



**TABLE DES  
MATIERES**

## TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
REMERCIEMENTS .....	I
ABREVIATIONS .....	II
GLOSSAIRE .....	III
LISTE DES TABLEAUX .....	V
LISTE DES FIGURES .....	VI
INTRODUCTION GENERALE.....	1
 <b><i>PREMIERE PARTIE : ETUDE CHIMIQUE</i></b>	
<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>5</b>
<b>2 MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>5</b>
2.1 MATERIELS.....	5
2.1.1 Matériel végétal.....	5
2.1.1.1 Position systématique.....	5
2.1.1.2 Description botanique de <i>Conchopetalum madagascariense</i> .....	6
2.1.1.3 Répartition géographique de <i>Conchopetalum madagascariense</i> .....	6
2.1.1.4 Date et lieu de récolte.....	6
2.1.2 Les produits chimiques .....	9
2.2 METHODES .....	9
2.2.1 Méthodes de préparation et de conservation du matériel végétal.....	9
2.2.2 Méthodes d'extraction.....	9
2.2.2.1 Extraction à froid.....	9
2.2.2.2 Extraction à chaud.....	10
2.2.3 Méthodes de purification.....	10
2.2.3.1 Fractionnement par le n-butanol.....	10
2.2.3.1.1 Principe.....	10
2.2.3.1.2 Mode opératoire.....	10
2.2.3.2 Fractionnement par l'acétate d'éthyle.....	11
2.2.3.2.1 Principe.....	11
2.2.3.2.2 Mode opératoire.....	11
2.2.3.3 Dialyse.....	11

2.2.3.3.1 Principe.....	11
2.2.3.3.2 Mode opératoire.....	12
2.2.3.3.2.1 Préparation de la membrane à dialyse.....	12
2.2.3.3.2.2 Mise en marche de la dialyse.....	12
2.2.3.4 Précipitation par l'acétate neutre de plomb (ANP).....	13
2.2.3.4.1 Principe.....	13
2.2.3.4.2 Mode opératoire.....	13
2.2.4 Calcul du rendement.....	13
2.2.5 Méthode de concentration.....	13
2.2.6 Méthodes analytiques.....	14
2.2.6.1 Chromatographie sur couche mince.....	14
2.2.6.1.1 Principe.....	14
2.2.6.1.2 Mode opératoire.....	14
2.2.6.1.2.1 Dépôt de l'échantillon.....	14
2.2.6.1.2.2 Développement de la plaque.....	14
2.2.6.1.2.3 Révélation du chromatogramme.....	15
2.2.6.2 Réactions de détection des familles chimiques.....	15
2.2.6.2.1 Les alcaloïdes.....	15
2.2.6.2.1.1 Test de MAYER.....	15
2.2.6.2.1.2 Test de WAGNER.....	15
2.2.6.2.1.3 Test de DRAGENDORFF.....	16
2.2.6.2.2 Les tanins et les polyphénols.....	16
2.2.6.2.2.1 Test à la gélatine.....	16
2.2.6.2.2.2 Test à la gélatine salée.....	16
2.2.6.2.2.3 Test au chlorure ferrique.....	16
2.2.6.2.3 Les stéroïdes, les triterpènes et les stérols insaturés.....	17
2.2.6.2.3.1 Les stéroïdes et les triterpènes.....	17
2.2.6.2.3.2 Les stérols insaturés : Test de SALKOWSKI.....	17
2.2.6.2.4 Les flavonoïdes et les leucoanthocyanes.....	17
2.2.6.2.4.1 Les flavonoïdes : Test de WILSTATER.....	17
2.2.6.2.4.2 Les leucoanthocyanes : Test de BATE-SMITH.....	18
2.2.6.2.5 Les saponines (Test de mousse).....	18
2.2.6.2.6 Les désoxyoses : Test de KELLER-KILIANI.....	18
2.2.6.2.7 Les anthraquinones : Test de BORNSTRÄGER.....	18
2.2.6.2.8 Les irridoïdes.....	19
<b>3 RESULTATS.....</b>	<b>19</b>

3.1 EXTRACTION.....	19
3.1.1 Extraction à froid.....	19
3.1.1.1 Extraction aqueuse à froid.....	19
3.1.1.2 Extraction hydroéthanolique à froid.....	19
3.1.1.3 Extraction éthanolique.....	20
3.1.2 Extraction à chaud.....	20
3.1.2.1 Extraction aqueuse à chaud.....	20
3.2 PURIFICATION.....	21
3.2.1 Fractionnement par le n-butanol.....	21
3.2.2 Fractionnement par l'acétate d'éthyle.....	21
3.2.3 Dialyse.....	22
3.2.4. Précipitation par l'acétate neutre de plomb.....	22
3.3 RENDEMENT.....	23
3.4 DEGRE D'HOMOGENEITE DES DIFFERENTS EXTRAITS.....	24
3.5 CARACTERISATION CHIMIQUE.....	25
3.5.1 Propriétés physico-chimiques.....	25
3.5.2 Nature chimique.....	25
<b>4 DISCUSSION ET CONCLUSION.....</b>	<b>27</b>

## ***DEUXIEME PARTIE : ETUDE TOXICOLOGIQUE***

<b>1 INTRODUCTION.....</b>	<b>28</b>
<b>2 MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>28</b>
2.1 MATERIELS.....	28
2.1.1 Les animaux d'expérimentation.....	28
2.1.1.1 Les animaux à sang chaud.....	28
2.1.1.1.1 Les souris.....	28
2.1.1.1.2 Le sang de mouton.....	29
2.1.1.2 Les animaux à sang froid.....	29
2.1.1.2.1 Les têtards.....	29
2.1.1.2.2 Les larves de moustiques.....	29
2.1.1.2.3 Les alevins de poisson.....	29
2.1.2 Les végétaux d'expérimentation.....	29
2.1.3 Les microorganismes.....	30
2.1.3.1 Les souches microbiennes utilisées.....	30
2.1.3.2 Les milieux de culture.....	30
2.1.4 Les moyens de stérilisation.....	31

2.1.5 Les disques pour les tests d'antibiogramme.....	31
2.2 Méthodes.....	31
2.2.1 Méthodes d'étude des effets sur les animaux.....	31
2.2.1.1 Expériences sur les animaux à sang chaud.....	31
2.2.1.1.1 Test sur souris.....	31
2.2.1.1.1.1 Estimation de la toxicité.....	31
2.2.1.1.1.2 Détermination de la DL <sub>50</sub> (24 h).....	32
2.2.1.1.2 Test hémolytique sur les hématies de mouton.....	32
2.2.1.1.2.1 Principe.....	32
2.2.1.1.2.2 Mode opératoire.....	33
2.2.1.2 Expériences sur les animaux à sang froid.....	34
2.2.1.2.1 Principe.....	34
2.2.1.2.2 Mode opératoire.....	35
2.2.1.2.2.1 Les alevins de carpe et les têtards de grenouille.....	35
2.2.1.2.2.2 Les larves de moustique.....	35
2.2.1.2.3 Détermination de la concentration létale 50% (CL <sub>50</sub> 24h).....	35
2.2.2 Méthodes d'étude des effets sur les végétaux.....	36
2.2.2.1 Etude des effets sur le pouvoir germinatif des graines.....	36
2.2.2.2 Etude des effets sur la croissance des jeunes plantules.....	36
2.2.2.2.1 Principe.....	36
2.2.2.2.2 Mode opératoire.....	37
2.2.2.3 Etude des effets sur le développement des bourgeons axillaires.....	37
2.2.3 Méthodes d'étude des effets sur la croissance des microorganismes.....	38
2.2.3.1 Coloration de GRAM.....	38
2.2.3.1.1 Principe.....	38
2.2.3.1.2 Mode opératoire.....	39
2.2.3.1.2.1 Préparation et fixation du frottis microbien.....	39
2.2.3.1.2.2 Coloration.....	39
2.2.3.2 Activité en milieu solide des extraits sur les microorganismes.....	39
2.2.3.2.1 Principe.....	39
2.2.3.2.2 Mode opératoire.....	40
2.2.3.3 Détermination de la CMI.....	41
2.2.3.3.1 Détermination de la CMI en milieu solide.....	41
2.2.3.3.2 Détermination de la CMI en milieu liquide.....	41
2.2.3.3.2.1 Principe.....	41
2.2.3.3.2.2 Mode opératoire.....	42

2.2.3.4 Détermination de la CMB.....	42
<b>3 RESULTATS.....</b>	<b>43</b>
3.1 Effets des extraits sur les animaux.....	43
3.1.1 Effets sur les animaux à sang chaud.....	43
3.1.1.1 Effets sur la souris.....	43
3.1.1.1.1 Description des symptômes d'intoxication.....	43
3.1.1.1.2 Evaluation de la toxicité (DL <sub>50</sub> 24 h).....	43
3.1.1.2 Effets sur les hématies de mouton.....	45
3.1.2 Effets sur les animaux à sang froid.....	46
3.1.2.1 Effets sur les alevins de carpe.....	46
3.1.2.2. Effets sur les têtards de grenouille.....	47
3.1.2.3 Effets sur les larves de moustique.....	48
3.2 Effets des extraits sur les végétaux.....	49
3.2.1 Effets de l'extrait brut sur le pouvoir germinatif des graines.....	49
3.2.2. Effets de l'extrait brut sur la croissance des jeunes plantules.....	50
3.2.3 Effets de l'extrait brut et de l'extrait sur le développement des bourgeons axillaires.....	56
3.3 EFFETS DES EXTRAITS SUR LES MICROORGANISMES.....	57
3.3.1 Caractères d'identification morphologique.....	57
3.3.2 Activité en milieu solide des extraits sur les microorganismes.....	57
3.3.3 Détermination de la CMI.....	58
3.3.3.1 Détermination de la CMI par la méthode de diffusion en milieu solide.....	58
3.3.3.2 Détermination de la CMI en milieu liquide.....	60
3.3.4 Détermination de la CMB.....	60
<b>4 DISCUSSION ET CONCLUSION.....</b>	<b>61</b>
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	64
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	65
ANNEXES	

## **REMERCIEMENTS**

Le présent travail a été effectué au Laboratoire du département de Biochimie fondamentale et appliquée de la Faculté des sciences, de l'Université d'Antananarivo.

En tout premier lieu, nous remercions Dieu Tout-Puissant, pour la protection, la santé et le courage qu'Il nous a offerts durant la période de réalisation de nos travaux. A Lui seul la gloire, de tous les temps, passé, présent et pour toujours.

Nous exprimons nos chaleureux remerciements à Monsieur le professeur Victor JEANNODA, Chef de département de Biochimie fondamentale et appliquée, Responsable de la formation en 3<sup>ème</sup> cycle, encadreur de notre stage et rapporteur de ce mémoire pour ses conseils et son aide considérable dans l'élaboration et la finition de ce mémoire, malgré ses nombreuses responsabilités.

Nous témoignons nos sincères reconnaissances à Madame le Docteur Danielle A.D. RAKOTO-RANOROMALALA, Maître de conférences, co-encadreur de notre stage pour ses conseils et ses suggestions durant le stage ainsi que son apport précieux dans la réalisation du manuscrit, malgré ses nombreuses occupations.

Nous adressons notre profonde gratitude à Madame le professeur Louissette RAZANAMPARANY qui nous fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire malgré ses nombreuses tâches.

Nous tenons à remercier sincèrement Monsieur le professeur Marson RAHERIMANDIMBY et Monsieur le Docteur Daniel RAMAMONJISOA pour nous avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail malgré leurs multiples obligations.

Nous ne saurions oublier Monsieur le Docteur Ranjana H. RANDRIANARIVO qui nous a apporté une aide précieuse tout au long de ce travail dans le laboratoire du département de Biochimie fondamentale et appliquée de la Faculté des sciences d'Antananarivo.

Ce travail n'aurait pu être mené à terme sans l'appui de mes parents et de toute ma famille, leur affection, leur soutien moral, financier et matériel tout au long de mes études. Nous leur exprimons toute notre profonde reconnaissance. Que cet ouvrage et notre réussite soient le couronnement de leurs efforts.

Enfin, nos remerciements s'adressent à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

**LISTE DES ABREVIATIONS**

- **ANP** : Acétate neutre de plomb
- **BAE** : Butanol/Acide acétique/Eau distillée
- **CCM** : Chromatographie sur couche mince
- **C** : Concentration
- **CL<sub>50</sub>** : Concentration létale 50%
- **CMB** : Concentration minimale bactéricide
- **CMI** : Concentration minimale inhibitrice
- **Da** : Dalton
- **DL<sub>50</sub>** : Dose létale 50%
- **EB** : Extrait brut
- **IMVAVET** : Institut malgache des vaccins vétérinaires
- **IPM** : Institut Pasteur de Madagascar
- **ip** : intrapéritonéale
- **LABASM** : Laboratoire de Biochimie appliquée aux sciences médicales
- **min** : minute
- **OMS** : Organisation mondiale de la santé
- **PBZT** : Parc botanique et zoologique de Tsimbazaza
- **PBS** : Phosphate buffered saline
- **p/p** : Poids par poids
- **p/v** : Poids par volume
- **qsp** : quantité suffisante pour
- **UV** : ultraviolet
- **v/v** : volume par volume

**GLOSSAIRE**

**Analgésique** : qui diminue ou supprime la douleur.

**Antibiotique** : substance qui détruit les bactéries (bactéricide) ou s'oppose à leur multiplication (bactériostatique).

**Antimitotique** : se dit de tout agent chimique ou physique agissant sur la division cellulaire en la ralentissant ou en la bloquant.

**Apoptose** : mort cellulaire génétiquement programmée.

**Asthme** : maladie caractérisée par une difficulté à rejeter l'air des poumons, accompagnée de sécrétions importantes de mucus par les glandes des parois internes.

**Ataxie** : incoordination des mouvements volontaires musculaires, symptomatiques de certaines affections nerveuses.

**Convulsion clonique** : alternance de contraction et de relaxation des muscles.

**Coriace** : qui est dur comme du cuir.

**Décoction** : procédé consistant à faire bouillir une substance dans un liquide, pour extraire les principes solubles.

**Dicotylédones** : plantes Angiospermes dont la graine renferme un embryon à deux cotylédons.

**Eczéma** : affection cutanée caractérisée par des lésions érythémateuses prurigineuses et vésiculaires, évoluant par poussées.

**Enophtalmie** : position anormale du globe oculaire, situé plus profondément dans l'orbite que la normale.

**Epicotyle** : partie de la jeune plantule en germination située au-dessus de l'insertion du ou des cotylédons.

**Hyperhémie** : vasodilatation excessive des petits vaisseaux suite à une accumulation de sang dans ces derniers.

**Hypocotyle** : partie de la tige située à la base de la plantule et qui émerge la première de la graine lors de la germination.

**Métastase** : localisation dans un ou plusieurs points du corps de cellules ayant migré d'un foyer primitif infectieux, parasitaire ou cancéreux.

**Monocotylédones** : groupe de plantes Angiospermes caractérisées par un embryon à un seul cotylédon, des feuilles démunies de pétioles à nervures parallèles, à graine développée.

**Monoïque** : se dit d'une plante qui porte sur le même pied des fleurs mâles et des fleurs femelles.

**Prurit** : sensation de démangeaison provoquée par une lésion locale, ou symptomatique d'une maladie.

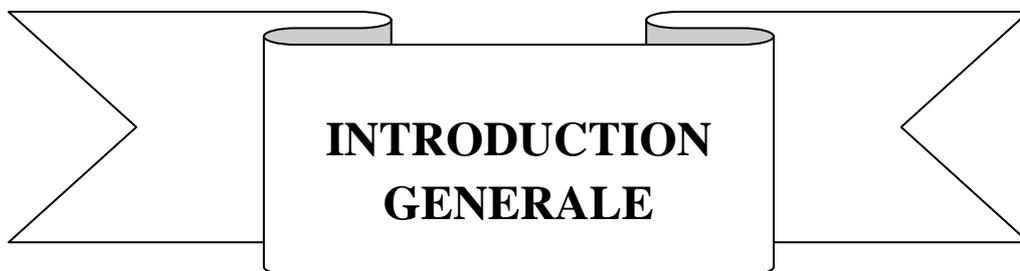
**Tachycardie** : accélération permanente du rythme cardiaque.

