



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

**PURIFICATION ET CARACTERISATION
PARTIELLES DES PRINCIPES TOXIQUES DE
L'ECORCE DE TIGE DE
Pittosporum verticillatum (PITTOSPORACEAE)**

Présenté par :

RAKOTONDRAVALY Mandratovola Dino

Maître ès-sciences

Le 03 avril 2015

Devant la commission du jury, composé de :

-Président : Professeur JEANNODA Victor

- Rapporteur : Docteur RANDRIANARIVO Hanitra Ranjàna

- Examineurs : -Professeur RAKOTO Danielle A. Doll

-Docteur RAZAFIARIMANGA Zara

DEDICACE

A Dieu tout puissant,

<<Ankino amin'ny Jehovah n asanao dia ho lavorary izay
kasainao>> ohabolana 16: 3

A mes parents, pour vos soutiens moral et financier qui n'ont pas été vains.

Puissiez-vous trouver ici le fruit de tant d'années de sacrifices et d'efforts.

A mes frères, **DOLAINA** et **FRANCO** en témoignage de leur affection.

A ma petite copine, pour son amour, son aide et ses conseils tout au long de
mes études universitaires.

A toute ma promotion, en souvenir du stage. Je vous souhaite une bonne suite
de carrière scientifique.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE.....	2
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	6
1-DESCRIPTION BOTANIQUE DE <i>Pittosporum</i>	6
2- USAGES TRADITIONNELS.....	6
3- <i>PITTOSPORUM</i> ETUDIEES AU LABASM	7
ETUDE CHIMIQUE.....	12
1-INTRODUCTION	12
2-MATERIELS ET METHODES.....	12
2.1 MATERIELS	12
2.1.1 Matériel végétal	12
2.1.1.1 Classification.....	12
2.1.1.2 Description botanique	13
2.1.1.3 Distribution géographique et lieu de récolte	13
2.1.1.4 Préparation et conservation du matériel végétal	13
2.1.2 Les produits chimiques	13
2.2-METHODES	16
2.2.1 Méthodes d'extraction	16
2.2.1.1 Extraction à froid	16
2.2.1.2 Extraction à chaud.....	16
2.2.2 Méthodes de purification	16
2.2.2.1 Précipitation par l'éthanol 50%.....	16
2.2.2.2 Traitement par l'acétate neutre de plomb.....	17
2.2.2.3 Dialyse	17
2.2.2.4 Précipitation par l'acétone	18
2.2.2.5. Précipitation par le n-butanol.....	18

2.2.3	Méthode de concentration	19
2.2.4	Méthode d'analyse	19
2.2.4.1	Chromatographie sur couche mince.....	19
2.2.4.2	Méthodes de criblage phytochimique	20
2.2.4.2.1	Préparation des extraits	20
2.2.4.2.1	Les alcaloïdes	21
2.2.4.2.2	Désoxyoses	21
2.2.4.2.3	Flavonoïdes: Test de WILSTÄTTER (test à la cyanidine).....	22
2.2.4.2.4	Leucoanthocyanes	22
2.2.4.2.5	Stéroïdes, triterpènes et stérols insaturés.....	22
2.2.4.2.6	Saponines.....	23
2.2.5	Calcul du rendement.....	23
3	RESULTATS	23
3.1	EXTRACTION	23
3.1.1	Extraction à froid.....	23
3.1.1.1	Extraction aqueuse	23
3.1.1.2	Extraction hydroéthanolique	24
3.1.2	Extraction à chaud	24
3.1.2.1	Extraction aqueuse	24
3.1.2.2	Extraction hydroéthanolique	25
3.2	PURIFICATION.....	25
3.2.1	Méthodes retenues dans le protocole de purification	25
3.2.1.1	Précipitation par l'éthanol 50%.....	25
3.2.1.2	Dialyse	25
3.2.1.3	Fractionnement par le n-butanol	25
3.2.2	Méthodes testées mais non retenues dans le procédé de la purification	26
3.2.2.1	Précipitation par l'acétate neutre de plomb.....	26

3.2.2.2 Précipitation par l'acétone	27
3.3 ANALYSE DES EXTRAITS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE	27
3.4 RENDEMENTS.....	28
3.5 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PRINCIPES TOXIQUES	28
3.6 NATURE CHIMIQUE.....	29
DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	31
ETUDE TOXICOLOGIQUE	33
1 INTRODUCTION	33
2 MATERIELS	33
2.1 LES ANIMAUX D'EXPERIMENTATION	33
2.1.1 Les souris.....	33
2.1.2 Les têtards de grenouille.....	33
2.1.3 Les larves de moustique	33
2.1.4 Les alevins de poissons.....	33
2.1.5 Les plantes d'expérimentation.....	34
2.1.6 Les souches microbiennes utilisées comme germes-tests.....	35
3 METHODES	35
3.1 METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES ANIMAUX	35
3.1.1 Les animaux à sang chaud.....	35
3.1.1.1 Estimation de la toxicité des extraits.....	35
3.1.1.2 Détermination de la DL50 (24h).....	35
3.1.2 Test hémolytique.....	36
3.1.2.1 Principe	36
3.1.2.2. Mode opératoire	36
3.1.3 Tests sur les animaux à sang froid	37
3.1.3.1 Principe	37
3.1.3.2. Mode opératoire	37

3.1.3.3. Test sur les alevins de carpe.....	38
3.1.3.4 Test sur les têtards de grenouille.....	38
3.1.3.5 Test sur larves de moustique	38
3.1.4 Méthodes d'étude sur des effets sur les végétaux	39
3.1.4.1 Méthodes d'étude des effets sur le pouvoir germinatif des graines	39
3.1.4.2 Test sur la croissance des jeunes plantules	39
3.1.4.3 Méthodes d'étude des effets sur le développement des bourgeons axillaires	40
3.1.5 Méthodes d'étude des effets sur la croissance des micro-organismes	40
3.1.5.1 Stérilisation	40
3.1.5.2 Étude de l'activité antimicrobienne	41
4-RESULTATS	43
4.1 EFFETS DE L'EXTRAIT SUR LES ANIMAUX.....	43
4.1.1 EFFET SUR LES ANIMAUX A SANG CHAUD.....	43
4.1.1.1 Effets sur la souris.....	43
4.1.1.2 Effet des extraits sur les hématies de mouton	45
4.1.2. Effets de l'extrait brut sur les animaux à sang froid.....	46
4.1.2.1. Effet de l'extrait brut sur les alevins de carpe.....	46
4.1.2.2. Effets sur les têtards de grenouille	47
4.1.2.3. Effets sur les larves de moustique.....	48
4.2. EFFETS DES EXTRAITS SUR LES VEGETAUX.....	48
4.2.1. Effet de l'extrait brut sur la germination des graines.....	48
4.2.2 Effets de l'extrait brut sur la croissance des jeunes plantules.....	50
4.2.3 Effet des extraits sur la levée de dominance apicale	53
4.3. EFFETS DE L'EXTRAIT BRUT ET L'EXTRAIT PUR SUR LES MICROORGANISMES	54
DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	56
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	58

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES61

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 prodigué tout au long de ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent à Madame le Professeur RAKOTO RANOROMALALA Danielle A. Doll et Madame le Docteur RAZAFIARIMANGA Zara 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

ANP : Acétate Neutre de Plomb

ATCC : American Type Culture Collection

BAE : Butanol/Acide acétique/Eau

CL50 : Concentration létale à 50%

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CMB : Concentration Maximale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

ip : intrapéritonéale

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CNRE : Centre National de Recherche sur l'Environnement

DL50 : Dose létale à 50%

EB : Extrait Brut

IPM : Institut Pasteur de Madagascar

LMG: Laboratorium voor Microbiologie Universiteit Gent Belgium

LABASM : Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales

p/p : poids par poids

p/v : poids par volume

qsq : en quantité suffisante pour

UV : ultraviolet

GLOSSAIRE

- **Ataxie** : incapacité à coordonner les mouvements
- **Convulsions toniques** : contractions brèves et répétées à courts intervalles
- **Exophtalmie** : grande ouverture des paupières et protubérance des yeux donnant l'impression d'une sortie des de leurs orbites
- **Hyperhémie** : dilatation des vaisseaux sanguins visible sous la peau
- **Pathogène** : qui entraîne une maladie
- **Paralysie flasque** : diminution de la motricité liée à une atteinte du neurone proximal situé dans le système nerveux central.

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau n°1</u> : Les différentes espèces de <i>Pittosporum</i> étudiées au LABASM.....	7
<u>Tableau n°2</u> : Effets des différentes espèces de <i>Pittosporum</i> étudiées au LABASM sur les animaux.....	8
<u>Tableau n°3</u> : CMI (mg/ml) et CMB (mg/ml) des principes actifs des différentes espèces de <i>Pittosporum</i> sur les souches sensibles	9
<u>Tableau n°4</u> : Effets des différentes espèces de <i>Pittosporum</i> étudiées au LABASM sur les végétaux.....	10
<u>Tableau 5</u> : Caractéristiques des extraits bruts obtenus par les différentes méthodes d'extraction	24
<u>Tableau n°6</u> : Résultats du criblage phytochimique de EB et E ₃	29
<u>Tableau n°7</u> : Les plantes d'expérimentation	34
<u>Tableau n°8</u> : Composition du milieu pour le test hémolytique	37
<u>Tableau n°9</u> : Normes utilisées pour les tests de sensibilité des microorganismes	42
<u>Tableau n°10</u> : Résultats de la détermination de la DL50 (24 h) sur la souris	44
<u>Tableau 11</u> : Données utilisées pour l'estimation de la DL50 (24h) de l'extrait E3 par la méthode graphique des totaux cumulatifs	44
<u>Tableau n°12</u> : Activité hémolytique d'EB et E ₃ à différentes concentrations sur les hématies de mouton	45
<u>Tableau n°13</u> : Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur les alevins de carpe ...	47
<u>Tableau n°14</u> : Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur les têtards de grenouille.....	48
<u>Tableau n°15</u> : Effets de l'extrait brut à 1mg/ml sur la germination de diverses graines.....	49
<u>Tableau n°16</u> : Longueur des bourgeons axillaires (mm) en présence des hormones et des extraits (50 µg)	53
<u>Tableau n°17</u> : Caractères des souches utilisées.....	54
<u>Tableau n°18</u> : Effets des extraits sur les germes par la méthode des disques	55

LISTE DES FIGURES

Figure n°1 : <i>Pittosporum verticillatum</i> (feuilles et graines)	14
Figure n°2 : Distribution géographique de <i>Pittosporum verticillatum</i>	15
Figure n°3 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de purification des principes toxiques de l'écorce de tige de <i>Pittosporum verticillatum</i>	26
Figure n°4 : Chromatogramme montrant l'évolution de l'homogénéité des différents extraits dans le système BAE 60/20/20	28
Figure 5 : Détermination de la DL ₅₀ (24 h) par la méthode graphique de REED et MUENCH. 45	
Figure 6 : Effet des différentes concentrations des extraits (EB et E3) sur les hématies de moutons.....	46.
Figure 7 : Schéma résumant les différentes étapes de l'expérience sur les effets de l'extrait brut sur la croissance des jeunes plantules	50
Figure 8 : Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur la croissance des épicotyles de riz	51
Figure 9 : Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur la croissance des hypocotyles de riz.....	51
Figure 10 : Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur la croissance des épicotyles de petit pois	52
Figure 11 : Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur la croissance des hypocotyles de petit pois	52

INTRODUCTION

GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Une substance est appelée poison ou toxique lorsque, après pénétration dans l'organisme par quelque voie que ce soit à une dose relativement élevée ou à petites doses, elle provoque des troubles d'une ou de plusieurs fonctions de l'organisme de façon passagère ou permanente et peut amener la mort.

Les toxines sont des poisons d'origine naturelle pouvant provenir d'animaux, végétaux ou de microorganismes.

La connaissance et l'utilisation des poisons remontent à des temps très anciens. Malgré les risques liés à la manipulation des poisons, l'homme a toujours su en tirer profit pour subvenir à ses besoins de base. D'une part, ils sont destinés à plusieurs fins comme la chasse, la pêche, la lutte contre les animaux nuisibles ou la justice populaire, mais d'autre part, ils peuvent être employés à des fins thérapeutiques. A titre d'exemples, on peut citer :

- pour la pêche : les appâts préparés avec des extraits d'*Euphorbia laro* (Euphorbiacées) qui sont très toxiques pour les poissons (RAHERINIAINA, 2004);
- pour la chasse: la confection des flèches empoisonnées par les Indiens d'Amérique à partir de *Chondrodendron tomentosum* (Ménispermacées) (BRUNETON, 1993);
- pour rendre la justice : le *tangena* (*Cerbera venenifera*) dans le rituel malagasy est utilisé pour prouver la culpabilité ou l'innocence d'un suspect.

Par ailleurs, pour traiter certaines maladies, des venins d'animaux peuvent être utilisés. Ainsi, le venin de crapaud sert à soigner les maladies du cœur et l'ascite (HABERMEHL, 1981).

Enfin, les toxines ont servi d'outils pour élucider des voies métaboliques et des phénomènes biologiques. A titre d'exemples :

- La toxine tétanique produite par la bactérie *Clostridium tetani* a contribué à l'élucidation du fonctionnement du système nerveux (BIZZINI, 1997) ;
- Les neurotoxines de cobra qui agissent au niveau de la plaque motrice et bloquent la conduction neuromusculaire ont permis de comprendre le fonctionnement de notre appareil neuromusculaire (BELLEFLEUR et DANTEC, 2005) ;

- La colicine E₃, une toxine isolée d'*Escherichia coli* a été utilisée dans la compréhension de la structure et de la fonction des membranes (HOLLAND, 1997).

D'après la littérature, la flore malgache comporte plusieurs espèces toxiques (PERNET et MEYER, 1957 ; BOITEAU, 1979). Cependant, beaucoup d'entre elles n'ont pas encore fait l'objet d'investigations chimiques et biologiques approfondies. C'est pourquoi, le Laboratoire de Biochimie appliquée aux Sciences médicales (LABASM) de la Faculté des Sciences (Université d'Antananarivo) a orienté depuis quelques années ses travaux de recherche vers l'étude chimique et toxicologique des principes actifs des plantes issues de différentes familles. Parmi les plantes déjà étudiées, on peut citer :

- *Ravensara anisata*, Lauracée (RAHANTARINORO, 2004) ;
- *Henonia scoparia*, Amaranthacée (RAMAHAFALY, 2002) ;
- *Mimusops commersonii*, Sapotacée (RAKOTOARIVELO, 2004) ;
- *Boletus affinis* Peck, Boletacée (RAZANAMPARANY, 1987) ;
- *Albizia lebbeck* (ANDRIANTSOA, 1983) ; *Albizia arenicola* (RANDRIANARIVO, 1996 et 2003) ; *Albizia bernieri* (RAHARISOA, 1999) ; *Albizia odorata* (RAJEMARIMOELISOA, 2000) ; *Albizia boinensis* (AHMED, 2009) ; *Albizia mahalao* (RAKOTOARIVONY, 2012), des Fabacées ;
- *Tachiadenus longiflorus*, Gentianacée (RAKOTO-RANOROMALALA, 1989) ;
- *Xerosicyos danguyi* et *Xerosicyos perrieri*, Cucurbitacées (RANDRIAMIHARISOA, 2000).

