqueuse précédente, mais le solvant d'extraction utilisé est le mélange hydroéthanolique 75% (voir paragraphe 2.2.1.1, p. 15). Ainsi, 20 ml d'extrait brut hydroéthanolique d'aspect limpide, de couleur marron, de pH 5,55, toxique sur souris ont été obtenus.

3.1.2 EXTRACTION A CHAUD

L'extraction a été effectuée à partir de 20 g de poudre de feuilles. La poudre est délayée dans 200 ml d'eau distillée selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.1.2 (p. 15).

La solution finale obtenue est de volume 20 ml. Elle est d'aspect limpide, de couleur marron et de pH 5,70, toxique sur souris.

Les résultats de ces différentes méthodes d'extraction sont résumés dans le tableau n°1 (p. 25).

Tableau 1 : Résultats des différentes méthodes d'extraction

Méthode d'extraction	Aqueuse à froid	Hydroéthanolique à froid	Aqueuse à chaud
pH de l'extrait brut	5,37	5,55	5,70
Couleur	marron	marron	marron
Aspect	limpide	limpide	limpide
Toxicité (temps de survie)	pas de symptôme	6 à 9min	plus de 3h
Rendement	5,06%	11,35%	5,3%

Ces résultats montrent que l'extrait brut hydroéthanolique 75% à froid est le plus toxique (temps de survie des souris le plus court) et son rendement est le plus élevé par rapport aux autres extraits. De plus, cet extrait est stérile car l'éthanol élimine de nombreux microorganismes.

L'extrait brut hydroéthanolique 75 % à froid (ou EB) a donc été choisi pour la suite de travaux.

3.2 PURIFICATION

La purification effectuée à partir de l'EB était basée sur des techniques reposant sur les différences de propriétés physico-chimiques telles que la solubilité ou le poids moléculaire.

Certaines de ces techniques n'ont pas été retenues dans le protocole de purification car l'extrait obtenu n'était pas toxique. Mais elles seront décrites car leurs résultats ont apporté des renseignements sur les propriétés physico-chimiques des principes toxiques.

Toutes ces étapes de purification ont été guidées par des tests de toxicité sur souris et d'homogénéité par CCM.

3.2.1 METHODES RETENUES DANS LE PROTOCOLE DE PURIFICATION

3.2.1.1 Traitement par la chaleur

L'extrait brut, de volume 10 ml est chauffé à 96°C pendant 15 min (voir paragraphe 2.2.2.1, p. 15). Un extrait limpide, de couleur marron clair et toxique sur les souris est obtenu.

Cette méthode constitue la première étape de la purification et l'extrait est dénommé extrait E1.

3.2.1.2 Fractionnement par le n-butanol

Le fractionnement de 8 ml de l'extrait E1 par le même volume de n-butanol (voir paragraphe 2.2.2.3, p. 16) a permis d'obtenir :

- une phase organique (phase supérieure) de couleur jaunâtre, limpide et non toxique sur les souris ;
- une phase aqueuse (phase inférieure) de couleur marron foncé, limpide et toxique sur les souris.

La phase aqueuse constitue donc l'extrait E2.

Le protocole définitif d'extraction et de purification des principes toxiques de feuilles de *Crotalaria trichotoma* Bojer est résumé sur la figure 3 (p. 27).

3.2.2 METHODES NON RETENUES DANS LE PROTOCOLE DE PURIFICATION

3.2.2.1 Précipitation par l'acétate neutre de plomb (ANP)

Après traitement de 2 ml d'EB par 0,3 ml de l'ANP 20% (p/v) (voir paragraphe 2.2.2.2, p. 16) et l'élimination de l'excès de plomb par 0,15 ml de phosphate disodique 10% (p/v), l'extrait est devenu jaunâtre, limpide mais n'a eu aucune action sur souris.

D'après ces résultats, les principes toxiques sont éliminés par l'ANP sous forme de précipité. Ils pourraient donc être des macromolécules ou des acides organiques.

Cette étape peu performante n'a pas été adoptée pour la purification des principes toxiques.

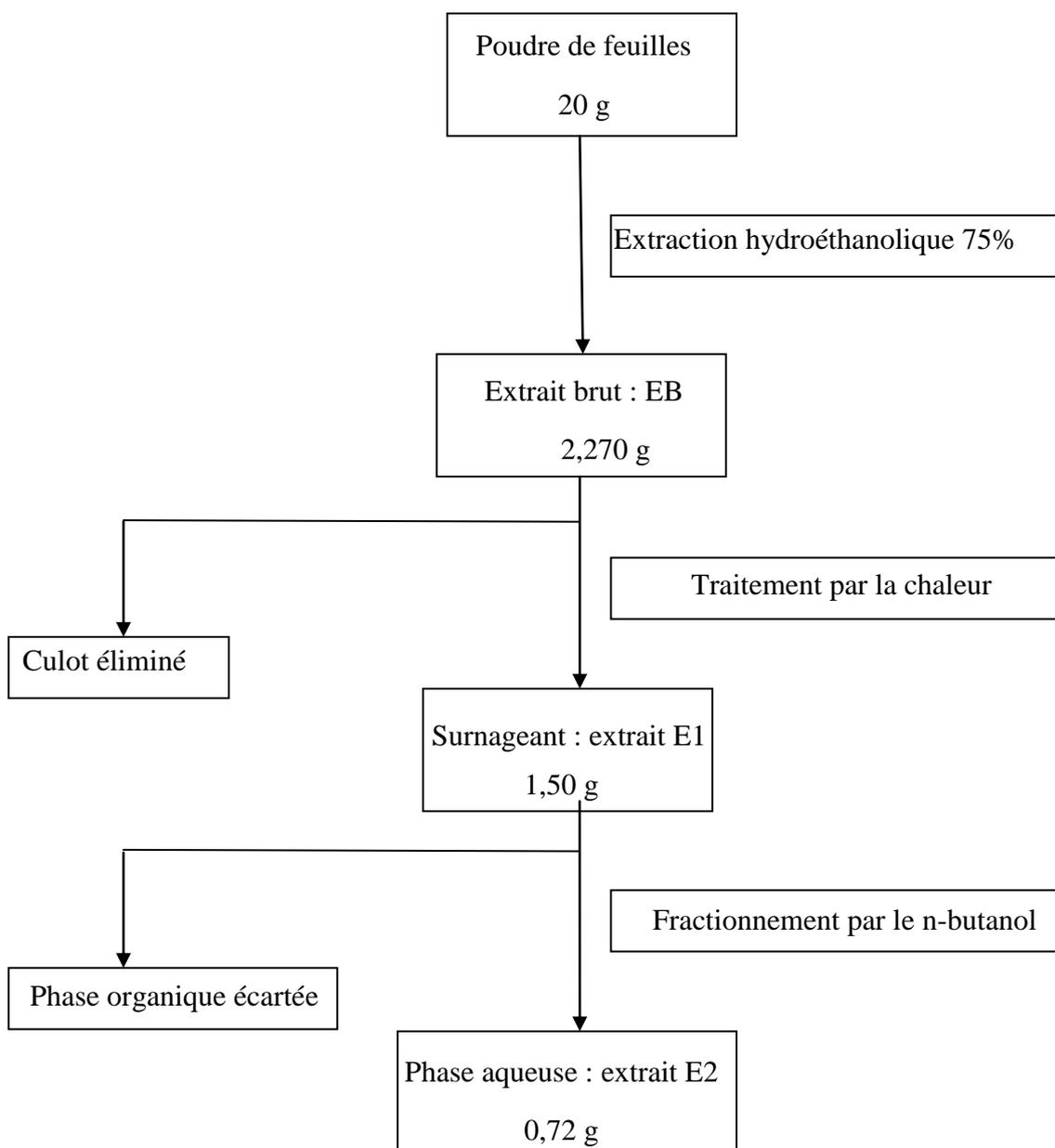


Figure 3: Schéma résumant l'extraction et les étapes de purification des principes toxiques de feuilles de *Crotalaria trichotoma*

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

3.2.2.2 Dialyse

L'extrait E2 de volume 4 ml est dialysé contre de l'eau distillée (voir méthode au paragraphe 2.2.2.4, p. 17). Le dialysat (liquide à l'extérieur du boudin) et de l'adialysat (liquide à l'intérieur du boudin) sont tous les deux concentrés jusqu'au volume final de 4 ml. Les deux solutions sont de couleur jaunâtre et d'aspect limpide. Les tests sur les souris révèlent qu'aucune d'elles n'est toxique sur souris.

Donc, cette étape n'a pas été retenue dans le protocole de purification.

3.3 RENDEMENTS

A partir de 20 g de poudre de feuilles, 2,27 g de résidu sec de l'EB et 0,72 g de l'extrait E2 ont été obtenus.

Par conséquent, les rendements calculés en utilisant la formule donnée au paragraphe 2.2.4 (p. 18) sont les suivants :

- rendement d'extraction par rapport à la poudre de feuilles : 11,35% ;
- rendement de purification par rapport à EB : 31,71% ;
- rendement en toxines par rapport à la poudre de feuilles : 3,6%.

3.4 ANALYSE DES EXTRAITS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

L'évolution de l'homogénéité des extraits obtenus au cours des différentes étapes de purification a été suivie par CCM dans le système de solvants BAE 60/20/20, p/p/p (voir méthode au paragraphe 2.2.5.1, p. 18).

Les différentes bandes sont directement observées à sous lumière UV à 254 nm et 366 nm, ensuite révélées par pulvérisation du réactif à la vanilline sulfurique. Les résultats sont présentés sur la figure 4.

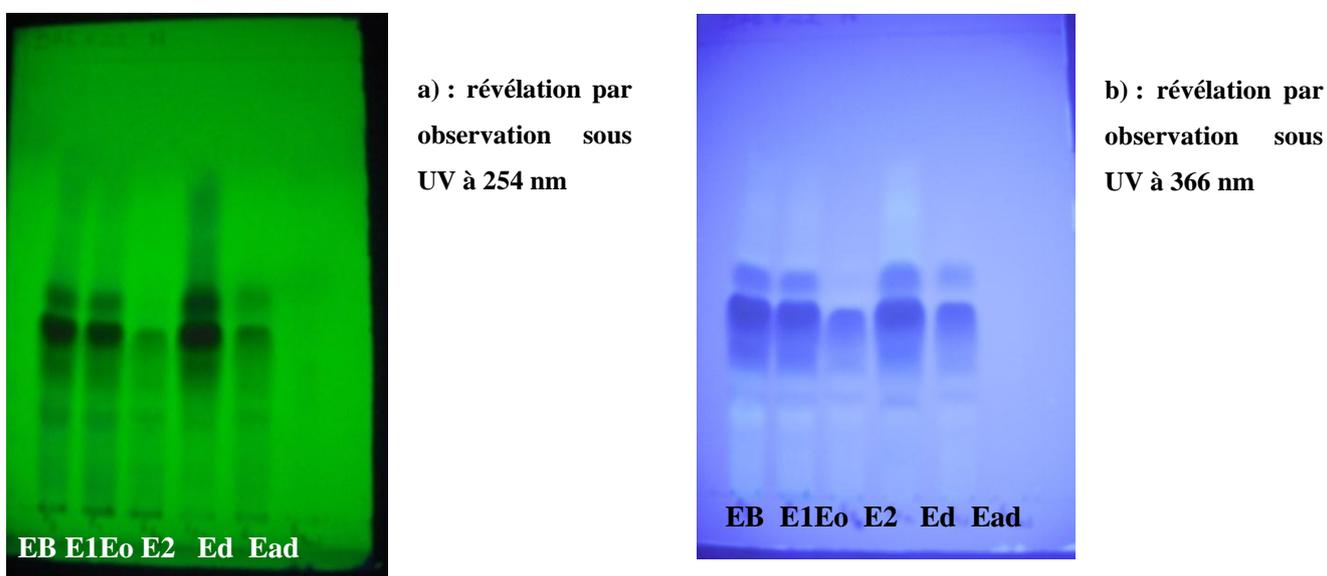


Figure 4: Chromatographie sur couche mince dans le système BAE 60/20/20 (p/p/p) des différents extraits obtenus lors du procédé de purification

EB : extrait brut hydroéthanolique ; **E1** : extrait obtenu après traitement par la chaleur ; **Eo** : phase organique obtenu lors de fractionnement par le n- butanol ; **E2** : phase aqueuse obtenu lors de fractionnement par le n- butanol ; **Ed** : dialysat ; **Ead** : adialysat

D'après la figure 4 (p. 28), les bandes majeures restent toujours visibles. Cela signifie que les composés éliminés au cours de la purification ne sont pas révélables par les méthodes utilisées.

3.5 CARACTERISATION CHIMIQUE

3.5.1 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

D'après leur comportement au cours de l'extraction et la purification, les principes toxiques des feuilles de *Crotalaria trichotoma* ont les propriétés physico-chimiques suivantes :

- ils ont un goût amer et sont de couleur marron ;
- ils résistent à la chaleur, car ils ont pu être extraits à température élevée (96°C) ;
- ils ne résistent pas à la congélation / décongélation, car après cette opération répétée la toxicité de l'extrait a tendance à augmenter. Cela nous a amené à conserver l'extrait à +4°C ;
- ils sont solubles dans les solvants polaires tels que l'eau et dans le solvant organique peu polaire comme le n-butanol ;
- ils sont précipitables par l'ANP, donc ils pourraient être de macromolécules ou des acides organiques ;
- ils pourraient être en partie adsorbés sur la membrane de dialyse et pourraient avoir une structure cyclique.

3.5.2 NATURE CHIMIQUE

Afin de déterminer la nature chimique du ou des principe(s) toxique(s), un criblage phytochimique sur l'extrait brut EB et l'extrait purifié E2 a été réalisé.

