



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
FACULTE DES SCIENCES



DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE

Mémoire pour l'obtention du Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) de Biochimie

Option : Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales

**ETUDES CHIMIQUE ET TOXICOLOGIQUE DES
EXTRAITS DE GRAINES D'*Albizia divaricata*,
UNE FABACEE ENDEMIQUE DE MADAGASCAR**

Présenté par :

RAKOTOMALALA Fetra Angelot

Maître ès-sciences

Soutenu publiquement le 03 avril 2015

Devant la commission du jury, composé de :

- Président : Professeur JEANNODA Victor
- Rapporteur : Docteur RANDRIANARIVO Ranjàna
- Examineurs : Professeur RAKOTO Danielle A. Doll
Docteur RAMAROSON Roseline

TABLE DES MATIERES

DEDICACE.....	i
REMERCIEMENTS.....	ii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	iii
GLOSSAIRE.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	v
LISTE DES FIGURES.....	vi
INTRODUCTION GENERALE.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
Première partie : ETUDE CHIMIQUE	
I.INTRODUCTION.....	8
II.MATERIELS ET METHODES.....	8
II.1. MATERIELS.....	8
II.1.1. Matériel végétal	8
II.1.1.1. Classification de la plante	8
II.1.1.2. Description botanique de la plante	9
II.1.1.3. Répartition géographique	10
II.1.1. 4. Origine du matériel végétal.....	10
II.1.1. 5. Préparation et conservation du matériel végétal	10
II.1.2. Produits chimiques	10
II.2. METHODES	11
II.2.1. Méthodes d'extraction	11
II.2.1.1. Extraction aqueuse à froid.....	11
II.2.1.2. Extraction par épuisements successifs	11
II.2.2. Méthodes de purification	11

II.2.2.1. Fractionnement par l'acétate d'éthyle.....	12
<i>a) Principe</i>	12
<i>b) Mode opératoire</i>	12
II.2.2.2. Fractionnement par le n-butanol.....	12
<i>a) Principe</i>	12
<i>b) Mode opératoire</i>	12
II.2.3. Méthode d'évaporation	13
II.2.4. Calcul du rendement	13
II.2.5. Méthodes d'analyse	13
II.2.5.1. Chromatographie sur couche mince.....	13
<i>a) Principe</i>	13
<i>b) Mode opératoire</i>	14
II.2.5.2. Criblage phytochimique	14
<i>a) Préparation des extraits</i>	15
<i>b) Les différents tests de criblage phytochimique</i>	15
<i>b.1) Les alcaloïdes</i>	15
<i>b.2) Les saponosides (Indice de mousse)</i>	16
<i>b.3) Les tanins et polyphénols</i>	18
<i>b.4) Les anthraquinones (test de BORNTRAGER)</i>	16
<i>b.5) Les désoxyoses (test de KELLER-KILIANI)</i>	17
<i>b.6) Les iridoïdes</i>	17
<i>b.7) Les flavonoïdes et les leucoanthocyanes</i>	17
<i>b.8) Les stéroïdes et les terpénoïdes</i>	17
III. RESULTATS	18
III.1. EXTRACTION	18
III.2 PURIFICATION	19

III.2.1. Fractionnement par l'acétate d'éthyle	19
III.2.2. Fractionnement par le n-butanol	20
III.3. RENDEMENT	21
III.4. ANALYSE DES EXTRAITS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE.....	21
III.5. CARACTERISATION CHIMIQUE.....	22
III.5.1.Nature chimique.....	22
III.5.2.Propriétés physico-chimiques.....	22
IV DISCUSSION-CONCLUSION.....	23

Deuxième partie: **ETUDE TOXICOLOGIQUE**

I.INTRODUCTION.....	25
II.MATERIELS ET METHODES.....	25
II.1. MATERIELS	25
II.1.1. Les animaux d'expérimentation	25
II.1.1.1. Les souris.....	25
II.1.1.2.Les poussins	25
II.1.1.3. Les têtards de grenouille	26
II.1.1.4. Les alevins de poisson.....	26
II.1.2. Les plantes d'expérimentation	26
II.1.3. Les matériels utilisés en microbiologie.....	26
II.1.3.1. Les microorganismes utilisés	26
II.1.3.2. Le milieu de culture	27
II.1.3.3. Les disques pour les tests antibiogramme.....	27
II.2. METHODES.....	28
II.2.1. Méthodes d'étude des effets sur les animaux.....	28

II.2.1.1 Test d toxicité aiguë sur souris.....	28
<i>a) Par voie intrapéritonéale.....</i>	28
<i>B) Par voie orale.....</i>	28
II.2.1.2.Détermination de la DL 50 (24h).....	28
II.2.1.2. Test de toxicité aiguë sur les poussins.....	29
<i>a) Par voie intrapéritonéale.....</i>	29
<i>b) Par voie intrapéritonéale</i>	29
II.2.1.3.Test sur les animaux aquatiques.....	30
<i>a) Principe.....</i>	30
<i>b) Mode opératoire.....</i>	30
<i>c)Détermination de la concentration létale 50% (CL50 24 h).....</i>	30
<i>b.2) Test sur les alevins de poussins.....</i>	30
II.2.2.Méthode d'étude des effets sur les végétaux.....	30
II.2.2.1. Etude des effets sur le pouvoir germinatif des graines.....	31
<i>a) Trempage.....</i>	31
<i>b) Germination.....</i>	31
II.2.2.2. Test sur la croissance des jeunes plantules.....	31
<i>a) Principe... ..</i>	31
<i>b) Mode opératoire.....</i>	31
<i>b.1. Trempage.....</i>	31
<i>b.2. Croissance.....</i>	31
II.2.2.3. Test sur le développement des bourgeons axillaires.....	32
II.2.3. Méthode d'étude des effets sur la croissance des microorganismes.....	32
II.2.3.1. Stérilisation.....	32
II.2.3.2. Etude de l'activité antimicrobienne des extraits des extraits.....	33
<i>a) Principe.....</i>	33

<i>b) Mode opératoire</i>	33
II.2.3.3. Détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu liquide.	34
II.2.3.4. Détermination de la CMB.....	35
III.RESULTATS	36
III.1. EFFETS SUR LES ANIMAUX	36
III.1.1. Effets sur la souris	36
III.1.1.1. Symptômes d'intoxications.....	36
<i>a) Par voie intrapéritonéale</i>	36
<i>b) Par voie orale</i>	36
II.1.1.2. Détermination de la DL 50 (24h).....	36
III.1.2. Effets sur les poussins	38
III.1.2. Symptômes d'intoxication.....	38
<i>a) Par voie intrapéritonéale</i>	39
<i>b) Par voie orale</i>	39
III.1.3. Effets sur les animaux aquatiques	39
III.1.3.1. Sur les têtards de grenouilles.....	39
III.1.3.2. Sur les alevins de poissons.....	39
III.2. EFFETS DES EXTRAITS SUR LES VEGETAUX	40
III.2.1. Effets sur le pouvoir germinatif de graines	40
III.2.2. Effets sur la croissance des jeunes plantules	41
III.2.2.1. Effets sur la croissance des jeunes plantules de Monocotylédones.....	42
III.2.2.1. Effets sur la croissance des jeunes plantules de Monocotylédones.....	44
III.3. EFFETS DES EXTRAITS SUR LES MICROORGANISMES	48
III.3.1. Activité antimicrobienne	48
III.3.2. Détermination de la CMI	48
III.3.2. Détermination de la CMB	49

IV. DISCUSSION ET CONCLUSION	53
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	58
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	59
ANNEXE.....	62
RESUME.....	63

DEDICACE

“Venez à moi, vous tous qui êtes fatigués et chargés, et je vous donnerai du repos”(Matthieu 11 : 28).

Ce mémoire est dédié :

A Dieu Tout-puissant qui m'a donné la force et le courage pour l'accomplissement de ce travail.

A la mémoire de mon père qui aurait voulu être parmi nous.

A ma femme, RAKOTOMALALA Harisoa Sandratra, que cet ouvrage soit pour toi un témoignage de notre amour fidèle.

A ma fille adorée RAKOTOMALALA Tretrika Angela, que ce travail soit un exemple pour ton avenir.

A ma mère et à mes beaux-parents, pour votre courage infaillible. Que vous trouviez en ce jour le fruit de tant d'années d'efforts, de sacrifices, et de dévouement.

A mes sœurs et à mes frères, le courage est primordial pour réussir.

A toute ma famille.

A tous mes amis et mes collègues.

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été réalisé au :

➤ Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales (LABASM), du département de Biochimie Fondamentale et Appliquée de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo.

Je voudrais adresser ma gratitude à Monsieur le Professeur JEANNODA Victor, Directeur de l'Ecole doctorale Sciences de la vie et de l'environnement. Je tiens à le remercier pour son soutien, son aide et ses conseils malgré ses multiples responsabilités. Je le remercie aussi de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

Je témoigne toute ma profonde reconnaissance à Monsieur le Docteur RANDRIANARIVO Hanitra Ranjàna, encadreur et rapporteur de mon stage pour les conseils et suggestions qu'il m'a prodigués tout au long de ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent à Madame le Professeur RAKOTO RANOROMALALA Danielle A. Doll et Madame le Docteur RAMAROSON Roseline qui ont accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont apporté une aide technique pour la réalisation de ce travail, en particulier l'équipe du Laboratoire de Biochimie Fondamentale et Appliquée et les doctorants.

Enfin, j'adresse mes vifs remerciements à tous ceux qui, de près ou de loin, ont apporté leur aide dans l'élaboration de ce mémoire.

LISTE DES ABREVIATIONS

ATCC	: American Type Culture Collection
BAE	: n-butanol/acide acétique/eau distillé
CCM	: Chromatographie sur couche mince
CL0	: Concentration létale 0%
CL50	: Concentration létale 50%
CL100	: Concentration létale 100%
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
DBFA	: Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée
DL0	: Dose létale 0%
DL50	: Dose létale 50%
DL100	: Dose létale 100%
DO	: Densité optique
E0	: Phase aqueuse acétate d'éthyle
E1	: Phase organique acétate d'éthyle
E2	: Phase organique n-butanol
E3	: Phase aqueuse n-butanol
EA	: Extrait aqueux
EAc	: Extrait acétate d'éthyle
EB	: Extrait brut
EH	: Extrait hexanique
EHE	: Extrait hydroéthanologique
EM	: Extrait méthanolique
IP	: Intrapéritonéale
IPM	: Institut Pasteur de Madagascar
LABASM	: Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales
LMG	: Laboratorium voor Microbiologie Universiteit Gent Belgium
P/V	: poids/volume
SNGF	: Silo National des Graines Forestières
UV	: Ultra-violet

GLOSSAIRE

Bourgeons axillaires	: insérés au-dessus du point d'attache des pédoncules des feuilles, assurent la ramification des plantes
Brachyblastes	: structure écailleuse enveloppant la base des verticilles foliaires.
Capillarité	: phénomène par lequel un liquide se trouve comme aspiré au contact d'un solide doté de tubes très fins
Contorsion abdominale	: étirement de l'animal avec des torsions du corps
Convulsion clonique	: alternance de contraction et de relâchement des muscles, répétée à courts intervalles
Convulsion tonique	: Contraction musculaires prolongées provoquant un état de rigidité et de contracture du corps
Dicotylédones	: plante issue de la germination d'une graine disposant de deux cotylédons
Epicotyle	: partie de la jeune plantule en germination située au dessus de l'insertion du ou des cotylédons
Hyperhémie	: désigne l'accroissement du flux sanguin vers un organe ou tissu de l'organisme
Hypocotyle	: partie de la tige située à la base de la plantule et qui émerge la première de la graine lors de la germination
Marc	: résidu d'une substance qu'on a fait infuser pour en extraire le suc
Monocotylédones	: plante angiosperme à fleurs et à feuilles aux nervures parallèles, dont les graines n'ont qu'un seul cotylédon
Micropyle	: point d'insertion de la graine sur l'ovaire
Pennes	: dont la structure rappelle celle des plumes des oiseaux
Pubescence	: état d'un organe végétal couvert de poils
Sessile	: qui vit fixé à son support et qui est dépourvu de pied ou de tige

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Nature des principes actifs des <i>Albizia</i> étudiées au LABASM.....	6
Tableau 2 : Effets des extraits de quelques <i>Albizia</i> malgaches sur les animaux.....	6
Tableau 3: Activité antimicrobienne de quelques espèces malgaches appartenant au genre <i>Albizia</i> ..	7
Tableau 4: Effets de divers extraits des <i>Albizia</i> étudiées au LABASM sur les végétaux	7
Tableau 5: Caractéristiques des extraits bruts obtenus lors de l'extraction	19
Tableau 6: Rendements aux différentes étapes de purification	21
Tableau 7: Résultats du criblage phytochimique de la poudre végétale et de l'extrait brut EB2.....	22
Tableau 8: Rendements de purification des graines de quelques espèces d' <i>Albizia</i> malgaches	24
Tableau 9: Les végétaux d'expérimentation	26
Tableau 10: Les microorganismes-tests	27
Tableau 11: Normes utilisées pour l'expression des résultats des tests d'activité.....	34
Tableau 12: Composition des différents milieux pour la détermination de la CMI.....	35
Tableau 13: Résultats de la détermination de la DL50 (24 h) de l'extrait méthanolique (EB2).....	37
Tableau 14: Valeurs utilisées pour l'estimation de la DL50 (24h) par la méthode graphique	38
Tableau 15: Effets de l'EB2 sur les têtards de grenouille	39
Tableau 16: Effets de l'EB2 sur les alevins de poisson	40
Tableau 17: Effets de l'extrait brut EB2 sur le pouvoir germinatif de graines.	41
Tableau 18 : Croissance des bourgeons axillaires de petit pois en présence des différents produits testés.....	47
Tableau 19 : Résultats des tests d'antibiogramme des différents extraits.....	48
Tableau 20 : Détermination de la CMI de l'extrait E2 en milieu liquide sur <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	49
Tableau 21 : DL50 (24h) sur souris des espèces d' <i>Albizia</i> déjà étudiées	50
Tableau 22 : CL50 des espèces d' <i>Albizia</i> déjà étudiées sur les têtards de grenouille et les alevins de poisson.....	52

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Un rameau d' <i>Albizia divaricata</i>	9
Figure 2 : Graines d' <i>Albizia divaricata</i>	10
Figure 3 : Extraction et purification des principes actifs à partir de la poudre de graines entières d' <i>Albizia divaricata</i>	20
Figure 4 : Chromatogramme des différents extraits obtenus au cours de l'extraction et de la purification des principes toxiques des graines entières d' <i>Albizia divaricata</i>	21
Figure 5 : Détermination graphique de la DL50 (24 h).....	38
Figure 6 : Croissance des épicotyles de maïs en présence de l'EB2 à différentes concentrations.	42
Figure 7 : Croissance des hypocotyles de maïs en présence de l'EB2 à différentes concentrations.....	43
Figure 8 : Croissance des épicotyles de riz en présence de l'EB2 à différentes concentrations.....	43
Figure 9 : Croissance des hypocotyles de riz en présence de l'EB2 à différentes concentrations.....	44
Figure 10 : Croissance des hypocotyles de haricot en présence de l'EB2 à différentes concentrations.....	44
Figure 11 : Croissance des épicotyles de haricot en présence de l'EB2 à différentes concentrations.....	45
Figure 12 : Croissance des hypocotyles de haricot en présence de l'EB2 à différentes concentrations.....	46
Figure 13 : Croissance des épicotyles de petit pois en présence de l'EB2 à différentes concentrations.....	46
Figure 14 : Croissance des épicotyles de petit pois en présence de l'EB2 à différentes concentrations.....	47

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Selon l'OMS, dans certains pays en voie de développement d'Asie, d'Afrique et d'Amérique latine, 80% de la population dépendent de la médecine traditionnelle surtout en milieu rural, du fait de la proximité et de l'accessibilité de ce type de soins au coût abordable et surtout en raison du manque d'accès à la médecine moderne de ces populations. De ce fait, ce type de thérapeutique, en particulier, l'utilisation de plantes médicinales, peut être considéré comme partie intégrante des soins de santé primaire. Cependant, les plantes peuvent contenir une large gamme de molécules dont les propriétés pharmaco-toxicologiques sont le plus souvent inconnues. Par ailleurs, plusieurs plantes sont à la fois toxiques et médicinales. Par exemple :

- *Phytolacca americana* L. (famille des Phytolaccaceae) qui est une plante entièrement vénéneuse contenant un glucoside et la phytolaccine toxique. Par contre, la poudre de racines est utilisée pour traiter la syphilis (DONALD, BARCELOUX et MD, 2008).

- *Gelsemium sempervirens* (Carolina Jessamine, famille des Loganiaceae) qui est entièrement vénéneuse du fait de la présence de deux alcaloïdes : la gelseminine et la gelsemoidin. Mais elle a des vertus médicinales antinévralgique, fébrifuge (DONALD, BARCELOUX et MD, 2008).

- *Berberis vulgaris* (Epine-vinette, famille des Berberidaceae). La plante est entièrement vénéneuse, sauf les baies. L'écorce a des propriétés fébrifuge, stomachique, hépatique, cardiaque alors qu'elle contient des alcaloïdes (berbérine) fortement toxiques (IVANOVSKA et PHILIPOUS, 1996).

- *Cicutavivrosa* (ciguë aquatique ou persil de marais, famille des Apiaceae). Toute la plante est un poison violent. Le rhizome contient un poison appelé cicutoxine et une huile essentielle aux effets narcotiques. Mais elle a les propriétés thérapeutiques sur le système nerveux central, à savoir spasmolytique, calmant, efficace contre les vertiges. La plante est souvent confondue avec le céleri, causant des empoisonnements qui ne sont pas rares (JUN et coll., 2011)

La plupart du temps, les chercheurs ont tendance à s'intéresser plus aux propriétés médicinales des plantes, alors que les propriétés toxicologiques présentent aussi beaucoup d'intérêts sur le plan fondamental et appliqué. A titre d'illustration :

-la digitaline, un hétéroside extrait de *Digitalis purpurea* permet de traiter les insuffisances cardiaques chroniques (BRUNETON, 1993) ;

- la roténone et l'antimycine A ont contribué à la compréhension de la structure et du fonctionnement de la chaîne respiratoire (MORELAND, 1980) ;
- les graines d'*Azadirachta indica* contiennent de l'azadirachtine à activité anti-appétante et inhibitrice de croissance pour les insectes.
- la cocaïne extraite des feuilles de coca (*Erythroxylum sp*) est utilisée pour lutter contre les insectes ravageurs (*Mandicas sexta*) (JAMES et coll., 1993).

Les plantes toxiques sont innombrables, mais certaines familles dont celles des Fabaceae, Sapotaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, etc sont davantage concernées. Le Laboratoire de Biochimie appliquée aux Sciences médicales (LABASM) du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée (DBFA) de la Faculté des Sciences (Université d'Antananarivo) étudie depuis plusieurs années les plantes toxiques malgaches. Plusieurs exemples peuvent être cités:

- *Rourea oreantalis*, *Cnestis clabra* et *cnestis polyphylla*, famille de Connaraceae ;
- les plantes du genre *Dioscorea* (Ignames), famille des Dioscoreaceae ;
- *Pechia madagascariensis*, famille des Apocynaceae ;
- *Chassalia bojeriana*, famille des Rubiaceae ;
- différentes espèces d'*Albizia*, famille de Fabaceae.

Pour notre part, nous avons entrepris l'étude chimique et biologique des principes toxiques des graines d'*Albizia divaricata* (famille des Fabaceae) pour les raisons suivantes :

- D'une part, les plantes du genre *Albizia* sont très connues dans le monde pour les propriétés pharmacologiques très variées de leurs principes actifs (voir Synthèse bibliographique) ;
- D'autre part, à Madagascar, il existe 30 espèces d'*Albizia* dont 27 endémiques. Un certain nombre d'entre elles ont déjà fait l'objet d'études approfondies mais *Albizia divaricata* n'a pas encore été étudiée.

Notre travail est subdivisé en deux grandes parties :

- L'étude chimique comprenant la purification et la caractérisation physico-chimique des principes toxiques ;
- L'étude biologique basée sur des tests de toxicité effectués sur divers organismes vivants

Synthèse bibliographique

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Le genre *Albizia* comprend environ 145 espèces réparties en Afrique, Asie et Amérique tropicale. Bien connues pour leurs différentes propriétés, plusieurs d'entre elles ont fait l'objet d'études chimiques et pharmacologiques approfondies. La présente partie résume les données bibliographiques sur les *Albizia* étrangères et malgaches.