Pour notre part, notre choix s'est fixé sur les principes actifs de l'écorce de tige de *Pittosporum veticillatum*, une Pittosporacée malgache, pour les raisons suivantes :

- l'endémicité de la plante (PERNET et MEYER, 1957) ;
- l'activité sur souris mise en évidence lors des tests préliminaires ;
- les études effectuées sur les principes actifs contenus dans les feuilles de cette plante (ARIJAONA, 2005) ;
- les utilisations thérapeutiques empiriques de l'infusion et du décocté de feuilles et d'écorces de la plante (pour soigner les ballonnements abdominaux et les palpitations cardiaques) (BOITEAU, 1993 ; GEORGE et SCHATZ, 2001) ;

Introduction

- les vertus médicinales de certaines autres espèces de cette famille (voir Synthèse bibliographique).

Le présent travail est subdivisé en deux grandes parties :

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

Les deux parties sont précédées d'une introduction générale incluant une synthèse bibliographique, et suivies d'une conclusion générale accompagnée des perspectives d'avenir.

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Pittosporum comme ce nom latin l'indique, est un arbre ou arbuste de la famille des Pittosporacées. *Pittosporum* est une plante cultivée pour l'ornement ; sa jolie fleur blanche dégage un doux parfum mais le fruit n'est pas comestible à cause de sa toxicité. Il existe environ 200 espèces de *Pittosporum* dans le monde (Afrique, Asie, Inde, Nouvelle Zélande, Madagascar). Elle pousse sur sol ordinaire et vit dans des endroits ensoleillés et abrités des vents frais.

1-DESCRIPTION BOTANIQUE

Le genre *Pittosporum* appartenant à la 92^{ème} famille renferme 11 espèces endémiques à Madagascar. Ce genre est distribué sur l'ensemble des forêts humides, subhumides et de montagne. Les feuilles sont simples et groupées en pseudo-verticille au sommet de l'axe. Ses fruits de couleur jaune à rouge orange se fendant en révélant des graines irrégulièrement prismatiques, résineuses et albuminées.

Pittosporum verticillatum est un arbre de 5 à 10 m de haut. L'écorce de tige est de couleur brun clair. Les feuilles sont alternes groupées aux extrémités des branches, longuement atténuées en un pétiole pouvant atteindre 8 cm de long et de 2,5 cm de large. Les fleurs petites, de couleur blanche dégagent une odeur agréable. Les fruits de couleur rouge orange sont sphériques.

2- USAGES TRADITIONNELS

Les représentants du genre *Pittosporum* sont largement utilisés en médecine traditionnelle. Ainsi:

-*Pittosporum senacia* est utilisée par les villageois pour soigner les piqûres d'araignées venimeuses (BOITEAU, 1986 ; RABESA, 1986 ; PERNET, 1957) ;

-*Pittosporum verticillatum* est utilisée pour soigner les ballonnements abdominaux et les palpitations cardiaques (BOITEAU, 1986 ; RABESA, 1986) ;

-*Pittosporum ochrosiaefolium* donne une infusion de tige qui sert à calmer le maux de ventre ; l'infusion de feuilles sert à soigner la blennorragie et les feuilles mâchées sont des antidotes des piqûres d'araignées venimeuses (BOITEAU, 1986 ; RABESA, 1986 ; PERNET, 1957).

3- PITTOSPORUM ETUDIÉES AU LABASM

Trois espèces de *Pittosporum* endémiques de Madagascar ont fait l'objet d'études poussées au LABASM (Tableau n°1).

Tableau n°1 : Les différentes espèces de *Pittosporum* étudiées au LABASM

Espèce	Organe utilisé	Référence
<i>Pittosporum ochrosiaefolium</i>	feuilles	ANDRIANTSOANIRINA (2006)
<i>Pittosporum senacia</i>	feuilles	RAZAFINTSALAMA (2006)
<i>Pittosporum verticillatum</i>	feuilles	ARIJAONA (2005)

Principes actifs :

D'après les études chimiques effectuées sur ces trois espèces de *Pittosporum*, leurs principes actifs seraient des polyphénols (sauf *Pittosporum verticillatum*), des saponines, des stéroïdes, des triterpènes et des stérols insaturés.

Propriétés biologiques :

Les trois espèces de *Pittosporum* étudiées au LABASM présentent une activité sur les animaux, les végétaux et les microorganismes.

➤ Effets sur les animaux :

Les principes actifs sont toxiques pour les souris (*Mus musculus*), les alevins de carpe (*Cyprinus carpio*), les têtards de grenouille sans patte (*Ptychadena mascarensis*) (tableau n°2).

Tableau n°2 : Effets des différentes espèces de *Pittosporum* étudiées au LABASM sur les animaux

Espèce	Nature des principes actifs	Extrait utilisé	DL ₅₀ (24h) sur les souris en mg/kg	CL ₅₀ (24h) sur les têtards de grenouille en µg/ml	CL ₅₀ (24h) sur les alevins de carpe en µg/ml
<i>Pittosporum senacia</i>	Saponine à génine triterpénique	Extrait purifié	26,05 à 27,41	28,4	27,54
<i>Pittosporum ochrosiaefolium</i>	Saponine à génine triterpénique	Extrait purifié	23,22 à 23,24	13,48	6,025
<i>Pittosporum verticillatum</i>	Saponine à génine triterpénique et stéroïdique	Extrait purifié	43,65 à 49,15	3,6	2,39

➤ Effets sur les microorganismes :

Les principes actifs inhibent la croissance des bactéries *Staphylococcus aureus* et *Shigella boydii* et de la levure *Candida albicans* (tableau n°3).

Tableau n°3 : CMI et CMB des principes actifs des différentes espèces de *Pittosporum* sur les souches sensibles

Espèces	Souche sensible	CMI(mg/ml)	CMB (mg/ml)
<i>Pittosporum senacia</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	EB : 1,2 EP : 5,9	EB : 9,6 EP : 11,9
<i>Pittosporum ochrosiaefolium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	EB : 7,033 EP : 3,802	EB : 14,067 EP : 28,135
	<i>Candida albicans</i>	EB : 28,135 EP : 7,607	EB : 28,135 EP : 15,215
<i>Pittosporum verticillatum</i>	<i>Shigellaboydii</i>	n.d	n.d

EB : extrait brut

EP : extrait purifié

n.d : non déterminé

➤ Effets sur les végétaux :

Les différents extraits issus des *Pittosporum* sont actifs sur quelques plantes potagères Monocotylédones et Dicotylédones et inhibent la croissance des jeunes plantules. Les résultats sont résumés dans le tableau n°4.

Tableau n°4 : Effets des différentes espèces de *Pittosporum* étudiées au LABASM sur les végétaux

Espèce	Extrait utilisé	Graine inhibée	Jeune plantule inhibée
<i>Pittosporum senacia</i>	Extrait brut	<i>Solanum nigrum</i>	Riz et haricot
<i>Pittosporum ochrosiaefolium</i>	Extrait brut	<i>Morelle noire</i>	Riz et haricot
<i>Pittosporum verticillatum</i>	Extrait brut	<i>Brassica sp</i>	Riz et petit pois

PREMIERE PARTIE :

ETUDE

CHIMIQUE

ETUDE CHIMIQUE

1-INTRODUCTION

Une étude approfondie sur les principes toxiques de feuilles de *Pittosporum verticillatum* a déjà été faite (ARIJAONA, 2005, voir synthèse) .Dans la présente partie du mémoire, nous avons:

- travaillé sur l'écorce de tige comme source de toxines, l'objectif étant de vérifier si ces deux organes contiennent les mêmes principes ou des composés différents ;
- testé plusieurs techniques d'extraction du (ou des) principe(s) toxique(s);
- purifié le(s) principe(s) toxique(s) ;
- étudié les propriétés physico-chimiques du (ou des) principe(s) toxique(s);
- déterminé sa (ou leur) nature chimique.

2-MATERIELS ET METHODES

2.1 MATERIELS

2.1.1 Matériel végétal

2.1.1.1 Classification

Règne : PLANTEA

Embranchement : TRACHEOPHYTA

Classe : MAGNOLIOPSIDA

Sous-classe : ROSIDEAE

Ordre : ROSALES

Famille : PITTOSPORACEAE

Genre : *Pittosporum*

Espèce : *verticillatum*

Noms vernaculaires : maimbovitsika, ambovitsika, fandoambolo

2.1.1.2 Description botanique

La description botanique détaillée est donnée dans la synthèse bibliographique (p. 3) et la plante est montrée sur la figure n°1(p. 14).

2.1.1.3 Distribution géographique et lieu de récolte

L'espèce *verticillatum* est rencontrée à l'Est de Madagascar. On peut aussi la trouver dans le nord-est et le sud-est de l'Île (figure n°2).

Nous avons récolté la plante dans la région de Mandraka en juillet 2013, période où la plante était au stade végétatif.

2.1.1.4 Préparation et conservation du matériel végétal

L'écorce de tige constitue le matériel d'étude. Les écorces sont détachées de la tige et séchées à l'air libre pendant quelques semaines. Elle est broyée à l'aide d'un broyeur BLENDER Robot Coupe(GT500).

Après tamisage, la poudre fine obtenue constitue notre matériel de départ. Elle est conservée à la température ambiante dans des bocaux hermétiques.

2.1.2 Les produits chimiques

La plupart des produits chimiques utilisés lors de notre analyse sont de qualité pure et de marque Merck, Prolabo, ou BDH.

Pour la chromatographie sur couche mince, le support utilisé est le gel de silice 60F254 (marque Merck, dimensions 20×20cm, épaisseur de la couche 0,2 mm).



a) Feuilles et fruits



b) Rameau

Figure n°1 : *Pittosporum verticillatum*

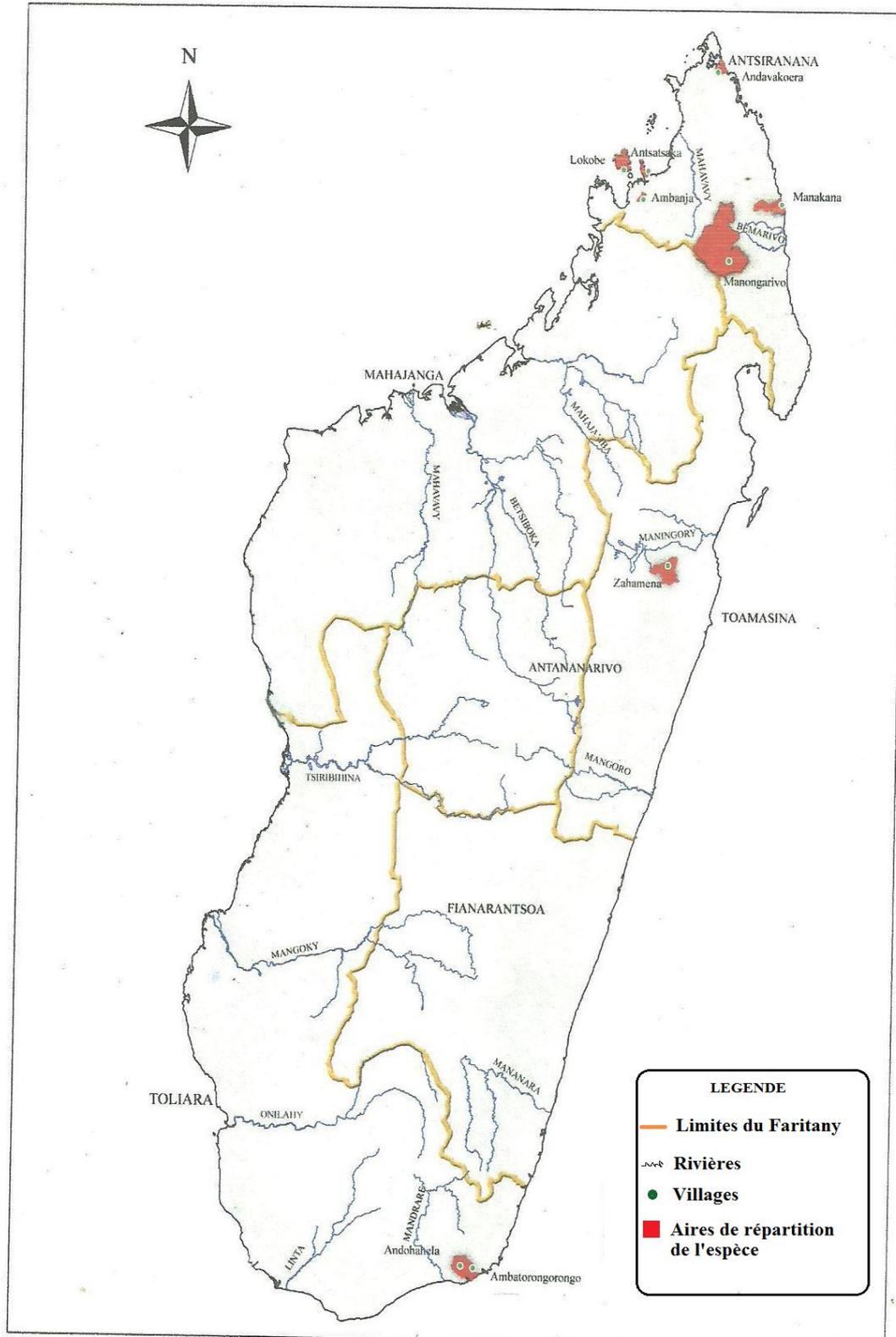


Figure n°2: Distribution géographique de *Pittosporum verticillatum* à Madagascar (source : <http://mobot.mobot.org/w3t/search/vast>) 2003.

2.2 METHODES

2.2.1 Méthodes d'extraction

2.2.1.1 Extraction à froid

La poudre végétale est délayée dans le solvant d'extraction (eau distillée ou mélange hydroéthanolique 75%) selon le rapport 1/10(p/v). Le mélange est soumis à une agitation magnétique pendant 3h à la température ambiante, puis laissé macérer à +4°C pendant une nuit.

Le macérat obtenu est filtré sur 4 épaisseurs de gaze. Le filtrat est ensuite centrifugé à 16000×g pendant 15min à l'aide d'une centrifugeuse JOUAN (modèle TH 12). Le culot est éliminé, alors que le volume du surnageant est réduit jusqu'au rapport 1/1(1ml pour 1g de matériel de départ) par évaporation au moyen d'un évaporateur rotatif (paragraphe 2.2.3.p. 13).

2.2.1.2 Extraction à chaud

La poudre végétale est mise en suspension dans le solvant d'extraction (eau distillée ou mélange hydroéthanolique 75%) selon le rapport 1/10(p/v). Le mélange est chauffé à reflux pendant 3h, sous agitation magnétique, puis laissé macérer pendant une nuit à +4°C. Le macérat obtenu subit le même procédé que pour une extraction à froid.

2.2.2 Méthodes de purification

(KAMOUN, 1977 ; AUDIGIE et coll., 1989 ; MAHUZIER et HAMON, 1990 ; BRUNETON, 1993)

2.2.2.1 Précipitation par l'éthanol 50%

a) Principe

Par addition d'un solvant organique miscible, le pouvoir dissolvant de l'eau diminue. En conséquence, les grosses molécules peu solubles précipitent.

b) Mode opératoire

Un volume déterminé du solvant (éthanol) est versé petit à petit sous agitation magnétique dans le même volume d'extrait à traiter. Le mélange obtenu est laissé reposer pendant 15min à +4°C.

Une centrifugation à 10000 tours/min pendant 15 min à l'aide d'une centrifugeuse JOUAN (modèle TH 12) est nécessaire pour séparer le précipité formé du surnageant, l'alcool est éliminé par évaporation, puis l'extrait est concentré jusqu'au rapport 1/1(p/v).