Le tableau n°2 (p. 30) nous montre que des alcaloïdes, des tanins, des stérols insaturés, des flavonoïdes, des iridoïdes, sont présents à la fois dans l'EB et dans l'E2. Donc les molécules éliminées dans les précipités lors de la purification pourraient être des composés non détectés lors du criblage phytochimique et ne sont pas révélés par la vanilline sulfurique.

Tableau 2 : Résultats du criblage phytochimique

Famille chimique	Test	EB	E2
ALCALOIDES	MAYER	+	+
	WAGNER	+	+
	DRAGENDORFF	+	+
SAPONOSIDES	Indice de mousse	-	-
TANINS et POLYPHENOLS	Gélatine 1%	-	-
	Gélatine salée 10%	-	-
	Chlorure ferrique	+	+
STEROIDES	LIEBERMANN- BURCHARD	-	-
TRITERPENES	LIEBERMANN- BURCHARD	-	-
STEROLS INSATURES	SALKOWSKI	+	+
FLAVONOIDES	WILLSTATTER	+	+
LEUCOANTHOCYANES	BATE-SMITH	-	-
DESOXYOSES	KELLER-KILIANI	-	-
ANTHRAQUINONES	BORNTRAGER	-	-
IRIDOIDES	HCl concentré	+	+
COUMARINES	NaOH	-	-
HETEROSIDES CYANOGENETIQUES	GRIGNARD	-	-

(-) : Test négatif

(+) : Test positif

4. DISCUSSION ET CONCLUSION

L'étude chimique a montré que les feuilles de *Crotalaria trichotoma* contiennent des principes toxiques sur souris.

Différentes méthodes d'extraction ont été testées mais la méthode d'extraction hydroéthanolique 75% à froid a été adoptée pour la suite de travaux car elle nous a permis d'obtenir l'EB le plus performant. En effet, l'éthanol solubilise beaucoup de composés.

A partir de l'EB, un procédé de purification a été mis au point. Il comporte dans l'ordre un traitement par la chaleur, un fractionnement par le n-butanol et il permet d'obtenir un extrait partiellement purifié avec un rendement en toxines de 3,6% et un rendement de purification de 31,71%. Le rendement en toxines de la plante est comparable à celui de feuilles de *Dialium unifoliatum* (FABACEAE) qui est de 2,05% (RAMBELOHARINTSOA, 2013). Cependant, il est inférieur à celui des feuilles de *Macarisia pyramidata* (RHIZOPHORACEAE) (RAKOTOASIMBOLA, 2007) de 9,83% et *Acridocarpus excelsus* (MALPIGHACEAE) (SILMI, 2009) de 8,38%. Il est alors nécessaire de mettre au point un autre protocole de purification pour améliorer ce rendement.

Du point de vue physico-chimique, les principes actifs sont des composés résistants à la chaleur. En outre, ils sont modifiés par les opérations décongélation et décongélation répétées. Ce comportement pourrait être dû au fait que les toxines sont adsorbées sur des molécules qui sont précipitées lors de la décongélation. L'élimination du précipité a pour effet d'augmenter la toxicité de l'extrait. Les principes toxiques sont solubles dans l'eau, dans l'éthanol et dans le n-butanol. Ils sont précipitables par l'acétate neutre de plomb (ANP), ce qui suggère qu'ils possèdent dans leur structure un groupement acide ou qu'ils ont un poids moléculaire élevé. Ces principes actifs pourraient avoir une structure cyclique entraînant leur adsorption partielle sur la membrane de dialyse.

D'après les résultats du criblage phytochimique, les principes actifs pourraient être des alcaloïdes, des tanins, des stérols insaturés, des flavonoïdes, des iridoïdes qui sont présents à la fois dans l'EB et dans l'E2.

D'après la littérature, les plantes du genre *Crotalaria* contiennent en général des alcaloïdes qui sont des dérivés pyrrolizidine (RAKOTO-RATSIMAMANGA et coll., 1969 ; FAO, 2011), des tanins, des flavonoïdes, des iridoïdes, des stérols et des triterpènes

(MOUELLET, 2004), des stéroïdes, des glycosides et des composés phénoliques (HEMENDRA et coll., 2010 ; DHOLE et coll., 2011). Ces constituants sont doués d'activités biologiques diverses. Ainsi par exemple, les alcaloïdes pyrrolizidine provoquent un effet hépatotoxique et aussi une élévation du taux des transaminases, de la phosphate alcaline et de la gamma-GT (RAKOTO-RATSIMAMANGA et coll., 1969, http://www.caryenne.ird.fr/database/web_elodie/symptomes/crotalaria/html).



DEUXIEME PARTIE :

ETUDE

TOXICOLOGIQUE

1 INTRODUCTION

Les principes toxiques des feuilles de *Crotalaria trichotoma* ont été partiellement purifiés au cours de l'étude chimique et leurs caractéristiques physico-chimiques ont été déterminées.

Au cours de l'étude toxicologique, nous avons étudié la toxicité de l'extrait brut (EB) et de l'extrait partiellement purifié (E1 et E2) en recherchant leurs effets sur :

- les animaux à sang chaud ;
- les animaux à sang froid ;
- la germination des graines et leurs effets sur la croissance des jeunes plantules ;
- les microorganismes.

2 MATERIELS ET METHODES

2.1 MATERIELS

2.1.1 LES ANIMAUX D'EXPERIMENTATION

Deux groupes d'animaux ont été utilisés : des animaux à sang chaud et des animaux à sang froid.

2.1.1.1 Les animaux à sang chaud

2.1.1.1.1 Les souris

Au cours de nos expériences, nous avons utilisé des souris blanches femelles (*Mus musculus*), de race OF1, âgées de 7 à 8 semaines et de poids moyen 30 g. Elles ont été fournies par l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM).

2.1.1.1.2 Les poussins

Des poussins (*Gallus gallus*) de race Hubbard classic, âgés d'une semaine ont été utilisés lors du test. Ils ont été fournis par AVITECH Mahazo, Antananarivo.

2.1.1.2 Les animaux à sang froid

2.1.1.2.1 Les têtards de grenouille

Le test est effectué sur des têtards de grenouille (*Ptychadena mascareniensis*), au stade sans patte. Ils ont été capturés le jour même du test dans les rizières des alentours de l'Université d'Antananarivo.

2.1.1.2.2 Les larves de moustique

Les larves de moustique (*Culex quinquefasciatus*) utilisées étaient au stade 3 de développement. Elles ont été récoltées dans les eaux stagnantes aux alentours de l'Université d'Antananarivo.

2.1.2.2.3 Les poissons

Les alevins de carpe (*Cyprinus carpio*) utilisés provenaient d'un petit élevage à Ambohimangakely, Antananarivo. Ces alevins âgés de 2 mois environ, mesurent 2,9 cm et pèsent 0,148 g en moyenne. Ils ont été adaptés dans un aquarium aéré contenant de l'eau de pluie pendant quelques jours.

2.1.2 LES VEGETAUX D'EXPERIMENTATION

Les graines utilisées pour les différents tests (germination et croissance de jeunes plantules) ont été achetées auprès des fournisseurs de semences d'Analakely, Antananarivo.

Ces graines sont présentées dans le tableau n°3.

Tableau 3 : Les graines utilisées pour les tests sur les végétaux

Classe	Famille	Nom scientifique	Nom usuel
DICOTYLEDONES	ASTERACEAE	<i>Lactuca sativa</i>	laitue
	APIACEAE	<i>Daucus carotta</i>	carotte
	BRASSICACEAE	<i>Brassica sp.</i>	tissam white
	CUCURBITACEAE	<i>Cucumis sp.</i>	concombre
		<i>Cucurbita pepo</i>	courgette
	FABACEAE	<i>Phaseolus vulgaris</i>	haricot
		<i>Pisum sativum</i>	petit pois
		<i>Glycine max</i>	soja
SOLANACEAE	<i>Lycopersicum esculentum</i>	tomate	
MONOCOTYLEDONES	POACEAE	<i>Oryza sativa</i>	riz
		<i>Zea mays</i>	maïs

2.1.3 MATERIELS DE MICROBIOLOGIE

2.1.3.1 Les microorganismes

Les microorganismes utilisés sont bactéries Gram positif (+) et Gram négatif (-) disponibles au Laboratoire de Microbiologie du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée.

Ils sont présentés dans le tableau n°4.

Tableau 4 : Les germes utilisés

Nom des germes	Forme	Gram	Référence
<i>Bacillus cereus</i>	Bacille	+	LMG 6910
<i>Bacillus megaterium</i>	Bacille	+	LMG 7127
<i>Staphylococcus aureus</i>	Coque	+	ATCC 6538
<i>Escherichia coli</i>	Bacille	-	363
<i>Salmonella enterica</i>	Bacille	-	ATCC 14028

ATCC: American Type Culture Collection

LMG : Laboratorium Voor Microbiologie Universiteit Gent Belgium

2.1.3.2 Les milieux de culture

Les milieux de culture de qualité pour analyse utilisés pour l'étude des effets sur les microorganismes étaient :

- le milieu de MUELLER-HINTON, de marque Liofilchen : un milieu solide qui sert à étudier la sensibilité des bactéries aux agents antibactériens.
- le milieu Nutrient Broth, de marque Liofilchen : un milieu liquide qui sert à déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI).

La composition de ces milieux est détaillée en Annexe III.

2.1.3.3 Les disques pour les tests d'antibiogramme

Les disques papier stériles de 6 mm de diamètre utilisés pour les tests d'antibiogramme ont été fournis par Biomérieux.

2.2 METHODES

2.2.1 METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG CHAUD

(DUMAS, 1953 ; FABRE et TRUHAUT, 1965 ; HAYES, 1982)

Deux voies d'administration ont été testées : la voie orale (*per os*) et la voie intrapéritonéale (ip). Les symptômes qui apparaissent pour chaque voie sont tous observés pendant au moins 24 h.

2.2.1.1 Estimation de la toxicité sur souris

2.2.1.1.1 Test par voie orale (gavage)

(OGWAL-OKENG et coll., 2003)

L'extrait à tester est injecté avec précaution au fond de l'estomac de l'animal à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille à gaver (sonde à bout arrondi). Le volume injecté est de 0,3 ml pour 25 g de souris. Après l'injection, la sonde est retirée rapidement pour éviter un reflux.

Pour ce test, 1 lot de 3 souris est utilisé, un autre lot injecté de NaCl 9‰ servant de témoin. Ces souris sont gavées une fois par jour pendant trois jours et les symptômes sont observés pendant les 24 h qui suivent chaque gavage.

2.2.1.1.2 Test par voie intrapéritonéale

(SANDBERG et coll., 1990)

a) Estimation de la toxicité

La toxicité d'un extrait est estimée par administration par voie ip, à raison de 0,3 ml par souris de 25 g.

Pour chaque test, 1 lot de 3 souris est utilisés, un autre lot injecté de NaCl 9‰ servant de témoin.

b) Détermination de la DL₅₀ (24 h)

La DL₅₀ (24 h) est la dose qui provoque la mort de 50% des animaux testés pendant 24 h. Pour la déterminer, 7 doses différentes d'extrait à tester en progression géométrique de raison bien déterminée sont injectées à 7 lots de 5 souris de même sexe. Les doses sont réparties entre la DL₀ (dose la plus élevée donnant 0% de mortalité) et la DL₁₀₀ (dose la plus faible donnant 100% de mortalité).

La DL_{50} (24 h) peut être déterminée de deux façons par la méthode de REED et MUENCH (1938) :

- Soit par la méthode algébrique, basée sur la formule :

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

avec :

- B = 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 progression géométrique.
- Soit par la méthode graphique, qui consiste à déterminer la DL_{50} à partir de l'intersection de la courbe des totaux cumulatifs des souris survivantes et celle des souris mortes.

2.2.1.2 Estimation de la toxicité sur poussins

2.2.1.2.1 Test par voie orale

A l'aide de l'aiguille à gaver, 0,3 ml d'extrait est introduit au fond de l'estomac d'un poussin de 25 g. Deux lots de 3 poussins dont l'un servant de témoin, reçoit du NaCl 9‰, sont nécessaires pour le test. Les symptômes sont observés pendant 24 h.

2.2.1.2.2 Test par voie intrapéritonéale

La toxicité est estimée par injection par voie ip de 0,3 ml d'extrait à un poussin de 25 g. Pour ce test, deux lots de 3 poussins sont utilisés, l'un d'eux, injecté de NaCl 9‰ servant de témoin. Les symptômes sont notés pendant 24 h.

2.2.2 METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG FROID

(OMS, 1970 ; BARBIER et coll., 1974)

2.2.2.1 Principe

Le test est basé sur l'étude de la réaction d'animaux aquatiques vis-à-vis de l'intoxication de leur milieu.

2.2.2.2 Mode opératoire

Sept lots de 5 animaux (têtards de grenouille, larves de moustique et alevins de carpe) sont testés avec sept concentrations différentes d'extrait à étudier. Ces concentrations

sont en progression géométrique de raison bien déterminée. Elles sont préparées en diluant en cascade l'extrait à tester dans de l'eau de pluie. Le volume final du mélange est de 200 ml. L'expérience dure 24 h.

2.2.2.3 Détermination de la CL₅₀ (24 h)

La CL₅₀ (24 h) ou concentration létale 50% (24 h) est la concentration qui tue la moitié des animaux testés pendant 24 h. Elle est déterminée par la méthode graphique de régression linéaire (BOYD, 1966) de la formule suivante :

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

avec : C = concentration en mg/ml

L'équation de la droite de régression linéaire est de la forme $Y = A + BX$

où :

- Y = pourcentage de mortalité ;
- A = une constante ;
- B = coefficient de régression ;
- X = logarithme décimal de la concentration (log C).

2.2.3 METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES VEGETAUX

(DAVID, 1952 ; HELLER et coll., 1955 ; MAYER et POLJAKOFF-MAYBER, 1963)

Avant toute utilisation, les graines utilisées sont trempées dans de l'eau de javel 10% (v/v) pendant quelques secondes pour les désinfecter, puis elles sont bien rincées avec de l'eau de robinet.