Données botaniques sur le genre *Albizia* :

www.fr.wikipedia.org/wiki/albizia

Albizia est un genre botanique appartenant à la famille des Fabaceae. Le nom *Albizia* vient de celui de son « inventeur », le noble florentin ALBIZI qui ramena l'arbre en Europe au XVIII^{ème} siècle. Le surnom « arbre à soie » fait allusion à ses fleurs plumeuses.

C'est un arbre ou arbuste pouvant atteindre jusqu'à 12 m de haut et 5 à 8 m de large, qui meurt en général assez jeune.

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

Les fleurs, petites et en pompons, exhibent des étamines qui sont souvent spectaculaires et plus longues que les pétales. Le fruit est une gousse plate de 10-15 cm, contenant 5 à 8 graines qui se disséminent lorsque la gousse s'ouvre d'elle-même.

Cette plante est courante dans les régions tropicales d'Asie, d'Afrique, de Madagascar, d'Amérique centrale et du sud et en Australie. *Albizia* apprécie les terres plutôt pauvres et sableuses et accepte le calcaire et la présence de sel dans les sols, ce qui est intéressant en bordure de mer.

Les *Albizia* étrangères dans la médecine traditionnelle :

Dans le monde, plusieurs plantes appartenant au genre *Albizia* sont utilisées dans la pharmacopée traditionnelle. A titre d'illustration :

- Les différentes parties de l'espèce *Albizia adianthifolia* sont utilisées traditionnellement dans le traitement de diverses maladies (TAMOKOU et coll., 2012). Ainsi par exemple, les écorces sont utilisées dans le traitement des douleurs abdominales, de la fièvre typhoïde, des infections urinaires et celles des tractus respiratoires ;

- En Inde, *Albizia odoratissima* est utilisée dans la médecine traditionnelle pour soigner la lèpre, les ulcères de la peau et la toux (KIRTIKAR et BASU, 1935) ;

- Au Kenya, les écorces d'*Albizia versicolor* peuvent guérir la toux et la fièvre tandis que les écorces d'*Albizia schimperanas* ont utilisées contre le paludisme (RUKUNGA et coll., 1996) ;
- La décoction des feuilles d'*Albizia gummifera* a des vertus antitussives et permet de traiter l'asthme tandis que ses racines sont employées contre la diarrhée et le psoriasis (BURKILL, 1995, DU PUY et coll., 2002 ; KATENDE et coll., 1995) ;
- Les écorces d'*Albizia lebeck* ont utilisées en Indochine dans le traitement de la diarrhée et de la dysenterie (BALEKAR et coll., 2012).

Principes actifs isolés à partir d'*Albizia* étrangères :

Les études approfondies sur *Albizia* ont montré que la plupart du temps, les principes actifs sont :

- **des alcaloïdes**, comme
 - La budmunchiamine K isolée à partir d'*Albizia gummifera* (RUKUNGA et coll., 2007) ;
 - La diméthylbudmunchiamine L1 isolée d'*Albizia schimperana* (VOLODYMYR et coll., 2009).
- **des flavonoïdes**, on peut citer par exemple :
 - Les 5-déoxyflavones : 7,8-diméthoxy-3,9,4,9-méthylènedioxyflavone (1) et 7, 29,49-triméthoxyflavone (2) purifiées à partir de l'écorce de racine d'*Albizia odoratissima* (KOTESWARA et coll., 2002) ;
 - Les tri-O-glycosides flavonols : le kaempferol et la quercétine 3-orthoaminopyranosyl (1, 4, 6)-p-glucopyranosyl(1, 6)-/J-galactopyranosides, identifiée à partir d'*Albizialebeck* (AMANY et MOUSALLAMY, 1997) ;
 - Les flavonoides (1-3) isolés à partir d'*Albizia zygia* : 4',7-dihydroxyflavanone (1) 3',4',7-trihydroxyflavone (2) et 3-O-méthylfisétine (3',4',7-trihydroxy-3-méthoxyflavone, (3) (ABDALLA et all., 2012).
- **des saponosides**, tels que:
 - Les saponines albizosides A–C isolées à partir de l'extrait méthanolique d'*Albizia chinensis* (LUI et coll., 2010) ;
 - Les albizia saponines A-E purifiées à partir d'*Albizia myriophylla* (YOSHIKAWA et coll., 2002) ;
 - Les saponines à triterpénoides oleananes, les gummifera osides A-C (1-3) isolés à partir de l'extrait éthanolique d'*Albizia gummifera* (SHUGENG et coll., 2007).

Activités biologiques des *Albizia* étrangères

D'après la littérature, les espèces d'*Albizia* ont des activités biologiques très variées. Ainsi, à titre illustration :

- Des alcaloïdes isolés à partir d'*Albizia gummifera* ont des activités anti-plasmodiales (RUKUNGA, et coll., 2007) ;
- Les prosapogénines isolées à partir d'*Albizia adianthifolia* ont comme effet la prolifération des lymphocytes T (HADDAD et coll., 2004) ;
- Les éthylacétates extraits à partir des écorces d'*Albizia adianthifolia* ont des activités antioxydantes et antimicrobiennes (TAMOKOU et coll., 2012) ;
- Les albizosides D et E isolés à partir d'*Albizia chinensis* ont des activités cytotoxiques (LIU et coll., 2010) ;
- Les alcaloïdes isolés à partir d'*Albizia schimperiana* ont des activités antimicrobiennes, antiparasitaires et cytotoxiques (SAMOYLENKO et coll., 2009) ;
- Les saponines triterpénoides isolées à partir d'*Albizia gummifera* ont des activités cytotoxiques contre les cellules cancéreuses ovariennes A2780 (CAO et coll., 2007) ;
- Les extraits éthanoliques obtenus à partir des écorces d'*Albizia lebbek* ont des activités anti-diarrhéiques chez le rat (BALEKAR et coll., 2012) ;
- Des flavonoïdes obtenus à partir d'*Albizia zygia* ont une activité anti-plasmodiale potentielle (ABDALLA et LAATSCH, 2012).

Les *Albizia* étudiées au LABASM

Plusieurs plantes du genre *Albizia* ont été étudiées au LABASM depuis 1983. Le Tableau n°1 (p.6) présente la liste de ces espèces ainsi que leurs principes actifs.

Propriétés biologiques des *Albizia* malgaches

Toxicité aiguë chez les animaux à sang chaud et à sang froid :

Les résultats obtenus concernant la toxicité aiguë chez les animaux sont résumés dans le tableau n°2 (p.6).

Tableau n°1 : Nature des principes actifs des *Albizia* étudiées au LABASM

Espèce	Organe utilisé	Principes actifs	Référence
<i>A. lebeck</i>	graines	hétérosides	ANDRIANTSOA (1983)
<i>A. arenicola</i>	graines (amande)	saponines	RANDRIANARIVO (1996)
	feuilles	saponines	RAKOTOMALALA (2012)
<i>A. polyphylla</i>	graines	saponosides	RAJEMIARIMOELISOA (1996)
	feuilles	alcaloïdes et flavonoïdes	RAKOTONDRA SOA (2000)
<i>A. sp</i>	graines	alcaloïdes	RAMAMONJISOA (1998)
<i>A. boivini</i>	graines	saponosides	RAHERINIAINA (1998)
<i>A. odorata</i>	graines	saponosides	RAJEMIARIMOELISOA (2000)
<i>A. tulearensis</i>	graines	saponosides	RAONIHARISOA (2003)
<i>A. boinensis</i>	feuilles	flavonoïdes	AHMED (2009)
<i>A. mahalao</i>	graines	saponines	RAKOTOARIVONY (2012)
<i>A. aurisparsa</i>	graines	alcaloïdes	ANDRIAMIRINJO (2014)
<i>A. greveana</i>	graines	désoxyoses et triterpènes.	RAHELIARISATA (2014)
<i>A. androyensis</i>	graines	désoxyoses et stéroïdes	RASOLOFOMANANA (2015)

Tableau n°2 : Effets des extraits de quelques *Albizia* malgaches sur les animaux

Espèce	Parties utilisées	Nature du ou des principe(s) actif(s)	Extrait(s) utilisé(s)	DL50 (24h) sur souris en mg/kg (par voie IP)	CL50 (24h) en µg/ml	
					têtards de grenouille	alevins de poisson
<i>A. polyphylla</i>	graines	alcaloïdes	EP	entre 73 et 76	369	174
	feuilles	alcaloïdes	EB, EP	entre 63,14 et 63,49 (EP)	369 (EB)	174 (EB)
<i>A. sp</i>	graines	alcaloïdes	EP	8,7	n.d	n.d
<i>A. boivini</i>	graines	saponosides	EP	11	n.d	n.d
	cosses	stéroïdes	EP	entre 57 et 60	540	190
<i>A. bernieri</i>	graines	saponosides	EP	entre 53 et 55	n.d	n.d
<i>A. odorata</i>	graines	saponosides	EP	9	16,71	5,62
<i>A. tulearensis</i>	graines	saponosides	EP	entre 2,9 et 3,2	15,03	2,289
<i>A. boinensis</i>	feuilles	flavonoïdes	EB	entre 51,2 et 51	21,20	40,08
<i>A. arenicola</i>	graines	saponines	EB, EP	41,44	103	6,43
<i>A. androyensis</i>	graines	stéroïdes	EM	entre 41,33 et 43,23	3,48	3,95

EB : Extrait brut

EP : Extrait purifié n.d : non déterminé

Activité chez les végétaux

Les extraits d'*Albizia* ont été testés sur la germination de quelques graines de plantes potagères Monocotylédones et Dicotylédones et sur la croissance des jeunes plantules. Les résultats sont résumés dans le tableau n°3 suivant :

Tableau n°3: Effets des divers extraits d'*Albizia* malgaches sur les végétaux

Espèce	Graines inhibées	Jeunes plantules inhibées
<i>A. polyphylla</i> (EB de feuilles)	riz	maïs et petit pois
<i>A. boivini</i> (EB de fruits)	riz et haricot	n.d
<i>A. tulearensis</i> (EB de graines)	petit pois	petit pois
<i>A. boinensis</i> (EB de feuilles)	riz et haricot	n.d
<i>A. mahalao</i> (EB de graines)	riz, maïs, melon et pois bambara	n.d
<i>A. arenicola</i> (EB de tégument)	oignon	riz et haricot

Activité antimicrobienne

Les différents extraits obtenus à partir des différentes espèces d'*Albizia* malgaches se sont montrés actifs aussi bien sur les bactéries que sur les levures (Tableau n°4).

Tableau n°4: Activité antimicrobienne de quelques espèces malgaches appartenant au genre *Albizia* (EB : extrait brut ; EP : extrait purifié ; nd : non déterminé)

Espèce	Germes sensibles	CMI	CMB
<i>A. arenicola</i> (téguments)	<i>Vibrio harveyi</i>	EB : 1,87 mg/ml	nd
		EP : 0,62 mg/ml	nd
<i>A. arenicola</i> (graines)	<i>Streptococcus β hémolytique</i>	EB : 12,5 µg/ml	EB: 100µg/ml
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EB: 50 µg/ml	EB: 800 µg/ml
<i>A. arenicola</i> (feuilles)	<i>Candida albicans</i>	EB: 6,25 µg/ml	EB: 100 µg/ml
		EB : 15,62 mg/ml	nd
<i>A. androyensis</i> (graines)	<i>Escherichia coli</i>	EP: 13,69 mg/ml	nd
<i>A. mahalao</i> (graines)	<i>Escherichia coli</i>	EP : 15 mg/ml	EP : 15 mg/ml
	<i>Staphylococcus aureus</i>	EP : 3,75 mg/ml	EP : 30 mg/ml
	<i>Staphylococcus aureus</i>	nd	nd
	<i>Escherichia coli</i>	nd	nd
<i>A. tulearensis</i> (grains)	<i>Salmonella typhimurium</i>	nd	nd
	<i>Candida sp</i>	nd	nd
<i>Pasteurella multocida</i>			

Première partie : étude chimique

I. INTRODUCTION

Plusieurs plantes malgaches du genre *Albizia* ont déjà fait l'objet d'études approfondies au LABASM (voir synthèse). Cependant, *Albizia divaricata* n'a pas encore fait l'objet d'études approfondies en dehors de l'étude botanique.

Des essais préliminaires ont permis de mettre en évidence la toxicité des graines d'*Albizia divaricata* sur souris. Dans la présente partie de ce mémoire, nous avons :

- mis au point un procédé d'extraction et de purification qui permettrait d'obtenir un extrait toxique hautement purifié à partir des graines ;
- étudié les propriétés physico-chimiques du (ou des) principe(s) toxique(s) ;
- essayé de déterminer sa (ou leur) nature chimique.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. MATERIELS

II.1.1. MATERIEL VEGETAL

II.1.1.1. Classification de la plante

(CRONQUIST, 1981)

La position systématique de la plante est la suivante :

Règne	: PLANTAE
Classe	: MAGNOLIOPSIDA
Ordre	: FABALES
Famille	: FABACEAE
Sous-Famille	: MIMOSOIDEAE
Genre	: <i>Albizia</i>
Espèce	: <i>divaricata</i>

A notre connaissance, aucun nom vernaculaire n'a été attribué à cette plante.

II.1.1.2. Description botanique de la plante

(DU PUY et coll., 2002)

Albizia divaricata est un petit arbre qui peut atteindre 4 m de haut et dont le tronc mesure jusqu'à 30 cm de diamètre. Son écorce est jaune, velue puis grise avec des lenticelles blanchâtres.

Les feuilles disposées principalement sur les brachyblastes, présentent une forme subarrondie, concave et sont portées par un pétiole de 8 à 12 mm de long. Chaque feuille est découpée en 3 paires de folioles, elles-mêmes découpées en 10 à 16 paires de foliolules.

Les fleurs qui apparaissent en décembre sont bisexuées et sessiles. Le pédicelle est de 2 à 5 mm de long, à pubescence jaune-brun foncé ; le calice est de 2 mm de long, de forme obconique et strié, à pubescence jaune-brun. La corolle est de 4 à 5 mm de long, à pubescence brune. Les étamines sont nombreuses, de 15 mm de long, unies à la base par un disque intrastaminal. L'ovaire est de type supère, à stipe de 0,2 mm de long, ellipsoïde, s'amincissant graduellement en un style mince de 15 mm de long.

Les gousses sont épaisses, droites ou tordues, de couleur marron et peuvent atteindre jusqu'à 15 cm de long (Figure n°1). Les graines matures ellipsoïdes à subcylindriques sont de couleur marron (Figure n°2, p.10).



Figure n° 1 : Un rameau d'*Albizia divaricata*



Figure n°2 : Graines d'*Albizia divaricata*

II.1.1.3. Répartition géographique

Albizia divaricata est une espèce endémique de Madagascar. Elle pousse sur le plateau calcaire aux environs de la colline de la Table (Toliara) où elle est assez fréquente (en particulier à la base orientale de la Table, ainsi que le long de la route qui se dirige vers Saint-Augustin) (RANDRIANARIVO et coll., 2003).

II.1.1.4. Origine du matériel végétal

Les graines qui constituent le matériel d'étude ont été fournies par le Silo National des Graines Forestières (SNGF) à Ambatobe, Antananarivo.

II.1.1.5. Préparation et mode de conservation du matériel végétal

Arrivées au laboratoire, les graines entières sont lavées avec une solution aqueuse d'hypochlorite de sodium (eau de javel) 10% pour les désinfecter. Elles sont ensuite rincées à l'eau distillée puis séchées à l'air libre. Les graines sèches sont prébroyées dans un mortier à l'aide d'un pilon, ensuite broyées au moyen d'un mixer ROBOT COUPE (GT 550) pour avoir une poudre très fine. Cette dernière est conservée dans des bocaux bien fermés et placés dans un endroit sec à la température ambiante.

II.1.2. PRODUITS CHIMIQUES

Les produits chimiques ainsi que les solvants utilisés dans les expériences, de marque Merck, Prolabo ou Labosi, sont de qualité pure et pour analyse.

Le support utilisé pour la chromatographie sur couche mince (CCM) est le gel de silice 60F254 (Merck) muni d'un indicateur de fluorescence, étalé sur des feuilles en plastique (plaques prêtes à l'emploi de dimensions 20 x20 cm, épaisseur de la couche : 0,2 mm).

II.2. METHODES

II.2.1. METHODES D'EXTRACTION

(MELEK et coll., 2007 ; MANJARY et coll., 2012)

II.2.1.1. Extraction aqueuse à froid

La poudre végétale est délayée dans l'eau distillée selon le rapport 1/10 (P/V), c'est-à-dire 1 g de poudre pour 10 ml d'eau distillée. Le mélange est homogénéisé par agitation magnétique pendant 3 h à la température ambiante, puis laissé macérer à +4°C durant 12 h.

Le macérat est ensuite filtré sur 4 épaisseurs de gaze après avoir été agité à nouveau pendant 30 min. Le filtrat obtenu est centrifugé à 10 000 tours/min (centrifugeuse Jouan, TH 12) pendant 15 min à la température ambiante. Le culot est écarté et le surnageant est évaporé à sec. Le résidu obtenu constitue l'extrait brut.

II.2.1.2. Extraction par épuisements successifs

La méthode est basée sur l'affinité des molécules présentes dans le matériel végétal vis-à-vis du solvant d'extraction.

Le matériel végétal, sous forme de poudre fine, est soumis à une extraction par épuisements successifs à l'aide de solvants de polarité croissante, à savoir :

- l'hexane, solvant le moins polaire qui permet d'extraire les lipides et d'autres produits apolaires ;
- l'acétate d'éthyle (AcOEt) qui extrait les produits peu polaires comme les cardénolides et les composés phénoliques ou les flavonoïdes ;
- le méthanol, solvant le plus polaire qui sert à extraire les triterpènes, les stéroïdes, les sucres, les tanins, les quinones et les alcaloïdes.

La poudre de graines entières est délayée dans le premier solvant (rapport 1/10, P/V). Le mélange est agité à la température ambiante pendant 3 h à l'aide d'un agitateur magnétique, laissé décanter pendant 1 h, puis filtré sur papier filtre. L'opération est répétée jusqu'à épuisement du matériel, c'est-à-dire jusqu'à ce que l'extrait soit aussi limpide que le solvant de départ. Les filtrats sont alors rassemblés. Le marc est laissé sécher à l'air libre avant de continuer avec le second solvant, et ainsi de suite. Chaque extrait obtenu est évaporé à sec.

II.2.2. METHODES DE PURIFICATION

(KAMOUN, 1987 ; ATHAMENA et coll., 2010)

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

a) Principe

Cette méthode d'extraction liquide-liquide est basée sur le transfert d'un ou de plusieurs constituants d'une première phase liquide (la solution aqueuse) vers une seconde phase liquide extractive (le solvant organique) pour laquelle ils ont plus d'affinité.

b) Mode opératoire

L'extrait aqueux à traiter et l'acétate d'éthyle sont mélangés volume à volume dans une ampoule à décanter. Le mélange est agité énergiquement puis laissé décanter jusqu'à l'obtention de deux phases bien distinctes : la phase supérieure organique et la phase inférieure aqueuse. La phase organique est recueillie. Le volume de la phase aqueuse est mesuré puis celle-ci est soumise à deux autres fractionnements. Les trois phases organiques ainsi obtenues sont rassemblées, débarrassées du solvant par évaporation après ajout d'un grand volume d'eau distillée et concentrées jusqu'au volume initial de l'extrait. La phase aqueuse est débarrassée de l'acétate d'éthyle résiduel par évaporation après ajout d'eau distillée.

II.2.2.2. Fractionnement par le n-butanol

a) Principe

Selon le même principe que précédemment, des substances mises en présence de deux solvants non miscibles et de polarités différentes se séparent en fonction de leur affinité relative vis-à-vis de ces solvants.

b) Mode opératoire

L'extrait à traiter est mélangé volume à volume avec le n-butanol dans une ampoule à décanter. Après une agitation énergique, le mélange est laissé décanter totalement, donnant 2 phases distinctes. La phase organique (phase supérieure) est recueillie et la phase aqueuse (phase inférieure) dont le volume est mesuré, subit encore deux autres fractionnements successifs. Les trois extraits butanoliques obtenus sont rassemblés, additionnés d'un grand volume d'eau distillée et évaporés pour éliminer le solvant organique. La solution est ramenée au volume initial. Le butanol résiduel de la phase aqueuse est également éliminé par évaporation après ajout d'eau distillée.