2.2.2.2 Traitement par l'acétate neutre de plomb

a) Principe

L'acétate neutre de plomb (ANP), comme tous les sels de métaux lourds, a la capacité de précipiter certaines macromolécules telles que les acides nucléiques, les polysaccharides et les protéines.

b) Mode opératoire

La solution d'ANP à 20% (p/v) de volume déterminé, est versée petit à petit dans l'extrait à traiter sous agitation magnétique. Le précipité formé est éliminé par centrifugation à 10000 tours/min pendant 15 min à l'aide d'une centrifugeuse HETTICH UNIVERSAL II.

L'excès de plomb est éliminé en le faisant précipiter par addition de phosphate disodique à 10% (p/v). L'ensemble est centrifugé dans les mêmes conditions que précédemment. Le surnageant est ramené à son volume initial par évaporation.

2.2.2.3 Dialyse

a) Principe

La dialyse est une technique de séparation des molécules en fonction de leur taille. La membrane poreuse du boudin de dialyse joue le rôle de tamis. Les molécules traversent la membrane en diffusant vers le liquide de contre-dialyse (à l'extérieur de la membrane). L'effet tamis explique la perméabilité à certaines substances et l'imperméabilité à d'autres en fonction de leur taille. Au cours de la dialyse, la diffusion des grosses molécules est lente ou nulle, celles des petites étant peu freinées par les frottements sur les parois. D'autres phénomènes peuvent aussi intervenir pendant la dialyse :

- l'adsorption de certains solutés à la membrane entraînant des modifications locales de concentration ;
- les phénomènes d'osmose.

b) Mode opératoire

b₁) Préparation de la membrane de dialyse

La membrane de dialyse est bouillie dans de l'eau distillée pendant 15 min afin d'éliminer la glycérine, les composés sulfurés et les métaux lourds qui la protègent. L'opération est répétée 3 fois. Après refroidissement, la membrane est conservée à +4°C dans la dernière eau bouillie. Avant l'utilisation, elle est de nouveau rincée à l'eau distillée.

b₂) Réalisation de la dialyse

Le boudin à dialyse contenant l'extrait à traiter est fermé à ses deux extrémités par un nœud placé dans un bécher et immergé dans le liquide de contre-dialyse (400 fois le volume de l'extrait). Pour éviter la formation de gradient de concentration au voisinage du boudin, une agitation magnétique de l'ensemble est nécessaire. Le liquide de contre-dialyse est renouvelé 3 fois, afin d'accélérer la disparition des substances diffusibles et maintenir la différence de concentration entre les 2 milieux.

2.2.2.4 Précipitation par l'acétone

a) Principe

Cette technique consiste à abaisser le pouvoir dissolvant du milieu par addition d'un solvant moins polaire miscible. Les substances peu solubles précipitent.

b) Mode opératoire

Le résidu d'évaporation à sec de l'extrait à traiter est repris dans du méthanol selon le rapport 1/10 (p/v).

Le mélange est agité jusqu'à l'obtention d'une solution homogène, puis le volume d'acétone nécessaire pour avoir une concentration finale de 80% (5 fois le volume de l'extrait méthanolique) est ajouté goutte à goutte dans la solution méthanolique. L'opération est effectuée dans un bac à glace sous agitation magnétique.

Le mélange est ensuite laissé au repos à +4°C jusqu'à décantation complète du précipité formé. Le surnageant est éliminé par aspiration, tandis que le précipité est abandonné à l'air libre jusqu'à la disparition de l'odeur du solvant. Il est ensuite repris dans de l'eau distillée. Une légère évaporation est effectuée pour éliminer les traces du solvant.

2.2.2.5. Précipitation par le n-butanol

a) Principe

Cette méthode est basée sur la partition des substances entre deux solvants non miscibles tels que le n-butanol et l'eau.

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) subit encore deux autres fractionnements successifs. Les trois extraits butanoliques ainsi obtenus sont rassemblés, additionnés d'un grand volume d'eau distillée et évaporés pour éliminer le solvant organique. Le butanol résiduel de la phase aqueuse est également éliminé par évaporation après ajout d'eau distillée.

2.2.3 Méthode de concentration

La réduction de volume ou l'évaporation à sec des différents extraits sont effectuées à la température 50 - 55°C à l'aide d'un évaporateur rotatif de marque Büchi (Rotavapor R110). La pression est réduite au moyen d'une pompe à vide.

2.2.4 Méthode d'analyse

2.2.4.1 Chromatographie sur couche mince

(RANDERATH, 1964 ; AUDIGIER et coll., 1989 ; MAHUZIER, 1990)

a) *Principe*

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode basée sur la séparation des substances en fonction de leurs affinités relatives pour un support hydrophile fixe et une phase organique mobile.

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

b) Mode opératoire

➤ Dépôt et développement

La plaque de gel de silice est découpée aux dimensions voulues. Les produits à analyser sont déposés à l'aide d'un capillaire en tirets de 7mm espacés de 6mm, à 1,5cm du bord inférieur et 1,3cm de chaque bord latéral de la plaque. Les dépôts sont ensuite séchés au séchoir à main. La plaque est ensuite plongée dans une cuve contenant le solvant de chromatographie dont l'atmosphère a été préalablement saturée par les vapeurs du solvant. Une chromatographie ascendante est effectuée. Quand le front du solvant arrive à 0,5cm du bord supérieur de la plaque, elle est retirée de la cuve, puis séchée au séchoir à main.

Le solvant utilisé est le système : Butanol/Acide acétique/Eau distillée (B/A/E) (60/20/20, P/P/P).

➤ **Révélation des chromatogrammes**

La révélation se fait par visualisation directe sous rayons ultraviolets à 2 longueurs d'ondes (254nm et 366nm). Ils sont ensuite révélés par pulvérisation du réactif à la vanilline sulfurique (la composition est donnée en Annexe3). Des taches roses apparaissent ; elles deviennent noires après chauffage à l'étuve à 120°C pendant 5 min.

2.2.4.2 Méthodes de criblage phytochimique

(FONG et coll., 1977 ; DALTON, 1979 ; CORDEL, 1981 ; BRUNETON, 1987; BRUNETON, 1993)

Pour chaque réaction de détection des familles chimiques, 1g de poudre végétale ou de résidu d'évaporation à sec de 1 ml d'extrait à tester est utilisé. Les tests sont effectués sur 4 extraits.

2.2.4.2.1 Préparation des extraits

a) Extrait aqueux

La poudre végétale ou le résidu d'évaporation à sec est délayé dans de l'eau distillée (10 ml). Après une légère agitation, le mélange est placé dans un bain-marie à 95°C pendant 30 min, laissé macérer à +4°C pendant une nuit, puis filtré. Le filtrat constitue l'extrait aqueux.

b) Extrait hydroéthanolique

Pour ce type d'extrait, la poudre végétale ou le résidu sec sont additionnés de mélange hydroéthanolique 75 % (10 ml). Le mélange est laissé macérer pendant 24h à +4°C puis filtré. Le filtrat obtenu constitue l'extrait hydroéthanolique.

c) Extrait acide

Pour préparer l'extrait acide, la poudre végétale ou le résidu sec sont laissés macérer pendant une nuit à +4°C dans de l'acide chlorhydrique (HCl) 12 N selon le rapport (1/10), (p/v). L'extrait est ensuite filtré. Le filtrat obtenu est appelé extrait acide.

d) Extrait chloroformique

L'extrait chloroformique est obtenu en mélangeant 1g de poudre végétale ou de résidu d'évaporation à sec de l'extrait à analyser avec 10 ml de chloroforme dans un tube à

essai hermétiquement fermé. Après agitation, la suspension est laissée macérer pendant une nuit à +4°C, puis filtré.

2.2.4.2.1 Les alcaloïdes

L'extrait acide est réparti dans 4 tubes à essai (0,5 ml/tube) dont l'un sert de témoin. Trois tests sont alors effectués avec les réactifs généraux des alcaloïdes.

La composition de ces réactifs est donnée en *Annexe II*.

a) Test de MAYER

L'extrait acide du 1^{er} tube est additionné de 4 à 5 gouttes de réactif de MAYER.

La présence d'alcaloïdes dans l'extrait est démontrée par l'apparition d'un précipité ou d'une floculation après addition du réactif.

b) Test de DRAGENDORFF

Dans le 2^{ème} tube, quatre à cinq gouttes de réactif de DRAGENDORFF sont ajoutées dans l'extrait à tester. L'apparition d'une précipitation ou d'une floculation dans l'extrait après addition du réactif indique la présence d'alcaloïdes.

c) Test de WAGNER

La formation d'un précipité dans le 3^{ème} tube, après ajout de quatre à cinq gouttes de réactif de WAGNER suggère la présence d'alcaloïdes.

L'obtention d'une réaction positive pour chaque test est la condition qui permet d'énoncer la présence d'alcaloïdes dans l'extrait testé. Un test de confirmation à l'éthanol 80% est cependant nécessaire pour confirmer la présence d'alcaloïdes. Ainsi, les réactions de détection des alcaloïdes sont dites positives si et seulement si le précipité formé dans chaque tube est soluble dans l'éthanol 180% de volume 0,5 ml.

2.2.4.2.2 Désoxyoses

A 0,5 ml d'extrait aqueux sont ajoutés successivement 0,5 ml de chlorure ferrique 10% et 0,5 ml d'acide acétique glacial. Après agitation, 0,3 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) 36,76 N est versé dans le tube à essai le long de la paroi.

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

2.2.4.2.3 Flavonoïdes: Test de WILSTÄTTER (test à la cyanidine)

La réaction à la cyanidine permet de mettre en évidence les flavones, les flavonols et les flavonones, par traitement par du magnésium chlorhydrique.

Deux tests sont effectués sur l'extrait hydroéthanolique. Trois tubes sont nécessaires, le premier servant de témoin.

Pour le premier test, 0,5 ml de HCl 12 N et deux tournures de magnésium sont ajoutés à 3ml d'extrait hydroéthanolique dans le 2^{ème} tube. Après 10 min, le changement de coloration est noté. Le virage au rouge révèle la présence de flavones, au rouge pourpre, celle des flavonols et au rouge violacé celle des flavonones.

2.2.4.2.4 Leucoanthocyanes

Pour détecter la présence de leucoanthocyanes, le test de BATE-SMITH est appliqué.

Du HCl 12 N de volume 0,5ml est additionné dans le 3^{ème} tube qui contient la solution hydroéthanolique 80%, puis le mélange est placé dans un bain-marie à 100°C pendant 30min.

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

2.2.4.2.5 Stéroïdes, triterpènes et stérols insaturés

L'extrait chloroformique est distribué dans 3 tubes à essai (1 ml/tube) dont le premier sert de témoin.

a) Test de LIEBERMANN-BURCHARD

Deux gouttes d'anhydride acétique sont ajoutées dans le deuxième tube. Le mélange est légèrement agité, puis quelques gouttes de H₂SO₄ 36N y sont ajoutées. L'évolution de la coloration est observée pendant 1h. Une coloration verdâtre dénote la présence de stéroïdes, tandis que l'apparition d'un anneau rouge ou violet indique la présence des triterpènes.

Les deux phénomènes peuvent être observés simultanément.

b) Test de SALKOWSKI

Un millilitre de H₂SO₄ 36N est versé dans le troisième tube en l'inclinant. L'apparition d'un anneau rouge au niveau de l'interface indique la présence de stérols insaturés.

2.2.4.2.6 Saponines

L'extrait aqueux obtenu est soumis à une agitation énergique pendant 3s. La présence de saponines se traduit par la formation d'une mousse de 3 cm de hauteur, qui persiste pendant 30min environ.

2.2.5 Calcul du rendement

Les extraits obtenus au cours des étapes d'extraction et de purification sont évaporés à sec et les résidus sont pesés afin de déterminer le rendement exprimé en pourcentage à partir de la formule suivante :

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

avec :

R : rendement

Pe : poids du ballon avec le résidu sec après évaporation (en g)

Pv : poids du ballon vide (en g)

M : poids du matériel végétal de départ (en g)

3-RESULTATS

Les principes toxiques sont thermostables d'après les expériences préliminaires. Ainsi, toutes les opérations de purification et d'extraction ont été effectuées à la température ambiante et la concentration des extraits ou l'évaporation des solvants à 55°C.

3.1 EXTRACTION

Plusieurs méthodes d'extraction à froid et à chaud ont été essayées à partir de la poudre d'écorce de tige.

3.1.1Extraction à froid

3.1.1.1 Extraction aqueuse

La poudre d'écorce de tige (20g) est mélangée à 200ml d'eau distillée. La suite des opérations est décrite au paragraphe 2.2.1.1 (p. 16).

3.1.1.2 Extraction hydroéthanolique

La poudre (20g) est extraite par le mélange hydroéthanolique 75%, selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.1.1 (p. 16).

3.1.2 Extraction à chaud

3.1.2.1 Extraction aqueuse

La poudre de matériel végétal (20g) est délayée dans 200ml d'eau distillée. La suite de l'extraction est décrite au paragraphe 2.2.1.2 (p. 16).

3.1.2.2 Extraction hydroéthanolique

Les étapes sont les mêmes que celles de l'extraction aqueuse à chaud, mais le solvant d'extraction est le mélange hydroéthanolique 75%. Les extraits bruts obtenus par les différentes méthodes ont été testés sur souris par voie ip (voir méthode au paragraphe 2.2.1.2, p. 16). Les résultats sont récapitulés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Caractéristiques des extraits bruts obtenus par les différentes méthodes d'extraction

Extrait brut	Aqueux à froid	Hydroéthanolique 75% à froid	Aqueux à chaud	Hydroéthanolique 75% à chaud
pH	5	5,30	4,6	5,22
Couleur	rouge brique	noir verdâtre	rouge rouille	rouge clair
Aspect	limpide	limpide	limpide	limpide
Consistance	fluide	fluide	fluide	fluide
Goût	amer	Amer	amer	amer
Toxicité	60 min	60 min	30 min	40 min

Ces résultats montrent que tous les extraits bruts (EB) sont toxiques sur souris. Cependant, la méthode d'extraction aqueuse à chaud a été adoptée pour la suite de notre étude pour les raisons suivantes :

- Le solvant est le moins coûteux ;
- L'EB aqueux à chaud s'avère le plus toxique.

- Pendant le chauffage, beaucoup de contaminants tels que les macromolécules et d'autres molécules thermostables ont été éliminées.

3.2 PURIFICATION

La purification est guidée par des tests de toxicité sur souris et l'homogénéité des extraits est appréciée par CCM. La purification des principes toxiques à partir de l'extrait brut fait appel à des techniques basées sur les différences de solubilité ou de poids moléculaire. Les méthodes non retenues dans le protocole de purification des extraits seront décrites pour les informations qu'elles apportent sur les principes toxiques.

3.2.1 Méthodes retenues dans le protocole de purification

3.2.1.1 Précipitation par l'éthanol 50%

L'EB (12,5 ml) est traité par l'éthanol 50%, selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.2.1 (p. 16). A la fin de l'opération, un surnageant limpide et de couleur marron café, toxique sur souris est obtenu. Il constitue l'extrait E₁. Le culot, repris dans l'eau distillée n'est pas toxique.

Cette technique permet d'éliminer quelques contaminants d'après l'analyse par CCM.

3.2.1.2 Dialyse

L'extrait E₁ précédent (11,5 ml) est dialysé contre de l'eau distillée selon la méthode décrite sur le paragraphe 2.2.2.3 (p. 17).