2.2.3.1 Etude des effets sur le pouvoir germinatif des graines

Pour chaque espèce étudiée (voir tableau n°3, p. 35), 2 lots de 10 graines sont trempés en parallèle dans l'eau de robinet, à l'obscurité, à 30°C pendant 48 h.

Après ce trempage, les graines du premier lot servant de témoin, sont mises à germer sur du coton imbibé d'eau. Les graines du deuxième lot sont transférées sur du coton imbibé d'extrait à étudier de concentration 1 mg/ml.

Les graines ayant germé sont comptées après 72 h d'incubation.

2.2.3.2 Etude des effets sur la croissance des jeunes plantules

(RAKOTO-RANOROMALALA, 2012 ; RAHELIARISATA, 2014)

Le test consiste à observer les effets de l'extrait à étudier sur la croissance des hypocotyles et épicotyles de jeunes plantules. Il est réalisé sur des représentants des Monocotylédones et des représentants des Dicotylédones.

Ces graines sont trempées à l'obscurité pendant 48 h et à 30°C dans l'eau de robinet.

Après ce trempage, un lot de 10 graines qui sert de témoin est transféré sur du coton imbibé d'eau de robinet et 9 lots de 10 graines sont transférés sur du coton imbibé d'extrait à tester à différentes concentrations. Ces lots sont arrosés avec de l'eau de robinet.

La longueur de l'hypocotyle et de l'épicotyle est mesurée tous les 2 jours pendant 15 jours.

Les résultats sont soumis à des analyses statistiques ANOVA utilisant le logiciel STATITCF (MSDOS 6.21), suivies du test de Newman-Keuls à 5% d'intervalle de confiance. Pour cela, deux facteurs ont été testés successivement : le nombre de jours d'expérimentation et la concentration de l'extrait à tester.

2.2.4 METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES MICROORGANISMES

2.2.4.1 Stérilisation

(DUVAL et SOUSSY, 1991 ; GROS, 2009)

Avant toutes les manipulations, tous les matériels utilisés, comme les milieux de culture, les disques d'antibiogramme et les cônes des micropipettes sont stérilisés à l'autoclave, à 121°C sous une pression de 2 bars pendant 20 min.

La verrerie et les pinces sont stérilisées à l'étuve à 180°C pendant 30 min.

La paille et les mains du manipulateur sont lavées à l'alcool 70°C pour éviter toute contamination.

2.2.4.2 Test d'activité antimicrobienne

(BILLE, 1998)

L'activité antimicrobienne est étudiée par deux méthodes :

- méthode de diffusion en milieu solide ou méthode des disques, utilisée pour tester la sensibilité des germes ;

- méthode de dilution en milieu liquide, utilisée pour la détermination de la CMI et la CMB.

2.2.4.2.1 Méthode de diffusion en milieu solide

a) Principe

(DUVAL et SOUSSY, 1991 ; FERRON, 1994)

Une zone d'inhibition de croissance microbienne ou halo d'inhibition apparaît autour d'un disque imprégné d'un extrait à propriété antimicrobienne.

b) Mode opératoire

A l'aide d'une anse stérile, les souches pures à étudier sont repiquées à partir d'une culture sur gélose-pente par la méthode de quadrant sur le milieu de MUELLER-HINTON coulé dans des boîtes de Petri, puis les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 h. C'est la revivification des souches ou préculture.

Après 24 h, une ansée de colonie est prélevée puis mise en suspension dans 10 ml d'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne obtenue est ensuite diluée de manière à avoir environ 10^6 cellules/ml, équivalent à une densité optique (DO) de 0,125 à la longueur d'onde $\lambda = 600\text{nm}$. Cet inoculum est ensemencé dans des boîtes de Petri contenant le milieu gélosé de MUELLER-HINTON selon la technique d'inondation. Les boîtes de Petri ensemencées sont laissées au repos pendant quelques minutes pour que les microorganismes se fixent bien à la surface du milieu et l'excès d'inoculum est éliminé par aspiration avec une pipette stérile.

Les extraits à étudier, préalablement stérilisés par filtration sur filtre Millipore (diamètre des pores : $0,22 \mu\text{m}$), sont déposés sur des disques d'antibiogramme à raison de 10 μl par disque, puis les disques sont séchés. À l'aide d'une pince, les disques ainsi préparés sont déposés délicatement à la surface du milieu. Les boîtes sont alors incubées à 37°C pendant 24 h. Après incubation, les diamètres des halos d'inhibition apparus sont mesurés.

Les résultats sont exprimés suivant les normes de LEIPZIG (1996) présentées dans le tableau n° 5 (p. 42).

Tableau 5 : Normes utilisées pour les tests de sensibilité des microorganismes

Diamètre du halo (x)	Degré de sensibilité des germes	Résultats
$x < 8$ mm	insensible	-
$9 \text{ mm} \leq x \leq 14$ mm	sensible	+
$15 \text{ mm} \leq x \leq 19$ mm	très sensible	++
$x > 20$ mm	extrêmement sensible	+++

2.2.4.2.2 Détermination de la CMI

(ARCHAMBAUD, 2000 ; AMHIS et coll., 2003)

La CMI ou la concentration minimale inhibitrice est la plus faible concentration d'extrait capable d'inhiber la croissance des microorganismes après un temps d'incubation de 24 h. Elle est déterminée par la méthode de dilution en milieu liquide.

a) Principe

En milieu liquide, la croissance bactérienne se traduit par un aspect trouble du milieu de culture ensemencé. Par contre, en cas d'inhibition de la multiplication microbienne, le milieu demeure limpide. Ainsi, la CMI correspond à la plus faible concentration de l'extrait à étudier pour laquelle le milieu de culture reste limpide après un temps d'incubation de 24 h (KIL et coll., 2009).

b) Mode opératoire

La souche à tester est relancée à partir d'une culture sur gélose-pente par mise en suspension d'une colonie du germe dans le milieu liquide Nutrient Broth. Le tout est incubé à 37°C pendant 24 h. La culture obtenue est diluée dans du milieu liquide stérile de façon à obtenir 10^6 cellules/ml ($DO = 0,126$ à $\lambda = 600$ nm).

L'extrait à tester est dilué dans de l'eau distillée de manière avoir 7 concentrations en progression géométrique de raison 1,14 allant de 100 mg/ml à 200 mg/ml (concentrations limites déterminées lors de tests préliminaires). Ainsi, 500 μ l de chaque solution obtenue sont versés dans des tubes à hémolyse stériles. Ensuite, 25 μ l d'inoculum sont additionnés dans chaque tube et le volume final est ajusté à 1 000 μ l avec le milieu de culture. Trois tubes sont utilisés comme témoin :

- témoin positif (T+) : 25 μ l d'inoculum et 975 μ l de milieu liquide, présentant une croissance de germe (trouble) ;

- témoin négatif (T-1) : 1 000 µl de milieu liquide, ne présentant aucune croissance de germe (limpide) ;
- témoin négatif (T-2) : 500 µl d'extrait concentré et 500 µl de milieu liquide, montrant l'absence de croissance bactérienne (limpide).

La composition des différents milieux utilisés est présentée dans le tableau n°6.

Tous les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant une nuit. Les résultats sont lus par comparaison avec les témoins : l'aspect trouble du milieu, visible à l'œil nu, indique la croissance des bactéries tandis que l'aspect limpide montre l'inhibition de leur croissance. La CMI correspond à la plus faible concentration de l'extrait pour laquelle le milieu de culture reste limpide après un temps d'incubation de 24 h.

Les tests sont réalisés en double.

Tableau 6 : Composition des différents milieux pour la détermination de la CMI

Tube n°	T+	T-1	T-2	1	2	3	4	5	6	7
Concentration initiale de l'extrait (mg/ml)	0	0	219,4	100	114	129,9	148,1	168,8	192,5	200
Volume de l'extrait (µl)	0	0	500	500	500	500	500	500	500	500
Volume de l'inoculum (µl)	25	0	0	25	25	25	25	25	25	25
Volume du milieu de culture (µl)	975	1000	500	475	475	475	475	475	475	475
Volume final du mélange (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Concentration finale de l'extrait (mg/ml)	0	0	109,7	50	57	64,98	74,07	84,44	96,27	100

2.2.4.2.3 Détermination de la CMB

La concentration minimale bactéricide ou CMB est la plus faible concentration d'antibiotique capable de détruire complètement les bactéries. Elle est déterminée après la CMI par dénombrement des germes survivants.

Une ansée du contenu des tubes qui n'ont pas montré de croissance est prélevée, puis ensemencée en stries transversales sur du milieu de MUELLER-HINTON coulé dans des boîtes de Petri. Les résultats sont lus après 24 h d'incubation à 37°C. La CMB correspond à la concentration minimale pour laquelle aucune colonie n'est visible sur le milieu.

3 RESULTATS

La toxicité de l'extrait brut (EB) et des extraits purifiés (E1 et E2) a été déterminée en observant leurs effets sur différents organismes animaux, végétaux et microbiens.

3.1 EFFETS SUR LES ANIMAUX

3.1.1 EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG CHAUD

3.1.1.1 Effets sur la souris

3.1.1.1.1 Test par voie orale (gavage)

L'EB a été administré par voie orale à 300,48 mg/kg, une dose létale par voie ip. L'extrait est injecté une fois par jour pendant 3 jours selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.1.1.1 (p. 37). Aucun symptôme n'est observé 24 h après chaque administration.

3.1.1.1.2 Toxicité par voie intrapéritonéale

a) Description des symptômes d'intoxication

L'administration par voie ip de l'EB à la dose létale de 300,48 mg/kg sur les souris (voir méthode paragraphe 2.2.1.1.2, p.37) provoque les symptômes suivants :

- juste après l'injection, une contorsion abdominale est observée, suivie d'un mouvement circulaire des souris ;
- après 1 min, les oreilles sont étirées vers l'arrière avec une hyperhémie et les animaux traînent leurs pattes postérieures, puis elles restent dans un coin ;
- au bout de 3 min, les souris deviennent complètement immobiles en montrant une enophtalmie et une piloérection ;
- après 7 à 9 min, la mort survient, précédée de convulsions cloniques.

b) Détermination de la DL₅₀ (24 h)

Sept doses en progression géométrique de raison 1,04, allant de 240 mg/kg (DL₀) à 300,48 mg/Kg (DL₁₀₀) ont été injectées à 7 lots de 5 souris de même sexe (voir paragraphe 2.2.1.1.2, p. 37).

Les résultats sont présentés dans le tableau n°7.

Tableau 7 : Résultats expérimentaux de la détermination de la DL50 (24 h)

Dose en mg/kg	Nombre de décès après							Nombre de souris		% de décès
	6 min	9 min	11 min	23 min	1 h	2 h	24 h	mortes	survivantes	
240	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
254,28	0	0	0	0	1	0	0	1	4	20
264,48	0	0	0	0	3	0	0	3	2	60
275,04	0	0	0	2	2	0	0	4	1	80
286,08	0	0	0	3	2	0	0	4	1	80
288,96	3	1	1	0	0	0	0	5	0	100
300,48	4	1	0	0	0	0	0	5	0	100

D'après la formule de REED et MUENCH (1938) présentée au paragraphe 2.2.1.1.2 (p. 37), la DL₅₀ (24 h) est estimée à **261,48 mg/kg**.

En utilisant la méthode graphique des totaux cumulatifs des mêmes auteurs, la valeur de la DL₅₀ est de **264,48 mg/kg** (tableau n°8 et figure 5, p. 46).

Tableau 8: Données utilisées pour l'estimation de la DL_{50} par la méthode graphique des totaux cumulatifs de REED et MUENCH (1938)

Dose en mg/kg de souris	Nombre de souris testées	Nombre de souris survivantes	Nombre de souris mortes	Totaux cumulatifs des survivantes	Totaux cumulatifs des mortes
240	5	5	0	13	0
254,28	5	4	1	8	1
264,48	5	2	3	4	4
275,04	5	1	4	2	8
286,08	5	1	4	1	12
288,96	5	0	5	0	17
300,48	5	0	5	0	22

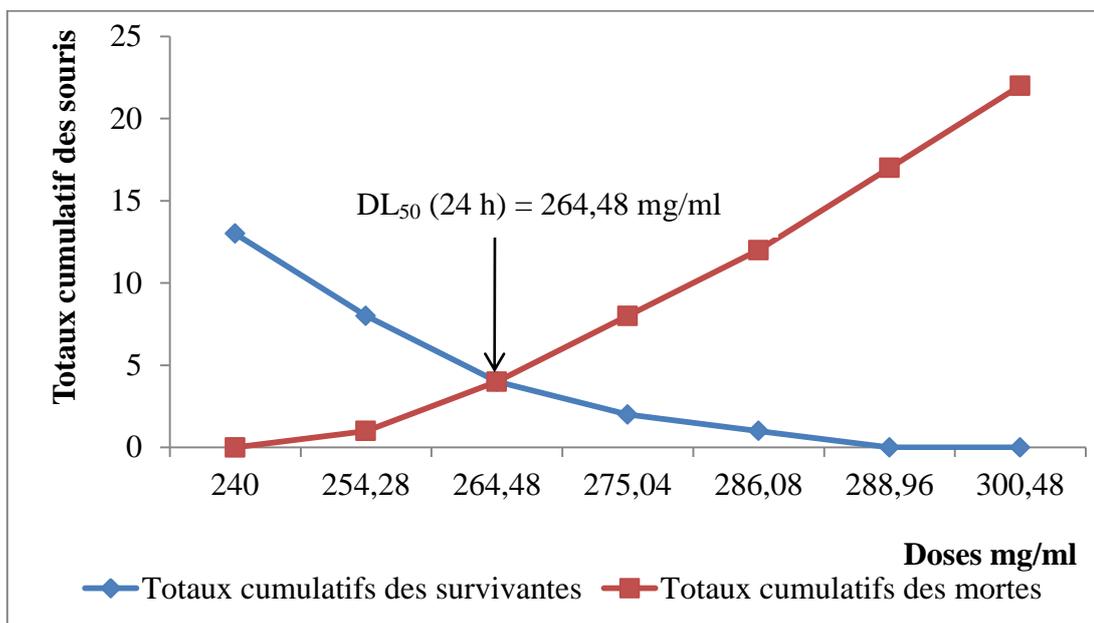


Figure 5: Détermination graphique de la DL_{50} par la méthode de REED et MUENCH (1938)

La valeur de la DL_{50} (24 h) est donc estimée entre **261,48 mg/kg** et **264,48 mg/kg** de souris.