II.2.3. METHODE D'EVAPORATION

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

II.2.4. CALCUL DU RENDEMENT

A chaque étape d'extraction et de purification, les extraits obtenus sont évaporés à sec et les résidus sont pesés. Le rendement est alors calculé selon la formule suivante :

$$R = \frac{(P_e - P_v)}{M} \times 100$$

avec :

R : rendement en %

P_c : poids du ballon avec le résidu sec (en g)

P_v : poids du ballon vide (en g)

M : poids de la poudre de départ (en g)

A partir de cette formule, trois types de rendement peuvent être calculés :

- le rendement d'extraction pour l'extrait brut par rapport à la poudre de départ ;
- le rendement pour l'extrait purifié par rapport à l'extrait brut, appelé rendement de purification ;
- le rendement pour l'extrait purifié par rapport à la poudre de départ, appelé rendement en toxines.

II.2.5. METHODES D'ANALYSE

II.2.5.1. Chromatographie sur couche mince

(RANDERATH, 1964 ; KAMOUN, 1991)

a) Principe

La chromatographie sur couche mince est une technique d'analyse mettant en jeu :

- une phase stationnaire qui est un support sur lequel les substances à séparer migrent suivant une direction déterminée ;
- une phase liquide mobile qui est un solvant ou un mélange de solvants entraînant les composés à séparer le long de la phase stationnaire.

La vitesse de déplacement des substances dépend de leur affinité pour la phase mobile organique d'une part et des forces d'adsorption dues au support d'autre part.

b) Mode opératoire

➤ Dépôt des échantillons :

Sur une plaque de gel de silice prête à l'emploi (voir § II.1.2, p 10) découpée aux dimensions voulues, les extraits à analyser sont déposés à l'aide d'un capillaire à 1,5 cm du bord inférieur de la plaque et à 1,3 cm à partir des bords latéraux. Les dépôts se présentent en tirets de 7mm de large espacés de 6 mm. Ils sont immédiatement séchés au moyen d'un séchoir à main.

➤ Développement de la plaque :

La plaque ci-dessus est placée dans une cuve à chromatographie (Desaga) préalablement saturée par les vapeurs de solvant de migration grâce à l'application de papier filtre imprégné du solvant sur ses parois internes. Le solvant de migration utilisé est le système Butanol/Acide acétique /Eau (BAE, 60/20/20, P/P/P).

Le solvant migre par capillarité vers le haut de la plaque (chromatographie ascendante) et lorsque son front se trouve à 0,5 cm du bord supérieur, la chromatographie est arrêtée. La plaque est ensuite retirée de la cuve puis séchée à l'aide d'un séchoir à main.

➤ Révélation du chromatogramme :

La révélation se fait :

- soit par visualisation des substances ayant migré sous lumière ultraviolette à 254 nm et à 366 nm. Les constituants apparaissent sous forme de taches violettes fluorescentes ;
- soit par pulvérisation du réactif à la vanilline sulfurique sur la plaque. Les constituants apparaissent sous forme de taches rose-violacé qui deviennent noires après chauffage à 120°C pendant 5 min.

La composition du réactif à la vanilline sulfurique est donnée en Annexe I.

II.2.5.2. Criblage phytochimique

(HEMINGWAY et KARCHESY, 1989; SAYYAH et coll., 2011; MAMYRBEKOVA-BEKRO et coll., 2012)

Le criblage ou screening phytochimique est l'ensemble de tests physico-chimiques qui ont pour but de mettre en évidence les grandes familles chimiques présentes dans un matériel végétal. Il est effectué sur la poudre végétale ou sur le résidu d'évaporation à sec de l'extrait à analyser.

a) Préparation des extraits à tester

Quatre extraits sont préparés : les extraits aqueux, acide, hydroéthanolique 80% et chloroformique. 2 g de poudre végétale ou de résidu d'évaporation à sec d'extrait à analyser sont mis en suspension dans 20 ml de solvant puis le tout est laissé macérer à +4°C durant une nuit. Le macérat est ensuite filtré sur du coton hydrophile. Le filtrat constitue l'extrait à analyser.

b) Les différents tests de criblage phytochimique

b.1. Les alcaloïdes

La détection des alcaloïdes est basée sur leur capacité à se combiner à des métaux lourds. L'extrait aqueux préparé précédemment est réparti dans 4 tubes à essai à raison de 1 ml par tube. Le premier sert de témoin et les trois autres sont utilisés pour les tests suivants :

➤ Test de MAYER

L'extrait à analyser est additionné de 5 gouttes de réactif de MAYER dans le tube 2. L'apparition d'une floculation ou d'un précipité indique la présence d'alcaloïdes.

➤ Test de WAGNER

Si l'addition de 5 gouttes de réactif de WAGNER dans le tube 3 fait apparaître une floculation ou un précipité, des alcaloïdes s'y trouvent.

➤ Test de DRAGENDORFF

L'apparition d'un précipité ou d'une floculation dans le tube 4 après ajout de 5 gouttes de réactif de DRAGENDORFF indique la présence d'alcaloïdes dans l'extrait.

Si les tests sont positifs, il est nécessaire d'effectuer un test de confirmation qui consiste à reprendre le précipité obtenu dans 0,5 ml d'éthanol 80%. Si le précipité est redissout, des alcaloïdes sont bel et bien présents.

La composition des réactifs utilisés dans la détection des alcaloïdes est donnée en Annexe II.

b.2. Les saponosides (Indice de mousse)

La détection des saponines est basée sur leur capacité à mousser en solution. Pour cela, 5ml d'extrait aqueux sont versés dans un tube à essai. La solution est agitée vigoureusement pendant 30 s. L'apparition d'une mousse de 3 cm de hauteur, persistant pendant 30 min, traduit la présence de saponines dans l'extrait.

b.3. Les tanins et polyphénols

Pour détecter les tanins et les polyphénols, l'extrait à analyser est réparti dans 4 tubes à essai ; à raison de 1 ml par tube. Le premier tube sert de témoin.

➤ Test à la gélatine

Dans le tube 2, cinq gouttes de gélatine à 1% (P/V) sont ajoutées. La formation de précipité traduit la présence de polyphénols.

➤ Test à la gélatine salée

Dans le tube 3, cinq gouttes de gélatine salée 10% sont ajoutées. Si un précipité se forme, l'extrait contient des tanins.

➤ Test au chlorure ferrique

Dans le tube 4, cinq gouttes de chlorure ferrique 10% en solution méthanolique sont ajoutées.

Un virage de la coloration au bleu-vert traduit la présence de tanins condensés (catéchiques ou flavonols-3 condensés et leucoanthocyanes ou flavanediols-3,4).

Un virage de la coloration au noir-bleuâtre traduit la présence tanins hydrolysables (gallique ou ellagique).

Une réaction négative à la gélatine salée accompagnée de l'apparition d'une coloration verte ou bleu-noir avec FeCl_3 signifie que d'autres types de composés phénoliques sont présents.

b.4. Les anthraquinones (test de BORNTRAGER)

Pour détecter les anthraquinones, 5 ml d'extrait aqueux sont mélangés à 5 ml de benzène. Le mélange est agité énergiquement dans une ampoule à décanter. Deux phases apparaissent après décantation. La phase benzénique supérieure est recueillie dans un tube à essai, puis additionnée de 1 ml d'ammoniaque 25%. Le mélange est agité énergiquement puis laissé au repos. L'apparition d'une couleur rouge dans la phase inférieure alcaline traduit la présence d'anthraquinones dans l'extrait à tester.

b.5. Les désoxyoses (test de KELLER-KILIANI)

Dans un tube à essai, l'extrait aqueux est dissous dans une solution de FeCl_3 10% additionnée de 4 ml d'acide acétique glacial (18N). Après une légère agitation, le mélange est additionné de 0,5 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) 36N. L'apparition d'un anneau pourpre à l'interface indique la présence de désoxyoses.

b.6. Les iridoïdes

Pour détecter les iridoïdes, 1 ml d'extrait aqueux est additionné de 5 gouttes de HCl 12N. Le mélange est porté au bain-marie bouillant pendant 30 min. Après refroidissement, l'apparition d'un précipité vert foncé ou bleu foncé indique la présence d'iridoïdes.

b.7. Les flavonoïdes et les leucoanthocyanes

L'extrait hydroéthanolique est utilisé pour détecter les flavonoïdes et les leucoanthocyanes. Pour cela, 1 ml de la solution est versé dans chacun des 4 tubes destinés au test. Le premier tube sert de témoin.

➤ Les flavonoïdes (Test de WILLSTÄTTER)

Dans le tube 2, quatre gouttes de HCl 12N et quelques tournures de magnésium sont ajoutées. Un virage de la coloration au rouge traduit la présence de flavonones, pourpre celle des flavonols ou rouge violacé celle des flavonones ou flavonols.

Dans le tube 3, quelques gouttes de HCl 12N, quelques tournures de magnésium, 0,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'alcool isoamylique sont ajoutés. Après 10 min de réaction, deux phases se séparent. Si la phase supérieure se colore en rouge, elle contient des flavones et en pourpre, elle contient des flavonols. La phase inférieure reste incolore.

➤ Les leucoanthocyanes (test de BATE-SMITH)

Dans le tube 4, 0,5 ml de HCl 12N est ajouté. La solution est portée au bain-marie à 100° C pendant 30 min. Après refroidissement, un virage de coloration au rouge vif traduit la présence de leucoanthocyanes.

b.8. Les stéroïdes et les terpénoïdes

L'extrait chloroformique est distribué dans 4 tubes à essai à raison de 1 ml par tube. Le premier sert de témoin.

➤ Test de LIEBERMANN-BURCHARD

Quatre gouttes d'anhydride acétique et 4 gouttes de H₂SO₄ (36N) sont ajoutées dans le tube 2.

L'observation se fait après 1 h :

- si la phase supérieure se colore en vert, des stéroïdes sont présents ;
- si un anneau rouge violacé apparaît entre les deux phases, l'extrait contient des triterpènes.

➤ Test de SALKOWSKI

Du H₂SO₄ 36N (1 ml) est ajouté dans le tube 3 tout en l'inclinant à 45°. La formation d'un anneau de séparation rouge indique la présence de stérols insaturés.

III. RESULTATS

Des informations concernant les principes actifs de la plante ont été tirées lors d'expériences préliminaires, comme leur résistance au chauffage ainsi qu'aux opérations de congélation et décongélation répétées. Par conséquent, toutes les manipulations ont été effectuées à la température ambiante. Les extraits étaient conservés à – 20°C.

III.1. EXTRACTION

Deux types d'extraction ont été réalisés :

- une extraction aqueuse à froid en utilisant 5 g de poudre végétale (voir méthode au § II.2.1.1 ; p. 11). L'extrait brut issu de cette méthode est appelé EB1.
- une extraction par épuisements successifs en utilisant 50 g de poudre végétale (voir méthode au § II.2.1.1.2, p. 11. .) par l'hexane, l'acétate d'éthyle et le méthanol donnant 3 extraits différents : l'extrait hexanique (EH), l'extrait acétate d'éthyle (EAcOeT) et l'extrait méthanolique (EB2).

Pour chaque extraction, le rendement est déterminé selon la méthode décrite en § II.2.4 (p.13) et les extraits obtenus sont testés sur souris. Les extraits EH et EAcOeT n'ont pas été testés vu leur consistance huileuse les rendant insolubles dans l'eau.

Les caractéristiques de ces 4 extraits sont résumées dans le Tableau n°5.

Ces résultats montrent que les extraits brut méthanolique et aqueux à froid sont toxiques sur souris. Cependant, l'extrait brut méthanolique (EB2) a été choisi pour la suite des expériences car il est le plus toxique. En outre, les épuisements successifs l'ont déjà clarifié.

Tableau n°5: Caractéristiques des extraits bruts obtenus lors de l'extraction

Méthode d'extraction	Epuisements successifs			Aqueuse à froid
	hexane	acétate d'éthyle	méthanol	
Solvant	hexane	acétate d'éthyle	méthanol	eau distillée
Extrait brut	hexanique	acétate d'éthyle	méthanolique = EB2	aqueux à froid = EB1
Couleur	jaune	jaune	jaune clair	jaune
Aspect	huileux limpide	huileux trouble	limpide	limpide
Poids du résidu d'évaporation à sec (mg)	1600	755	5825	1088
Rendement	3,2%	1,51%	11,65%	21,76%
Concentration au rapport 1/1 (p/v) en mg/ml	nd	nd	116	217,6
Toxicité	nd	nd	toxique	toxique
Temps de survie de souris	nd	nd	30 min	1h 30 min

nd : non déterminé

III.2. PURIFICATION

La purification est bioguidée par des tests de toxicité sur souris et l'homogénéité est appréciée par CCM. A partir de l'extrait méthanolique (EB2) deux techniques de purification basées sur la différence de solubilité ont été appliquées successivement :

- le fractionnement par l'acétate d'éthyle ;
- le fractionnement par le n-butanol.

III.2.1. FRACTIONNEMENT PAR L'ACETATE D'ETHYLE

L'extrait méthanolique EB2 de volume 20 ml, a été soumis à un fractionnement par l'acétate d'éthyle selon la méthode décrite au § II.2.2.1. (p.12).

Les deux phases obtenues présentent des caractéristiques différentes. D'une part, la phase organique appelée E1 de couleur vert clair, limpide est toxique pour les souris à la dose de 18 mg/kg (temps de survie 12 h). D'autre part, la phase aqueuse de couleur jaunâtre est non toxique à la même dose. Par conséquent, la phase organique appelé E1 a été choisie pour la suite de la purification.

III.2.2. FRACTIONNEMENT PAR LE n-BUTANOL

Le résidu d'évaporation à sec de l'extrait E1 pesant 30 mg a été remis en suspension dans 30 ml d'eau distillée. La solution a ensuite été fractionnée par le n-butanol (voir. § II.2.2.2. p. 12). Deux phases bien distinctes ont été obtenues :

- Une phase organique ou butanolique supérieure limpide, de couleur jaune procurant un résidu d'évaporation à sec qui pèse 15 mg. Une dose de 18 mg/kg de cette phase est mortelle pour les souris.
- Une phase aqueuse inférieure limpide, de couleur marron donnant un résidu sec qui pèse après évaporation 5 mg. A la même dose que précédemment, cette phase est non toxique.

Le diagramme de la Figure n°3 illustre les différentes étapes de l'extraction et de la purification à partir de 50 g de poudre de graines entières d'*Albizia divaricata*.

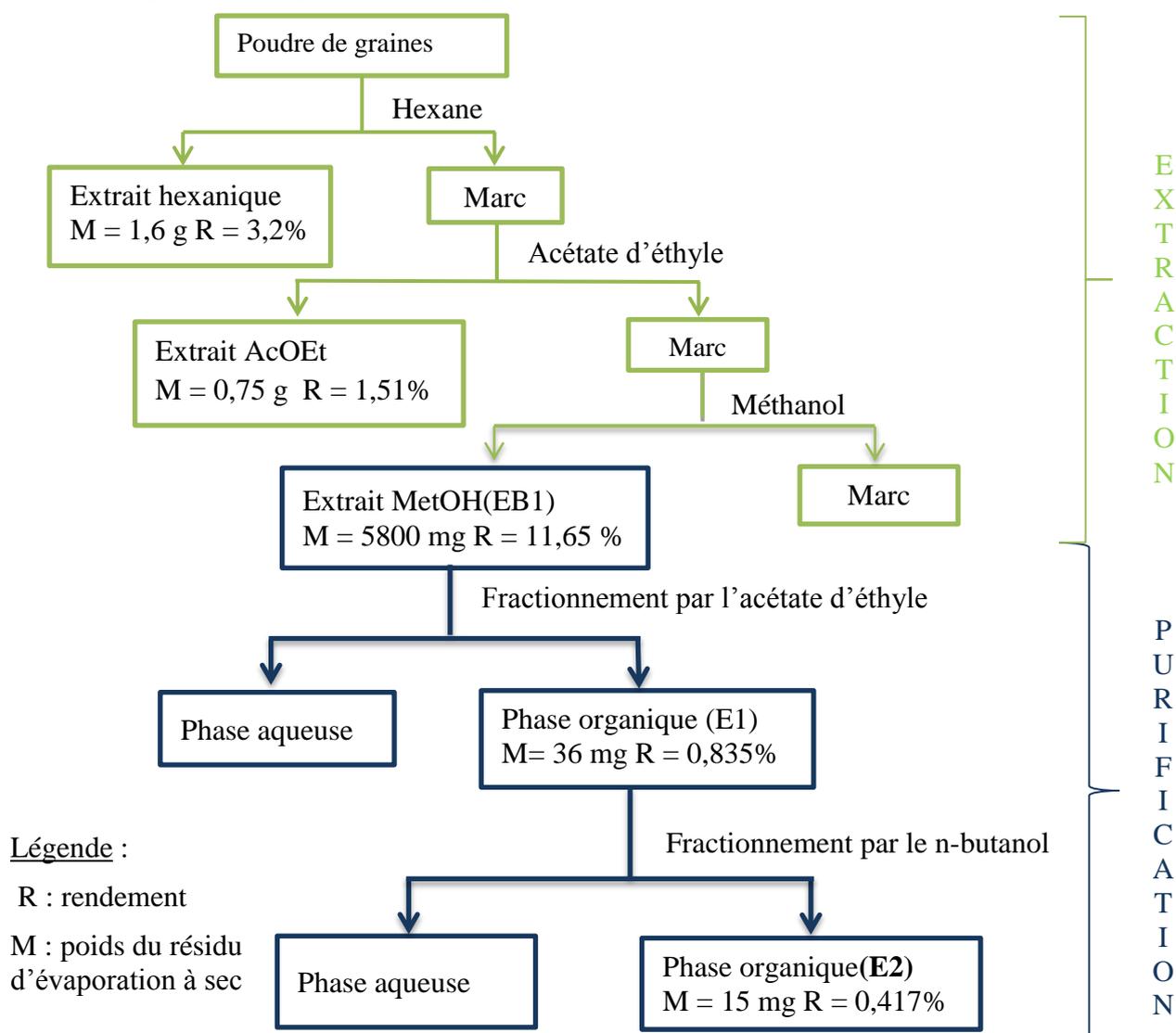


Figure n°3 : Extraction et purification des principes actifs à partir de la poudre de graines entières d'*Albizia divaricata*

III.3. RENDEMENTS

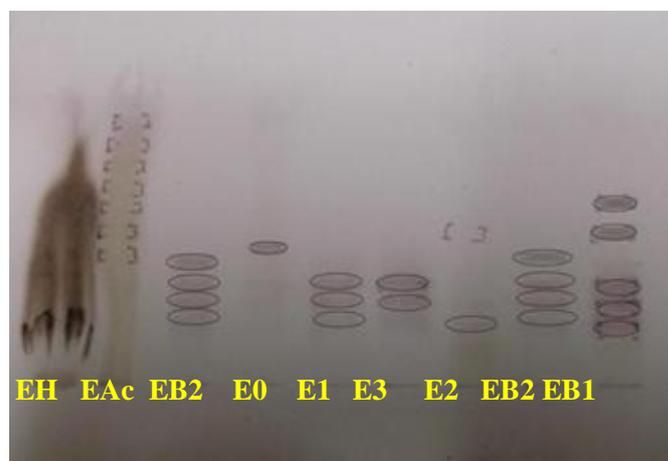
Le rendement est déterminé après l'extraction et à chaque étape de la purification. Les rendements des différents extraits calculés d'après la méthode donnée au § II 2.4 (p 13) sont présentés dans le Tableau n°6 suivant.

Tableau n°6 : Rendements aux différentes étapes de purification

Poids du résidu d'évaporation à sec de chaque extrait	Rendement de purification par rapport à EB2 (5800 mg)	Rendement en toxines par rapport à la poudre de départ (50 000 mg)
E1 = 36 mg	7,2%	0,835%
E2 = 15 mg	3,6%	0,417%

III.4. ANALYSE DES EXTRAITS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

L'évolution de l'homogénéité des différents extraits obtenus au cours de la purification a été suivie par CCM selon la méthode décrite au § II.2.5.1. (p. 13 ; 14). Le solvant utilisé est le système (B/A/E 60/20/20 ; P/P/P). Le chromatogramme est observé sous lumière ultraviolette de longueurs d'onde $\lambda = 254$ nm et $\lambda = 366$ nm, puis révélé à l'aide du réactif à la vanilline sulfurique. Le résultat est représenté sur la Figure n°4 suivante.