Le dialysant (liquide dans le boudin) et le dialysat (liquide qui sort du boudin) subissent une évaporation de manière à avoir un rapport 1/1(p/v).

D'après les tests réalisés sur les deux extraits, seul le dialysant provoque la mort des souris. Mais quelques symptômes sont observés pendant 45 min après l'injection du dialysat.

Le dialysant dénommé E₂ va donc subir l'étape suivante.

3.2.1.3 Fractionnement par le n-butanol

L'extrait E₂ (10 ml) est traité 3 fois par le n-butanol selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.2.4 (p. 18).

L'injection par voie ip de la phase organique provoque la mort des souris tandis que la phase aqueuse n'est pas toxique. Le chromatogramme de la phase organique montre peu de bandes majeures.

Le fractionnement par le n-butanol a été retenu dans le procédé de purification. La phase organique constitue l'extrait E₃.

Le procédé d'extraction et de purification des principes toxiques adopté est résumé sur la figure 3(p. 26).

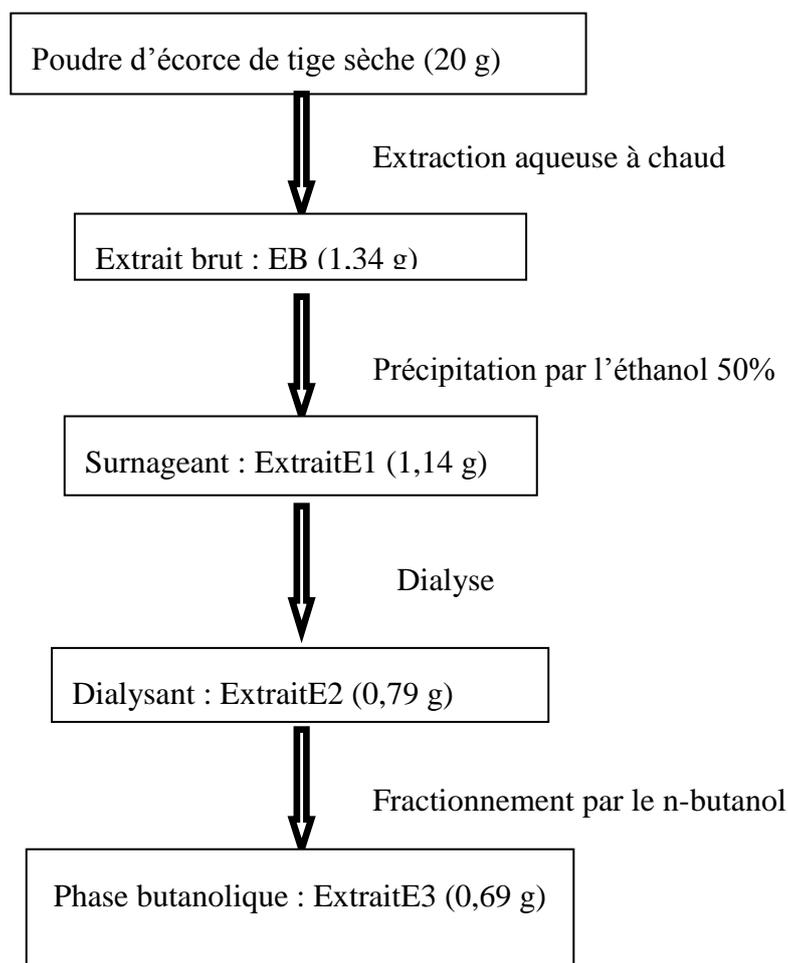


Figure n°3 : Schéma récapitulatif montrant les différentes étapes du procédé de purification des principes toxiques d'écorce de tige de *Pittosporum verticillatum*. Les chiffres représentent les poids des résidus d'évaporation à sec des extraits.

3.2.2 Méthodes testées mais non retenues dans le procédé de la purification

3.2.2.1 Précipitation par l'acétate neutre de plomb

L'EB de volume 2,5 ml subit un traitement par l'ANP à 20% de volume 0,1 ml selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.2.4 (p. 17). L'excès de plomb est éliminé par 0,1 ml de phosphate disodique (Na₂HPO₄ à 10%). Un extrait peu coloré, limpide est obtenu. Son

injection par voie ip chez la souris ne provoque que quelques symptômes qui disparaissent après 2h. Par conséquent, cette étape de purification n'a pas été retenue dans le procédé de purification.

La toxine est donc précipitée par l'ANP.

3.2.2.2 Précipitation par l'acétone

Selon la méthode décrite au paragraphe (2.2.2.4, p. 18) , 5ml d'EB sont traités par 10 ml d'acétone. Nous avons obtenu un surnageant limpide et non toxique. Le culot repris dans de l'eau distillée donne un extrait de couleur marron qui s'est avéré toxique. Cette technique n'a pas été retenue dans le procédé de la purification car la toxicité du précipité est inférieure à celle des autres extraits (temps de survie plus long).

3.3 ANALYSE DES EXTRAITS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

L'évolution de l'homogénéité des différents extraits au cours de la purification est montrée sur le chromatogramme de la figure 4(p. 19). Les différentes bandes, après avoir été observées à la lumière UV de longueurs d'ondes 254nm et 366nm, ont été révélées par le réactif à la vanilline sulfurique.

L'extrait brut comporte 8 bandes majeures revelables, alors que l'extrait E₃ n'en comporte que 3. La purification a donc permis d'éliminer 5 bandes majeures.

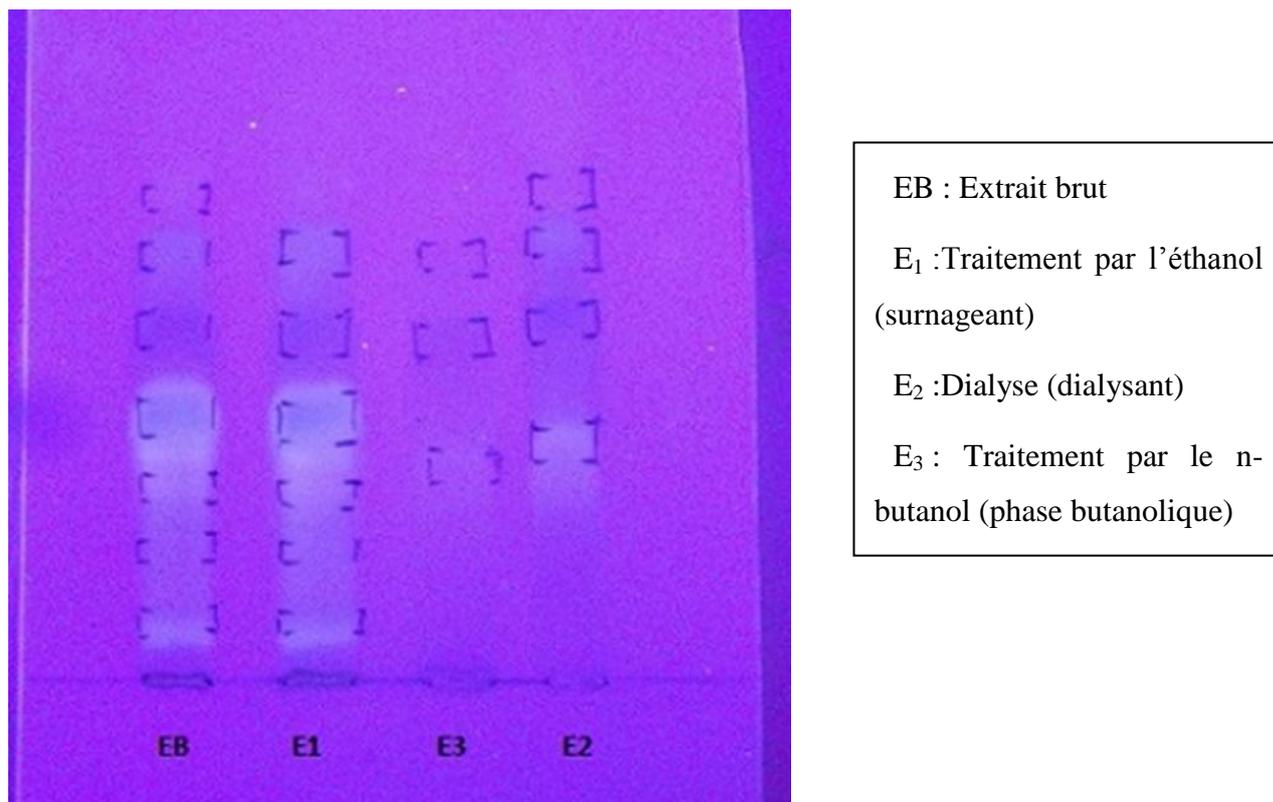


Figure n°4 : Chromatogramme montrant l'évolution de l'homogénéité des différents extraits dans le système BAE 60/20/20 (P/P/P) à 254 nm.

3.4 RENDEMENTS

A chaque étape de la purification, le résidu obtenu après évaporation à sec de l'extrait correspondant, est pesé. 20g de poudre de végétale donnent 1,34 g d'EB et 0,69 g de résidu sec de E₃. Le rendement de purification par rapport à l'extrait brut est de 51,49% et le rendement en toxines par rapport à la poudre d'écorce de tige est estimé à 3,45%.

3.5 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PRINCIPES TOXIQUES

D'après les techniques utilisées au cours de l'extraction et de purification, les principes toxiques de l'écorce de tige de *Pittosporum verticillatum* présentent les propriétés physico-chimiques suivantes :

- la poudre de l'écorce de tige a une odeur piquante;
- les principes sont thermostables, car ils résistent aux opérations de congélation et décongélation répétées;
- ils sont solubles dans l'eau, dans l'éthanol et dans des solvants organiques apolaires comme le n-butanol;

- ils sont précipitables par l'acétate neutre de plomb;
- ils sont incapables de traverser la membrane de boudin à dialyse à moins qu'ils n'interfèrent avec cette membrane;
- ils ont un goût amer.

3.6 NATURE CHIMIQUE

Un criblage phytochimique a été effectué sur l'extrait brut et l'extrait E₃ afin de cerner la nature chimique des principes toxiques. Les résultats sont présentés dans le tableau n°6.

Tableau n°6 : Résultats du criblage phytochimique d'EB et E₃

Famille chimique	TEST	RESULTAT	
		Extrait brut	Extrait E ₃
Alcaloïdes	Mayer	-	-
	Wagner	-	-
	Dragendorff	-	-
Flavonoïdes	Willstätter	-	-
Leucoanthocyanes	Bate-Smith	-	-
Tanins	Gélatine 1%	-	-
	Gélatine salée	-	-
Polyphénols	Chlorure ferrique	+	-
Stérols insaturés	Salkowski	+	+
Triterpènes	Liebermann-Burchard	-	-
Stéroïdes		+	+
Anthraquinones	Borntrager	-	-
Désoxyoses	Keller-Kiliani	+	+
Saponines	Indice de mousse	+	+

+ : Test positif

- : Test négatif

Etude chimique

Ce tableau montre que la poudre végétale et l'extrait E3 renferment des saponines, des désoxyoses, des stérols insaturés et des stéroïdes.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'étude chimique précédente a permis de mettre en évidence la présence des principes toxiques dans l'écorce de tige de *Pittosporum verticillatum*.

Plusieurs méthodes d'extraction ont été essayées. Elles ont permis d'obtenir des extraits bruts toxiques mais l'extraction aqueuse à chaud a été choisie car elle est la plus performante et la moins coûteuse. A partir de l'extrait brut aqueux à chaud, un procédé de purification comprenant une précipitation par l'éthanol 50%, une dialyse et un fractionnement par le n-butanol, a permis d'obtenir un extrait partiellement purifié composé de 3 bandes majeures. Le rendement de purification est de 51,49% et le rendement en toxines de 3,45%. Ces rendements sont comparables à ceux des extraits de feuilles qui sont de 52,8% et 4,4%, respectivement (ARIJAONA, 2005). Ces valeurs sont également similaires à celles de l'extrait de feuilles de *Pittosporum senacia* dont le rendement en toxines est de 5,4% (ANDRIANTSOANIRINA, 2006).

Les techniques que nous avons essayées, retenues ou non dans le procédé de purification, ont apporté des informations sur certaines propriétés physico-chimiques des principes toxiques. Ainsi, ce sont de composés thermostables, solubles dans les solvants polaires tels que l'eau, l'éthanol, méthanol et des solvants organiques le n-butanol. Les composés toxiques sont précipitables par les sels de métaux lourds comme l'ANP, ce qui suppose qu'ils pourraient présenter de groupement acide. Les toxines ne passent pas à travers la membrane de dialyse, ce qui porte à penser que leur poids moléculaire pourrait être supérieur à 15000 Da à condition qu'il n'y ait pas d'adsorption non spécifique sur la membrane de dialyse.

Le criblage de l'extrait brut et de l'extrait E₃ montre qu'ils contiennent des stérols insaturés et des stéroïdes. La présence de saponoside(s) a également été mise en évidence. Ainsi, les principes toxiques pourraient être des saponosides dont la génine serait un stérol insaturé ou un stéroïde. Ces résultats permettent d'avancer que la nature des principes actifs des feuilles (ARIJAONA, 2005) et des écorces de tige de *Pittosporum verticillatum* pourrait être la même. Cependant, des études de structures chimiques plus poussées sont nécessaires pour conclure de manière sûre. D'autre part, des saponines ont également été trouvées dans les extraits des autres plantes du genre *Pittosporum* étudiées au LABASM, mais leur génine est triterpénique.

DEUXIEME PARTIE :

ETUDE

TOXICOLOGIQUE

ETUDE TOXICOLOGIQUE

1 INTRODUCTION

Un extrait purifié E3 a été obtenu à partir de l'extrait brut (EB) issu de l'écorce de tige de *Pittosporum verticillatum*. Cette deuxième partie est consacrée à l'évaluation de la toxicité de l'EB et/ou E₃ sur différents systèmes biologiques. Ainsi, ces extraits ont été testés sur :

- des animaux à sang chaud et à sang froid ;
- des végétaux ;
- des microorganismes.

2 MATERIELS

2.1 LES ANIMAUX D'EXPERIMENTATION

2.1.1 Les souris

Les souris *Mus musculus* variété albinos issues de la souche « TANA-SWISS » utilisées pendant les tests, ont été fournies par l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM).

2.1.2 Les têtards de grenouille

Les têtards de grenouille *Ptychadena mascareniensis* utilisés sont au stade « sans pattes ». Ils sont capturés dans les plans d'eau des environs du campus universitaire 3 jours avant le test pour qu'ils s'adaptent aux conditions du laboratoire.

2.1.3 Les larves de moustique

Des larves du moustique *Culex quinquefasciatus* au stade 3 de développement, c'est-à-dire âgées de 6 à 7 jours, capturées dans les eaux stagnantes situées aux environs du campus universitaire ont été utilisées. Elles sont capturées le jour du test.

2.1.4 Les alevins de poisson

Des alevins de poisson du genre *Cyprinus carpio* de $2 \pm 0,5$ cm âgés de 2 mois, ont été utilisés pour le test. Ils ont été fournis par une ferme d'élevage située à Ambohimangakely (Antananarivo).

2.1.5 Les plantes d'expérimentation

Des graines sèches de plantes potagères Monocotylédones et de Dicotylédones ont été utilisées pour l'étude des effets sur les végétaux. Ces graines dont la liste est donnée dans le tableau n°7, proviennent d'un marchand de semences à Ambohipo.