3.1.1.2 Effets sur les poussins

L'administration de la dose 1 200 mg/kg, dose létale sur souris de l'EB par voie ip (voir paragraphe 2.2.1.2, p. 38), ne provoque aucun symptôme sur les poussins.

3.1.2 EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG FROID

3.1.2.1 Effets de l'extrait brut sur les têtards de grenouille

Selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.2 (p.38), sept lots de cinq animaux sont testés avec sept concentrations (1 mg/ml à 1,5 mg/ml), en progression géométrique de raison 1,08.

Les résultats de cette expérience sont résumés dans le tableau n°9.

Tableau 9 : Effets de différentes concentrations de l'EB sur les têtards de grenouille

Lot n°	Concentration C de l'EB en mg/ml	log C	Nombre de têtards		Taux de mortalité
			morts	survivants	
1	1	0	0	5	0 %
2	1,08	0,033	0	5	0 %
3	1,16	0,064	5	0	100 %
4	1,25	0,096	5	0	100 %
5	1,35	0,130	5	0	100 %
6	1,45	0,161	5	0	100 %
7	1,56	0,193	5	0	100 %

D'après ces résultats, l'EB est toxique sur les têtards de grenouille, mais il n'a pas été possible de déterminer la CL₅₀, du fait que la concentration létale 100% et celle donnant 0% de mortalité sont très rapprochées.

Donc, la toxicité de l'EB sur les têtards de grenouille obéit à la loi du « tout ou rien ».

3.1.2.2 Effets de l'extrait brut sur les larves de moustique

D'après la méthode décrite au paragraphe 2.2.2 (p. 38), sept lots de cinq animaux sont testés avec sept concentrations de l'EB allant de 1,16 mg/ml à 2 mg/ml. Les résultats ont montré que toutes les larves sont vivantes après 24 h. Ni morbidité ni mortalité n'ont été observées.

Donc, l'EB à la concentration 2 mg/ml ne provoque aucun effet sur ces larves.

3.1.2.3 Effets de l'extrait brut sur les alevins de carpe

Sept lots de cinq alevins de carpes ont été testés avec sept concentrations de l'EB différentes en progression géométrique de raison $r = 1,13$ allant de 500 $\mu\text{g/ml}$ (CL_0) à 1040 $\mu\text{g/ml}$ (CL_{100}) (voir paragraphe 2.2.2, p. 38).

Les résultats de l'expérience sont présentés dans le tableau n°10.

Tableau 10 : Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur les alevins de carpe

Concentration en $\mu\text{g/ml}$	$\log C$	Nombre d'animaux à tester	Nombre de survivants	Nombre de morts	Taux de mortalité
500	2,69	5	5	0	0 %
565	2,75	5	4	1	20 %
638,45	2,80	5	3	2	40 %
721,44	2,85	5	2	3	60 %
815,23	2,91	5	1	4	80 %
921,21	2,96	5	1	4	80 %
1040	3,01	5	0	5	100 %

Ces résultats montrent que l'EB est toxique sur les alevins de carpe car il provoque leur mort à partir de la concentration 565 $\mu\text{g/ml}$. Cette toxicité est proportionnelle à la concentration.

La droite de régression linéaire a comme équation :

$$Y = - 78,68X + 0,17$$

avec un coefficient de corrélation $R = 0,96$

D'où la valeur de la CL_{50} (24 h) est de **719,10 $\mu\text{g/ml}$** .

3.2 EFFETS SUR LES VEGETAUX

3.2.1 EFFETS DE L'EXTRAIT BRUT SUR LE POUVOIR GERMINATIF DES GRAINES

Les effets de l'EB à 1 mg/ml sur le pouvoir germinatif des graines de plantes potagères ont été explorés selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.3.1 (p. 39).

Les résultats sont présentés dans le tableau n°11.

Tableau 11 : Effets de l'extrait brut sur le pouvoir germinatif de graines de Monocotylédones et de Dicotylédones

	Famille	Nom scientifique	Nom usuel	Taux de germination	Taux d'inhibition
DICOTYLEDONES	ASTERACEAE	<i>Lactuca sativa</i>	laitue	100 %	0 %
	APIACEAE	<i>Daucus carotta</i>	carotte	100 %	0 %
	BRASSICACEAE	<i>Brassica sp.</i>	tissam white	100 %	0 %
	CUCURBITACEAE	<i>Cucumis sp.</i>	concombre	100 %	0 %
		<i>Cucurbita pepo</i>	courgette	100 %	0 %
	FABACEAE	<i>Phaseolus vulgaris</i>	haricot	100 %	0 %
		<i>Pisum sativum</i>	petit pois	100 %	0 %
		<i>Glycine max</i>	soja	100 %	0 %
	SOLANACEAE	<i>Lycopersicum esculentum</i>	tomate	100 %	0 %
MONOCOTYLEDONES	POACEAE	<i>Oryza sativa</i>	riz	100 %	0 %
		<i>Zea mays</i>	maïs	100 %	0 %

D'après le tableau n°11, l'EB à 1 mg/ml n'a aucun effet sur la germination des graines. Toutes les graines testées se sont avérées insensibles à l'EB et germent à 100%. Il n'y a donc pas d'inhibition du pouvoir germinatif.

3.2.2 EFFETS DE L'EXTRAIT BRUT SUR LA CROISSANCE DES JEUNES PLANTULES

Deux représentants des Monocotylédones (riz et maïs) et deux représentants des Dicotylédones (haricot et petit pois) ont été utilisés pour l'évaluation des effets des différentes concentrations de l'EB sur la croissance des jeunes plantules. Pour ce faire, cinq lots de dix graines de chaque plante ont été testés avec cinq concentrations différentes de l'EB allant de 0,45 mg/ml à 7,2 mg/ml (voir paragraphe 2.2.3.2, p. 40). Un autre lot mis à germer et arrosé en présence d'eau de robinet a servi de témoin. La figure 6 résume les expériences.

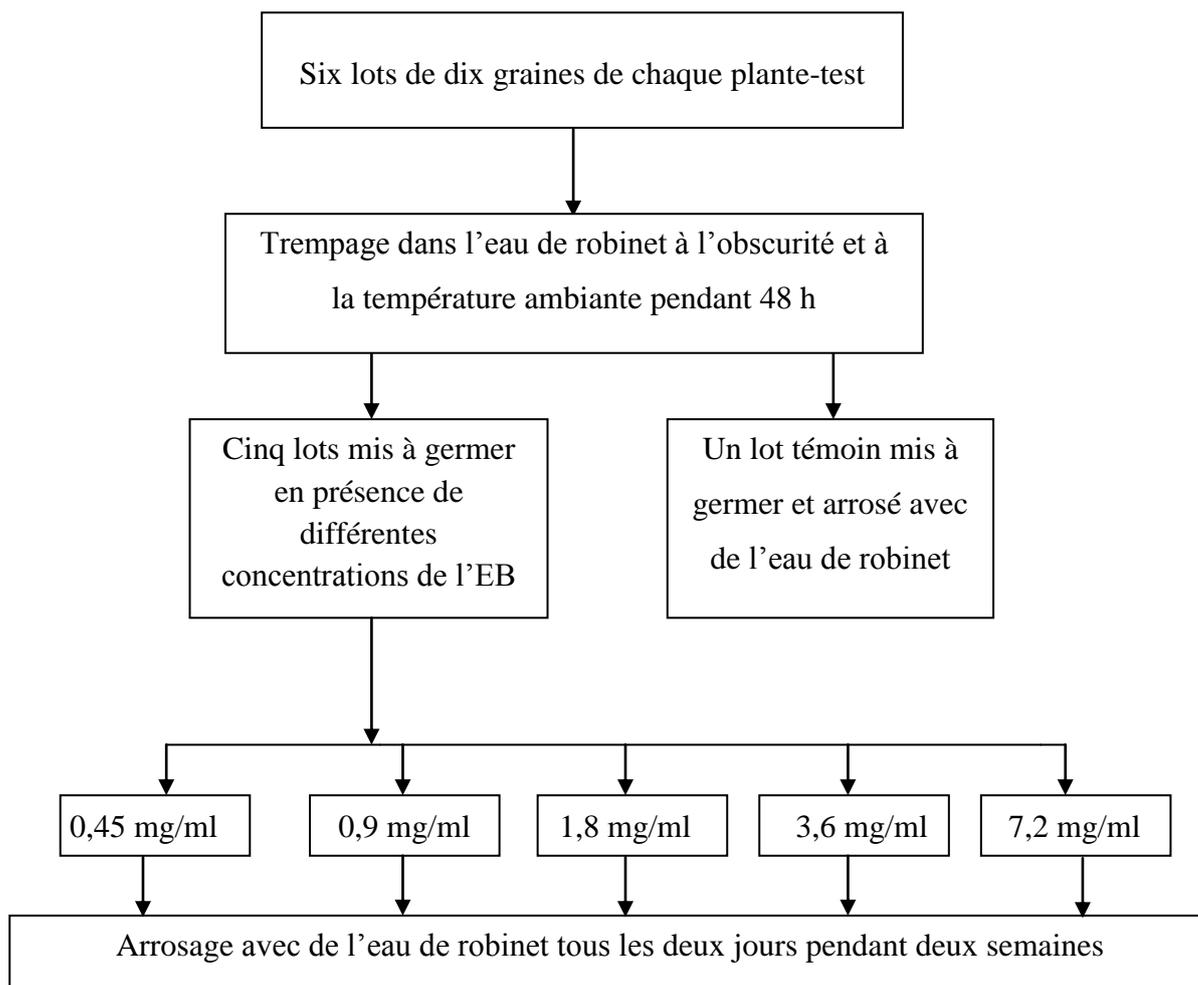


Figure 6 : Schéma récapitulatif des différentes étapes des expériences sur la croissance des jeunes plantules

Les résultats de ce test sont présentés sur les figures 7 à 10 (p.51 à 54).

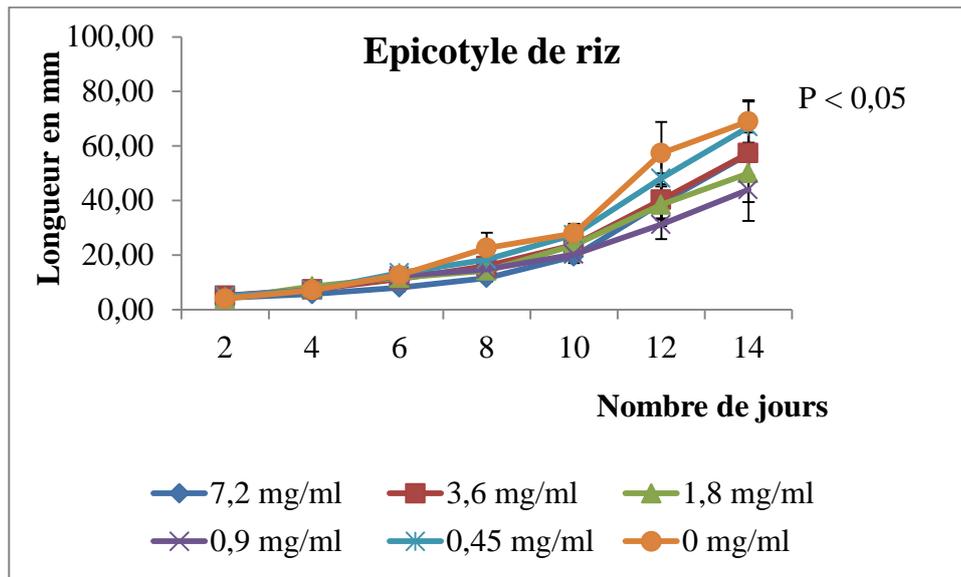


Figure 7a: Croissance des épicotyles de riz en présence de différentes concentrations de l'extrait brut

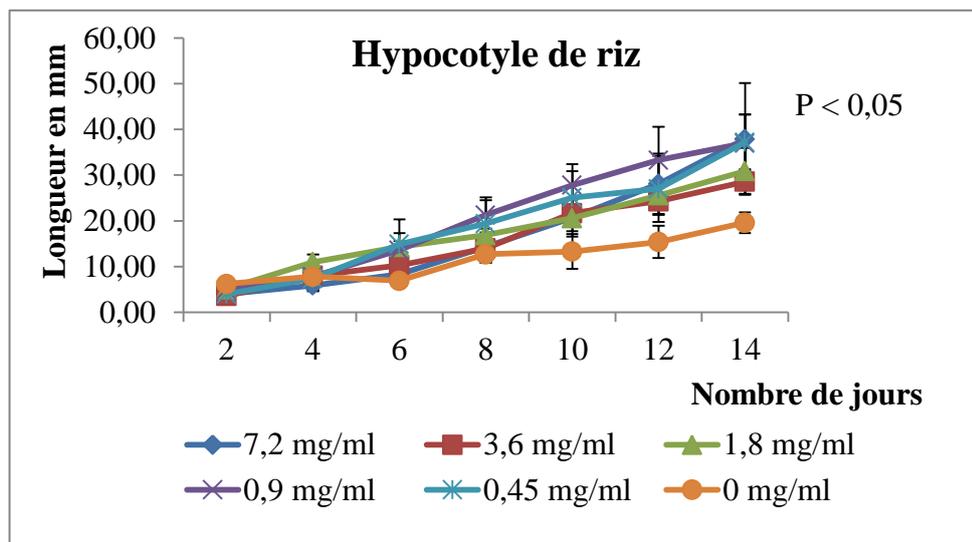


Figure 7b: Croissance des hypocotyles de riz en présence de différentes concentrations de l'extrait brut

D'après les figures 7a et 7b, la croissance des épicotyles de riz est comparable à celle du lot arrosé avec de l'eau de robinet (témoin), tandis que la croissance des hypocotyles est stimulée à partir de 8^{ème} jour.