## LISTE DES TABLEAUX

	Pages
<b><u>Tableau 1</u></b> : Caractéristiques des extraits bruts obtenus par les différentes méthodes d'extraction.....	20
<b><u>Tableau 2</u></b> : Résultats du criblage phytochimique de l'extrait brut et de l'extrait E2.....	26
<b><u>Tableau 3</u></b> : Les végétaux d'expérimentation .....	30
<b><u>Tableau 4</u></b> : Composition du milieu pour le test hémolytique .....	34
<b><u>Tableau 5</u></b> : Normes utilisées pour l'expression des résultats des tests de diffusion sur gélose.....	41
<b><u>Tableau 6</u></b> : Résultats expérimentaux de la détermination de la DL <sub>50</sub> (24 h) de l'extrait sur souris.....	44
<b><u>Tableau 7</u></b> : Résultats expérimentaux pour l'estimation de la DL <sub>50</sub> (24 h) de l'extrait sur souris par la méthode graphique des totaux cumulatifs.....	44
<b><u>Tableau 8</u></b> : Activité hémolytique de différentes concentrations de l'extrait brut et de l'extrait sur les hématies de mouton.....	46
<b><u>Tableau 9</u></b> : Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur les alevins de carpe .....	47
<b><u>Tableau 10</u></b> : Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur les têtards de grenouille .....	48
<b><u>Tableau 11</u></b> : Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur les larves de moustique.....	48
<b><u>Tableau 12</u></b> : Effets de l'extrait brut à 1mg/ml sur la germination de diverses graines .....	50
<b><u>Tableau 13</u></b> : Caractéristiques morphologiques des souches utilisées.....	57
<b><u>Tableau 14</u></b> : Activité en milieu solide l'extrait brut et de l'extrait sur les germes testés par la méthode des disques.....	58
<b><u>Tableau 15</u></b> : Détermination de la CMI de l'extrait brut et de l'extrait sur <i>Vibrio harveyi</i> .....	59
<b><u>Tableau 16</u></b> : Détermination de la CMI de l'extrait brut en milieu liquide.....	60

**LISTE DES FIGURES**

	Pages
<b>Figure 1</b> : <i>Conchopetalum madagascariense</i> a) feuilles, b) fleurs, c) fruits.....	7
<b>Figure 2</b> : Distribution géographique de <i>Conchopetalum madagascariense</i> .....	8
<b>Figure 3</b> : Schéma récapitulatif du procédé d'extraction et de purification des principes toxiques d'écorces de branches de <i>Conchopetalum madagascariense</i> .....	23
<b>Figure 4</b> : Chromatographie sur couche mince dans le système BAE 60/20/20 (p/p/p) des différents extraits obtenus lors du procédé de purification.....	24
<b>Figure 5</b> : Détermination de la DL <sub>50</sub> (24 h) de l'extrait par la méthode graphique.....	45
<b>Figure 6</b> : Effet de l'extrait brut et de l'extrait sur les hématies de mouton.....	45
<b>Figure 7</b> : Schéma récapitulatif des différentes étapes des expériences sur les effets de l'extrait brut sur la croissance de jeunes plantules.....	51
<b>Figure 8</b> : Croissance des épicotyles de maïs en fonction du trempage.....	52
<b>Figure 9</b> : Croissance des hypocotyles de maïs en fonction du trempage.....	52
<b>Figure 10</b> : Croissance des épicotyles de petit pois en fonction du trempage.....	53
<b>Figure 11</b> : Croissance des hypocotyles de petit pois en fonction du trempage.....	53
<b>Figure 12</b> : Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur le développement de l'épicotyle de maïs.....	54
<b>Figure 13</b> : Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur le développement de l'hypocotyle de maïs.....	54
<b>Figure 14</b> : Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur le développement de l'épicotyle de petit pois.....	55
<b>Figure 15</b> : Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur le développement de l'hypocotyle de petit pois.....	55
<b>Figure 16</b> : Effets de l'extrait brut, de l'extrait, de la gibbérelline et de l'auxine sur la croissance des bourgeons axillaires.....	56
<b>Figure 17</b> : CMI de l'extrait et de l'extrait brut sur <i>Vibrio harveyi</i> en milieu solide.....	59



**INTRODUCTION  
GENERALE**

Depuis les temps les plus reculés, la principale préoccupation de l'homme a été la satisfaction de ses besoins alimentaires. Il a depuis longtemps développé une relation intime avec son milieu et appris, parfois à ses dépens, à connaître et exploiter les ressources végétales et animales nécessaires à sa survie.

Malgré les risques inhérents à leur utilisation, l'homme a toujours su tirer profit des propriétés toxiques de certains organismes pour diverses fins, comme la pêche, la lutte contre les animaux nuisibles, la guerre, l'élimination des ennemis ou le traitement de certaines maladies.

De nos jours, on sait qu'un grand nombre d'organismes unicellulaires ou pluricellulaires élaborent des substances toxiques d'une extrême hétérogénéité structurale, et de propriétés physico-chimiques et biologiques très variées. Ces substances, dénommées toxines après administration dans un organisme vivant, par quelque voie que ce soit, provoquent des troubles d'une ou de plusieurs fonctions de l'organisme, pouvant aller jusqu'à leur suppression ou à la mort.

Grâce à la toxicologie, science qui s'occupe des poisons, les connaissances sur les toxines d'origines diverses n'ont cessé d'être approfondies. Grâce à l'apport de diverses disciplines scientifiques comme la biochimie, la chimie, la médecine, la physiologie et la pharmacologie, la toxicologie a connu un essor considérable.

Dans l'état actuel des recherches scientifiques, plusieurs toxines ont pu être isolées et caractérisées sur le plan chimique et biologique. Elles ont été employées à des fins thérapeutiques et pour l'élucidation des phénomènes biologiques ou des voies métaboliques. On peut citer :

- la toxine tétanique ou tétaospasme, protéine isolée de la bactérie *Clostridium tetani*, qui a été un outil précieux dans l'exploration du fonctionnement du système nerveux central (BIZZINI, 1977) ;
- les antibiotiques, comme la pénicilline isolée du champignon *Penicillium notatum* et découverte par Alexander FLEMING le 03 Septembre 1928, utilisés contre les maladies infectieuses ;
- la morphine, extraite de la plante *Papaver somniferum*, utilisée comme analgésique (BRUNETON, 1993) ;
- la cobratoxine du serpent *Naja naja*, à activité analgésique puissante identique à celle de la morphine, utilisée dans le traitement de cancer au stade terminal (ROCHAT et coll., 1976 ; HABERMEHL, 1981) ;

- la toxine cholérique, isolée du bacille *Vibrio cholerae* qui est un activateur universel de l'adénylate cyclase. Elle a constitué un outil pour l'investigation des effets biologiques de l'AMPc et du mécanisme de régulation de ce messenger, ainsi que pour la mise en évidence de la structure et de la fonction des membranes cellulaires (BENNET et CUATRECASAS, 1977) ;

- la roténone, isolée de diverses Papilionacées, a considérablement contribué à la compréhension du fonctionnement de la chaîne respiratoire (MORELAND, 1980).

- la colchicine, alcaloïde d'une plante égyptienne, *Colchicum autumnale*, qui a une propriété antimitotique. Depuis plus de 50 ans, elle est aussi employée contre la goutte grâce à sa propriété de réduire les inflammations dues aux sels d'acide urique (BRUNETON, 1993).

Nous comprenons ainsi pourquoi la toxicologie moderne ne cesse de rechercher davantage de nouvelles toxines en vue de les caractériser chimiquement et à prospecter leurs propriétés biologiques, afin de pouvoir les exploiter à des fins utiles.

Madagascar peut être considéré comme un continent miniature. La diversité de ses climats et de ses sols a permis l'éclosion d'une flore riche qui a pu évoluer grâce à l'absence des grands herbivores présents en Afrique. On y dénombre actuellement plus de 12 000 espèces végétales dont 80% sont endémiques (RABESA, 1986).

Plusieurs d'entre elles, réputées toxiques, sont pourtant utilisées par des paysans dans la pharmacopée traditionnelle. A titre d'exemples, on peut citer :

- les feuilles d'*Albizia gummifer* (Fabacée) utilisées pour traiter les tumeurs de la gorge dans les régions de l'Ambongo et du Boina et les racines contre la toux sèche en cas de fatigue (RAKOTOBE et coll., 1993) ;

- les écorces de tronc et de racines de *Cabucala crytophella* (Apocynacée) de noms vernaculaires « andriambavifoxy, amanta », qui contiennent principalement des alcaloïdes. Cette plante pourrait donc avoir des vertus thérapeutiques assez considérables (BOITEAU, 1993) ;

- des appâts empoisonnés préparés avec les bulbes de *Rhodocodon madagascariensis* (Liliacée) ou le *Dipcadi heterocuspe* (Liliacée) utilisés pour éliminer les chiens errants, les souris et les rats (RAKOTO-RATSIMAMANGA, 1998) ;

➤ le « rotra » de Madagascar (*Eugenia jambalana* Lamarck), (Myrtacée) qui possède des propriétés hypoglycémiantes. Le principe actif responsable de cette propriété a été extrait (RAKOTO-RATSIMAMANGA, 1967) ;

➤ *Achyranthes aspera* (Amarantacée), appelée couramment « tsipolomanitra », qui contient de l'achyranthine, principe soluble dans l'eau à effet hypotenseur, modérateur cardiaque et vasodilatateur (BOITEAU, 1993) ;

➤ le décocté d'écorces d'*Albizia lebbek* (Fabacée) utilisé pour traiter les manifestations allergiques telles que l'asthme, l'eczéma ou le prurit (TRIPATHI et coll., 1979). Selon ANDRIANTSOA (1983), un principe actif toxique pour la souris et des composés bactéricides sont présents dans les graines de cette espèce.

Ainsi, afin de vérifier qu'une plante peut être exploitée sans risque ou possède des propriétés intéressantes, une étude toxicologique est capitale. C'est pour cette raison que le laboratoire de Biochimie appliquée aux Sciences médicales (LABASM), par le biais de son unité de recherche sur les toxines, s'est toujours intéressé aux plantes toxiques. Plusieurs plantes issues de diverses familles ont déjà fait l'objet d'une étude approfondie. On peut citer :

- une **EUPHORBIACEE**, *Croton mongue* (RALISON, 1987) ;
- une **BOLETACEE**, *Boletus affinis* Peck (RAZANAMPARANY, 1987) ;
- une **GENTIANACEE**, *Tachiadenus longiflorus* (RAKOTO-RANOROMALALA, 1989) ;
- une **SAPINDACEE**, *Deinbollia boinensis* (RAKOTOBE, 2003) ;
- une **LAURACEE**, *Ocotea madagascariensis* (RANDRIAMAHAVALISOA, 2003) ;
- une **SAPOTACEE**, *Mimusops commersonii* (RAMAMONJISOA–RAKOTOARIVELO, 2004) ;
- une **LILIACEE**, *Rhodocodon madagascariensis* (TOILIBOU, 2006) ;
- une **ANNONACEE**, *Xylopia humblotiana* (RASOLONDRABE, 2007) ;
- une **ARALIACEE**, *Schefflera longipedicellata* (RASOLOHARIJOANA, 2008) ;
- Des **FABACEES** : *Albizia lebbek* (ANDRIANTSOA, 1983) ; *Albizia arenicola* (RANDRIANARIVO, 1996, 2003 ; MOUNIDATI, 2009) ; *Albizia polyphylla* (RAJEMIARIMOELISOA, 1996 ; RAKOTONDROSOA, 2000) ; *Albizia species* (RAMAMONJISOA, 1998) ; *Albizia bernieri* (RAHARISOA, 1999) ; *Albizia boivini* (RAHERINIAINA, 1999) *Albizia odorata* (RAJEMIARIMOELISOA, 2000) ; *Albizia tulearensis* (RAONIHARISOA, 2003).

- Des **CONNARACEES** : *Rourea orientalis* (RAKOTO–RANONOROMALALA, 1984) ;  
*Cnestis glabra* et *Cnestis polyphylla* (JEANNODA, 1986) ;

- Des **CUCURBITACEES** : *Xerosicyos danguyi* (RAKOTONDRAZANAKA, 1999) ;  
*Xerosicyos perrieri* (RANDRIAMIHARISOA, 2000) ; *Odosicyos bosseri*  
(RAKOTONDRAZANAKA, 2003) ;

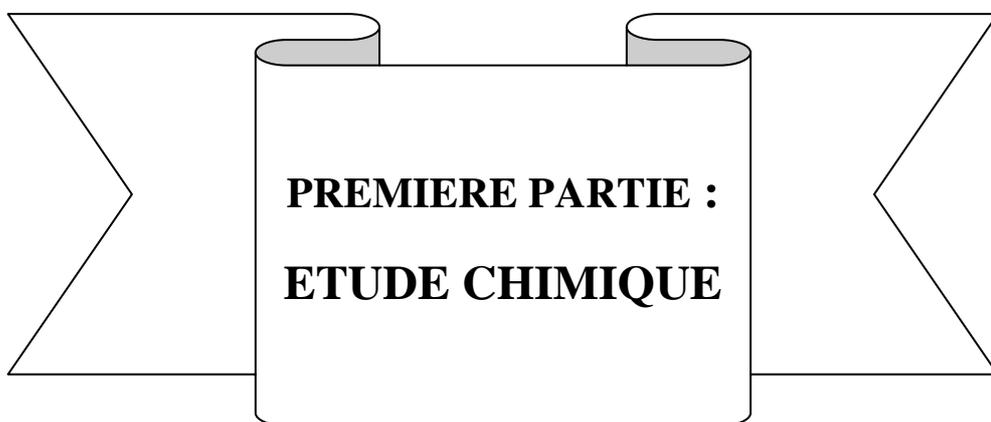
Pour notre part, notre choix s'est fixé sur les écorces de branches de *Conchopetalum madagascariense*, une Sapindacée, pour les raisons suivantes :

- d'après les enquêtes effectuées sur le lieu de récolte, les écorces de la plante sont utilisées comme **savon** par les paysans. Cette utilisation laisse croire qu'elles renferment des saponosides.

En effet, ces derniers possèdent des propriétés biologiques et pharmacologiques assez intéressantes. Des études ont montré qu'outre leur pouvoir hémolytique, les saponosides ont la capacité d'induire l'apoptose chez différents types cellulaires, ou encore inhiber la prolifération tumorale, voire les métastases (MOHAMED et coll., 2004). De plus, des extraits de marron d'Inde (*Aesculus hypocastanum*, une Sapindacée) ont été utilisés pour traiter des problèmes de circulation sanguine du fait des effets vasoconstricteurs des saponines ;

- l'espèce est endémique de Madagascar ;
- aucune étude préliminaire concernant les principes actifs contenus dans la plante n'a été entreprise.

Ce travail sera présenté en deux parties : la première sera consacrée à l'étude chimique comportant l'extraction et la purification des principes actifs, et la deuxième à celle des propriétés toxicologiques des extraits obtenus. Ces deux parties sont précédées d'une introduction générale et suivies d'une conclusion générale accompagnée des perspectives d'avenir.



**PREMIERE PARTIE :**  
**ETUDE CHIMIQUE**

## **1 INTRODUCTION**

D'après la littérature, aucune étude autre que botanique (SCHATZ, 2001) n'a encore été faite sur *Conchopetalum madagascariense*.

Des tests préliminaires sur souris ont permis de mettre en évidence une activité toxique dans les extraits des écorces de branches qui constituent le matériel de cette étude.

Ainsi, dans cette étude chimique nous nous sommes employé à :

- mettre au point un procédé d'extraction et de purification des principes toxiques ;
- étudier certaines de leurs propriétés physico-chimiques ;
- déterminer leur nature chimique.

## **2 MATERIELS ET METHODES**

### **2.1 MATERIELS**

#### **2.1.1 Matériel végétal**

##### **2.1.1.1 Position systématique de *Conchopetalum madagascariense***

La plante a été identifiée à l'herbarium du Parc botanique et zoologique de Tsimbazaza (PBZT). Elle y est répertoriée sous le numéro d'herbier 8818 MILLER J du 26 Octobre 1996.

**Classification** : (SCHATZ, 2001)

Règne : VEGETAL  
Embranchement : ANGIOSPERMES  
Classe : DICOTYLEDONES  
Ordre : SAPINDALES  
Famille : SAPINDACEAE  
Genre : *Conchopetalum*  
Espèce : *madagascariense*  
Noms vernaculaires : Savoninala, Savoniala, Hazoambo

### **2.1.1.2 Description botanique de *Conchopetalum madagascariense***

(SCHATZ, 2001; TROPICOS, 2008)

*Conchopetalum madagascariense*, présentée sur la figure 1 (p. 7) est un arbre monoïque atteignant 14 m de haut, aux axes des inflorescences munis de poils courts et simples. Les feuilles alternes composées imparipennées sont coudées à la base du pétiole et coriaces.

L'inflorescence est en grappes de grappes, ramiflores, les fleurs à 5 sépales rouge vif, 5 pétales libres, 3 ovaires loculaires avec 2 ovules par loge et 8 étamines rouges. Le fruit est une grande capsule sèche, tardivement déhiscente, profondément trilobée, légèrement gonflée, glabre avec un fin réseau de nervures saillantes.

### **2.1.1.3 Distribution géographique**

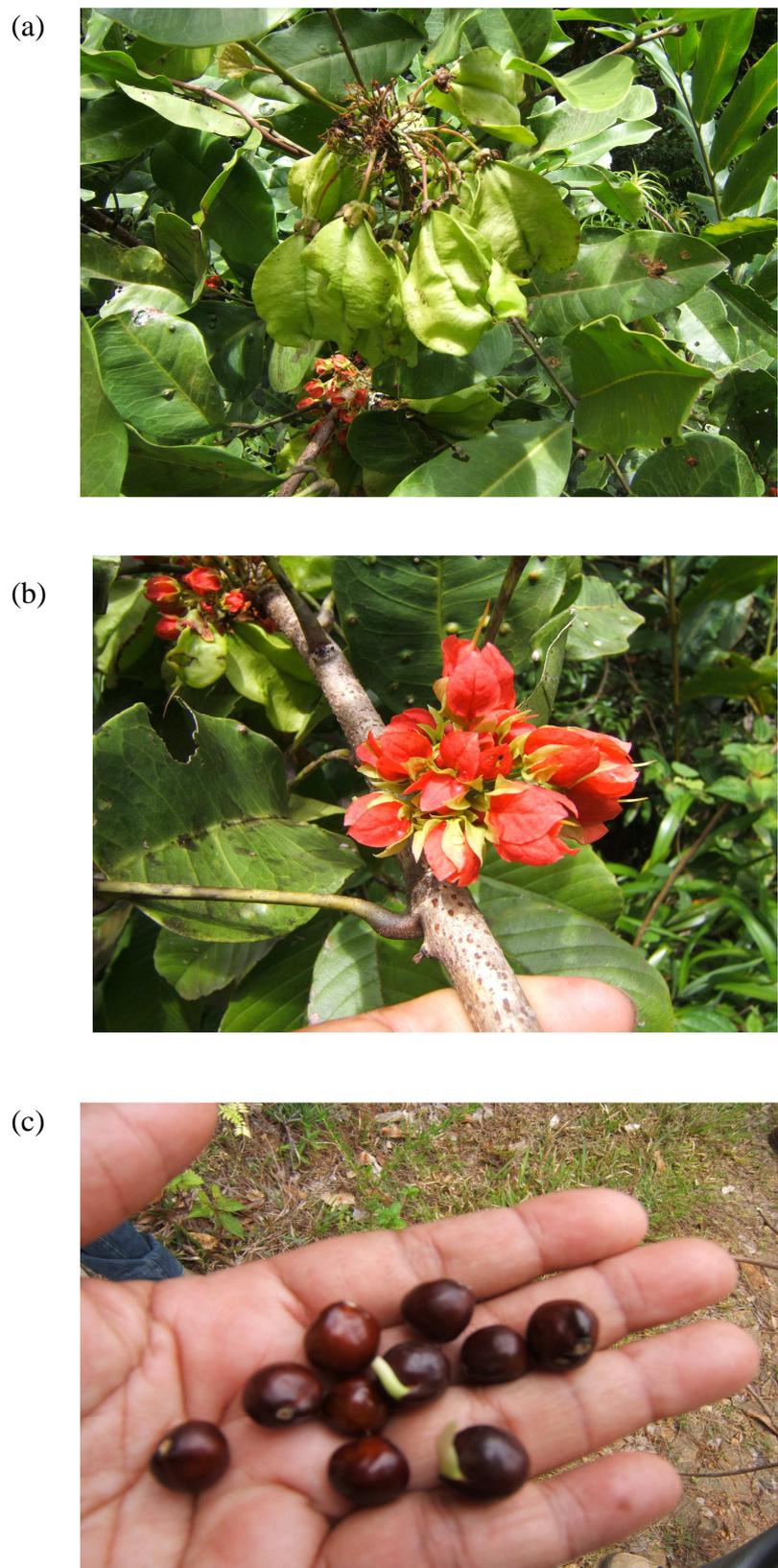
(SCHATZ, 2001 ; TROPICOS, 2008)

*Conchopetalum madagascariense* est une espèce endémique de Madagascar. Elle est distribuée principalement dans la région Atsinanana, à Toamasina et plus précisément dans la forêt dense d'Analalava, à 115km au sud-ouest de Foulpointe, à une altitude de 50 à 60 m.