Tableau n°7: Les plantes d'expérimentation

	Famille	Nom usuel	Nom scientifique
DICOTYLEDONES	APIACEAE	Carotte	<i>Daucus carotta</i>
		Persil	<i>Petroselinum crispum</i>
	BRASSICACEAE	Tissam white	<i>Brassica sp.</i>
	CUCURBITACEAE	Concombre	<i>Cucumis sp.</i>
	FABACEAE	Haricot blanc	<i>Phaseolus vulgaris</i>
		Petit pois	<i>Pisum sativum</i>
SOLANACEAE	Tomate	<i>Lycopersicum esculentum</i>	
MONOCOTYLEDONES	LILIACEAE	Oignon	<i>Allium cepa</i>
	POACEAE	Mais	<i>Zea mays</i>
		Riz	<i>Oryza sativa</i>

2.1.6 Les souches microbiennes utilisées comme germes-tests

Les souches pathogènes utilisées ont été isolées à partir de la collection des souches pathogènes fournie par le laboratoire de Microbiologie du CNRE (Centre National de Recherche sur l'Environnement).

2.1.7 Les milieux de culture

(DUMAS, 1953 ; LARPENT et LARPENT-GOURGAUD, 1997)

Les précultures microbiennes ont été préparées dans du bouillon nutritif de MUELLER-HINTON. Le milieu solide de MUELLER-HINTON a été utilisé pour l'étude de

l'activité sur les microorganismes. La composition de ces différents milieux est donnée en Annexe III.

3 METHODES

3.1 METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES ANIMAUX

3.1.1 Les animaux à sang chaud

3.1.1.1 Estimation de la toxicité des extraits

Il s'agit d'une observation, sur la souris, des modifications de leur comportement et de leur état physiologique après l'injection intrapéritonéale (ip), d'un volume de 0,3 ml d'extrait par 25 g d'animal. Chaque test nécessite deux lots d'animaux :

- le premier lot de souris qui reçoit de sérum physiologique, sert de témoin ;
- le deuxième lot est destiné au test.

3.1.1.2 Détermination de la DL50 (24h)

La DL50 (24 h) ou Dose létale 50% (24 h) est la dose qui tue 50% de souris testées après 24 h de test. Pour cela, 6 lots de 5 souris ont été testés avec 6 doses en progression géométrique de raison R déterminée.

La DL50 (24 h) est déterminée selon la méthode de REED et MUENCH (1938) de 2 manières :

- en utilisant la formule :

$$\log DL50 = \log B \frac{0,5 - N}{M - N}$$

avec :

B : dose immédiatement inférieure à la DL50

N : mortalité provoquée par la dose B

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

R : raison de la progression géométrique

En utilisant la méthode graphique : la valeur de la DL50 (24 h) est déterminée à partir de l'intersection de la courbe des totaux cumulatifs des survivants et de celle des totaux cumulatifs des morts en fonction des doses injectées.

3.1.2 Test hémolytique

3.1.2.1 Principe

Il s'agit d'une microméthode de titration basée sur la sédimentation des hématies intactes et sur la coloration en rouge du surnageant en cas d'hémolyse.

3.1.2.2. Mode opératoire

Le sang de mouton est lavé 3 fois en le mélangeant avec du sérum physiologique, puis en centrifugeant le mélange à 10 000 tours/min pendant 5 min (HETTICH UNIVERSAL II). Le surnageant est éliminé par aspiration tandis que le culot est récupéré. Le culot obtenu au troisième lavage constitue les 100% d'hématies. Cette dernière est diluée de moitié à l'aide du tampon PBS. C'est à partir de la suspension d'hématies à 50% obtenue que la suspension à 2% est préparée, par dilution avec du tampon PBS.

Le test est réalisé sur une microplaque à fond plat qui comprend 96 puits.

L'extrait à tester est dilué en cascade avec du PBS (coefficient de dilution $\frac{1}{2}$). Les puits de la microplaque sont remplis selon le tableau 8 (p. 38). La plaque est secouée très doucement, puis incubée dans une étuve à 37°C pendant 3 h.

Les essais sont réalisés en double pour chaque extrait à étudier.

Les résultats sont lus à l'œil nu :

- pour un test positif (hémolyse totale), le contenu des puits se colore en rouge ;
- pour un test négatif (absence d'hémolyse), le surnageant reste incolore avec un culot d'hématies au fond des puits ;
- dans le cas d'une hémolyse partielle, le liquide du surnageant se colore en rouge avec un culot d'hématies au fond du puits.

Tableau n°8 : Composition du milieu pour le test hémolytique

Puits n°	T+	T-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Extrait à étudier à 10mg/ml (µl)	0	0	0,024	0,049	0,09	0,196	0,39	0,78	1,56	3,125	6,25	12,5	25	50
PBS (µl)	0	50	49,97	49,95	49,9	49,80	49,61	49,22	48,44	46,87	43,75	37,5	25	0
Eau distillée (µl)	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hématies à 2%(µl)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Volume final du mélange (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Concentration finale d'extrait à étudier (mg/ml)	0	0	5×10^{-3}	0,01	0,02	0,04	0,08	0,15	0,31	0,62	1,25	2,5	5	10

3.1.3 Tests sur les animaux à sang froid

3.1.3.1 Principe

La technique consiste à tester la résistance d'animaux aquatiques vis-à-vis des principes actifs de l'extrait à étudier ajouté dans leurs milieux.

3.1.3.2. Mode opératoire

Des lots d'animaux sont sélectionnés, puis placés dans des cristallisoirs contenant 200 ml d'eau de pluie. Différentes quantités de la toxine à étudier sont ajoutées de manière à avoir différentes concentrations en progression géométrique. L'expérience dure 24h.

Détermination de la concentration létale 50% (CL50) 24h (BOYD, 1996).

La CL50 (24 h) ou la concentration qui tue 50% des animaux testés en 24 h, est déterminée par une méthode graphique, en appliquant la 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

$$Y=A+BX$$

Où :

Y = le % de mortalité

A = une constante

B = le coefficient de régression

X = le logarithme décimal de la concentration (log C)

3.1.3.3. Test sur les alevins de carpe

Sept lots de six alevins sont testés avec 7 concentrations différentes d'extrait à tester. Ces concentrations sont en progression géométrique.

3.1.3.4 Test sur les têtards de grenouille

Sept concentrations en progression géométrique d'extrait à étudier sont testées sur 7 lots de 7 têtards sans pattes.

3.1.3.5 Test sur larves de moustique

(OMS, 1970)

Six lots de 20 larves au stade 3 de développement sont placés dans six bocal contenant chacun 200 ml d'eau de pluie. Le 1^{er} lot sert de témoin. L'extrait à différentes concentrations est ajouté dans les cinq autres bocal. Les résultats sont observés au bout de 24 h.

Le pourcentage de mortalité se calcule en additionnant le nombre de larves moribondes et de larves mortes.

Les larves sont considérées comme :

- mortes, quand elles ne réagissent plus lorsqu'on les touche avec une aiguille dans la région cervicale ;
- moribondes, lorsqu'elles sont incapables de plonger ou de monter en surface quand on agite l'eau.

3.1.4 Méthodes d'étude des effets sur les végétaux

3.1.4.1 Méthodes d'étude des effets sur le pouvoir germinatif des graines

L'expérience consiste à étudier l'action des principes actifs sur le pouvoir germinatif de différentes graines appartenant à différentes familles végétales.

Les graines sont lavées à l'eau de javel 10% (eau de javel/eau de robinet ; 10/90 ; v/v) pour éliminer les organismes contaminants tels les champignons, ...

Pour chaque type de graines, deux lots sont préparés. Un lot est placé dans une boîte de Petri sur du coton imbibé d'extrait à une concentration déterminée. Le deuxième lot sert de témoin.

Les boîtes sont ensuite placées à l'obscurité à 30°C pendant 48 h.

La levée ou non de dormance de l'embryon, se traduisant par le développement ou non de l'hypocotyle et de l'épicotyle est observée à partir de ce jour.

3.1.4.2 Test sur la croissance des jeunes plantules

➤ Principe :

Les effets de l'extrait à tester à différentes concentrations sont observés sur la croissance des jeunes plantules de plantes potagères en mesurant la longueur de leurs épicotyles et hypocotyles. Les tests sont effectués sur un représentant des Monocotylédones et un représentant des Dicotylédones.

➤ Mode opératoire :

- Trempage :

Huit lots de 10 graines sont utilisés pour chaque plante-test. Ils sont trempés dans de l'eau de robinet et placés à l'obscurité pendant 48 h à la température ambiante.

- Germination :

Après 48 h, les 8 lots sont désinfectés par lavage à l'eau de javel 10%, puis rincés à l'eau distillée.

Sept lots sont mis à germer sur du coton imbibé d'extrait à différentes concentrations. Le dernier lot est mis à germer sur du coton imbibé d'eau (témoin).

Les plantules sont arrosées tous les 2 jours avec le même extrait.

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

3.1.4.3 Méthodes d'étude des effets sur le développement des bourgeons axillaires

(HELLER et coll., 1995)

Les effets stimulateurs ou inhibiteurs des principes toxiques sur le développement des bourgeons axillaires sont étudiés en se référant à l'action d'hormones stimulatrices et inhibitrices déjà connues (respectivement la gibbérelline et l'auxine).

Les effets sont estimés par la mesure de la croissance des bourgeons axillaires.

Des lots de jeunes plantules de petit pois âgés de 4 jours sont utilisés. Ces plantules sont préalablement décapitées au-dessus du deuxième bourgeon axillaire. Sur la partie sectionnée, 50 µg d'extrait à étudier ou d'hormone est déposé sous un volume de 1 µl. La solution déposée est enrobée dans de la lanoline qui sert de fixateur. Pour les lots témoins, 1 µl d'eau de robinet est utilisé.

Les effets des extraits et des hormones de référence sur le développement des bourgeons axillaires sont observés tous les 2 jours pendant 2 semaines. Les plantules sont arrosées quotidiennement à l'eau de robinet.

3.1.5 Méthodes d'étude des effets sur la croissance des microorganismes

3.1.5.1 Stérilisation

(LARPENT et LARPENT GOURGAUD, 1990 ; FERRON, 1994)

Le milieu de culture, les disques pour les tests d'antibiogramme, les cônes des micropipettes sont stérilisés à l'autoclave (Webeco) à 120°C, sous une pression de 2 bars pendant 20 min.

La verrerie et les pinces sont stérilisées à l'étuve (Jouan, B463) à 180°C pendant 1h.

Les extraits à étudier sont stérilisés par filtration sur filtres stériles Millipore (Sartorius, Minisart NML, diamètre des pores 0,22 µm).

3.1.5.2 Etude de l'activité antimicrobienne

(DUVAL et SOUSSY, 1990 ; LE MINOR et VERNON, 1989)

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

a) Principe

Quand un disque de papier chargé d'une quantité définie d'antibiotique est déposé à la surface d'un milieu gélosé préalablementensemencé avec une suspension de bactéries, l'antibiotique diffuse au sein de la gélose en créant une zone circulaire d'inhibition appelée halo d'inhibition ou auréole d'inhibition. Dans cette zone, les concentrations de l'antibiotique diminuent du centre du disque vers la périphérie. Le diamètre du halo d'inhibition varie en fonction du degré de sensibilité de la bactérie à l'antibiotique.

b) Mode opératoire

❖ Repiquage des souches et préparation de l'inoculum :

Une ansée de la souche à étudier est prélevée à partir d'une culture sur gélose-pente, puis ensemencée en stries à l'aide d'une anse de platine stérile sur le milieu gélosé de MUELLER-HINTON coulé dans une boîte de Petri. Le tout est incubé à 37°C pendant 24 h.

Une ansée est ensuite prélevée et mise en suspension dans un tube à essai contenant 10 ml de sérum physiologique. Une dilution appropriée doit être effectuée par lecture de densité optique (DO) pour avoir environ 10^6 cellules/ml (DO = 0,125 à 600 nm).

❖ Ensemencement du milieu :

La suspension est ensemencée selon la technique d'inondation dans des boîtes de Petri contenant le milieu gélosé. L'excès de liquide est aspiré à l'aide d'une pipette stérile après quelques minutes, quand les microorganismes ont bien adhéré au milieu.

❖ Mise en culture :

Les extraits à tester, préalablement stérilisés sont d'abord déposés sur des disques d'antibiogramme stériles à raison de 10 µl par disque, puis le tout est séché à l'air libre.

Les disques ainsi chargés sont ensuite déposés à la surface du milieu ensemencé à l'aide d'une pince fine stérile.

Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 h. Après l'incubation, les diamètres des halos d'inhibition sont mesurés.

Les résultats sont exprimés selon les normes présentées dans le tableau n°9.

Tableau n9: Normes utilisées pour les tests de sensibilité des microorganismes

Diamètre du halo (X)	Résultats
$X < 7 \text{ mm}$	-
$7 \text{ mm} \leq X < 8 \text{ mm}$	+
$8 \text{ mm} \leq X < 9 \text{ mm}$	++
$X > 9 \text{ mm}$	+++

4-RESULTATS

4.1 EFFETS DE L'EXTRAIT SUR LES ANIMAUX

4.1.1 EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG CHAUD

4.1.1.1 Effets sur la souris

a) Description des symptômes

L'injection de l'extrait E₃ par voie ip de la dose létale de 214 mg/kg entraîne chez la souris les symptômes suivants :

- juste après l'administration, la queue de l'animal se dresse perpendiculairement à son corps et son abdomen s'étire ;
- l'activité motrice diminue petit à petit 10 min après l'injection et une incoordination des membres est observée au cours de ses rares déplacements. En même temps une hyperhémie des oreilles est notée ;
- les pattes postérieures et les pattes antérieures montrent une paralysie flasque 15 min après l'injection ;
- une ataxie et une exophtalmie s'installent. Une convulsion tonique apparaît avant la mort de l'animal au bout de 30 min.

b) Description des symptômes développés après injection d'une dose sublétale

L'injection de E₃ à la dose sublétale 98,28 mg/kg chez la souris provoque les mêmes symptômes que la dose létale, à l'exception des convulsions. Les souris restent immobiles pendant quelques heures et une rémission progressive est observée au-delà de la troisième heure.

c) Détermination de la DL₅₀ (24 h)

La DL₅₀ (24 h) est déterminée selon la méthode de REED et MUENCH (1938) (voir méthode p. 36). Six lots de 5 souris mâles sont injectées par voie ip, de six doses en progression géométrique de raison $r = 1,25$, allant de la DL₀ = 98,28 mg/kg à la DL₁₀₀ = 300 mg/kg.

Les résultats expérimentaux sont résumés dans le tableau 10.

Tableau n°10: Résultats de la détermination de la DL50 (24 h) sur la souris

Dose en mg/kg de souris	Nombre de décès après :							Total des décès	Total des survivants	Taux de mortalité
	3h	6h	9h	12h	15h	18h	24h			
98,28	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0%
122,8	0	0	0	1	0	0	0	1	4	20%
153,6	0	0	2	0	0	0	0	2	3	40%
192	1	2	0	0	0	0	0	3	2	60%
240	2	1	0	0	0	0	0	3	2	60%
300	2	3	0	0	0	0	0	5	0	100%

D'après la relation de REED et MUENCH (1938), le $\log DL50 = 2,33$. La DL50 est ainsi évaluée à **214,28 mg/kg**.

Par la méthode graphique des totaux cumulatifs (REED et MUENCH, 1938), elle est estimée à 178 mg/kg (voir tableau n°11 et figure n°5).

