

# SOMMAIRE

INTRODUCTION

## **Partie I) Etudes bibliographiques**

- I) GENERALITES SUR LA PLANTE
- II) NOTIONS THEORIQUES SUR LA PHYTOCHIMIE
- III) EXTRACTION PAR SOLVANT
- IV) CHROMATOGRAPHIE
- V) TESTS BIOLOGIQUES

## **Partie II) Etudes Expérimentales**

- I) RECOLTE ET PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL
- II) EXTRACTION DES METABOLITES SECONDAIRES
- III) SCREENING PHYTOCHIMIQUE DES EXTRAITS BRUTS
- IV) FRACTIONNEMENT PAR PARTAGE DE L'EXTRAIT BRUT
- V) FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT AU DCM
- VI) SCREENING PHYTOCHIMIQUE DE LA FRACTION BIOACTIVE
- VII) HYDROLYSE ACIDE DES HETEROSIDES (SAPONOSIDES)

CONCLUSION

## GLOSSAIRE

**Antibactérienne ou bactéricide** : Une substance antibactérienne ou bactéricide est une substance possédant la capacité de tuer des bactéries.

**Antibiotique** : Substance capable d'empêcher le développement des microorganismes.

**Antifongique ou fongicide** : Une substance antifongique est une substance possédant la capacité de tuer ou de limiter la prolifération des champignons microscopiques.

**Décoction** : préparation obtenue en faisant bouillir de manière prolongée une substance pour en extraire les principes actifs.

**Dicotylédones** : Classe des plantes dont la graine a deux cotylédons.

**Endémique** : Qualifie une plante native d'une région déterminée et que l'on ne trouve pas ailleurs en site naturel.

**Hépatite** : affection du foie provoquée par un virus ou une intoxication

**Inflorescence** : mode de regroupement des fleurs sur une plante. Ensemble de ces fleurs.

**Inhibition** : Diminution ou blocage de l'activité d'un organe, d'un corps ou d'une fonction psychique.

**Intoxination** : maladie d'origine alimentaire résultant de l'ingestion d'entérotoxines préformées dans l'aliment.

## LISTE DES ABREVIATIONS

% : pourcent

°C : degré Celcius

AcOEt : acétate d'éthyle.

BuOH : butanol

CCM : Chromatographie sur couche mince

CTX : Cétotaxime

DCM : dichlorométhane

DMSO : diméthylsulfoxyde

EMF<sub>A</sub> : Extrait brut Méthanolique du Feuille Avec déchlorophyllation

EMFA : Extrait de l'AcOEt du Feuille après partage liquide-liquide

EMFB : Extrait du BuOH du Feuille après partage liquide-liquide

EMFD : Extrait au DCM du Feuille après partage liquide-liquide

EMFH : Extrait Hexanique du Feuille après partage liquide-liquide

EMFQ : Extrait aqueux du Feuille après partage liquide-liquide

EMF<sub>S</sub> : Extrait brut Méthanolique du Feuille Sans déchlorophyllation

EMR : Extrait brut Méthanolique de l'écorce de racine

EMT : Extrait brut Méthanolique de l'écorce de Tige

ESPA : Ecole Supérieure Polytechnique d'Antananarivo

g : gramme

GMI : gentamicine

h: heure

H<sub>B</sub> : Extrait au BuOH de la feuille après hydrolyse acide

HCl : acide chlorhydrique

H<sub>D</sub> : Extrait au DCM de la feuille après hydrolyse acide

IPM : Institut Pasteur de Madagascar

l : litre

LHAE : Laboratoire d'Hygiène, des Aliments et de l'Environnement

m/v : rapport masse/volume

McF : Mac-farland

MeOH : méthanol

mg : milligramme

min : minute

ml : millilitre

mm: millimètre

N : normale

nm : nanomètre

∅ : diamètre

R<sub>f</sub>: rapport frontal

s : seconde

SXT : trimetroprimesulfametaxazole

TCS : Tryptophane Caséine Soja

UFC : Unité Formant Colonie

UV : ultra-violet

v/v : volume/volume

µl: microlitre

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Localisations du Schefflera bojeri à Madagascar .....	9
Figure 2: Localisations du Schefflera bojeri à Antananarivo.....	9
Figure 3 : Réaction globale simplifiée de la photosynthèse.....	11
Figure 4 : Cyclisation des cinnamates en coumarines.....	14
Figure 5 : Structure du bergaptène (exemple de coumarine) .....	14
Figure 6 : Les structures de base des flavonoïdes .....	15
Figure 7 : Structures moléculaires de quelques anthocyanes .....	17
Figure 8: Des exemples des tanins .....	18
Figure 9 : Quelques motifs quinoniques .....	19
Figure 10 : Isoprène (2-méthylbuta1,3-diene).....	19
Figure 11 : Les différentes classes des terpènes.....	20
Figure 12 : Biosynthèse des squelettes de base des triterpènes.....	21
Figure 13: Squelette de base des stéroïdes .....	22
Figure 14 : Composition des saponines.....	22
Figure 15 : Exemples de structures de saponosides .....	23
Figure 16 : Exemple d'un hétéroside cardiotonique : l'ouabaïne .....	24
Figure 17 : Une plaque CCM .....	30
Figure 18 : Organigramme des étapes d'extraction et de fractionnement bioguidé.....	38
Figure 19 : Organigramme du procédé de partage liquide-liquide de l'extrait brut .....	56
Figure 20 : Histogramme des masses des fractions éluées obtenues .....	67
Figure 21 : Technique d'isolement d'une souche.....	b
Figure 22: mouvements de stries lors de l'écouvillonnage.....	d

## LISTE DES PHOTOS

Photo 1 : Cliché d'une branche foliolée du <i>Schefflera bojeri</i> .....	5
Photo 2 : Cliché de la plante <i>Schefflera bojeri</i> .....	5
Photo 3 : Clichés des différentes parties du <i>Schefflera bojeri</i> : feuille, tige et racine, tige, fleurs, fruit .....	7
Photo 4 : Cliché de l'herbier du <i>Shefflera bojeri</i> .....	8
Photo 5 : Cliché de la filtration sur Buchner .....	40
Photo 6 : Cliché de l'évaporation sous-vide de l'extrait au rotavapor .....	40
Photo 7 : Partage à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de feuilles de <i>Schefflera bojeri</i> .....	55
Photo 8 : Cliché de la séparation sur colonne chromatographique .....	61
Photo 9 : Cliché de la migration dans la cuve chromatographique .....	63
Photo 10 : Clichés des profils chromatographiques en CCM des fractions 44 à 116 .....	64
Photo 11 : Clichés des profils chromatographiques en CCM des fractions 118 à 190 .....	65
Photo 12 : Clichés des profils chromatographiques en CCM des fractions 118 à 190 .....	66
Photo 13 : Cliché de l'antibiogramme de la sensibilité du <i>Candida albicans</i> aux fractions F <sub>1</sub> à F <sub>7</sub> .....	68
Photo 14 : Clichés de la plaque CCM de F <sub>6</sub> , visualisée sous UV 254 nm et 365 nm .....	72
Photo 15 : Cliché de la plaque CCM de F <sub>6</sub> révélée à l'anysaldéhyde, visualisée dans le visible .....	73
Photo 16 : Cliché de la plaque CCM de F <sub>6</sub> révélée par NH <sub>3</sub> , visualisée dans le visible .....	74
Photo 17 : Cliché de la plaque CCM de F <sub>6</sub> révélée à l'AlCl <sub>3</sub> , visualisée sous UV 365 nm ....	74
Photo 18 : Clichés des plaques CCM de F <sub>6</sub> révélées par le réactif de Liebermann-Burchard et visualisées sous UV 254nm et 365 nm .....	75
Photo 19 : Cliché de la plaque CCM de F <sub>6</sub> révélée par FeCl <sub>3</sub> , visualisée dans le visible .....	76
Photo 20 : Cliché du chauffage à reflux de feuilles de <i>S. bojeri</i> .....	79

Photo 21 : Cliché de la cuve de migration par CCM des extraits partitionnés aux solvants.....	79
Photo 22 : Clichés des plaques CCM des extraits hydrolysés : A : visualisation sous UV 254nm, B : visualisation sous 365nm et C: après pulvérisation à l'anisaldéhyde.....	79
Photo 23 : Clichés de Plaque CCM de H <sub>D</sub> , visualisée sous UV 254nm et 365 nm.....	81
Photo 24 : Cliché de la plaque CCM de H <sub>D</sub> révélée à l'anysaldéhyde, visualisée dans le visible .....	82
Photo 25 : Cliché de la plaque CCM de H <sub>D</sub> révélée par NH <sub>3</sub> , visualisée dans le visible et sous UV 365 nm.....	83
Photo 26 : Cliché de la plaque CCM de H <sub>D</sub> révélée à l'AlCl <sub>3</sub> , visualisée sous UV 365 nm...	84
Photo 27 : Clichés de la plaque CCM de H <sub>D</sub> révélée par le réactif de Liebermann-Burchard visualisée sous UV 254nm et 365nm .....	85
Photo 28 : Cliché de la plaque CCM de H <sub>D</sub> révélée par FeCl <sub>3</sub> , visualisée dans le visible.....	86
Photo 29 : Cliché des produits à tester .....	a
Photo 30 : Exemple d'une souche isolée.....	c
Photo 31 : agitateur vortex .....	c
Photo 32 : l'appareil densimat .....	c
Photo 33 : Ensemencement des germes sur le milieu gélose correspondant par écouvillonnage d	
Photo 34 : dépôt des extraits sur les disques .....	e

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les différentes classes des composés phénoliques selon le squelette de base .....	13
Tableau 2 : L'ensemble des solvants nécessaires aux extractions végétales .....	26
Tableau 3 : Rendements et notations des extraits bruts .....	41
Tableau 4 : Référence des sensibilités des souches.....	42
Tableau 5 : Diamètres d'inhibition des antibiotiques de référence et du DMSO.....	42
Tableau 6 : Antibiogramme des extraits bruts de la plante .....	43
Tableau 7 : Résultats du criblage phytochimique du <i>Schefflera bojeri</i> .....	52
Tableau 8 : Les rendements des partages aux différents solvants.....	57
Tableau 9 : Antibiogramme des extraits de partage liquide-liquide de l'extrait brut de feuille .....	57
Tableau 10 : Système d'élution pour la séparation en chromatographie sur colonne .....	60
Tableau 11 : Systèmes de solvant testés avant le choix de l'éluant pour le CCM.....	62
Tableau 12 : Masses et rendements des fractions obtenues lors de la chromatographie sur colonne .....	67
Tableau 13 : Résultat du test biologique sur <i>Candida albicans</i> des fractions rassemblées .....	68
Tableau 14 : Couleurs révélées à l'anisaldéhyde .....	71
Tableau 15 : Couleurs révélées à la vapeur de NH <sub>3</sub> .....	71
Tableau 16 : Couleurs révélées par l'AlCl <sub>3</sub> .....	71
Tableau 17 : Couleurs révélées par le réactif de Liebermann-Burchard.....	71
Tableau 18 : Couleur révélée par FeCl <sub>3</sub> .....	72
Tableau 19 : Résultats du criblage phytochimique sur CCM de F <sub>6</sub> .....	76
Tableau 20 : Antibiogramme des extraits hydrolysés en comparaison avec ceux non hydrolysés.....	80
Tableau 21 : Résultats du screening phytochimique sur CCM de l'extrait H <sub>D</sub> .....	86

Tableau 22 : Référence des sensibilités des souches..... e

*Rapport-gratuit.com* 

## INTRODUCTION

L'utilisation des plantes en thérapeutique par les humains ainsi que les animaux est très ancienne. En effet, les plantes avaient été privilégiées par toutes les civilisations du monde pour développer une pharmacopée traditionnelle en réponse aux maladies qui les touchaient.

Jusqu'à aujourd'hui, l'usage populaire des plantes reste d'une grande importance. Selon les données fournies par l'OMS, près de 80% de la population mondiale ont recours aux plantes médicinales par manque d'accès aux médicaments prescrits mais aussi parce que les plantes ont pu démontrer une réelle efficacité. [1]

Depuis les deux derniers siècles environ, l'essor industriel des pays occidentaux a donné naissance à la chimie de synthèse et à la chimie combinatoire qui ont aujourd'hui supplanté la nature pour fournir des médicaments. Mais encore dans ces industries pharmaceutiques modernes, l'étude des composés d'origine naturelle porte beaucoup d'espoir par rapport aux composés synthétiques. Ainsi, 28% des nouvelles molécules décrites entre les années 1981 et 2002 sont des composés naturels auxquels nous pouvons ajouter 20% de ces nouveaux composés qui sont des molécules dérivées des composés naturels. Ceci est dû à la grande diversité et complexité de structures des molécules élaborées par la nature, qui sont souvent difficiles à reproduire par la synthèse, et aussi parce que les composés naturels sont souvent adaptés à des cibles biologiques spécifiques. [1]

En outre, le potentiel de découverte des plantes est encore très étendu. On considère effectivement que, jusqu'à ce jour, seulement moins de 10 % des espèces de végétaux supérieurs qui peuplent actuellement la planète ont été explorées pour leurs propriétés chimiques et biologiques. [2]

Madagascar, un pays très béni avec la richesse de sa flore endémique, offre ses plantes aromatiques et médicinales estimées à environ une dizaine de milliers d'espèces. C'est l'une des flores la plus riche et la plus diversifiée. Cependant, on peut dire qu'elle est encore un pays en voie de développement. Dans le contexte socio-économique, l'étude des plantes peut aboutir à l'obtention de réponses thérapeutiques adéquates et de faible prix, joignant à une efficacité scientifique prouvée. Elle devrait donc exploiter ses ressources naturelles pour développer son économie.

En particulier, nous avons orienté notre étude à la recherche de plante disposant d'activité biologique contre certaines maladies comme les acnés juvéniles atteignant notamment les jeunes personnes et certaines maladies de la peau.

C'est la raison d'être de ce mémoire intitulé « Etude chimique et élucidation de l'activité antifongique de la plante *Schefflera bojeri* (Seem) R.Vig. dite « Tsingila », endémique de Madagascar » réalisé au sein de la Mention Génie des Procédés Chimiques et Industriels de l'Ecole Supérieure Polytechnique d'Antananarivo en collaboration avec l'Institut Pasteur de Madagascar.

Notre choix d'étude a été tourné vers cette plante parce qu'elle est utilisée traditionnellement par les Malagasy en phytothérapie, et ne présente pas d'études chimiques ni biologiques antérieures. Un autre facteur qui nous a beaucoup incités de l'étudier est son endémicité à Madagascar. Cette étude entre donc dans le cadre de projet de développement durable de Madagascar.

L'étude a été menée afin d'élucider les principales familles chimiques dans la plante responsable de ses vertus antibactériennes et antifongique par voie bioguidée. Pour cela, notre ouvrage se divise en deux parties :

Dans la première partie, nous donnons la synthèse bibliographique sur les généralités de la plante étudiée, la phytochimie et les tests biologiques antibactériennes. Nous présentons également des notions sur les méthodes d'extraction par solvant et les méthodes chromatographiques sur couche mince et sur colonne.

La deuxième partie de notre ouvrage est consacrée à la présentation des études expérimentales effectuées. Elle comporte l'étude chimique guidée par des tests biologiques des extraits du *Schefflera bojeri*. Nous décrivons les étapes de fractionnement et les résultats obtenues suivies des interprétations.

Nous terminons cet ouvrage par une brève conclusion et perspective future à propos de *Schefflera bojeri*.

Partie I) *Études*

*bibliographiques*

## **I) GENERALITES SUR LA PLANTE**

### **I-1) La flore de Madagascar**

#### **I-1-1) La biodiversité floristique de Madagascar**

Madagascar possède une flore endémique réellement unique au monde rapportée à la superficie du pays, malgré la proximité du continent Africain.

Environ 12 000 espèces de plantes sont connues actuellement dont 90% sont des espèces endémiques.

Environ, 4000 espèces restent à découvrir et il a été estimé que les taxonomistes de la flore de Madagascar décrivent 100 espèces par an.

Pour les arbres et arbustes, 103 familles (dont 5 familles endémiques) sont connues avec 490 genres (dont 161 genres endémiques), et 4220 espèces (dont 4032 espèces endémiques). [3]

Cette particularité floristique est certainement liée à une originalité chimique de ces plantes et c'est aussi la recherche de cet endémisme chimique qui donne un attrait de plus à l'étude de ces plantes médicinales traditionnelles malgaches. [4]

#### **I-1-2) Les plantes médicinales et/ou aromatiques**

Une plante est médicinale si au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. [5]

L'ensemble des plantes aromatiques et médicinales existant à Madagascar est estimé à environ une dizaine de milliers d'espèces.

La pharmacopée traditionnelle malagasy compte environ 2 300 espèces. 90% de ces espèces ne sont pas encore commercialisées comme source de médicament ou de molécules phytochimiques malgré la potentialité qu'elles démontrent lors de leur utilisation traditionnelle.

Les plantes médicinales peuvent être forestières, spontanées et/ou des adventices. [3]

*Schefflera bojeri* est une plante médicinale, endémique à Madagascar. Elle est utilisée par les Malagasy en phytothérapie, mais elle n'a pas encore fait l'objet d'étude phytochimique ni biologique.

## I-2) Identification botanique de la plante

**Nom scientifique :** *Schefflera bojeri* (Seem.) R. Vig. (1906) (synonyme: *Cussonia bojeri*, Seem.(1866) [6]

**Noms vernaculaires :** Le plus utilisé est « Tsingila », mais dans certains endroits il y a d'autres appellations comme « Hazotsora, Alomanaka, hazomboay, Vontsilana, Vatsila ». [7]



*Photo 1 : Cliché d'une branche foliolée du Schefflera bojeri*



*Photo 2 : Cliché de la plante Schefflera bojeri*

### I-2-1) Description botanique [6] [8]

<b>Règne</b>	<i>Plantae</i>
<b>Sous-règne</b>	<i>Tacheobionta</i>
<b>Division</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Classe</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Sous-classe</b>	<i>Rosidae</i>
<b>Ordre</b>	<i>Apiales</i>
<b>Famille</b>	<i>Araliaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Schefflera</i>
<b>Espèce</b>	<i>Schefflera bojeri</i>

### **I-2-2) La famille *Araliaceae***

Selon la description du botaniste français Antoine Laurent de Jussieu, la famille des *Araliaceae* est une famille de plantes dicotylédones, deux cotylédons sur l'embryon, deux feuilles constitutives de la graine. [9]

Elle comprend environ 920 espèces réparties en 84 genres qui appartiennent pour la plupart aux régions tropicales. [10]

Pour la flore de Madagascar, on estime à 160 espèces dont 95,6% endémiques. 62 sont décrites avec 88,6% endémiques. Et le travail de taxonomiste est en progrès. [11]

Les *Araliaceae* sont une famille d'arbres ou d'arbustes caducs et persistants, parfois de plantes herbacées ou de lianes ligneuses, avec des racines aériennes. Les feuilles sont généralement alternes, plus rarement opposées, souvent de grande taille et groupées à l'extrémité des rameaux. Elles sont simples ou composées, et dans ce cas elles sont palmatilobées, palmaticomposées ou mono à tripennées. La base du pétiole est souvent élargie et plus ou moins engainante, les stipules sont absentes ou réduites et formant alors une ligule parfois membraneuse autour du pétiole. Chez les espèces grimpances, des racines aériennes sont modifiées pour permettre à la plante de s'accrocher au support.

### **I-2-3) Le genre *Schefflera* :**

Il est dédié à Jacob Christian Scheffler, botaniste allemand du XIXe siècle. [6]

*Schefflera* est un genre de plantes à fleurs dans la famille *Araliaceae*. Ce sont des arbres, des arbustes ou des lianes, en croissance de 1 à 30 m de hauteur, avec des tiges ligneuses [12]

Il s'agit d'un genre intertropical représenté par 650 à 700 espèces dont environ 15 sont rencontrés à Madagascar.

Il est distribué dans la forêt et le fourré sempervirents, humide, subhumides et de montagne. On peut le reconnaître à ses feuilles composées palmées qui ne sont parfois que trifoliolées ou unifoliolées, et à l'absence d'articulation du pédicelle. De multiples espèces sont épiphytes, un groupe d'espèce d'arbre montre des folioles caractéristiques à l'apex tronqué. Le noircissement des feuilles au cours de séchage est fréquent. [7]

**I-2-4) L'espèce *Schefflera bojeri* ou « Tsingila » :**

C'est une espèce endémique rencontrée souvent dans les Hautes Terres de Madagascar.

❖ **Remarque**

Le mot « tsingila » est un mot betsileo venant du « de hila » qui veut dire : branler sur sa base tantôt d'un côté tantôt de l'autre ; au sens figuré : être anxieux, hésitant. [7]

**2-4-1) Botanique**

C'est une espèce ligneuse et arbres semenciers constitué d'un arbuste ayant un diamètre plus de 5 cm, beaucoup ramifiée de 0,5m à 3,5m de hauteur. Modérément arbre branchée présentant des feuilles coriaces, généralement trifoliolées, inflorescence en ombelle, fleurs à bourgeon, pétale et étamine jaune commun, pétale soudée, 5 sépales libres, Verts olives, 5 étamines alternées avec les sépales, étamines réduites d'environ 1 mm de longueur de profond jaune avec courte rouge filament.

Ses jeunes fruits sont vert pâle et deviennent de couleur pourpre intense à la maturité.



**Photo 3 : Clichés des différentes parties du *Schefflera bojeri*: feuille, tige et racine, tige, fleurs, fruit**



*Schefflera bojeri (Seem.) R. Vig.*

*Photo 4 : Cliché de l'herbier du Schefflera bojeri*

#### **2-4-2) Localisation à Madagascar**

Elle se développe en forêt humide, en surface dégradée dominée par les *Ericaceae*.

Selon TROPICOS, voici une liste des lieux où on le trouve, mais elle n'est pas exhaustive : [6]

- Antananarivo: Ankazobe, Analamanga (Angavokely, Sabotsy, Betatao, ...), Itasy (Soamananety, forêt de Tapia, Antongona...), Vakinankaratra (Antsirabe, Ibity, Vavavato, Antsampandrano, Ramainandro, Analalava...)
- Fianarantsoa: Isalo, Andringitra, Ambalavao, Tapia, Amoron'i Mania (Ambatofinandrahana, Faliarivo, Itremo), Haute Matsiatra (Andringitra, Androka, Antaranomby, Ampamaherana...), Ihorombe (Ihosy, Andringitra, Isalo, Lanamandro,...).
- Toamasina : Tamatave, Brickaville Didy, Analanjirofo( Maningoro)
- Toliara : Bepolaka, Ihosy, Isalo, Atsimo-andrefana(Ampahidroy, Ankazomanga, Tapia, Sakaraha,...)

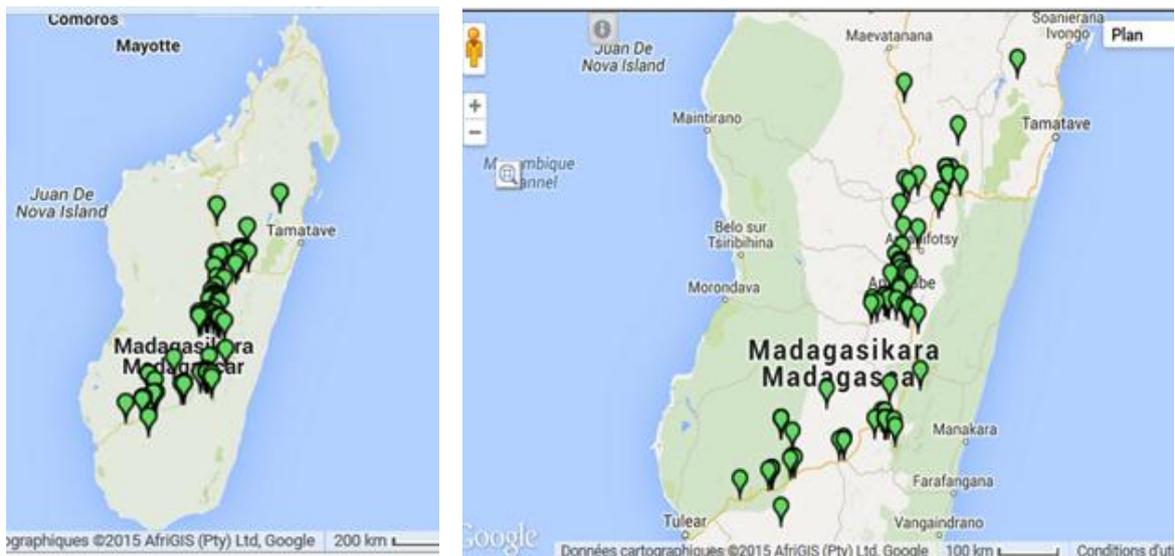


Figure 1: Localisations du *Schefflera bojeri* à Madagascar [6]

Notre plante a été récoltée à Ankalalahana Arivonimamo dans la forêt de Tapia où elles sont dominées par le Tapia.

Voici la carte plus précise qui montre sa localisation à Arivonimamo :

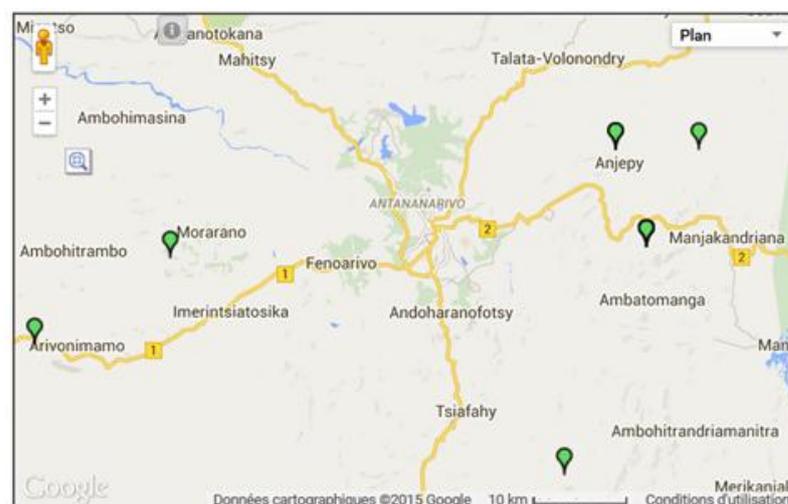


Figure 2: Localisations du *Schefflera bojeri* à Antananarivo [6]

**2-4-3) Utilisations traditionnelles :**

Ses feuilles ont beaucoup d'utilisations traditionnelles dont un document l'a définie comme plante médicinale générale. [13]

La décoction est administrée contre les diarrhées profuses. Elle est utilisée quotidiennement pour son action sur les maux d'estomac (l'ulcère de l'estomac), sur les maladies du foie et l'hépatite. [4] [14] [15] [16]

Les feuilles écrasées servent à préparer un emplâtre qu'on prétend souverain contre l'acné juvénile dit aussi en Malgache « mony ». [16]

C'est aussi un fortifiant utilisé dans les cas d'anorexie et il aurait des propriétés antinévralgiques.

## II) NOTIONS THEORIQUES SUR LA PHYTOCHIMIE

### II-1) Définition

La phytochimie ou chimie des végétaux est la science qui étudie la structure, le métabolisme, la fonction, ainsi que les méthodes d'analyse, de purification et d'extraction des substances naturelles issues des plantes. [17]

### II-2) Les substances produites par la plante

Les végétaux sont des photoautotrophes. Ils fabriquent, grâce à la photosynthèse, toutes les substances dont ils ont besoin à partir du dioxyde de carbone de l'air, de l'énergie solaire, de l'eau et des minéraux du sol selon la réaction globale de photosynthèse suivante : [18]



*Figure 3 : Réaction globale simplifiée de la photosynthèse [19]*

Les substances produites par la plante sont subdivisées en deux groupes de molécules : les métabolites primaires et les métabolites secondaires.

#### II-2-1) Les métabolites primaires [19]

Ils sont appelés aussi métabolites fondamentales. Ce sont les molécules indispensables à la vie de la plante :

- ils ont un rôle essentiel pour le métabolisme et le développement végétal participant aux fonctions cellulaires.
- ils se retrouvent dans toutes les espèces

Ce sont les protéines, les glucides et les lipides.

#### II-2-2) Les métabolites secondaires [2] [19] [20] [21]

Ce sont des composés biosynthétisés naturellement par les végétaux mais qui ne participent pas directement au métabolisme végétal. Ils sont longtemps considérés comme "non indispensables" à la vie des plantes mais jouant certains rôles secondaires.

Etant dérivés des métabolites primaires, les métabolites secondaires diffèrent en fonction des espèces.