EH : extrait hexanique ; **EA** : extrait acétate d'éthyle ; **EB2** : extrait méthanolique ; **E0** : phase aqueuse acétate d'éthyle ; **E1** : phase organique acétate d'éthyle ; **E3** : phase aqueuse n-butanol ; **E2** : phase organique n-butanol e ; **EB1** : extrait aqueux

Figure n°4: Chromatogramme des différents extraits obtenus au cours de l'extraction et de la purification des principes toxiques des graines entières d'*Albizia divaricata* (système B/A/E 60/20/20, P/P/P ; révélation au réactif à la vanilline sulfurique)

D'après ces résultats, l'extrait EB2 comporte quatre bandes majeures alors que l'extrait E2 n'en présente qu'une. La purification a donc permis d'éliminer trois bandes majeures.

III.5. CARACTERISATION CHIMIQUE

III.5.1. NATURE CHIMIQUE

La nature chimique du (ou des) principe(s) toxique(s) a été cernée par criblage phytochimique de la poudre de graines et de l'extrait brut EB2 selon la méthode décrite au § II.2.5.2. (p. 14 -17).

Les résultats sont présentés dans le Tableau 7 suivant.

Tableau n°7: Résultats du criblage phytochimique de la poudre végétale et de l'extrait brut EB2

Famille chimique	Test	Résultats	
		Poudre de graines	EB2
Alcaloïdes	MAYER	+	-
	WAGNER	+	-
	DRAGENDORFF	+	-
Flavonoïdes	WILSTÄTTER	-	-
Leucoanthocyanes	BATE-SMITH	+	-
Tanins	Gélatine 1%	-	-
	Gélatine salée	-	-
Polyphénols	Chlorure ferrique	-	-
Stéroïdes, triterpènes	LIEBERMANN-BURCHARD	+	+
Stérols insaturés	SALKOWSKI	-	-
Désoxyoses	KELLER-KILIANI	+	-
Iridoïdes	HCl concentré à chaud	-	-
Saponosides	Test de mousse	+	+
Quinones	BORNTRAGER	-	-

(-) : Test négatif (+) : Test positif

Le criblage phytochimique montre que la poudre végétale renferme des alcaloïdes, des leucoanthocyanes, des stéroïdes, des désoxyoses et des saponosides tandis que l'extrait brut EB 2 ne réagit positivement qu'aux tests des saponosides et des stéroïdes et triterpènes. Les autres composés ont donc été éliminés au cours des épuisements successifs.

III.5.2. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

L'application de diverses techniques d'extraction et de purification a permis de déterminer certaines propriétés physico-chimiques du (ou des) principe(s) toxique(s) des graines d'*A. divaricata*.

Ainsi :

- les résidus obtenus après évaporation à sec des différents extraits (EB2, E1, E2 E3) se présentent comme une poudre fine ;
- ils ont un goût amer ;
- ils sont solubles dans l'eau, le méthanol; l'acétate d'éthyle et le n-butanol ;
- ils sont insolubles dans le chloroforme;
- les principes actifs résistent à des températures élevées (jusqu'à 50°C) ;
- leur toxicité n'est pas affectée par les opérations de congélation et de décongélation répétées.

IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'étude chimique a permis de mettre en évidence la toxicité de graines d'*A. divaricata*. Les principes toxiques ont pu être extraits à froid avec de l'eau distillée et par épuisements successifs, avec des rendements respectifs de 21,76% et de 11,65%. Vu que l'extrait brut méthanolique EB2 est trois fois plus toxique, il a été choisi pour la purification des principes toxiques.

A partir de l'EB2, un procédé de purification comprenant un fractionnement par l'AcOEt et un fractionnement par le n-butanol a permis d'obtenir un extrait purifié E2 toxique sur souris. Le degré de purification de E2 est élevé (1 bande majeure en CCM) compte tenu de l'efficacité de l'extraction par épuisements successifs, donnant un extrait brut très clarifié.

Le rendement en toxines est de 0,417%. La comparaison avec les résultats obtenus avec les autres *Albizia* montre que le rendement de purification varie d'une espèce à une autre (voir Tableau n°8, p. 24). Ce rendement est plus élevé que celui des graines d'*A. androyensis* qui est de 0,14% (RASOLOFOMANANA, 2015) et d'*A. greveana* qui est de 0,21% (RAHELIARISATA, 2014), mais largement inférieur à celui de graines d'*A. aurisparsa* qui est de 1,22% (RANDRIAMIARINJO, 2014). Il est alors nécessaire de mettre au point un autre protocole de purification qui permettrait d'éviter trop de perte en toxines.

A l'issue du fractionnement par le n-butanol, 2 extraits ont été obtenus : la phase organique E2 qui est toxique pour les souris à une dose 18 mg/kg et la phase aqueuse E3 qui ne provoque pas d'effets nocifs chez les souris avec cette même dose. Les principes actifs ont donc une plus grande affinité pour les solvants organiques que pour l'eau distillée.

Les principes actifs des graines d'*A. divaricata* sont solubles dans l'eau et dans les solvants organiques ; ils sont thermostables et résistent au phénomène de congélation et décongélation. On peut déduire de cette dernière propriété que les principes actifs pourraient avoir un faible poids

moléculaire. D'après le criblage phytochimique, les principes pourraient être des saponosides à génine stéroïdique ou triterpénique. Cette structure est très répandue chez les *Albizia*. A titre d'exemple, les principes toxiques de graines d'*A. bovini* ont la même nature chimique (RAHERINIAINA 1998).

Tableau n°8: Rendements de purification des extraits de graines de quelques espèces d'*Albizia* malgaches

Espèce	Rendement de purification	Rendement en toxines	Références
<i>Albizia androyensis</i>	0,69%	0,14%	RASOLOFOMANANA (2015)
<i>Albizia greveana</i>	0,88%	0,21%	RAHELIARISATA (2014)
<i>Albizia divaricata</i>	3,6%	0,417%	Auteur
<i>Albizia mahalao</i>	0,87%	0,58%	RAKOTOARIVONY (2012)
<i>Albizia arenicola</i>	28,68%	1,004%	RAKOTOMALALA (2012)
<i>Albizia tulearensis</i>	13,3%	nd	RAONIHARISOA (2003)
<i>Albizia aurisparsa</i>	7,93%	1,22%	RANDRIAMIARINJO (2014)

nd : non déterminé

Deuxième partie : étude toxicologique

I.INTRODUCTION

L'étude chimique a permis de mettre en évidence des principes toxiques dont les propriétés physico-chimiques et la nature chimique ont pu être cernées. Dans cette deuxième partie, les travaux se sont poursuivis par la recherche des propriétés toxicologiques de ces principes actifs sur divers organismes animaux, végétaux et microbiens. Pour cela, nous avons étudié les effets sur:

- ❖ les animaux à sang chaud : les souris et les poussins ;
- ❖ les animaux à sang froid : les alevins des poissons et les têtards de grenouille ;
- ❖ le pouvoir germinatif des graines, la croissance des jeunes plantules ainsi que celle des bourgeons axillaires ;
- ❖ la croissance des microorganismes.

Il est à noter que l'extrait brut méthanolique EB2 disponible en grande quantité a été utilisé pour les expériences nécessitant une quantité importante d'extrait. Par contre, l'extrait brut hexanique, l'extrait brut acétate d'éthyle et l'extrait purifié EP2 ont été utilisés seulement pour les tests sur les microorganismes.

II MATERIELS ET METHODES

II.1.MATERIELS

II.1.1. LES ANIMAUX D'EXPERIMENTATION

II.1.1.1.Les souris

Nous avons utilisé des souris blanches mâles de souche TANA-SWISS stabilisée depuis plusieurs années à l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) et pesant 25 ± 2 g. Ces souris ont été fournies par l'IPM.

II.1.1.2.Les poussins de *Gallus gallus*

Des poussins âgés d'un jour fournis par AVITECH sise à Sabotsy Namehana, Antananarivo ont été utilisés.

II.1.1.3. Les têtards de grenouille

Les têtards de grenouille (*Ptychadena mascareniensis*) au stade sans pattes, utilisés pour les tests, ont été capturés dans les rizières sises aux alentours du campus d'Ambohitsaina (Université d'Antananarivo).

II.1.1.4. Les alevins de poisson

Les alevins du poisson *Cyprinus carpio* âgés de 2 mois, ont été achetés auprès d'un pisciculteur privé situé à Ambohimangakely. Avant les tests, ces alevins sont placés au moins une semaine dans un aquarium aéré, pour les adapter à leur nouvel habitat.

II.1.2. LES PLANTES D'EXPERIMENTATION

Des graines de plantes Monocotylédones et Dicotylédones appartenant à différentes famille sont été utilisées. Ces plantes sont présentées dans le Tableau n°9.

Tableau n°9 : Les végétaux d'expérimentation

Classe	Famille	Nom usuel	Nom scientifique
DICOTYLEDONES	APIACEAE	Carotte	<i>Daucus carotta</i>
	BRASSICACEAE	Brède	<i>Brassica sp.</i>
	SOLANACEAE	Tomate	<i>Lycopersicum esculentum</i>
	CUCURBITACEAE	Concombre	<i>Cucumis sp.</i>
	FABACEAE	Haricot rouge	<i>Phaseolus vulgaris</i>
		Haricot blanc	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Petits pois		<i>Pisum sativum</i>	
MONOCOTYLEDONES	LILIACEAE	Oignon	<i>Allium cepa</i>
	POACEAE	Maïs	<i>Zea mays</i>
		Riz	<i>Oryza sativa</i>
		Ahidratsy	<i>Eragrostis pilosa</i>

II.1.3. LES MATERIELS UTILISES EN MICROBIOLOGIE

II.1.3.1. Les microorganismes utilisés

Quatre souches de bactéries Gram +, trois souches de bactéries Gram - et une souche de levure ont été utilisées. Ces germes étaient disponibles au laboratoire de Microbiologie de département de Biochimie fondamentale et appliquée. Ils sont présentés dans le Tableau n°10 (p.27) avec leurs caractéristiques ainsi que leurs références.

Tableau n°10: Les microorganismes-tests
(SNEATH et coll., 1987)

Genre	Gram	Forme	Nom scientifique	Pathogénicité	Référence
Bactéries	+	Bacille	<i>Bacillus cereus</i>	Septicémie, abcès du poumon, infection de la peau, etc.	ATCC 13061
			<i>Bacillus megaterium</i>	Non pathogène	LMG 7127
		Coque	<i>Staphylococcus aureus</i>	Furoncles, pneumonie, méningite, infections urogénitales	LMG7127
	-	Bacille	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infections cutanées, septicémies, endocardites, infection nosocomiales	LMG1242
			<i>Salmonella enterica</i>	Diarrhées, vomissements, fièvre	ATCC14028
			<i>Escherichia coli</i>	Gastro-entérites, diarrhées	CCM 4516
Levure	+	Sporulé e	<i>Candida albicans</i>	Candidose	

ATCC : American Type Culture Collection

LMG : Laboratoriumvoor Microbiologie Universiteit Gent Belgium

II.1.3.2. Le milieu de culture

(BOURDON et coll., 1991)

Les milieux utilisés, de qualité pour analyse, sont :

- ❖ Le milieu de MUELLER-HINTON, un milieu solide de marque Biorad. Il est utilisé pour la culture des souches et l'étude de la sensibilité aux agents antimicrobiens ;
- ❖ le milieu solide de Sabouraud pour la culture de la levure *Candida albicans* ;
- ❖ Le milieu NutrientBroth de marque Liofilchem, un milieu de culture liquide utilisé lors de la détermination de la concentration minimale d'inhibitrice (CMI).

La composition de ces milieux est donnée en Annexe III.

II.1.3.3. Les disques pour les tests d'antibiogramme

Des disques de papier stériles de 6 mm de diamètre fournis par Biomérieux ont été utilisés pour tester l'activité des extraits vis-à-vis des microorganismes.

II.2.METHODES

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

II.2.1.1. Test de toxicité aiguë sur souris

a) Par voie intrapéritonéale

Pour évaluer la toxicité aiguë sur souris, l'extrait à tester est administré par voie intrapéritonéale (IP) sous un volume de 0,3ml par 25g de souris. Pour chaque test, un lot de 3 souris de même poids ($25 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$) et de même sexe est utilisé. Un autre lot de trois souris ayant les mêmes caractéristiques sert de témoin. Les souris de ce dernier lot reçoivent chacune 0,3 ml de sérum physiologique.

Les observations durent 24h.

b) Par voie orale

Les extraits liquides sont administrés directement dans l'estomac des souris à l'aide d'une aiguille à bout arrondi, spéciale pour gavage, à raison de 0,25 ml d'extrait pour 25 g de masse corporelle. Comme pour le test de toxicité aiguë par voie IP, un lot de 3 souris est utilisé et un autre lot de 3 souris ayant les mêmes caractéristiques sert de témoin.

Les observations durent 24h.

II.2.1.2.Détermination de la DL 50 (24h)

La DL50 (24h) par voie IP est la dose qui tue 50 % des animaux testés en 24 h.

Pour la déterminer, 8 doses en progression géométrique de raison r de l'extrait à étudier sont injectées à huit lots de cinq souris de même sexe et de poids $25 \pm 2 \text{ g}$. Ces doses se situent entre la plus faible dose entraînant la mort de 100% des animaux testés (DL 100) et la dose la plus élevée provoquant 0% de mortalité (DL 0). L'extrait à tester est administré par voie IP à raison de 0,3 ml pour 25 g de masse corporelle. Les souris sont laissées à jeun 24 h avant le test.

Les deux méthodes de calcul suivantes ont été utilisées :

- ❖ la méthode de REED et MUENCH (1938) ;
- ❖ la méthode de régression linéaire de BOYD (1966).

D'après la première méthode, la DL 50 est calculée de deux façons :

- ❖ Soit par la formule suivante :

$$\log DL50 = \log B + \frac{(0,5-N)}{(M-N)} \log r$$

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 la progression géométrique

❖ Soit par la méthode graphique qui consiste à projeter le point d'intersection de la courbe des totaux cumulatifs des survivants et celle des morts, en fonction des doses injectées.

La deuxième méthode de détermination est basée sur l'équation de la droite de régression suivante :

$$Y = A + B X$$

avec :

Y : pourcentage de mortalité

A : constante

B : coefficient de régression

X : logarithme décimal de la concentration (log C)

II.2.1.3. Test de toxicité aiguë sur les poussins

a) Par voie intrapéritonéale

L'extrait à tester est injecté par voie IP chez les poussins, à raison de 0,3 ml par 25 g de masse corporelle. Deux lots de 3 poussins ont été utilisés, le premier lot servant de témoin.

Les observations durent 24 h.

b) Par voie orale

L'extrait à tester en solution aqueuse est administré directement dans le gésier des poussins au moyen d'une aiguille à bout arrondi, spéciale pour gavage, à raison de 0,3 ml par poussin de 25g. Deux lots de 3 poussins ont été utilisés, le premier lot servant de témoin.

Les observations durent 24 h.

II.2.1.4. Test sur les animaux aquatiques

a) Principe

La méthode consiste à tester la résistance d'animaux aquatiques vis-à-vis de l'extrait à étudier, ajouté dans leur milieu.

b) Mode opératoire

Différentes concentrations en progression géométrique de raison r de l'extrait à tester sont préparés dans des cristallisoirs (volume final = 200 ml)

Ensuite des lots de 5 animaux aquatiques (alevins de poisson ou têtards de grenouille) sont transférés dans chaque milieu ainsi préparé. Un lot de 5 animaux aquatiques servant de témoin est placé dans 200 ml d'eau de pluie. L'expérience dure 24 h.

c) Détermination de la concentration létale 50% (CL50 24 h)

La CL 50 (24 h) ou la concentration qui tue 50% des animaux testés pendant 24 h est déterminée par la méthode de régression linéaire de la relation :

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

où :

C: concentration en mg/ml

L'équation de la droite de régression linéaire est de la forme :

$$Y = A + BX$$

avec :

Y: pourcentage de mortalité

A: constante

B: coefficient de régression

X: logarithme décimal de la concentration (log C)

II.2.2. METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES VEGETAUX (RAKOTO et coll., 2012)

Les graines utilisées pour cette étude sont tout d'abord désinfectées par trempage dans l'eau de javel 10% pendant 15 min, puis rincées avec de l'eau de robinet.

Les effets sur les végétaux sont déterminés par le biais d'expériences sur :

- le pouvoir germinatif des graines ;

- la croissance des jeunes plantules ;
- le développement des bourgeons axillaires.

II.2.2.1. Test sur le pouvoir germinatif des graines

a) Trempage

Pour chaque espèce étudiée (voir § II.1.2, Tableau n°9, p. 26), deux lots de 10 graines sont trempés dans l'eau de robinet pendant 48 h à l'obscurité à la température ambiante.

b) Germination

Après le trempage, pour chaque type de graine, le premier lot de graines qui sert de témoin est mis à germer dans une assiette tapissée de coton imbibé d'eau de robinet, puis arrosé avec de l'eau distillée. Le second lot est mis à germer en présence de l'extrait à tester de concentration connue et arrosé avec cette même solution.

Après incubation pendant 72 h à l'abri de la lumière, les graines ayant germé sont dénombrées.

II.2.2.2. Test sur la croissance des jeunes plantules

Deux espèces représentant les Monocotylédones (maïs et riz) et deux autres les Dicotylédones (petit pois et haricot blanc), servent de matériels d'étude.

a) Principe

La méthode est basée sur l'observation des effets de l'extrait à tester à différentes concentrations sur la croissance des jeunes plantules par la mesure périodique de la longueur de leurs hypocotyles et leur épicotyles. Les valeurs obtenues sont comparées à celles mesurées sur des graines des plantes mises à germer en absence d'extrait (témoin négatif) et des graines mises à germer en présence de glyphosate (herbicide utilisé comme témoin positif).

b) Mode opératoire

b-1. Trempage

Les graines des plantes-tests sont trempées dans l'eau de robinet, puis placées à l'obscurité pendant 48 h à la température ambiante.

b-2. Croissance

Après 48 h de trempage, les graines sont réparties en 7 lots:

- cinq lots de 10 graines mises à germer sur du coton imbibé d'extraits à différentes concentrations. Les jeunes plantules sont arrosées toutes les 48 h avec le même extrait ;

- un lot de 10 graines mises à germer sur du coton imbibé d'eau de robinet et arrosées avec celle-ci toutes les 48 h ;
- un autre lot de 10 graines mises à germer sur du coton imbibé de glyphosate.

La longueur des hypocotyles et des épicotyles est mesurée tous les deux jours pendant 2 semaines.

Les données ainsi obtenues ont été soumises à des analyses statistiques ANOVA à l'aide du logiciel STATITCF (MS-DOS version 6.21), suivi du test de Newman-Keuls à 5% d'intervalle de confiance. Deux facteurs ont été testés séparément: le nombre de jours d'expérience et la concentration des extraits.

II.2.2.3. Test sur le développement des bourgeons axillaires

Des jeunes plantules de petit pois (*Pisum sativum*), âgées de 10 jours constituent les végétaux d'expérimentation.

Cette étude a pour but de comparer les effets des extraits à tester avec ceux de deux hormones végétales, l'auxine, une hormone capable d'inhiber la croissance des bourgeons axillaires, et la gibbérelline, une hormone stimulant cette croissance.

L'expérience est effectuée sur 4 lots de 10 jeunes plantules préalablement décapitées au niveau de la tige, juste au-dessus du premier bourgeon dont :

- le premier lot servant de témoin positif reçoit 50 µg de gibbérelline ;
- le second lot servant de témoin négatif reçoit 50 µg d'auxine ;
- le troisième lot reçoit 50 µg d'extrait à tester ;
- le quatrième lot reçoit une goutte d'eau distillée (témoin neutre).

La substance à analyser est mélangée avec de la lanoline qui sert de fixateur. Le mélange obtenu est appliqué sur la partie sectionnée des plantules, à raison de 1 µl par application.