Tableau 11 : Données utilisées pour l'estimation de la DL50 (24h) de l'extrait E₃ par la méthode graphique des totaux cumulatifs

Dose en mg/kg de souris	Nombre de souris testées	Nombre de survivantes	Nombre de mortes	Total cumulatif des survivantes	Total cumulatif des mortes
98,28	5	5	0	16	0
122,8	5	4	1	11	1
153,6	5	3	2	7	3
192	5	2	3	4	6
240	5	2	3	0	9
300	5	0	5	0	14

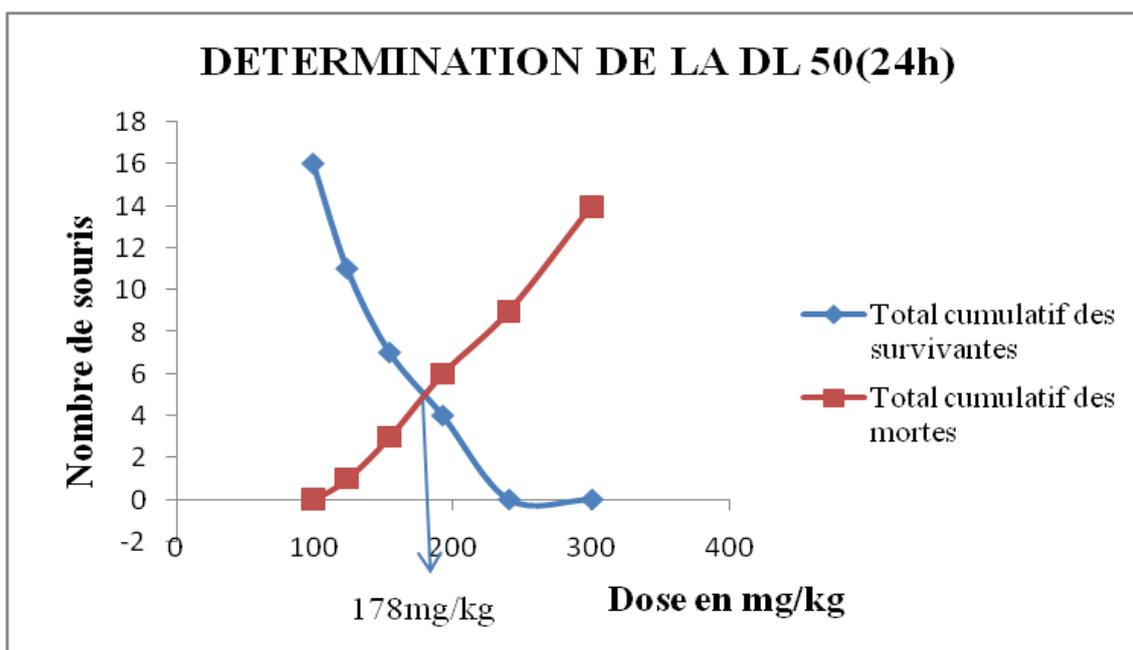


Figure 5 : Détermination de la DL50 (24 h) par la méthode graphique de REED et MUENCH (1938)

4.1.1.2 Effets des extraits sur les hématies de mouton

Le pouvoir hémolytique de l'EB et de l'extrait E₃ a été testé sur des suspensions d'hématies de mouton à 2% (voir méthode au paragraphe 3.1.2, p. 36). Les résultats de ce test sont montrés sur la figure n°6 et dans le tableau n°12.

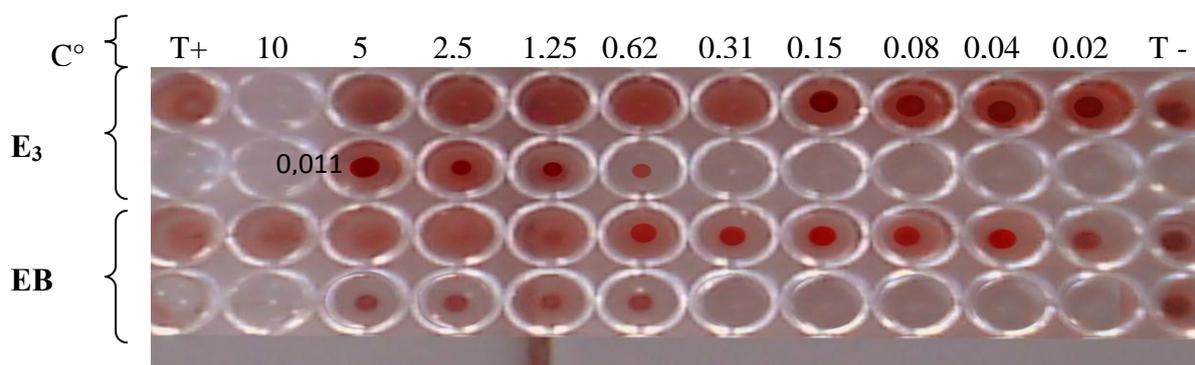
Tableau n°12: Activité hémolytique de l'EB et E₃ à différentes concentrations sur les hématies de mouton

Puits n°	T+	T-	12	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Concentration (mg/ml)	0	0	10	5	2,5	1,25	0,62	0,31	0,15	0,08	0,04	0,02	0,01	5×10 ⁻³
Extrait brut (µl)	+	-+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	-	-	-
E ₃ (µl)	+	-	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	-	-

++ : Hémolyse totale

+ : hémolyse partielle

- : absence d'hémolyse



C° : concentration en mg/ml

Figure 6 : Effet des différentes concentrations des extraits (EB et E3) sur les hématies de mouton

L'effet hémolytique est variable selon la concentration. Ainsi, il a été observé :

- une hémolyse totale à partir de 0,31mg/ml pour E₃ à des concentrations supérieures ou égales à 2,5 mg/ml pour l'EB ;
- une hémolyse partielle à des valeurs comprises entre 0,02mg/ml et 0,31mg/ml pour E₃ et entre 0,04 mg/ml et 1,25 mg/ml pour l'EB;
- une absence d'hémolyse à des concentrations inférieures ou égales à 0,01 mg/ml pour E₃ et à des concentrations inférieures ou égales à 0,02 mg/ml pour l'EB.

Ces résultats montrent qu'il y a eu augmentation de l'activité hémolytique au cours de l'étape de purification et confirment la présence de saponosides détectés lors du criblage phytochimique.

4.1.2. EFFETS DE L'EXTRAIT BRUT SUR LES ANIMAUX A SANG FROID

La méthode utilisée est décrite au paragraphe 3.1.3 (p. 37).

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

Sept lots de 6 alevins sont testés avec 6 concentrations de l'EB allant de 4,78 µg/ml à 9 µg/ml(en progression géométrique de raison r : 1,09).

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

Tableau n°13 : Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur les alevins de carpe

Lot n°	Concentration (µg/ml)	log C	Nombre d'alevins		Taux de mortalité
			morts	survivants	
1	4,78	0,679	0	6	0%
2	5,31	0,725	2	4	33,33%
3	5,9	0,77	2	4	33,33%
4	6,56	0,816	4	2	66,66%
5	7,29	0,862	4	2	66,66%
6	8,1	0,908	4	2	66,66%
7	9	0,954	6	0	100%

Les résultats obtenus montrent que l'EB exerce une activité toxique sur les poissons et que cette toxicité varie suivant la concentration.

L'équation de la droite de régression linéaire est $Y = -57,03 + 16,81X$ avec un coefficient de corrélation $r = 0,93$.

A partir de cette équation, la CL50 (24h) est estimée à **6,36 µg/ml**.

4.1.2.2. Effets sur les têtards de grenouille

Sept concentrations de l'extrait brut allant de 45,51 mg/kg à 61 mg/kg en progression géométrique de raison $r = 1,05$ ont été testées sur sept lots de 5 têtards de grenouille sans patte.

L'extrait brut est toxique sur les têtards d'après les résultats inscrits dans le tableau n°14.

Tableau n°14 : Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur les têtards de grenouille

Concentration en µg/ml	log C	Nombre de morts sur 5	Taux de mortalité
45,51	1,65	0	0%
47,79	1,67	1	20%
50,18	1,70	2	40%
52,69	1,72	3	60%
55,32	1,74	3	60%
58,09	1,76	5	100%
61	1,78	5	100%

L'équation de la droite de la droite de régression linéaire est $Y = -275,89 + 6,26X$ avec un coefficient de corrélation $r = 1,05$.

D'après cette équation la CL50 (24h) est évaluée à **52,04 µg/ml**.

4.1.2.3. Effets sur les larves de moustique

Cinq concentrations de l'EB allant de 1,13 mg/ml à 2 mg/ml sont utilisées selon la méthode décrite au paragraphe 3.1.3.5 (p. 38).

D'après les résultats, les larves de moustique sont insensibles à l'EB à la concentration 2 mg/ml. Par ailleurs, d'après la littérature, au delà de 2 mg/ml, l'extrait étudié ne peut plus être considéré comme toxique.

4.2. EFFETS DES EXTRAITS SUR LES VEGETAUX

4.2.1. Effet de l'extrait brut sur la germination des graines

Le but de cette expérience est de déterminer les effets de l'EB sur le pouvoir germinatif des graines. La méthode est décrite au paragraphe 3.1.4 (p. 39).

Les graines sont trempées dans l'eau, puis mises à germer dans l'EB. La concentration unique utilisée est de 1mg/ml. Les résultats sont récapitulés dans le tableau n°15 (p. 49).

Tableau n°15 : Effets de l'extrait brut à 1mg/ml sur la germination de diverses graines

Famille	Nom vernaculaire	Nom scientifique	Taux de germination
APIACEAE	Carotte	<i>Daucus carotta</i>	80%
BRASSICACEAE	Tissam white	<i>Brassica sp</i>	80%
CUCURBITACEAE	Concombre	<i>Cucumis sp</i>	90%
FABACEAE	Haricot blanc	<i>Phaseolus vulgaris</i>	90%
	Petit pois	<i>Pisum sativum</i>	100%
SOLANACEAE	Tomate	<i>Lycopersicum esculentum</i>	80%
AMARYLLIDACEAE	Poireau	<i>Allium ampeloprasum</i>	60%
LILIACEAE	Oignon	<i>Allium cepa</i>	20%
POACEAE	Riz	<i>Oryza sativa</i>	100%
	Maïs	<i>Zea maïs</i>	80%

D'après ces résultats nous pouvons conclure que :

- le petit pois et le riz sont insensibles à l'EB à 1 mg/ml car leur germination est de 100% ;
- pour les autres graines, la germination varie de 20%(oignon) à 60%(poireau).

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

Dans cette expérience, nous avons étudié les effets de l'EB à des doses plus élevées que 1 mg/ml sur un représentant des Dicotylédones (le petit pois) et des Monocotylédones (le riz).

L'expérience se déroule selon la méthode décrite au paragraphe.3.1.4.2 (p. 39).

Pour chaque plante potagère, 6 lots de 10 graines sont utilisés. Ils sont trempés dans de l'eau de robinet pendant 48 h à l'obscurité, puis 5 lots sont mis à germer en présence de l'EB à différentes concentrations allant de 0,9 mg/ml à 15 mg/ml, et arrosés avec les mêmes extraits. Le 7^{ème} lot servant de témoin est mis à germer dans l'eau de robinet et arrosé avec de l'eau de robinet. Les étapes du test sont résumées sur la figure 7 (p. 50).

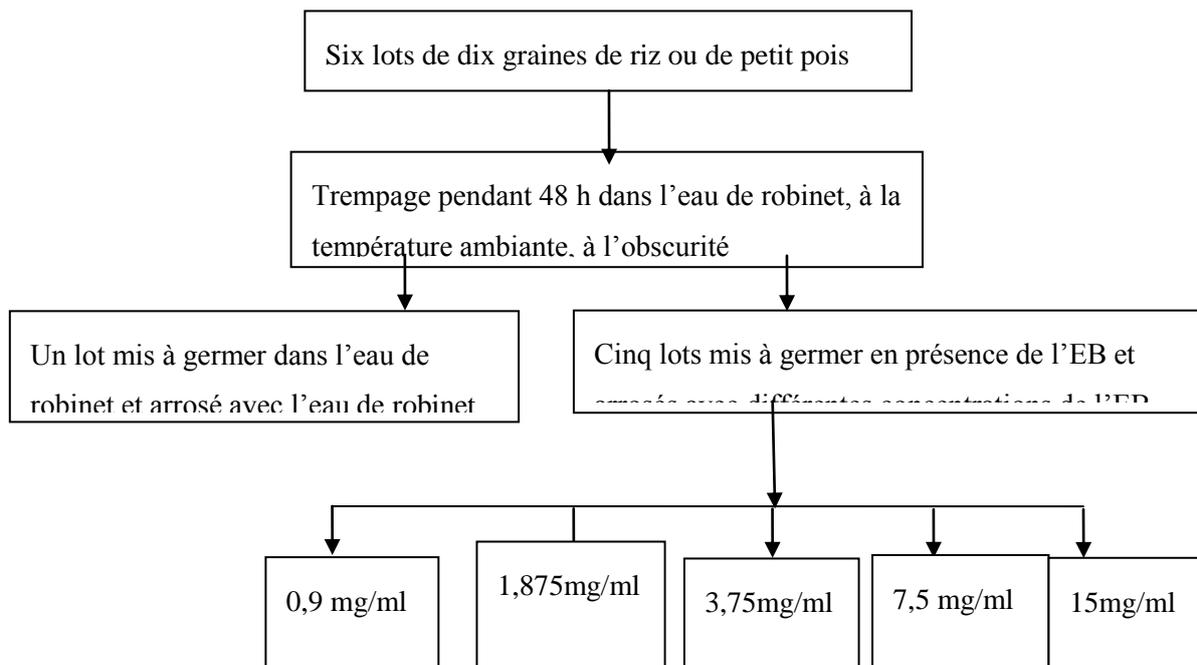


Figure 7 : Schéma résumant les différentes étapes de l'expérience sur les effets de l'extrait brut sur la croissance des jeunes plantules

La croissance des plantules est suivie pendant deux semaines en mesurant la longueur des hypocotyles et épicotyles tous les deux jours. Les résultats sont présentés sur les courbes des figures 8 à 12 (p. 52 à 53).