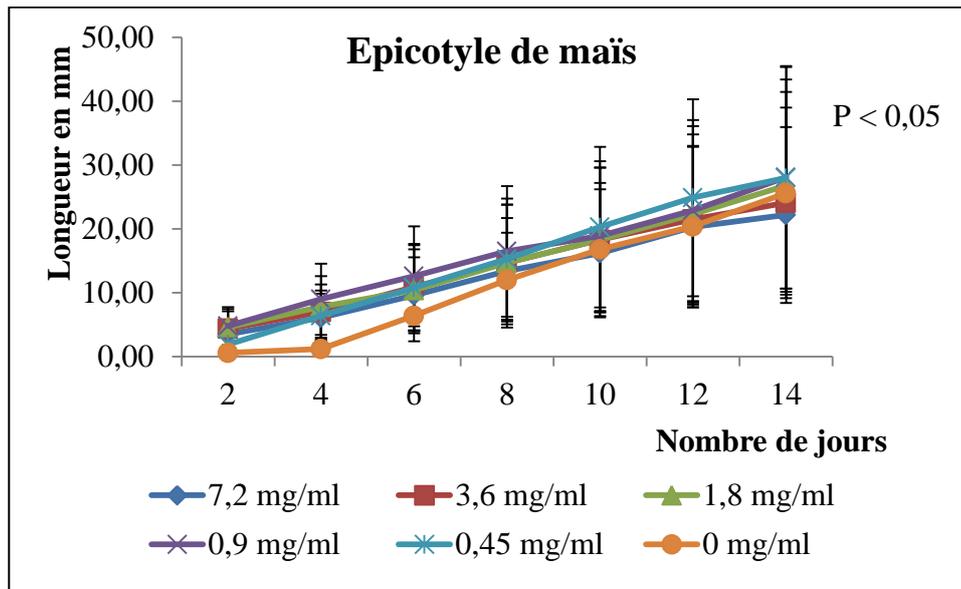


Figure 8a : Croissance des épicotyles de maïs en présence de différentes concentrations de l'extrait brut

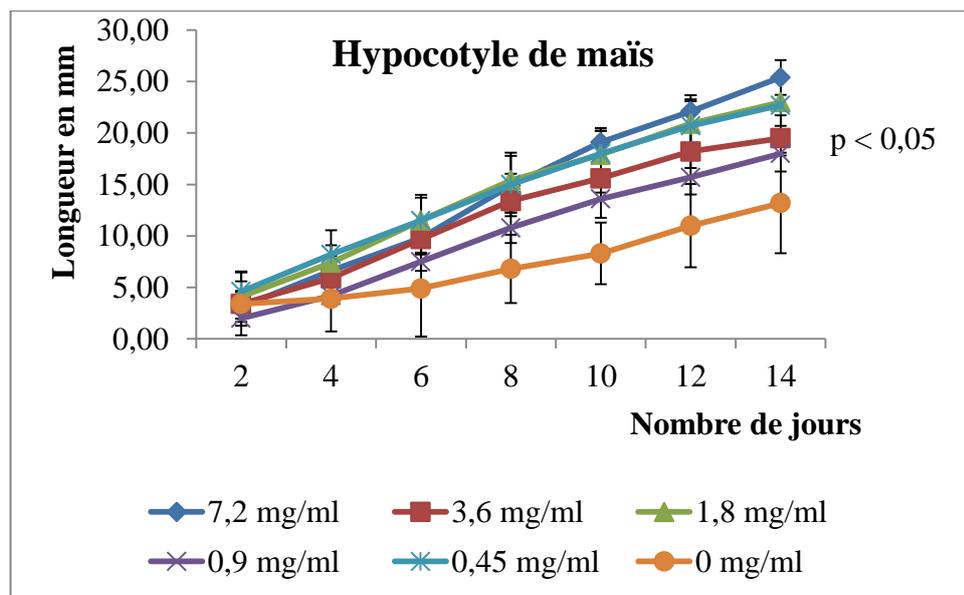


Figure 8b: Croissance des hypocotyles de maïs en présence de différentes concentrations de l'extrait brut

Pour le maïs, la longueur des épicotyles tend à se rapprocher de celle du témoin. Par contre, un effet stimulateur de l'EB sur la croissance des hypocotyles est observé à partir du 4^{ème} jour du test (figure 8a et 8b).

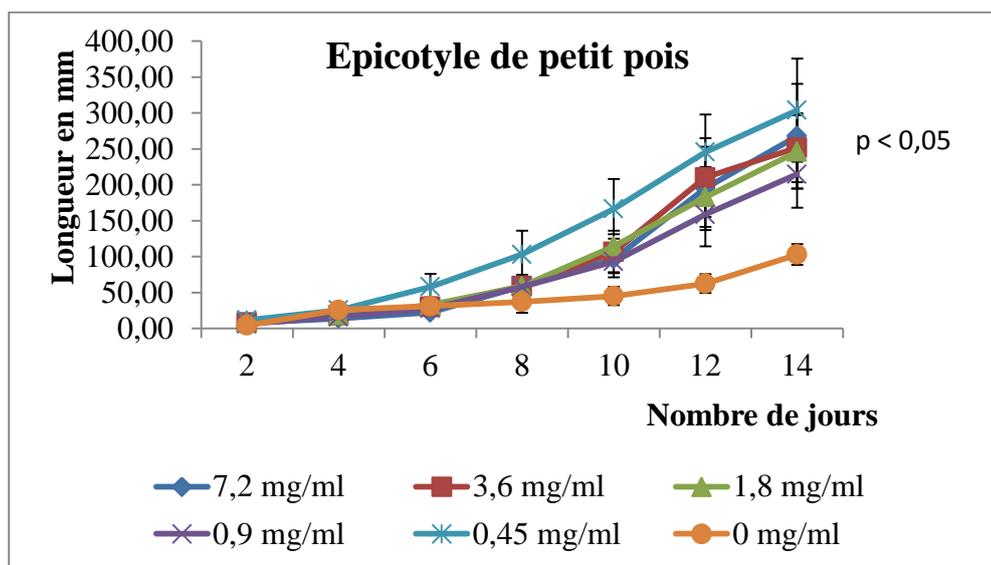


Figure 9a: Croissance des épicotyles de petit pois en présence de différentes concentrations de l'extrait brut

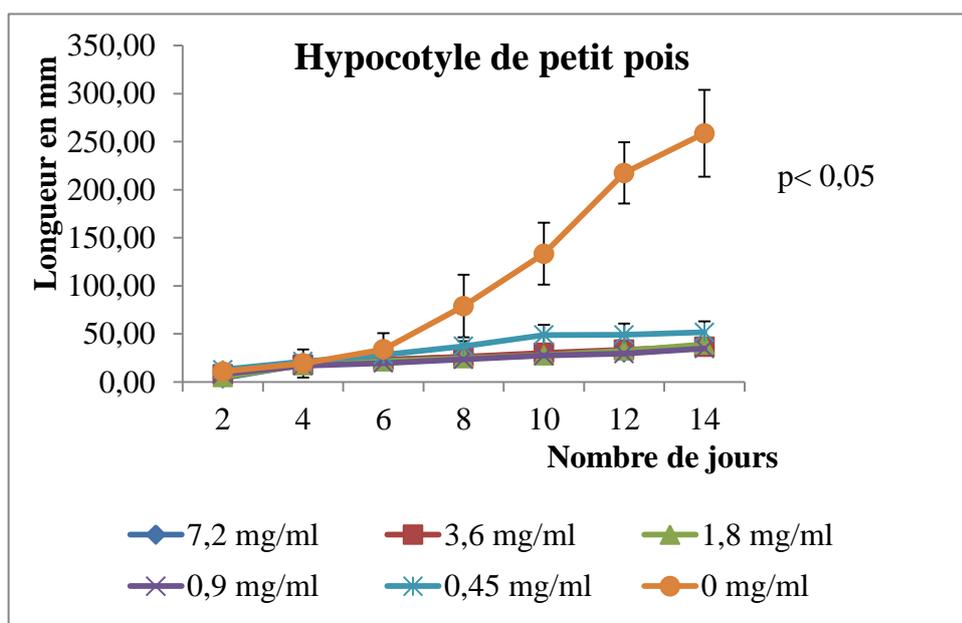


Figure 9b: Croissance des hypocotyles de petit pois en présence de différentes concentrations de l'extrait brut

Par rapport au lot arrosé avec de l'eau de robinet, l'extrait exerce un effet stimulateur sur la croissance des épicotyles de petit pois à partir de 6^{ème} jour. Par contre il a un effet nettement inhibiteur sur la croissance des hypocotyles (figure 9a et 9b).

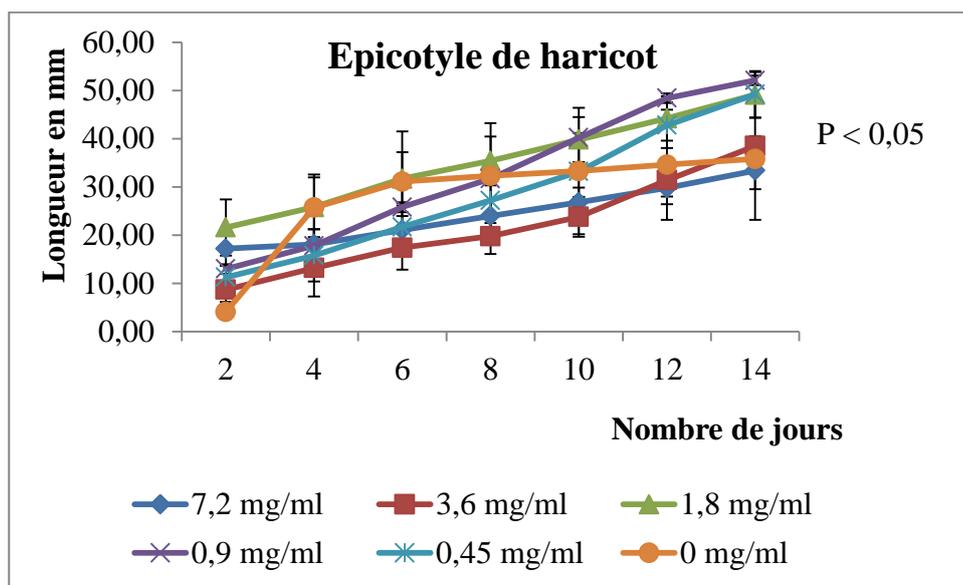


Figure 10a: Croissance des épicotyles de haricot en présence de différentes concentrations de l'EB

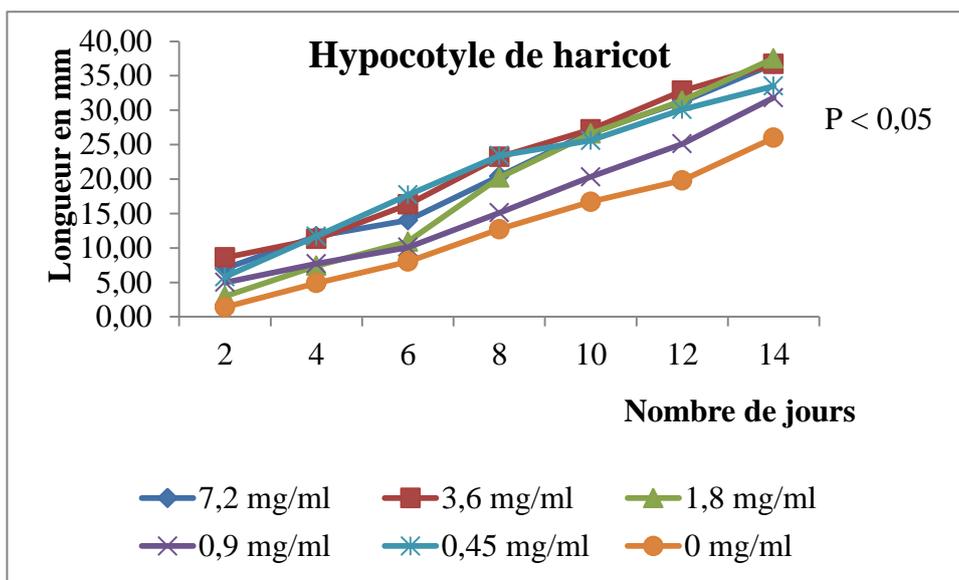


Figure 10b: Croissance des hypocotyles de haricot en présence de différentes concentrations de l'extrait brut

Le développement des épicotyles de haricot est semblable à celui du témoin et le développement des hypocotyles est légèrement stimulé par l'EB (voir figure 10a et 10b).

3.3 EFFETS SUR LES MICROORGANISMES

Nous avons étudié l'activité de l'EB et des extraits obtenus tout le long des étapes de purification (E1 et E2) sur 5 germes-tests (tableau n°4, p. 36).

3.2.1 ACTIVITE ANTIMICROBIENNE EN MILIEU SOLIDE

L'activité antimicrobienne de l'EB, l'E1 et l'E2, à la concentration de 100 mg/ml, a été évaluée selon la méthode de diffusion en milieu solide décrite au paragraphe 2.2.4.2.1 (p. 41). Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 11 et dans le tableau n° 12.