La longueur des bourgeons axillaires est mesurée tous les 2 jours pendant deux semaines.

II.2.3. METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LA CROISSANCE DES MICROORGANISMES

II.2.3.1. Stérilisation

(CAMILLE et coll. 2007)

Avant les tests, tous les matériels utilisés sont stérilisés. Les milieux de culture, les cônes de micropipettes (Pipetman) ainsi que la verrerie (boîtes de Petri, tubes à vis) sont stérilisés à l'autoclave (Webeco Stericlave) à 121°C sous une pression de 2 bars pendant 20 min. La verrerie ainsi stérilisée et les pinces sont ensuite séchées à l'étuve (Thermosi SR-1000) à 120°C pendant 30min. Quant aux extraits à tester, ils sont stérilisés par filtration sur filtres Millipore de marque Polylabo (filtres à seringue stériles de 25 mm de diamètre) dont les pores ont 0,22 µm de diamètre. Les mains et la paillasse doivent être nettoyées avec de l'alcool 70° et les travaux se font toujours dans une zone aseptique entre deux flammes de bec Bunsen.

II.2.3.2 Etude de l'activité antimicrobienne

La sensibilité des microorganismes vis-à-vis des extraits a été étudiée en utilisant la méthode de diffusion en milieu gélosé ou méthode des disques.

a) Principe

(DUVAL et SOUSSY, 1991, MANJARY et coll., 2012)

Un antibiotique déposé sur un disque placé à la surface de la gélose préalablement ensemencée avec une suspension de bactéries, diffuse dans le milieu en créant une zone circulaire d'inhibition de croissance appelée halo d'inhibition. Dans cette zone, la concentration de l'antibiotique diminue du centre du dépôt vers la périphérie. Le diamètre de ce halo varie en fonction du degré de sensibilité de la bactérie à l'antibiotique : plus la souche est sensible à l'antibiotique, plus le halo d'inhibition est large.

b) Mode opératoire

A l'aide d'une anse de platine stérile, la souche à étudier est repiquée en stries sur milieu gélosé de MUELLER-HINTON dans une boîte de Petri, à partir d'une culture sur gélose-pente, puis incubée à 37°C pendant 24 h. C'est le relancement de la culture ou préculture. Une ansée de colonie est ensuite prélevée puis mise en suspension dans 10 ml d'eau physiologique stérile. Une dilution appropriée doit ensuite être effectuée pour avoir environ 10^6 cellules/ml, équivalent à une densité optique (DO) de 0,125 à longueur d'ondes $\lambda = 600$ nm. La suspension est ensemencée dans des boîtes de Petri contenant le milieu gélosé de MUELLER-HINTON selon la technique d'inondation. Après 10 min, temps d'adhésion des bactéries à la surface du milieu de culture, l'excès d'inoculum est éliminé par aspiration à l'aide d'une pipette stérile.

Les extraits à tester, préalablement stérilisés par filtration sur filtres Millipore, sont ensuite déposés sur les disques à raison 10 µl/disque puis séchés. A l'aide d'une pince fine stérile, les disques ainsi chargés sont déposés à la surface du milieu.

Les boîtes sont alors incubées à 37°C pendant 24 h.

Après l'incubation, les diamètres des halos d'inhibition apparus autour des disques sont mesurés. Les résultats sont exprimés suivant les normes présentées dans le Tableau n°11.

Tableau n° 11: Normes utilisées pour l'expression des résultats des tests d'activité antimicrobienne

Diamètre du halo d'inhibition (X)	Expression des résultats
6 mm < X < 7 mm	-
7 mm ≤ X < 8 mm	+
8 mm ≤ X < 9 mm	++
X ≥ 9 mm	+++

II.2.3.3. Détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu liquide

A partir d'une solution-mère de concentration déterminée (200 mg/ml), les extraits sont dilués de moitié en cascade.

○ **Préparation de la préculture**

La souche pure est repiquée et ensemencée sur une boîte de Petri contenant de la gélose en utilisant la méthode des stries, puis incubée à 37°C pendant 24 h.

○ **Préparation de l'inoculum**

Une ansée de germes est prélevée à partir de la préculture et inoculée dans du milieu liquide (NutrientBroth). La suspension est incubée à 37°C. Au bout de 24 h, la culture obtenue est diluée de manière à obtenir 10⁵ cellules/ml. Elle va servir d'inoculum.

○ **Inoculation**

Le test est effectué dans les puits d'une microplaque à fond en « U ». Trois puits servent de témoins, à savoir :

- Témoin négatif (T1⁻) : 200 µl de milieu liquide ;
- Témoin négatif (T2⁻) : 5 µl d'extrait à tester et 195 µl de milieu liquide ;
- Témoin positif (T⁺) : 5 µl d'inoculum et 195 µl de milieu liquide.

Dans les puits restants, 5 μ l d'inoculum, 95 μ l de milieu liquide et 100 μ l de la dilution de l'extrait sont introduits à l'aide d'une micropipette.

La plaque est incubée pendant 24 h à la température optimale de la souche.

La croissance bactérienne se traduit par la turbidité du milieu ou par un dépôt au fond du puits. La CMI correspond à la plus faible concentration de l'extrait testé ne présentant pas de trouble après 24h de culture.

Tableau n°12: Composition des différents milieux pour la détermination de la CMI

Puits n°	1 T1	2 T2	3 T+	4	5	6	7	8	9	10	11
Concentration initiale de l'extrait (mg/ml)	0	0	0	1,56	3,125	6,25	12,5	25	50	100	200
Volume de l'extrait (μ l)	0	5	0	100	100	100	100	100	100	100	100
Volume de l'inoculum (μ l)	0	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Volume de milieu de culture (μ l)	200	195	195	95	95	95	95	96	95	95	95
Volume final du mélange (μ l)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Concentration finale de l'extrait (mg/ml)	0	0	0	0,78	1,56	3,125	6,25	12,5	25	50	100

Il est à noter que les tests sont réalisés en double.

Les résultats sont lus par comparaison de l'aspect du milieu avec les 3 témoins : l'aspect trouble, visible à l'œil nu, indique la croissance des bactéries et l'aspect limpide montre l'inhibition de leur multiplication. La CMI correspond à la plus faible concentration de l'extrait à étudier pour laquelle aucune croissance bactérienne n'est visible.

II.2.3.4. Détermination de la CMB

La CMB ou concentration minimale bactéricide est la plus faible concentration d'antibiotique capable de détruire les bactéries. Elle est déterminée juste après la CMI par dénombrement des germes qui ont survécu à l'action de l'extrait à étudier.

A l'aide d'une anse stérile, une aliquote prélevée dans les tubes qui ne présentaient pas de croissance visible est ensemencée en stries transversales sur le milieu gélosé de MULLER-HINTON. Les tubes dont la concentration en extrait à étudier est inférieure à la CMI ne sont pas utilisés. Après incubation de 24 h à 37°C, les résultats sont lus.

La CMB correspond à la concentration minimale pour laquelle toutes les bactéries sont mortes et aucune colonie n'est observée dans le milieu.

III.RESULTATS

III.1. EFFETS DE L'EXTRAIT SUR LES ANIMAUX

III.1.1. EFFETS SUR LA SOURIS

III.1.1.1.Symptômes d'intoxication

a) Par voie intrapéritonéale

L'administration par voie IP de l'extrait brut EB2 à la dose létale de 18 mg/kg (voir méthode § II.2.1.1. a, p. 28) entraîne l'apparition des symptômes suivants :

- juste après l'injection, une contorsion abdominale est observée, l'animale est agité ;
- 10 min après, les deux symptômes précédents disparaissent mais une hyperhémie des oreilles qui sont tirées vers l'arrière et une piloérection ainsi qu'une augmentation du rythme respiratoire apparaissent ;
- Après 1 h, les animaux se déplacent rarement en traînant leurs pattes postérieures ; une enophthalmie est observée.

Au bout de 6 h, la fréquence respiratoire diminue, l'animal n'arrive plus à bouger, des convulsions cloniques sont observées, suivies de la mort.

b) Par voie orale

Après administration par voie orale de l'EB2 à la dose de 18 mg/kg (DL100 par voie IP)(voir méthode § II.2.1.1. b, p. 28), les symptômes suivants sont observés :

- après 15 min, des démangeaisons, un saignement du nez, une contorsion abdominale apparaissent ;
- au bout d'une heure : le rythme respiratoire diminue ;

Ces symptômes persistent jusqu'à la mort de l'animal au bout de 24 h.

III.1.1.2.Détermination de la DL50 (24 h)

D'après les tests préliminaires, la valeur de la DL100 et la DL0 sont respectivement 18mg/kg et 3,5 mg/kg. Sept doses de l'extrait EB2 en progression géométrique de raison $r = 0,75$ situées entre ces valeurs ont été utilisées pour déterminer la DL50 (voir § II.2.1.2, p.28- 29).

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau n°13.

Tableau n°13: Résultats de la détermination de la DL50 de l'extrait méthanolique (EB2)

Dose en mg/kg	Nombre de souris mortes après							Taux de mortalité
	2h	4h	8h	12h	16h	20h	24h	
3,20	0	0	0	0	0	0	0	0%
4,27	0	0	0	0	0	1	1	40%
5,69	0	0	0	0	1	0	1	40%
7,59	0	0	0	1	0	0	2	60%
10,125	0	0	0	0	0	0	3	60%
13,5	0	0	3	1	0	0	0	80%
18	0	5	0	0	0	0	0	100%

➤ D'après la méthode de REED et MUENCH (1938) (voir § II.2.1.2, p. 28-29)

La dose immédiatement inférieure à la DL50 (**B**) est égale à **5,69 mg/kg**

La mortalité provoquée par la dose B (**N**) est égale à **0,4**

La mortalité provoquée par la dose immédiatement supérieure à la DL50 (**M**) est égale à **0,6**

La raison de la progression géométrique r égale à **0,75**

D'où, la formule donne :

$$\log DL50 = \log 5,69 + \frac{(0,5 - 0,4)}{(0,6 - 0,4)} \log 0,75$$

$\log DL50 = 0,68$ d'où **DL50 = 4,78 mg/kg**

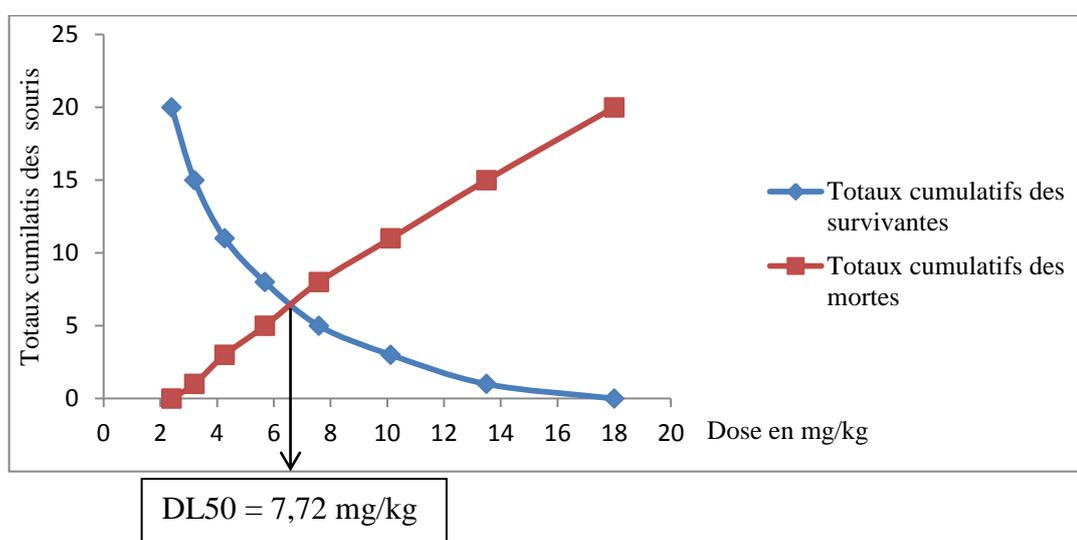
Les valeurs utilisées pour la détermination de la DL50 selon les mêmes auteurs sont donnés dans le Tableau n°14.

La Figure n°5 p. 38 montre les courbes des totaux cumulatifs des souris survivantes et celles des mortes.

D'après cette méthode, la DL50 (24 h) est estimée à 7,21 mg/kg.

Tableau n°14: Valeurs utilisées pour l'estimation de la DL50 (24h) d'après la méthode graphique

Dose en mg/k	Nombre de souris	Nombre de survivantes	Nombre de mortes	Totaux cumulatifs des survivantes	Totaux cumulatifs des mortes
3,20	5	5	0	16	0
4,27	5	3	2	11	2
5,69	5	3	2	8	4
7,59	5	2	3	5	7
10,125	5	2	3	3	10
13,5	5	1	4	1	14
18	5	0	5	0	19

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

- D'après la méthode de régression linéaire (BOYD, 1966), l'équation de la droite est :

$$Y = - 46,30 + 114,28 X$$

avec un coefficient de corrélation **R = 0,96**.

D'où, la valeur de la DL50 est évaluée à **6,97 mg/kg**.

III.1.2. EFFETS SUR LES POUSSINS

III.1.2.1. Symptômes d'intoxication

a) Par voie intrapéritonéale

Les symptômes d'intoxication observés chez les poussins ayant reçu l'EB2 par voie IP à la dose de 18 mg/kg (DL100 chez les souris) sont les suivants :

- une réaction de pelotonnement apparaît lorsqu'on touche les animaux ;
- une diminution de l'activité motrice et du rythme respiratoire est notée ;
- avant leur mort au bout de 10 h, les poussins montrent des convulsions toniques.

a) Par voie orale

Le test a été effectué suivant la méthode décrite en § II.2.1.3 (p.29). La dose administrée était de 18 mg/kg. A l'exception d'une hypersalivation, les symptômes observés sont similaires à ceux qui apparaissent suite à l'injection de l'EB2 par voie IP. Les poussins meurent au bout de 24 h.

III.1.3.EFFETS SUR LES ANIMAUX AQUATIQUES

III.1.3.1.Sur les têtards de grenouille

Six concentrations de l'EB2 en progression géométrique (raison $r = 0,9$), allant de 5 µg/ml (CL0) jusqu'à 10 mg/ml (CL100) ont été éprouvées sur 6 lots de 5 têtards selon la méthode décrite au § II.2.1.3 (p.30)

Le tableau 15 affiche les résultats obtenus.

Tableau n°15 : Effets de l'EB2 sur les têtards de grenouille

Concentration en µg/ml	log C	Nombre de têtards testés	Nombre de morts	Nombre de survivants	Taux de mortalité
10	1	5	5	0	100%
9	0,95	5	5	0	100%
8,10	0,90	5	5	0	100%
7,29	0,86	5	5	0	100%
6,56	0,81	5	0	5	0%
5,31	0,72	5	0	5	0%

Ces résultats montrent que la différence entre la CL0 et la CL100 est très petite. Les effets de l'EB2 sur les têtards de grenouille suivent la loi du « tout ou rien ». Il est donc impossible de déterminer la CL50.

III.1.3.2.Sur les alevins de poissons

Sept concentrations de l'EB2 en progression géométrique allant de 5 µg/ml (CL0) jusqu'à 11,6 µg/ml (CL100) (raison $r = 0,9$), ont été éprouvées sur 7 lots de 5 alevins de poisson (voir méthode § II.2.1.3, c, p.30)

Le Tableau n°16 montre les résultats obtenus.

Tableau n°16 : Effets de l'EB2 sur les alevins de poisson

Concentration µg/ml	log C	Nombre d'alevins testés	Nombre des alevins		Taux de mortalité
			morts	vivants	
5	0,69	5	0	5	0
5,55	0,74	5	1	4	20%
6,17	0,79	5	2	3	40%
7,6	0,88	5	2	3	40%
9,4	0,97	5	4	1	80%
10,4	1,01	5	4	1	80%
11,6	1,06	5	5	0	100%

Ces résultats indiquent que l'EB2 est toxique sur les alevins de poisson. En outre, un effet dose est observé.

- Détermination de la CL50 (24 h)

L'équation de la droite de régression linéaire est la suivante :

$$Y = - 105,7 + 99,46X$$

Avec un coefficient de corrélation **R = 0,98**.

D'après cette équation, la CL50 (24 h) est estimée à **8,45 µg/ml**.

III.2.EFFETS DES EXTRAITS SUR LES VEGETAUX

Les effets de l'EB2 ont été étudiés sur le pouvoir germinatif des graines, la croissance des jeunes plantules et le développement des bourgeons axillaires.

III.2.1.Effets sur le pouvoir germinatif de graines

Suivant la méthode décrite au § II2.2.1. (p. 31), deux lots de dix graines de chaque espèce sont trempés dans de l'eau de robinet pendant 48 h à l'obscurité. Un lot est ensuite mis à germer en présence de l'EB2 à la dose unique de 1 mg/ml à la température ambiante. Le deuxième lot servant de témoin est mis à germer en présence d'eau de robinet.

Au bout de 72 h, les graines ayant germé sont comptées.

L'inhibition se traduit par la non germination de la graine.

Les résultats exprimés en pourcentage d'inhibition sont présentés dans le Tableau n°17.

Les résultats montrent que la sensibilité des graines vis-à-vis d'EB est variable. Ainsi, la germination des graines de brède, de tomate et de concombre est inhibée totalement par l'EB2 (taux d'inhibition 100%). Tandis que celle des autres espèces montre une inhibition allant de 40% pour le haricot, jusqu'à 90% pour l'oignon, le petit pois, le riz et la mauvaise herbe.

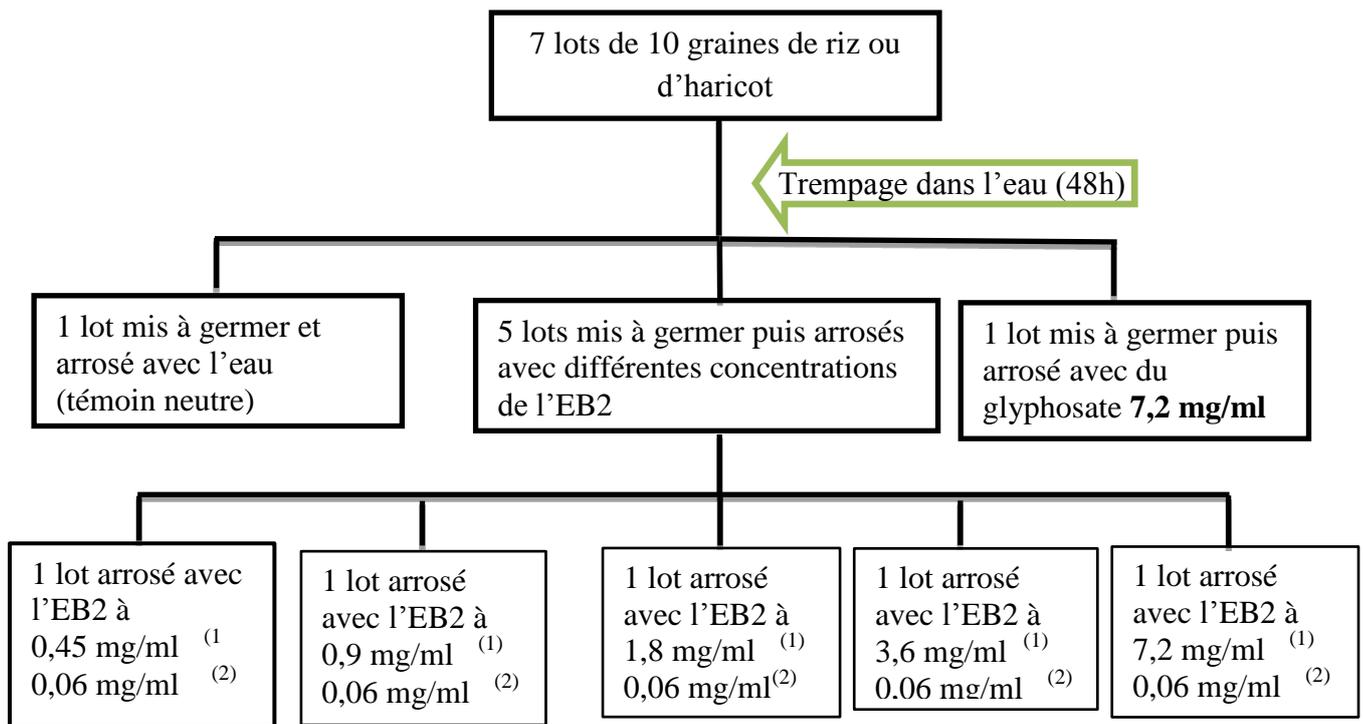
Tableau n°17 : Effets de l'EB2 sur le pouvoir germinatif de graines

Classe	Famille	Nom usuel	Nom scientifique	Taux de germination	Taux d'inhibition
DICOTYLEDONES	APIACEAE	Carotte	<i>Daucus carotta</i>	0%	100%
	BRASSICACEAE	Brède	<i>Brassica sp.</i>	0%	100%
	SOLANACEAE	Tomate	<i>Lycopersicum esculentum</i>	10%	80%
	CUCURBITACEAE	Concombre	<i>Cucumis sp.</i>	0%	100%
	FABACEAE	Haricot rouge	<i>Phaseolus vulgaris</i>	30%	70%
		Haricot blanc	<i>Phaseolus vulgaris</i>	60%	40%
		Petit pois	<i>Pisum sativum</i>	10%	90%
MONOCOTYLEDONES	LILIACEAE	Oignon	<i>Allium cepa</i>	10%	90%
	POACEAE	Maïs	<i>Zea mays</i>	45%	55%
		Riz	<i>Oryza sativa</i>	10%	90%
		Ahidratsy	<i>Eragrostis pilosa</i>	10%	90%

III.2. 2. Effets sur la croissance des jeunes plantules

Les effets de l'EB2 sur la croissance des jeunes plantules ont été évalués sur des plantes potagères représentant les Monocotylédones (riz et maïs) et les Dicotylédones (haricot et petit pois). L'EB a provoqué l'inhibition de la germination des graines de ces plantes à différents taux (voir tableau n°17, p.41). Selon les conditions expérimentales décrites au § II.2.2.2 (p. 31), les graines sont trempées dans l'eau de robinet pendant 48 h, puis mises à germer et arrosées avec différentes concentrations de l'EB2, allant de 0,45 mg/ml à 7,2 mg/ml pour le haricot et le maïs et de 0,06 mg/ml à 1 mg/ml pour le riz et le petit pois. Ces différentes limites ont été déterminées au cours d'expériences préliminaires. Un lot mis à germer et arrosé avec de l'EB2 sert de témoin. L'herbicide de référence est le glyphosate à 7,2 mg/ml.