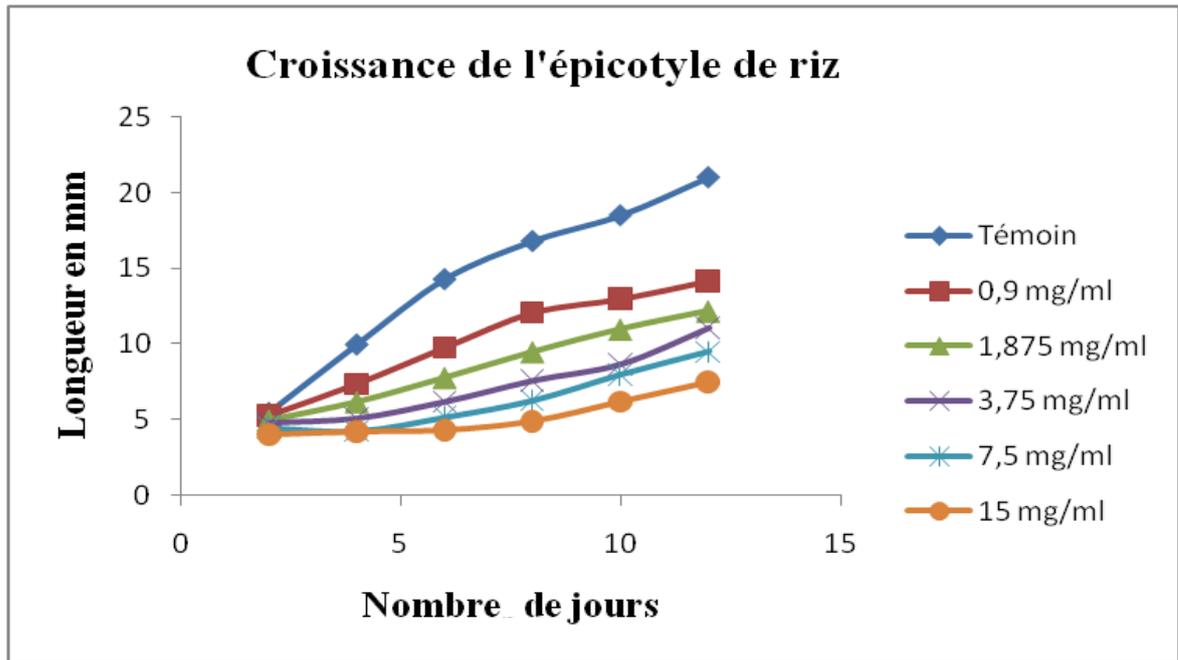


Figure 8 : Effets des différentes concentrations de l'extrait brut sur la croissance des épicotyles de riz

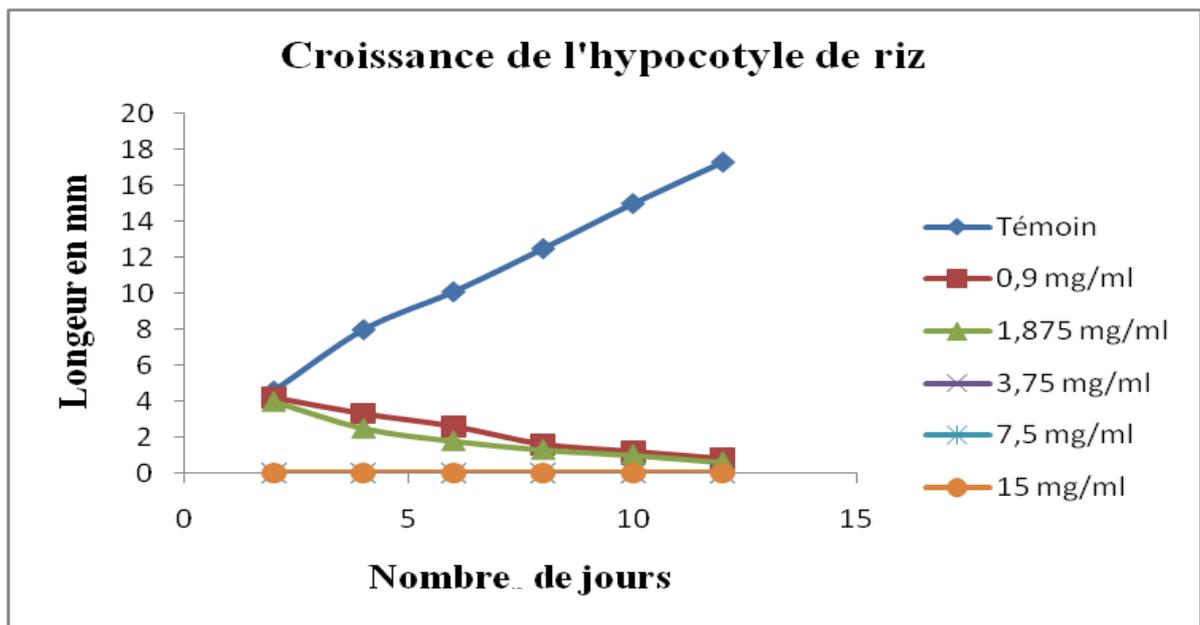


Figure 9 : Effets des différentes concentrations de l'extrait brut sur la croissance des hypocotyles de riz

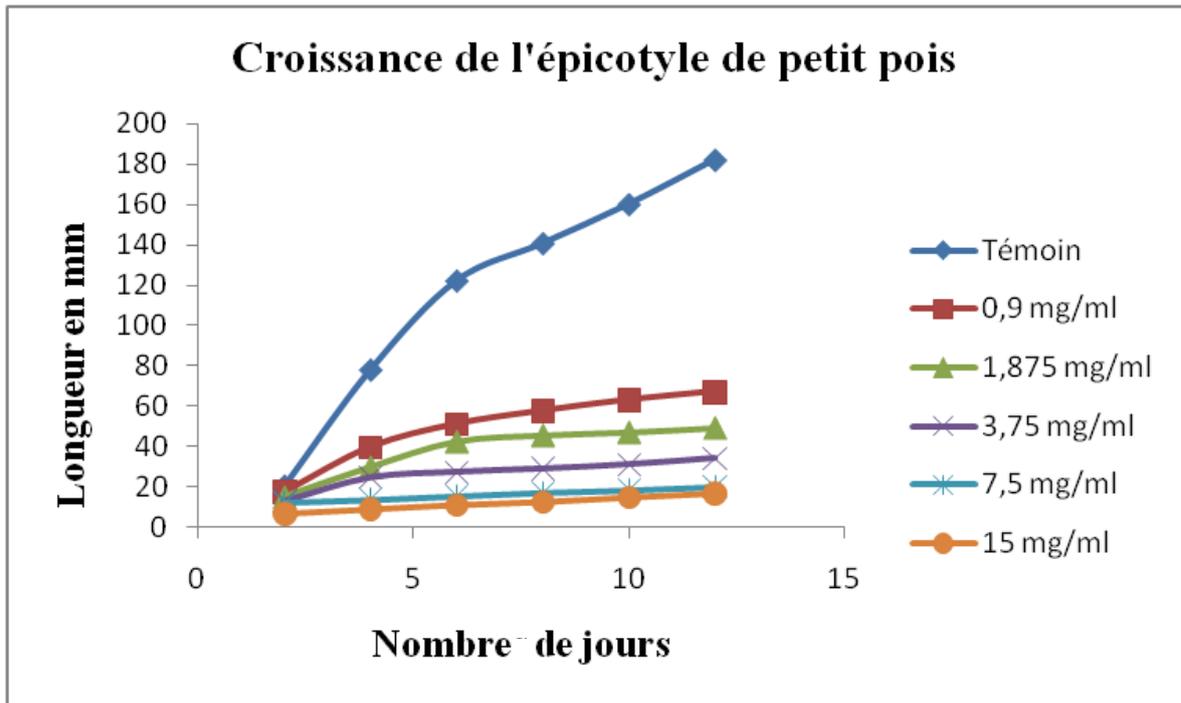


Figure 10 : Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur la croissance des épicotyles de petit pois

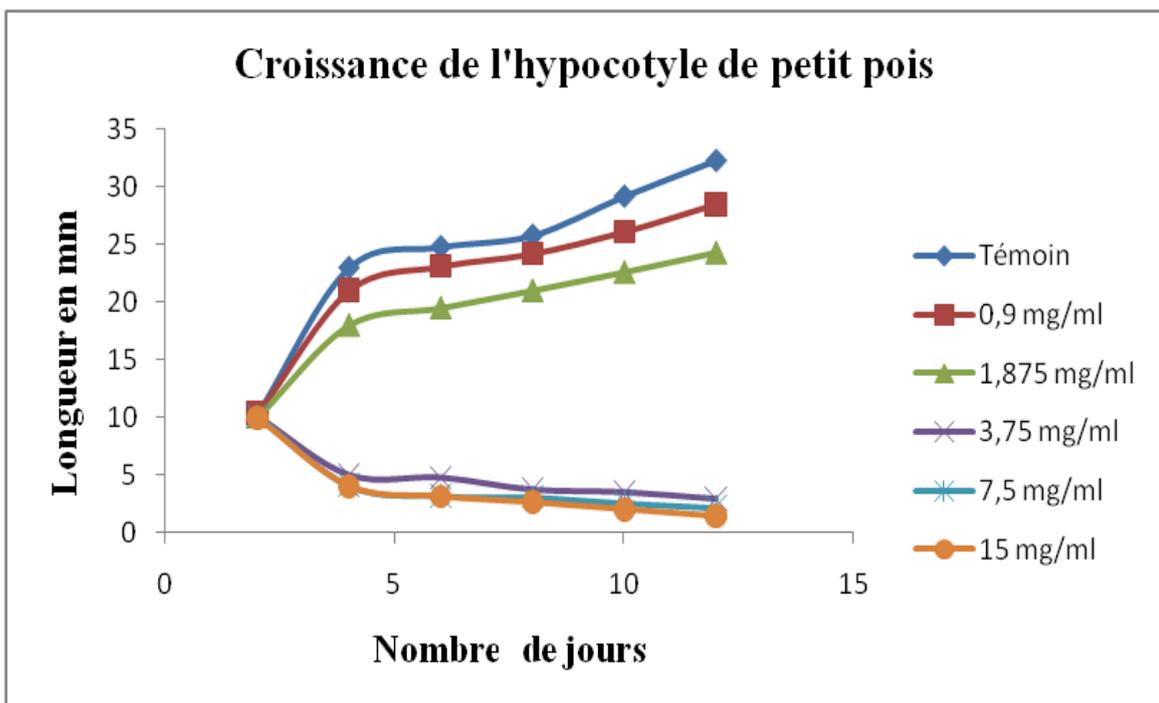


Figure 11 : Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur la croissance des hypocotyles de petit pois

Ces résultats montrent que :

- la croissance de l'hypocotyle de riz est totalement inhibée pour les 5 concentrations, par rapport au témoin et aucun effet-dose n'est observé. Pour l'hypocotyle de petit pois, une inhibition de la croissance est notée et elle est fonction de la concentration à partir de 3,75 mg/ml ; mais à des concentrations inférieures ou égales à 1,875 mg/ml, la croissance est presque égale à celle du témoin ;
- concernant l'épicotyle, une inhibition est observée et cette inhibition est proportionnelle à la dose pour les deux espèces ;
- pour les deux plantules, l'hypocotyle est plus sensible que l'épicotyle et le riz est plus sensible que le petit pois.

4.2.3 Effet des extraits sur la levée de la dominance apicale

Cette expérience a été réalisée pour comparer les effets de l'EB et E3 à ceux des hormones végétales gibbérelline et auxine sur le développement des bourgeons axillaires, selon la méthode indiquée au paragraphe 3.1.4.3. (p. 40).

Le tableau n°16 présente les résultats obtenus.

Tableau n°16: Longueur des bourgeons axillaires (mm) en présence des hormones et des extraits (50 µg)

Jours Produit	2	4	6	8	10	12
Eau	15	22	35	42	48	54
Gibbérelline	20	40	66	88	92	110
Auxine	10	12	14	14,2	14,6	15
EB	12	18	22	27	35	40
E3	10	14	19	23	27,2	35,8

D'après ces résultats, l'EB et E3 ont un effet inhibiteur sur la croissance des bourgeons axillaires. Par ailleurs, E3 est plus actif que l'extrait brut.

4.3. EFFETS DES EXTRAITS SUR LES MICROORGANISMES

Trois concentrations de l'EB et de l'extrait purifié E3 ont été utilisées (50mg/ml ; 25mg/ml ; 12,5 mg/ml) sur six souches de bactéries (leurs caractéristiques sont données dans le tableau n°17) pour déterminer les effets sur la croissance des microorganismes en milieu solide.

La méthode des disques utilisée est décrite au paragraphe 3.1.5 (p. 40).

Tableau n°17 : Caractéristiques des souches utilisées

Caractéristiques Nom scientifique	Type	Gram	Référence
<i>Bacillus cereus</i>	Bacille	+	LMG 6910
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocci	+	ATCC 6538
<i>Bacillus megaterium</i>	Bacille	+	LMG 7127
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacille	-	LMG 1242
<i>Salmonella enterica</i> sérovary <i>typhimurium</i>	Bacille	-	ATCC 14028
<i>Escherichia coli</i>	Bacille	-	363

ATCC: American Type Culture Collection

LMG: Laboratoriumvoor Microbiologie Universiteit Gent Belgium

Les résultats sont présentés dans le tableau n°18.

Les résultats ont montré que les extraits étudiés n'ont aucune activité sur les six souches bactériennes testées à la dose de 50 mg/ml.

Tableau n°18 : Effets des extraits sur les germes par la méthode des disques

Nom des souches	Diamètre du halo (mm)	Résultats	
		EB	E3
<i>Bacillus cereus</i>	6	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	-	-
<i>Bacillus megaterium</i>	6	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	-	-
<i>Salmonella enterica</i> sérovary typhimurium	6	-	-
<i>Escherichia coli</i>	6	-	-

- : insensible

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'EB et l'extrait purifié E3 sont toxiques pour divers organismes animaux et végétaux.

Chez la souris, l'injection de l'extrait par voie ip entraîne des symptômes d'intoxication tels que la diminution de l'activité motrice suivie d'une hyperhémie, une paralysie flasque des pattes et des convulsions avant la mort. L'ensemble de ses symptômes suggèrent une atteinte du système nerveux et/ou du cœur. Il est à noter que le temps de survie de la souris dépend de la dose administrée et ces symptômes sont les mêmes que ceux provoqués par les toxines des feuilles (ARIJAONA, 2005).

La DL50 (24 h) est estimée entre 178mg/kg à 214,28mg/kg. Par rapport à l'extrait feuilles dont la DL50 se situe entre 43,65 mg/kg à 49,15 mg/kg (ARIJAONA, 2005), l'extrait d'écorce est moins toxique. Sa toxicité est comparable à celle d'*Olax lanceolata* (Olacacées) (DL50 comprise entre 185,25 mg/kg et 200 mg/kg) (RAHELINAINAMANDIMBY, 2003). Cependant, il est plus actif que celui d'autres plantes telles qu'*Ocotea madagascarensis* (Lauraceae) avec une DL50 de 265,99 mg/kg (RANDRIAMAHAVALISOA, 2003).

La nature saponosidique des principes toxiques est confirmée par la lyse des hématies de mouton. Le pouvoir hémolytique des saponosides est dû à leurs interactions avec la membrane érythrocytaire (BRUNETON, 1993). A des concentrations comparables, les extraits de *P. senacia* et *P. ochrosiaefolium* ont également montré une activité hémolytique (ARIJAONA, 2005 ; RAZAFINTSALAMA, 2006) due à des saponosides.

L'extrait brut agit sur les animaux à sang froid. La CL50 est de 6,36 µg/ml sur les alevins et 54,04 µg/ml sur les têtards de grenouille. D'après ces résultats l'extrait est plus toxique sur les alevins de carpe que sur les têtards de grenouille. Ceci est dû au contact direct des toxines avec les branchies des poissons.

Les larves de moustique sont insensibles à l'EB jusqu'à une concentration de 2 mg/ml. La coloration de l'extrait marron foncé rend impossible l'augmentation de la concentration pour d'autres tests. L'extrait de feuilles est toxique sur les larves de moustique avec une CL50 estimée à 1,090 mg/ml (ARIJAONA, 2005).

Chez les végétaux, l'EB à 1mg/ml inhibe la germination des graines des plantes potagères. L'inhibition de la germination varie de 20% à 60%. Cette inhibition pourrait être

due à l'inactivation des enzymes nécessaires à la germination ou à une action directe sur l'embryon.

Chez les jeunes plantules de petit pois et de riz, le développement de l'épicotyle et de l'hypocotyle est inhibé par l'EB. L'hypocotyle est plus sensible que l'épicotyle. Cette inhibition pourrait être due à son contact direct avec l'extrait. L'extrait pourrait aussi avoir des effets sur le phénomène d'enracinement, sur l'adsorption et sur l'utilisation des nutriments. En outre, le riz est plus sensible que le petit pois.