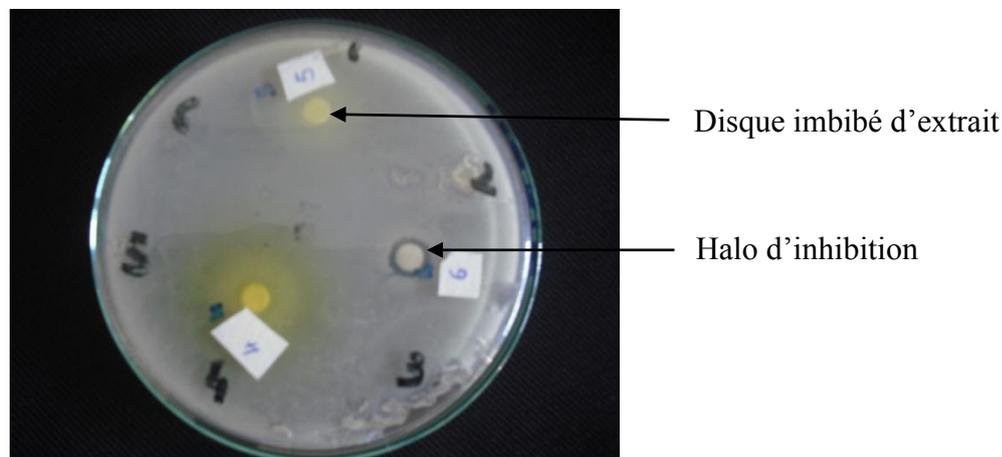


Figure 11: Effets de l'EB (1), E1 (2) et E2 (3) à 100 mg/ml sur *Bacillus cereus*

Tableau 12 : Effets de l'EB, E1 et E2 sur les germes testés par la méthode des disques

Nom des souches	Forme	GRAM	Diamètre des halos (mm)		
			EB	E1	E2
<i>Bacillus cereus</i>	bacille	+	11	6	6
<i>Bacillus megaterium</i>	bacille	+	9	6	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	coque	+	8	6	6
<i>Escherichia coli</i>	bacille	-	6	6	6
<i>Salmonella enterica</i>	bacille	-	6	6	6

D'après ces résultats, l'EB est actif sur : *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* et *Staphylococcus aureus* et inactif sur *Escherichia coli* et *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus* étant le plus sensible (halos d'inhibition 11 mm). Par contre, les extraits E1 et E2 ne possèdent aucune activité sur les 5 souches testées.

3.2.2 DETERMINATION DE LA CMI ET DE LA CMB

L'EB (l'extrait le plus actif) a été choisi pour la détermination de la CMI et de la CMB sur le germe le plus sensible *Bacillus cereus*.

3.2.2.1 Détermination de la CMI

La CMI de l'EB sur *Bacillus cereus* a été déterminée par la méthode de dilution en milieu liquide (méthode décrite au paragraphe 2.2.4.2.2, p. 42).

Les résultats sont donnés dans le tableau n° 13.

Tableau 13 : Détermination de la CMI de l'EB en milieu liquide sur *Bacillus cereus*

Tube n°	T+	T-1	1	2	3	4	5	6	7	T-2
Concentration finale de l'extrait (mg/ml)	0	0	50	57	64,98	74,07	84,44	96,27	100	109,7
Turbidité	++	-	+	+	+	-	-	-	-	-

++ : très trouble

+ : trouble

- : limpide

D'après les résultats, la CMI de l'EB vis-à-vis de *Bacillus cereus* est estimée à **74,07 mg/ml**.

3.2.2.2 Détermination de la CMB

La CMB est déterminée par ensemencement en stries sur le milieu solide de MUELLER HINTON des suspensions bactériennes des tubes contenant les concentrations de l'EB supérieures ou égales à la CMI (voir méthode paragraphe 2.2.4.2.3, p. 44).

La CMB n'a pas pu être déterminée faute d'avoir observé une inhibition totale de la croissance des germes, même en augmentant la concentration de l'extrait jusqu'à 260 mg/ml.

4 DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les résultats des expériences effectuées lors de cette seconde partie montrent que les extraits de feuilles de *Crotalaria trichotoma* Bojer, récoltée à Iaroka exercent des effets sur des animaux à sang chaud, des animaux à sang froid, des végétaux et des microorganismes.

Chez les souris, l'administration de l'EB par voie orale n'a provoqué aucun symptôme. Par contre, l'injection par voie intrapéritonéale provoque des symptômes tels que la contorsion abdominale suivie d'une agitation, une hypoactivité, un traînement des membres postérieurs, un étirement des oreilles vers l'arrière avec une hyperhémie, une enophtalmie, une piloérection et des convulsions cloniques. Ces symptômes portent à penser que l'extrait agit au niveau des systèmes nerveux (neurotoxine), cardiovasculaire et respiratoire.

La valeur de la DL₅₀ (24 h) est estimée entre 261,48 mg/kg et 264,48 mg/kg. En comparant aux autres toxines déjà étudiées au LABASM, l'extrait présente une toxicité proche de celle de l'extrait de feuilles d'*Ocotea madagascariensis* (RANDRIAMAHAVALISOA, 2003) dont la valeur de DL₅₀ (24 h) est comprise entre 265,99 mg/kg et 272,25 mg/kg. Il est nettement moins toxique que l'extrait de graines d'*Albizia tulearensis* qui a une DL₅₀ (24 h) située entre 2,92 mg/kg et 3,2 mg/kg (RAONIHARISOA, 2003) et l'extrait de feuilles d'*Albizia polyphylla* (RAKOTONDRA SOA, 2000) de DL₅₀ (24 h) entre 63,14 mg/kg et 63,49 mg/kg. Par contre, il est plus toxique que l'extrait de feuilles d'*Astrotrichilia parvifolia* qui présente une DL₅₀ (24 h) de 400 mg/ml (RASOLOFONANTENAINA, 2012) et l'extrait de feuilles d'*Ophiocolea floribunda* dont la DL₅₀ (24 h) est de 1,29 g/kg (RALINORO, 2008). Ces deux dernières plantes sont utilisées à des fins médicinales.

L'extrait purifié E2 est toxique sur souris et provoque les mêmes symptômes que l'EB.

Chez les poussins, aucun symptôme n'a été observé après l'injection par voie ip et par gavage de l'EB à la dose 1 200 mg/kg.

L'élimination de la toxicité de l'extrait par voie orale peut être due à la neutralisation des principes toxiques par les mécanismes intervenant au niveau du tube digestif, tels que la digestion enzymatique et l'inactivation par la flore intestinale (BRUNETON, 1993).

Chez les animaux à sang froid, l'EB est toxique sur les têtards de grenouille mais la valeur de la CL₅₀ n'a pas pu être trouvée du fait que la concentration létale 100% et celle 0% sont très rapprochées, c'est-à-dire que la toxicité de l'extrait obéit à la loi du « tout ou rien ».

L'EB est également ichthyotoxique avec une CL₅₀ estimée à 719,10 µg/ml sur les alvins de carpe. D'après cette valeur, l'extrait est plus toxique que celui des feuilles de *Macaranga boutonoides* (EUPHORBIACEAE) avec une CL₅₀ estimée à 990 µg/ml (RAKOTONIAINA, 2009).

L'EB n'a aucun effet sur les larves de moustique *Culex quinquefasciatus* jusqu'à la concentration 2 mg/ml. Ainsi l'utilisation de l'EB de *Crotalaria trichotoma* Bojer, récoltée à Iaroka en tant que larvicide pourrait avoir un effet néfaste envers l'écosystème car elle exige d'être utilisée à forte concentration.

Chez les végétaux, toutes les graines testées sont insensibles à l'EB à la concentration de 1 mg/ml et ont germé normalement.

Concernant le développement de jeunes plantules, pour le riz, le maïs et le haricot, la croissance de l'épicotyle est comparable à celle du témoin, tandis que l'hypocotyle est stimulée à partir du 8^{ème} jour pour le riz, 4^{ème} jour pour le maïs et 2^{ème} jour pour le haricot. Pour le petit pois, l'EB exerce un effet stimulateur de croissance de l'épicotyle et un effet inhibiteur de la croissance de l'hypocotyle à partir du 6^{ème} jour du test.

Ces résultats montrent que seuls les hypocotyles de petit pois ont subi un effet inhibiteur de la part de l'EB. La sensibilité des hypocotyles pourrait s'expliquer par le fait que ces organes sont en contact direct avec l'extrait toxique introduit dans le substrat. Ce phénomène a été fréquemment observé avec les extraits étudiés au LABASM comme celui des écorces de tige de *Uapaca thouarsii* (EUPHORBIACEAE) (RANDRIANANDRASANA, 2004), et celui des graines d'*Albizia androyensis*, (FABACEAE) (RASOLOFOMANANA, 2015).

Les autres jeunes plantules se sont avérées insensibles à l'EB.

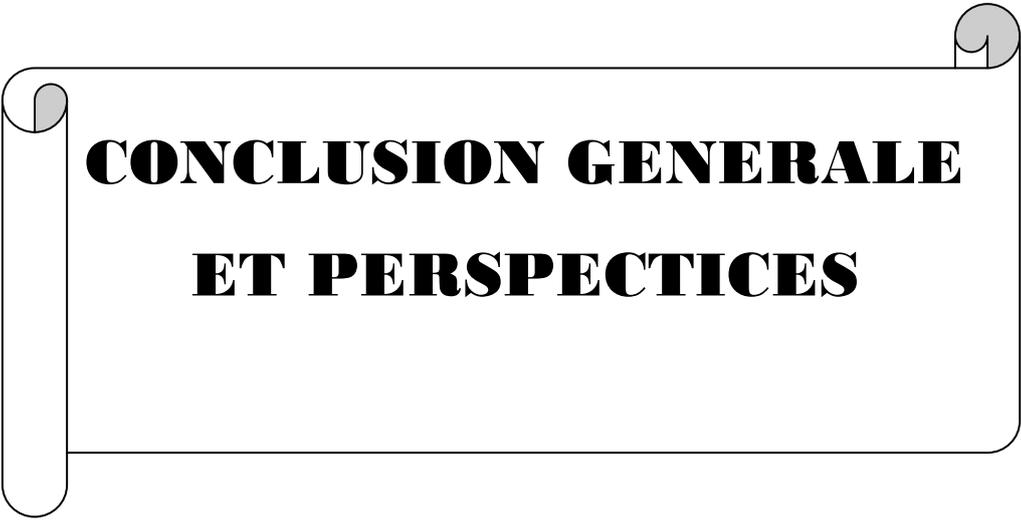
Ainsi, l'EB est peu toxique sur les plantes potagères, il a même une action stimulatrice sur les hypocotyles de riz, de maïs, de haricot et les épicotyles de petit pois. Sa toxicité vis-à-vis des hypocotyles de petit pois paraît très spécifique. Son utilisation comme herbicide serait envisageable mais un test préalable sur les mauvaises herbes est nécessaire.

Ces caractéristiques de l'action de l'EB permettent de justifier l'emploi des feuilles comme engrais vert ou comme couverture des sols, à l'instar de nombreuses crotalaires comme *C. retusa* L. (http://www.barbadine.com/pages/crotalaria_retusa_lien.html, *C. juncea*, *C. spectabilis*, *C. pallida* et *C. micans* (<http://www.oswaldasia.org/species/c/c>; <http://www.prota4u.org/protav8.asp?fr=1&p=Crotalaria+juncea+L>).

L'EB exerce aussi un effet inhibiteur sur la croissance des microorganismes. Il est actif sur trois germes : *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* et *Staphylococcus aureus*. Parmi ces bactéries, le plus sensible est *Bacillus cereus* donnant un halo d'inhibition de 11 mm. Par contre, l'E2 n'a pas d'activité toxique sur ces microorganismes. Cette absence d'activité peut être due à l'élimination de certains composés antibactériens lors des étapes de purification.

La nature de l'effet d'un composé est déterminée à partir de la valeur de la CMI et de la CMB. D'après BOURREE et coll. (2002), un composé est considéré comme bactéricide c'est-à-dire qu'il provoque la destruction totale des bactéries quand la valeur de CMI et celle de la CMB sont très proches ou égales, et bactériostatique (ou provoque seulement l'inhibition de la multiplication bactérienne) si ces deux valeurs sont éloignées. Et si le rapport CMB/CMI est inférieur ou égale à 4, l'extrait est bactéricide mais s'il est supérieur à 4, l'extrait est bactériostatique (MARMONIER, 1990).

Vis-à-vis de *Bacillus cereus*, la valeur de la CMI est de 74,04 mg/ml et celle de la CMB est supérieure de 260 mg/ml d'après nos résultats. Cela nous permet de dire que l'EB a un effet bactériostatique car les valeurs de CMI et de CMB sont très éloignées.



**CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES**

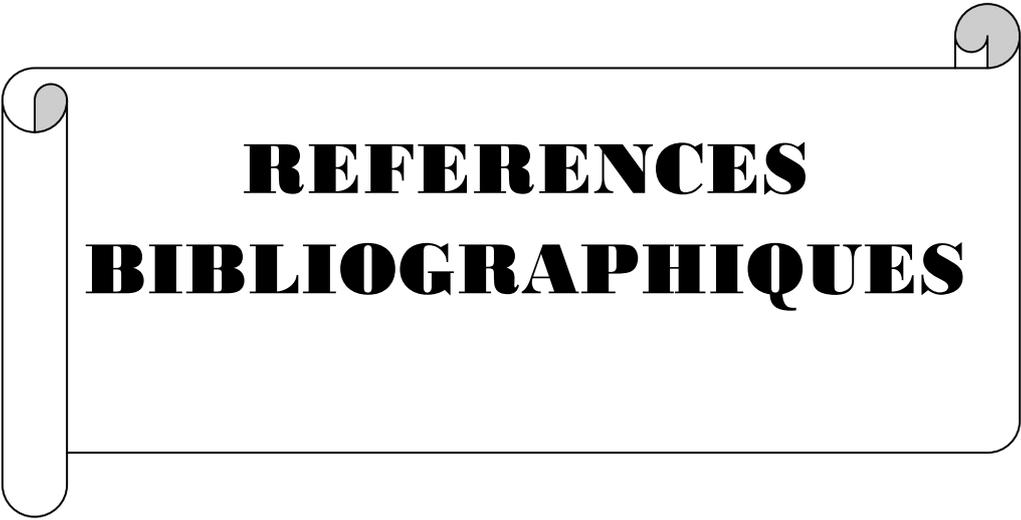
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

En conclusion, les résultats des travaux réalisés sur *Crotalaria trichotoma* Bojer, récoltée à Iaroka (FABACEAE) bien qu'ils soient préliminaires, nous ont permis de :

- mettre en évidence une activité toxique dans les feuilles de la plante ;
- mettre au point une technique d'extraction et de purification des principes toxiques de la plante ;
- apporter les premières informations sur leurs propriétés physico-chimiques, leur nature chimique et leurs propriétés biologiques.