### **2-2-1) Rôles**

Ce sont des métabolismes d'adaptation de la plante avec le milieu. Ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont probablement des éléments essentiels de la coévolution des plantes avec les organismes vivants, tels que parasites, pathogènes et prédateurs, mais aussi pollinisateurs et disséminateurs. Par exemple protection de l'attaque des pathogènes ou des herbivores, attraction des pollinisateurs, lutter contre la compétition avec d'autres plantes.

Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires dont près de 40 000 structures sont connues.

Autres que ces rôles écologiques, leur utilisation par l'homme dans de nombreuses préparations thérapeutiques est très largement répandue.

### **2-2-2) Classification**

On peut classer les métabolites secondaires en trois grands groupes :

- les composés phénoliques
- les terpènes et stéroïdes
- les composés azotés incluant les alcaloïdes.

Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine.

### **II-2-3) Les composés phénoliques [2]**

La définition des composés phénoliques prend en compte, à la fois des éléments structuraux et l'origine biogénétique des composés.

Ils se caractérisent par la présence d'un noyau benzénique (structure carbonée C<sub>6</sub>), portant un groupement hydroxyle libre ou engagé dans une fonction ester, éther ou hétéroside. Ils sont non azotés, le plus souvent solubles dans l'eau et présents sous forme de glycoconjugué.

Dans la nature, ces composés sont généralement dans un état lié sous forme d'esters ou plus généralement d'hétérosides. Ils existent également sous forme de polymères naturels (tanins).

Le groupe le plus vaste et plus répandu des phénols est celui des flavonoïdes.

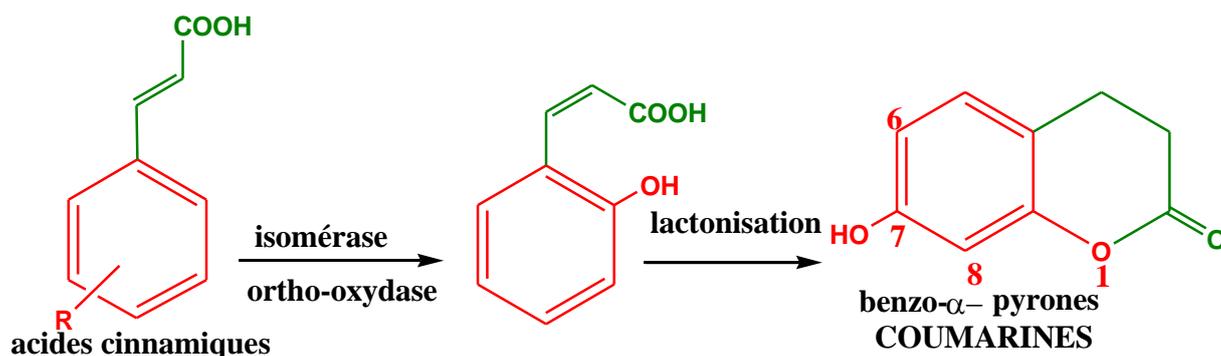
**Tableau 1 : Les différentes classes des composés phénoliques selon le squelette de base [22]**

Squelette carbonée	Classes de composés phénoliques
C <sub>6</sub>	Phénols simples et benzoquinones
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acides phénoliques
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acétophénonnes et les acides phenylacétiques
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acides hydroxy-cinnamiques, coumarines, phénylpropènes, chromons
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphthoquinones
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xanthonnes
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbènes et anthraquinones
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoïdes et isoflavonoïdes
(C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> ) <sub>2</sub>	Tannins hydrolysables
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanes et néolignanes
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Biflavonoïdes
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Lignines
(C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Catéchols
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Tannins condensés

### 2-3-1) Les coumarines [2] [5] [21] [23]

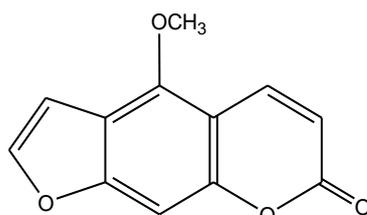
Les coumarines sont des 2H-1-benzopyran-2-ones, lactones des acides ortho-hydroxy-Z-cinnamiques. L'isomérisation de la double liaison E en Z est réalisée par la lumière à 320 nm. Près d'un millier d'entre elles ont été décrites, et si les plus simples sont très largement distribuées dans le monde végétal, les plus complexes sont surtout décrites chez les Apiaceae et les Rutaceae. Les coumarines sont fréquemment hydroxylées en position 7 et ces hydroxyles peuvent être méthylés ou engagés dans une liaison hétérosidique

Origine biologique des coumarines :



*Figure 4 : Cyclisation des cinnamates en coumarines [5]*

La prénylation du noyau benzénique des coumarines aboutit à la formation de furano et pyranocoumarines. Elles sont responsables de la phototoxicité de certaines espèces végétales (Apiaceae ou Rutaceae), qui se manifeste par une dermatite aiguë. Le bergaptène est d'ailleurs utilisé pour ses propriétés photodynamisantes dans le traitement du psoriasis, et certaines coumarines sont aussi utilisées dans les produits solaires.



*Figure 5 : Structure du bergaptène (exemple de coumarine)*

La présence de certains coumarines explique l'effet antifongique, antibactérien, antivirale, antimalariale, anti-inflammatoire, anti-tumorale et anticoagulant d'une plante.

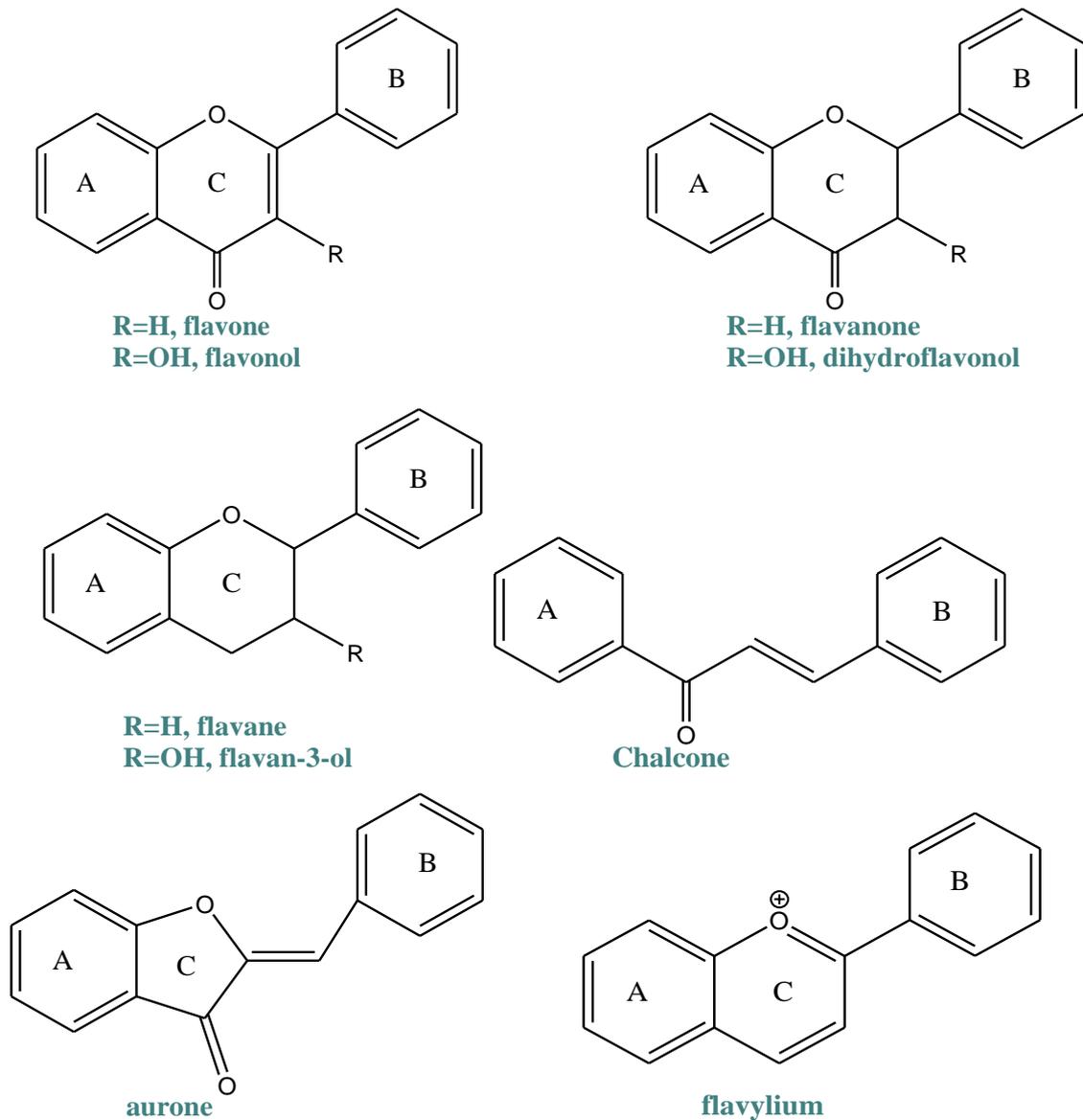
### **2-3-2) Les flavonoïdes [2] [24] [25]**

Les flavonoïdes sont des pigments végétaux, simples ou glycosylés, responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Mais, les flavonoïdes présents dans les feuilles, sont en général masqués par la présence de chlorophylle.

Les flavonoïdes, partageant tous une origine biosynthétique commune, est un groupe de composés définis par une structure générale en C<sub>15</sub>, caractérisée par un enchaînement Ar-C<sub>3</sub>-Ar.

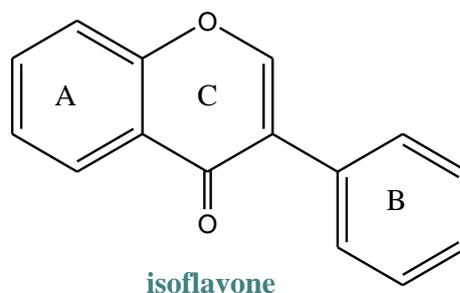
Les flavonoïdes comprennent les flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, flavylum, chalcones, aurones et les isoflavonoïdes.

Les flavones et flavonols représentent 80% des flavonoïdes.



*Figure 6 : Les structures de base des flavonoïdes [24]*

Les isoflavonoïdes diffèrent des autres flavonoïdes par la position du cycle B, qui dans le cas des isoflavonoïdes est attaché en position 3 (en 2 pour les autres flavonoïdes), formant un squelette de base 1,2-diphénylpropane.



Les flavonoïdes possèdent de nombreuses vertus thérapeutiques.

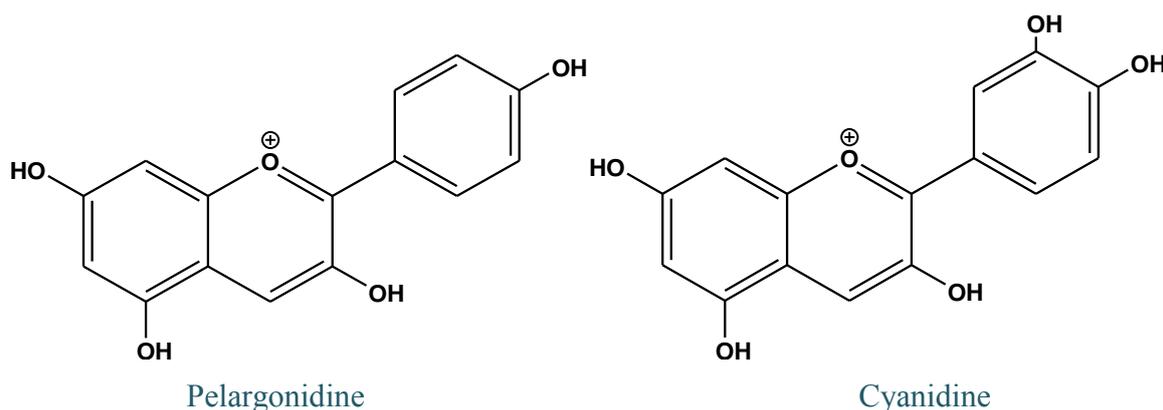
Ils sont connus principalement pour leur activité antioxydante puissante susceptible d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules. Autres études aussi ont montré que les flavonoïdes sont des bons inhibiteurs d'enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la xanthine oxydase, la cyclooxygénase et la lipooxygénase.

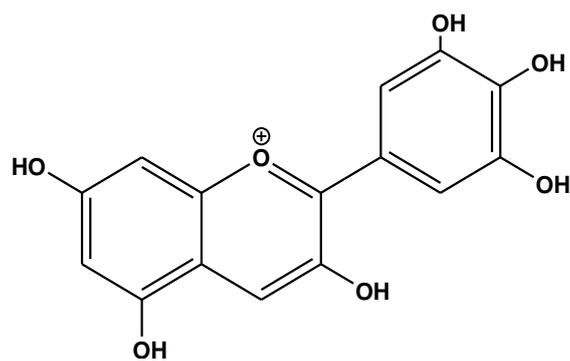
Certains d'entre eux ont des propriétés d'augmentation de la résistance capillaire et de diminution de la perméabilité membranaire ainsi que des activités anti-inflammatoires, anti-allergiques, antibactériens, antiviraux, hépato-protecteurs, anticancéreux, antispasmodiques, analgésique, diurétiques...

Les isoflavones sont des produits de défense naturelle, insecticides, antitumoraux, de puissants oestrogènes et susceptibles de diminuer faiblement la fréquence des bouffées de chaleur liées aux manifestations de la ménopause.

### 2-3-3) Anthocyanosides [2]

Contrairement aux autres flavonoïdes qui absorbent en général essentiellement dans le spectre ultraviolet, les anthocyanes sont des composés colorés (orange, pourpre à bleu). Ils sont largement impliqués dans la coloration des pétales mais on les retrouve également dans de nombreux tissus (exemple du chou rouge). Leur synthèse dans les organes foliaires est souvent activée par des stress (froid, carences, sénescence...). Ces composés sont beaucoup utilisés comme colorants alimentaires et présentent des propriétés anti-oxydantes.





Delphinidine

*Figure 7 : Structures moléculaires de quelques anthocyanes*

#### *2-3-4) Les tanins [2]*

Les tanins ont l'aptitude à se combiner aux macromolécules, d'où leur utilisation pour le tannage de la peau animale fraîche en la rendant imputrescible et résistante à l'eau, la chaleur et l'abrasion (combinaison aux fibres de collagène de la peau). Ceci explique par ailleurs, que les tanins précipitent les protéines, la cellulose et les pectines mais aussi leur goût âpre et leur astringence caractéristiques, issus de la précipitation des glycoprotéines de la salive.

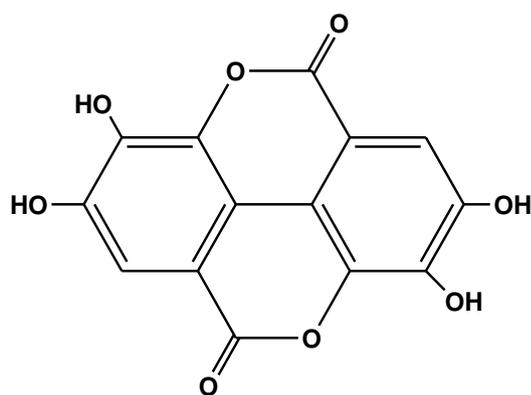
Les tanins sont des composés phénoliques hydrosolubles de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000.

On distingue deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique : les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

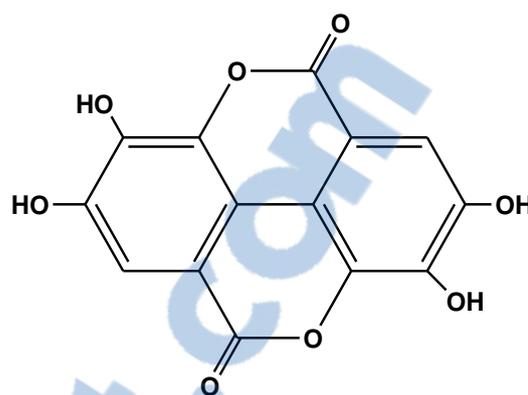
- **les tanins hydrolysables**, esters d'un sucre (essentiellement de glucose) et de l'acide gallique ou de l'acide éllagique,

- **les tanins condensés** ou proanthocyanidols, non hydrolysables résultant de la polymérisation d'unités flavan-3-ols. Ils forment dans les vacuoles des solutions pseudo-colloïdales et peuvent aussi se fixer au niveau des lignines, renforçant encore l'imputrescibilité du bois de cœur.

La disparition des tanins, lorsque les fruits ont atteint leur maturation, montre que comme d'autres composés phénoliques, ils peuvent être réutilisés par la plante.



acide ellagique



flavan-3-ol

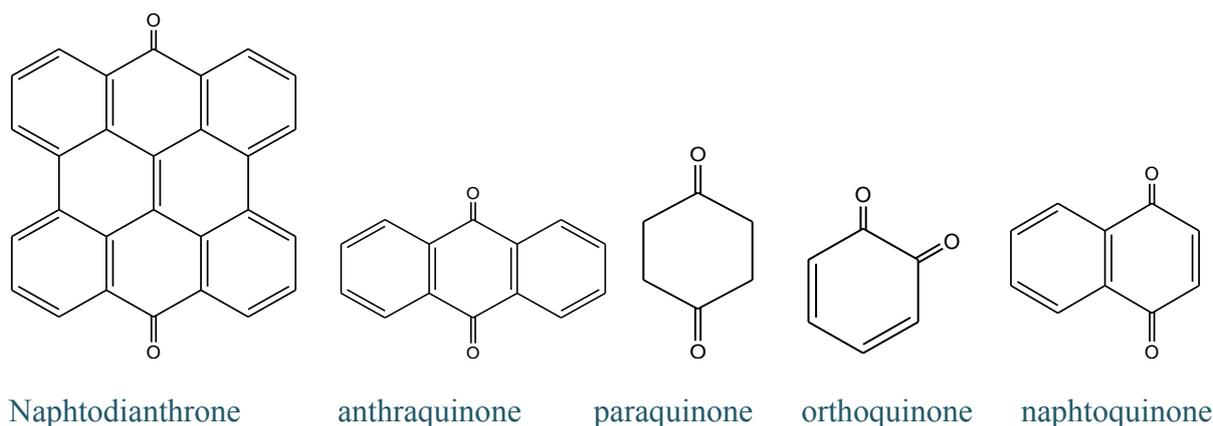
**Figure 8: Des exemples des tanins**

Les applications médicales des plantes à tanins découlent de leur affinité pour les protéines : ils ont un effet antidiarrhéique, et par voie externe, ils imperméabilisent les couches superficielles de la peau, sont vasoconstricteurs et limitent la perte en fluides. Ces propriétés, ajoutées par ailleurs à leur effet antiseptique, en font des molécules intéressantes pour la régénération des tissus en cas de blessure superficielle ou de brûlure, et les rendent utilisables dans le traitement des diarrhées infectieuses. Des galls du chêne (*Quercus infectoria*, Fagaceae), est d'ailleurs extrait le tanin officinal utilisé comme astringent dans les dermatoses et les brûlures, et comme hémostatique.

### **2-3-5) Quinones [2] [26]**

Les quinones résultent de l'oxydation de dérivés aromatiques caractérisés par un motif 1,4-dicétocyclohexa-2,5-diéniq (para-quinones) ou par un motif 1,2-dicétocyclohexa-3,5-diéniq (ortho-quinones). La dione peut être conjuguée aux doubles liaisons d'un noyau benzénique (benzoquinones) ou à celles d'un système aromatique polycyclique condensé : naphthalène (naphtoquinones), anthracène (anthraquinones), naphtodianthrène (naphtodianthrène)...

On retrouve des motifs quinoniques dans différentes classes des métabolites secondaires.



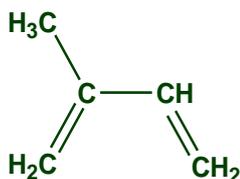
*Figure 9 : Quelques motifs quinoniques*

Beaucoup de naphthoquinones sont antibactériennes et antifongiques. Des activités anti-protozoaires et antivirales sont décrites. Par ailleurs, certaines quinones ont un fort pouvoir allergisant provoquant des dermatites et des réactions prurigineuses.

Les benzoquinones sont des composés anti-appétant, antimicrobiens, acaricides, insecticides et nématocides.

#### **II-2-4) Les terpènes et stéroïdes [2] [8] [25] [27]**

Les terpènes et les stéroïdes constituent probablement la plus large classe de composés secondaires dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique. Ils sont formés à partir de l'assemblage d'unités C<sub>5</sub> à 5 atomes de carbones ramifiées (2-méthylbuta1,3-diène ou isoprène), issus du même précurseur « acide mévalonique » et ayant pour origine biosynthétique l'acétyl CoA ou le malonyl CoA.



*Figure 10 : Isoprène (2-méthylbuta1,3-diène)*

Les terpénoïdes sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, ...).

Le nombre d'unités isopréniques définit les différentes classes de terpènes comme la figure suivante nous montre.

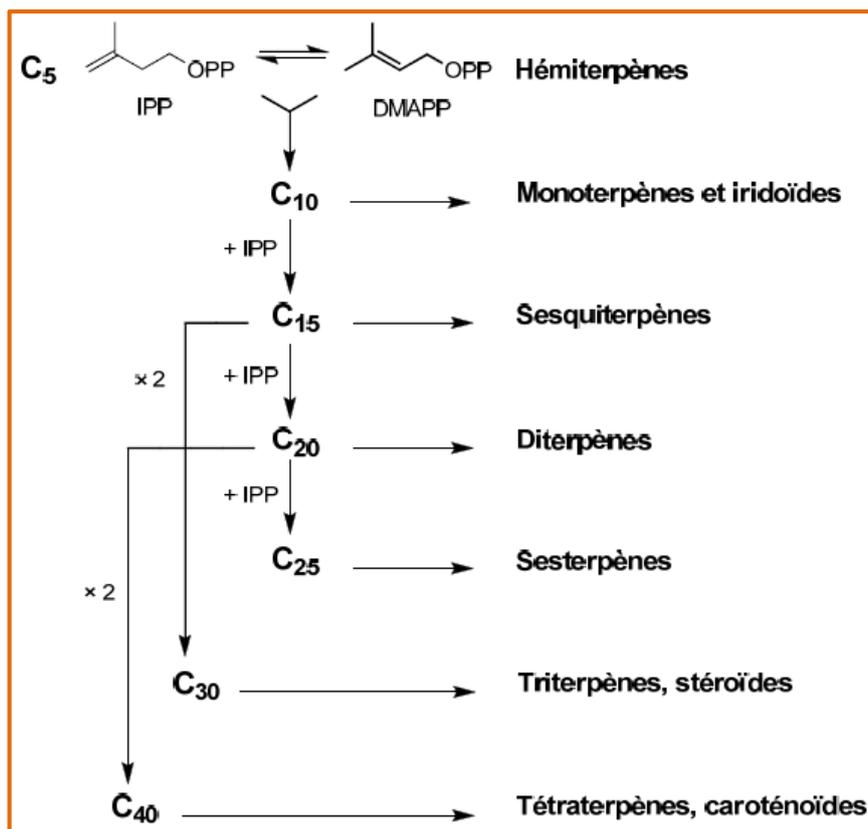


Figure 11 : Les différentes classes des terpènes [27]

Légendes : IPP= diphosphate d'isopentényle

DMAPP= diphosphate de diméthylallyle

### 2-4-1) Les monoterpènes et les sesquiterpènes

Issus du couplage de 2 unités isopréniques, les monoterpènes existent dans les huiles essentielles. Cyclisés en méthylcyclopentanes et glycosylés, ils constituent les iridoïdes. La glycosylation les rendant solubles, on les trouve non pas dans des appareils sécréteurs mais dans toutes les parties de la plante. Les sesquiterpènes, molécules en C<sub>15</sub> se rencontrent aussi dans les huiles essentielles.

### 2-4-2) Les diterpènes

Ces composés en C<sub>20</sub> sont particulièrement abondants chez les Lamiaceae et les Asteraceae même si certains, telles les gibberellines, à rôle d'hormone de croissance, sont universels. Ils peuvent être acycliques ou bi- ou tri-cycliques. Les plus intéressants sur le plan pharmacologique sont les diterpènes tricycliques à noyau taxane. Le taxol et son analogue hémisynthétique, le docétaxel (Taxotère) sont utilisés dans le traitement des tumeurs de l'ovaire résistant aux autres thérapeutiques et dans celui des cancers du poumon et du sein.

Des diterpènes toxiques induisant des troubles digestifs violents ou des irritations cutanées ou oculaires graves ont été isolés des Euphorbiaceae et des Thymelaceae.

### 2-4-3) Triterpènes et stéroïdes

Les triterpènes sont des composés en  $C_{30}$  issus de la cyclisation du 3S-époxy-2,3-squalène ou plus rarement du squalène. Presque toujours hydroxylés en 3, les triterpènes présentent une très forte unité structurale, les différences majeures étant d'ordre configurationnel et liées à la conformation adoptée par l'époxy-squalène (ou le squalène) avant la cyclisation.

Les principes directeurs qui conduisent à l'élaboration des principaux squelettes triterpéniques sont rassemblés dans la figure suivante :

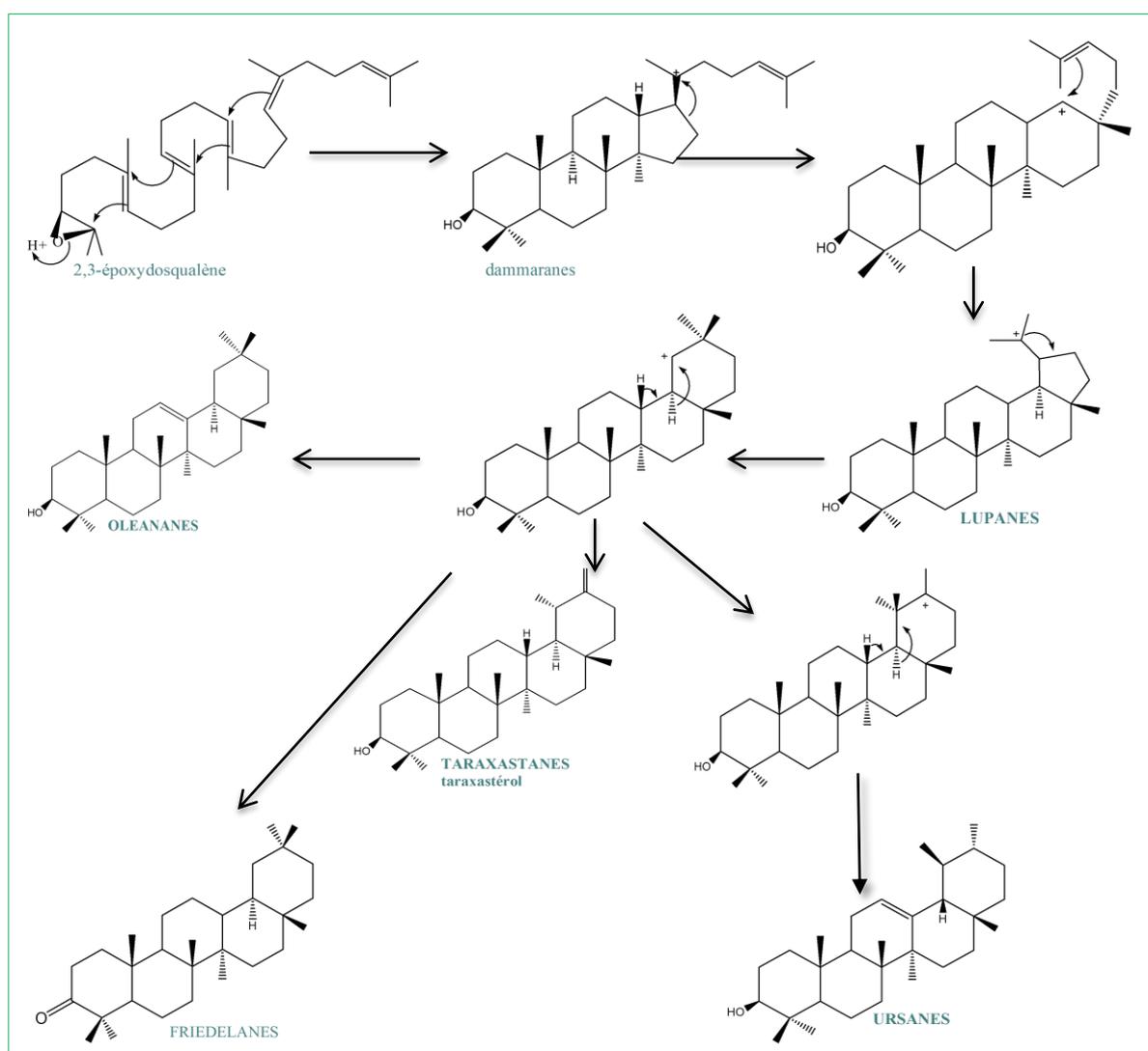
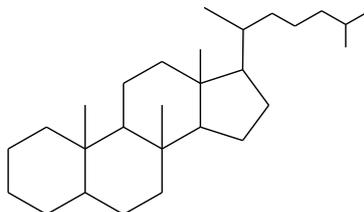


Figure 12 : Biosynthèse des squelettes de base des triterpènes [9]

Les stéroïdes peuvent être considérés comme des triterpènes tétracycliques ayant perdu au moins trois méthyles (Structure en C<sub>27</sub>).