Sa répartition géographique à Madagascar est montrée sur la carte de la figure 2 (p. 8).

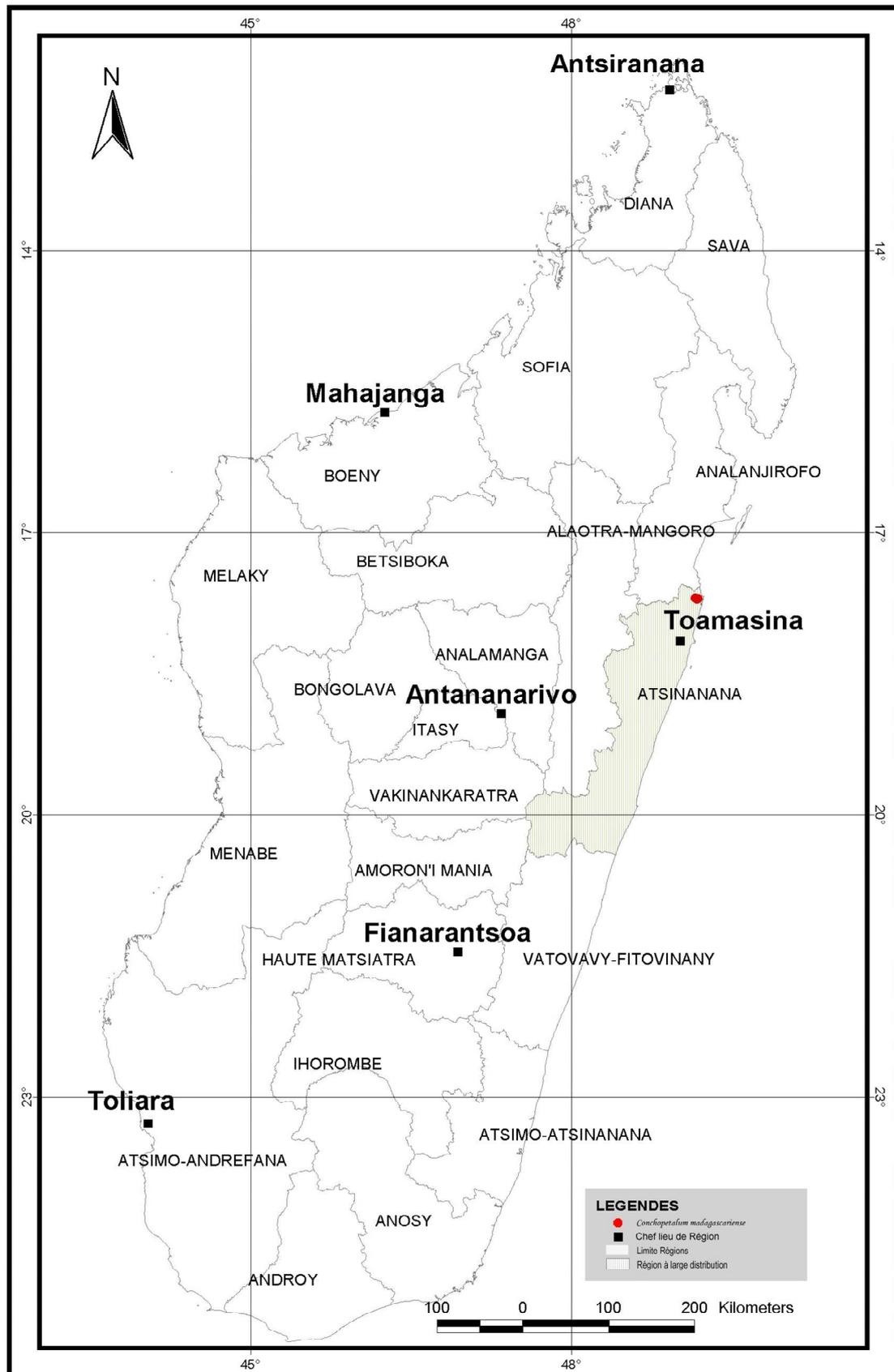
### **2.1.1.4 Date et lieu de récolte**

Les branches de la plante ont été récoltées en Octobre 2007 dans la forêt d'Analalava, Foulpointe, à 115 km au nord de Toamasina.



**Figure 1** : *Conchopetalum madagascariense*

a) Feuilles, b) Fleurs, c) Fruits



Source : Tropicos (2008)

**Figure 2** : Distribution géographique de *Conchopetalum madagascariense*

### **2.1.2 Les produits chimiques**

Les produits chimiques et les solvants organiques utilisés dans cette étude sont de qualité pour analyse et de marque MERCK, PROLABO.

Les supports utilisés pour la chromatographie sur couche mince sont des plaques de gel de silice 60 F<sub>254</sub> prêtes à l'emploi (marque MERCK) ; de dimensions : 20 x 20 cm (épaisseur de la couche : 0,2 mm), et pouvant être découpées selon les dimensions voulues.

## **2.2 METHODES**

### **2.2.1 Méthodes de préparation et de conservation du matériel végétal**

Les écorces de branches sont séchées à l'abri du soleil pendant quelques semaines. Elles sont ensuite broyées au moyen d'un broyeur de marque BLENDER (Robot Coupe GT 550), jusqu'à pulvérisation. Après tamisage, la poudre fine obtenue est conservée dans un bocal opaque hermétiquement fermé, à la température ambiante.

### **2.2.2 Méthodes d'extraction**

#### **2.2.2.1 Extraction à froid**

La poudre végétale est délayée dans le solvant d'extraction (eau distillée, éthanol, ou mélange hydroéthanolique 75%), suivant le rapport 1/10 (p/v) : (1 g de poudre est mélangé à 10 ml de solvant). Le mélange est soumis à une agitation magnétique pendant 3 h à la température ambiante, puis laissé macérer pendant une nuit à + 4°C. Le macérat est ensuite agité de nouveau pendant 30 min, puis filtré sur quatre épaisseurs de gaze afin d'éliminer le marc. Le filtrat ainsi obtenu est centrifugé à 10 000 tours/min pendant 15 min à + 5°C à l'aide d'une centrifugeuse JOUAN (modèle T52). Le surnageant est récupéré tandis que le culot est éliminé.

Pour l'extraction aqueuse, le surnageant est concentré tandis que pour les extractions hydroéthanolique et alcoolique, l'éthanol est éliminé par évaporation sous pression réduite (voir méthode au paragraphe 3.1 p. 19). Dans les deux cas, le volume final est ramené à 1 ml pour 1 g de poudre de départ (rapport 1/1, p/v).

### **2.2.2.2 Extraction à chaud**

La poudre végétale est mise en suspension dans le solvant d'extraction (eau distillée ou éthanol) dans le rapport 1/10 (p/v). Le mélange est chauffé à reflux pendant au moins 2 h, sous agitation magnétique et à la température d'ébullition du solvant d'extraction. Après refroidissement à la température ambiante, le décocté est laissé macérer pendant 12 h à + 4°C. La suite de l'opération (filtration, centrifugation, concentration) est la même que pour l'extraction à froid.

### **2.2.3 Méthodes de purification**

#### **2.2.3.1 Fractionnement par le n-butanol**

##### **2.2.3.1.1 Principe**

Des substances mises en présence de deux solvants non miscibles et de polarités différentes peuvent être séparées en fonction de leur solubilité relative vis-à-vis des solvants utilisés (MAHUZIER et HAMON, 1990 ; KAMOUN 1997 ; BRUNETON, 1993).

##### **2.2.3.1.2 Mode opératoire**

Un mélange volume à volume de l'extrait à traiter et de n-butanol est mis dans une ampoule à décanter. Le tout est agité énergiquement, puis laissé au repos jusqu'à séparation nette de deux phases : une phase supérieure organique et une phase inférieure aqueuse. La phase organique est recueillie tandis que la phase aqueuse subit de nouveau deux fractionnements successifs.

Les trois phases organiques rassemblées ainsi que la phase aqueuse sont filtrées séparément sur papier filtre afin d'éliminer les éléments insolubles. Pour chaque filtrat, le butanol est éliminé par évaporation, la phase organique étant préalablement additionnée d'un excès d'eau distillée. Les volumes des deux phases sont ramenés à celui de l'extrait à traiter. L'apparition éventuelle d'un précipité au cours de l'évaporation nécessite une centrifugation à 12 000 tours/min (centrifugeuse BREMSE, modèle TH12) pendant 15 min à + 5°C.

### **2.2.3.2 Fractionnement par l'acétate d'éthyle**

#### **2.2.3.2.1 Principe**

La séparation est basée sur la distribution d'une substance en fonction de son affinité relative vis-à-vis de deux solvants non miscibles (MAHUZIER et HAMON, 1990 ; KAMOUN, 1997).

#### **2.2.3.2.2 Mode opératoire**

La manipulation est la même que pour le fractionnement par le n-butanol, seulement, le solvant utilisé est l'acétate d'éthyle.

### **2.2.3.3 Dialyse**

#### **2.2.3.3.1 Principe**

(MAHUZIER et HAMON, 1990).

La dialyse est une technique de fractionnement des molécules en fonction de leur poids moléculaire à l'aide d'une membrane à pores calibrées, appelée membrane de dialyse.

Au cours de la dialyse, deux phénomènes se produisent :

- la diffusion ou dialyse proprement dite : sortie des substances diffusibles à travers la membrane de dialyse vers le liquide de contre-dialyse ;
- l'osmose : passage de l'eau de la solution la plus diluée vers la plus concentrée. Par conséquent, le volume de l'extrait dans le boudin augmente. Le phénomène s'arrête dès que l'équilibre de concentration est atteint entre les deux compartiments.

Pour maintenir une différence de concentration suffisante et pour accélérer la diffusion des substances, un volume important de liquide de contre-dialyse est nécessaire. De plus, celui-ci doit être renouvelé fréquemment.

La vitesse de la dialyse est influencée par la température, le volume de l'extrait à dialyser, le pH de ce dernier et celui du liquide de contre-dialyse.

### **2.2.3.3.2 Mode opératoire**

Le boudin à dialyse ou sac à dialyse utilisé est un cylindre en cellophane, de 3,3 cm de largeur (à plat). Il est perméable aux substances dont le poids moléculaire est inférieur à 6000–8000 Da.

#### ***2.2.3.3.2.1 Préparation de la membrane à dialyse***

Le boudin à dialyse contient une couche protectrice composée de glycérine, de composés sulfuriques et de métaux lourds qu'il faut préalablement éliminer en faisant bouillir la membrane dans de l'eau distillée pendant 15 min. Cette opération est répétée 3 fois. Après refroidissement, la membrane peut être conservée à + 4°C pendant quelques jours dans la dernière eau dans laquelle elle a été bouillie.

Avant utilisation, elle est à nouveau rincée à l'eau distillée.

#### ***2.2.3.3.2.2 Mise en marche de la dialyse***

L'extrait à dialyser est versé dans le boudin à dialyse dont une extrémité est fermée par un nœud simple. Un deuxième nœud est ensuite confectionné à l'autre extrémité en laissant un espace suffisant entre le niveau supérieur de l'extrait et ce deuxième nœud. Cette précaution est prise pour éviter l'éclatement de la membrane par augmentation du volume de l'extrait dans le boudin.

Le boudin ainsi préparé est immergé dans le liquide de contre-dialyse (eau distillée) de volume égal à 100 fois celui de l'extrait. Afin d'éviter la formation d'un gradient de concentration des substances diffusibles autour du boudin à dialyse, une agitation magnétique de l'ensemble est nécessaire. L'eau de contre-dialyse doit être renouvelée deux à trois fois afin d'accélérer la sortie des substances diffusibles dans le boudin et de maintenir la différence de concentration entre les deux milieux. La durée de la dialyse est d'environ 24 h.

A la fin de la dialyse, la solution à l'intérieur du boudin à dialyse (adialysat) ainsi que celle à l'extérieur (dialysat) sont concentrées par évaporation.

### **2.2.3.4 Précipitation par l'acétate neutre de plomb (ANP)**

#### **2.2.3.4.1 Principe**

Les sels des métaux lourds, comme l'ANP, ont la capacité de précipiter sous forme de sels insolubles de nombreuses macromolécules telles que les protéines, les polysaccharides, les acides nucléiques, ainsi que les acides organiques.

#### **2.2.3.4.2 Mode opératoire**

Une solution aqueuse d'ANP (20%) (p/v) de volume défini, est versée goutte à goutte sous agitation magnétique dans l'extrait à traiter. Le précipité formé est éliminé par centrifugation (centrifugeuse BREMSE, modèle TH12) à 12 000 tours/min pendant 5 min. Cette opération est répétée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de précipité, mais le volume de la solution d'ANP ne devrait pas dépasser 1% de celui de l'extrait.

L'ajout progressif d'une solution aqueuse de phosphate disodique à 10% (p/v) dans le surnageant est nécessaire pour éliminer l'excès de plomb sous forme de précipité. Celui-ci est écarté par centrifugation dans les mêmes conditions que précédemment. Le surnageant est concentré par évaporation.

### **2.2.4 Calcul du rendement**

L'extrait obtenu à chaque étape d'extraction ou de purification est évaporé à sec et le résidu correspondant est pesé. Le rendement correspond au pourcentage du poids du résidu par rapport à celui du matériel de départ. Il est calculé selon la formule :

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

### **2.2.5 Méthode de concentration**

Toutes les opérations de réduction de volume d'extraits et d'évaporation de solvants sont réalisées à l'aide d'un évaporateur rotatif BÜCHI (modèle Rotavapor R 110) à 60°C. La pression est réduite à l'aide d'une pompe à vide.

## **2.2.6 Méthodes analytiques**

### **2.2.6.1 Chromatographie sur couche mince**

#### **2.2.6.1.1 Principe**

La chromatographie sur couche mince est une méthode simple et rapide couramment utilisée pour tester l'homogénéité d'un extrait. Elle fait intervenir les phénomènes de partage et d'adsorption. Pendant leur migration sur un support adsorbant, les substances sont transférées d'une phase stationnaire polaire, la couche d'adsorbant, vers une phase mobile non polaire, le solvant.

La vitesse de migration des substances dépend de leur solubilité dans la phase mobile et des forces d'adsorption dues au support stationnaire (RANDERATH, 1964 ; AUDIGIE et coll., 1989 ; MAHUZIER et HAMON, 1990).

#### **2.2.6.1.2 Mode opératoire**

##### **2.2.6.1.2.1 Dépôt de l'échantillon**

Les extraits à analyser sont déposés au moyen d'un capillaire, sous forme de fins tirets horizontaux de 7 mm espacés de 6 mm, situés à 1,5 cm du bord inférieur de la plaque découpée aux dimensions voulues. Les tirets se situant aux deux extrémités de la ligne de dépôt sont placés à 1,3 cm de chaque bord latéral de la plaque. Chaque dépôt est tout de suite suivi d'un séchage à l'aide d'un séchoir à main.

##### **2.2.6.1.2.2 Développement de la plaque**

La plaque est ensuite placée dans une cuve à chromatographie (DESAGA), saturée en vapeurs de solvant. La saturation est obtenue par application de papier filtre imbibé du solvant de migration contre la paroi interne du récipient.

Pour notre étude, le solvant utilisé est le système : Butanol / Acide acétique / Eau distillée (ou BAE) 60/20/20/ (p/p/p).

Quand le front du solvant arrive à 0,5 cm du bord supérieur de la plaque, la chromatographie est arrêtée. La plaque est ensuite retirée de la cuve, puis séchée au séchoir à main.

### **2.2.6.1.2.3 Révélation du chromatogramme**

La plaque est révélée à l'aide de deux méthodes :

- 1<sup>ère</sup> méthode : Visualisation directe des substances ayant migré sous lumière ultraviolette (UV) à 254 nm et à 366 nm. Les constituants apparaissent sous forme de taches fluorescentes.