La Figure n°6 résume le déroulement de l'expérience.



⁽¹⁾ : Concentration de l'EB2 testé sur les graines de maïs et de haricot

⁽²⁾ : Concentration de l'EB2 testé sur les graines de riz et de petit pois

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

La longueur des hypocotyles et des épicotyles est mesurée tous les deux jours pendant 2 semaines.

III.2.2.1. Effets sur la croissance des jeunes plantules de Monocotylédones

Pour le maïs, le développement des épicotyles est stimulé par l'EB2 à 0,45 mg/ml et 0,9 mg/ml puis au-delà de ces concentrations, une inhibition de la croissance des épicotyles est observée. Concernant le développement des hypocotyles, un effet stimulateur de la croissance est observé avec les concentrations de l'EB2 0,45 mg/ml et 0,9 mg/ml. Par contre, une inhibition de la croissance apparaît à partir de 1,8 mg/ml et cet effet augmente au fur et à mesure que la concentration d'EB2 augmente. L'inhibition de la croissance des hypocotyles du maïs est donc proportionnelle à la concentration de EB2 ($P < 0,005$).

Concernant le riz, la croissance des épicotyles est inhibée à partir de 0,06 mg/ml et l'effet de cette inhibition augmente au fur et à mesure que la concentration augmente. L'inhibition de la croissance des épicotyles est donc significativement proportionnelle à la concentration de l'EB2 ($P < 0,005$). Pour le cas des hypocotyles, la croissance est stimulée par l'EB2 à 0,06 mg/ml et 0,125 mg/ml, puis au-delà de ces concentrations une inhibition de la croissance apparaît avec une inhibition totale à 1 mg/ml.

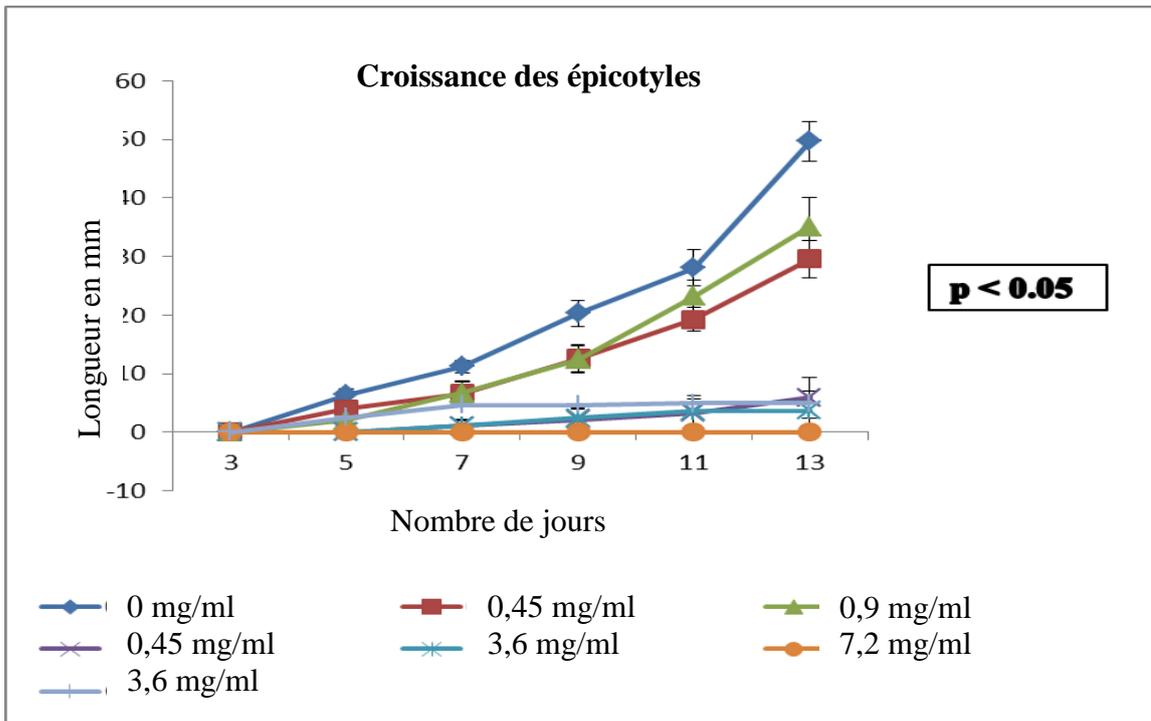


Figure n° 7 : Croissance des épicotyles de maïs en présence de l'EB2 à différentes concentrations

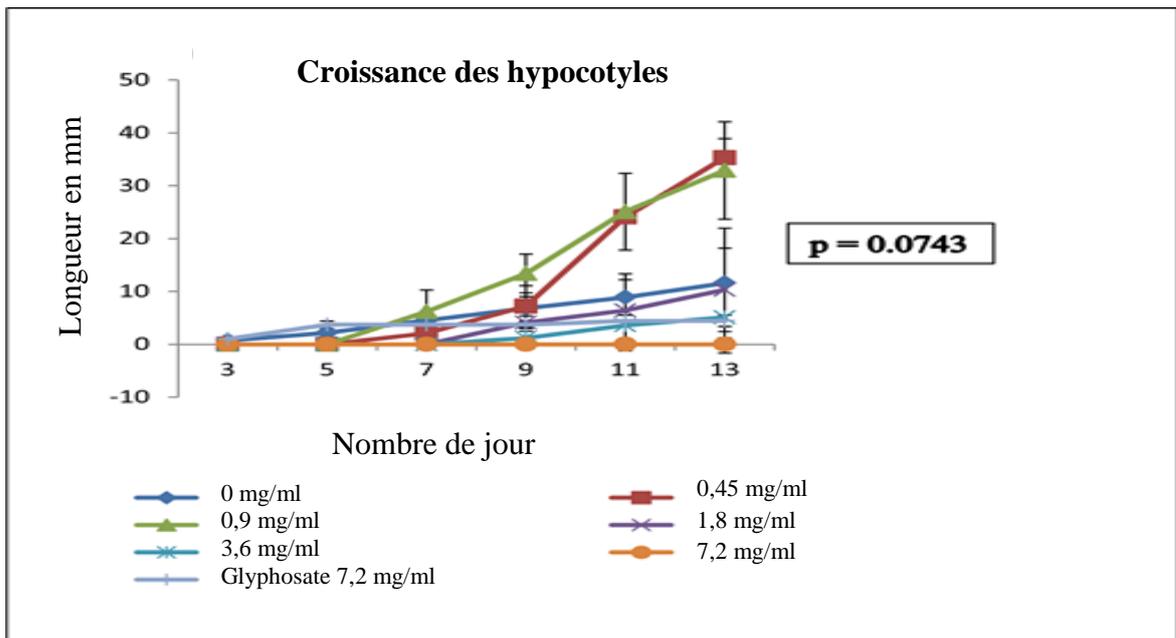


Figure n° 8 : Croissance des hypocotyles de maïs en présence de l'EB2 à différentes concentrations

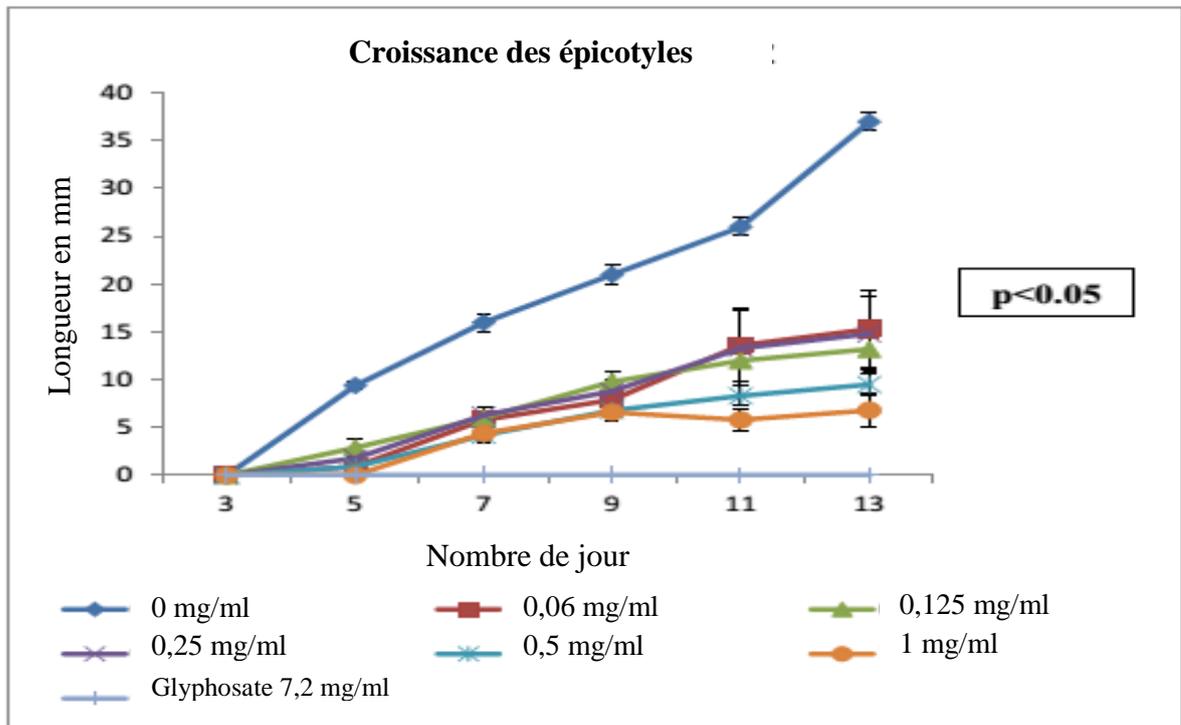


Figure n° 9 : Croissance des épicotyles de riz en présence de l'EB2 à différentes concentrations

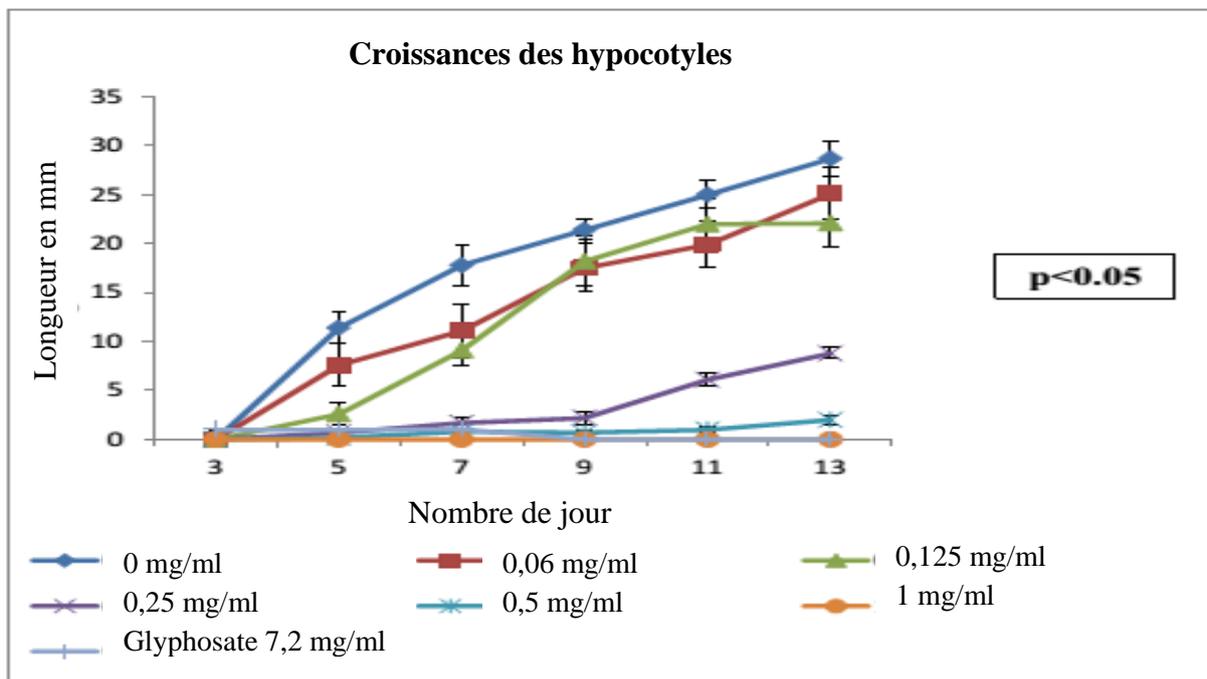


Figure n° 10 : Croissance des hypocotyles de riz en présence de l'EB2 à différentes concentrations

III.2.2.2. Effets sur la croissance des jeunes plantules de Dicotylédones

Pour le petit pois, le développement des épicotyles est normal à 0,06 mg/ml et au-delà de cette concentration, une inhibition de la croissance des épicotyles apparaît et cette inhibition augmente au fur et à mesure que la concentration augmente. L'inhibition est donc proportionnelle à la concentration de l'EB2 ($P < 0,05$). Par ailleurs, une inhibition du développement des hypocotyles a

été constatée en présence de l'EB2 de 0,06 mg/ml jusqu'à 0,5 mg/ml. Cette inhibition qui montre un effet-dose ($P < 0,05$), est totale en présence de l'EB2 à 1 mg/ml.

Concernant le haricot, la croissance des épicotyles est normale à 0,45 mg/ml puis une faible inhibition apparaît à la concentration de 0,9 mg/ml et une inhibition totale de la croissance des épicotyles est observée au-delà de ces concentrations. Pour le cas des hypocotyles, la croissance est normale à 0,45 mg/ml, puis une inhibition de la croissance des hypocotyles est observée à partir de 0,9 mg/ml. Cette effet est proportionnel à la concentration ($P < 0,05$).

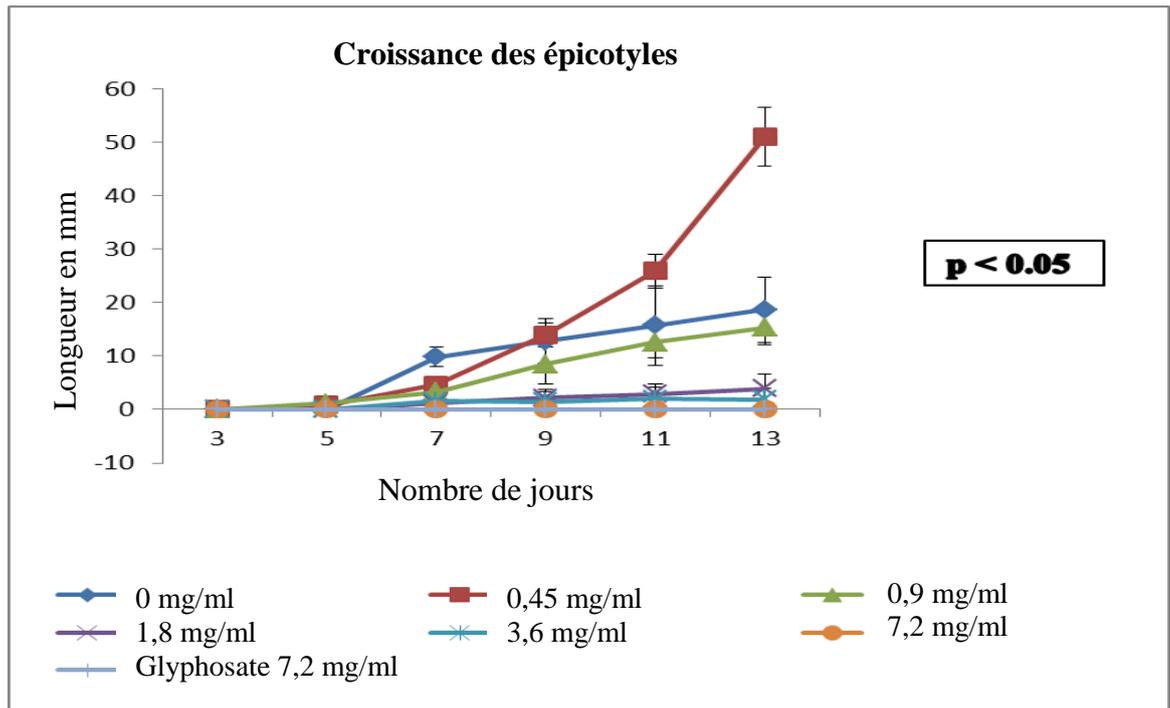


Figure n°11 : Croissance des épicotyles de haricot en présence de l'EB à différentes concentrations

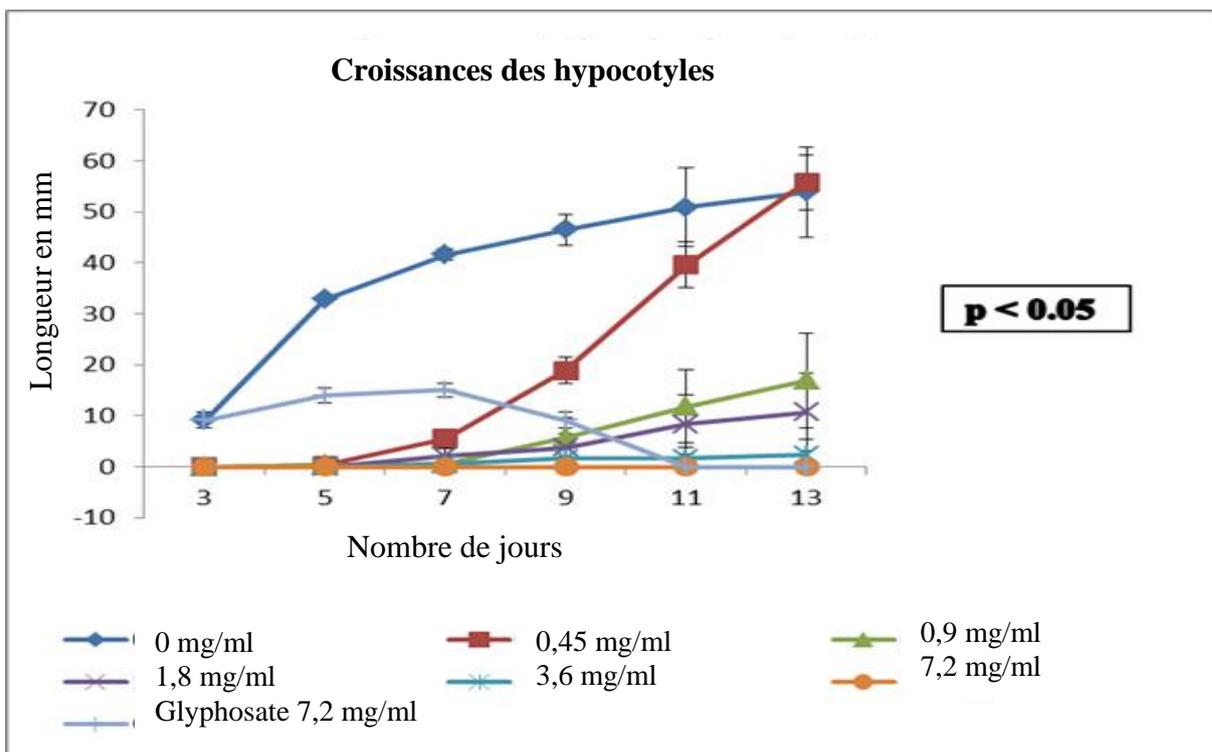


Figure n°12 : Croissance des hypocotyles de haricot en présence de l'EB2 à différentes concentrations