Dans l'avenir, nous envisageons :

- d'améliorer le procédé d'extraction et de purification, afin d'obtenir un meilleur rendement en principes toxiques;
- d'isoler les principes toxiques pour mieux étudier leurs propriétés physico-chimiques, leur structure et leur nature chimique ;
- d'élucider leur mécanisme d'action ;
- d'approfondir les propriétés biologiques sur d'autres animaux, végétaux et sur les microorganismes et de prospecter d'autres propriétés biologiques.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ADJONOHOUN E.J., AHYI M.R., AKPAGANA K., CHIBO P., WATARA E.H., EYEME J., GARBA M., GASSITA J.N. GBEASSOR M., GOUDOTE E., GUINDO S. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques du Togo. Paris : **1996** ; 674 p.
2. 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.
3. ANGENOT L. Essais phyto-chimiques préliminaires sur quelques plantes médicinales du Rwanda oriental. *Plantes médicinales et phytothérapie*, **1970** ; 4 (4) : 263-278.
4. AUDIGIE C., DUPONT G., ZONZAIN F. Principes des méthodes d'analyses biochimiques. Paris : Doin éditeur, **1989** ; 2 : 190 p.
5. BALA S., GARD K.N. Preliminary observations on the anti-ovulatory activity present in *Crotalaria juncea* Linn. *J. Pharmacol. Indian*, **1973** ; 5 : 404-405.
6. BARBIER B., LEYNAUD G., CHAMP P. Les tests de toxicité sur les poissons. *Techniques et sciences municipales*, **1974** ; 69 (6) : 346-350.
7. BEKRO Y.A., MAMIRBEKOU A., BEKRO J.A., BOUA B.B., TRABIFH, EHILE E.E. Etude ethobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* Baill. Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae): *Science et Nature*, **2007**; 4 (2): 217-225.
8. BHATT K.C., PANDEY A., DHARIWAL O.P., PANWAR N.S., BHANDARI D.C. Tum-thang (*Crotalaria tetragona* Roxb. Ex Andr.): A little know wild edible species in the north-eastern hill region of India. *Genet Ressour Crop Evol.*, **2009** ; 56 : 729-733.
9. BILLE J. *Examen microbiologique et monitoring du traitement*. In : SCHORDERET M. Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. 3^{ème} éd. Paris : FRISON-ROCHE, **1998** ; 725-728
10. BIZZINI B. *Tetanos toxin structure as a basis for elucidating its immunological and neuropharmacological activities*. In: CUATRECASAS P. The specificity and action

- animal, bacterial and plant toxins (Receptors and recognition, series B, vol. D). London: Chapman and Hall, **1977** ; 75-218.
11. BOLDRIN P.K., RESENDR F.A., HÖHNE A.P.O., SANTORO DE CAMARGO M., ESPANHA L.G., NOGUEIRA C.H., MELO M.F., VILEGAS W., VARANDE E.A. Estrogenic and mutagenic activities of *Crotalaria pallida* measured by recombinant yeast assay and Ames test. *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine*, **2013** ; 10 p.
12. BOREL J., RANDOUX A. Méthodes chromatographiques. In : KAMOUN P. Appareils et méthodes en biochimie. 3^{ème} éd. Paris : Médecine-Sciences Flammarion, **1987** ; 129-192.
13. BOURREE P., COLLECTIF A., VITTECOQ D. Maladies infectieuses. Paris : Estem, **2002** ; 384 p.
14. BOYD W.C. Fundamentals of Immunology. 4^{ème} éd. New York: Wiley and Sons Editors, **1966** ; 503 p.
15. BRUNETON J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2^{ème} éd. Paris : Technique et Documentation-Lavoisier, **1993** ; 915 p.
16. BURKILL H.M., The useful plants of West Tropical Africa. 2nd éd. Kew, Richmond, United Kingdom: Families J-L. Royal Botanic Garden, **1995** ; 3 : 857 p.
17. COLLIER R.J. *Inhibition of protein synthesis by exotoxins from Corynebacterium diphtheriae*. In: CUATRECASAS P. The specificity and action of animal, bacterial and plant toxins. (Receptors and recognition, series B, vol. D). London: Chapman and Hall, **1977** ; 69-98.
18. CORDELL G.A Introduction to alkaloids, a biogenetics approach. New York: John Wiley, **1981**; 441 p.
19. DALTON D.R. The alkaloid-the fundamental chemistry, a biogenetic approach. New York: Marcel Dekker, **1989** ; 565 p.
20. DAVID R. Les hormones végétales. Paris, **1952** ; 125 p.
21. DEBRAY M., JACQUEMIN H., RAZAFINDRAMBAO R. Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar. Paris : ORSTOM, **1971** ; 150 p.

22. DHOLE J.A., DHOLE N.A., LONE K.D., BODKE S.S. Preliminary phytochemical analysis and antimicrobial activity of some weeds collected from Marathwada Region. *Journal of Research in Biology*, **2011** ; 1 : 19-23.
23. DU PUY D.J., LABAT J.N., RABEVOHITRA R., VILLIERS J.F. and MOAT J. The Leguminosae of Madagascar. Kew: Royal botanic garden, **2002** ; 750 p.
24. DUMAS, J. Les animaux de laboratoire. Paris : Flammarion, **1953** ; 719 p.
25. DUVAL J., SOUSSY C.J. Antibiothérapie. 4^{ème} éd. Paris : Masson, **1991** ; 188 p.
26. FABRE R., TRUHAUT R. Précis de toxicologie. Paris : Société d'édition d'enseignement supérieur, **1965** ; 311 p.
27. FAO. Food and agriculture organization. Pyrrolizidine alkaloids in foods and animal feeds. *FAO Consumer Protection Fact Sheets*, **2010**; 2: 1-6.
28. FERRON A. Bactériologie médicale. 15^{ème} éd. Paris : C et R, **1994** ; 472 p.
29. FONG H.H.J., TIN W.A.M., FARNSWORTH N.R. Phytochemical screening review. Chicago: University of Illinois, **1977** ; 73-126.
30. GOUN E., CUNNINGHAM G., CHU D., NGUYEN C., MILES D. Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. *Fitoterapia*, **2003** ; 72 : 592-596.
31. GRAVEL J., BOUDREAULT P. Utilisation de la toxine botulinique dans la pathologie spastique. *Pharmactuel*, **2000** ; 33 (5) : 134-137.
32. GROS R. Techniques microbiologiques : application en écologie et biotechnologie. *Cours*, **2009** ; 115 p.
33. HABERMEHL G.G. Venomous animals and their toxins. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, **1981** ; 159 p.
34. HAYES W.A. Principles and methods of toxicology. New York: Raven press, **1982**; 750 p.
35. HECKEL E. Les plantes utiles de Madagascar. *Ann. Musée Colon de Marseille*, **1910**, 2^{ème} série, 8 : 372 p.
36. HELLER R., ESNAULT T.R., LANCE C. Abrégé de physiologie végétale : Développement. 5^{ème} éd. Paris : Masson, **1955** ; 90-126.

37. HEMENDRA S.C., SUSHIL K.S. Antibacterial activity of seed and flower parts of *Crotalaria juncea* Linn. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, **2010** ; 3 : 212-215.
38. HEMINGWAY R.W., KARCHESY J.J. Chemistry and significance of condensed tanins. New York: Plenum press, **1989**; 249-264.
39. JEANNODA V. Etudes chimique, biochimique et toxicologique du principe convulsivant des Connaracées de Madagascar. [Thèse de doctorat d'Etat en Sciences]. Strasbourg : Université Louis Pasteur de Strasbourg, **1986** ; 273 p.
40. KAMOUM P. Appareils et méthodes en biochimie. 3^{ème} éd. Paris : Médecine-sciences Flammarion, **1997** ; 373 p.
41. KIL Y.H., SEONG E.S., GHIMIRE B.K., CHUNG I.M., KWON S.S., GOH E.J., HEO K., KIM D., LIM J.D., LEE D., YU C.Y. Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food Chemistry*, **2009** ; 115 : 1234-1239.
42. KIRTIKAR K.R., BASU B.D. Indian Medicinal Plants, Lolit Mohan Basu, Allahabad, India, **1935** ; p. 1 606.
43. KOKKALI V., KATRAMADOS L., NEWMAN J.D., Monitoring the effect of metal ions on the mobility of *Artemiasalina nauplii*. *Article biosensors*, **2011** ; 10 p.
44. LEIPZIG. Madagascar : Rapport de pays pour la conférence technique internationale sur les ressources phytogénétiques. Ed. FAO (Allemagne), **1996** ; 102 p.
45. LEMOINE C. Les plantes toxiques. Paris : Jean-paul Gisserot, **2004** ; 31 p.
46. LETOUZEY R. Manuel de botanique forestière. Marne : *Centre Technique Forestier Tropical*, **1982** ; 2 : 206 p.
47. MAHUZIER G., HAMON M. Abrégé de chimie analytique : méthode de séparation. 2^{ème} éd. (Collection abrégé de Pharmacie), **1990** ; 261 p.
48. MALASHETTY V.B., PATIL A. Effect of chromatographic fractions of ethanolic extract of *Crotalaria juncea* L. seeds on ovarian follicular kinetics and estrous cycle in albino rats. *J. Pharmacol Ther. Iran*, **2007** ; 6 : 159-163.
49. MARMONIER A.A. Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. In : Bactériologie médicale, techniques usuelles. 4^{ème} éd. Paris : Doin, **1990** ; 227-236.

50. MAYER A.M., POLJAKOFF-MAYBER A. The germination of seeds. London : Pergamon press, **1963** ; 236 p.
51. MOGODE D.J. Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (Caesalpinaceae) utilisée dans le traitement des dermatoses au Tchad. [Thèse de doctorat : Pharmacie]. Bamako : Université de Bamako, **2005** ; 234 p.
52. MORELAND D.E. Effects of toxicants on oxidative and photophosphorylation. *In*: Introduction to biochemical, toxicology. Ed. HODGSON E. and GUTHRIE E.F., **1980** ; 245-260.
53. MOUELET M.A., Screening phytochimique de deux espèces de plantes : *Crotalaria retusa* L. (Papilionaceae) et *Mitragyna ciliata* Aubrev. & Pellegr. (RUBIACEAE) récoltées au Gabon [Thèse de Doctorat : Pharmacie]. Bamako : Université de Bamako, **2004** ; 88 p.
54. NADKAMI K.A. Indian Materia Medica. 3^{ème} éd. Bombay : Popular Book Depot, **1954**, 1 : 46 p.
55. NOHARA T. Analysis of steroid and another biologically significant steroids. San Diego: Nes W.D. et Parish E.J., **1989** ; 119-132.
56. OGWAL-OKENG J.W., OBUA C., ANOKBONGGO W.W. Acute toxicity effects of the methanolic extract of *Fagara zanthoxyloides* (Lam.) root-bark. *African Health sciences*, **2003**, 3 (3) : 124-126.
57. 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.
58. ORWA. *Crotalaria trichotoma* Bojer. *Agroforestry Database*, **2009** ; 4 : 5 p.
59. PERLTIER M.A.G. Note sur les Légumineuses-Papilionidées de Madagascar et des Comores. *Journal d'agriculture tropicale et de botanique appliquée*, **1959**, 6 : 267-289.
60. PERNET R., MEYER G. Pharmacopée de Madagascar. *Institut de recherches scientifiques*. Antananarivo, **1957** ; 86 p.
61. POLHILL R, *Crotalaria* in Africa and Madagascar. **1982**, 389 p.

62. PRAKASH A.O. Biological evaluation of some medicinal plant extracts for contraceptive efficacy in femals. *Contracept Fertil Sex*, **1985** ; 13 : 649-655.
63. PRAKASH A.O., Dehadrai S., JONATHAN S. Toxicological studies on the ethanolic extract of *Crotalaria juncea* seeds in rats. *J. Ethnopharmacol.*, **1995** ; 45 : 165-167.
64. RABE T., VAN STADEN J. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. *J. Ethnopharmacol.*, **1997** ; 5 : 81-87.
65. RAHANTARINORO J. Etude chimique et toxicologique des extraits de feuilles de *Ravensara anisata* (LAURACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2004** ; 78 p.
66. RAHELIARISATA V.A. Purification et caractérisation partielles des principes toxiques de graines d'*Albizia greveana*, une Fabacée endémique de Madagascar. [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2014** ; 90 p.
67. RAHERINIAINA C.E. Etude chimique et toxicologique du principe ichtyotoxique de *Euphorbia laro* (EUPHORBIACEAE)-Impact de la pêche au laro. [Thèse de Doctorat : Biochimie]. Tuléar : Université de Tuléar, **2004** ; 121 p.
68. RAKOTONDRA SOA N.S. Etudes chimique et biologique des extraits toxiques de feuilles d'*Albizia polyphylla* (MIMOSOÏDEAE, FABACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2000** ; 72 p.
69. RAKOTO-RANOROMALALA D.A.D., RANDRIANARIVO R., EL-YACHOURROUTUI M., ARISOA A.A., RAHARISOA N., RAKOTONDRA SOA N., RAONIHARISOA P., JEANNODA V. Effects of extracts from *Albizia* (FABACEAE) endemic species of Madagascar on vegetable seedling development. *J. Chem. Eng.* **2012** ; 6 : 313-322.
70. RAKOTOASIMBOLA I.H. Purification et caractérisation chimique et toxicologique partielles des principes toxiques des feuilles de *Macarisia pyramidata* (RHIZOPHORACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2007** ; 60 p.