- 2<sup>ème</sup> méthode : Pulvérisation sur la plaque du réactif à la vanilline sulfurique. Ce réactif est composé de 0,5 g de vanilline en solution dans 100 ml d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 36 N. Les constituants apparaissent sous forme de taches rose-violacé qui brunissent après chauffage à 120°C pendant 5 min.

### **2.2.6.2 Réactions de détection des familles chimiques**

Pour chaque méthode de détection, le résidu d'évaporation à sec de 1ml d'extrait à analyser est utilisé.

#### **2.2.6.2.1 Les alcaloïdes**

(DALTON, 1979 ; CORDELL, 1981 ; BRUNETON, 1993)

Le résidu d'évaporation à sec de l'extrait à tester est mis à macérer dans 3 ml d'acide chlorhydrique (HCl) 2 N. La suspension obtenue est également répartie dans 4 tubes à essai dont le premier sert de témoin et les 3 autres sont utilisés pour la détection des alcaloïdes. Pour cela, les réactifs de MAYER, de WAGNER et de DRAGENDORFF sont utilisés.

Les compositions de ces réactifs sont données en annexe I

##### **2.2.6.2.1.1 Test de MAYER**

L'extrait acide du second tube est additionné de 5 gouttes de réactif de MAYER. La formation d'un précipité ou d'une floculation marque la présence d'alcaloïdes.

##### **2.2.6.2.1.2 Test de WAGNER**

La formation d'une floculation, après ajout de 5 gouttes de réactif de WAGNER dans le troisième tube, démontre la présence d'alcaloïdes.

### **2.2.6.2.1.3 Test de DRAGENDORFF**

Cinq gouttes de réactifs de DRAGENDORFF sont versées dans la suspension de l'extrait acide du dernier tube. Le résultat est positif s'il y a apparition d'un précipité.

Notons que si tous les précipités formés sont solubles dans 0,5 ml d'éthanol 80%, la présence d'alcaloïdes dans l'extrait est confirmée.

### **2.2.6.2.2 Les tanins et les polyphénols**

(HEMINGWAY et KARCHESY, 1989)

Le résidu d'évaporation à sec de l'extrait à étudier est dissous dans 3 ml d'eau chaude distillée. Le mélange obtenu est également réparti dans 4 tubes à essai. Le premier tube est utilisé comme témoin, les 3 autres sont destinés aux 3 différents tests ci-dessous.

#### **2.2.6.2.2.1 Test à la gélatine**

Le contenu du 2<sup>ème</sup> tube reçoit 4 gouttes de gélatine à 1% (p/v). L'apparition d'une floculation blanche indique la présence de tanins condensés de type catéchique dans l'extrait à analyser.

#### **2.2.6.2.2.2 Test à la gélatine salée**

La gélatine salée est composée de gélatine à 1% dans une solution de chlorure de sodium (NaCl) à 10%.

Cinq gouttes de gélatine salée sont versées dans le 3<sup>ème</sup> tube. La formation d'un précipité indique la présence des tanins hydrolysables de type pyrogallique.

#### **2.2.6.2.2.3 Test au chlorure ferrique**

Quatre gouttes de chlorure ferrique 10% en solution méthanolique sont ajoutées dans le 4<sup>ème</sup> tube. L'apparition d'un précipité de couleur vert-noir indique la présence de tanins de type catéchol, tandis qu'une coloration bleuâtre dénote la présence de tanins de type pyrogallol.

Une réaction négative aux tests à la gélatine salée ou non, accompagnée d'une coloration verte pour le test au chlorure ferrique, indique la présence d'autres composés phénoliques, au lieu des tanins.

### **2.2.6.2.3 Les stéroïdes, les triterpènes et les stérols insaturés**

(FONG et coll., 1977 ; NOHARA, 1989)

Le résidu sec est dissous dans 3 ml de chloroforme. Après l'avoir agité, le mélange est filtré puis distribué dans 3 tubes à essai dont le premier sert de témoin.

#### **2.2.6.2.3.1 Les stéroïdes et les triterpènes : test de LIEBERMANN-BÜRCHARD**

Le contenu du second tube est additionné de deux gouttes d'anhydride acétique. L'ensemble est agité légèrement, puis quelques gouttes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N sont ajoutées en inclinant le tube.

L'évolution de la coloration est observée pendant 1 h :

- si la coloration est verdâtre, des stéroïdes sont présents ;
- si un anneau rouge ou violet apparaît, des triterpènes sont présents.

Les deux phénomènes peuvent être observés simultanément.

#### **2.2.6.2.3.2 Les stérols insaturés : test de SALKOWSKI**

Du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré 4 N (1 ml) est versé dans le troisième tube à essai incliné à 45°C. L'apparition d'un anneau rouge au niveau de l'interface indique la présence des stérols insaturés.

### **2.2.6.2.4 Les flavonoïdes et les leucoanthocyanes**

Le résidu d'extrait à étudier est évaporé à sec et repris dans 10 ml d'éthanol 80%. La solution obtenue est ensuite répartie dans 4 tubes à essai : le premier contenant 1ml de solution sert de témoin et les 3 derniers tubes, contenant chacun 3 ml de solution, sont utilisés pour les tests.

#### **2.2.6.2.4.1 Les flavonoïdes : test de WILSTATER**

Le contenu du second tube à essai est additionné de 0,5 ml de HCl 12,07 N et de 2 tournures de magnésium.

Dans le troisième tube, 1 ml d'eau distillée et 1 ml d'alcool isoamylique sont additionnés.

La présence de flavonoïdes dans le second et le troisième tube est observée après 10 min. Elle se traduit par le changement de la coloration :

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

#### ***2.2.6.2.4.2 Les leucoanthocyanes : test de BATE-SMITH***

Dans le quatrième tube, 0,5 ml de HCL 12,07 N est ajouté, puis le tube est porté au bain-marie à 100°C pendant 30 min.

L'apparition d'une coloration rouge-violet après refroidissement, révèle la présence de leucoanthocyanes.

#### ***2.2.6.2.5 Les saponines (test de mousse)***

(FONG et coll., 1977)

Le résidu sec est dissous dans 1ml d'eau distillée. La solution aqueuse obtenue est agitée vigoureusement pendant 30 s. Si une mousse de 3 cm de hauteur apparaît et qu'elle persiste pendant 30 min, on note la présence des saponines dans l'extrait.

#### ***2.2.6.2.6 Les désoxyoses : test de KELLER-KILIANI***

(FONG et coll., 1977)

Dans un tube à essai, le résidu d'évaporation à sec est dissous dans 1 ml de solution aqueuse de chlorure ferrique à 10%. L'ensemble est additionné de 4 ml d'acide acétique glacial. Après agitation, le mélange est additionné de 0,5 ml de HCl 2 N en inclinant le tube à 45°C. La formation d'un anneau pourpre indique la présence de désoxyoses.

#### ***2.2.6.2.7 Les anthraquinones : test de BORNSTRÄGER***

Le résidu est mis en suspension dans 3 ml d'eau distillée et le mélange est filtré. Le filtrat obtenu est extrait avec 1 ml de benzène dans une ampoule à décanter puis agité énergiquement. Après décantation, la phase organique (phase supérieure) est recueillie dans un tube à essai et additionnée de 5 gouttes d'ammoniaque 25%.

Après agitation, le virage au rouge de la phase alcaline (phase inférieure) indique la présence d'anthraquinones dans l'extrait.

#### **2.2.6.2.8 Les irridoïdes**

Le résidu d'évaporation est repris dans 1 ml d'eau distillée. Le mélange obtenu est agité, puis ajouté de 0,5 ml de HCl concentré. Le tout est chauffé au bain-marie bouillant durant 30 min. La présence d'irridoïdes est marquée par la formation d'une coloration bleue, après refroidissement.

### **3 RESULTATS**

D'après des tests préliminaires, les écorces de branches de *Conchopetalum madagascariense* ont montré une toxicité sur souris.

Il a été observé que les principes toxiques de *Conchopetalum madagascariense* sont résistants à des températures élevées et à des opérations répétées de congélation et de décongélation. Par conséquent, les expériences ont été réalisées à la température ambiante, les opérations de concentration des extraits à 60°C et leur conservation à - 20°C.

#### **3.1 EXTRACTION**

Quatre méthodes ont été testées dans le but d'extraire au maximum les principes toxiques, et dans le souci d'obtenir un extrait brut facile à manipuler.

##### **3.1.1 Extraction à froid**

Trois types d'extraction ont été effectués (voir méthodes au paragraphe 2.2.2.1. p. 9).

###### **3.1.1.1 Extraction aqueuse à froid**

La poudre d'écorces (25 g) est mélangée à 250 ml d'eau distillée. Nous avons obtenu après réduction de volume du surnageant, 25 ml d'extrait brut (rapport 1/1, p/v).

Après centrifugation, une solution de couleur marron, fluide, limpide et de pH 5,18, est obtenue. Elle constitue l'extrait brut.

###### **3.1.1.2 Extraction hydroéthanolique à froid**

Les étapes de cette extraction sont les mêmes que celles de l'extraction aqueuse à froid précédente, mais le solvant d'extraction utilisé est le mélange hydroéthanolique 75%.

A partir de 25 g de poudre, nous avons obtenu 25 ml d'extrait brut (rapport 1/1, p/v), de couleur marron foncé, fluide, limpide et de pH 5,57.

### 3.1.1.3 Extraction éthanolique

25 g de poudre sont délayés dans 250 ml d'éthanol absolu, et le mélange est agité pendant 3 h à la température ambiante. La suite de l'extraction est la même que pour toutes les extractions à froid précédentes.

Un extrait brut de volume 25 ml (rapport 1/1, p/v), de couleur marron clair, fluide, limpide et de pH 5,29, est obtenu.

### 3.1.2 Extraction à chaud

#### 3.1.2.1 Extraction aqueuse à chaud

La poudre d'écorces (25 g) est délayée dans 250 ml d'eau distillée. Le mélange est chauffé à reflux selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.2.2 (p. 10).

Le surnageant obtenu est ensuite concentré jusqu'à un volume de 25 ml (rapport 1/1, p/v).

L'extrait brut ainsi obtenu est fluide, limpide, de couleur marron foncé et de pH 5,62.

Les résultats enregistrés pour ces différentes méthodes d'extraction sont consignés dans le tableau 1 ci-dessous, montrant les caractéristiques des différents extraits bruts.

**Tableau1** : Caractéristiques des extraits bruts obtenus par les différentes méthodes d'extraction

Méthode d'extraction	Aqueuse à froid	Hydroéthanolique 75% à froid	Ethanolique absolue à froid	Aqueuse à chaud
<b>Consistance</b>	Fluide	Fluide	Fluide	<b>Fluide</b>
<b>Aspect</b>	Limpide	Limpide	Limpide	<b>Limpide</b>
<b>Couleur</b>	Marron	Marron foncé	Marron clair	<b>Marron foncé</b>
<b>pH</b>	5,18	5,57	5,29	<b>5,62</b>
<b>Goût</b>	Peu amer	Aigre	Aigre	<b>Amer</b>
<b>Rendement (%)</b>	15,52	15,21	13,13	<b>15,4</b>
<b>Toxicité*</b>	1 h	49 min	43 min	<b>55 min à 1h</b>

\* Temps de survie moyen après administration de l'extrait

D'après ces résultats, les différents extraits bruts sont tous toxiques pour la souris. Cependant, la technique d'extraction aqueuse à chaud a été adoptée pour la suite des travaux pour les raisons suivantes :

- sous l'effet de la chaleur, de nombreux contaminants sont éliminés. Par ailleurs, les extraits ainsi obtenus sont stériles ;
- la méthode est moins coûteuse que les extractions éthanolique ou hydroéthanolique, même si les extraits bruts correspondant à ces deux techniques sont plus toxiques.

### **3.2 PURIFICATION**

Différentes techniques basées sur des propriétés telles que la solubilité ou le poids moléculaire, ont été essayées. Deux d'entre elles ont été retenues dans le procédé de purification. Mais toutes les méthodes de purification, même si certaines n'ont pas été retenues, seront rapportées ici car elles nous ont fourni des informations intéressantes sur les propriétés physico-chimiques des principes toxiques.

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

#### **3.2.1 Fractionnement par le n-butanol**

L'extrait brut (**EB**), de volume 25 ml, est mélangé à 25 ml de n-butanol. Trois fractionnements sont effectués selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.3.1 (p. 10).

Ni la phase aqueuse de couleur marron clair et limpide, ni celle organique de couleur jaunâtre, limpide également, ne sont toxiques sur souris. Cependant quelques symptômes d'intoxication ont été observés à savoir : une contorsion abdominale et une diminution progressive de l'activité motrice. Mais au bout de 24 h, les souris présentent un état physiologique normal.

Par conséquent, nous n'avons pas adopté cette technique de purification peu performante, car les principes actifs se partagent entre les deux phases.

#### **3.2.2 Fractionnement par l'acétate d'éthyle**

L'**EB** aqueux à chaud de volume 25 ml est traité 3 fois par l'acétate d'éthyle selon la technique décrite au paragraphe 2.2.3.2 (p. 11). Nous avons obtenu deux extraits :

- \* L'extrait organique limpide de couleur verdâtre clair, non toxique.

\* L'extrait aqueux de couleur marron foncé, limpide et toxique.

Cette technique constitue la première étape de purification et l'extrait aqueux est dénommé extrait **E<sub>1</sub>**.

### **3.2.3 Dialyse**

L'extrait **E<sub>1</sub>** (25 ml) est dialysé contre de l'eau distillée (2500 ml) (voir méthode au paragraphe 2.2.3.3 p. 11). D'après les résultats,

- le dialysat ou adialysat, c'est-à-dire le liquide restant dans le boudin, de couleur marron, limpide, fluide, est toxique chez les souris.
- Le dialysat, ou liquide de contre-dialyse de couleur marron clair, est non toxique sur les souris.

Cette étape a permis d'éliminer de nombreux contaminants d'après les résultats de la CCM des extraits. L'adialysat constitue alors l'extrait **E<sub>2</sub>**.

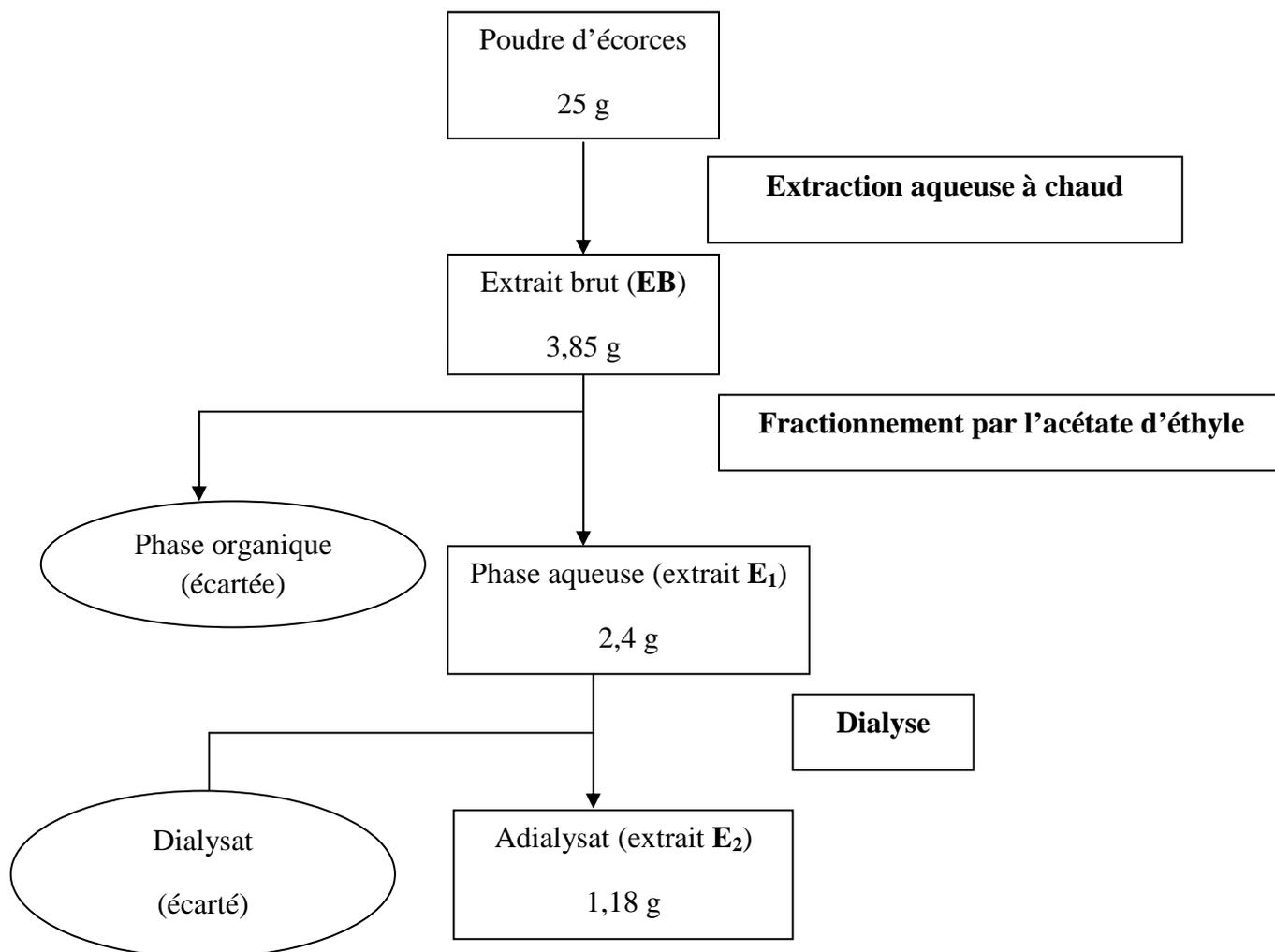
### **3.2.4. Précipitation par l'acétate neutre de plomb**

L'extrait **E<sub>2</sub>** de volume 5 ml traité avec 1 ml d'ANP 20%. L'excès de plomb est éliminé par 0,5 ml de phosphate disodique à 10% (voir paragraphe 2.2.3.4, p. 13). L'extrait est devenu incolore, mais n'a aucun effet sur les souris testées.