**Figure 13: Squelette de base des stéroïdes**

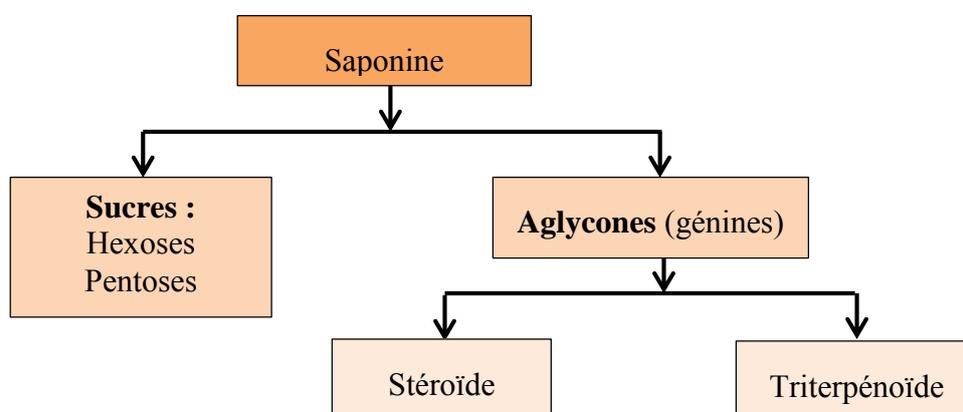
Ce sont des substances dont l'utilisation thérapeutique et industrielle est majeure. Elles ont des pouvoirs antiseptiques, anti-inflammatoires, diurétiques ou spasmolytiques, insecticides, antivirales, antifongique, analgésiques.

### *i) Les saponosides*

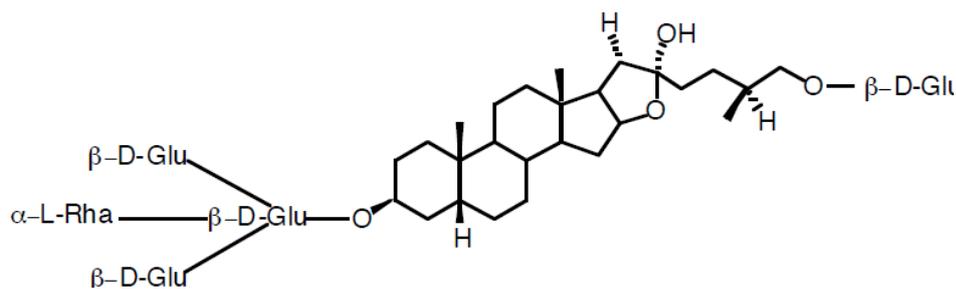
Les saponosides constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux. Ils se caractérisent par des effets tensio-actifs leur conférant la propriété de former des solutions moussantes lorsqu'ils sont dissous dans l'eau.

Structuralement, ils peuvent être classés en deux groupes selon la nature de leur génine : les saponines à génines triterpéniques, de loin les plus nombreux existant chez les angiospermes dicotylédones et chez certains animaux marins et celles à génines stéroïdiques, presque exclusivement présentes chez les angiospermes monocotylédones.

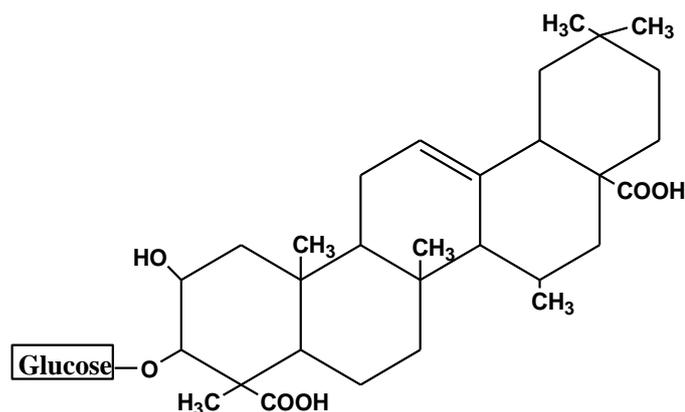
Les chaînes osidiques des saponosides sont le plus souvent formées de 2 à 10 oses banals, liés à la génine par une liaison de type ester ou éther.



**Figure 14 : Composition des saponines**



Le sarsaparilloside de *Smilax medica*



Saponoside triterpénique : glucoside de l'acide médigénique

**Figure 15 : Exemples de structures de saponosides**

Il semble que les saponosides jouent un rôle de défense du végétal contre les pathogènes microbiens. Les interactions mises en jeu avec les stérols de la membrane ont pour conséquence des propriétés hémolytiques et une activité spermicide de certaines molécules. Elles sont toxiques pour les animaux à sang froid et en particulier pour les poissons et les mollusques. Différentes saponines isolées comportent des propriétés immunomodulatrice, cytotoxique, antitumorale, anti-inflammatoire, antifongique, antivirale, expectorante pour ne citer que les principales propriétés.

Certaines drogues à saponosides sont utilisées pour leurs propriétés antitussives (rhizome de la réglisse), mais aussi anti-œdémateuses (cotylédons de la graine de Marronnier d'Inde) ou encore analgésiques (*Platycodon grandiflorum*).

### ii) *Les hétérosides cardiotoniques* [2]

Les glucosides cardiotoniques sont présents notamment dans les familles des Asclepiadaceae et des Apocynaceae. Ils sont de structure homogène, comprenant une génine

stéroïdique de type cardénolide (C<sub>23</sub>) ou bufadiénolide (C<sub>24</sub>) et une partie osidique constituée d'un ose (ouabaïne) et souvent d'un oligoside.

L'activité cardiotonique est liée à la génine. Elle se traduit par une augmentation de la contractilité (effet inotrope positif), une diminution de la fréquence cardiaque (effet chronotrope négatif) et une diminution de la vitesse de conduction à la jonction auriculoventriculaire (effet dromotrope négatif). Les digitales (*Digitalis sp. Scrophulariaceae*) renferment des hétérosides de cardénolides mais seules la digitale pourpre (*Digitalis purpurea L.*) et la digitale laineuse (*Digitalis lanata Ehrh.*) sont utilisées pour l'extraction de la digitoxine, de la digoxine et de leurs dérivés.

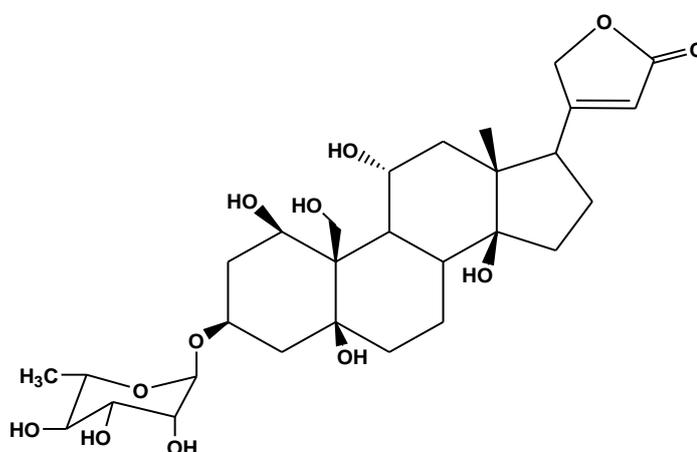


Figure 16 : Exemple d'un hétéroside cardiotonique : l'ouabaïne

### 2-4-4) Les caroténoïdes [2]

Ce sont des molécules tétraterpéniques, constituées de l'enchaînement de 8 unités isopréniques, possédant un chromophore caractéristique (au moins 10 doubles liaisons conjuguées) expliquant leur couleur jaune-orangée et leur sensibilité à l'oxydation. Les caroténoïdes sont employés en industrie agro-alimentaire principalement pour leur pouvoir colorant (safran : *Crocus sativus L. Iridaceae*) mais on peut aussi noter qu'ils sont préconisés en cas de photodermatose puisqu'ils interfèrent avec les processus de photo-oxydation.

### II-2-5) Les alcaloïdes [2] [22] [25]

Les alcaloïdes sont des composés cycliques contenant un ou plusieurs atomes d'azote leur conférant la basicité, en facilitant leur isolement et purification comme sels solubles dans l'eau formés en présence des acides minéraux. Pourtant, le degré de basicité varie beaucoup, d'une part selon la structure de la molécule d'alcaloïde et d'autre part selon la présence et l'endroit des autres groupes fonctionnels.

Cette définition concerne les alcaloïdes avec un azote inclus dans l'hétérocycle et aussi les alcaloïdes ayant un atome d'azote exocyclique comme la colchicine. Certains alcaloïdes peuvent être de nature terpénique, stéroïdique ou aromatique.

Jusqu'à maintenant plus de 10.000 alcaloïdes ont été isolés ou détectés chez les plantes, les champignons et même les animaux, pour cela et à cause de la grande diversité de ce groupe de métabolites, leur classification est basée sur plusieurs critères : l'origine biologique, la voie de biosynthèse, la structure et les propriétés spectroscopiques/spectrométriques.

Les alcaloïdes jouent plusieurs activités pharmacologiques :

Analgésique (cocaïne), anticholinergique (atropine, scopolamine, galanthamine), antimalarial (quinine), anti-hypertensive (réserpine), antitussive (codéine), dépressant cardiaque, stimulant centrale (caféine), diurétique, anesthésiant local (cocaïne), narcotique (morphine), antitumorale, sympathomimétique (éphédrine)...

### **II-3) Screening phytochimique :**

Le screening phytochimique ou criblage phytochimique est un ensemble de tests ayant pour but de déterminer qualitativement les grandes familles des principes actifs ou métabolites secondaires contenus dans une plante. Il s'agit de faire l'inventaire des grandes classes de composés présents dans les plantes.

L'identification d'une famille chimique d'un extrait se fait en présence de réactifs spécifiques. En effet, les fonctions chimiques réagissent avec ces réactifs spécifiques pour donner naissance à des réactions de précipitation, de floculation, de complexation ou des troubles caractéristiques mettant en évidence la présence de la famille chimique. [28]

### III) EXTRACTION PAR SOLVANT

Une extraction par solvant consiste à retirer (extraire) une ou des espèces chimiques d'un milieu solide ou liquide à l'aide d'un solvant organique.

#### Les solvants

Les solvants sont des substances organiques liquides et souvent volatiles capables de dissoudre et d'extraire les substances chimiques comme les métabolites secondaires d'une plante. Le processus de dissolution ne modifie ni le solvant ni les composés dissous.

Les différentes propriétés chimiques telles que polarité, tension de vapeur, point d'ébullition et volatilité déterminent leur domaine d'application.

Chimiquement, les solvants constituent un groupe très hétérogène. [29] [30]

Le tableau suivant regroupe l'ensemble des solvants nécessaires aux extractions végétales, chacun en fonction de sa polarité.

*Tableau 2 : L'ensemble des solvants nécessaires aux extractions végétales [31]*

Solvants	Caractère		Classe chimique
	Hydrophile	Hydrophobe	
<p><b><u>Solvants polaires :</u></b></p> <p>Eau Méthanol Ethanol</p> <p><b><u>Solvants moyennement polaires :</u></b></p> <p>Isopropanol Acetonitrile Dichlorométhane Chloroforme Acétate d'éthyle Ether éthylique</p> <p><b><u>Solvants apolaires :</u></b></p> <p>Hexane Ether de pétrole</p>			<p><b><u>Substances très polaires :</u></b></p> <p>Alcaloïdes, sels Oses et osides Hétérosides Flavonoïdes hétérosides Acides aminés</p> <p><b><u>Substances moyennement polaires :</u></b></p> <p>Flavonoïdes aglucones Saponosides aglucones Alcaloïdes bases Huiles essentielles</p> <p><b><u>Substances apolaires :</u></b></p> <p>Quinones Caroténoïdes Stérols Acides gras Hydrocarbures</p>

La solubilisation des substances dans le solvant peut être effectuée par différentes méthodes (pressage, infusion, décoction, macération, enfleurage, hydrodistillation, utilisation de soxhlet).

### **III-1) Macération à froid [32] [33]**

La macération est un procédé qui consiste à laisser séjourner une plante dans un solvant à froid pour en extraire les composés solubles (arômes, principes actifs).

La plante est laissée à tremper dans le solvant à température ambiante, en vase clos, dans un endroit sombre et frais pendant un certain moment. Dans la plupart des cas, le solvant utilisé dans l'extraction des substances naturelles est un mélange d'eau et d'alcool permettant de prévenir la fermentation et/ou la détérioration.

A la fin de la période de macération, le liquide d'extraction est séparé du marc par filtration puis le filtrat subit l'évaporation à sec du solvant sous pression réduite pour obtenir l'extrait hydroalcoolique sec utilisé dans les études chimiques et biologiques.

Il s'agit d'une technique d'extraction traditionnelle. Son avantage est la préservation des espèces chimiques fragiles car elle est pratiquée à froid. Cependant, ses inconvénients sont la durée d'opération longue et la nécessité de beaucoup de quantité de solvant.

### **III-2) Extraction par soxhlet :**

L'extracteur Soxhlet permet de réaliser l'extraction par solvant en fonctionnement continu des métabolites secondaires renfermée dans la poudre sèche de la partie de la plante étudiée. La méthode permet l'extraction séquentielle de la plante sèche au moyen des différents solvants par ordre de polarité croissante.

Cette méthode est avantageuse par rapport aux macérations successives parce qu'elle n'a besoin qu'une petite quantité de solvant et de moindre opérations. On a donc un gain de temps de manipulation. Par ailleurs, le solvant qui condense est toujours pur. La solubilisation de la substance est donc favorisée grâce à des meilleurs coefficients de partage. Son inconvénient est l'extraction à chaud qui peut dégrader certaines substances chimiques.

### **III-3) Extraction liquide/liquide [34]**

C'est une opération fondamentale de transfert de matière entre deux phases liquides non miscibles, sans transfert de chaleur. Elle est basée sur la différence de solubilité du soluté dans les deux phases. En chimie organique, on utilise habituellement une phase aqueuse et une phase organique.

## *Etudes bibliographiques*

Elle consiste à extraire un ou plusieurs constituants d'une solution par dissolution au contact d'un solvant dans lesquels les corps sont plus solubles. Le contact intime du solvant avec la solution est réalisé dans des appareils destinés à mélanger les deux phases (ampoules, colonnes, mélangeurs). La séparation des phases est effectuée soit par décantation gravimétrique ou soit par centrifugation au cas où le mélange à séparer forme une émulsion.

Le passage du soluté dans le solvant aboutit théoriquement à un équilibre dans la composition des phases. L'obtention de cet équilibre est liée à la vitesse de diffusion du soluté d'une phase à l'autre.

## **IV) CHROMATOGRAPHIE**

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différentes affinités d'un ou plusieurs composés à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe et l'autre mobile. Il y existe plusieurs phénomènes physiques responsables de la rétention plus ou moins forte des composés sur la phase stationnaire.

En chromatographie d'adsorption, la capacité d'adsorption des composés sur la phase stationnaire est en relation directe avec leur polarité. Plus un composé est polaire, plus fortement sera-t-il adsorbé sur les sites actifs polaires de la phase stationnaire et moins vite il se déplacera. Dans le cas particulier d'une chromatographie liquide, la phase mobile appelée également éluant est un solvant ou un mélange de plusieurs solvants miscibles dont le rôle est de déplacer les composés du mélange vers le haut de la plaque en chromatographie sur couche mince ou vers la sortie de la colonne en chromatographie liquide sur colonne. Plus l'éluant est polaire, plus les composés organiques migreront rapidement à travers la phase stationnaire. [35]

### **IV-1) Chromatographie sur couche mince (CCM) [36]**

La chromatographie sur couche mince est une technique effectuée notamment en vue d'une analyse d'un mélange de substances organiques comme les extraits de plante.

#### **IV-1-1) Description et principe**

La phase stationnaire solide constituée généralement de gel de silice, de cellulose ou d'alumine, est fixée sur une plaque en aluminium, en verre ou en plastique alors que la phase mobile liquide, nommée éluant, est un solvant ou un mélange de solvants.

Les principaux éléments d'une séparation CCM sont :

- La cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.
- La phase stationnaire : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant fixée sur une plaque de verre ou d'aluminium.
- L'échantillon : constitué par dilution du mélange de substances à analyser, déposé sur la ligne de dépôt.
- Le système éluant de développement

Dans la réalisation d'une CCM, une petite quantité de l'échantillon déposée sur la plaque chromatographique est mise en contact avec la phase mobile dans la cuve. L'éluant migre de bas en haut, par capillarité, le long de la phase fixe en entraînant les constituants du mélange par phénomène d'adsorption-désorption. C'est le phénomène d'éluion, qui permet la séparation des constituants du mélange à analyser.

Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on définit par rapport frontal ou rétention frontale ( $R_f$ ) selon la relation :

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par l'espèce chimique}}{\text{distance parcourue par le front de l'éluant}} = \frac{x_A}{d}$$

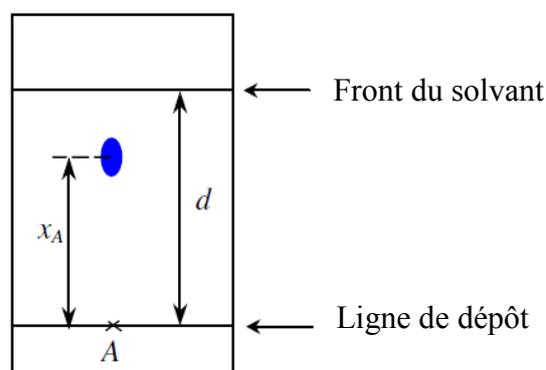


Figure 17 : Une plaque CCM

### IV-1-2) Révélation

L'identification des substances isolées se fait selon différentes méthodes

- directement si les substances sont colorées
- à l'aide de révélateurs chimiques si elles sont incolores.
- les taches de migration relatives aux substances peuvent également être mise en évidence sans ou avec pulvérisation de révélateur, par visualisation aux rayons UV à ondes courtes ( $\lambda_{\max} < 254 \text{ nm}$ ) ou à ondes longues ( $\lambda_{\max} > 365 \text{ nm}$ ).

### IV-1-3) Applications de la CCM

Etant donné qu'elle indique le nombre de composants d'un mélange, elle est utilisée pour suivre la progression d'une réaction. Elle permet également de contrôler la pureté d'un composé ou d'un mélange organique.

C'est aussi la technique habituellement employée pour rechercher le meilleur solvant, avant d'entreprendre une séparation par chromatographie sur colonne.

### **IV-2) Chromatographie sur colonne [37]**

C'est la méthode standard de fractionnement et de purification dans un laboratoire de chimie organique.

#### **IV-2-1) Description et principe**

Les éléments nécessaires en chromatographie sur colonne sont :

- La phase stationnaire : gel de silice active ou alumine
- Les éluants
- La colonne en verre
- Sable de Fontainebleu et coton
- L'échantillon à séparer
- Béchers, support et tubes à essais
- Collecteur de fractions

Elle est basée sur le même principe que la CCM. La phase solide est installée dans la colonne. L'échantillon est déposé en haut de la colonne par voie sèche ou par voie humide et la séparation des composants résultent de l'écoulement continu d'un éluant, traversant la colonne par gravité ou sous l'effet d'une faible, de moyenne ou de haute pression. On peut utiliser comme éluant un solvant unique ou bien accroître progressivement la polarité de l'éluant par mélange de solvant apolaire, moyennement polaire ou polaire de façon à accélérer le déplacement des composés à travers la colonne.

Les molécules sont entraînées vers le bas à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant. Le chromatogramme se développe en formant une succession de zones cylindriques incluant la substance éluee qui se séparent en migrant vers le bas.

Les substances éluees sont recueillies systématiquement à la sortie de la colonne.

#### **IV-2-2) Applications**

En chromatographie analytique, la CCM permet l'identification qualitative et/ou quantitative des constituants d'un mélange plus ou moins complexe.

En chromatographie préparative, dont les objectifs sont la séparation et la récupération, elle est utilisée pour purifier des produits intermédiaires formés au cours d'un procédé chimique, séparer les composés indésirables d'un mélange ou isoler des molécules actives.

La chromatographie en phase liquide utilisée à l'échelle préparatoire est capable de remplacer en une seule opération les mises en œuvre successives de techniques traditionnelles (extraction, distillation, cristallisation, ...) et permet d'atteindre une pureté très élevée inaccessible par d'autres méthodes de séparation ou en un temps plus court ou encore avec un rendement plus élevé.

## V) TESTS BIOLOGIQUES [38] [39] [40]

Les tests biologiques menés dans le cadre de ce travail ont pour objectif de déterminer les activités antibactériennes et antifongiques des extraits de plante.

En effet, le but des essais *in-vitro* de sensibilité des agents pathogènes aux antimicrobiens est de prédire comment un microorganisme répondra vraisemblablement à une thérapie antimicrobienne chez l'hôte infecté.

### V-1) **Choix d'une méthode :**

De nombreuses techniques permettent de réaliser les tests d'activité antimicrobienne.

Les plus fréquemment employées sont la diffusion sur disque, la dilution en milieu gélose, les dilutions (macro et micro) en bouillon et le test de concentration en bande (par exemple : l'E-test).

Le choix d'une méthode dépend de nombreux facteurs comme l'aspect pratique, la flexibilité, l'automatisation, le coût, la reproductibilité, l'exactitude et les préférences personnelles.

Principalement, les trois techniques suivantes conduisent à des résultats reproductibles et répétables quand elles sont réalisées correctement :

- diffusion sur disque,
- dilution en bouillon
- dilution en milieu gélose.

La méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé est la méthode utilisée dans notre étude. C'est une technique simple, rapide, fiable et visuelle. [39]

Elle est la plus fréquemment utilisée puisqu'elle ne requiert ni de techniques ni d'équipement de laboratoires sophistiqués mais peut se faire dans tous les laboratoires de microbiologie clinique. Elle est facile à mettre en œuvre, reproductible et a un faible coût.

### V-2) **Méthode par diffusion sur disque en milieu gélosé**

Elle est appelée également méthode des disques ou antibiogramme standard. Elle se réfère à la diffusion d'un agent antimicrobien d'une concentration spécifique à partir de disques, dans le milieu de culture solide, qui a étéensemencé avec l'inoculum choisi et isolé en culture pure. Après un certain temps de culture, l'aire circulaire qui entoure le disque et qui

ne montre aucune culture visible permet de mesurer le diamètre d'inhibition qui indique le degré de sensibilité de la bactérie. En effet, le diamètre de cette zone de halo d'inhibition est proportionnel à la sensibilité bactérienne à l'antimicrobien présent dans le disque. Plus ce diamètre est grand, plus la bactérie est sensible à l'antibiotique essayé. Plus ce diamètre est petit, plus la bactérie est résistante à l'antibiotique essayé.

### **V-3) L'antibiogramme :**

C'est une application de la détermination de la concentration minimale inhibitrice ou CMI par une méthode de diffusion. Elle permet la détermination de la sensibilité d'une bactérie. [41]

Elle consiste à mettre en contact un panel d'antibiotiques avec une bactérie. Il permet de savoir comment une bactérie donnée réagit à un antibiotique donné. L'antibiogramme permet de mesurer la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne. Il permet donc de jauger l'efficacité d'un produit ou substance reconnue à vertu thérapeutique comme les extraits de plante.

### **V-4) Choix des souches testées**

Les germes testés sont choisis comme représentatifs des bactéries à gram+, à gram- et des souches fongiques. Ils ont été sélectionnés en raison de leur utilisation courante pour le dosage des antibiotiques et aussi pour les maladies tropicales courantes qu'elles occasionnent : diarrhées, infections cutanées, entre autres. Les souches microbiennes essayées sont classées comme suit :

Bactéries à gram (+) :

- *Bacillus cereus* (CIP 642)
- *Enterococcus faecalis* (ATCC 29219)
- *Listeria monocytogène* (ATCC 19111)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

Bactéries à gram (-) :

- *Escherichia coli* (CIP 103914)
- *Klebsiella pneumoniae* (LHAE 3)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)
- *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028)
- *Vibrio cholerae* (LHAE 1)

Souche fongique (Levure ou champignon) :

- *Candida albicans* (ATCC 10231)

Leurs descriptions et les symptômes des maladies provoqués sont résumés dans l'annexe 2.

En particulier, parmi les souches microbiennes testées lors de notre étude, figure la souche fongique *Candida albicans*, champignon origine de diverses maladies, notamment les acnés juvéniles, certaines maladies de la peau et maladies diarrhéiques.

Partie II) *Études*

*Expérimentales*

Les enquêtes ethnobotaniques menées auprès des tradipraticiens nous ont permis de constater que la plante *Schefflera bojeri*, objet de notre étude, possède de nombreuses vertus thérapeutiques, notamment antibactériennes.

Les travaux menés dans notre ouvrage consistent en premier lieu à extraire les substances naturelles ou métabolites secondaires renfermés par la plante puis en second lieu, à identifier la ou les familles des composés naturels responsables d'une ou des activités biologiques de la plante.

Dans cet objectif, nous avons abordé respectivement l'étude chimique de la plante puis les analyses des activités antimicrobiennes des extraits de la plante.

Après collecte de la plante et son extraction brute, un screening phytochimique des extraits bruts a été réalisé pour mettre en évidence les familles chimiques présentes dans la plante.

Ensuite, nous avons procédé à la recherche des substances actives de la plante par la méthode bioguidée c'est-à-dire purification des extraits associée à des tests biologiques. Le bioguidage consiste à déterminer, tout au long de la purification, la ou les activités biologiques d'intérêt des différentes fractions obtenues. Les fractionnements ont pour but d'isoler la ou les substances responsables de l'activité biologique parmi les composés de l'extrait brut de la plante.

Les molécules bioactives peuvent se trouver dans toute partie de la plante. Dans notre travail, nous avons procédé aux études des extraits de feuilles, d'écorce de tige et d'écorce de racine.