71. RAKOTOMALALA A.T. Etudes chimique et toxicologique des extraits toxiques des feuilles d'*Albizia arenicola* (FABACEAE), endémique de Madagascar. [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2012** ; 63 p.
72. RAKOTONDRAZANAKA L. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes toxiques de *Xerosiocyos danguyi* (CUCURBITACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **1999** ; 61 p.
73. RAKOTONIAINA M.M. Purification et caractérisation partielles des principes antimicrobiens des feuilles de *Macaranga boutonoides* (EUPHORBIACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2009** ; 55 p.
74. 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 3^e cycle : Sciences]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **1989** ; 68 p.
75. RAKOTO-RATSIMAMANGA A, BOITEAU P., MOUTON M. Eléments de Pharmacopée Malagasy. Tananarive : *Société pour la Promotion de la Pharmacopée Malagasy*, **1969** ; 308 p.
76. RAKOTO-RATSIMAMANGA A. Inventaire des pesticides naturels d'origine végétale à Madagascar : VOARISOA. *L'environnement et les produits toxiques*, **1998** ; 291 p.
77. RALINORO F., Etudes chimique et toxicologique des extraits des feuilles d'une plante médicinale malgache *Ophiocolea floribunda* (BIGNONIACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2008** ; 56 p.
78. RAMBELOHARINTSOA N.M. Etudes chimique et toxicologique des extraits des feuilles de *Dialium unifoliatum*, une Fabacée endémique de Madagascar. [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2013** ; 67 p.
79. RANDEKATH K. Chromatographie sur couche minces. Paris : GAUTHIER-VILLARS, **1964** ; 296 p.
80. RANDRIAMAHAVALISOA T.F. Etudes chimique et toxicologique des extraits toxiques des feuilles d'*Ocotea madagascariens* (LAURACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2003** ; 68 p.

81. RANDRIAMIHARISOA F. Etude chimique et biologique d'extraits toxiques de feuilles de *Xerosicyos perrieri* (CUCURBITACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2000** ; 71 p.
82. RANDRIANANDRASANA J. Etude chimique et toxicologique des extraits d'écorces de tige de *Uapaca thouarsii* (EUPHORBIACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2004** ; 79 p.
83. RAO V.N.S., DASARADHAN P., KRISHNAIAH K.S. Antifertility effects of some indigenous plants. *J. Med. Res. Indian*, **1979** ; 517-520.
84. RAONIHARISOA P. Etudes chimique et toxicologique des extraits de graines d'*Albizia tulearensis* (MIMOSOÏDEAE, FABACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2003** ; 78 p.
85. RASOLOFOMANANA R. J. Etude chimique et toxicologique des extraits de graines d'*Albizia androyensis*, une Fabacée endémique de Madagascar. [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2015** ; 68 p.
86. RASOLOFONANTENAINA R. Etudes chimique et toxicologique des extraits de feuilles d'*Astrotrichilia parvifolia* (MELIACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2012** ; 57 p.
87. RASOLOHARIJAONA F.Y. Etudes chimique et toxicologique d'une plante médicinale malgache, *Schefflera longipedicellata* (ARALIACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2008** ; 57 p.
88. RATOvonIRINA N.H. Etudes chimique et toxicologique des fractions lipidiques et non lipidiques des graines de *Mucuna pruriens* (FABACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2009** ; 62 p.
89. REED L., MUENCH H. A simple method of estimating fifty per cent points. *Am. J. Hyg.*, **1938** ; 27 : 293.
90. RIZK A.M. Constituents of plants growing. *Fitoterapia. Qatar*, **1952** ; 52 (2) : 35-42.
91. ROCHAT H., KOPEYANA C., GARCIA L.C., MARTINEZ G., ROSOS J.P., PAKARIS A., MARTIN F., GARCIA A., MARTIN-MOUTT N., GREGOIRE J., MIRANGA F. Recent results on the structure of scorpion and snake toxins. *In: Animal, plant and microbial toxins (Chemistry, Pharmacology and Immunology)*. Ed. HAYASHIA A.O.K. and SAWAY, **1976** ; 2 : 79-87.

92. SANDBERG F., RATSIMBASON M., ANDRIANTSOA M. Rapport technique: Manuel pratique de screening pharmacologique des plantes médicinales. Vienne : *Organisation des Nations Unies pour le développement industriel*, **1990** ; 28 p.
93. SHARMA H.K, CHHANGTE L., DOLUI A.K. Traditional medicinal plants in Mizoram, *Fitoterapia Indian* : **2001** ; 72 : 146-161.
94. SILMI A. Etudes chimique et toxicologique des extraits de feuilles d'une plante médicinale malgache *Acridocarpus excelsus* (MALPIGHIACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2009** ; 73 p.
95. SINGLETON P. Bactériologie. 2^{ème} éd. Paris : Masson, **1994**, 245 p.
96. VIJAYKUMAR B., SANGAMMA I., SHARANAPPA A., PATIL S.B. Antispermato-genique and hormonal effects of *Crotalaria juncea* L. seed extracts in male mice. *Asian J. Andril.*, **2004** ; 6: 67-70.

REFERENCES WEBOGRAPHIQUES

http://www.lemonde.fr/planete/visuel/2014/10/11/de-la-plante-au-medicament_4504158_3244.html#bJwmkR2fO7s2.99

<http://www.fmcgastro.org/htdocs/postu98/larrey.html>

http://www.caryenne.ird.fr/database/web_elodie/symptomes/crotalaria/html

http://www.barbadine.com/pages/crotalaria_retusa_lien.html

<http://www.oswaldasia.org/species/c/c;http://www.prota4u.org/protav8.asp?fr=1&p=Crotalaria+juncea+L>

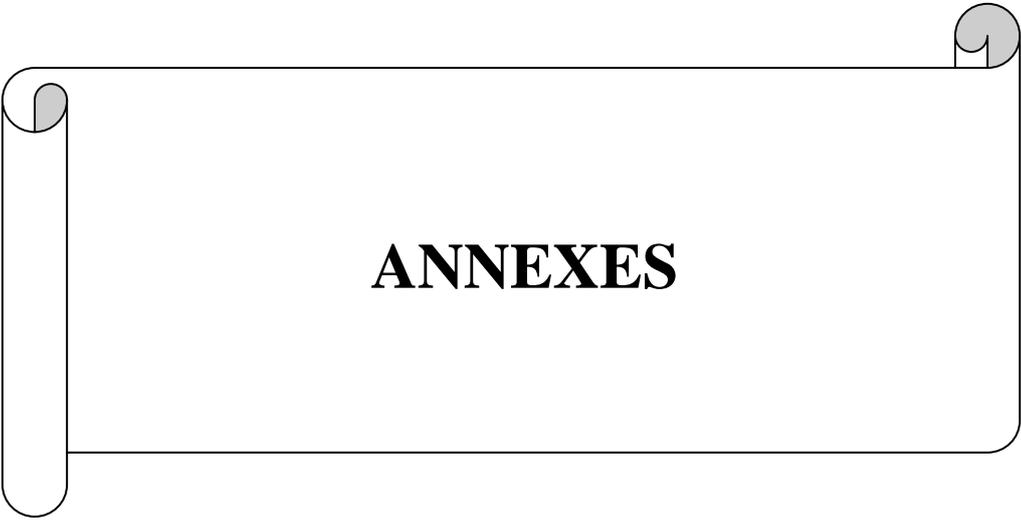
www.afleurdepau.com/.../fabaceae/f.htm

AMHIS W., BENSLIMANE A., TIOUTIT D., NAIM M. Tests de sensibilité utile au traitement antibiotique, **26 MAI 2003**,

[<http://www.santetropicale.com/resume/9105pdf>].

ARCHAMBAUD M. « Méthodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques » dans Brûlures, vol I, Novembre **2000**,

[www.medbc.com/meditline/review/brulure/vol_1/num_3/txr%5Cvol1n3p141.asp].



ANNEXES

ANNEXES

Annexe I : Composition des réactifs généraux des 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 du 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 100 ml

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

Annexe II : Composition du picrate de sodium

Carbonate de sodium	:	5 g
Acide picrique	:	0,5 g
Eau distillée	:	100 ml

Annexe III : Les différents milieux de culture

A. Composition des milieux de culture :

- Milieu de MUELLER-HINTON (milieu solide)

Formule-type (g/ml)

Extrait de viande	:	2,0
Peptone trypsique de caséine	:	17,5
Amidon	:	1,5
Agar	:	15,0

- Milieu Nutrient broth (milieu liquide)

Formule-type (g/ml)

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

B. Préparation à partir des milieux déshydratés

- Préparation du milieu de MUELLER-HINTON

Dissoudre 36 g de milieu déshydraté dans de l'eau distillée en agitant continuellement puis ajuster à 1 l.

Chauffer le milieu jusqu'à dissolution totale sur une plaque chauffante, toujours en remuant avec un agitateur magnétique.

Autoclaver à 121°C à 2 bars pendant 15 min.

- Préparation du milieu Nutrient broth

Dissoudre 13 g de milieu déshydraté dans de l'eau distillée en agitant continuellement puis ajuster à 1 l.

Chauffer le milieu jusqu'à dissolution totale sur une plaque chauffante, toujours en remuant avec un agitateur magnétique.

Autoclaver à 121°C à 2 bars pendant 15 min.

Name : RAZAFINORO

First name : Nadia

Title : CHEMICAL AND TOXICOLOGICAL STUDY OF *Crotalaria trichotoma* Bojer
LEAVES EXTRACTS, harvested Iaroka (FABACEAE)

ABSTRACT

A toxic activity was found in leaves of *Crotalaria trichotoma* Bojer, harvested Iaroka (FABACEAE).

The cold hydroethanolic crude was purified by a heat treatment and n-butanol fractionation, allowing obtaining a partially purified E2 extract. The yield in toxins is about 3.6%.

The active principles were compounds resist heat, soluble in water, ethanol and n-butanol. Their activity is modified by the operations of freezing and defrosting repeated

The phytochemical screening of the crude extract revealed the presence of alkaloids, tannins, unsaturated sterols, flavonoids, iridoids.

The crude extract administered in mouse by intraperitoneal route caused symptoms suggesting an attack of central nervous system. The lethal dose 50 (LD 50) is estimated at between 261.48 mg/kg and 264.48 mg/kg of mice. By oral route, EB at 1 200 mg/ml is not lethal and not provokes symptoms. It presents no activity at the chick.

On frogs' tadpoles, the toxicity of the crude extract follows the law of "all or nothing". On fishes, the lethal concentration 50 (LC 50) is at 719.10 µg/ ml. The same extract was not toxic on mosquito larvae even at 2 mg/ml.

No toxic activity of the EB was observed with respect to the germination of seed and in general it has a stimulative effect of the growth of young seedlings.

In the micro-organisms, the EB exerts an effect bacteriostatic with respect to *Bacillus cereus*. The MIC is estimated at 74.07 mg/ml and the MBC higher than 260 mg/ml.

Key-words: *Crotalaria trichotoma*, FABACEAE, leaf, toxic, LD50, LC 50, antimicrobial activity

Adviron: Professeur RAKOTO-RANOROMALALA Danielle A. Doll

Nom : RAZAFINORO

Prénom : Nadia

Titre du mémoire : ETUDES CHIMIQUE ET TOXICOLOGIQUE DES EXTRAITS DE FEUILLES DE *Crotalaria trichotoma* Bojer, récoltée à Iaroka (FABACEAE)

RESUME

Une activité toxique a été mise en évidence dans les feuilles de *Crotalaria trichotoma* Bojer, récoltée à Iaroka (FABACEAE).

L'extrait brut hydroéthanolique à froid (EB) a subi une purification comportant un traitement par la chaleur suivi d'un fractionnement par le n-butanol, permettant d'obtenir un extrait partiellement purifié E2. Le rendement en toxines est de l'ordre de 3,6%. Les principes actifs sont des composés résistants à la chaleur, solubles dans l'eau, dans l'éthanol et dans le butanol et précipitables par l'ANP. Leur activité est modifiée par les opérations de congélation et de décongélation répétées.

Le criblage phytochimique de l'extrait brut a révélé la présence d'alcaloïdes, de tanins, de stérols insaturés, de flavonoïdes et d'iridoïdes.

Chez la souris, l'administration de l'EB par voie intrapéritonéale provoque des symptômes suggérant une atteinte du système nerveux centrale. La DL₅₀ (24 h) est estimée entre 261,48 mg/kg et 264,48 mg/kg de souris. Par voie orale, l'EB n'est pas létal à la dose 1 200 mg/kg et ne provoque aucun symptômes d'intoxication. Il ne présente aucune activité chez le poussin.

Chez les têtards de grenouille, la toxicité de l'EB obéit à la loi du « tout ou rien ». Chez les alevins de carpe, il est toxique, donnant une CL₅₀ de 719,10 µg/ml. Ce même extrait n'a aucune activité toxique sur les larves de moustique jusqu'à la concentration de 2 mg/ml.

Aucune activité toxique de l'EB n'a été observée vis-à-vis de la germination de graine et en général il a un effet stimulateur sur la croissance de jeunes plantules.

Chez les microorganismes, l'EB exerce un effet bactériostatique vis-à-vis de *Bacillus cereus*. La CMI est estimée à 74,07 mg/ml et la CMB est supérieure à 260 mg/ml.

Mots clés : *Crotalaria trichotoma*, FABACEAE, feuilles, toxique, DL₅₀, CL₅₀, activité antimicrobienne

Encadreur : Professeur RAKOTO-RANOROMALALA Danielle A. Doll