Ainsi, les principes toxiques ont été précipités par l'ANP. Ils ont donc des poids moléculaires assez élevés ou possèdent des groupements acides.

Cette technique n'a pas été adoptée dans le protocole de purification des principes toxiques.

Les différentes techniques retenues définitivement dans le procédé de purification des principes toxiques sont, dans l'ordre, le fractionnement par l'acétate d'éthyle et la dialyse. Elles sont résumées sur la figure 3 (p. 23).



**Figure 3:** Schéma récapitulatif du procédé d'extraction et de purification des principes toxiques d'écorces de branches de *Conchopetalum madagascariense*.

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

### 3.3 RENDEMENT

Les poids des résidus d'évaporation à sec de l'**EB** et de l'extrait **E<sub>2</sub>**, obtenus à partir de 25 g de poudre d'écorces sont respectivement de 3,85 g et 1,18 g.

Par conséquent, les rendements calculés en utilisant la formule donnée au paragraphe 2.2.4 (p. 13), sont les suivants.

Rendement d'extraction par rapport à la poudre d'écorces : 15,4%

Rendement de purification par rapport à **EB** : 30,65%

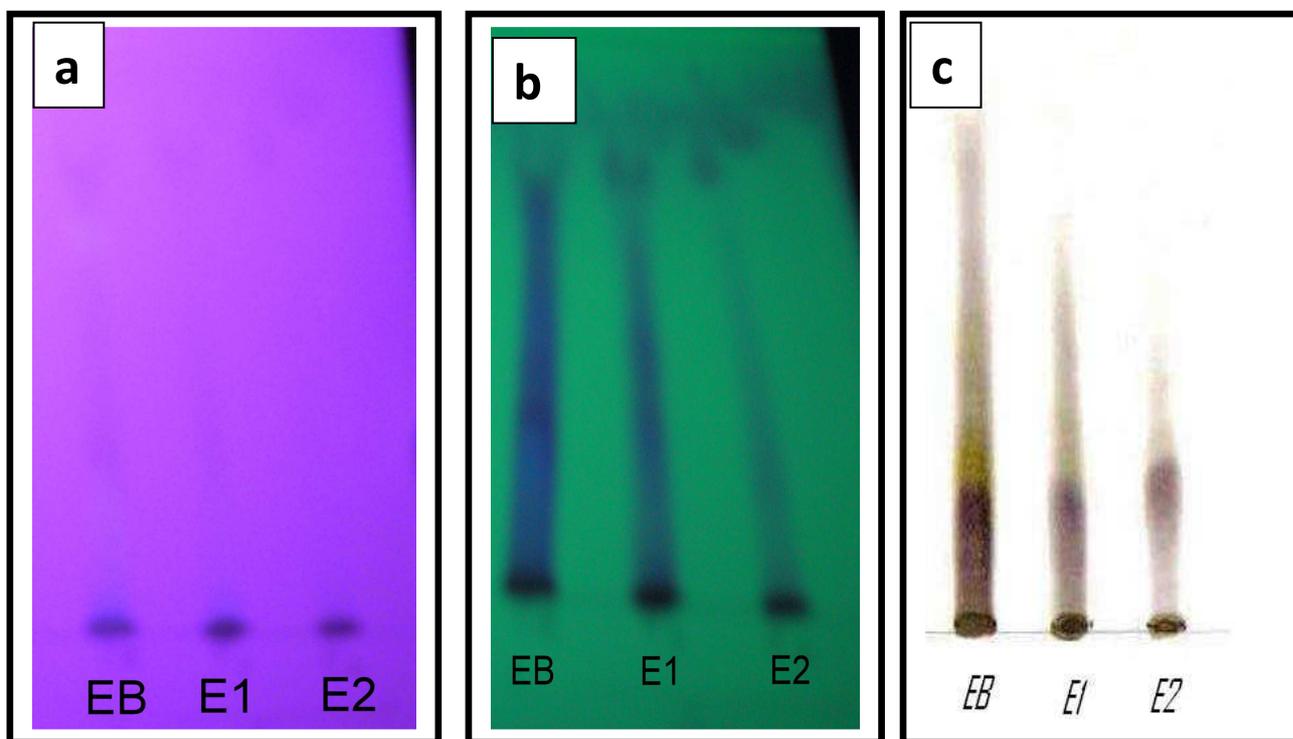
Rendement en toxines par rapport à la poudre d'écorces : 4,72%.

### 3.4 DEGRE D'HOMOGENEITE DES DIFFERENTS EXTRAITS

L'évolution de l'homogénéité des extraits au cours des étapes de purification a été appréciée par CCM. Les chromatogrammes sont d'abord visualisés sous la lumière ultraviolette à 254 nm, puis à 366 nm. A cette dernière longueur d'onde, des taches fluorescentes ont été observées. Une révélation par le réactif à la vanilline sulfurique est ensuite pratiquée.

**EB** présente 5 bandes majeures révélables à la vanilline sulfurique, alors que l'extrait **E2** n'en comporte que deux. Ainsi, la purification a permis d'éliminer 3 bandes majeures contaminantes.

Ces résultats sont montrés sur la figure 4 ci-dessous.



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

a) Révélation par observation sous UV à 254 nm, b) Révélation par observation sous UV à 366 nm, c) Révélation par le réactif à la vanilline sulfurique

**EB** : Extrait brut

**E<sub>1</sub>** : Phase aqueuse du fractionnement par l'acétate d'éthyle

**E<sub>2</sub>** : Adialysat

### 3.5 CARACTERISATION CHIMIQUE

#### 3.5.1 Propriétés physico-chimiques

Des propriétés physico-chimiques des principes toxiques contenus dans les écorces de tige de *Conchopetalum madagascariense* ont été déduites de leur comportement au cours de leur purification :

Ainsi, ils sont :

- thermostables, car ils résistent au chauffage à 96°C et à des opérations de congélation et décongélation répétées ;
- solubles dans les solvants polaires tels que l'eau ou l'éthanol ;
- insolubles dans les solvants peu polaires comme le n-butanol ou l'acétate d'éthyle ;
- précipitables par l'acétate neutre de plomb ;
- incapables de traverser la membrane de dialyse de seuil 6000-8000 Da ;
- de goût amer et de couleur marron.

#### 3.5.2 Nature chimique

Un criblage phytochimique dont les résultats sont récapitulés dans le tableau 2 (p. 26), a été effectué sur **EB** et l'extrait **E<sub>2</sub>** afin de cerner la nature chimique des principes toxiques.

**Tableau 2** : Résultats du criblage phytochimique de l'extrait brut et de l'extrait E<sub>2</sub>

Famille chimique	Test	Résultats	
		Extrait brut	Extrait E <sub>2</sub>
ALCALOÏDES	MAYER	-	-
	WAGNER	-	-
	DRAGENDORFF	-	-
Flavonoïdes	WILSTATER	-	-
Saponines	Test de mousse	+	+
Stérols insaturés	SALKOWSKI	+	+
Leucoanthocyanes	BATE-SMITH	-	-
Tanins	Gélatine 1%	-	-
	Gélatine salée	-	-
Polyphénols	Chlorure ferrique	-	-
Anthraquinones	BORNSTRÄGER	-	-
Triterpènes	LIEBERMANN-BÜRCHARD	-	-
Désoxyoses	KELLER-KILIANI	+	+
Irridoïdes		-	-

+ : test positif

- : test négatif

D'après ces résultats, **EB** ainsi que l'extrait **E<sub>2</sub>** ont réagi positivement aux tests des saponines, des désoxyoses et des stérols insaturés.

#### **4 DISCUSSION ET CONCLUSION**

Les résultats de l'étude chimique ont permis de mettre en évidence la présence de principes toxiques dans les écorces de branches de *Conchopetalum madagascariense*.

Plusieurs techniques d'extraction et de purification ont été essayées. A l'issue des différents essais, la méthode d'extraction à chaud a été choisie car elle donne un extrait brut toxique, non contaminé par des germes, peu coûteux et limpide, avec un rendement de 15,4%.

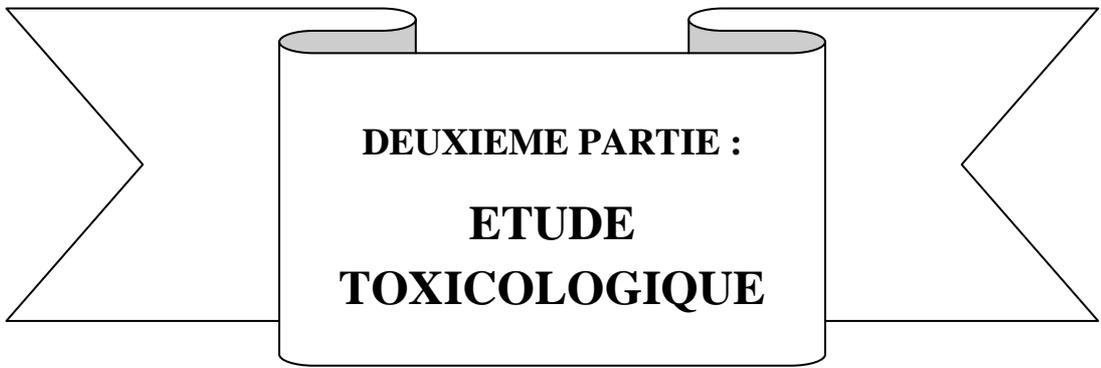
Deux d'entre les techniques de purification testées ont été retenues, à savoir le fractionnement par l'acétate d'éthyle et la dialyse. Elles constituent, dans l'ordre, les étapes du procédé de purification. Un extrait partiellement purifié est ainsi obtenu avec un rendement de purification de 30,65%, et un rendement en toxines de 4,72%.

Les principes toxiques sont thermostables, solubles dans les solvants polaires tels que l'eau et l'éthanol. Ils sont insolubles dans les solvants organiques comme le n-butanol et l'acétate d'éthyle.

Ils sont précipitables par les métaux lourds comme l'ANP. Ceci suggère qu'ils peuvent contenir dans leurs structures un groupement acide ou qu'ils ont un poids moléculaire élevé. Leur incapacité à passer au travers de la membrane de dialyse porte à penser qu'il pourrait s'agir de composés de poids moléculaire relativement élevé à moins qu'il n'y ait interférence (adsorption spécifique) avec la membrane de dialyse. D'autres techniques comme la filtration sur gel ou l'ultrafiltration, dans des conditions qui ne favorisent pas les interactions non spécifiques, peuvent être utilisées ultérieurement pour vérifier ce résultat.

Les résultats du criblage phytochimique de notre étude ont montré la présence dans les extraits de saponines, de désoxyoses et de stérols insaturés.

**En conclusion**, les écorces de branches de *Conchopetalum madagascariense* contiennent des principes toxiques qui pourraient être des saponosides, la génine étant un stérol insaturé. Ce qui explique leur utilisation comme savon par les paysans.



**DEUXIEME PARTIE :**  
**ETUDE**  
**TOXICOLOGIQUE**

## **1 INTRODUCTION**

L'étude chimique a permis de mettre en évidence la présence de principes toxiques dans les écorces de branches de *Conchopetalum madagascariense*. Dans cette partie, nous avons recherché les propriétés toxicologiques des principes actifs sur divers organismes animaux, végétaux et microbiens. Pour cela, nous avons étudié :

- ❖ les symptômes d'intoxication et l'effet-dose chez la souris ;
- ❖ le pouvoir hémolytique sur les hématies de mouton ;
- ❖ les effets sur les animaux à sang froid, en particulier les alevins de carpe, les têtards de grenouille et les larves de moustique ;
- ❖ les effets sur la germination des graines de différentes espèces de plantes Monocotylédones et Dicotylédones, ainsi que sur la croissance de jeunes plantules et le développement des bourgeons axillaires ;
- ❖ les effets sur la croissance des microorganismes.

Les expériences ont été effectuées sur l'extrait purifié **E<sub>2</sub>**, appelé « **extrait** » pour la suite des travaux. Les tests exigeant une quantité relativement importante d'extrait toxique ont été effectués avec l'extrait brut (**EB**).

## **2 MATERIELS ET METHODES**

### **2.1 MATERIELS**

#### **2.1.1 Les animaux d'expérimentation**

Les animaux utilisés se répartissent en 2 groupes : les animaux à sang chaud et les animaux à sang froid.

##### **2.1.1.1 Les animaux à sang chaud**

###### **2.1.1.1.1 Les souris**

Nous avons utilisé des souris blanches *Mus musculus* âgées de 7 à 8 semaines, de race TANA-SWISS stabilisée depuis plusieurs années à l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM). Ces souris proviennent de l'animalerie du département de Biochimie fondamentale et appliquée de la Faculté des sciences (Université d'Antananarivo).

#### **2.1.1.1.2 Le sang de mouton**

Pour le test hémolytique, du sang de mouton sain fourni par l'Institut malgache des vaccins vétérinaires, ou IMVAVET, d'Ampanandrianomby (Antananarivo), a été utilisé.

#### **2.1.1.2 Les animaux à sang froid**

##### **2.1.1.2.1 Les têtards**

Les têtards de grenouille (*Ptychadena mascareniensis*) utilisés pour les tests ont été capturés dans les rizières sises aux alentours du campus d'Ambohitsaina (Université d'Antananarivo). Ces animaux ont été capturés le jour même des tests.

##### **2.1.1.2.2 Les larves de moustique**

Les larves de moustique (*Culex quinquefasciatus*) utilisées ont été récoltées dans les rizières de l'Etablissement supérieur des sciences agronomiques, à Ankatso. Elles sont au stade trois avancé de leur développement.

##### **2.1.1.2.3. Les alevins de poisson**

Les alevins de poisson (*Cyprinus carpio*) ont été fournis par des pisciculteurs privés, agréés par la direction générale de la Pêche et des ressources halieutiques, localisée à Ampanandrianomby (Ministère de l'Agriculture, de l'élevage et de la pêche). Ils sont âgés de 4 semaines, et ont une longueur moyenne de 3,5 cm et un poids moyen de 0,67 g.

Avant les tests, ces alevins sont placés au moins une semaine dans un aquarium aéré, pour les adapter à leur nouvel habitat.

#### **2.1.2 Les végétaux d'expérimentation**

Des graines de plusieurs plantes Monocotylédones et Dicotylédones ont été utilisées. Mises en vente par AGRIVET (Antananarivo), elles ont été séchées, bien sélectionnées et conservées dans des emballages en aluminium bien scellés. Ces graines sont présentées dans le tableau 3 (p. 30).

**Tableau 3** : Les végétaux d'expérimentation

Classe	Famille	Nom scientifique	Nom usuel
DICOTYLEDONES	APIACEAE	<i>Daucus carotta</i>	Carotte
	ASTERACEAE	<i>Lactuca sativa</i>	Laitue
	BRASSICACEAE	<i>Brassica sp.</i>	Tissam blanc
	CUCURBITACEAE	<i>Cucumis sp.</i>	Concombre
		<i>Cucurbita pepo</i>	Courgette
	FABACEAE	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Haricot
		<i>Pisum sativum</i>	Petit pois
SOLANACEAE	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Tomate	
MONOCOTYLEDONES	POACEAE	<i>Oryza sativa</i>	Riz
		<i>Zea mays</i>	Maïs

### 2.1.3 Les microorganismes

#### 2.1.3.1 Les souches microbiennes

Les souches microbiennes utilisées pour les tests d'activité antimicrobienne des extraits toxiques étaient déjà disponibles au laboratoire de Microbiologie du département de Biochimie fondamentale et appliquée.

Il s'agit des bactéries *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi* et de *Staphylococcus aureus*. Leurs caractéristiques seront données plus loin (voir paragraphe 3.3.1 p. 57).

#### 2.1.3.2 Les milieux de culture

Nous avons utilisé trois milieux de culture dont les compositions sont données en annexe II. Il s'agit :

- du milieu de MUELLER-HINTON, de marque Liofilchem : un milieu solide employé pour l'étude de la sensibilité des germes classiques comme *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* et *Staphylococcus aureus* aux substances antibactériennes ;
- du milieu MARINE AGAR de marque Difco : un milieu solide utilisé comme base servant à l'isolement, la culture et la numération des bactéries halophiles telles que *Vibrio harveyi* et *Vibrio fischeri* (voir méthode au paragraphe 2.2.3.2 p. 39) ;

- du milieu ZOBELL : c'est un milieu liquide permettant le développement des bactéries telles que les vibrions (voir méthode au paragraphe 2.2.3.3.2 p. 41).

#### **2.1.4 Les moyens de stérilisation**

Ce sont :

- l'autoclave (WEBECO) : la stérilisation des milieux de culture, des disques d'antibiogramme ainsi que les cônes de micropipettes, se fait à l'aide de cet appareil, à 121° C pendant 20 min.
- l'étuve (JOUAN-B 463) : la verrerie (boîtes de Petri,...) est stérilisée à l'étuve pendant 15 min, à 185 °C.
- les filtres MILLIPORE (filtres à seringue stérile de 25 mm de diamètre) : de marque POLYLABO, et dont la dimension des pores est de 0,22 µm, permettant de stériliser les extraits.

#### **2.1.5 Les disques pour les tests d'antibiogramme**

Des disques stériles de 6 mm de diamètre, produits par BIOMERIEUX, ont été utilisés pour les tests d'antibiogramme.