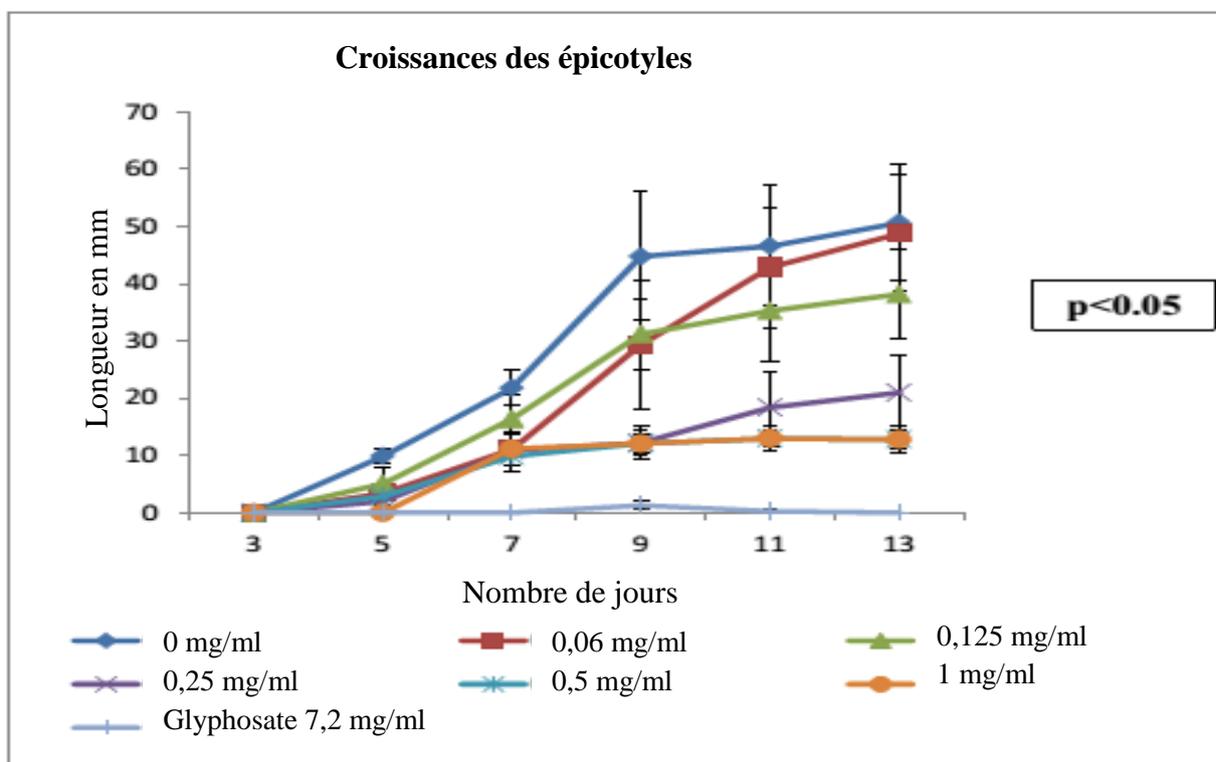


Figure n°13 : Croissance des épicotyles de petit pois en présence de l'EB2 à différentes concentrations

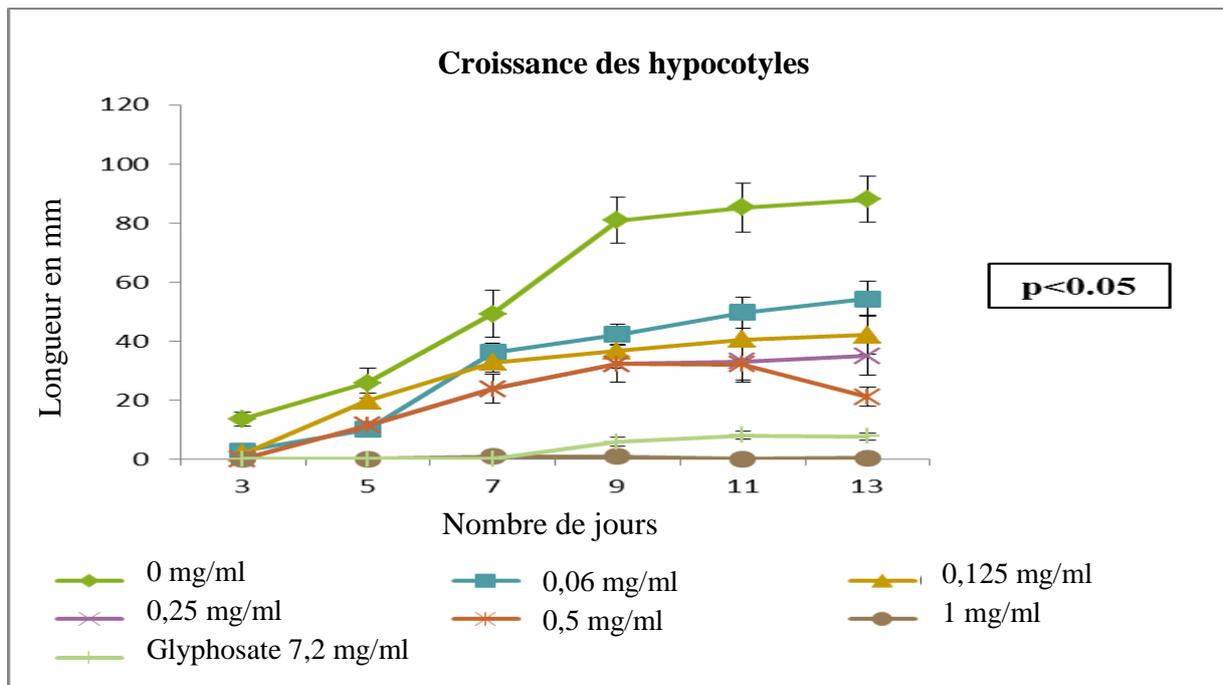


Figure n°14: Croissance des hypocotyles de petit pois en présence de l'EB2 à différentes concentrations

III.2.3. Effets sur les bourgeons axillaires

L'expérience a été réalisée sur des plantules de petit pois (*Pisum sativum*) âgées de 10 jours sur une période de 14 jours selon la méthode donnée au § II.2.2.3 (p.32). Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau n°18.

Tableau n°18 : Croissance des bourgeons axillaires de petit pois en présence des différents produits testés

Produits testés (50µg)	Jour	Longueur des bourgeons axillaires en mm							
		0	2	4	6	8	10	12	14
Gibbérelline		0	7	17	24	30	35	37	40
Eau distillée		0	5	10	15	20	22	28	30
EB2		0	5	8	10	15	19	23	26
Auxine		0	0	0	0	0	0	0	0

D'après ces résultats, l'EB2 exerce une faible inhibition sur la croissance des bourgeons axillaires de petit pois. Cet effet est très inférieur à celui de l'auxine, hormone inhibitrice de la croissance.

III.3. EFFETS DES EXTRAITS SUR LES MICROORGANISMES

III.3.1. Activité antimicrobienne

Les effets sur les microorganismes ont été déterminées selon la méthode décrite en § II.2.3.2 (p.33). Tous les extraits obtenus tout au long de l'extraction et de la purification ont été testés. La concentration de chaque extrait testé a été ramenée à 100 mg/ml et le volume de chaque extrait déposé pour chaque disque était de 10 µl, soit 1 mg/disque.

Les résultats obtenus sont montrés dans le Tableau n°19 (p.48).

Tableau n°19 : Résultats des tests d'antibiogramme des différents extraits

Souches	Extraits	Diamètre du halo d'inhibition (en mm)					
		EB1	EH	EAc	E1	E2	E3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		6	6	6	6	14	6
<i>Staphylococcus aureus</i>		6	6	6	6	6	6
<i>Bacillus cereus</i>		6	6	6	6	6	6
<i>Escherichia coli</i>		6	6	6	6	6	6
<i>Bacillus megaterium</i>		6	6	6	6	6	6
<i>Salmonella enterica</i>		6	6	6	6	6	6
<i>Candida albicans</i>		6	6	6	6	6	6

Légende : **EB1** : extrait aqueux à froid ; **EH** : extrait hexanique ; **AcOEt** : extrait acétate d'éthyle ; **EB2** : extrait méthanolique ; **E1** phase organique acétate d'éthyle ; **E2** phase organique n-butanol ; - : pas d'activité.

Parmi les 6 extraits testés, seul l'extrait purifié E2, phase organique n-butanol, manifeste une activité antibactérienne, vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*, donnant un halo d'inhibition de 14mm de diamètre.

C'est sur cette espèce sensible que la CMI a été déterminée.

III.3.2. Détermination de la CMI

La phase organique n-butanol notée E2, qui est l'extrait le plus actif (voir Tableau n°19 , p.48) a été utilisée pour l'évaluation de la CMI sur *Pseudomonas aeruginosa*, germe le plus sensible, par la méthode de dilution en milieu liquide sur microplaque (voir § II.2.3.3., p. 34 ; 35).

Huit concentrations différentes de l'E2 allant de 0,78 mg/ml à 100 mg/ml ont été testées. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau n°20:

Tableau n°20: Détermination de la CMI de l'extrait E2 en milieu liquide sur *Pseudomonas aeruginosa*

Puits n°	T+	T-	T-2	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentration finale de E2 (mg/ml)	0	0	100	0,78	1,56	3,125	6,25	12,5	25	50	100
Turbidité	++	-	-	++	+	+	-	-	-	-	-

++ : très trouble (croissance microbienne)

+ : trouble (croissance microbienne)

- : limpide (inhibition de la croissance microbienne)

D'après ces résultats, la CMI de l'extrait E3 vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* est estimée à **3,125 mg/ml**.

III.3.3. Détermination de la CMB

Selon la méthode décrite au § II.2.3.4 (p. 35), la CMB est déterminée par ensemencement en stries sur milieu solide des suspensions bactériennes des tubes correspondant aux concentrations de E3 supérieures ou égales à la CMI, soit à partir de la concentration 3,125 mg/ml jusqu'à 100 mg/ml. D'après les résultats obtenus, la CMB de E3 est égale à **10 mg/ml**, concentration pour laquelle aucune colonie ne pousse dans le milieu.

IV DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats de l'étude biologique ont montré que les principes actifs des graines d'*Albizia divaricata* contiennent agissent sur divers organismes vivants.

Injecté par voie IP chez la souris, l'extrait brut EB2 à 18 mg/kg provoque principalement une contorsion abdominale, une alternance d'hyperactivité et d'hypoactivité, une hyperpnée et un traînement des pattes postérieures. Ces symptômes d'intoxication suggèrent que les principes toxiques agissent surtout sur le système nerveux. Par contre, l'administration par voie orale de la même dose engendre des symptômes très caractéristiques tels que la démangeaison, les saignements du nez, le rétrécissement du ventre, la diminution du rythme respiratoire. Il est à noter que le temps de survie des souris ayant reçu l'EB2 par voie orale est plus long que pour celles ayant reçu l'EB2 par voie IP. Au cours du transit dans le tube digestif, les toxines ont pu être dégradées par la flore

intestinale, désactivées ou mal absorbées (OGWAL-OKENG et coll., 2003). Ces phénomènes peuvent expliquer cette augmentation du temps de survie des souris testés par voie orale.

La DL50 (24h) est comprise entre 4,78 et 7,72 mg/kg. Par rapport à aux autres espèces du genre *Albizia* (voir Tableau n °16), les extraits de graines d'*Albizia divaricata* ont une toxicité très élevée. Certes, ils sont moins toxiques que les extraits de graines d'*Albizia tulearensis* (DL50 entre 2,9 et 3,2 mg/kg) (RAONIHARISOA, 2003) et d'*Albizia greveana* (DL50 entre 1,30 et 1,87 mg/kg) (RAHELIARISATA, 2014), mais les extraits de graines d'*Albizia divaricata* sont plus toxiques que ceux d'*Albizia bernieri* (DL50 entre 53 et 55 mg/kg) (RAHARISOA, 1998) et d'*Albizia polyphylla* dont la DL50 est comprise entre 73 et 76 mg/kg (RAJEMIARIMOELISOA, 1996), par exemple. En outre, les extraits de graines d'*Albizia divaricata* sont nettement plus toxiques que les extraits obtenus à partir d'autres organes d'autres d'espèces appartenant au genre *Albizia*. On peut, par exemple, noter que les extraits de graines d'*Albizia divaricata* sont très toxiques par rapport aux extraits de feuilles d'*Albizia boinensis* (DL 50 entre 51,2 et 51,6 mg/kg) (AHMED, 2009). Les extraits de graines d'*Albizia divaricata* sont également plus toxiques que ceux d'autres plantes comme *Xerosicyos danguyi* (DL 50 entre 58,8 et 61,88 mg/kg) (RAKOTONDRAZANAKA, 1999) et *Chassalia bojeriana* (DL 50 entre 1960 et 1820 mg/kg) (RANDRIAMAMPIANINA, 2008).

Le tableau n°21 récapitule les DL50 24h sur souris des extraits des *Albizia* déjà étudiées

Tableau n°21 : DL50 (24h) sur souris des espèces d'*Albizia* déjà étudiées

Espèce	Partie utilisée	DL50 (mg/kg)	Référence
<i>Albizia greveana</i>	Graines	Entre 1,13 et 2,02	RAHELIARISATA, 2014
<i>Albizia tulearensis</i>	Graines	Entre 2,9 et 3,2	RAONIHARISOA, 2003
<i>Albizia divaricata</i>	Graines	Entre 4,78 et 7,72	Auteur
<i>Albizia sp</i>	Graines	8,7	RAMAMONJISOA, 1998
<i>Albizia odorata</i>	Graines	9	RAJEMIARIMOELISOA, 2000
<i>Albizia mahalao</i>	Graines	Entre 22,23 et 24,4	RAKOTOARIVONY, 2012
<i>Albizia aurisparsa</i>	Graines	Entre 38,76 et 39,71	ANDRIAMIARINJO, 2014
<i>Albizia arenicola</i>	Feuilles	Entre 41,40 et 41,44	RAKOTOMALALA, 2012
<i>Albizia androyensis</i>	Graines	Entre 41,33 et 43,23	RASOLOFOMANANA 2015
<i>Albizia boinensis</i>	Feuilles	Entre 51,2 et 51,6	AHMED, 2009
<i>Albizia bernieri</i>	Graines	Entre 53 et 55	RAHARISOA, 1998
<i>Albizia boivini</i>	Cosses	Entre 57 et 60	ARISOA ,2001

L'EB2 s'est montré toxique sur les poussins. A l'exception d'une hypersalivation observée chez les poussins l'ayant reçu par voie orale, les animaux ont montré les mêmes symptômes par voie IP et par voie orale. L'EB2 est létal par voie IP. Ces résultats différents de ceux obtenus par voie orale avec les graines d'*A. mahalao* qui n'ont pas eu d'effets sur les poussins (RAKOTOARIVONY, 2012) et avec celles d'*A. androyensis* dont l'extrait provoque des symptômes mais n'entraîne pas la mort (RASOLOFOMANANA, 2015). Ceci montre que la voie d'absorption des principes actifs contenus dans les graines des espèces appartenant au genre *Albizia* pourrait influencer l'activité de ces principes actifs chez les poussins.

L'activité de l'EB2 sur les têtards de grenouille suit la loi du « tout ou rien », donc il a été impossible de déterminer la CL50 sur ces animaux. *A. divaricata* est la seule espèce qui a manifesté un tel effet sur les têtards parmi toutes celles qui ont été étudiées. En effet, les autres extraits ont montré une toxicité proportionnelle à la concentration vis-à-vis de ces animaux et des valeurs de CL50 ont pu être obtenues (voir Tableau n°22 .p. 52).

L'EB2 est très toxique sur les alevins de poisson avec une CL50 (24 h) de 8,45 µg/ml. Cette valeur est très faible par rapport à celle des cosses d'*A. boivini* (ARISOA, 2001) dont la CL50 estimée à 190,3 µg/ml. Cependant, cette valeur de la CL50 de graines d'*A. divaricata* est supérieure à celle d'autres espèces, notamment celle des graines d'*A. tulearensis* (RAONIHARISOA 2003) qui est de 2,28 µg/ml.

Le tableau n°22 permet de comparer la CL50 des graines d'*Albizia divaricata* avec celles des autres espèces d'*Albizia* déjà étudiées.

Tableau n°22 : CL50 (24h) des espèces d'*Albizia* déjà étudiées sur les têtards de grenouille et les alevins de poisson

Espèce	Partie utilisée	Extrait	CL50 (24 h)		Référence
			Sur les têtards de grenouille (µg/ml)	Sur les alevins de poisson (µg/ml)	
<i>A. odorata</i>	Amande de graine	EB et EP	EB : 0,18 EP : 16,71	EB : 0,27 EP : 5,26	RAJEMIARIMOELISOA, 2000
<i>A. tulearensis</i>	Graines	EP	15,04	2,29	RAONIHARISOA, 2003
<i>A. arenicola</i>	Amande de graine	EP	3,22	2,73	RANDRIANARIVO, 2003
<i>A. divaricata</i>	Graines	EB	n.d	8,45	Auteur
<i>A. androyensis</i>	Graines	EB	3,48	3,95	RASOLOFOMANANA 2015
<i>A. boinensis</i>	Feuilles	EB	46,08	21,20	AHMED, 2009
<i>A. arenicola</i>	Téguments de graines	EP	105,73	94,56	MOUNIDATI, 2009
<i>A. polyphylla</i>	Feuilles	EB	369	174	RAKOTONDRA SOA, 2000
<i>A. boivini</i>	Cosses	EP	541,39	190,30	ARISOA, 2001

Sur le pouvoir germinatif des graines, les effets des extraits de graines d'*Albizia divaricata* sont variables. L'inhibition varie de 40 à 100%, ce qui peut être dû à une plus ou moins grande sensibilité des graines vis-à-vis de l'extrait. L'obtention d'une inhibition de la germination de la mauvaise herbe à un taux de 90%, taux qui est en outre supérieur à celui d'*Albizia androyensis* (40%) (RASOLOFOMANANA, 2015), est intéressante mais sa toxicité vis-à-vis des plantes potagères pourrait limiter son utilisation.

Au niveau des jeunes plantules, les extraits de graines d'*Albizia divaricata* affectent à la fois la croissance des épicotyles et celle des hypocotyles aussi bien chez les Dicotylédones que chez les Monocotylédones. L'inhibition de la croissance des hypocotyles est plus forte que celle des épicotyles pour les jeunes plantules de petit pois, du haricot, du maïs et du riz. Ceci est dû au fait que la racine est plus sensible aux composés phytotoxiques que la tige (CHON et coll., 2000) elle est plus perméable à ces composés que la tige (NISHIDA et coll., 2005). Aux mêmes concentrations de l'EB2, la sensibilité des plantules est similaire.