Nous adoptons dans notre étude, le plan des étapes d'extraction et de fractionnement bioguidé suivant :

- Récolte et préparation de la plante
- Extraction des métabolites secondaires
- Screening phytochimique des extraits bruts
- Partage de l'extrait brut bioactif
- Fractionnement
- Screening phytochimique de la fraction bioactive

L'organigramme correspondant est donné ci-dessous :

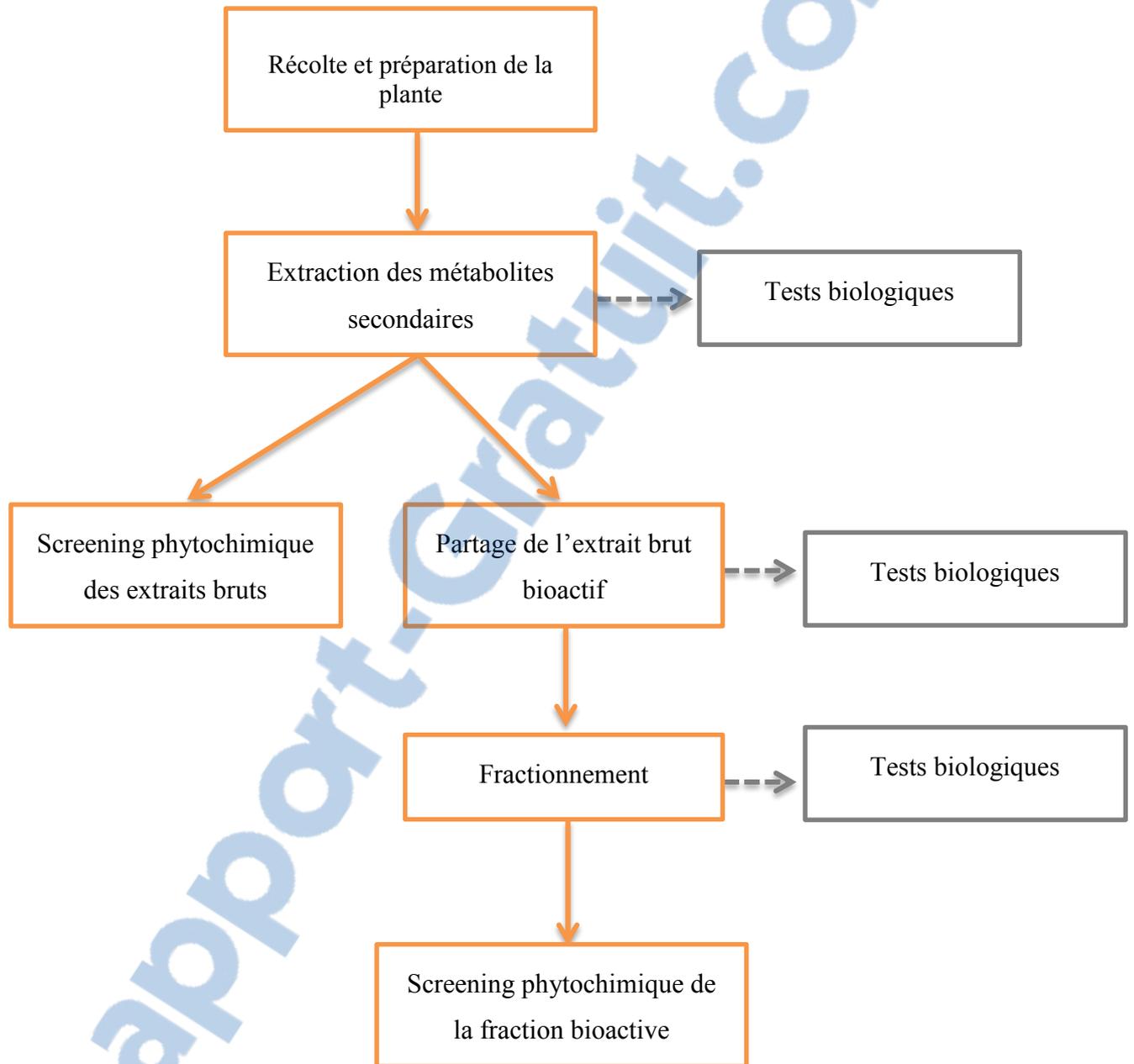


Figure 18 : Organigramme des étapes d'extraction et de fractionnement bioguidé

## **I) RECOLTE ET PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL**

### **I-1) Récolte et identification**

Notre plante a été récoltée dans la forêt de Tapia à Ankalalahana, district Arivonimamo, région Itasy le 30 Octobre 2015. Nous avons collecté des tiges, feuilles et racines.

Nous avons réalisé un herbier de la plante puis son identification botanique a été effectuée par Dr Franck Rakotonasolo, botaniste du Parc Botanique et Zoologique de Tsimbazaza.

### **I-2) Séchage et broyage**

Juste après récolte, les écorces des tiges et des racines sont découpées en taille moyenne avant le séchage et broyage.

Le séchage a été effectué à l'ombre à la température ambiante pendant 8 jours. Ceci permet de minimiser les dégradations des substances naturelles présentes dans la plante.

Après séchage, ils sont broyés à l'aide d'un broyeur à lame et tamisés à des granulométries inférieures à 2mm.

Ce broyat obtenu constitue notre matériel végétal dont nous utilisons dans la suite de nos travaux de recherche.

## II) EXTRACTION DES METABOLITES SECONDAIRES

### II-1) Extraction par macération

La méthode utilisée est la méthode classique d'extraction hydroalcoolique de la drogue ou partie végétale sèche de la plante par macération.

Les drogues sont macérées dans un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O : 80/20. Trois opérations successives de macération de 24h ont été effectuées afin d'assurer le maximum épuisement du matériel végétal. Puis, l'extrait hydroalcoolique obtenu est filtré sous vide à l'aide du filtre Buchner pour séparer le filtrat liquide du marc. La séparation du solvant et des constituants solubles se fait par évaporation sous pression réduite du mélange sur un évaporateur rotatif (Rotavapor R-3000 A24, BUCHI) à température comprise entre 40°C et 50°C afin de ne pas dégrader les métabolites naturels extraits.



*Photo 5 : Cliché de la filtration sur Buchner*



*Photo 6 : Cliché de l'évaporation sous-vide de l'extrait au rotavapor*

Le filtrat recueilli dans l'extraction des feuilles a une couleur verte, c'est l'indication de la présence de chlorophylle. Nous avons alors procédé à la déchlorophyllation à l'aide du charbon actif. Le départ de chlorophylle était prouvé par l'absence de coloration verte par dépôt d'une goutte de la solution sur un papier filtre.

Dans le cas particulier des feuilles, nous avons effectué une macération sans déchlorophyllation afin de pouvoir comparer les activités biologiques des extraits bruts déchlorophyllé et non déchlorophyllé.

Les extraits bruts obtenus indicés EM (extrait méthanolique) sont alors recueillis puis pesés et conservés dans des flacons de verre de couleur sombre maintenu à l'abri de la lumière.

Les quantités de drogues utilisées, les volumes du solvant suffisants, les masses des extraits bruts obtenus ainsi que les rendements d'extraction sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau 3 : Rendements et notations des extraits bruts**

Types de drogues	Feuilles		Ecorce de tige	Ecorce de racine
	MeOH/H <sub>2</sub> O	MeOH/H <sub>2</sub> O		
Masse (g)	200	20	150	78
Volume du solvant (ml) ×3	1000	100	900	700
Masse de l'extrait (g)	74,500 (déchlorophyllé)	6,993 (non déchlorophyllé)	21,025	10,290
<b>Rendement (%)</b>	<b>37,250</b>	<b>34,965</b>	<b>14,016</b>	<b>13,192</b>
Notation des extraits	EMF <sub>A</sub>	EMF <sub>S</sub>	EMT	EMR

Le rendement est calculé suivant la formule suivante :

$$\text{rendement} = \frac{\text{masse de l'extrait}}{\text{masse de la drogue}} \times 100$$

Ces résultats montrent que parmi les trois parties de la plante étudiée, la feuille est la plus riche en substances chimiques solubles avec un rendement moyenne de 35%. Cette valeur particulièrement élevée pourrait être due à sa richesse en saponines qui sont très solubles dans des solvants constitués de mélange alcool/eau.

### II-2) Tests biologiques des extraits bruts

Le test biologique met en évidence les activités antimicrobiennes des extraits, donc ses effets thérapeutiques. Il est nécessaire pour savoir lesquels des extraits ont des activités biologiques marquantes et méritent d'être étudiés par le fractionnement bioguidé.

Le test a été réalisé dans le Laboratoire d'Hygiène des Aliments et de l'Environnement (LHAE) de l'Institut Pasteur de Madagascar. La méthode utilisée est la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé, qui est la plus utilisée par les laboratoires d'analyse biologique bactérienne. [42]

Les modes opératoires des tests effectués, ainsi que les matériels et méthodes utilisés sont récapitulés dans l'annexe 1.

La sensibilité des souches bactériennes est proportionnelle au diamètre du halo d'inhibition autour du disque après l'incubation selon les indications du tableau suivant :

**Tableau 4 : Référence des sensibilités des souches** [43]

Diamètre d'inhibition Ø (mm)	Sensibilité des souches
$\text{Ø} < 7 \text{ mm}$	Résistante
$7 \text{ mm} \leq \text{Ø} \leq 8 \text{ mm}$	Peu sensible
$8 \text{ mm} < \text{Ø} \leq 9 \text{ mm}$	Sensible
$\text{Ø} > 9 \text{ mm}$	Très sensible

Les souches testées sont choisies comme représentatives des bactéries à gram+, à gram- et des souches fongiques. Elles ont été sélectionnées en raison de leur utilisation courante pour le dosage des antibiotiques. [44]

### II-2-1) Test des antibiotiques de référence et du DMSO

Des antibiotiques de référence sont testés pour chaque souche comme témoin positif. Le DMSO, qui est le solvant de dissolution des extraits, est aussi testé à blanc pour voir s'il modifie leurs activités. Les résultats correspondants sont donnés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 5 : Diamètres d'inhibition des antibiotiques de référence et du DMSO**

Nom des souches	Antibiotiques	Diamètre d'inhibition de l'antibiotique (mm)	Diamètre d'inhibition du DMSO (mm)
<i>Bacillus cereus</i>	GMI	28	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	SXT	29	6
<i>Enterococcus faecalis</i>	Ampicilline	23	6

<i>Listeria monocytogènes</i>	Ampicilline	28	6
<i>Escherichia coli</i>	CTX	34	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX	31	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GMI	24	6
<i>Salmonella typhimurium</i>	Ampicilline	31	6
<i>Vibrio cholerae</i>	Ampicilline	28	6

Les résultats du tableau précédent montrent que les antibiotiques de référence utilisés sont bien des témoins positifs à nos tests. Le DMSO n'a pas d'activité biologique vis-à-vis de souches testées, donc les résultats des tests d'activité antibactérienne obtenus correspondront aux activités propres des extraits.

### II-2-2) Test des extraits bruts

Les diamètres du halo d'inhibition mesurés en mm pour les extraits bruts après incubation sont résumés dans le tableau 6 :

**Tableau 6 : Antibiogramme des extraits bruts de la plante**

	Noms des souches	EMF <sub>A</sub>	EMF <sub>S</sub>	EMT	EMR
<b>Bactéries à gram +</b>	<i>Bacillus cereus</i>	6	6	6	6
	<i>Staphylococcus aureus</i>	6	6	6	6
	<i>Enterococcus faecalis</i>	6	6	NT	NT
	<i>Listeria monocytogènes</i>	6	6	6	6
<b>Bactéries à gram -</b>	<i>Escherichia coli</i>	6	6	6,5	7
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	6	6	6
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,5	7,5	6	6
	<i>Salmonella typhimurium</i>	6	6	6	6
	<i>Vibrio cholerae</i>	6	6	6	6
<b>Souche fongique</b>	<i>Candida albicans</i>	13	10	NT	NT

Note :

NT : non testé

Les résultats du tableau 5 montrent que les extraits bruts de *schefflera bojeri* ne présentent presque aucune activité sur les bactéries, sauf une très faible sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* sur l'extrait de feuilles. Par contre, les extraits bruts des feuilles sont très actifs sur la souche fongique *Candida albicans*.

Nous remarquons aussi que l'extrait déchlorophyllé de feuille a une activité supérieure à celle non déchlorophyllé (vis-à-vis du *Candida albicans* 13mm et 10mm de diamètres). On peut dire donc que la déchlorophyllation a amélioré son activité biologique. La chlorophylle constitue une charge dans l'extrait et diminue son activité d'où la nécessité de procéder à la déchlorophyllation des extraits bruts alcooliques avant partage liquide/liquide et tests biologiques.

En particulier, la suite de notre fractionnement bioguidé est donc orientée sur l'extrait de feuille déchlorophyllé qui, d'après nos résultats de tests antibactériens, a montré une très forte activité biologique sur *Candida albicans*.

Ces résultats confirment également les enquêtes ethnobotaniques affirmant l'usage traditionnel des extraits de feuilles de *Schefflera bojeri* à des fins thérapeutiques pour guérir les acnés juvéniles, de nombreuses maladies cutanées et certaines maladies diarrhéiques provoqués par la souche fongique *Candida albicans*. [45]

Ainsi, la suite de notre étude de fractionnement bioguidé est donc déterminée par ce résultat d'activité de l'extrait méthanolique déchlorophyllé de feuilles de *Schefflera bojeri* sur la souche *Candida albicans*.

Toutefois, des tests biologiques de sensibilité d'autres souches ont été menés afin de trouver d'autres activités de nos extraits de plante.

### III) SCREENING PHYTOCHIMIQUE DES EXTRAITS BRUTS

Le criblage ou screening phytochimique permet de mettre en évidence les familles chimiques susceptibles d'être présentes dans la plante. Son but est de donner un aperçu global du profil chimique des extraits étudiés, c'est la première information sur l'espèce végétale.

Les méthodes de criblage phytochimique sont basées sur des tests de caractérisation par formation de complexes insolubles (réaction de précipitation) ou bien par formation de complexes colorés (réaction de coloration).

#### III-1) Modes opératoires

##### III-1-1) Criblage des coumarines

###### *1-1-1) Première méthode* [21] [46]

Le test de détection des coumarines est basé sur leur propriété à présenter une fluorescence nette aux rayons UV. A 200 mg d'extrait méthanolique, on ajoute 10 ml d'eau distillée. Après dissolution et filtration, à 5 ml du filtrat est additionnée goutte à goutte une solution aqueuse de soude à 20 %, puis on la chauffe au bain marie bouillant pendant quelques minutes. Le mélange est ensuite observé sous rayonnement UV 365 nm : une fluorescence nette (jaune, vert, bleu, orange) sous UV 365 nm indique la présence des coumarines (méthode indicative et non une identification).

###### *1-1-2) Deuxième méthode* [47]

La plante sèche broyée est introduite dans le fond d'un tube à essai avec de l'eau. Dans la partie supérieure du tube est placé un papier imbibé d'une solution aqueuse de soude 0,2N. Une fluorescence jaune de ce papier à la lumière UV indique une réaction positive. D'autres composés présentent également une fluorescence nette aux UV. Cette mise en évidence ne correspond donc qu'à une indication et non identification.

##### III-1-2) Criblage des flavonoïdes [46] [48] [49]

200 mg d'extrait MeOH sont dissous dans de l'éthanol 80%. Après filtration, la solution d'extrait est soumise aux réactions suivantes :

###### *1-2-1) Test de Wilstater*

1ml de l'échantillon est additionné de 0,5 ml de HCl concentré et de 3 tournures de magnésium. Après 10 mn, l'apparition d'une coloration rouge indique la présence des

flavones, l'apparition d'une coloration pourpre indique la présence de flavonols et l'apparition d'une couleur rouge violacée indique la présence de flavanones et flavanols.

### **1-2-2) Test de Wilstater modifié**

1ml de l'échantillon est additionné de 0,5 ml de HCl concentré et de 3 tournures de Magnésium. Après dissolution du magnésium, 1 ml d'eau suivi de 1ml d'alcool isoamylique sont ajoutés. Après 10 mn l'apparition d'une coloration rouge indique la présence des flavones et l'apparition d'une coloration pourpre indique la présence de flavonols.

### **III-1-3) Criblage des anthocyanes [46] [49]**

A 2 ml de solution éthanolique d'extrait, on ajoute 2 ml de solution d'acide chlorhydrique à 25%. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacé par addition de solution d'ammoniaque à 25% indique la présence d'anthocyanes.

### **III-1-4) Criblage des leucoanthocyanes [46]**

A 2 ml de solution éthanolique d'extrait sont additionnés 2 ml de HCl concentré. Le mélange est placé au bain marie bouillant pendant une vingtaine de minutes. L'apparition d'une coloration rouge (rouge grenat) démontre la présence de leucoanthocyanes.

### **III-1-5) Criblage des quinones [46] [48]**

#### **1-5-1) Réaction de Bornträger**

200 mg d'extrait de MeOH sont dissous dans de l'eau distillée, puis filtrés. Le filtrat est extrait deux fois au benzène. A 10 ml d'extrait benzénique est ajouté 5 ml de solution aqueuse d'ammoniaque à 20%, puis agité. Après décantation, une coloration rouge orangée ou rouge violacée de la phase ammoniacale indique un test positif pour les anthraquinones libres.

#### **1-5-2) Hydrolyse acide**

(Détection des hétérosides anthraquinones par leur transformation en anthraquinones)

100 mg d'extrait MeOH sont dissous dans une solution aqueuse de HCl 12% par chauffage dans un bain-marie bouillant. Après refroidissement, la solution est épuisée par du chloroforme. La solution chloroformique est évaporée à sec, et l'extrait est dissous dans une solution aqueuse d'ammoniaque à 20%. Une coloration jaune qui vire au rouge par chauffage au bain-marie apparaît en présence des hétérosides anthracéniques.

### **III-1-6) Criblage des tanins et autres composés phénoliques**

#### ***1-6-1) Première méthode*** [47]

Action du chlorure ferrique sur l'infusé à 10%. Les colorations sont variables allant du vert au bleu au brun passant par le bleu souvent accompagné de précipités de couleur diverses. Ce réactif réagissant aussi sur les composés phénoliques donne cependant une bonne indication dans le cas d'un précipité bleu-noir (tanins galliques) et d'un précipité brun-vert (tanins catéchiques).

#### ***1-6-2) Deuxième méthode*** [46] [49]

L'extrait organique de masse 100 mg est dissout dans 25 ml d'eau distillée bouillante puis additionné de quatre gouttes de solution aqueuse de NaCl à 10% (m/v). La solution ainsi obtenue est filtrée sur papier Whatman. Le filtrat refroidi est alors réparti dans quatre tubes à essai, le 4<sup>ème</sup> tube servant de témoin.

- Tube n°1 : addition de cinq gouttes de gélatine à 1% (m/v). L'apparition d'un précipité éventuel indique la présence de polyphénols.
- Tube n°2 : addition de cinq gouttes de gélatine salée (mélange volume à volume (50/50 v/v) de gélatine à 1% et de solution NaCl à 10%). L'apparition d'une précipitation par la gélatine salée signifie la présence de tanins.
- Tube n°3 : addition de cinq gouttes de FeCl<sub>3</sub> dilué à 1% dans le méthanol.
  - La présence de tanins galliques et ellagiques (tanins hydrolysables) est indiquée par l'apparition d'une coloration bleue noire.
  - La présence de tanins catéchiques (tanins condensés) s'observe par l'apparition d'une coloration brune verdâtre.

Une réaction négative à la gélatine salée accompagnée d'une coloration verte ou bleue noire avec FeCl<sub>3</sub>, est due à la présence d'autres types de composés phénoliques.

### **III-1-7) Criblage des triterpènes et stéroïdes** [46] [49]

On prend 500 mg de l'extrait MeOH dépigmenté ou d'extrait organique et y ajouter 20 ml de dichlorométhane puis agiter pendant 5 à 10 min. Laisser décanter puis sécher la solution avec du sulfate de sodium Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre. Filtrer et répartir le filtrat dans 5 tubes à essais propres et secs ; le tube n°5 servira de témoin.

#### **❖ *Test de Liebermann Burchard***

Dans le 1er tube, additionner 4 gouttes d'anhydride acétique et 4 gouttes d'acide sulfurique concentré. La présence des composés chimiques est indiquée par la coloration observée suivante :

- Pourpre : présence de triterpènes ;
- Violet ou bleu-vert : présence de stéroïdes.

❖ **Test de Salkowski**

Incliner le tube à 45° puis ajouter 1ml d'acide sulfurique concentré. Après 30 mn, la présence de stérols insaturés est indiquée par l'apparition d'un anneau de séparation des phases de couleur rouge.

❖ **Test de Badjet Kedde**

Additionner quelques grains d'acide picrique à la solution. L'observation d'une coloration rouge dénote la présence de stéroïdes lactoniques.

❖ **Test de Keller-Killiani**

Incliner le tube de 45° et additionner quelques gouttes de FeCl<sub>3</sub> à 10% dans le méthanol et quelques gouttes d'acide acétique glacial. La présence d'un anneau de séparation de phase de couleur rouge pourpre indique la présence de désoxy-2-sucre.

**III-1-8) Criblage des iridoïdes [48]**

Les tests sont réalisés sur l'extrait MeOH.

**1-8-1) Réaction avec HCl dilué suivi de chauffage**

A 1 ml de solution limpide d'extrait est ajouté 0,5 ml de HCl 12% aqueux. Le mélange est ensuite chauffé au bain marie à 80°C pendant 2 à 3 min.

**1-8-2) Réaction en présence de glycérol**

Le réactif est constitué d'un mélange à volume égal d'éthanol 80%, de glycérol et de HCl 12% aqueux préparé juste avant le test. A 1 ml de solution limpide d'extrait est ajouté 0,5ml de ce réactif. Le mélange est ensuite chauffé au bain-marie à 80°C pendant 2à3 min.

**1-8-3) Réaction de Trim et Hill**

Le réactif est constitué d'un mélange à volume égal d'une solution aqueuse de CuSO<sub>4</sub> à 5% (m/v) et de HCl 12% aqueux préparé juste avant le test. A 1 ml de solution limpide

d'extrait est ajouté 0,5 ml de ce réactif. Le mélange est ensuite chauffé au bain marie à 80°C pendant 2 à 3 min.

Pour chaque réaction, l'apparition de précipité noir après chauffage indique la présence des iridoïdes.

### **III-1-9) Criblage des saponines [46] [49]**

Ils sont des tensio-actifs. Le test est basé sur leur dissolution dans l'eau en formant une solution moussante.

1 g de drogue et 10 ml d'eau distillée sont agités vigoureusement pendant 30 s dans un tube à essai. Puis on laisse reposer le tube à essai verticalement pendant 30 min. Après, on mesure la hauteur de mousse. La présence des saponines est indiquée par une hauteur de mousse supérieure ou égale à 3 cm.

### **III-1-10) Criblage des alcaloïdes : [46] [48] [49]**

Les alcaloïdes sont des substances azotées basiques. Les réactions de caractérisation effectuées sont basées sur leur capacité de se combiner avec les métaux lourds en formant des précipités.

5g de la drogue sont macérés dans une solution de HCl aqueux 2N. Après agitation, on laisse reposer pendant 30 min. Puis, on filtre sur coton et on répartit le filtrat dans 4 tubes à essais. Dans chaque tube à essais, on ajoute 5 gouttes des réactifs correspondants :

Tube n°1 : Réactif de Wagner (le résultat attendu est précipité rouge orangé)

Tube n°2 : Réactif de Mayer (le résultat attendu est précipité blanc)

Tube n°3 : Réactif de Dragendorff (le résultat attendu est précipité orange)

Tube n°4 : Témoin

### **III-1-11) Criblage des composés cyanogénétiques [46]**

Dans un tube à essai, humecter 2 g de matériel végétal sec avec une quantité suffisante d'eau puis ajouter 1 ml de  $\text{CHCl}_3$ . Insérer ensuite une bandelette de papier filtre Whatman imprégnée de solution fraîchement préparée de picrate de sodium (5 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 0,5 g d'acide picrique + 100 ml d'eau distillée) juste au-dessus de la drogue et plier sur le bord du tube à essai. Boucher le tube avec du coton hydrophile et chauffer à 35°C au bain marie pendant 3 h. La présence des composés cyanogénétiques est indiquée par le virage de la coloration du papier picrossodé au rouge orangé par production de HCN.

**III-1-12) Criblage des polysaccharides [48]**

A un décocté limpide de poudre végétal sont additionnés 3 volumes d'éthanol 90%. La formation d'un précipité indique la présence de polysaccharides.

**III-2) Résultats**

**III-2-1) Résultats de test de coumarine**

Les résultats sont tous négatifs, la plante ne contient pas de coumarine.

**III-2-2) Résultats des flavonoïdes**

	EMF	EMT	EMR
Test de Wilstater	+++ (Rouge)	+ (rouge)	-
Test de Wilstater	+++ (Rouge)	+ (rouge)	-

Ce tableau montre que les flavonoïdes sont abondants dans les feuilles, présentes en faible quantité dans l'écorce de tige et absentes ou à l'état de trace dans l'écorce des racines.

**III-2-3) Résultats des anthocyanes**

Tous les tests ont montré des résultats négatifs, sauf sur l'EMF qui a montré des traces de virage au bleu violacée. L'EMF contient donc peu d'anthocyanes.

**III-2-4) Résultats des leucoanthocyanes**

EMF	EMT	EMR
+++	+	+

Nous observons l'abondance des leucoanthocyanes dans les feuilles et présence faible dans les écorces de tige et de racine.

**III-2-5) Résultats des quinones**

	EMF	EMT	EMR
Réaction de Bornträger	+	+	-
Hydrolyse acide	-	+	-

Ce tableau nous montre que les quinones existent à l'état de trace dans toutes les parties de la plante.

**III-2-6) Résultats des tanins et autres composés phénoliques**

**2-6-1) Résultat de la première méthode**

Feuille : précipité brun-vert

Tige : précipité brun-vert

Racine : précipité brun-vert

**2-6-2) Résultats de la deuxième méthode**

	EMF	EMT	EMR
Tube 1	-	-	-
Tube 2	-	-	-
Tube 3	Coloration verte	Coloration verte	Coloration vert

D'après ces deux résultats, on peut dire que la plante ne contient pas des tanins mais des autres composés phénoliques.

**III-2-7) Résultats des triterpènes et stéroïdes**

	EMF	EMT	EMR
Test de Liebermann Burchard	+++ Pourpre (mélangé d'un reflet bleu-vert)	+ (pourpre)	++ (pourpre)
Test de Salkowski	+++	++	++
Test de Badjet-Kedde	-	-	-
Test de Keller-Killiani	-	+	+

D'après ce résultat, nous déduisons que les feuilles contiennent abondamment des triterpènes, stéroïdes et des stérols insaturés. On observe leurs présences faibles ou moyennes dans les écorces de tige et de racine.

**III-2-8) Résultats des iridoïdes**

	EMF	EMT	EMR
Réaction avec HCl dilué	-	+++	+++
Réaction en présence de glycérol	-	-	++
Réaction de Trim et Hill	+++	+++	-

Les trois tests exécutés sont inclusifs et non exclusifs. En effet, un résultat positif à l'une seulement des trois méthodes indique la présence d'iridoïdes dans l'extrait.

Ce résultat montre alors la présence d'iridoïdes dans les 3 parties étudiées de *S. bojeri* (feuilles, écorces de tige et écorces de racine).

### III-2-9) Résultats des saponines

Réactif utilisé	Résultat attendu	EMF	EMT	EMR
Eau	Hauteur de mousse $\geq$ 3cm	+++	-	-

Les résultats indiquent que les feuilles sont très riches en saponines tandis que les écorces de tige et de racine n'en contiennent aucun.

### III-2-10) Résultats des alcaloïdes

Les 3 extraits ont montré des résultats négatifs aux tests. La plante ne contient pas d'alcaloïdes.

### III-2-11) Résultats des composés cyanogénétiques

Les résultats sont tous négatifs. Les composés cyanogénétiques sont absents ou existent à l'état de trace dans notre plante.

### III-2-1) Résultats des polysaccharides

Feuille	Tige	Racine
++	-	+++

L'écorce de racine est riche en polysaccharides. Leur présence est moyenne dans les feuilles et très faibles ou nulle dans l'écorce de tige.

## III-3)Récapitulation de tous les résultats des criblages phytochimique :

*Tableau 7 : Résultats du criblage phytochimique du Schefflera bojeri*

Familles chimiques		EMF	EMT	EMR
Coumarines		-	-	-
Flavonoïdes	Flavones	-	+	-
	Flavonols	+++	-	-
	Flavanones et flavanols	-	-	-
Anthocyanes		-	-	-

Leucoanthocyanes		+++	+	+
Quinones	Anthraquinones libres	+	+	-
	Hétérosides anthracéniques	-	+	-
Tanins et autres composés phénoliques	tanins	-	-	-
	polyphénols	-	-	-
	Autres types des composés phénoliques	+	+	+
Triterpènes et stéroïdes	triterpènes	+++	+	++
	stéroïdes	++	-	-
	Stérols insaturés	+++	++	++
	Stéroïdes lactoniques	-	-	-
	Desoxy-2 sucre	-	+	+
Iridoïdes		+++	+++	+++
Saponines		+++	-	-
Alcaloïdes		-	-	-
Composés cyanogénétiques		-	-	-
Polysaccharides		++	-	+++

Appréciation de présence

- : négatif ou existence à l'état de trace

+ : Faible

++ : Abondante

+++ : Forte

Ces résultats montrent que, la feuille est la partie de la plante la plus riche en métabolites secondaires.

Parmi les trois grandes familles chimiques des métabolites secondaires, la famille des alcaloïdes n'a pas été mise en évidence dans l'espèce *Schefflera bojeri*.

Concernant les composés phénoliques, les résultats du criblage phytochimique indiquent la forte présence des flavonols et des leucoanthocyanes dans les feuilles. Des anthraquinones libres et des autres types de composés phénoliques existent aussi, mais en

faible quantité. Dans les écorce de tige et de racine, certaines de ces composés sont présentent en faible quantité.

Les terpénoïdes du *Schefflera bojeri* sont des iridoïdes, triterpènes, stéroïdes, stérols insaturés à forte présence dans les feuilles et abondance dans les écorces de tige et de racine. Il y a aussi présence faible de désoxy-2-sucres dans les écorces de tige et de racine. La présence des saponosides en quantité très forte dans les feuilles a été très remarquable, tandis qu'ils sont absents dans les autres parties de la plante.