## **2.2 METHODES**

### **2.2.1 Méthodes d'étude des effets sur les animaux**

#### **2.2.1.1 Expériences sur les animaux à sang chaud**

##### **2.2.1.1.1 Test sur les souris**

###### ***2.2.1.1.1.1 Estimation de la toxicité***

La toxicité est évaluée par injection de l'extrait à tester par voie intrapéritonéale (ip), à raison de 0,3 ml par 25 g de poids. Deux lots de deux souris de 25g ± 2g chacun, sont nécessaires pour le test. Un autre lot de deux souris de même poids sert de témoin. Les souris de ce dernier lot reçoivent chacune 0,3 ml d'eau physiologique.

### 2.2.1.1.1.2 Détermination de la $DL_{50}$ (24 h)

(REED et MUENCH, 1938)

La dose létale 50% ou dose qui provoque la mort de 50% des animaux testés pendant 24 h, est estimée selon la méthode de REED et MUENCH (1938). D'après cette méthode, la  $DL_{50}$  (24 h) peut être déterminée de deux façons :

- La première utilise la formule suivante :

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

Où : B = dose immédiatement inférieure à  $DL_{50}$

N = mortalité provoqué par la dose B

M = mortalité provoquée par la dose immédiatement supérieure à la  $DL_{50}$

R = raison de progression géométrique.

- La deuxième utilise la méthode graphique par laquelle la valeur de la  $DL_{50}$  (24h) est déterminée à partir de l'intersection des courbes des totaux cumulatifs des survivants et des morts en fonction des doses injectées.

Sept doses en progression géométrique d'extraits à tester sont nécessaires pour l'évaluation de la  $DL_{50}$  (24 h) sur sept lots de cinq souris de  $25 \pm 2$  g. L'extrait à tester est administré par voie ip sous un volume de 0,3 ml par 25 g de souris. Avant le test, les souris sont laissées à jeûn pendant 24 h.

### 2.2.1.1 2 Test hémolytique sur les hématies de mouton.

#### 2.2.1.1.2.1 Principe

Le test hémolytique est une technique basée sur la sédimentation des hématies intactes et sur la coloration rouge du surnageant en cas d'hémolyse due à une substance hémolytique donnée. Ce test permet de confirmer la présence de saponines dans un extrait, étant donné que ces dernières ont la capacité de lyser les membranes des hématies, libérant alors l'hémoglobine.

#### **2.2.1.1.2.2 Mode opératoire**

Une suspension de sang frais de mouton défibriné est utilisée. Trois à quatre lavages successifs sont effectués en mélangeant la suspension du sang avec du sérum physiologique, puis en centrifugeant à 10 000 tours/min (centrifugeuse JOUAN, modèle T52) pendant 5 min. A chaque lavage, le culot est récupéré tandis que le surnageant est éliminé par aspiration. Le culot du dernier lavage constitue les hématies à 100%, lorsque le surnageant est devenu clair.

Le mélange volume à volume du culot avec du sérum physiologique permet d'obtenir une suspension d'hématies à 50%. 0,2 ml de ces dernières sont ajoutées à 4,8 ml de tampon « phosphate buffered saline » (PBS). Cela permet d'obtenir une suspension d'hématies à 2%.

La composition du PBS est présentée en annexe III.

Différentes concentrations d'extrait à tester sont obtenues par dilution en cascade de l'extrait à tester avec du PBS (coefficient de dilution 1/2). 50µl d'extrait à tester sont versés dans chaque cupule d'une microplaque à fond « U ». La suspension d'hématies à 2% obtenue précédemment est ajoutée dans les cupules à raison de 50 µl par cupule.

Deux témoins sont préparés :

- un témoin positif (T<sup>+</sup>) : 50µl d'eau distillée avec 50 µl d'hématies à 2%. Ce mélange présente une hémolyse.
- un témoin négatif (T<sup>-</sup>) : 50 µl de PBS avec 50 µl d'hématies à 2%. Aucune hémolyse n'apparaît.

Le tableau 4 (p. 34) montre la composition du milieu pour le test hémolytique.

**Tableau 4** : Composition du milieu pour le test hémolytique

N° des cupules	T+	T -	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentration de l'extrait à étudier (mg/ml)	0	0	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,007	0,004	0,002
Eau distillée (µl)	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PBS (µl)	0	50	0	25	37,5	43,75	46,87	48,44	49,22	49,61	49,81	49,91
Volume d'extrait (µl)	0	0	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,19	0,09
Hématies à 2% (µl)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Volume final du mélange (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

La microplaque est incubée à l'étuve à 37°C pendant 3 h, ensuite à + 4°C durant une nuit.

La lecture du résultat se fait à l'œil nu :

- S'il y a hémolyse, la solution demeure colorée en rouge ;
- En absence d'hémolyse, la solution devient incolore avec un culot d'hématies au fond du puits ;
- Une hémolyse partielle est observée lorsque la solution reste colorée en rouge, mais présente un culot d'hématies au fond du puits.

### 2.2.1.2. Expériences sur les animaux à sang froid

(BARBIER et coll. ; 1974)

#### 2.2.1.2.1. Principe

L'expérience consiste à tester la résistance des animaux aquatiques face à une intoxication de leur milieu par l'extrait à étudier.

En effet, chez les animaux aquatiques comme les poissons, la voie majeure de pénétration des produits toxiques est le mince épithélium semi-perméable des branchies au niveau duquel s'effectuent les échanges entre l'eau extérieure et le sang. Ainsi, suite à l'addition de toxine dans

le milieu, l'animal se trouve en contact direct avec cette dernière et des signes d'intoxication sont rapidement observés.

#### **2.2.1.2.2 Mode opératoire**

##### ***2.2.1.2.2.1 Test sur les alevins de carpe et les têtards de grenouille***

Sept des lots d'animaux (alevins de carpe ou têtards de grenouille) de même âge sont testés. Ils sont placés dans des cristallisoirs contenant 200 ml d'eau de pluie. L'extrait à étudier y est ajouté de manière à avoir des concentrations en progression géométrique de raison  $r$ . Ces concentrations ont été déterminées par des tests préliminaires. Un autre lot d'animaux placés dans de l'eau de pluie sert de témoin. La durée de l'expérience est de 24 h.

##### ***2.2.1.2.2.2 Test sur les larves de moustique***

(OMS, 1970)

Six lots de larves au stade trois de développement sont utilisés pour le test. Ces larves sont réparties dans des cristallisoirs contenant 100 ml d'eau de source. L'extrait à tester y est ajouté de manière à avoir des concentrations en progression géométrique de raison  $r$ . Un autre lot de larves placé dans de l'eau de source sans extrait sert de témoin.

Les résultats sont observés après 24 h.

Le pourcentage de mortalité à chaque concentration est calculé en additionnant le nombre de larves moribondes et celui de larves mortes.

On qualifie les larves de :

- mortes quand, touchées avec une aiguille dans la région cervicale, elles ne bougent plus ;
- moribondes, quand elles sont incapables de remonter en surface ou de plonger quand on agite l'eau.

##### **2.2.1.2.3 Détermination de la concentration létale 50% (CL<sub>50</sub>) 24 h**

(BOYD, 1966)

La CL<sub>50</sub> (24 h) ou la concentration qui tue 50% des animaux testés en 24 h, est déterminée par une méthode graphique, utilisant la régression linéaire de la relation :

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

Où C : Concentration en mg/ml

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

Où Y : pourcentage de mortalité

A : une constante

B : coefficient de la régression

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

### **2.2.2 Méthodes d'étude des effets sur les végétaux**

Avant toute utilisation, les graines utilisées dans tous les tests sont désinfectées par trempage dans l'eau de javel 10% (v/v) pendant 5 min, puis rincées à l'eau.

Trois expériences ont été réalisées pour observer les effets de l'extrait à étudier sur les plantes.

#### **2.2.2.1. Etude des effets sur le pouvoir germinatif des graines**

Pour tester les effets de l'extrait à tester sur le pouvoir germinatif, on examine la capacité des graines à germer en sa présence.

Pour chaque espèce étudiée, deux lots de 10 graines sont trempés en parallèle dans de l'eau de robinet durant 48 h, à l'obscurité et à 30°C.

Après ce trempage, le premier lot, servant de témoin, est mis à germer sur du coton imbibé d'eau dans une boîte de Petri, et le deuxième sur du coton imprégné de l'extrait à tester de concentration déterminée dans une autre boîte de Petri.

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

#### **2.2.2.2 Etude des effets sur la croissance des jeunes plantules**

L'expérience est menée sur les jeunes plantules d'un représentant des Monocotylédones et d'un représentant des Dicotylédones.

##### **2.2.2.2.1 Principe**

C'est une technique qui consiste à observer les effets de l'extrait à tester à différentes concentrations sur le développement des épicotyles et des hypocotyles des plantules, en les comparant avec ceux des graines non traitées servant de témoins.

#### **2.2.2.2 Mode opératoire**

Neuf lots de dix graines sont utilisés pour chaque espèce. Ils sont séparés en deux groupes :

- Le premier comprend deux lots de graines trempées dans l'extrait à tester à une concentration déterminée, puis placées dans l'obscurité pendant 48 h à 30° C.
- Le deuxième est composé de sept lots trempés dans l'eau de robinet et placés dans les mêmes conditions que précédemment.

Après ce trempage, les deux lots de graines de chaque espèce trempés dans l'extrait à étudier sont lavés à l'eau. Puis, l'un des lots est mis à germer sur du coton imbibé du même extrait, tandis que l'autre est placé sur du coton imprégné d'eau de robinet.

Six parmi les sept lots trempés dans l'eau du deuxième groupe sont mis à germer sur du coton imbibé d'extrait à tester à six concentrations différentes.

Le dernier lot servant de témoin est mis à germer sur du coton imbibé d'eau.

Pour apprécier les effets des différentes concentrations sur la croissance des jeunes plantules, la mesure de la longueur des épicotyles et des hypocotyles est effectuée tous les deux jours pendant deux semaines.

#### **2.2.2.3 Etude des effets sur le développement des bourgeons axillaires**

(HELLER et coll., 1995)

Les effets des extraits sur le développement des bourgeons axillaires des jeunes plantules sont comparés à ceux de deux hormones végétales : la gibbérelline et l'auxine. La gibbérelline, par son action stimulante sur le métabolisme et les synthèses, stimule la croissance des bourgeons axillaires. Par contre, l'auxine qui participe surtout au phénomène de dominance apicale, ne favorise pas la croissance des bourgeons axillaires.

L'expérience est réalisée sur un lot de cinq jeunes plantules de petits pois (*Pisum sativum*), âgées de six jours. Ces dernières ont été obtenues après trempage, germination et croissance des graines en présence d'eau de robinet. Elles sont préalablement décapitées au-dessus du deuxième bourgeon axillaire.

La substance à tester, mélangée avec de la lanoline, est appliquée sur la partie sectionnée des plantules, à raison de 1 µl de solution par application. Parmi les cinq jeunes plantules :

- une reçoit de la lanoline mélangée avec 1 µl d'eau distillée (témoin) ;
- une deuxième servant de témoin négatif reçoit 50 µg d'auxine ;
- une autre, utilisée comme témoin positif, reçoit 50 µg de gibbérelline ;

- Les deux dernières reçoivent chacune 50 µg d'extrait à tester.

L'expérience est réalisée en double.

Les résultats sont observés pendant deux semaines en arrosant les plantules avec de l'eau de robinet et en mesurant la longueur des bourgeons axillaires tous les deux jours.

### **2.2.3 Méthodes d'étude des effets sur la croissance des microorganismes**

Les effets sur les microorganismes sont étudiés selon les méthodes microbiologiques usuelles, à savoir :

- l'appréciation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion en milieu solide ou méthode des disques ;

- la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu liquide puis en milieu solide

- la détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).

Les germes-tests sont caractérisés par la coloration de Gram.

#### **2.2.3.1 Coloration de GRAM**

(SINGLETON, 1994 ; MEYER et coll., 2000 ; LE MINOR et VERON, 1989)

##### **2.2.3.1.1 Principe**

La paroi bactérienne peut être plus ou moins perméable à certains colorants. Ainsi, lors d'un processus de coloration, le colorant cristal violet lié à la paroi cellulaire des bactéries forme, après action de l'iode, un complexe « colorant-iode ». On distingue alors les bactéries GRAM positif et les bactéries GRAM négatif. En ce qui concerne les bactéries GRAM positif, les décolorants comme l'alcool ou l'acétone ne sont ni capables de dissoudre le complexe « colorant-iode », ni de l'éliminer. Dans ce cas, la cellule garde une coloration bleu-violet. Par contre, pour les bactéries GRAM négatif, le complexe « colorant-iode » est dissous et la cellule bactérienne est colorée en rose par un colorant de contraste (la safranine).

Cette division en deux groupes repose sur les différences de composition des parois cellulaires bactériennes.

### **2.2.3.1.2 Mode opératoire**

#### **2.2.3.1.2.1 Préparation et fixation du frottis microbien**

Une partie de colonie du germe à étudier, prélevée à l'aide d'une anse de platine, est mise en suspension dans 3 gouttes d'eau distillée. Un prélèvement de la suspension ainsi obtenue est déposé sur une lame propre. Le frottis obtenu est séché à l'air et à côté de la flamme d'un bec Bunsen, puis fixé par trois passages rapides sur la flamme.

#### **2.2.3.1.2.2 Coloration**

La préparation est colorée à l'aide du cristal violet pendant une minute. La lame est ensuite recouverte d'une solution de lugol-PVP (polyvinylpyrrolidone) pendant une minute pour faire disparaître l'éclat métallique dû au cristal violet. La lame est ensuite décolorée par l'alcool/acétone pendant durant 30 s.

Après rinçage à l'eau, la lame est recolorée par la fushine de Ziehl pendant une minute. Elle est de nouveau lavée à l'eau, puis séchée entre deux couches de papier buvard.

Le frottis ainsi préparé est finalement recouvert de 3 gouttes d'huile d'immersion et observé sous microscope optique (OLYMPUS CH 20) au fort grossissement (G x 1 000) :

- Les bactéries GRAM positif sont colorées en violet.
- Les bactéries GRAM négatif sont colorées en rose.

Les compositions des colorants utilisés sont données en annexe IV.

#### **2.2.3.2 Activité en milieu solide des extraits sur les microorganismes**

Pour déterminer la sensibilité des souches aux agents antimicrobiens, la méthode de diffusion en gélose ou méthode des disques a été appliquée et les milieux utilisés sont celui de MUELLER-HINTON pour *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhi* et le milieu MARINE AGAR pour *Vibrio harveyi* et *Vibrio fischeri* (voir paragraphe 2.1.3.2 p. 30).

##### **2.2.3.2.1 Principe**

A la surface d'un milieu solide uniformément ensemencé avec le germe à étudier, un antibiotique déposé sur un disque diffuse au sein de la gélose en créant une zone circulaire. Dans cette dernière, les concentrations de l'antibiotique diminuent vers la périphérie et l'activité antimicrobienne est caractérisée par l'apparition d'un halo d'inhibition autour du disque

préalablement imprégné d'antibiotique. Le diamètre de ce halo est fonction du degré de sensibilité du germe vis-à-vis de l'antibiotique (DUVAL et SOUSSY, 1990 ; FERRON, 1994).

#### **2.2.3.2.2 Mode opératoire**

Le test se déroule pendant trois jours successifs :

##### **Premier jour : Préparation des milieux, repiquage des souches**

Le milieu adéquat (MUELLER-HINTON ou MARINE AGAR) est préalablement préparé (voir annexe II). Il est coulé dans des boîtes de Petri stériles et au tiers de celles-ci pour y repiquer la souche.

La souche pure à étudier est repiquée sur le milieu gélosé approprié coulé dans une boîte de Petri et à l'aide d'une anse de platine stérile, selon la technique d'épuisement.

Ensuite, les boîtes de Petri contenant les germes *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* et *Staphylococcus aureus* sont incubées à 37°C à l'étuve pendant 24 h. Les autres (*Vibrio harveyi* et *Vibrio fischeri*) sont laissés à la température du laboratoire pendant 48 h.

##### **Deuxième jour : Préparation de l'inoculum, ensemencement et dépôt**

Après l'incubation, une ansée de colonie de la souche à étudier est prélevée et mise en suspension dans un tube à essai contenant 10 ml de sérum physiologique. Une dilution doit être effectuée de manière à obtenir 10<sup>6</sup> bactéries/ml.

La suspension diluée est ensemencée dans des boîtes de Petri contenant le milieu gélosé adéquat, selon la technique d'inondation. Les boîtes ensemencées sont laissées pendant quelques minutes pour permettre aux bactéries de bien se fixer à la surface du milieu de culture. Après que les germes s'y sont bien adhérents, l'excès d'inoculum est aspiré avec une pipette stérile.

Les disques d'antibiogramme stériles sont ensuite déposés à la surface du milieu ensemencé, à l'aide d'une pince fine stérile. Les extraits à tester préalablement stérilisés par filtration sur filtre MILLIPORE, sont alors déposés sur les disques à raison de 10 µl par disque.

Enfin, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 h pour *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, et à la température ambiante pendant 48 h pour *Vibrio harveyi* et *Vibrio fischeri*.

### **Troisième jour : Lecture des résultats**

L'appréciation de l'activité antimicrobienne des extraits étudiés se fait par mesure du diamètre du halo d'inhibition formé autour du disque.

Les normes utilisées pour l'expression des résultats des tests de diffusion sur gélose sont présentées dans le tableau ci-dessous. Il s'agit des normes de l'IPM.

**Tableau 5:** Normes utilisées pour l'expression des résultats des tests de diffusion sur gélose

<b>Diamètre du halo d'inhibition (x)</b>	<b>Degrés de sensibilité des germes</b>	<b>Résultats</b>
x < 7 mm	Insensible	-
7 mm < x < 8 mm	Assez sensible	+
8 mm < x < 9 mm	Sensible	++
x > 9 mm	Très sensible	+++

#### **2.2.3.3 Détermination de la CMI**

La CMI ou Concentration minimale inhibitrice est la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle on a une inhibition de la croissance bactérienne après un temps d'incubation de 24 h (DUVAL et SOUSSY, 1990 ; FERRON, 1994).