Les extraits EB et E3 exercent un effet inhibiteur sur la croissance des bourgeons axillaires même s'il est moins important que celui de l'auxine.

Des résultats similaires ont été obtenus sur les végétaux avec les extraits de feuilles et aussi des autres *Pittosporum* (ARIJAONA, 2005 ; RAZAFINTSALAMA, 2006). Ce qui signifie que les composés actifs pourraient être de même nature ou apparentés.

Chez les bactéries, les extraits étudiés à 50mg/ml n'ont montré aucune activité sur les six souches bactériennes testées. L'activité à de concentrations plus fortes et/ou sur d'autres germes mérite d'être étudiée.

L'ensemble des résultats montre que l'extrait de feuille est plus toxique que celui de l'écorce. Si les principes actifs sont les mêmes dans les deux extraits, cela signifierait que l'extrait en contiendrait moins. Mais s'il s'agit de principes actifs différents, ceux de l'extrait d'écorce seraient moins actifs.

Dans le cas de l'hémolyse et l'inhibition de la croissance des bourgeons axillaires, il y a eu augmentation de l'activité toxique au cours de l'étape de purification. Cela montre que les composés actifs présents dans l'EB et l'extrait purifié E3 sont les mêmes que les composés toxiques sur souris.

CONCLUSION

GENERALE

ET

PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

En conclusion, les travaux réalisés sur l'écorce de tige de *Pittosporum verticillatum* dans le cadre de ce mémoire, bien qu'ils soient encore préliminaires, ont permis de :

- mettre en évidence la toxicité de l'écorce de tige ;
- déterminer certaines propriétés physico-chimiques et la nature chimique des principes toxiques présents dans cet organe de la plante ;
- mettre en évidence les propriétés toxicologiques sur divers organismes animaux et végétaux.

Dans l'avenir, nous envisageons :

- d'augmenter le rendement en toxines en améliorant le procédé d'extraction et de purification ;
- d'étudier le mécanisme d'action des principes toxiques ;
- de tester l'activité sur d'autres souches microbiennes, plus particulièrement sur les souches pathogènes pour l'homme et les animaux ;
- de poursuivre l'étude sur d'autres organes de la plante comme la racine.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. AHMED Etudes chimique et toxicologique de graines d'*Albizia boinensis* (FABACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie] Antananarivo: Université d'Antananarivo, 2009.
2. ANDRIANTSOA-RAZAFIMALALA H. Contribution à la purification et à la caractérisation d'un principe antibactérien d'une légumineuse *Albizia lebbeck*. [Mémoire de DEA : Biochimie] Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1983 ; 42p.
3. ANDRIATSOANIRINA L. Etudes chimique et toxicologique des principes toxique des feuilles de *Pittosporum ochrosiae folium* (PITTOSPORACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie] Antananarivo: Université d'Antananarivo, 2006 ; 71p.
4. ARIJAONA M. Purification et caractérisation partielles des principes toxiques de feuilles de *Pittosporum verticillatum* (PITTOSPORACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie] Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2005 ; 75p.
5. AUDIGIER C. et DUPONT G. Principes des méthodes d'analyse biochimique. Paris : Doin éditeur, 1989 ; 190p.
6. BENNET V. and CUATRECASAS P. Cholera toxin : Membrane gangliosides and activation of adenylatecyclase. In : The specificity and action of animal, bacterial and plant toxins. (Receptors and recognition, serie B, vol 1). Edited by Cuatrecasas P., London : Chapman and Hall, 1977 ; 75-218.
7. BIZZINI B. Tetanos toxin structure as a basis for elucidating its immunological and neuropharmacological activities. In : The specificity and action of animal, bacterial and plant toxins. (Receptors and recognition, series B, 1). Edited by Cuatrecasas P., London : Chapman and Hall, 1977 ; 175-218.
8. BOITEAU P. Dictionnaire des noms malgaches des végétaux, 1972, 1 : 488p
9. BOITEAU P. Précis de Matière médicale malgache avec formulaire. Libraries de Madagascar, 1979 ; 97p.
10. BOYD. Fundamentals of immunology, 4^{ème}éd. New York : Wiley and Sons, 1966 ; 503p.
11. BRUNETON J. Eléments de phytochimie et de pharmacologie. Paris : Technique de documentation Lavoisier, 1993 ; 210p.
12. BRUNETON J. Pharmacognosie et phytochimie, plante médicinale. Paris, France : Lavoisier, 3^{ème} éd., 1999 ; 1120p.

13. CORDELL G. Introduction to alcaloïds, a biogenetic approach. New York : John Wiley, 1981 ; 441p.
14. DALTON D. R. The alcaloïds, the fundamental chemistry, a biogenetic approach. New York : Marcel Dekker, 1979 ; 565p.
15. DANTEC et BELLEFLEUR C. Antibiothérapie, 4^{ème} éd. Paris : Masson, 1990 ; 188p.
16. DUMAS J. Les animaux de laboratoire. Paris : Flammarion, 1953 ; 719p.
17. DUVAL J. et SOUSSY C. J. Antibiothérapie, 4^{ème} éd. Paris : C et R, 1990 ; 188p.
18. FERRON A. Bactériologie médicale, 15^{ème} éd. Paris : C et R, 1994 ; 472p.
19. FONG H. H. J., TIN W. A. M. and FARNSWORTH N. R. Phytochemical screening. Chicago: Review University of Illinois, 1977: 73-126.
20. HABERMEHL G. Venomous animals and their toxins. Springer-verlag, Berlin Heidelberg New York, 1981; 124-186.
21. HELLER R., ESNAULT T. R. et LANCE C. Physiologie végétale Paris, Milan, Barcelone : Développement, 1955.
22. HOLLAND I. B. Colicin E3 and related bacteriocins : penetration of the bacterial surface and mechanism of ribosomal inactivation. In : The specificity and action of animal, bacterial and plant toxins. (Receptors and recognition, series B, 1). Edited by Cuatrecasas P., London : Chapman and Hall, 1977 ; 99-127.
23. HUMBERT H. 92^{ème} famille des PITTOSPORACEAE (Flore de Madagascar et des Comores). Paris : Muséum national d'histoire naturelle, 1955 ; 45p.
24. KAMOUN P. Appareils et méthodes en biochimie, 3^{ème} éd. Paris : Médecine-Sciences FLAMMARION, 1987 : 373p.
25. LARPENT J. P. et LARPENT G. Mémento technique de microbiologie, 3^{ème} éd. Londres, New York, Paris : Lavoisier, 1997 ; 1039p.
26. LE MINOR L. et VERNON M. Bactériologie médicale, 2^{ème} éd. Paris : Flammarion. Médico-Sciences, 1989 ; 617p.
27. MAHUZIER G. et HAMON M. Méthode de séparation, 2^{ème} éd. Paris : Masson, 1990 ; 269p. (Abrégé de chimie analytique, T2).
28. MARIA G., BRISINDA G. and CIVELLO M. Relief by botulinium toxin of voiding dysfunction due to beginning prostatic hyperplasia, placebo-controlled study. Urology 2003 ; 455p.
29. MEYER A., DEIANA J. et LECLERC H. Cours de microbiologie générale. Paris : Dion éditeur, 1994 ; 495p.

30. OMS. Résistance aux insecticides et lutte antivectorielle. 17^{ème} rapport du comité. OMS d'experts des insecticides. Série de rapport techniques n°443, Genève, 1970 ; 306p.
31. PERNET R. Pharmacopée de Madagascar. *Inst. Rech. Sci.* Antananarivo, 1957; 86p.
32. RABESA Z. A. Pharmacopée de l'Alaotra. CIDST, Imprimerie Tatsinanana, Antananarivo, 1986 ; 288p.
33. RAHANTARINORO J. Etudes chimique et toxicologique des extraits toxiques de feuilles de *Ravensara anisata* (LAURACEAE) [Mémoire de DEA : Biochimie] Antananarivo: Université d'Antananarivo, 2004 ; 78p.
34. RAHARISOA N. Purification et caractérisation partielle des principes actifs d'*Albizia bernieri* (FABACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie] Antananarivo: Université d'Antananarivo, 1999 ; 72p.
35. RAHELINAINAMANDIMBY L. Etudes chimique et biologique d'extraits toxiques d'*Olex lanceolata* (Olacaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie] Antananarivo: Université d'Antananarivo, 2003 ; 69p.
36. RAHERINAINA C. Etude chimique et toxicologique du principe ichtyotoxique de *Euphorbia laro* (EUPHORBIACEAE) [Thèse de doctorat : Biochimie] Antananarivo : université d'Antananarivo, 2004 ; 121p.
37. RAKOTOARIVELO N. S. A. Etude chimique et toxicologiques de graines de *Mimusops commersonii* (Sapotacée). [Mémoire de DEA : Biochimie] Antananarivo: Université d'Antananarivo, 2004 ; 81p.
38. RAKOTONDRA SOA. Purification et caractérisation partielle des principes actifs d'*Albizia polyphylla* (FABACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie] Antananarivo: Université d'Antananarivo, 2000 ; 68p.
39. RAMADE E. Ecotoxicologie. Paris : Masson, 1979 ; 228p.
40. RAMAHAFALY R. M. Etude chimique et biologique d'extrait toxiques de rameaux de *Hemonia scoparia* (AMARANTHACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie] Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2002 ; 60p.
41. RANDE RATH K. Chromatographie sur couche mince, techniques et applications en Chimie organique. Paris : Dunod, 1970 ; 178p.
42. RANDRIAMIHARISOA F. Etude chimique et biologique des principes toxiques de feuilles de *Xerocycos perrieri* (CUCURBITACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie] Antananarivo: Université d'Antananarivo, 2000 ; 71p.

Références bibliographiques

43. RANDRIANARIVO H. R. Purification et caractérisation partielle des principes actifs d'*Albizia arenicola*(MIMOSIDEAE, FABACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie] Antananarivo: université d'Antananarivo, 1996 ; 63p.
44. REED L. and MUENCH H. A simple method of estimating fifty per cent points. *Am. J. Hyg.*, 1938, 27: 293p.
45. SCHATZ G. Flore générique des arbres de Madagascar. Grande Bretagne : Linkater R., 2001 ; 503p.

ANNEXES

ANNEXE I : Composition des réactifs pour la révélation des chromatogrammes

Réactif à la vanilline sulfurique :

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

ANNEXE II : Composition des réactifs pour les tests d'alcaloïdes

Réactif de MAYER :

-Chlorure mercurique	13,5 g
-Iodure de potassium	60 ml
-Eau distillée qsq	100 ml

Réactif de WAGNER :

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

Réactif de DRAGENDORFF :

-Nitrate de bismuth.....	1,7 g
-Acide nitrique concentré	20 g
-Eau distillée qsq	100 ml

ANNEXE III : Composition du milieu utilisé pour les tests sur les microorganismes

Milieu MUELLER-HINTON (milieu solide) :

- Infusion de viande de bœuf déshydratée..... 300 g/l
- Hydrolysate acide de caséine..... 17,5 g/l
- Amidon 1,5 g/l
- Agar..... 100 g/l
- Eau distillée qsq 100 ml
- pH..... 7

ANNEXE IV

- Chlorure de sodium..... 7,650 g
- Phosphate disodique..... 0,724 g
- Phosphate monopotassique 0,210 g
- Eau distillée qsq 100 ml
- pH..... 7

Nom : RAKOTONDRAVALY

Prénom : Mandratovola Dino

Titre : Purification et caractérisation partielles des principes toxiques de l'écorce de tige de *Pittosporum verticillatum* (PITTOSPORACEAE)

RESUME

Une activité toxique a été mise en évidence dans l'écorce de tige de *Pittosporum Verticillatum*, une PITTOSPORACEAE endémique de Madagascar. La plante est utilisée pour soigner les ballonnements abdominaux et les palpitations cardiaques. Un protocole de purification comportant une précipitation par l'éthanol 50%, une dialyse et un fractionnement par le n-butanol a permis d'obtenir un extrait partiellement purifié E₃ à partir d'un extrait brut aqueux à chaud (EB).

Les principes toxiques sont thermostables, précipitables par l'acétate neutre de plomb, solubles dans l'eau, l'éthanol et le butanol. D'après le criblage phytochimique de E₃, les principes toxiques pourraient être des saponosides dont la génine serait un stérol insaturé ou un stéroïde.

L'injection de E₃ par voie ip chez la souris entraîne des symptômes d'intoxication tels que la diminution de l'activité motrice suivie d'une hyperhémie et des convulsions toniques avant la mort. Ces symptômes accusent une atteinte du système nerveux. La DL₅₀ (24 h) est évaluée entre 178 mg/kg et 214,28 mg/kg de poids.

In vitro, les principes actifs provoquent la lyse des hématies de mouton.

L'EB est aussi toxique chez les animaux à sang froid tels les alevins de poisson et les têtards de grenouille pour lesquels la CL₅₀ (24 h) est respectivement de 6,36 µg/ml et 52,04 µg/ml. Les larves de moustique sont insensibles à l'EB jusqu'à une concentration de 2 mg/ml.

L'extrait brut inhibe la germination des graines de plantes potagères, la croissance des jeunes plantules d'une Monocotylédone (riz) et d'une Dicotylédone (petit pois) ainsi que celle des bourgeons axillaire de petit pois.

Aucune des bactéries testées n'a montré de sensibilité vis-à-vis des extraits EB et E₃ à 50 mg/ml.

Mots clés : Pittosporaceae, *Pittosporum verticillatum*, toxique, saponoside, hémolyse, inhibition germination.

Name: RAKOTONDRAVALY

First Name: Mandratovola Dino

Title: Purification and partial characterization of the toxic principles from stem bark of *Pittosporum verticillatum* (PITTOSPORACEAE)

ABSTRACT

Toxic activity was found in the *Pittosporum verticillatum* stem bark extract, an endemic PITTOSPORACEAE of Madagascar. The plant is used to treat abdominal bloating and heart palpitations.

Precipitation with 50% ethanol, dialysis and fractionated with n-butanol yielded a partially purified extract E3 from a hot aqueous crude extract (EB).

Toxic principles were thermostable, precipitated with neutral lead acetate, soluble in water, ethanol and butanol.

Phytochemical screening of E3 showed that toxic principles could be steroid or unsaturated sterol saponins

Mice that received intraperitoneal injection of purified extract E3 developed symptoms of poisoning including decreased motor activity followed by hyperemia and tonic convulsions before death. These symptoms showed an impairment of the nervous system. The Letal Dose 50 LD₅₀ (24 h) was estimated to between 178 mg / kg, 214.28 mg / kg of mice.

In vitro, the active ingredients cause lysis of sheep red blood cells.

The crude extract was also toxic to cold-blooded animals such as fishes royal strain and apode frog tadpoles. The Letal Concentration 50 LC₅₀ (24 h) were respectively 6.36 µg / ml and 52.04 ug / ml. Mosquito larvae are insensitive to EB to at concentration of 2 mg / ml.

The crude extract inhibited the seedlings growth and the germination of vegetables: rice (monocotyledon) and pea (Dicotylédon) as well as the axillary buds growth of pea. No tested bacteria was sensitive to both EB and E3 to 50 mg / ml.

Keywords: Pittosporaceae, *Pittosporum verticillatum*, toxic, saponoside, hemolysis, inhibiting germination