Les polysaccharides sont abondants dans les feuilles et fortement présentes dans les racines. Les composés cyanogénétiques ne sont pas mis en évidence dans la plante.

## IV) FRACTIONNEMENT PAR PARTAGE DE L'EXTRAIT BRUT

### IV-1) Extractions et rendements

La partition par des solvants à polarité croissante permet de séparer les groupes de molécules suivant leur polarité. Les partitions séquentielles de l'extrait brut déchlorophyllé de feuille sont exécutées en utilisant successivement les solvants Hex, DCM, AcOEt et le BuOH. Ainsi, les substances à polarité inférieure ou égale au solvant sont extraites par le solvant employé, d'où l'utilisation des solvants du moins polaire au plus polaire pour avoir une bonne séparation des substances naturelles de l'extrait brut.

En premier lieu, ce dernier est d'abord dissous dans un mélange EtOH/H<sub>2</sub>O-50/50 puis versé dans une ampoule à décanter. Ensuite, on ajoute de l'hexane au même volume que la phase aqueuse. Après agitation, le mélange est laissé à décanter jusqu'à la séparation en 2 phases bien distinctes. La phase inférieure qui est la phase aqueuse est alors soutirée et la phase organique de l'hexane est filtrée et desséchée au sulfate de sodium Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre. L'opération est répétée 3 fois avec le même solvant pour assurer le maximum d'extraction. On observe que la phase organique est devenue de plus en plus claire. Le solvant est éliminé par évaporation sous pression réduite, l'extrait hexanique de partage obtenu noté EMFH est pesé puis disposé dans un flacon en verre sombre.

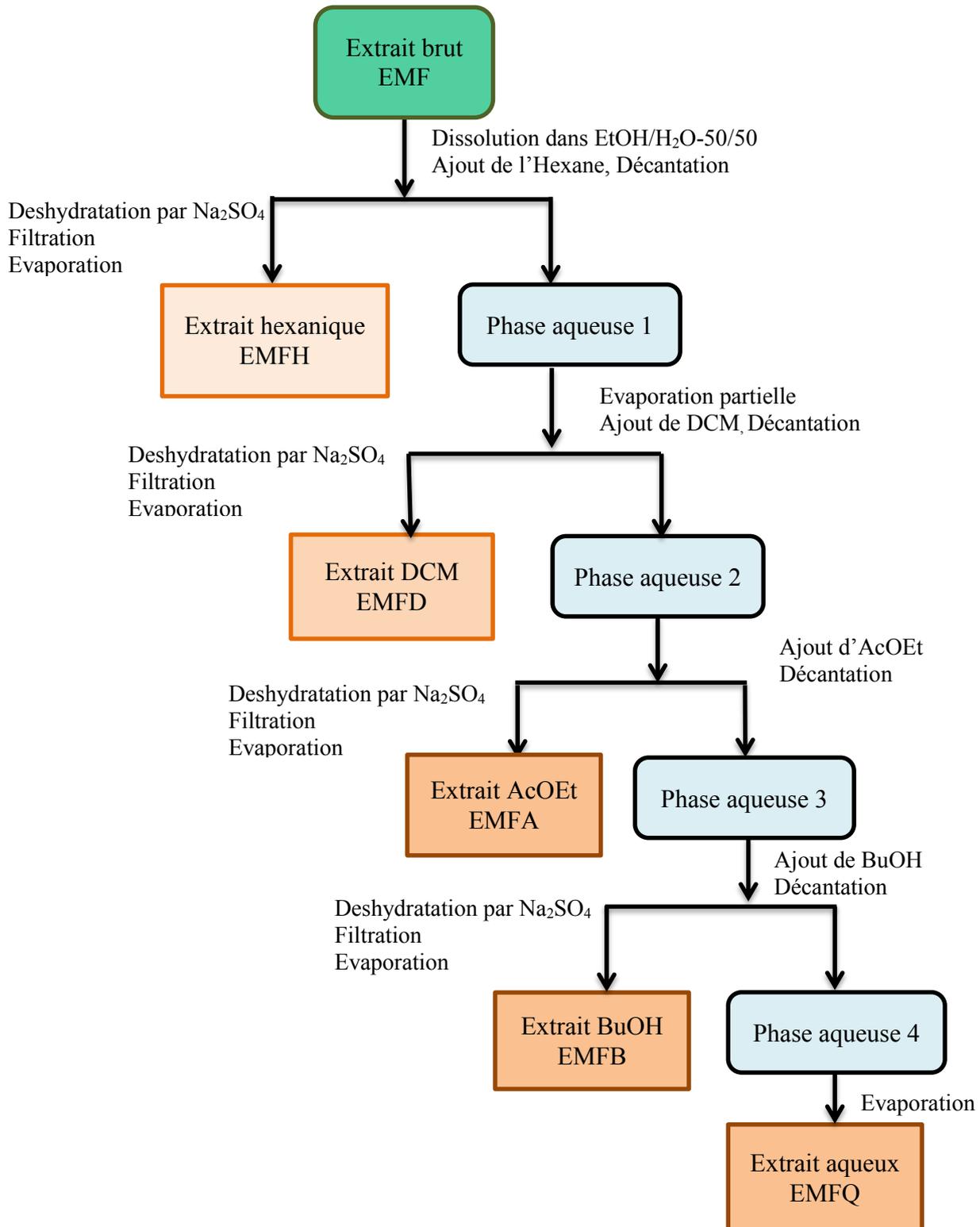
La suite du fractionnement par partage séquentiel de la phase aqueuse récupérée se réalise en ajoutant le 2<sup>ème</sup> solvant, le 3<sup>ème</sup>, et ainsi de suite à la phase aqueuse résiduelle recueillie après chaque séquence de partage.

Avant la deuxième extraction par le DCM, la phase aqueuse est évaporée partiellement pour éliminer l'EtOH.



*Photo 7 : Partage à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de feuilles de Schefflera bojeri*

L'organigramme suivant illustre la succession d'opérations réalisées lors du fractionnement par partage séquentiel de l'extrait brut méthanolique de feuille de *Schefflera bojeri*.



**Figure 19 : Organigramme du procédé de partage liquide-liquide de l'extrait brut**

Les masses et rendements (%) obtenus lors du partage sont récapitulés dans le tableau 8. La masse de l'extrait dechlorophyllé de feuilles EMF<sub>A</sub> de départ est 65,200g.

**Tableau 8 : Les rendements des partages aux différents solvants**

Solvants utilisés	Notation des extraits	Masses (g)	Rendements (%)
Hexane	EMFH	0,454	0,696
DCM	EMFD	4,228	6,484
Acétate d'éthyle	EMFA	4,300	6,595
BuOH	EMFB	31,367	48,109
H <sub>2</sub> O	EMFQ	24,818	38,064
Total		65,167	99,948

#### IV-2) Activités biologiques des extraits de partage

Les différents extraits obtenus sont ensuite testés sur des différentes souches pour voir leurs activités biologiques. Les résultats sont groupés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 9 : Antibiogramme des extraits de partage liquide-liquide de l'extrait brut de feuille**

	Noms des souches	EMFH	EMFD	EMFA	EMFB	EMFQ
Bactéries à gram +	<i>Bacillus cereus</i>	9	10	9,5	6	6
	<i>Staphylococcus aureus</i>	8	8	8	6	6
Bactéries à gram -	<i>Escherichia coli</i>	6	6,5	6	6	6
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	7	6,5	6	6
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,5	6,5	6	6	6
	<i>Salmonella typhimurium</i>	7,5	6	6	6	6
	<i>Vibrio cholerae</i>	6	6	6,5	6	6
Souche fongique	<i>Candida albicans</i>	6	13	9	6	6

On peut constater que le fait d'avoir partagé l'extrait l'a rendu plus actives sur certaines souches en éliminant les substances inactives. [11]

Ces résultats montrent que toutes les souches bactériennes et fongiques testées sont insensibles aux extraits butanoliques et aqueux. Cependant, nous observons que les extraits EMFH, EMFD et EMFA respectivement à l'hexane, au DCM et à l'acétate d'éthyle détiennent des activités biologiques. En effet, le germe bactérien *Bacillus cereus* est très sensible à ces 3 extraits aux diamètres d'inhibition respectifs de 9 mm, 10 mm et 9,5 mm.

La souche bactérienne *Staphylococcus aureus* semble disposer d'une sensibilité moyenne vis-à-vis de ces 3 extraits.

Enfin, les extraits de feuilles partitionnés au DCM et à l'acétate d'éthyle montrent une forte activité contre la souche fongique *Candida albicans* avec des diamètres d'inhibition respectifs de 13 mm et 9 mm.

En résumé, l'extrait au DCM présente particulièrement des activités sur le *Bacillus cereus* et le *Candida albicans* avec un diamètre d'inhibition maximal de 13 mm contre le *Candida albicans*.

Le fait d'avoir réalisé un partage liquide-liquide a alors permis de récupérer majoritairement les substances actives des feuilles par le solvant DCM.

Donc, dans la suite de notre travail, l'extrait des feuilles partitionné au DCM nommé EMFD est sélectionné pour être fractionné et soumis aux tests biologiques de la méthode de fractionnement bioguidé sur la souche fongique *Candida albicans* qui nous a montré la plus forte sensibilité biologique parmi toutes les souches testées.

## V) FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT AU DCM

La méthode fractionnement bioguidé nous a permis de choisir l'extrait au DCM indiqué biologiquement actif précédemment pour être traité par un fractionnement de plus en plus approfondi.

La méthode utilisée pour le fractionnement de cet extrait est la chromatographie liquide sur colonne alors que les migrations des substances ont été suivies par la chromatographie sur couche mince.

### V-1) Détermination du système d'éluant

En chromatographie sur colonne, la séparation dépend de l'éluant utilisé qui peut être soit un solvant pur soit un mélange de plusieurs solvants de façon à « ajuster » son pouvoir éluant.

Une étude préalable sur CCM a été faite sur l'extrait DCM pour déterminer le système de solvant adéquat pour la séparation sur colonne. Les solvants testés sont DCM pur, DCM/MeOH-80/20 et Hexane/AcOEt-80/20.

Avec le DCM pur, une bonne migration avec des tâches séparées a été observée mais avec une faible élution. Puis, la polarité de l'éluant a été augmentée en utilisant le mélange DCM/MeOH-80/20. Ce dernier a donné une bonne migration avec une forte élution. Nous avons essayé aussi le mélange Hexane/AcOEt-80/20 qui a donné une bonne séparation mais une migration lente.

D'après ces résultats, l'utilisation du système éluant en gradient de solvant par mélange DCM/MeOH a été choisie. Le gradient d'élution est une technique analytique qui consiste à modifier la force éluante de la phase mobile en cours de la séparation afin de raccourcir le temps de rétention des solutés les plus fortement retenus, tout en conservant la séparation des solutés les moins retenus. Cette méthode permet de séparer complètement et rapidement un mélange complexe composé de nombreux solutés de rétentions très différentes. [37]

Le système d'élution utilisé lors de notre chromatographie liquide sur colonne de l'extrait EMFD est résumé dans le tableau suivant :

**Tableau 10 : Système d'élution pour la séparation en chromatographie sur colonne**

Ordre	Système de solvant	Proportions (v/v)	Volume (en ml)
1	DCM/Hexane	90/10	250
2	DCM pur	100/0	250
3	DCM/MeOH	98/2	250
4	DCM/MeOH	95/5	250
5	DCM/MeOH	92/8	250
6	DCM/MeOH	90/10	250
7	DCM/MeOH	80/20	250
8	DCM/MeOH	50/50	250
9	DCM/MeOH	0/100	500

**V-2) Fractionnement par chromatographie sur colonne**

La phase stationnaire utilisée est le gel de silice 60 F<sub>254</sub> à granulométrie entre 0,040 à 0,063 mm.

**V-2-1) Préparation de la colonne :**

Nous avons adopté le remplissage par voie humide. En premier lieu un morceau de coton imbibé de solvant d'élution est placé au fond de la colonne. Ensuite, le gel de silice de masse 80 g dilué dans le premier système de solvant d'élution avec un erlen-Meyer est introduite dans la colonne grâce à un entonnoir que l'on laisse alors s'écouler à robinet ouvert. Le tassement de l'adsorbant de la colonne doit être réalisé par ajout systématique de solvant d'élution pendant 1 h 30 mn en prenant soin de frapper de temps en temps la paroi de la colonne pour le favoriser.

Après tassement de la colonne, l'extrait EMFD de masse 1,269 g est dissous dans un mélange DCM/MeOH en solution très concentrée, et est installé lentement et soigneusement à robinet fermé au-dessus de l'adsorbant à l'aide d'une pipette. Puis, un demi-centimètre de sable est rajouté au-dessus. Cette couche permet de réaliser l'ajout d'éluant sans perturbation de la surface du gel de silice.

### **V-2-2) Recueil des fractions**

Le robinet est ensuite ouvert de manière à laisser s'écouler l'éluant et faire pénétrer l'extrait dans l'adsorbant de silice. Puis, l'éluant est alors versé progressivement par écoulement continu en dessus de la colonne en mode gradient de solvant. Les fractions éluées sont recueillies par des tubes à essais numérotés disposés dans des portoirs puis sont analysés par CCM pour connaître leur profil et pour pouvoir regrouper les fractions à profils semblables.



*Photo 8 : Cliché de la séparation sur colonne chromatographique*

### **V-3) Analyse par CCM des fractions obtenues**

Vu que le nombre de 288 tubes ayant permis à la collecte des fractions est important, la CCM a été réalisée sur 4 plaques à gel de silice sur feuille d'aluminium de dimension 20 cm × 10 cm.

- Plaque n°1 : tubes n° 44 à 116
- Plaque n°2 : tubes n° 118 à 190
- Plaque n°3 : tubes n° 192 à 264

Les tubes n°1 à 43 sont les premières fractions qui sont presque de l'éluant pur, ils n'ont pas été analysés mais rassemblés dans le premier groupement des fractions. De même pour les tubes n°265 à 288, ils contiennent les solvants de lavage de la colonne et ont été rassemblés dans le dernier groupement des fractions.

Suivant le gradient d'éluant utilisé, les substances dans ces fractions ont des polarités croissantes. Les substances les moins polaires sont sorties en premier lieu et à la fin les plus

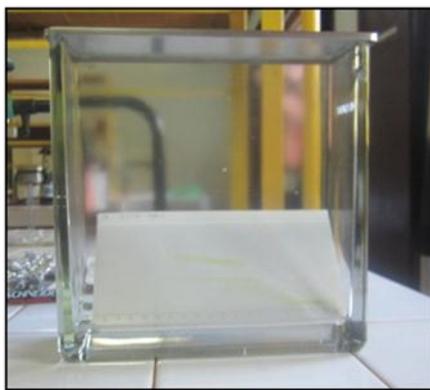
polaires. Le système éluant utilisé pour la CCM a été choisi de manière à bien mettre en évidence les taches de migration des substances éluées selon leur polarité.

Des études préliminaires ont été faites pour chaque plaque pour choisir le bon système éluant. Pour cela, des essais sont effectués sur 3 des dépôts, à savoir les deux extrêmes et le milieu, en essayant des mélanges de solvant. Ces manipulations sont résumées dans le tableau suivant :

**Tableau 11 : Systèmes de solvant testés avant le choix de l'éluant pour le CCM**

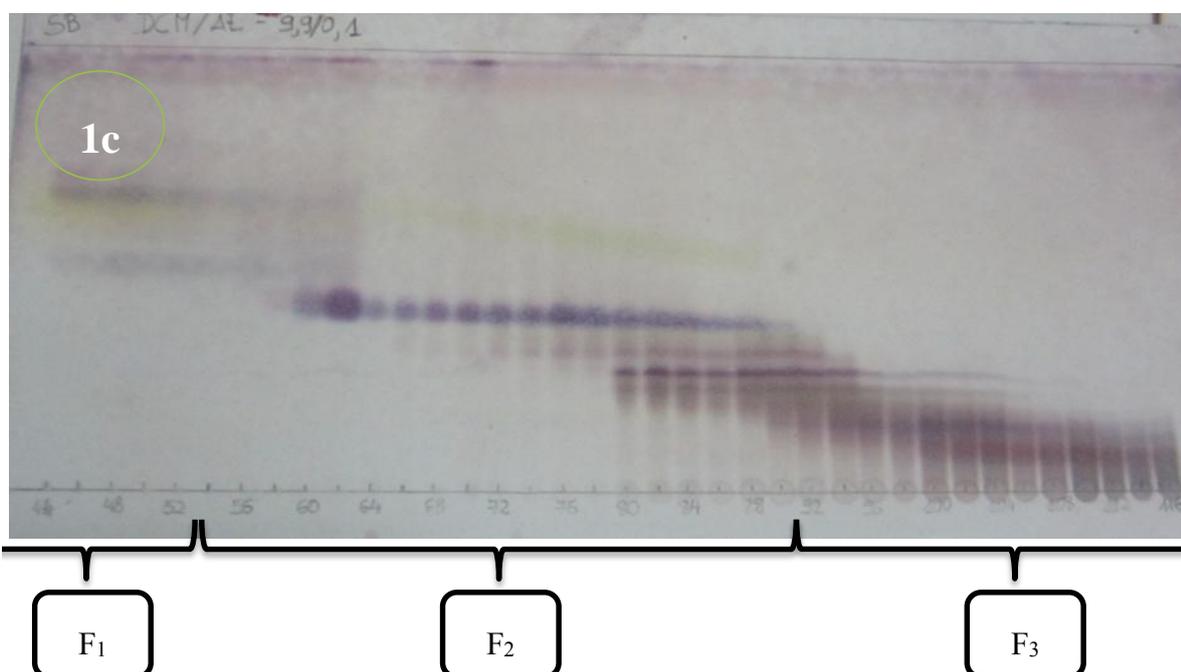
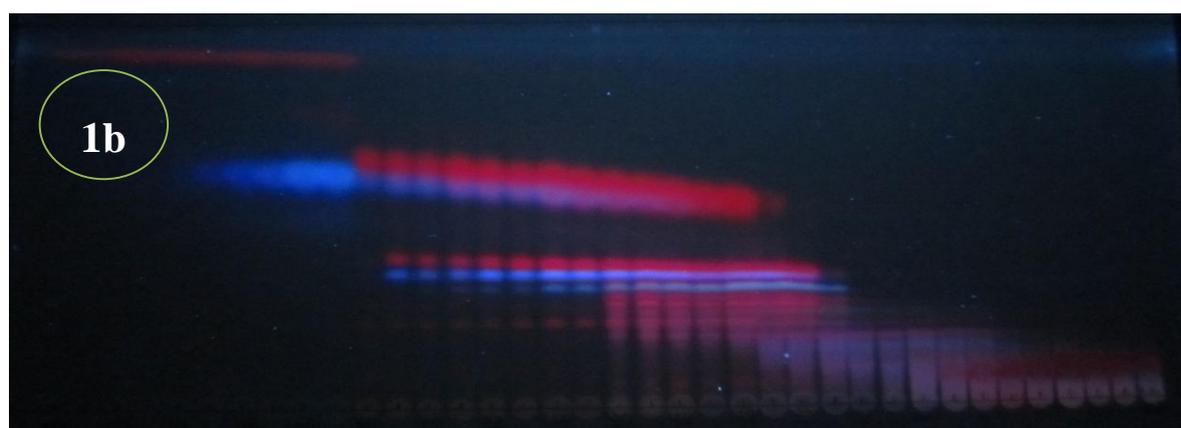
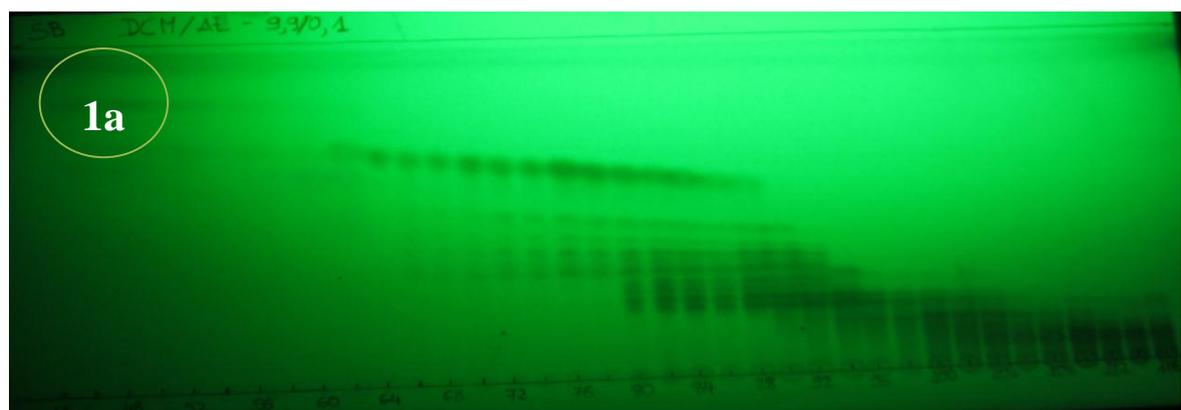
Plaques	Systèmes éluant essayés (v/v)	Système éluant choisi
Plaque n°1	DCM/Hex - 80/20	DCM/AE - 99/01
	DCM pur	
	DCM/AE - 90/10	
	DCM/AE - 98/02	
	DCM/AE - 99/01	
	DCM/MeOH - 90/10	
Plaque n°2	DCM/MeOH - 90/10	DCM/MeOH/acide acétique - 95/05/3 gouttes à la pipette pasteur
	DCM/AE/acide acétique - 90/10/3 gouttes à la pipette pasteur	
	DCM/AE/acide acétique - 80/20/3 gouttes à la pipette pasteur	
	DCM/MeOH/acide acétique - 95/05/3 gouttes à la pipette pasteur	
Plaque n°3	DCM/MeOH/acide acétique - 80/20/3 gouttes à la pipette pasteur	DCM/MeOH/acide acétique - 85/15/3 gouttes à la pipette pasteur
	DCM/MeOH/acide acétique - 85/15/3 gouttes à la pipette pasteur	

Le système de solvant ternaire avec l'acide acétique a été adopté. En réalité, l'ajout d'AcOH dans l'éluant minimise la rétention des composés sur la silice et permet ainsi une meilleure résolution des spots.



*Photo 9 : Cliché de la migration dans la cuve chromatographique*

Après migration, les taches de substances sont révélées à l'UV 254 nm puis à 365 nm et par pulvérisation à l'anisaldéhyde. Les profils chromatographiques des résultats sont donnés ci-dessous respectivement suivant cet ordre de révélation avec les regroupements choisis :



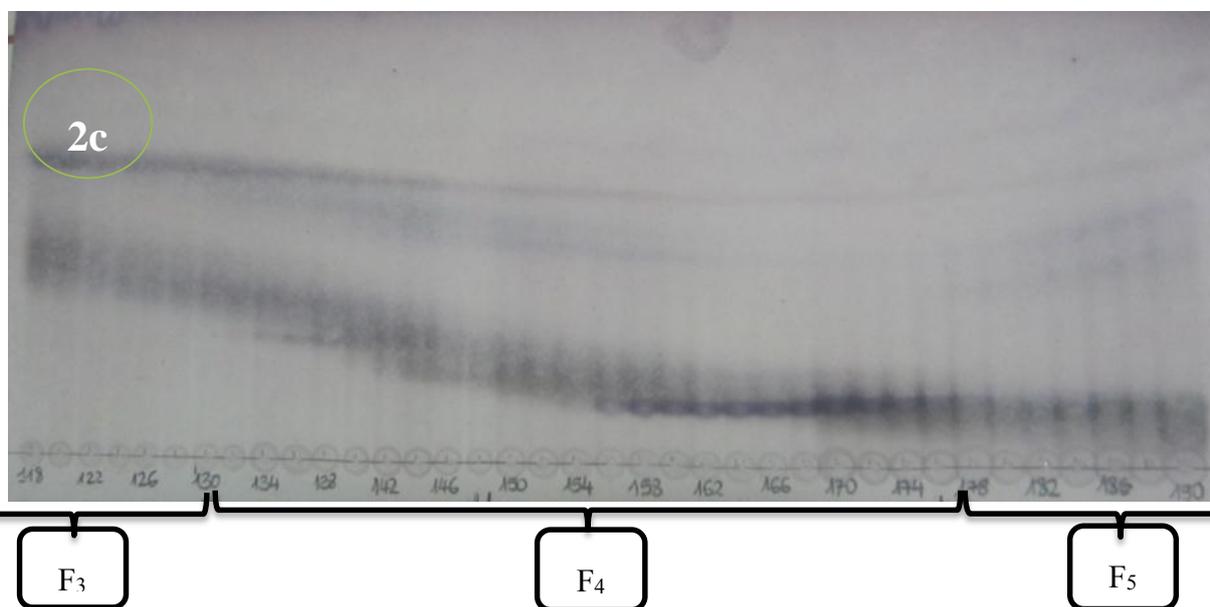
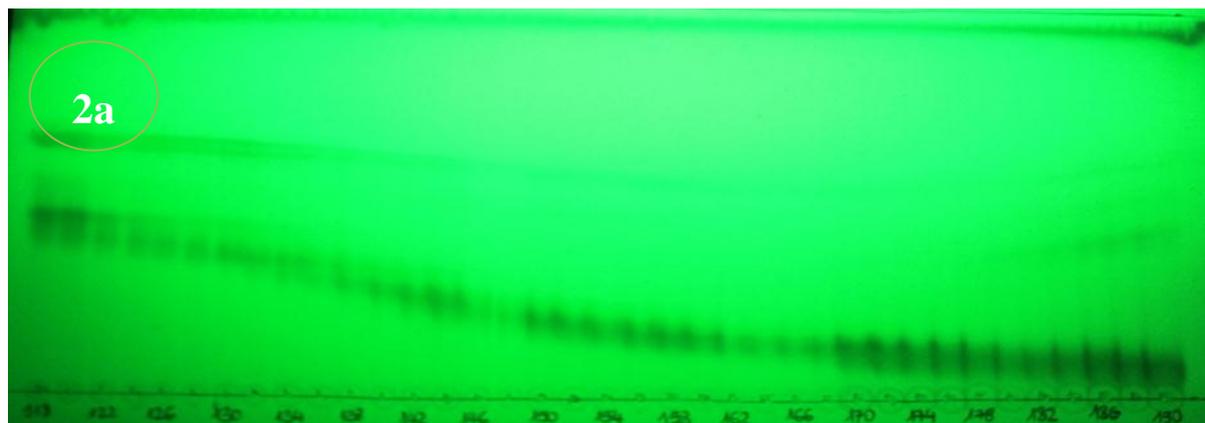
*Photo 10 : Clichés des profils chromatographiques en CCM des fractions 44 à 116*

*Plaque 1a : Visualisation directe sous UV 254nm*

*Plaque 1b : Visualisation directe sous UV 365nm*

*Plaque 1c : Visualisation au visible après révélation à l'anisaldéhyde*

*Eluant : DCM/AE-99/01*



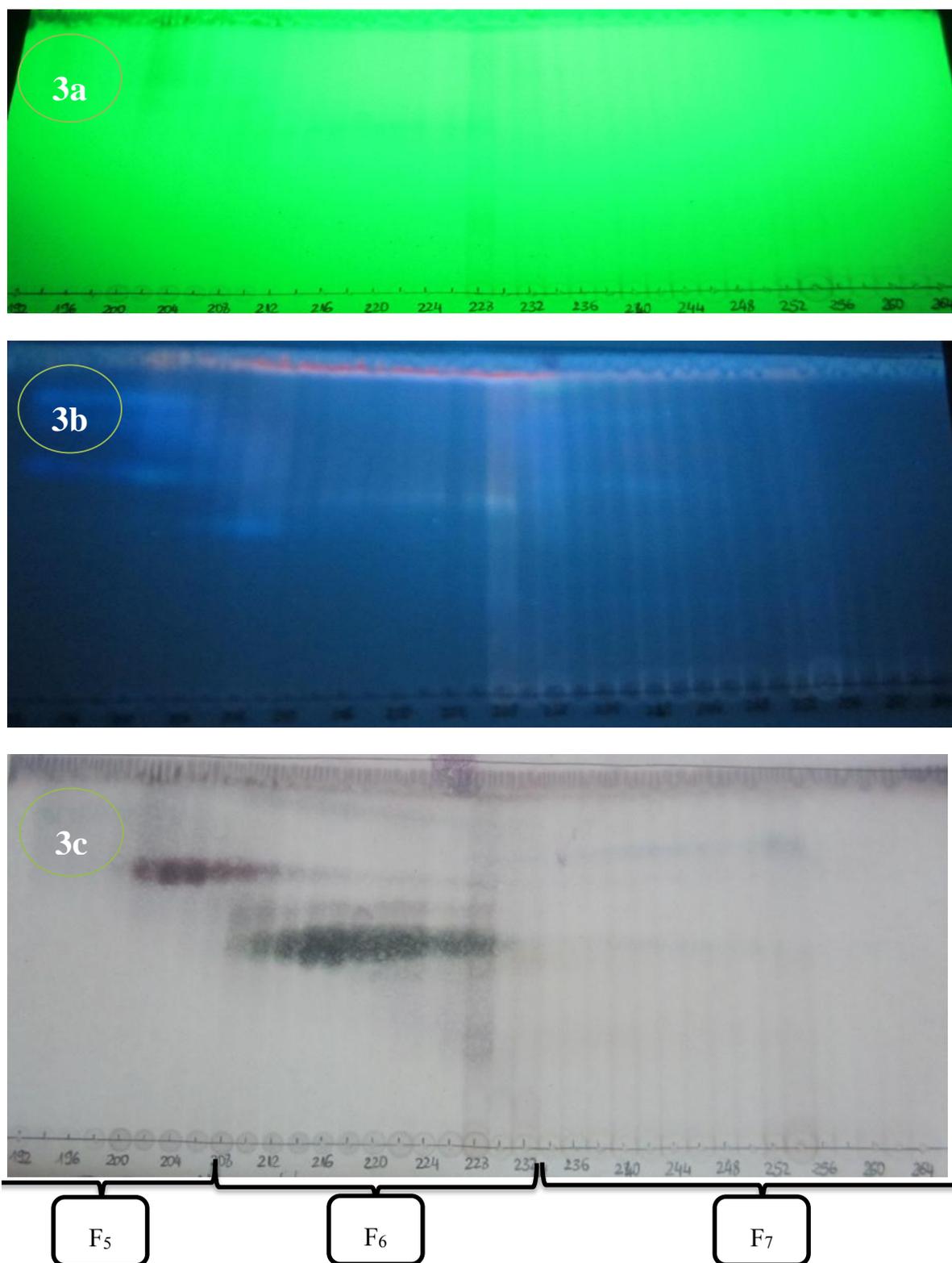
*Photo 11 : Clichés des profils chromatographiques en CCM des fractions 118 à 190*

*Plaque 2a : Visualisation directe sous UV 254nm*

*Plaque 2b : Visualisation directe sous UV 365nm*

*Plaque 2c : Visualisation au visible après révélation à l'anisaldéhyde*

*Eluant : DCM/MeOH/acide acétique-95/05/3 gouttes à la pipette pasteur*



*Photo 12 : Clichés des profils chromatographiques en CCM des fractions 192 à 264*

*Plaque 3a : Visualisation directe sous UV 254nm*

*Plaque 3b : Visualisation directe sous UV 365nm*

*Plaque 3c: Visualisation au visible après révélation à l'anisaldéhyde*

*Eluant : DCM/MeOH/acide acétique-85/15/3 gouttes à la pipette pasteur*

L'observation des profils chromatographiques des fractions visualisés sous UV 254, UV 365 et par révélation à l'anisaldéhyde nous a permis de rassembler les fractions en 7 groupes nommés F<sub>1</sub> à F<sub>7</sub>. En effet, le regroupement a été fait selon l'identité des tâches de migration, et surtout selon les valeurs des R<sub>f</sub>.