Deux méthodes sont utilisées pour déterminer la CMI. La première est celle des disques en milieu solide et la deuxième la méthode de dilution en milieu liquide, le milieu ZOBELL.

##### **2.2.3.3.1 Détermination de la CMI en milieu solide**

En milieu solide, la CMI correspond à la plus faible concentration d'extrait à tester qui provoque l'apparition d'un halo d'inhibition dont le diamètre est supérieur ou égal à 7 mm. La méthode est identique à celle décrite au paragraphe 2.2.3.2.1 (p. 39), sauf qu'ici, pour pouvoir estimer la CMI, plusieurs concentrations du même extrait sont testées.

##### **2.2.3.3.2 Détermination de la CMI en milieu liquide**

###### **2.2.3.3.2.1 Principe**

La croissance bactérienne en milieu liquide est appréciée par comparaison de l'aspect des milieux inoculés en présence d'extrait à tester avec celui du témoin sans extrait. Un aspect trouble indique une croissance des bactéries, par contre un aspect limpide montre une inhibition

de leur multiplication, donc une diminution de la densité optique (DO) du milieu. Ainsi, la CMI d'une souche bactérienne correspond à la plus faible concentration de l'extrait à étudier pour laquelle la DO est inférieure à la DO initiale, après un temps d'incubation de 24h.

#### **2.2.3.3.2 Mode opératoire**

Une ansée de la souche à tester est préalablement repiquée en milieu liquide et incubée à 30°C pendant 24 h. Ensuite, la préculture est diluée de façon à obtenir une DO de 0,002 (à  $\lambda = 600$  nm).

Le milieu inoculé est réparti dans une série de 5 tubes à raison de 1 ml par tube. 1 ml d'extrait à tester de concentration déterminée est ajouté dans chaque tube afin d'avoir différentes concentrations. Ainsi, la DO finale dans chaque tube est de 0,001. Un milieu inoculé sans extrait sert de témoin.

La CMI correspond donc à la valeur de concentration pour laquelle la DO est inférieure ou égale à 0,001.

#### **2.2.3.4 Détermination de la CMB**

La concentration minimale bactéricide ou CMB est la plus faible concentration d'antibiotique capable de détruire les bactéries.

Ainsi, les contenus des tubes employés pour la détermination de la CMI en milieu liquide et dont les concentrations sont supérieures ou égales à la CMI, sontensemencés séparément en stries transversales à la surface de milieux de culture gélosés, coulés dans les boîtes de Petri.

Après incubation pendant 24 h, les boîtes sont observées et la lecture se fait en comptant les colonies correspondant aux bactéries vivantes.

La CMB correspond à la concentration minimale pour laquelle aucune colonie n'a survécu.

## **3 RESULTATS**

### **3.1 EFFETS DES EXTRAITS SUR LES ANIMAUX**

#### **3.1.1. Effets sur les animaux à sang chaud**

L'étude des effets sur les animaux à sang chaud comporte le test de l'**extrait** sur les souris et l'étude du pouvoir hémolytique de l'**extrait brut (EB)** et de l'**extrait** sur les hématies de mouton.

##### **3.1.1.1. Effets sur la souris**

###### **3.1.1.1.1. Description des symptômes d'intoxication**

L'extrait **E<sub>2</sub>** ou (« **extrait** »), administré par voie ip à la dose létale de 70,93 mg/kg de souris, provoque les symptômes suivants :

- Juste après l'injection, les souris sont agitées et restent groupées dans un coin de la cuvette ;
- 5 min après, elles traînent leurs pattes postérieures ;
- 20 min après, une hypoactivité est observée, accompagnée d'une hyperhémie ;
- Une enophtalmie et une tachycardie sont remarquées 45 min après l'injection ;
- 1 h 30 min après l'injection, une ataxie est observée de telle sorte que l'animal n'arrive plus à se déplacer normalement ;
- Au bout de 2 h 30 min, des convulsions cloniques apparaissent et deviennent de plus en plus fréquentes, conduisant à la mort des souris.

###### **3.1.1.1.2 Evaluation de la DL<sub>50</sub> (24 h)**

Sept doses de l'**extrait** en progression géométrique de raison  $r = 1,13$ , allant de 34,07 mg/kg (0% de mortalité) à 70,93 mg/kg (100% de mortalité) sont employées, suivant la méthode de REED et MUENCH (1938) (voir méthode au paragraphe 2.2.1.1.1.2 p.32). Chaque dose est injectée par voie ip à un lot composé de 5 souris de  $25 \pm 2$  g. Un autre lot de 5 souris recevant 0,3 ml de sérum physiologique par 25 g de souris sert de témoin.

Les résultats expérimentaux sont montrés dans le tableau 6 (p. 44).

**Tableau 6 :** Résultats expérimentaux de la détermination de la DL<sub>50</sub> (24 h) de l'**extrait** sur souris

Dose en mg/kg de souris	Nombre de décès après :									Total des décès	Total des survivants	% de mortalité
	4h	6h	11h	12h	15h	18h	21h	22h	24h			
34,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
38,50	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	4	20
43,50	0	0	0	0	1	0	1	1	0	3	2	60
49,16	0	0	0	0	2	1	0	0	0	3	2	60
55,55	0	0	1	0	1	1	1	0	0	4	1	80
62,77	0	2	1	1	1	0	0	0	0	5	0	100
70,93	1	1	1	2	0	0	0	0	0	5	0	100

D'après la formule de REED et MUENCH (1938), on a :

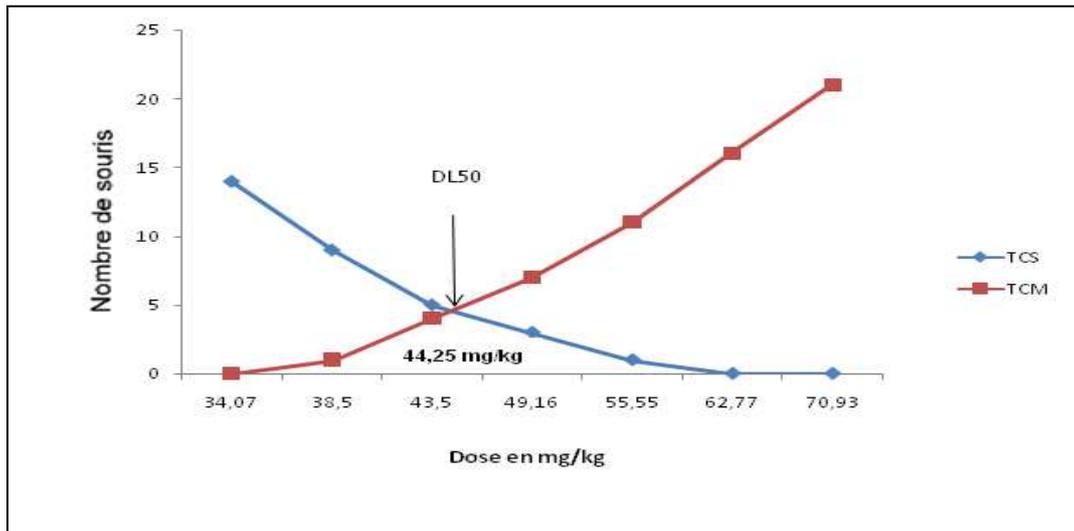
$$\log DL_{50} = \log 38,5 + \frac{0,5 - 0,2}{0,6 - 0,2} \log 1,13$$

Ainsi  $\log DL_{50} = 1,63$ . D'où la valeur de la DL<sub>50</sub> (24 h) de l'**extrait** par voie ip est évaluée à **42,66mg/kg** de souris.

En utilisant la représentation graphique de ces mêmes auteurs, elle est estimée à **44,25mg/kg** de souris (voir Tableau 7 ci-dessous et figure 5, p. 45).

**Tableau 7 :** Résultats expérimentaux pour l'estimation de la DL<sub>50</sub> (24 h) de l'**extrait** sur souris par la méthode graphique des totaux cumulatifs

Dose en mg/ kg de souris	Nombre de souris testées	Nombre de survivantes	Nombre de mortes	Total cumulatif des survivants	Total cumulatif des mortes
34,07	5	5	0	14	0
38,50	5	4	1	9	1
43,50	5	2	3	5	4
49,16	5	2	3	3	7
55,55	5	1	4	1	11
62,77	5	0	5	0	16
70,93	5	0	5	0	21



**Figure 5:** Détermination de la DL<sub>50</sub> (24 h) de l'extrait par la méthode graphique

Avec TCS : totaux cumulatifs des survivants

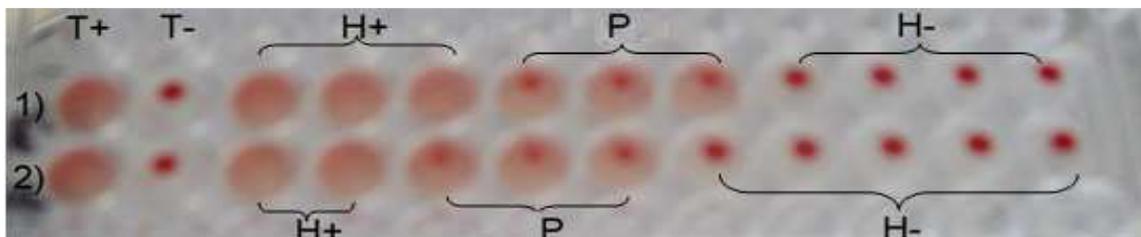
TCM : totaux cumulatifs des morts

### 3.1.1.2 Effets sur les hématies de mouton

D'après les résultats du criblage phytochimique (voir paragraphe 3.5.2. p. 25), **EB** et l'**extrait** contiennent des saponosides et le test hémolytique a été réalisé pour confirmer leur présence.

Les différentes concentrations des extraits à tester sont préparées par dilution en cascade d'une solution-mère à 1 000 µg/ml (coefficient de dilution 1/2). Ce test est effectué selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.1.1.2. (p. 32).

Les résultats obtenus sont montés sur la figure 6 ci-dessous et consignés dans le tableau 8 (p. 46).



**Figure 6:** Effet de l'extrait brut et de l'extrait sur les hématies de mouton

1) : Extrait ; 2) : EB

H+ : hémolyse totale ; P : hémolyse partielle ; H- : absence d'hémolyse

**Tableau 8:** Activité hémolytique de différentes concentrations de l'**extrait brut** et de l'**extrait** sur les hématies de mouton

Concentration (µg/ml)	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,90	1,95
Effets de EB	++	++	P	P	P	-	-	-	-	-
Effets de l'extrait	++	++	++	P	P	P	-	-	-	-

++ : hémolyse totale

P : hémolyse partielle

- : absence d'hémolyse

L'activité hémolytique varie selon la concentration des extraits.

Ainsi, on note une :

- hémolyse totale à des concentrations supérieures ou égales à 500 µg/ml pour **EB** et supérieures ou égales à 250 µg/ml pour l'**extrait**;
- hémolyse partielle avec sédimentation des hématies intactes aux concentrations allant de 62,5 à 250 µg/ml pour **EB** et de 31,25 à 125 µg/ml pour l'**extrait**;
- absence d'hémolyse à des concentrations inférieures ou égales à 31,25 µg/ml pour **EB** et inférieures ou égales à 15,62 µg/ml pour l'**extrait**.

La présence des saponosides dans les extraits à tester est ainsi bien confirmée.

### **3.1.2 Effets sur les animaux à sang froid**

Les effets de **EB**, disponible en quantité suffisante, ont été étudiés sur les animaux à sang froid suivant la méthode décrite au paragraphe 2.2.1.2 (p. 34). Les animaux utilisés sont :

- les alevins de carpe ;
- les têtards de grenouille ;
- les larves de moustique.

#### **3.1 2.1 Effets sur les alevins de carpe**

Sept concentrations de **EB**, allant de 1,68 µg/ml à 3,41 µg/ml, en progression géométrique de raison 1,125, ont été testées sur sept lots de cinq alevins de carpe. D'après les

résultats de ce test consignés dans le tableau 9 ci-dessous, **EB** est toxique pour les alevins à partir de la concentration de 2,13 µg/ml.

**Tableau 9:** Effets de différentes concentrations de l'**extrait brut** sur les alevins de carpe

Concentration (C) de EB (µg/ml)	log C	Nombre d'alevins	Nombre d'alevins		% de mortalité
			morts	survivants	
1,86	0,22	5	0	5	0
1,89	0,28	5	0	5	0
2,13	0,33	5	5	0	100
2,39	0,38	5	5	0	100
2,69	0,43	5	5	0	100
3,03	0,48	5	5	0	100
3,41	0,53	5	5	0	100

La détermination de la concentration létale 50% (CL<sub>50</sub>) s'avère impossible car aucune valeur intermédiaire entre 0% et 100% de mortalité n'a été obtenue. L'intervalle séparant la concentration maximale tolérée et la concentration létale est très étroit. Ainsi, la toxicité de **EB** sur les alevins de carpe semble obéir à la loi du « tout ou rien »

### 3.1.2.2. Effets sur les têtards de grenouille

Sept concentrations de **EB**, allant de 2,18 à 4,44 µg/ml, en progression géométrique de raison 1,126, sont testées sur sept lots de cinq têtards de grenouille.

Les résultats obtenus sont inscrits dans le tableau 10 (p. 48).

**Tableau 10:** Effets de différentes concentrations de l'**extrait brut** sur les têtards de grenouille

Concentration (C) de EB (µg/ml)	log C	Nombre de têtards	Nombre de têtards		% de mortalité
			morts	survivants	
2,18	0,34	5	0	5	0
2,45	0,39	5	0	5	0
2,76	0,44	5	0	5	0
3,11	0,49	5	0	5	0
3,50	0,54	5	0	5	0
3,95	0,60	5	5	0	100
4,44	0,65	5	5	0	100

D'après ce tableau, la détermination de la  $CL_{50}$  est impossible, du fait encore que la concentration maximale tolérée et la concentration sûrement mortelle sont très rapprochées. Donc, la toxicité de **EB** sur les têtards obéit aussi à la loi du « tout ou rien ».

### 3.1.2.3 Effets sur les larves de moustique

Six concentrations de **EB** en progression géométrique de raison 1,42, allant de 0,5 mg/ml ( $CL_0$ ) à 2,89 mg/ml ( $CL_{100}$ ), ont été employées (voir méthode au paragraphe 2.2.1.2.2.2 p.35).

Les résultats sont consignés dans le tableau 11 ci-après.

**Tableau 11:** Effets de différentes concentrations de l'**extrait brut** sur les larves de moustique

Concentration (C) de EB (mg/ml)	log C	Nombre de larves	Nombre de larves		% de mortalité
			mortes	survivantes	
0,50	-0,30	5	0	5	0
0,71	-0,15	5	1	4	20
1,008	0,003	5	2	3	40
1,43	0,16	5	2	3	40
2,03	0,31	5	4	1	80
2,89	0,46	5	5	0	100

D'après les résultats du tableau 11 (p. 48), **EB** est toxique sur les larves de moustique. Cette toxicité est proportionnelle à la concentration.

La droite de régression linéaire a comme équation :

$$Y = 40,28X - 10,86$$

Le coefficient de corrélation est de 0,97.

D'où la **CL<sub>50</sub>** (24 h) est de **1,51 mg/ml**.

### **3.2 EFFETS DES EXTRAITS SUR LES VEGETAUX**

Les effets des extraits sur les végétaux ont été recherchés en étudiant le pouvoir germinatif des graines, et la croissance des jeunes plantules en présence de **EB** et sur le développement des bourgeons axillaires en présence de **EB** et de **l'extrait**.

#### **3.2.1 Effets de l'extrait brut sur le pouvoir germinatif des graines**

Afin de pouvoir déterminer les effets sur le pouvoir germinatif des graines, l'expérience consiste à faire germer en présence de **EB** à la dose unique de 1 mg/ml, des graines de différentes espèces végétales préalablement trempées dans de l'eau de robinet, selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.2.1 (p. 36). Les graines sont présentées dans le tableau 3 (p. 30).

Le tableau 12 (p. 50) indiquant les résultats, montre que la sensibilité des graines vis-à-vis de l'extrait brut est variable. Ainsi, parmi les 10 espèces de graines testées, 5 (haricot, courgette, concombre, laitue et petit pois) sont insensibles à la concentration de 1 mg/ml et germent parfaitement à un taux de 100%. Pour les autres, une inhibition variable est observée, allant de 10% chez le tissam blanc à 70% chez la carotte.

**Tableau 12:** Effets de l'extrait brut à 1mg/ml sur la germination de diverses graines

Classe	Famille	Nom usuel	Nom scientifique	Taux de germination	Taux d'inhibition
DICOTYLE- DONES	APIACEAE	Carotte	<i>Daucus carotta</i>	30%	70%
	ASTERACEAE	Laitue	<i>Lactuca sativa</i>	100%	0%
	BRASSICACEAE	Tissam blanc	<i>Brassica sp.</i>	90%	10%
	CUCURBITACEAE	Concombre	<i>Cucumis sp.</i>	100%	0%
		Courgette	<i>Cucurbita pepo</i>	100%	0%
	FABACEAE	Haricot	<i>Phaseolus vulgaris</i>	100%	0%
		Petit pois	<i>Pisum sativum</i>	100%	0%
SOLONACEAE	Tomate	<i>Lycopersicum esculentum</i>	50%	50%	
MONOCOTYLE- DONES	POACEAE	Riz	<i>Oryza sativa</i>	60%	40%
		Maïs	<i>Zea mays</i>	80%	20%

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

La première expérience sur les plantes consistait à évaluer la toxicité de **EB** sur le pouvoir germinatif des graines. Les résultats ont montré une légère sensibilité, voire une insensibilité pour certaines espèces.