Un effet inhibiteur du développement des bourgeons axillaires de plantules de petits pois a été observé avec l'EB2. Cet effet de l'extrait brut EB2 est comparable à celui de l'extrait brut d'A.

androyensis (RASOLOFOMANANA, 2015). Par contre, un effet stimulateur du développement des bourgeons axillaires a été observé chez *A. tulearensis* (RAONIHARISAOA, 2003), *A. mahalao* (RAKOTOARIVONY, 2012) et *A. greveana* (RAHELIARISATA, 2014).

Au niveau des microorganismes, seul l'extrait purifié E2 a montré une activité antibactérienne sur *Pseudomonas aeruginosa*. Le rapport CMB/CMI étant égal à 3,2, l'extrait purifié E2 a donc un effet bactéricide (MARMONIER, 1990). Nos résultats montrent ainsi un spectre d'activité étroit des extraits de graines d'*Albizia divaricata*. Pourtant la concentration utilisée était déjà élevée. Des investigations sur d'autres germes sont nécessaires pour conclure sur l'effet antimicrobien des graines.

Conclusion générale et perspectives

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les études chimique et toxicologique réalisées sur *Albizia divaricata*, une Fabacée endémique malgache, ont permis de :

- mettre en évidence la présence de principes toxiques dans les graines ;
- donner les premières informations sur les propriétés physico-chimiques de ces principes;
- déterminer leurs propriétés toxicologiques sur des organismes animaux, végétaux et microbiens.

Dans l'avenir, nous envisageons :

- d'améliorer les méthodes d'extraction et de purification en vue d'obtenir les principes toxiques à l'état pur ;
- d'identifier la structure des principes toxiques et d'entreprendre l'étude de leur mécanisme d'action ;
- d'élargir les recherches par la prospection d'autres propriétés permettant de mieux utiliser cette plante ;
- d'étudier les possibilités d'exploitation des remarquables propriétés inhibitrices sur les graines de Monocotylédones et de Dicotylédones, dans la lutte contre les mauvaises herbes.
- d'étendre les investigations à d'autres germes.

Références bibliographiques

- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ABDALLA A. M. et LAATSCH H. Flavonoids from Sudanese *Albizia zygia* (Leguminosae, subfamily Mimosoideae), a plant with antimalarial potency. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* **2012.** 9(1): 56-58.
2. AHMED A. Etudes chimique et toxicologique des extraits de feuilles d'*Albizia boinensis* (FABACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2009** ; 63p.
3. AHMED D., KUMAR V., VERMA A., VERMA A., GUPTA P.S., KUMAR H., DHINGRA V., MISHRA V. and SHARMA M. Antidiabetic, renal/hepatic/pancreas/cardiac protective and antioxidant potential of methanol/ dichloromethane extract of *Albizia lebbek* Benth. stem bark (ALEX) on streptozotocin induced diabetic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* **2014.** 14:243.
4. AMANI M.D. and EL-MOUSALLAMY. Leaf flavonoids of *albizialebbek*. *Phytochemistry.* **1998.** 48(4) : **759-761.**
5. ANDRIAMIARINJO N.F. Purification et caractérisation partielles des principes toxiques des graines d'*Albizia aurisparsa*, une Fabacée endémique de Madagascar. [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2014** ; 65p.
6. ANDRIANTSOA H. Contribution à la purification et à la caractérisation d'un principe antimicrobien des graines d'une Légumineuse, *Albizia lebbek*. [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **1983** ; 42p.
7. ANGENOT L. Essais phyto-chimiques préliminaires sur quelques plantes médicinales du Rwanda oriental. *Plantes médicinales et phytothérapie* **1970**, Tome IV, no 4, 263.
8. ARISOA A.A. Etude chimique et biologique d'extraits toxiques de fruits d'*Albizia boivini* (Mimosoïdeae, Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2001** ; 67p.
9. BALEKAR N., KUMAR D. J., DIXIT P., and NAIR V. Evaluation of antidiarrheal activity of ethanolic stem bark extract of *Albizia lebbek* Linn. in rats. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **2012.** 34 (3) : 317-322.
10. BALGEES A., ATTA ELMNAN A.M.A., FADAL E. and SALIH A.M. Effect of supplementing a basal diet of treated or untreated baggase with different levels of *Albizia lebbek* on intake, digestibility and rumen fermentation. *Pakistan Journal of Nutrition.* **2011.** 10(12) : 1149-1153.

11. BOURDON J.L., MARCHAL N., RICHARD C. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries, 4^{ème} Edition Paris : Doin Editeur. **1991** ; 551 p.
12. BRUNETON J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Paris : Tech. Et Doc. Lavoisier, **1993** ; 893p.
13. CAMILLE. Préparation et stérilisation de milieu du matériel et des milieux de culture. In : Microbiologie pratique pour le laboratoire. Paris : Lavoisier. **2007** : 47- 74.
14. CRONQUIST. A., An integrated system of classification flowering plants. Volume 34. New York : Columbia University, **1981** ; 1268p.
15. DONALD G. BARCELOUX, MD. Barbados nut. In : Medical Toxicology of Natural Substances. **2008**:829.
16. DU PUY D.J., LABAT J.N., RABEVOHITRA R., VILLIERS J.F., BOSSER J. and MOAT J. The Leguminosae of Madagascar. Kew : Royal Botanic Garden, **2002** ; 750p.
17. DUVAL J., SOUSSY C. J. Antibiothérapie, 4^{ème} Edition. Paris : Masson, 1990 : 37-38.
18. EL-MOUSALLAMY A. M. D. Leaf flavonoids *Albizia lebbek*. *Phytochemistry*. **1998**. 48: 759-761.
19. GOVENDER R., PHULUKDAREE A., GENGAN R.M., ANAND K. and CHUTURGOON1 A.A. Silver nanoparticles of *Albizia adianthifolia*: the induction of apoptosis in human lung carcinoma cell line. *Journal of Nanobiotechnology*. **2013**.11:5.
20. HADDAD M., LAURENS V. et LACAILLE-DUBOIS M. Induction of apoptosis in a leukemia cell line by triterpènes saponins from *Albizia adianthifolia*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2004**.12: 4725-4734.
21. HEMINGWAY R.W., KARCHESY J.J. Chemistry and significance of condensed tannins. New York : Plenum Press, **1989**: 249-264.
22. IVANOVSKA N. and PHILIPOU S. 1996. Study on the anti-inflammatory action of *Berberis vulgaris* root extract, alkaloid fraction and pure alkaloids. *International Journal of Immunopharmacology*. **1996**. 18 :553-561.
23. JAMES A., NATHANSON, EDWARD J., HUNNICUTT, KANTHAM L. and SCAVONE C. Cocaine as a naturally occurring insecticide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**. 90 : 9645-9648.
24. JEAN-NOEL et GUY. Antibiogramme, méthode de disque. In : Microbiologie technique. Tom1. 4^{ème} Edition. **2006** : 32-33.
25. JUN T. Chemical composition and fungical activity of essential oil from *Cicutavirosa*. L.var-latisectacelak. *International Journal of Food Microbiology* **2011**. 145(2-4) : 464-470.
26. KAMOUN P. Appareils et méthodes en biochimie 3^{ème} Edition. Paris : Flammarion. **1987**; 373 p.

27. KAMOUN P. Appareils et méthodes en biochimie. 3^{ème} Edition. Paris : Médecine-Sciences Flammarion. **1991** ; 363p.
28. KHATOON M., ISLAM E., ISLAM R. et coll., Estimation of total phenol and *in vitro* antioxidant activity of *Albizia procera* leaves. *BMC Research Notes*. **2013**. 6:121.
29. KIRTIKAR K. R., BASU B. D. Indian Medicinal Plants, Periodical Experts, **1935**. 2: 939.
30. KOTESWARA Y R., VIJAYA B. R. M., VENKATA R. C. et coll. Two New 5-Deoxyflavones from *Albizia odoratissima*. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**. 50(9) :1271-1272.
31. LUI R., SHUANG-GANG M., LIU Y., YU S., CHEN X. et ZHANG J. Albizosides D and E, two new cytotoxic triterpènes saponins from *Albizia chinensis*. *Carbonitrate Research*. **2010**. 345: 1877-1881.
32. MAMYRBEKOVA-BEKRO J.A., BOUA B.B. , DIABY A., BEKRO Y.A. Screening phytochimique bio guidé et évaluation *in vitro* des propriétés purgatives de *Anchomanes difformis* (Blume) Engl., une plante utilisée en Côte d'Ivoire dans le traitement folklorique de la constipation. *Nature & Technologie* .**2012** :09 : 20-26
33. MANJARI A. S., KANTI C. C., SAROJINI N. MAMYRBEKOVA-BEKRO J. A., BOUA B. B. et ABOUBACAR. *In vitro* antibacterial activities study of *Albizzia lebeck* (L) Benth leaf extract. *International Research Journal of Pharmacy*. **2012**. 3(5):348-349.
34. MARMONIER A.A. Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. In :Bactériologie médicale, techniques usuelles. 3^{ème} Edition. Paris :Doin, **1990** : 227-236.
35. MELEK F.R., MIYASE T., GHALY N.S. and NABIL M. Triterpenoid saponins with N acetyl sugar from the bark of *Albizia procera*. *Phytochemistry*. **2007**. 68 :1261–1266.
36. MORELAND D.E. Effets of toxicants on oxydative and photophosphorylation. In :Introduction to Biochemical Toxicology. Edited by HODGSON E. and GUTHRIE E.F., **1980** : 245-260.
37. NOHARA T. Analysis of steroid and another biologically significant steroids. San Diego :Nes. W. D. et Parish E.J. **1989** :119-132.
38. PILET P.-E. Les phytohormones de croissance. Méthode chimie, biochimie, physiologie application pratique. **1961** ; 774p.
39. RAHARISOA N. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes toxiques d'*Albizia bernieri* (FABACEAE) [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **1999** ; 72p.
40. 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** ; 90p.

41. RAHERINIAINA C.E. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes toxiques d'*Albizia boivini* (FABACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **1999** ; 74p.
42. RAJEMIARIMOELISOA C.F. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes actifs d'*Albizia polyphylla* (Mimosoïdeae-Légumineuseae). [Mémoire de DEA Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **1996** ; 76p.
43. RAJEMIARIMOELISOA C.F. Isolement, caractérisation chimique et biologique du principe actif d'*Albizia odorata* (Mimosoïdée-Fabacée). [Thèse de Doctorat : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2000** ; 113p.
44. RAKOTO D. A. D., RANDRIANARIVO R., EL-YACHOUROUTUI M., ARISOA A.A., RAHARISOA N., RAKOTONDRA SOA N., RAONIHARISOA P. and JEANNODA V. Effects of extracts from *Albizia* (FABACEAE) endemic species of Madagascar on vegetable seedling development. *J. Chem.Chem. Eng.* **2012**. 6 : 313-322.
45. RAKOTOARIVONY R.F. Etudes chimique et toxicologique des extraits de graines entières d'*Albizia mahalao*, une Fabacée endémique de Madagascar. [Mémoire de DEA: Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2012** ; 59p.
46. RAKOTOMALALA A.T. Etudes chimique et toxicologique des extraits de feuilles d'*Albizia arenicola* (Fabaceae) [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo ; Université d'Antananarivo. **2012** ; 57p.
47. RAKOTONDRA SOA N.S. Etude chimique et biologique des extraits toxiques de feuilles d'*Albizia polyphylla* (Mimosoïdae, Fabaceae) [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2000** ; 72p.
48. RAMAMONJISON E.D. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes toxiques d'*Albizia sp.* [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **1998** ; 66p.
49. RANDE RATH K. Chromatographie sur couches minces. Paris : Gauthiers-Villars, **1964** ; 296p.
50. RANDRIANARIVO H.R. Isolement, caractérisation chimique et biologique des principes toxiques d'*Albizia arenicola* (Mimosoïdae-Fabaceae). [Thèse de Doctorat : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2003** ; 159p.
51. RANDRIANARIVO H.R. Purification et caractérisation partielle des principes actifs d'*Albizia arenicola* (Mimosoïdae-Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo. **1996** ; 63p.

52. RAONIHARISOA P. Etude chimique et toxicologique des extraits toxiques de graines d'*Albizia tullearensis* (Mimosoïdeae, Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2003** ; 78p.
53. RASOLOFOMANANA R.J. Etudes chimique et toxicologique des extraits de graines d'*Albizia androyensis*, une Fabacée endémique de Madagascar. [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2015**;72p.
54. RUI L., SHUANG-GANG M., YU-XI L., SHI-SHAN Y., XIAO-GUANG C., JIAN-JUN Z. Albizosides D and E, two new cytotoxic triterpènes saponins from *Albizia chinensis*. *Carbohydrate Research*. **2010**. 345: 1877–1881.
55. RUKUNGA G.M., MUREGI F.W., TOLO F.M., OMAR S.A., MWITARI P., MUTHAURA C.N., OMLIN F., LWANDE W., HASSANALI A., GITHURE J., IRAQI F.W., MUNGAI G.M., KRAUS W. and KOFI-TSEKPO W.M.. The antiplasmodial activity of spermine alkaloids isolated from *Albizia gummifera*. *Fitoterapia*. **2007**. 78: 455-459.
56. RUKUNGA G.M., WATERMAN P.G. Triterpènes of *Albizia versicolor* and *Albizia schimperana* stem barks. *Fitoterapia*. **2001**. 72: 188-190.
57. SAYYAH. Screening of the anticonvulsant activity of some plants from Fabaceae family in experimental seizure models in mice. *DARU*. **2011**. n° 4: 5.
58. SEYYDNEJAD S.M., MASUMEH N., ISMAIEEL D. and HOSSEIN M. Antibacterial Activity of Hydroalcoholic Extract of *Callistemon citrinus* and *Albizia lebbeck*. *American Journal of Applied Sciences*. **2010**. 7 (1): 13-16.
59. SHUGENG C., ANDREW N., MILLER J. S., RATOVOSON F., RAZAFITSALAMA J. , RATOVOSON F., RAZAFITSALAMA J., ANDRIANTSIFERANA R., VINCENT E., RASAMISON, TENDYKE K., SUH T., DAVID G. and KINGSTON I. Cytotoxic. Triterpenoid Saponins of *Albizia gummifera* from the Madagascar Rain Forest. *J. Nat. Prod.* **2007**. 70: 361-366.
60. SNEATH P.H.A., MAIR N.S., SHARPE M.E., HOLT J.G. Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. Baltimore : Williams and Wilkins, **1987**; 1599p.
61. TAMOKOU J. D., MPETGA D. J. S., LUNGA P. K., TENE M., TANE P. and KUIATE J. R. Antioxidant and antimicrobial activities of ethyl acetate extract, fractions and compounds from stem bark of *Albizia adianthifolia* (Mimosoïdeae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **2012**. 12: 99.
62. VOLODYMYR S., MELISSA R. J., SHABANA I. K., ZHAO J., BABU L., TEKWANIA, JACOB O., MIDIWOC, LARRY A., WALKERA et MUHAMMADA I. Antimicrobial, Antiparasitic and Cytotoxic Spermine Alkaloids from *Albizia schimperana*. *Nat. Prod. Commun.* **2009**. 4(6) : 791–796.

63. YOSHIKAWA M., MORIKAWA T., NAKANO K., PONGPIRIYADACHA Y., TOSHIYUKI MURAKAMIE and MATSUDA H. Characterization of New Sweet Triterpene Saponins from *Albizia myriophylla*. *American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy*. **2002**:607-8412.

WEBOGRAPHIE:

www.fr.wikipedia.org/wiki/albizia

Annexes

ANNEXES

ANNEXE I

Composition du réactif à la vanilline sulfurique :

Vanilline.....	0,5 g
Acide sulfurique (H ₂ SO ₄) 36N.....	100 ml

ANNEXE II

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 :

Mélange V/V de deux solutions A et B

· **Solution A :**

- Nitrate de bismuth.....	1,7 g
- Acide tartrique.....	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 III

Composition des différents milieux de culture

BOUILLON NUTRITIF

- Peptone bactériologique.....	5 g
- Extrait de viande.....	3 g
- Extrait de levure.....	4 g
- Glucose.....	5 g

- Eau distillée..... q.s.p 1000 ml

Milieu gélosé de MUELLER-HINTON (formule-type g/l)

- Extrait de viande..... 3 g

- Peptone..... 5 g

- Peptone tripsique de caséine..... 10 g

- Chlorure de sodium..... 5 g

- Dextrose (glucose)..... 2 g

- Agar..... 10 g

- Eau distillée..... q.s.p 1000 ml

Milieu gélosé de SABOURAUD

- Peptone..... 10 g

- Glucose massé..... 20 g

- Agar-agar..... 15 g

- Eau distillée (qsp)..... 1 000 ml

- vitamines et facteurs de croissance

- pH = 6,0

Nom : RAKOTOMALALA

Prénoms : Fetra Angelot

Titre du mémoire : Etude chimique et toxicologique de graines d'*Albizia divaricata*, une Fabacée endémique de Madagascar

RESUME

Une activité toxique sur souris a été mise en évidence dans les graines d'*Albizia divaricata*, une Fabacée endémique de Madagascar.

L'extrait brut (EB2) méthanolique a subi une purification comportant deux étapes, le fractionnement par l'acétate d'éthyle et le fractionnement par le n-butanol, permettant d'obtenir un extrait E2, partiellement purifié. Le rendement en toxines est de l'ordre de 0,417 %

Les principes actifs sont thermostables, solubles dans l'eau et dans les solvants organiques tels que l'acétate d'éthyle et le n-butanol.

D'après le criblage phytochimique les principes toxiques dans EB2 pourraient être des saponosides à génine stéroïdique ou triterpénique.

Les symptômes d'intoxication sur souris par voie ip de l'extrait purifié E2 suggèrent que les principes actifs agissent au niveau du système nerveux central. La DL50 est comprise entre 4,78 et 7,72 mg/kg. A 7,29 µg/ml, EB est toxique sur les têtards de grenouille, mais la toxicité suit la loi du « tout ou rien ». Par ailleurs, la CL50 de EB sur les alevins de poisson est de 8,45µg/ml.

EB2 inhibe la germination des graines de plusieurs plantes Monocotylédones et Dicotylédones. De plus, EB2 inhibe la croissance des épicotyles et hypocotyles des jeunes plantules de maïs, de riz, de haricot et de petit pois. Il inhibe également celle des bourgeons axillaires des plantules de petit pois.

Par ailleurs, E2 présente un spectre étroit sur les microorganismes car il n'est actif que sur *Pseudomonas aeruginosa*. La CMI de l'extrait E2 sur la souche est de 3,125 mg/ml et la CMB est de 10 mg/ml. E2 est donc bactéricide.

Mots clés : *Albizia divaricata*, FABACEAE, graines, toxique, inhibition, germination, DL50, CL50.

Name : RAKOTOMALALA

First name : Fetra Angelot

Title : Chemical and toxicological study of *Albizia divaricata*, FABACEAE endemic to Madagascar

ABSTRACT

Toxic activity was found in *Albizia divaricata* seed extracts, a Fabaceae endemic to Madagascar. The crude methanolic extract (EB2) was fractionated with ethyl acetate and n-butanol. A partially purified extract (extract E2) is obtained. Toxin yield is of the order of 0.417%

The active principles are thermostable, soluble in water and in organic solvents such as ethyl acetate and n-butanol. The phytochemical screening showed that toxic principle could be steroid or triterpene saponins

Mice that received intraperitoneal injection of the purified extract E2 showed symptoms of poisoning suggested that active principles might affect the central nervous system. The letal dose 50 LD50 of the crude extract was estimated at between 4.78 and 7.72 mg / kg of mice. At 7.29 µg / ml, the crude extract was toxic on apode frog tadpoles, but the toxicity followed the law of "all or nothing". Moreover, the crude extract was also toxic on fishes royal strain (LC50 estimated at 8,45µg / ml).

EB2 inhibited the germination of several vegetables (Monocotyledons and Dicotyledons). In addition, EB2 inhibited the seedlings growth of maize, rice, beans and peas. It also inhibited the axillary buds growth of pea seedlings.

In addition, E2 had a narrow spectrum of action against a selected group of bacterial types. It was active against *Pseudomonas aeruginosa*. The Minimum Inibitory Concentration (MIC) value of the purified extract E2 was 3.125 mg / ml and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) was 10 mg / ml.

Keywords: *Albizia divaricata*, FABACEAE, seeds, toxic, inhibition, germination, LD50, LC50.