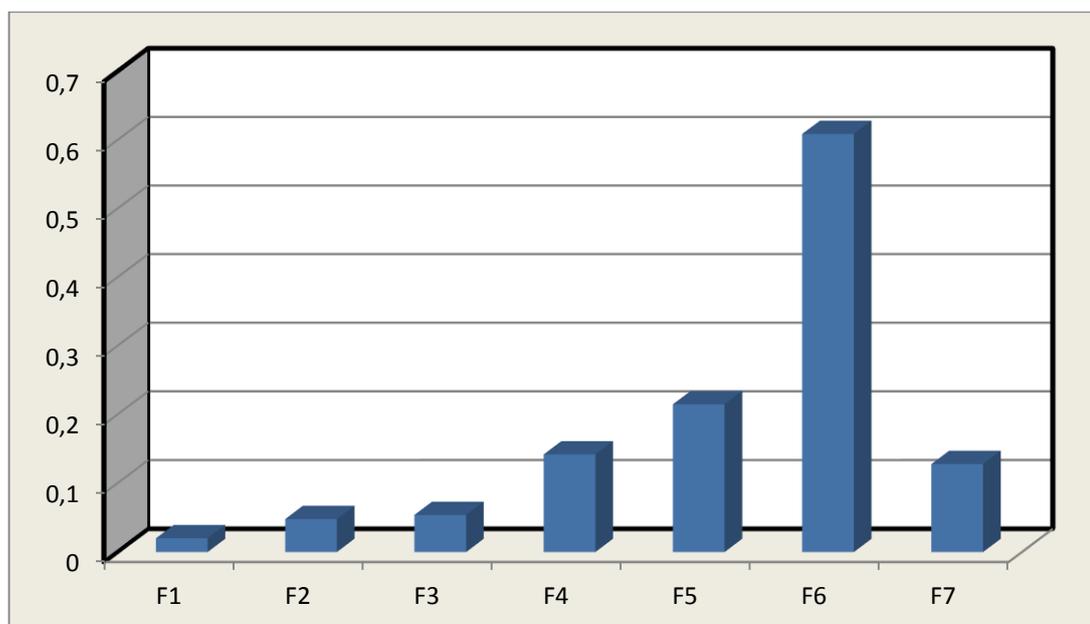
Les fractions regroupées sont disposées dans des ballons à col rodés tarés puis évaporés et pesés. Les masses et rendements obtenus sont résumés dans le tableau 12 :

**Tableau 12 : Masses et rendements des fractions obtenues lors de la chromatographie sur colonne**

Fractions	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub>	F <sub>7</sub>
Numéros des tubes regroupés	1 à 53	54 à 90	91 à 130	131 à 177	178 à 206	207 à 232	233 à 288
Masses (g)	0,020	0,048	0,054	0,142	0,215	0,609	0,128
Rendements (%)	1,576	3,782	4,255	11,189	16,942	47,990	10,086

Avec une masse initiale 1,269 g de l'EMFD, la somme des fractions élués a atteint un rendement de 95,823%. La fraction F<sub>6</sub> possède le rendement le plus élevé, elle représente la moitié en masse des fractions éluées. Elle contient en principe des substances polaires.

Nous résumons dans l'histogramme ci-dessous cette interprétation :



**Figure 20 : Histogramme des masses des fractions éluées obtenues**

#### V-4) Test biologique des fractions obtenues

Le deuxième test biologique a indiqué que c'est l'extrait au DCM qui possède la meilleure activité vis-à-vis des souches testés surtout sur *Candida albicans*.

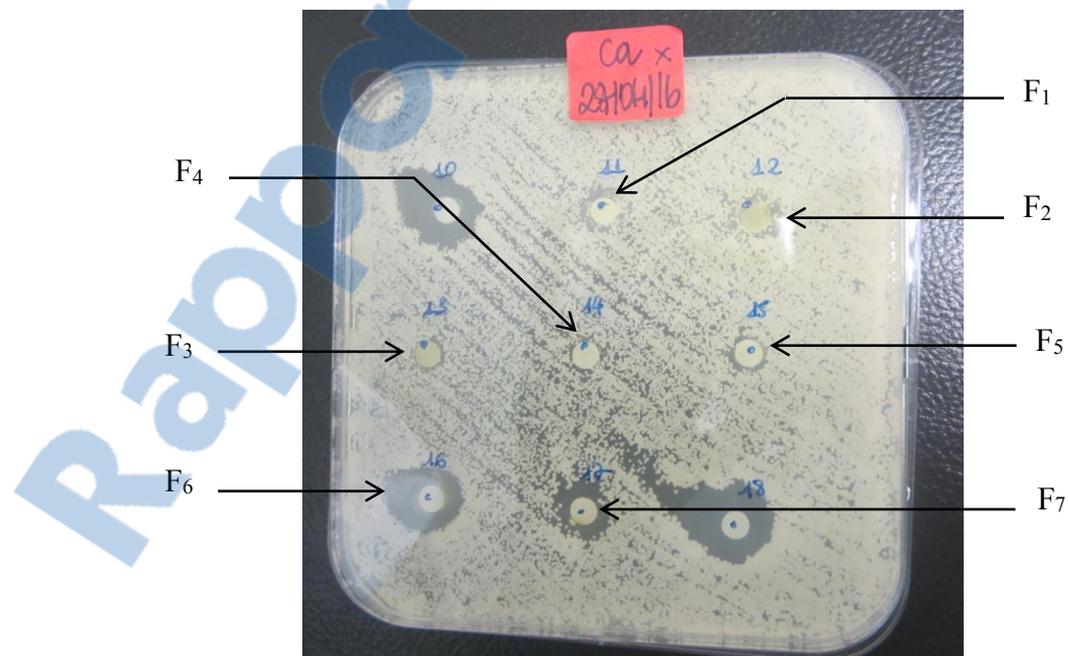
Sur le profil chromatographique, nous voyons suivant le nombre des différentes tâches, que cet extrait est constitué de plusieurs composés dont seulement quelques-uns sont responsables de l'activité thérapeutique. L'étape suivante du fractionnement bioguidé consiste à effectuer le test d'activité biologique sur *C. albicans* afin de savoir précisément laquelle des fractions F<sub>1</sub> à F<sub>7</sub> contiennent la substance active.

Les résultats des tests d'activité antifongique sur *C. albicans* sont récapitulés dans le tableau suivant :

**Tableau 13 : Résultat du test biologique sur *Candida albicans* des fractions rassemblées**

Souche	Diamètres des halos d'inhibition des fractions rassemblées (mm)						
	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub>	F <sub>7</sub>
<i>Candida albicans</i>	6,5	6,5	6,5	6,5	7,5	18	13

L'image correspondant à ces résultats de tests biologiques est donnée ci-dessous :



**Photo 13 : Cliché de l'antibiogramme de la sensibilité du *Candida albicans* aux fractions F<sub>1</sub> à F<sub>7</sub>**

D'après ces résultats, les fractions F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub> et F<sub>5</sub> sont inactives à la souche testée. Le *Candida albicans* est sensible aux deux extraits F<sub>6</sub> et F<sub>7</sub>. La fraction F<sub>6</sub> montre une très forte activité avec 18 mm de diamètre d'inhibition. Cette valeur permet de dire que l'activité de l'EMFD est concentrée dans la fraction F<sub>6</sub>.

De plus, la purification de l'extrait EMFD sur colonne chromatographique a permis de sélectionner les substances actives et d'éliminer les composés inactifs d'où l'observation d'une augmentation de la sensibilité de la souche fongique *C. albicans* avec des diamètres d'inhibition améliorés allant de 13mm à 18mm.

Les substances actives de l'extrait EMFD vis-à-vis de la souche *C.albicans* sont presque majoritairement incluses dans la fraction F6 qui représente environ la moitié de sa masse (au rendement massique remarquable de 47,99%). Il est donc intéressant d'approfondir notre étude sur cet extrait.

Pour cela, une analyse qualitative sur CCM a été faite pour pouvoir dénombrer approximativement ses constituants, et un criblage phytochimique pour en avoir une connaissance des familles chimiques des composés responsables de l'activité de la plante.

Le profil chromatographique sur CCM révélé à l'anisaldéhyde montre l'intérêt de la fraction active F<sub>6</sub>. En effet, elle est pratiquement constituée d'un unique produit majoritaire. La suite de ce travail consistera alors à l'isolement de la molécule active, qui nécessite malgré tout quelques étapes de purification et dont la structure chimique sera déterminée ultérieurement par analyse RMN et par spectrométrie de masse.

## **VI) SCREENING PHYTOCHIMIQUE DE LA FRACTION BIOACTIVE**

Après identification de la fraction active sur *Candida albicans*, notre but est maintenant de déterminer les familles chimiques auxquelles appartiennent les substances responsables de ses activités.

La méthode utilisée est le criblage phytochimique par CCM de la fraction F<sub>6</sub> qui ne nécessite qu'une petite quantité d'extrait et qui est très efficace comme méthode de séparation des substances. Elle nous donne d'une part un aperçu du nombre des constituants mais d'autre part, elle permet par pulvérisation des chromatogrammes avec des réactifs spécifiques de révélation, de connaître la nature des familles chimiques des substances éluées probablement responsables de l'activité de cette fraction.

### **VI-1) Matériels utilisés**

Les différents matériels utilisés dans cette opération sont :

- Plaques CCM dont l'adsorbant est le gel de silice fixé sur une plaque en aluminium
- Système d'éluant : des mélanges de solvants mises au point après différents essais pour la meilleure élution
- Cuve chromatographiques
- Pulvérisateur
- Réactifs révélateurs :
  - Anisaldéhyde 5%
  - Vapeur d'ammoniac (NH<sub>3</sub>) (solution à 25%)
  - Chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) 1% dans l'éthanol
  - Réactif de LIEBERMANN-BURCHARD
  - Chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>) 2% dans le méthanol

### **VI-2) Révélation et caractéristique des taches [25] [50]**

Les indications sur les couleurs des taches des substances éluées et révélées par la pulvérisation des chromatogrammes aux réactifs spécifiques sont regroupées dans les tableaux suivants :

**VI-2-1) Pulvérisation à l'anisaldéhyde**

*Tableau 14 : Couleurs révélées à l'anisaldéhyde*

Composés révélés	Couleurs de taches dans le visible
dérivés phénoliques, terpénoïdes et stéroïdes, sucres	Violet, Bleu, Rouge, Gris ou vert

**VI-2-2) Traitement de la plaque à la vapeur d'ammoniac :**

*Tableau 15 : Couleur révélées à la vapeur de NH<sub>3</sub>*

Composés révélés	Visualisation dans le visible	Visualisation sous UV 365nm
Coumarine	Vert	Vert
	jaune	bleu
	jaune	Orange
	Jaune vert	Orange
	Vert	Marron
	Jaune	Marron
anthocyane	Jaune	bleu

**VI-2-3) Pulvérisation par l'AlCl<sub>3</sub>**

*Tableau 16 : Couleurs révélées par l'AlCl<sub>3</sub>*

Composés révélés	Visualisation dans le visible	Visualisation sous UV 365 nm
Flavonoïdes	Jaune	jaune
	Jaune	vert
	Jaune pâle	Bleu (puis vire au brun)
	Jaune pâle	vert
flavonol	Jaune pâle	Jaune pâle

**VI-2-4) Pulvérisation par le réactif de LIEBERMANN-BURCHARD**

*Tableau 17 : Couleurs révélées par le réactif de Liebermann-Burchard*

Composés révélés	Visualisation sous UV 254 nm	Visualisation sous UV 365 nm
Stéroïde	bleu	Jaune vert
Triterpènes de type oléanane, ursanne	bleu	rouge
Stéroïde	Bleu foncé	jaune

	(non révélé)	jaune
Triterpènes de type lupane	orange	orange

**VI-2-5) Pulvérisation par FeCl<sub>3</sub> :**

*Tableau 18 : Couleur révélée par FeCl<sub>3</sub>*

Composés révélés	visualisation dans le visible
Polyphénols	Bleu

**VI-3) Résultats du criblage phytochimique sur CCM**

Le système éluant choisi pour réaliser la CCM de F<sub>6</sub> est le mélange DCM/MeOH/AcOH-90/10/4 gouttes.

Après migration, nous observons dans le visible une tache de couleur verte à R<sub>f</sub>=0,639 que l'on peut attribuer à la chlorophylle.

**VI-3-1) Visualisation sous UV 254 nm et 365 nm**

Avant de pulvériser par les réactifs spécifiques, les composés élués sont d'abord visualisés sous UV 254 nm et 365 nm, pour avoir un aperçu global de la composition qualitative de la fraction active F<sub>6</sub>. Les images correspondantes sont données ci-dessous :



254 nm 365 nm

*Photo 14 : Clichés de la plaque CCM de F<sub>6</sub>, visualisée sous UV 254 nm et 365 nm*

L'observation directe sous UV 254 indique la substance majeure, comme superposition de 2 taches très voisines, en  $R_f=0,182$  et  $R_f=0,197$ . Elles sont aussi observées sous UV 365 comme une seule tache fluorescente.

De plus, la visualisation du chromatogramme de  $F_6$  sous UV 254 permet d'observer une tache grise à  $R_f=0,639$  qui est colorée en rouge sous UV 365. Ces résultats confirment que c'est de la chlorophylle.

D'autres tâches sont aussi présentes mais très floues, ils correspondent donc à des substances à l'état de trace que l'on peut attribuer à des impuretés.

### **VI-3-2) Révélation à l'anisaldéhyde :**

Après migration et pulvérisation à l'anisaldéhyde, nous avons la plaque correspondant ci- dessous visualisé dans le visible :



*Photo 15 : Cliché de la plaque CCM de  $F_6$  révélée à l'anisaldéhyde, visualisée dans le visible*

Nous observons trois taches très marquées de substances majeures de couleur vert noir de  $R_f$  respectives  $R_f=0,182$  ;  $R_f=0,197$  et  $R_f=0,229$ .

Ces substances pourront alors être soit des dérivés phénoliques, soit des terpénoïdes ou stéroïdes.

### **VI-3-3) Révélation après traitement à la vapeur de l'ammoniac :**

Le but est d'identifier la présence ou non des coumarines dans la fraction  $F_6$ . Après traitement à la vapeur de  $NH_3$ , la plaque est visualisée dans le visible puis sous UV 365 nm.



*Photo 16 : Cliché de la plaque CCM de F<sub>6</sub> révélée par NH<sub>3</sub>, visualisée dans le visible*

Les résultats du traitement à la vapeur d'ammoniac ne montrent aucune tache jaune ou jaune verte dans le visible. Donc, la fraction F<sub>6</sub> ne contient pas de coumarine.

**VI-3-4) Révélation par l'AlCl<sub>3</sub> :**

Dans le but de révéler si des flavonoïdes sont présentes ou non dans la fraction F<sub>6</sub>, nous avons pulvérisé la plaque avec le chlorure d'aluminium AlCl<sub>3</sub>. Après pulvérisation, la plaque est visualisée dans le visible et puis sous UV 365.

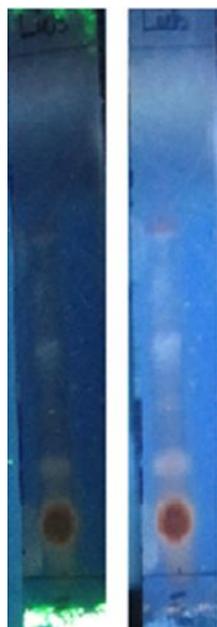


*Photo 17 : Cliché de la plaque CCM de F<sub>6</sub> révélée à l'AlCl<sub>3</sub>, visualisée sous UV 365 nm*

Aucune tache fluorescente caractéristique de flavonoïde n'a été observée. La fraction F<sub>6</sub> ne contient pas de flavonoïdes.

**VI-3-5) Révélation par le réactif de LIEBERMANN-BURCHARD :**

Cette pulvérisation au réactif de LIEBERMANN-BURCHARD a pour but de mettre en évidence la présence ou non des triterpènes et stéroïdes dans la fraction F<sub>6</sub>. Les clichés pris lors de la visualisation sous UV 254 et sous UV 365 sont donnés ci-dessous :



254 nm 365 nm

*Photo 18 : Clichés des plaques CCM de F<sub>6</sub> révélées par le réactif de Liebermann-Burchard et visualisées sous UV 254nm et 365 nm*

Deux substances majeures possédant la référence frontale  $R_f=0,182$  et  $R_f=0,197$  sont colorées en orange à UV 254 nm et à UV 365 nm. Ils sont donc des triterpènes de type lupane.

Une troisième substance majeure à la référence frontale  $R_f=0,229$  est colorée en orange clair sous UV254 et UV 365, elle est aussi un triterpène de type lupane.

**VI-3-6) Révélation par FeCl<sub>3</sub>:**

La pulvérisation par ce réactif permet d'affirmer la présence ou non des polyphénols dans la fraction F<sub>6</sub>.

Le cliché de la plaque visualisée dans le visible est montré ci-dessous :



*Photo 19 : Cliché de la plaque CCM de F<sub>6</sub> révélée par FeCl<sub>3</sub>, visualisée dans le visible*

L'observation de ce cliché montre l'absence de tache de coloration bleue, donc les polyphénols sont absents dans la fraction F<sub>6</sub>.

#### **VI-4) Récapitulation des résultats du screening phytochimique de F<sub>6</sub> et interprétation :**

*Tableau 19 : Résultats du criblage phytochimique sur CCM de F<sub>6</sub>*

Réactifs	Visualisation dans le visible		Visualisation sous UV		Types de composés
			254 nm	365 nm	
	R <sub>f</sub>	Couleurs	Couleurs	Couleurs	
Anisaldéhyde	0,182	Noir verdâtre	-	-	dérivés phénoliques, terpénoïdes et stéroïdes
	0,197	Noir verdâtre	-	-	
	0,229	Noir verdâtre	-	-	
NH <sub>3</sub>	-	Rien	-	Rien	-
AlCl <sub>3</sub>	-	Rien	-	Rien	-
Liebermann-Burchard	0,182	-	Orange	Orange	<b>Triterpènes de type lupane,</b>
	0,197	-	Orange	Orange	
	0,229	-	Orange clair	Orange clair	
FeCl <sub>3</sub>	-	Rien	-	-	-

Avant l'utilisation des révélateurs, les visualisations sous UV ont montré apparemment trois taches prédominantes par rapport aux restes dont deux d'entre elles se superposent aux  $R_f=0,182$  et  $R_f=0,197$  très voisines et la troisième se trouve à  $R_f=0,229$ .

La révélation à l'anisaldéhyde confirme plus fortement l'observation de ces deux taches de composés majoritaires, alors que les autres sont des taches de faible intensité. L'anisaldéhyde est un réactif non spécifique classé universel. Il permet en particulier de révéler la présence des substances comme les dérivés phénoliques, terpénoïdes et stéroïdes ou des sucres.

Les résultats de la révélation à l' $\text{NH}_3$ ,  $\text{AlCl}_3$  et  $\text{FeCl}_3$  sont tous négatifs nous indiquant alors que la fraction  $F_6$  ne contient donc ni de coumarines ni de flavonoïdes et polyphénols. En effet, l'absence de coumarines et de polyphénols est déjà montrée précédemment dans l'extrait brut de feuille (voir paragraphe III-3).

L'utilisation du réactif de Liebermann-Burchard a révélé fortement la présence de ces substances majeures aux  $R_f=0,182$  ;  $R_f=0,197$  et  $R_f=0,229$  et a permis de mettre en évidence que ce sont des triterpènes de type lupane.

On peut conclure donc que, la fraction  $F_6$  est composée principalement de trois substances majoritaires. On peut prédire que les substances responsables de son activité antifongique sont des triterpènes de type lupane.

Après essais d'élution avec différents systèmes de solvants, nous avons pu observer que pratiquement les taches de migration de deux substances se sont toujours superposées. En d'autre terme, leurs vitesses de déplacement sont très proches. Donc, leur polarité et structure sont presque identiques. Nous pouvons alors penser que les deux substances aux  $R_f$  respectives de 0,182 et 0,197 sont isomères.

## VII) HYDROLYSE ACIDE DES HÉTÉROSIDES (SAPONOSIDES)

Les résultats du criblage phytochimique de l'extrait brut de feuilles de *S. bojeri* ont montré qu'elles sont très riches en saponosides. De plus, les fractionnements par partage liquide/liquide ont montré la prépondérance des fractions polaires extraites à l'acétate d'éthyle et au butanol incluant principalement les substances polaires comme les hétérosides.

Les saponosides sont des hétérosides formés biologiquement par condensation d'un ose (sucre) avec un composé non-glucidique appelé la génine ou encore la fraction aglycone. Les sucres rencontrés au niveau des saponosides sont des hexoses, des pentoses, des méthyl pentoses, des acides uroniques. Les génines sont triterpéniques et stéroïdiques.

Cependant, d'après nos études bibliographiques, les saponosides existant dans la plante, sous forme condensées à des nombreux sucres, sont inactives. Elles sont hydrolysées pour avoir leurs formes actives qui en font tout l'intérêt : antimicrobiens, antifongiques, parasitocides, irritants cellulaires, ... [51]

Tous les hétérosides peuvent être hydrolysés. En particulier, l'hydrolyse acide est totale et sépare complètement la génine du sucre. [20] [52]

La prépondérance des substances polaires (la somme des rendements d'extraction AcOEt et n-BuOH= 54,704%) nous laisse prévoir une activité biologique partielle de la plante *S.bojeri* par la forte présence de saponosides. C'est pourquoi, nous avons effectué l'hydrolyse des feuilles suivie d'extractions par solvant (DCM et n-BuOH).

Les extraits d'hydrolyse sont enfin analysés pour connaître leurs activités antibactériennes et antifongiques.

### VII-1) Mode opératoire

A 3g de feuilles de plante sèches et broyées ont été ajoutée à froid 250 ml de HCl 2N. Le tout est alors chauffé à reflux au bain marie bouillant pendant 40 mn avec agitation régulière toutes les 10 minutes. Après refroidissement et filtration sur papier Whatman, la solution acide recueillie est transvasée dans une ampoule à décanter. Ensuite, nous procédons à l'extraction des génines successivement par le DCM et le butanol. Les extractions à chaque solvant sont effectuées 2 fois chacune.

## Études expérimentales

Les extraits secs obtenus après évaporation des solvants sont analysés par CCM. Quelques milligrammes de ces extraits sont dissous dans un mélange de DCM/MeOH. Le système éluant utilisé est le mélange DCM/ MeOH (9/1-v/v).

Les quatre extraits dont les 2 fractions de génines obtenues après hydrolyses désignées respectivement H<sub>D</sub> celle du DCM et H<sub>B</sub> celle du butanol, et les extraits au DCM et à AcOEt (EMFD et EMFA) du partage sans hydrolyse. Le but est de comparer le profil chromatographique des extraits sans hydrolyse et après hydrolyse.



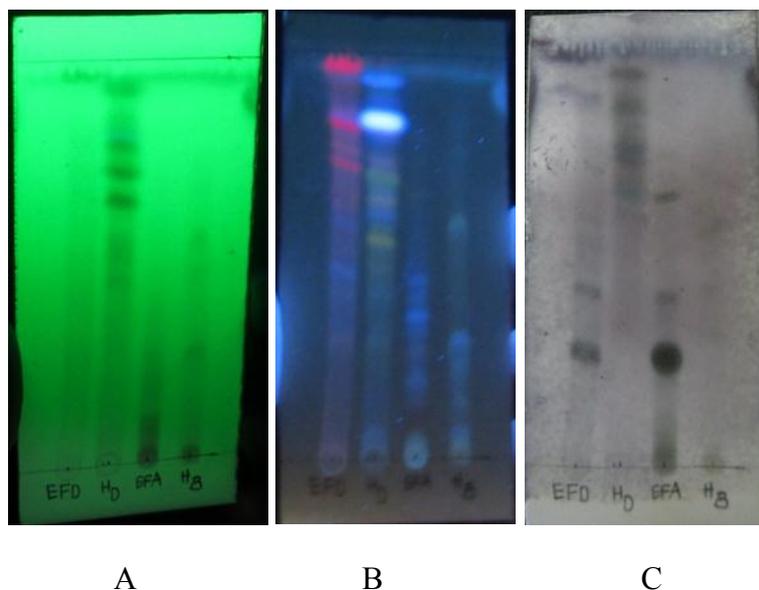
*Photo 20 : Cliché du chauffage à reflux de feuilles de S. bojeri*



*Photo 21 : Cliché de la cuve de migration par CCM des extraits partitionnés aux solvants*

### VII-2) Résultats

Après migration, la plaque est observée sous UV 254 et UV 365 et puis pulvérisée à l'anisaldéhyde.



*Photo 22 : Clichés des plaques CCM des extraits hydrolysés : A : visualisation sous UV 254nm, B : visualisation sous 365nm et C: après pulvérisation à l'anisaldéhyde*

### VII-3) Interprétations :

D'après ces profils, nous constatons la différence flagrante des profils chromatographiques entre les extraits non hydrolysés et les extraits provenant de l'hydrolyse acide. Nous observons surtout beaucoup de taches de migration et ainsi beaucoup de substances obtenues de l'hydrolyse surtout dans l'extrait DCM hydrolysé (H<sub>D</sub>). Plusieurs génines sont donc libérées et sont majoritairement extraites par le DCM.

Nous observons aussi la disparition de certaines tâches. Ces substances peuvent être très sensibles à la température et donc détruites lors de l'opération de l'hydrolyse qui est effectuée à chaud.

### VII-4) Test biologique

Le test biologique des extraits d'hydrolyse a été réalisé afin de pouvoir en comparer les activités antibactériennes avec celles des extraits non hydrolysés. Les résultats d'antibiogramme correspondant sont récapitulés dans le tableau ci-dessous :

*Tableau 20 : Antibiogramme des extraits hydrolysés en comparaison avec ceux non hydrolysés*

	Noms des souches	EMFD	H <sub>D</sub>	EMFA	EMFB	H <sub>B</sub>
Bactéries à gram +	<i>Bacillus cereus</i>	10	NT	9,5	6	NT
	<i>Staphylococcus aureus</i>	8	<b>9,5</b>	8	6	7,5
	<i>Enterococcus faecalis</i>	NT	<b>9</b>	NT	NT	7
	<i>Listeria monocytogènes</i>	NT	<b>12</b>	NT	NT	7
Bactéries à gram -	<i>Escherichia coli</i>	6,5	8	6	6	8
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	<b>10</b>	6,5	6	7
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,5	8	6	6	7
	<i>Salmonella typhimurium</i>	6	<b>10</b>	6	6	8
	<i>Vibrio cholerae</i>	6	7,5	6,5	6	6
Souche fongique	<i>Candida albicans</i>	13	<b>12</b>	9	6	6

Note : NT = non testé

Généralement nous observons des accroissements d'activité biologique des fractions d'hydrolyse extraites au DCM sur les différentes souches essayées excepté la souche fongique

*Candida albicans*. Plusieurs souches insensibles deviennent sensibles. Des augmentations de valeur de diamètre d'inhibition allant de 6mm à 10mm sont constatées.

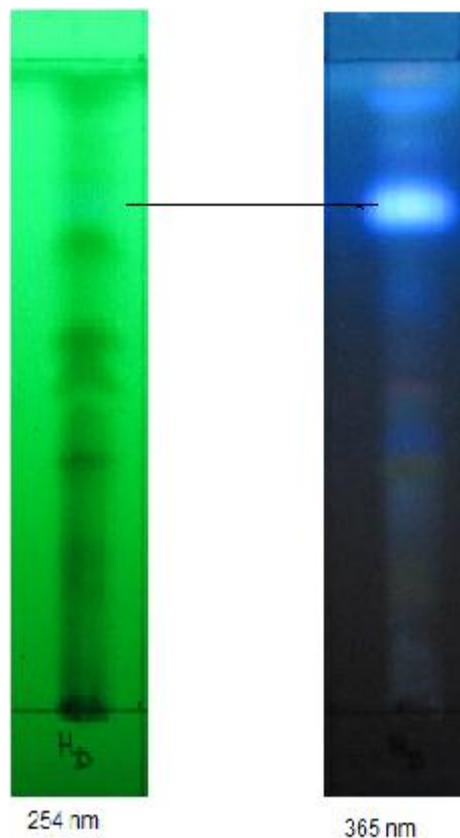
Nous remarquons également que la souche *C.albicans* dispose d'une forte sensibilité à la fraction d'hydrolyse extraite au DCM d=12mm. Ce résultat confirme que les substances actives de la plante sont les extraits au DCM constitués principalement par des substances moyennement polaires.

De plus, cet extrait est actif globalement sur toutes les souches testées.

#### **VII-5) Criblage phytochimique sur CCM de l'extrait au DCM (H<sub>D</sub>)**

Pour la connaissance des familles chimiques présentes dans l'extrait H<sub>D</sub> responsables de ses activités, nous avons procédé à son criblage phytochimique d'identification par révélation en CCM. Les modes opératoires sont identiques à ceux décrits précédemment dans les paragraphes VI-1 et VI-2. Les résultats après visualisation sous UV 254/365 nm puis après pulvérisation par des réactifs spécifiques de révélation sont montrés par les figures suivantes.

##### **VII-5-1) Visualisation sous UV**



*Photo 23 : Clichés de Plaque CCM de H<sub>D</sub>, visualisée sous UV 254nm et 365 nm*

L'aperçu global du profil chromatographique nous indique qu'il est composé de nombreux constituants.

Nous observons une tache de substance majoritaire, fluorescente en bleu à 254 nm et à 365 nm à  $R_f=0,77$ .

A première vue, ce composé est probablement une substance flavonoïdique dont nous confirmons dans la suite de nos analyses.

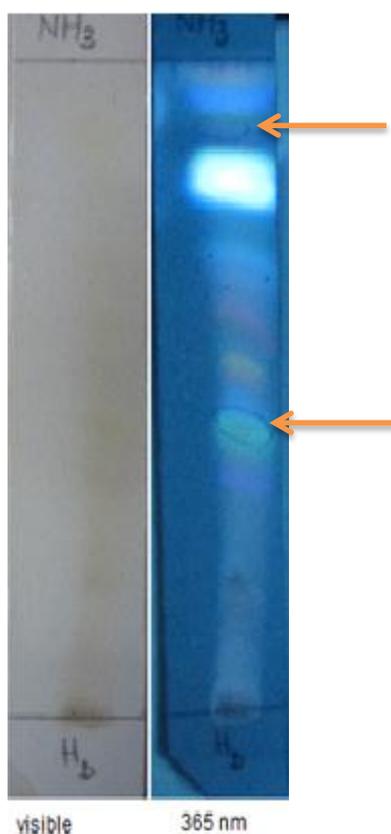
### **VII-5-2) Révélation à l'anisaldéhyde :**



*Photo 24 : Cliché de la plaque CCM de  $H_D$  révélée à l'anisaldéhyde, visualisée dans le visible*

Différentes taches faibles de couleurs bleue, jaune et violet sont observées. Des substances telles des dérivés phénoliques, des terpénoïdes et stéroïdes ainsi que des sucres sont alors présentes dans  $H_D$ .

### **VII-5-3) Révélation après traitement à la vapeur de l'ammoniac :**



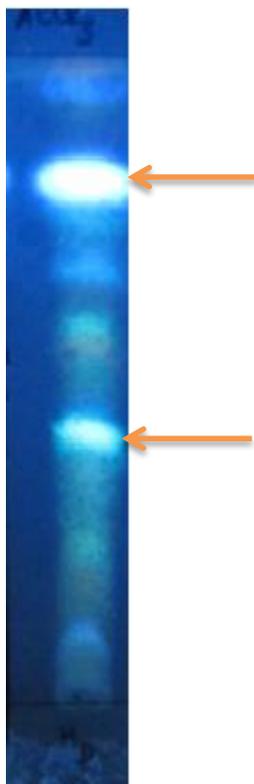
**Photo 25 : Cliché de la plaque CCM de  $H_D$  révélée par  $NH_3$ , visualisée dans le visible et sous UV 365 nm**

Après révélation par l'ammoniac, nous observons dans le visible des taches très faibles de couleur jaune. Deux parmi eux sont les plus observés aux  $R_f=0,90$  et  $R_f=0,43$  (ils sont indiqués par les flèches sur les figures ci-dessus). Ils sont orange et marrons sous UV 365nm.

Des coumarines sont donc présentes dans  $H_D$ .

Cependant, nous ne pouvons affirmer que ce sont des coumarines sauf après révélation des flavonoïdes.

#### **VII-5-4) Révélation par l' $AlCl_3$**

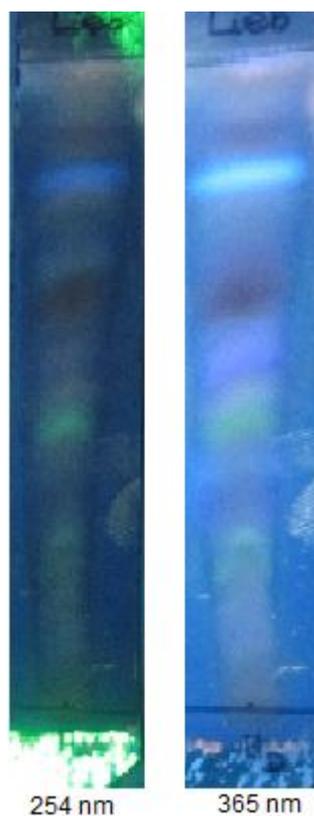


*Photo 26 : Cliché de la plaque CCM de H<sub>D</sub> révélée à l'AlCl<sub>3</sub>, visualisée sous UV 365 nm*

Après utilisation d'AlCl<sub>3</sub>, deux taches sont prédominantes (indiquées par les flèches sur la photo ci-dessus). Une tache fluorescente en bleue à R<sub>f</sub>=0,77 ; et une tache verte au R<sub>f</sub>=0,40. Il y a aussi d'autres taches fluorescentes mais faibles.

Ces substances au R<sub>f</sub>=0,77, probablement les substances majeures de H<sub>D</sub> sont donc des flavonoïdes.

#### **VII-5-5) Révélation par le réactif de LIEBERMANN-BURCHARD**



*Photo 27 : Clichés de la plaque CCM de  $H_D$  révélée par le réactif de Liebermann-Burchard visualisée sous UV 254nm et 365nm*

Une tache remarquable dans l'utilisation de ce réactif est observée au  $R_f=0,82$  ; elle est colorée en fluorescence bleue à 254 nm et en jaune vert à 365nm. La substance correspondante est donc un stéroïde.

Une deuxième tache à  $R_f=0,45$  fluorescente en vert sous UV 254 et UV 365 est probablement un stéroïde.

Une troisième tache prépondérante située à la  $R_f=0,63$ , de couleur orange à UV 254 et 365 est attribuée à un triterpène de type lupane.

#### **VII-5-6) Révélation par $FeCl_3$**



*Photo 28 : Cliché de la plaque CCM de H<sub>D</sub> révélée par FeCl<sub>3</sub>, visualisée dans le visible*

L'observation d'une tache bleu violet foncé prépondérante à R<sub>f</sub>= 0,80 permet d'émettre que l'extrait H<sub>D</sub> contient de polyphénols.

**VII-5-7) Récapitulation des résultats du criblage phytochimique de H<sub>D</sub> :**

*Tableau 21 : Résultats du screening phytochimique sur CCM de l'extrait H<sub>D</sub>*

Réactifs	Visualisation dans le visible		Visualisation sous UV		Types de composés possibles
			254 nm	365 nm	
	R <sub>f</sub>	Couleur	Couleur	Couleur	
NH <sub>3</sub>	0,43	Jaune	-	Marron	coumarines
	0,90	jaune		orange	
AlCl <sub>3</sub>	0,40	Jaune	-	Verte	flavonoïdes
	0,77	jaune		bleue	
Liebermann-Burchard	0,45	-	Vert	Vert	Stéroïde Triterpènes de type lupane, stéroïdes
	0,63		Orange	Orange	
	0,82		bleue	Jaune vert	
FeCl <sub>3</sub>	0,80	Bleu violet	-	-	polyphénols

Ces résultats nous montrent les différentes familles chimiques présentes dans l'extrait au DCM après hydrolyse. La révélation à l'anisaldéhyde a indiqué que cet extrait contient des dérivés phénoliques, des terpénoïdes et stéroïdes, ou des sucres. L'utilisation de l'ammoniac a mis en évidence la présence des coumarines dont deux taches sont plus marquables aux  $R_f=0,43$  et  $R_f=0,90$ . Le chlorure d'aluminium a montré que l'extrait  $H_D$  contient des flavonoïdes notamment aux  $R_f=0,40$  et  $R_f=0,77$ . Ce réactif a révélé que les substances majeures de cet extrait  $H_D$  au  $R_f=0,77$  sont des flavonoïdes. L'extrait contient aussi des triterpènes et stéroïdes d'après la révélation par le réactif de Liebermann-burchard dont les majeurs sont aux  $R_f 0,45 ; 0,63$  et  $0,82$ . Ses polyphénols sont révélés à  $R_f=0,80$ .

La présence des coumarines dans cet extrait montre la coupure des hétérosides par l'hydrolyse parce que l'extrait brut de feuille non hydrolysé ne contient pas de coumarines.

L'application de l'hydrolyse nous a permis de constater que des aglycones de *Schefflera bojeri* sont cachés dans ses saponosides. Ils sont aussi responsables de ses nombreuses vertus thérapeutiques.

### **Remarque :**

Il existe des enzymes au niveau intestinal capables d'hydrolyser les hétérosides. De plus, certains microorganismes présents dans l'intestin sont capables d'hydrolyser les  $\beta$ -glycosides en aglycones et leur permettant alors de franchir la barrière intestinale et pourrait accroître l'activité anti-bactérienne et antifongique des extraits ingérés. [24]

Toutefois, il faut signaler la toxicité des plantes riches en saponosides d'où l'intérêt de procéder soit au fractionnement, soit à l'hydrolyse des extraits de feuilles afin d'éviter le risque d'intoxication.

## CONCLUSION

Plusieurs plantes de la biodiversité de Madagascar restent encore non étudiées. En particulier, nos enquêtes ethnobotaniques ont révélé que *Schefflera bojeri*, plante endémique de Madagascar, ne présente pas d'études scientifiques antérieures alors que ses feuilles sont très efficaces en pharmacopée traditionnelle malgache. Ces raisons nous ont motivées de la choisir dans ce travail qui constitue la première recherche chimique et biologique sur cette espèce végétale.

Nous avons procédé au criblage phytochimique et au fractionnement bioguidé des extraits de feuilles, d'écorces de tige et de racine, en utilisant respectivement les extractions par solvant et les techniques chromatographiques. Les propriétés antibactériennes et antifongique ont été évaluées *in vitro* par la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé.

Le criblage phytochimique a montré que parmi les parties étudiées de cette plante, la feuille est la plus riche en famille de substances chimiques. Ses constituants majeurs sont des flavonoïdes, des leucoanthocyanes, des triterpènes et des stéroïdes. Elle est principalement très riche en saponines.

Le résultat de l'extraction méthanolique brute par macération suivi du test biologique, indique que la feuille possède un rendement massique élevé en métabolites secondaires et elle s'est avérée la plus active biologiquement. Notamment, elle présente une forte activité vis-à-vis de la souche fongique *Candida albicans* avec un diamètre d'inhibition de 13 mm. Le fractionnement par partage liquide-liquide par différents solvants à polarité croissante de l'extrait brut de feuille a indiqué que les substances actives sont incluses dans la fraction partitionnée au DCM. Parmi les germes testés, la forte sensibilité de la souche fongique *Candida albicans* a été retrouvée dans cet extrait au diamètre d'inhibition de 13 mm.

Le fractionnement sur colonne chromatographique à gel de silice de l'extrait au DCM nous a permis de rassembler des fractions éluées selon leurs profils chromatographiques en 7 fractions regroupées. Les tests biologiques réalisés sur ces fractions regroupées ont révélé la fraction F<sub>6</sub> comme responsable de son activité vis-à-vis de *Candida albicans*. En effet, le diamètre d'inhibition de la souche a été accru par purification de l'extrait à 18mm. De plus, l'intérêt de ce résultat repose au fait que la fraction F<sub>6</sub> représente en masse presque la moitié de l'extrait au DCM d'où la possibilité de la poursuite de ce travail à l'isolement des substances actives.

Le CCM de criblage phytochimique de cette fraction active a montré qu'effectivement elle est constituée par trois substances majeures appartenant à la famille des triterpènes de type lupane et dont deux sont pratiquement superposées. La détermination exacte de leur structure constituera les travaux ultérieurs dans la suite de notre étude.

Les tests de screening phytochimiques nous ont montré la richesse des feuilles de *S. bojeri* en saponosides. Après hydrolyse acide de cette partie de la plante, nous avons trouvé que l'extrait au DCM de l'hydrolysate dispose également des activités antibactériennes vis-à-vis de plusieurs souches respectivement contre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans* aux diamètres d'inhibition respectifs 9,5 mm ; 9 mm ; 12 mm ; 10 mm ; 10 mm ; 12 mm. Les profils chromatographiques ont montré que, l'extrait au DCM obtenu présente des substances nouvelles libérées de leur forme glycosilées. Ainsi, les saponosides de cette plante renferment des génines à forte activité biologique. Le screening phytochimique de ce dernier extrait a indiqué la présence des dérivés phénoliques, des terpénoïdes et stéroïdes, des coumarines, des flavonoïdes et aussi des triterpènes de type lupane dont les constituants majeurs sont des flavonoïdes provenant alors de l'hydrolyse des saponosides.

Bref, ces résultats montrent la richesse de *Schefflera bojeri* en tant que plante médicinale. Son activité sur la souche fongique *Candida albicans* a confirmé ses usages traditionnels contre l'acné juvénile, de nombreuses maladies cutanées et certaines maladies diarrhéiques. Cette plante présente alors des perspectives de recherche qui méritent d'être poursuivies comme la détermination structurale des trois triterpènes de type lupane responsable de son activité antifongique, les études des autres activités antibactériennes aperçues dans ce travail, et l'étude de ses propriétés antioxydantes. Enfin, la transformation de la fraction F<sub>6</sub> ou de son produit isolé sous forme galénique est alors envisageable sous forme poudre, pommade, crème dermique ou solution hydroalcoolique.

**BIBLIOGRAPHIES ET WEBOGRAPHIES**

- [1] P. COULERIE, Étude phytochimique et pharmacologique de plantes de Nouvelle-Calédonie à potentialités anti-dengue, Université de la Nouvelle-Calédonie école doctorale du pacifique, ed 469: Thèse de docteur en chimie des substances naturelles, 2012.
- [2] S. KRIEF, Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (*pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda, activités biologiques et étude chimique de plantes consommées, Thèse de doctorat, 2003.
- [3] MINISTERE DE L'ENVIRONNEMENT ET DES FORETS, «Quatrième rapport national de la convention sur la diversité biologique de Madagascar ;,» 2009.
- [4] M.DEBRAY, «Médecine et pharmacopée traditionnelle de Madagascar,» 1975.
- [5] J.VERCAUTEREN, Plan, Schémas, Formules du Cours de Pharmacognosie, Université Montpellier I, Laboratoire de Pharmacognosie, 2006-2007.
- [6] « *Schefflera bojeri* (Seem.) R.Vig.,» 2016. [En ligne]. Available: [www. tropicos.org](http://www.tropicos.org). [Date de consultation: Janvier 2016].
- [7] P. BOITEAUX, Dictionnaire des noms malgaches des végétaux, ,, Alzieu éd., vol. collection « nature » : Flore de Madagascar..
- [8] G. B. K. NKWOKAP, Isolement et caractérisation des saponosides de trois plantes de la famille des araliaceae et dracaenaceae et évaluation de leurs activités cytotoxiques sur cellules tumorales, Cameroun - Université de Yaoundé: Vegetal Biology. Université de Bourgogne, 2010.
- [9] «Araliaceae-Araliacées, Flore de la Reunion,» [En ligne]. Available: <http://www.mi-aime-a-ou.com/Araliaceae.php>. [Date de consultation: 09 Mai 2016].
- [10] J. B. CHAZAN, Répartition des sapogénines terpéniques dans quelques genres d'araliacées de Madagascar, ,, Tananarive,: Centre O.R.S.T.O.M., en 1970.
- [11] c. ALEXIS ST-GELAIS B. SC., Étude de la composition chimique et de l'activité biologique de *Dirca palustris* l., Septembre 2014.
- [12] «*Schefflera*,» [En ligne]. Available: <https://en.wikipedia.org/wiki/Schefflera>. [Date de consultation: 11 Décembre 2015].

## Bibliographies et Webographies

- [13] R. M. N., A. R. Kuhlman, V. Jeannoda, H. Rabarison, N. Rakotoarivelo, T. Randrianarivony, F. Raktoarivony, A. Randrianasolo et R. W. Bussmann, Medicinal plants sold in the markets of Antananarivo, Madagascar Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, 2015.
- [14] C. A. KULL, J. RATSIRARSON et G. RANDRIAMBOAVONJY, Les forêts de tapia des Hautes Terres malgaches, Madagascar, pp. 22-58.
- [15] E. A. RAKOTOBÉ, C. J. C. RASOLOMANANA et S. S. RANDRIANASOLO, Pharmacopées de l'Ambongo et du Boina, Antananarivo, 1993.
- [16] A. DESCHENMAKER, Ravi-maitso, 1975.
- [17] TINUVIEL, «Biochimie-Phytochimie-Pharmacognosie : introduction et définition,» 10 octobre 2008.
- [18] Microsoft® Encarta® 2009. © 1993-2008 Microsoft Corporation..
- [19] J. REYNAUD, Cours de botanique, Université de Lyon, 2009-2010.
- [20] A. GRAVOT, Support de cours sur le métabolisme secondaire, Université de Rennes 1 – L2 UE PHR –: Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV, Année universitaire 2008/2009.
- [21] J. BRUNETON, Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3e éd., TEC & DOC, 1999, pp. 225-1120.
- [22] A. ATTOU, Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent, Université abou bekr belkaid Tlemcen, faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, département de biologie: Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister en biologie, 2010-2011.
- [23] H. ALILOU, B. BENCHARKI, L. M. I. HASSANI et N. BARKA, Screening phytochimique et identification spectroscopique des flavonoïdes d'*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus*, Laboratoire d'Agroalimentaire et Santé, Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan 1er, Casablanca, Maroc: Afrique SCIENCE, 2014.
- [24] S. MOREL, Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae), 2011.

## Bibliographies et Webographies

- [25] L. E. RAKOTONANTOANDRO, Contribution aux études des activités antibactériennes par fractionnement bioguidé d'extraits de *Psiadia salviifolia* Baker ou "kijitina" (Asteraceae), Université d'Antananarivo, Ecole supérieure Polytechnique, Département Génie chimique: Mémoire de fin d'études afin de l'obtention de diplôme d'étude approfondies en Chimie appliquée à l'industrie et à l'environnement, 2015.
- [26] A. LHUILLIER, Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *agauria salicifolia* hook.f ex oliver, *agauria polyphylla* baker (ericaceae), *tambourissa trichophylla* baker (monimiaceae) et *embelia concinna* baker (myrsinaceae), Institut National Polytechnique de Toulouse: Thèse pour obtenir le titre de docteur, Spécialité : Sciences des Agroressources, 2007.
- [27] MPNC, Terpènes et stéroïdes, Master , 2010-2011.
- [28] J. RANAIVOSON, contribution à l'étude chimique et biologique des extraits de *Laggera alata* (COMPOSITAE), DEA, département de biochimie appliquée aux sciences médicales, Faculté des sciences, université d'Antananarivo, 1998.
- [29] M. KOLLER, C. PLETSCHER et M. JOST, «Factsheet Solvants,» janvier 2013.
- [30] *Les secrets de solvatation*, Laboratoire de toxicologie et maîtrise du risque chimique.
- [31] L. BENSENGUENI-TOUNSI, Etude "in vitro" de l'effet antibactérien et antifongique de *Inula viscosa*- *Lawsonia inermis*-*Asphodelus microcarpus* – *Aloe vera* – *Juniperus oxycedrus*, Université de Constantine, Algérie: Mémoire pour obtenir le diplôme de Magister en médecine vétérinaire, 2001.
- [32] M. Carole, *Techniques d'extraction*, Lycée International Grenoble, Avril 2014.
- [33] «Plante/ Les techniques d'extraction des plantes,» 2007. [En ligne]. Available: [www.biolinéaires.com/articles/plantes/1380-les-techniques-d-extraction-de-plantes.html#V3t7NvnmP5c](http://www.biolinéaires.com/articles/plantes/1380-les-techniques-d-extraction-de-plantes.html#V3t7NvnmP5c). [Date de consultation: 10 Mars 2016].
- [34] R. RHODE, *Extraction liquide - liquide*, Lycée Pradeau La Sède Tarbes, NOVEMBRE 1998.
- [35] R. SALGHI et A. ENSA, *Chromatographie, Cours d'analyses physico-chimique des denrées alimentaires II, GPÉE, 1ère année*, pp. 20-45.
- [36] E. ANTONOT et R. MARCHAL, *Chromatographie (Stage MAFPEN)*, Lycée Louis Vincent - METZ, Janvier 1998.

## Bibliographies et Webographies

- [37] N. TLILI, Procédés de séparation multi colonnes continus:Extension à la chromatographie à gradient de solvant; THÈSE DE DOCTORAT Pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE Spécialité : Génie des procédés et des produits, Université de Lorraine, 2013.
- [38] *Méthodes de laboratoires utilisées pour les essais d'antibioresistance*, Manuel terrestre de l'OIE,, 2008, pp. 61-71.
- [39] D. GENNEA et H. H. SIEGRISTB, De l'antibiogramme à la prescription d'un antibiotique, Forum Med , 14 mai 2003, pp. 464-468.
- [40] «antibiogramme,» [En ligne]. Available: <http://sante-medecine.journaldesfemmes.com/faq/6576-antibiogramme>. [Date de consultation: 8 mars 2016].
- [41] P. NEVOT, A. PHILLIPON et G. PAUL, Agents antibactériens : antibiotiques,, 1ère éd., 1979, pp. 1223-1234.
- [42] J. THIERRY, *Antibiotiques - Actualités, bonne pratique de l'antibiogramme*, Groupe Dyomedeia, Lyon France, 2012.
- [43] H. LECLERC, M. SIMONET et J. L. GAILLARD, Microbiologie générale, 2e éd., D. Editeurs, Éd., Paris, 1983, p. 369.
- [44] L. E. RAZAFINDRABENJA, *Contribution à l'étude chimique et biologique de Hypericum japonicum var.Pseudocrispum*, 2014.
- [45] *Candida albicans - Fiches technique santé-sécurité : agents pathogènes*, Canada: Agence de la santé publique du Canada,, 2011.
- [46] E. R. ANDRIANARISON, R. RAKOTOSAONA, O. J. ANDRIANAIVORAVELONA, J. R. ANDRIANARISON, J. E. HANDRINIRINA et P. A. ANDRIANARY, *Screening phytochimique et isolement par voie bioguidée de substances à activité antibactérienne d'extraits de Cassia occidentalis Sond récoltée à Maevantanana*, 2015.
- [47] G.-F. AMEENAH et J. GUEHO, «Inventaire et étude des plantes médicinales et des plantes aromatiques des Etats de l'océan indien,» 1990-1997.
- [48] M. RAZAFINDRALAMBO, Etudes chimiques et biologique de psychotria oreotrephe (Rubiaceae) endémique de Madagascar, Université d'Antananarivo: Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme d'Etudes Approfondies en Chimie Appliquée à l'Industrie et à l'Environnement, 2015.

## Bibliographies et Webographies

- [49] Y. RANARIVELO, Les Grandes familles Chimiques de Produits Naturels, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo., 2004.
- [50] E. DARAMSTADT, Révélateurs pour la chromatographie en couche mince et sur papier, Allemagne, 1980.
- [51] C. VIGOR, J. VERCAUTEREN et J. MONTELS, *Travaux pratique de pharmacognosie: "les substances naturelles dans la chaine du médicament"*, Université Montpellier I, 2010.
- [52] *Pharmacognosie, chapitre 4: Drogues à saponosides*, FACULTÉ DE PHARMACIE DE MONASTIR - DCEP 1,, 2013- 2014.
- [53] R. DIMBY, Isolement d'un constituant chimique des feuilles. Activités biologiques et microbiologiques, DEA, département chimie organique, option substances naturelles, faculté des sciences, université d'Antananarivo, 2007.
- [54] D. PENOËL, R. JOLLOIS et P. et FRANCHOMME, L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles, fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle, 1995.
- [55] A. F. RAZAFINDRAMAKA, Contribution à l'étude chimique et biologique de *Brunfelsia eximia* (Solanaceae) et d'une espèce d'Euphorbiaceae codée FD, Février 2008.
- [56] *Bacillus cereus*, Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail, Septembre 2011.
- [57] V. ISABELLE, L. GERARD, G. YVES et V. François, *Cours de Bactériologie Médicale*, Lyon.
- [58] N. M. O. D. HARIOLY, Etudes préliminaires de la composition chimique de l'huile essentielle de *Schinus Terebenthifolius* et de leurs activités biologiques, Université d'Antananarivo: Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur Agronome, 2006.
- [59] P. HORDÉ, *Klebsiella pneumoniae - Définition*, 2016.
- [60] F. C. MOUSSA, *Vibrio cholerae*, Ministère de la Santé et de la Prévention, Réseau National de Laboratoires du Sénégal.

## ANNEXES

**Annexe 1 : Protocole du test biologique effectué**

Le test biologique consiste à la réalisation d'un antibiogramme.

En microbiologie, un *antibiogramme* est un examen de sensibilité d'un germe microbien à divers antibiotiques en vue de sélectionner l'antibiotique le plus efficace pour lutter contre ce germe [53], [54]

Dans notre étude, on test chacun des extraits à plusieurs souches microbiennes.

**Préparation des produits à tester :**

Les méthodes classiques de détermination du pouvoir antimicrobien se heurtent souvent au problème de l'insolubilité des huiles essentielles dans le milieu de culture, ce qui se traduit par l'obtention de résultats peu reproductibles. ALLEGRINI et ses collaborateurs [1972, 1973] ont mis au point une méthode utilisant un émulsionnant, le tween, qui s'est révélé sensible très fiable, reproductible. Cette méthode a été utilisée avec succès pour l'étude de l'action antibactérienne d'huile essentielle de plantes endémiques de Madagascar. [55]

Dans notre cas, le tween 80 est remplacé par du DMSO.

Les extraits secs sont dissous totalement dans du DMSO à raison de 20 mg d'extrait dans 1ml de solvant.



*Photo 29 : Cliché des produits à tester*

**Isolement et purification des souches :**

Les tests antibactériens doivent être réalisés à partir des cultures jeunes (de 18 à 24h) en phase de croissance exponentielle.

Il est indispensable d'isoler les microorganismes à étudier et d'en faire une culture pure pour déterminer à quelle espèce on a à faire.

Les souches à isoler sont déjà revivifiés dans le laboratoire LHAE de l'IPM.

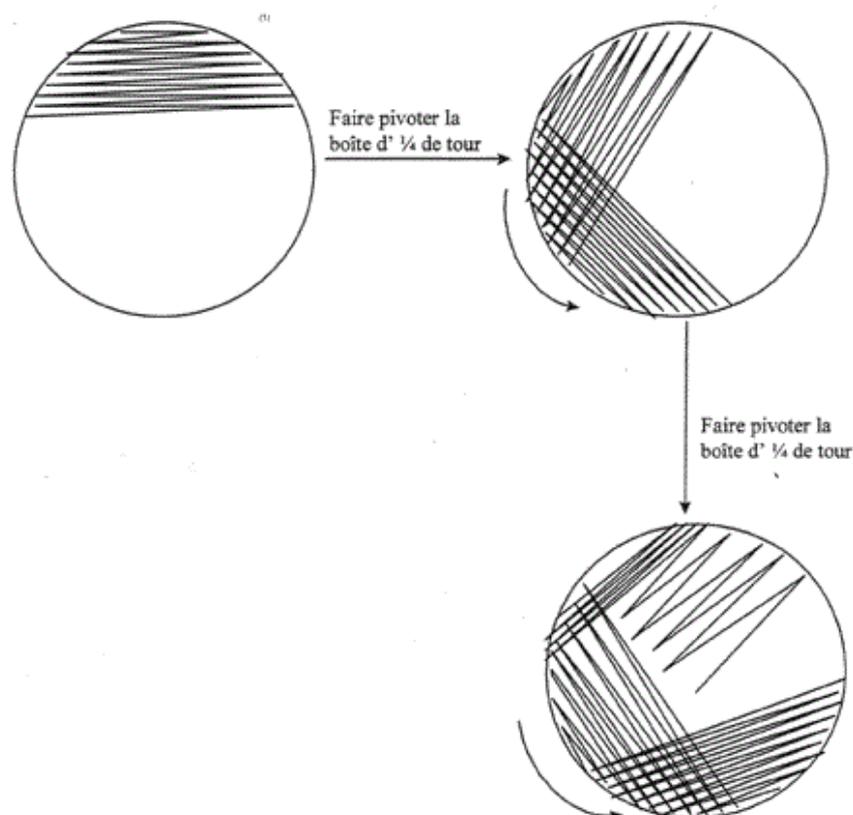
On prélève alors un inoculum qui est ensemencé par stries serrées à la surface d'une gélose nutritive préalablement coulée dans une boîte de Pétri. Seules les cellules isolées sont déposées et donnent naissance en 24 heures à des colonies provenant de la croissance d'un seul individu.

Le milieu de culture pour l'isolement des souches (environnement artificiel du microbe) est GNS pour le *Vibrio cholerae* et TCS pour les autres.

Les manipulations sont effectuées dans une zone délimitée par un rayon de 15cm autour de la flamme d'un bec bunsen.

Le mode d'étalement des souches est montré par la figure 25.

Après, la boîte de pétri fermé est incubé à 37°C pendant 24 h.



*Figure 21 : Technique d'isolement d'une souche*



*Photo 30 : Exemple d'une souche isolée*

### **Préparation de l'inoculum ou suspension bactérienne :**

On prend des colonies isolées à l'aide d'une anse et on le met en suspension dans de l'eau physiologique (turbidité nul). On le fait passer à l'agitateur vortex pour avoir une homogénéité de la suspension. Puis, on vérifie sa turbidité par l'appareil appelé « densimat », on l'ajuste à 0,5 McF. S'il est inférieur, on ajoute des souches et s'il est en excès on ajoute de l'eau physiologique. 0,5 McF est équivalent à  $10^8$  ufc/ml pour les bactéries et  $10^7$  ufc/ml pour les levures. On dilue ensuite à 1/10 de sorte que la concentration finale est de  $10^7$  ufc/ml.



*Photo 31 : agitateur vortex*



*Photo 32 : l'appareil densimat*

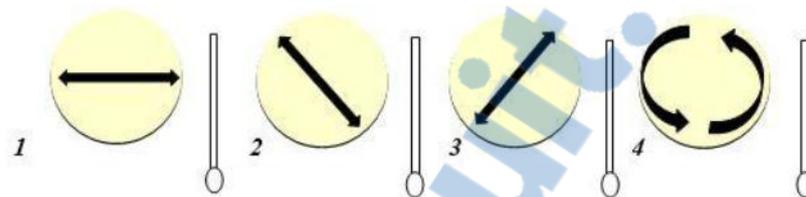
### **Ensemencement des germes**

La technique utilisée est l'écouvillonnage. Il consiste à tremper un écouvillon stérile et sec dans l'inoculum, à l'essorer puis, l'ensemencer en stries sur toute la surface de la boîte de Pétri contenant la gélose à 3 reprises, en faisant tourner la boîte de  $60^\circ$  après chaque application, puis à

passer l'écouvillon sur le bord de la boîte de pétri dans le but de recouvrir totalement la boîte de pétri avec une couche mince d'inoculum.

Les milieux utilisés sont la gélose Mueller Hinton pour les bactéries et la gélose de Sabouraud pour la levure.

Puis on le laisse sécher à la température ambiante pendant environ 3 minutes et sous couvercles fermée.



*Figure 22: mouvements de stries lors de l'écouvillonnage*



*Photo 33 : Ensemencement des germes sur le milieu gélose correspondant par écouvillonnage*

#### **Dépôt des produits à tester**

Des disques stériles de papier Wattman de 6 mm de diamètre sont déposés, à l'aide d'une pince stérile sur les cultures ensemencées précédemment. Puis, les disques sont imbibés de la solution de produit à tester à raison de 10  $\mu$ l/disque à l'aide d'un injecteur.

Toutes les boîtes sont alors incubées à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et 48 h pour *Candida albicans*. [45]



*Photo 34 : dépôt des extraits sur les disques*

### **Dépôt des antibiotiques de référence**

Parallèlement on procède de même en remplaçant le disque imbibé des produits par des disques des antibiotiques qui servira des témoins positifs et du DMSO.

### **Lecture des résultats**

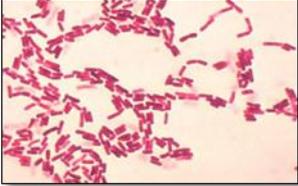
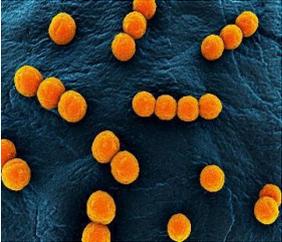
Après incubation, on observe l'apparition d'une zone claire autour des disques n'ayant pas de colonies microbiennes, appelée zone d'inhibition. L'effet antimicrobien recherché est proportionnel au diamètre d'inhibition mesuré.

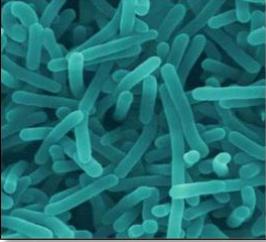
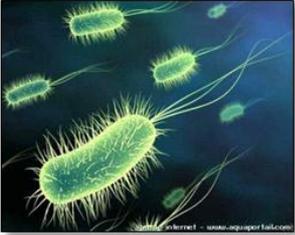
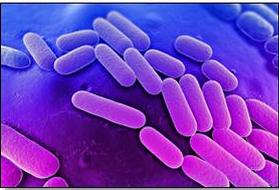
La lecture est obtenue en mesurant ce diamètre d'inhibition en mm à l'aide d'une règle et en le comparant aux valeurs de référence.

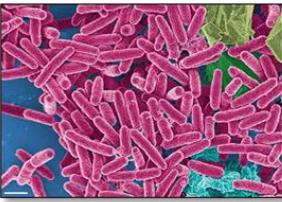
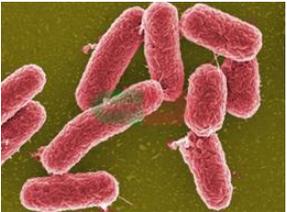
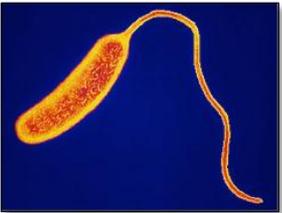
*Tableau 22 : Référence des sensibilités des souches [43]*

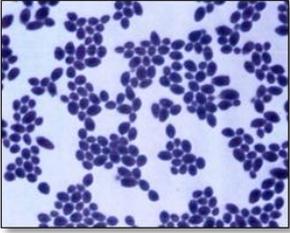
<b>Diamètre d'inhibition (<math>\emptyset</math>)</b>	<b>Sensibilité des souches</b>
$\emptyset < 7 \text{ mm}$	Résistante
$7 \text{ mm} \leq \emptyset \leq 8 \text{ mm}$	Peu sensible
$8 \text{ mm} < \emptyset \leq 9 \text{ mm}$	Sensible
$\emptyset > 9 \text{ mm}$	Très sensible

## Annexe 2 : Description des souches testées [45] [56] [57] [58] [59] [60]

Nom des souches et références	descriptions	Symptômes
<p><i>Bacillus cereus</i> (CIP 642)</p> 	<p>Il s'agit d'un bâtonnet à coloration Gram+, sporulant et aéro-anaérobie facultatif.</p>	<p>Intoxications se traduisant par des symptômes émétiques (nausées, vomissements, malaises, diarrhées et douleurs abdominales occasionnelles) et de toxi-infections caractérisées par des symptômes diarrhéiques (Diarrhées aqueuses, douleurs abdominales, nausées occasionnelles)</p>
<p><i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29219)</p> 	<p>Ce sont des bactéries aérobies arrondies. Elles se présentent en chaînettes ou par paires, et certains groupes sont pathogènes opportuniste pour l'homme.</p>	<p>à l'origine d'infections chez les patients fragilisés et responsable des infections urinaires, abcès abdominaux, péritonites, infections secondaires des plaies chirurgicales, endocardites lentes ou subaiguës, angine, scarlatine, érysipèle, fièvre puerpérale et certaines pneumonies.</p>
<p><i>Listeria monocytogènes</i> (ATCC 19111)</p>	<p>Ce sont des bacilles très résistantes et peuvent se développer à une température de + 4°C, ce qui leur permet de se multiplier dans des aliments contaminés même</p>	<p>Listériose, septicémie, responsable de l'avortement. Elle est potentiellement dangereuse, elle atteint plus gravement les nouveau-nés et</p>

	<p>conservés au réfrigérateur. C'est une bactérie opportuniste (elle touche plus facilement les organismes affaiblis par une autre maladie).</p>	<p>les personnes âgées que le reste de la population</p>
<p><i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)</p> 	<p>Ce sont des bactéries à Gram+, pathogènes, immobiles aérobies-anaérobies facultatives. Elles sont très répandues dans la nature (air, eau, sol) et vivent souvent à l'état commensal sur la peau et les muqueuses des organismes humains et animaux.</p>	<p>les infections cutanéomuqueuses telles que les folliculites et les abcès, impétigo, furoncles, anthrax, panaris, cellulites ou les sinusites et les otites.</p>
<p><i>Escherichia coli</i> (CIP 103914)</p> 	<p>Ce sont des bactéries à gram (-) saprophytes de l'intestin et d'indiscutables agents pathogènes. Elles se présentent sous forme de bacilles asporulés de 2 à 4 µm de long sur 0,4 à 0,6 µm de large et aux extrémités arrondies.</p>	<p>Responsable de localisation suppurées diverses, génito-urinaires principalement, et de gastro-entérites infantiles, les pyélonéphrites aiguës, les cystites, les septicémies après l'âge de 50 ans. Il en résulte une diarrhée aqueuse et glaireuse.</p>
<p><i>Klebsiella pneumoniae</i> (LHAE 3)</p> 	<p>Ce sont des cellules isolées ou par paires, regroupées en courtes chaînes, capsulées, non mobiles ; Ils sont présents dans le tube digestif et dans l'appareil respiratoire des hommes et des animaux en tant que bactéries commensales. Elles sont fréquentes dans les selles et peuvent être un</p>	<p>responsable d'angines, d'infections pulmonaires, parfois d'infections urinaires ou d'infections plus généralisées.</p>

	<p>indicateur d'une contamination fécale. Elles sont abondantes dans le sol, les eaux et sont des fixateurs de l'azote atmosphérique.</p>	
<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)</p> 	<p>Bactéries à gram (-), aérobies qui peuvent vivre librement dans la nature, dans les milieux humides et dans la partie intestinale du tube digestif de l'homme et des animaux. Ils se présentent sous forme de bâtonnets assez fins de diamètre égal à 0,5µ.</p>	<p>Infections nosocomiales, infection de l'oeil, plaies (surtout brûlures et plaies opératoires), appareil urinaire, gastro-intestinales, des poumons, origine des méningites d'inoculation et des septicémies, infections généralisées surtout chez les nouveaux nés.</p>
<p><i>Salmonella Typhimurium</i> (ATCC 14028)</p> 	<p>Ce sont des bacilles à Gram négatif, mobiles dans toutes les directions grâce à des flagelles. Elles sont aéro-anaérobies facultatifs.</p>	<p>Salmonellose transmise de l'animal à l'homme, provoquant des gastro-entérites et de toxi-infections alimentaires ; responsable aussi de la fièvre typhoïde.</p>
<p><i>Vibrio cholerae</i> (LHAE 1)</p> 	<p><i>Vibrio cholerae</i> (ou vibron cholérique ou bacille virgule) est une protéobactérie Gram négatif en forme de bâtonnet incurvé. Elle possède également un flagelle qui lui donne une mobilité. Elle vit habituellement dans les écosystèmes aquatiques mais l'Homme est également un réservoir.</p>	<p>Choléra = Toxi-infection intestinale aiguë, diarrhée aqueuse considérable, vomissements, douleurs abdominales et déshydratation rapide.</p>

<p><i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)</p> 	<p>C'est une levure saprophyte qui existe chez l'homme sain dans les muqueuses de la cavité buccale, de l'intestin ou du vagin.</p>	<p>Agent pathogène très polyvalent, responsable des infections fongiques (candidose) des muqueuses digestives et gynécologiques, de multitude d'infections comme les infections superficielles cutanées, l'érythème fessier des nouveau-nés, la bronchopneumonie, la vaginite et diverses d'infections profondes.</p>
---	---	---

## Annexe 3 : Préparation des réactifs utilisés

### Réactifs pour le screening des alcaloïdes

**Réactif de Mayer** : 1,35g de chlorure de mercure (II) + 94 ml d'eau distillée + 5 g d'iodure de potassium, le volume est ramenée à 100 ml avec de l'eau distillée.

### **Réactif de Dragendorff** :

Solution A= 1,7g de sous- nitrate de bismuth + 20g d'acide tartrique + 30 ml d'eau distillée

Solution B= 16g de d'iodure de potassium + 40 ml d'eau distillée

Solution C= 10 g d'acide tartrique + 50 ml d'eau distillée

Au moment de l'emploi, les 3 solutions sont mélangées à volumes égaux.

**Réactif de Wagner** : 1,27 g d'iode + 2g d'iodure de potassium + 50 ml d'eau distillée.

### Réactif anisaldéhyde sulfurique pour pulvérisation des plaques CCM

Méthanol : 85 ml

Acide acétique : 10 ml

Acide sulfurique : 5 ml

p-anisaldéhyde : 0,5ml

## TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS .....	I
SOMMAIRE .....	III
GLOSSAIRE.....	IV
LISTE DES ABREVIATIONS .....	V
LISTE DES FIGURES.....	VII
LISTE DES PHOTOS.....	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	X
INTRODUCTION.....	1
<b>Partie I) Etudes bibliographiques .....</b>	<b>3</b>
I) GENERALITES SUR LA PLANTE.....	4
I-1) La flore de Madagascar.....	4
I-1-1) La biodiversité floristique de Madagascar.....	4
I-1-2) Les plantes médicinales et/ou aromatiques.....	4
I-2) Identification botanique de la plante.....	5
I-2-1) Description botanique.....	5
I-2-2) La famille <i>Araliaceae</i> .....	6
I-2-3) Le genre <i>Schefflera</i> :.....	6
I-2-4) L'espèce <i>Schefflera bojeri</i> ou « Tsingila » :.....	7
2-4-1) Botanique.....	7
2-4-2) Localisation à Madagascar.....	8
2-4-3) Utilisations traditionnelles :.....	10
II) NOTIONS THEORIQUES SUR LA PHYTOCHIMIE.....	11
II-1) Définition.....	11
II-2) Les substances produites par la plante.....	11

## *Table des matières*

II-2-1) Les métabolites primaires.....	11
II-2-2) Les métabolites secondaires .....	11
2-2-1) Rôles.....	12
2-2-2) Classification.....	12
II-2-3) Les composés phénoliques .....	12
2-3-1) Les coumarines .....	13
2-3-2) Les flavonoïdes .....	14
2-3-3) Anthocyanosides .....	16
2-3-4) Les tanins .....	17
2-3-5) Quinones .....	18
II-2-4) Les terpènes et stéroïdes.....	19
2-4-1) Les monoterpènes et les sesquiterpènes.....	20
2-4-2) Les diterpènes .....	20
2-4-3) Triterpènes et stéroïdes .....	21
i) Les saponosides .....	22
ii) Les hétérosides cardiotoniques .....	23
2-4-4) Les caroténoïdes.....	24
II-2-5) Les alcaloïdes .....	24
II-3) Screening phytochimique : .....	25
III) EXTRACTION PAR SOLVANT .....	26
III-1) Macération à froid .....	27
III-2) Extraction par soxhlet .....	27
III-3) Extraction liquide/liquide .....	27
IV) CHROMATOGRAPHIE .....	29
IV-1) Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	29
IV-1-1) Description et principe.....	29

## *Table des matières*

IV-1-2) Révélation .....	30
IV-1-3) Applications de la CCM .....	30
IV-2) Chromatographie sur colonne .....	31
IV-2-1) Description et principe .....	31
IV-2-2) Applications .....	32
V) TESTS BIOLOGIQUES .....	33
V-1) Choix d'une méthode : .....	33
V-2) Méthode par diffusion sur disque en milieu gélosé .....	33
V-3) L'antibiogramme .....	34
V-4) Choix des souches testées .....	34
<b>Partie II) Etudes Expérimentales .....</b>	<b>36</b>
I) RECOLTE ET PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL .....	39
I-1) Récolte et identification .....	39
I-2) Séchage et broyage .....	39
II) EXTRACTION DES METABOLITES SECONDAIRES .....	40
II-1) Extraction par macération .....	40
II-2) Tests biologiques des extraits bruts .....	41
II-2-1) Test des antibiotiques de référence et du DMSO .....	42
II-2-2) Test des extraits bruts .....	43
III) SCREENING PHYTOCHIMIQUE DES EXTRAITS BRUTS .....	45
III-1) Modes opératoires .....	45
III-1-1) Criblage des coumarines .....	45
1-1-1) Première méthode .....	45
1-1-2) Deuxième méthode .....	45
III-1-2) Criblage des flavonoïdes .....	45
1-2-1) Test de Wilstater .....	45

## Table des matières

1-2-2) Test de Wilstater modifié.....	46
III-1-3) Criblage des anthocyanes.....	46
III-1-4) Criblage des leucoanthocyanes.....	46
III-1-5) Criblage des quinones.....	46
1-5-1) Réaction de Bornträger.....	46
1-5-2) Hydrolyse acide.....	46
III-1-6) Criblage des tanins et autres composés phénoliques.....	47
1-6-1) Première méthode.....	47
1-6-2) Deuxième méthode.....	47
III-1-7) Criblage des triterpènes et stéroïdes.....	47
❖ Test de Liebermann Burchard.....	47
❖ Test de Salkowski.....	48
❖ Test de Badjet Kedde.....	48
❖ Test de Keller-Killiani.....	48
III-1-8) Criblage des iridoïdes.....	48
1-8-1) Réaction avec HCl dilué suivi de chauffage.....	48
1-8-2) Réaction en présence de glycérol.....	48
1-8-3) Réaction de Trim et Hill.....	48
III-1-9) Criblage des saponines.....	49
III-1-10) Criblage des alcaloïdes.....	49
III-1-11) Criblage des composés cyanogénétiques.....	49
III-1-12) Criblage des polysaccharides.....	50
III-2) Résultats.....	50
III-2-1) Résultats de test de coumarine.....	50
III-2-2) Résultats des flavonoïdes.....	50
III-2-3) Résultats des anthocyanes.....	50

## *Table des matières*

III-2-4) Résultats des leucoanthocyanes .....	50
III-2-5) Résultats des quinones .....	50
III-2-6) Résultats des tanins et autres composés phénoliques.....	51
2-6-1) Résultat de la première méthode.....	51
2-6-2) Résultats de la deuxième méthode .....	51
III-2-7) Résultats des triterpènes et stéroïdes.....	51
III-2-8) Résultats des iridoïdes.....	51
III-2-9) Résultats des saponines.....	52
III-2-10) Résultats des alcaloïdes.....	52
III-2-11) Résultats des composés cyanogénétiques .....	52
III-2-1) Résultats des polysaccharides .....	52
III-3) Récapitulation de tous les résultats des criblages phytochimique :.....	52
IV) FRACTIONNEMENT PAR PARTAGE DE L'EXTRAIT BRUT .....	55
IV-1) Extractions et rendements .....	55
IV-2) Activités biologiques des extraits de partage.....	57
V) FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT AU DCM .....	59
V-1) Détermination du système d'éluant.....	59
V-2) Fractionnement par chromatographie sur colonne .....	60
V-2-1) Préparation de la colonne :.....	60
V-2-2) Recueil des fractions .....	61
V-3) Analyse par CCM des fractions obtenues .....	61
V-4) Test biologique des fractions obtenues.....	68
VI) SCREENING PHYTOCHIMIQUE DE LA FRACTION BIOACTIVE .....	70
VI-1) Matériels utilisés .....	70
VI-2) Révélation et caractéristique des taches [25] [50].....	70
VI-2-1) Pulvérisation à l'anisaldéhyde .....	71

## Table des matières

VI-2-2) Traitement de la plaque à la vapeur d'ammoniac : .....	71
VI-2-3) Pulvérisation par l' $\text{AlCl}_3$ .....	71
VI-2-4) Pulvérisation par le réactif de LIEBERMANN-BURCHARD .....	71
VI-2-5) Pulvérisation par $\text{FeCl}_3$ : .....	72
VI-3) Résultats du criblage phytochimique sur CCM .....	72
VI-3-1) Visualisation sous UV 254 nm et 365 nm .....	72
VI-3-2) Révélation à l'anisaldéhyde : .....	73
VI-3-3) Révélation après traitement à la vapeur de l'ammoniac : .....	73
VI-3-4) Révélation par l' $\text{AlCl}_3$ : .....	74
VI-3-5) Révélation par le réactif de LIEBERMANN-BURCHARD : .....	75
VI-3-6) Révélation par $\text{FeCl}_3$ : .....	75
VI-4) Récapitulation des résultats du screening phytochimique de $F_6$ et interprétation... ..	76
VII) HYDROLYSE ACIDE DES HETEROSIDES (SAPONOSIDES) .....	78
VII-1) Mode opératoire .....	78
VII-2) Résultats .....	79
VII-3) Interprétations : .....	80
VII-4) Test biologique .....	80
VII-5) Criblage phytochimique sur CCM de l'extrait au DCM ( $H_D$ ) .....	81
VII-5-1) Visualisation sous UV .....	81
VII-5-2) Révélation à l'anisaldéhyde : .....	82
VII-5-3) Révélation après traitement à la vapeur de l'ammoniac : .....	82
VII-5-4) Révélation par l' $\text{AlCl}_3$ .....	83
VII-5-5) Révélation par le réactif de LIEBERMANN-BURCHARD .....	84
VII-5-6) Révélation par $\text{FeCl}_3$ .....	85
VII-5-7) Récapitulation des résultats du criblage phytochimique de $H_D$ : .....	86
CONCLUSION .....	88



## *Table des matières*

BIBLIOGRAPHIES ET WEBOGRAPHIES .....	90
ANNEXES .....	a
Annexe 1 : Protocole du test biologique effectué .....	a
Annexe 2 : Description des souches testées .....	f
Annexe 3 : Préparation des réactifs utilisés .....	j
TABLE DES MATIERES	

**AUTEUR :** SOLOFOHENITSOA Nivo Estelle

**TITRE :** « ETUDE CHIMIQUE ET ELUCIDATION DES ACTIVITES ANTIFONGIQUE DE LA PLANTE *Schefflera bojeri* (Seem.) R. Vig ENDEMIQUE DE MADAGASCAR »



**Nombre des pages :** 94

**Nombre des tableaux :** 22

**Nombre des figures :** 22

**Nombre des photos :** 34

**Nombre des annexes :** 3

## RESUME

Notre étude consiste à la première recherche chimique et biologique sur le *Schefflera bojeri* (Seem.) R. Vig., endémique à Madagascar. Le criblage phytochimique a mis en évidence la présence majeure des flavonoïdes, des leucoanthocyanes, des triterpènes et stéroïdes, des polysaccharides et surtout des saponines. L'extraction brute hydrométhanolique a été menée sur la feuille, les écorces de tige et de racine. Le fractionnement bioguidé effectué sur l'extrait brut de feuilles nous a permis d'obtenir une fraction active F6 de l'extrait au DCM de la feuille, particulièrement vis-à-vis de la souche fongique *Candida albicans* avec un diamètre d'inhibition de 18mm. Le criblage phytochimique sur CCM de F6 a montré qu'elle est constituée par trois substances majeures appartenant à la famille de triterpène de type lupane. L'hydrolyse acide des hétérosides de la feuille a montré que les aglycones disposent des activités antibactériennes notamment l'extrait au DCM.

Bref, les résultats ont montré les intérêts suscités par l'étude de cette plante, la nécessité d'isoler les substances actives et de connaître leurs structures chimiques.

**Mots clés :** *Schefflera bojeri*, phytochimie, saponoside, fractionnement bioguidé, antifongique, *Candida albicans*, chromatographie liquide sur colonne, CCM.

## ABSTRACT

This work constitutes the first stage of chemical and biological research on *Schefflera bojeri* (Seem.) R. Vig., an endemic plant in Madagascar. The phytochemical screening makes observable the major existence of flavonoids, leucoanthocyanes, triterpens and steroids, polysaccharids and especially saponins. The brut extraction was focused on the leaf, the stems and roots'barks. The bioassay-guided fractionation making realized on the brute astract of leaves enables the obtainment of an active fraction F6 through leaf's extract by DCM, particularly face to the fungal stub *Candida albicans* with an inhibition diameter of 18mm. The phytochemical screening on TLC of F6 has demonstrated that it's composed with three major substances belonging to triterpen's family of lupine model. The acid hydrolysis of the leaf's heterosids has shown that aglycons dispose as well, antibacterial activities especially the extract by DCM.

In a few words, the results have shown interests induced from the study of this plant, the necessity to isolate the active substances and to know their chemical structures.

**Keys words:** *Schefflera bojeri*, phytochemistry, saponin, bioassay-guided fractionation, antifungal, *Candida albicans*, liquid column chromatography, TLC.

**RAPPORTEUR :** Professeur ANDRIANARISON Edouard Ravalison

**Contact (Auteur):** 033 64 688 08/ [nivosolofohenitsoa@gmail.com](mailto:nivosolofohenitsoa@gmail.com)