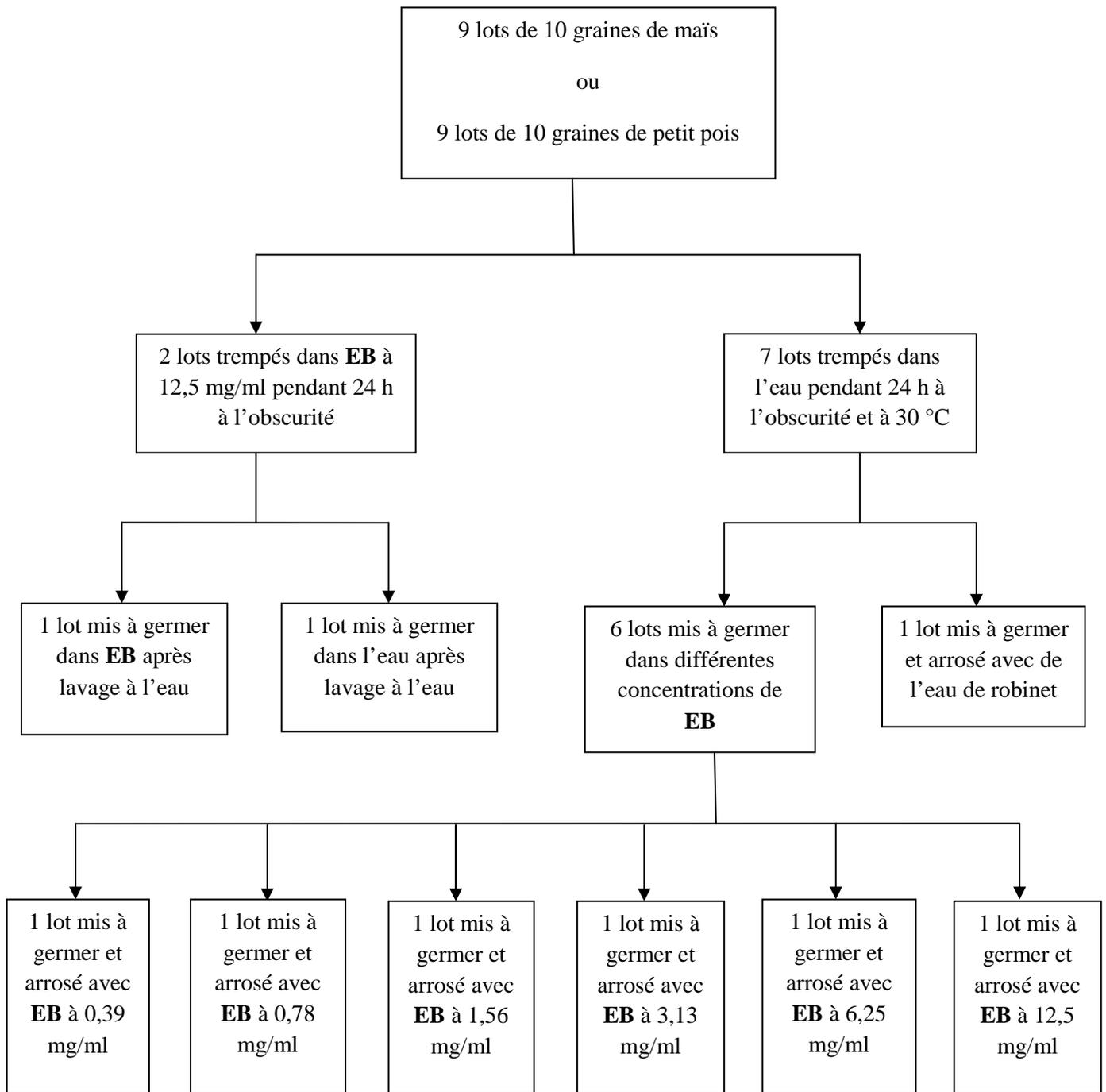
Ainsi, le but de cette deuxième expérience dont les conditions et les étapes sont présentées sur la figure 7 (p. 51), est de vérifier si l'absence ou le peu d'effet de **EB** à la concentration de 1 mg/ml sur certaines graines n'est pas due à une question de dose.

Nous avons alors testé un représentant des Monocotylédones (le maïs : 80% de germination) et un représentant des Dicotylédones (le petit pois : 100% de germination).

L'expérience s'est déroulée comme suit :

Neuf lots de 10 graines sont utilisés pour chacune des deux espèces (maïs et petit pois). Deux lots sont trempés dans l'extrait brut à 12,5 mg/ml et sept parmi les six lots restants sont trempés dans l'eau. Six parmi ces derniers sont mis à germer en présence de différentes

concentrations de **EB**, allant de 0,39 mg/ml à 12,5 mg/ml. Le dernier lot trempé et mis à germer en présence d'eau de robinet, sert de témoin.

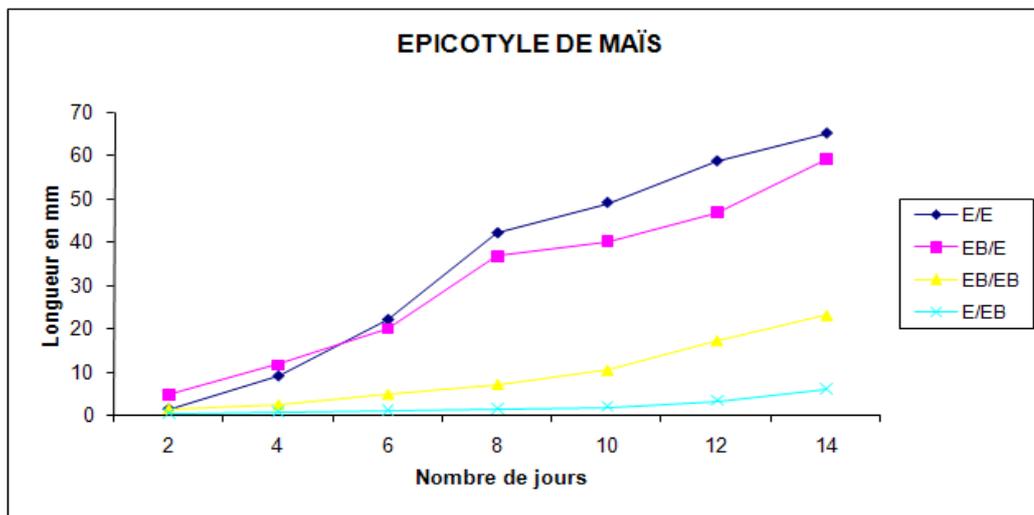


**Figure 7:** Schéma récapitulatif des différentes étapes des expériences sur les effets de l'extrait brut sur la croissance de jeunes plantules

Pour les jeunes plantules de maïs, le lot trempé dans **EB** à 12,5 mg/ml et arrosé avec ce même extrait (EB/EB) et celui trempé à l'eau puis mis à germer dans **EB** à 12,5 mg/ml (E/EB)

montrent une inhibition de croissance considérable. Cette inhibition est bien marquée au niveau des hypocotyles (voir figure 8 et 9).

En revanche, les lots trempés dans **EB** à 12,5 mg/ml et arrosés avec de l'eau (EB/E) (épicotyles et hypocotyles) poussent mieux et tendent même à se rapprocher des témoins (E/E).



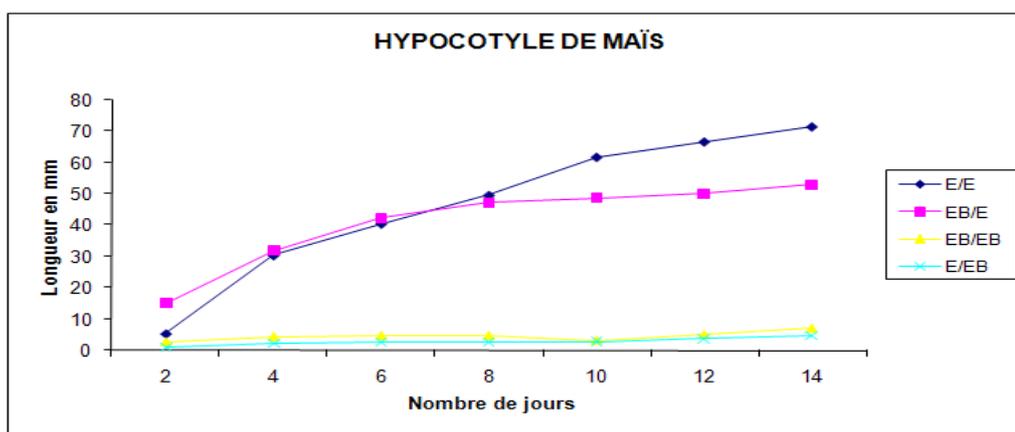
**Figure 8:** Croissance des épicotyles de maïs en fonction du trempage

E/E : lot trempé dans l'eau de robinet puis arrosé avec de l'eau

EB/E : lot trempé dans EB à 12,5 mg/ml puis arrosé avec de l'eau

EB/EB : lot trempé dans EB à 12,5 mg/ml puis arrosé avec ce même extrait

E/EB : lot trempé dans l'eau de robinet puis arrosé avec EB à 12,5 mg/ml



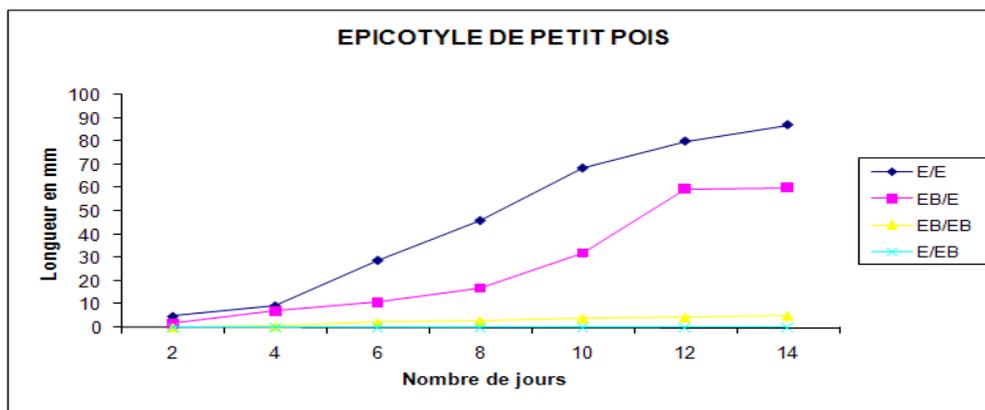
**Figure 9:** Croissance des hypocotyles de maïs en fonction du trempage

Pour les jeunes plantules de petits pois, la croissance des épicotyles et des hypocotyles des graines des lots trempés dans **EB** à 12,5 mg/ml et mis à germer en présence de ce même extrait après lavage à l'eau (EB/EB), présente une inhibition importante par rapport au témoin

(E/E). L'inhibition est beaucoup plus marquée au niveau des épicotyles qu'au niveau des hypocotyles (figure 10 et 11).

Pour les graines trempées dans l'eau puis mises à germer dans **EB** à 12,5 mg/ml (E/EB), la longueur des épicotyles et celle des hypocotyles sont pratiquement nulles.

Par contre, les lots trempés dans **EB** à 12,5 mg/ml et mis à germer dans l'eau après lavage à l'eau (EB/E), se développent mais seule la longueur des hypocotyles tend à se rapprocher de celle des témoins (E/E).



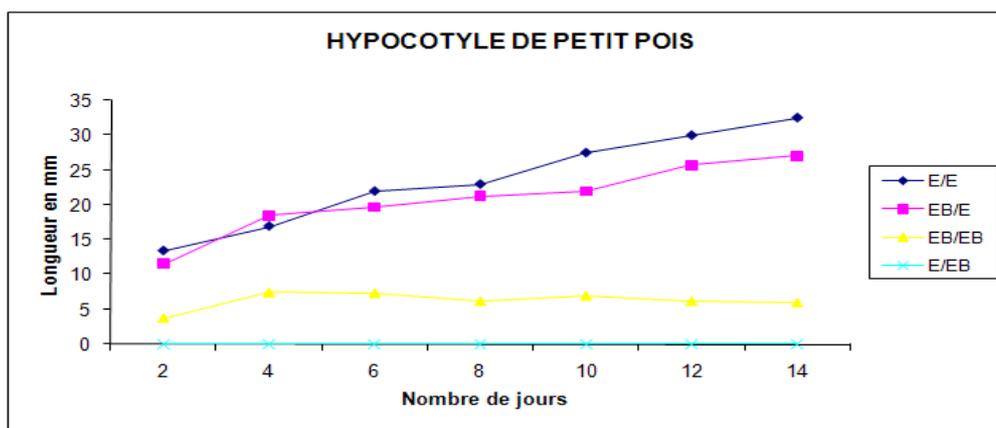
**Figure 10:** Croissance des épicotyles de petit pois en fonction du trempage

E/E : lot trempé dans l'eau de robinet puis arrosé avec de l'eau

EB/E : lot trempé dans EB à 12,5 mg/ml puis arrosé avec de l'eau

EB/EB : lot trempé dans EB à 12,5 mg/ml puis arrosé avec ce même extrait

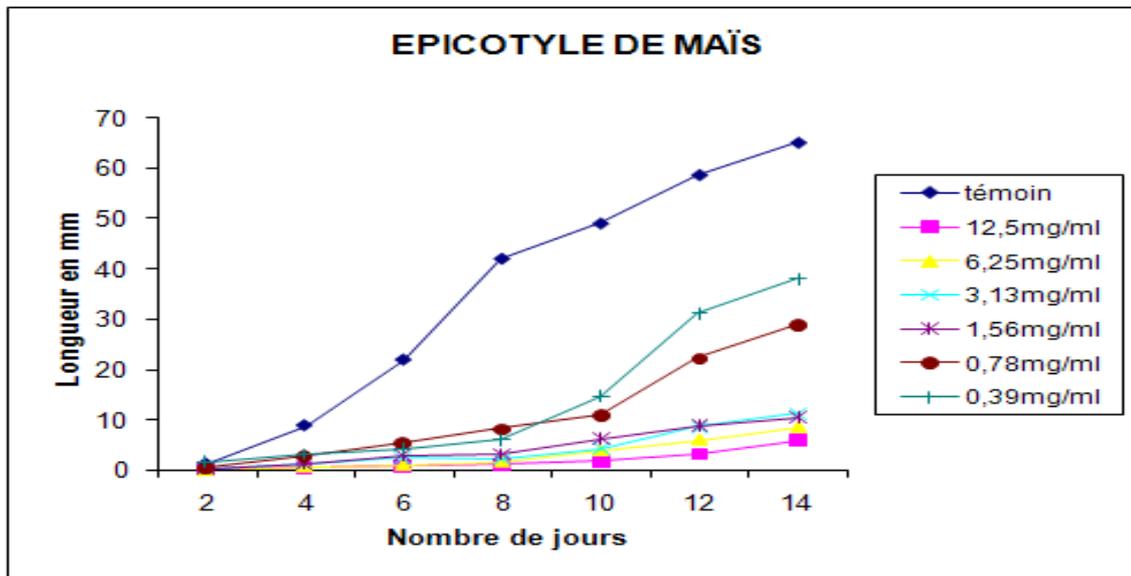
E/EB : lot trempé dans l'eau de robinet puis arrosé avec EB à 12,5 mg/ml



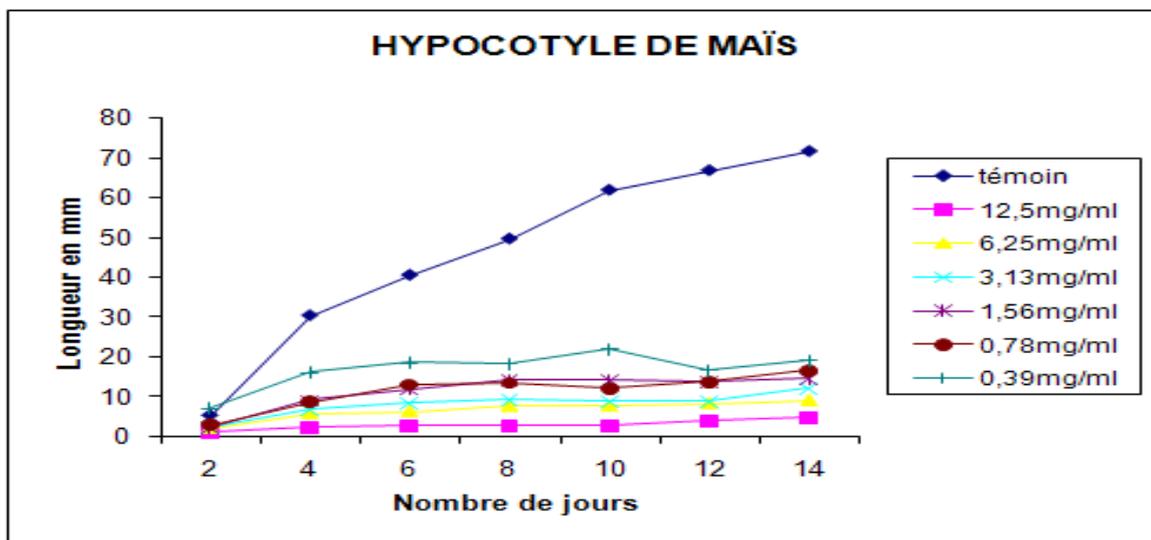
**Figure 11:** Croissance des hypocotyles de petit pois en fonction du trempage

En ce qui concerne les lots de graines de maïs et de petit pois trempées dans l'eau puis mises en germer en présence de différentes concentrations de **EB**, une inhibition est remarquée. En général, elle est fonction de la dose.

Chez le maïs, une inhibition des longueurs des épicotyles est bien marquée aux concentrations supérieures ou égales à 1,56 mg/ml. Mais au niveau des hypocotyles, l'inhibition est nette pour toutes les concentrations utilisées (voir figure 12 et 13 ci-dessous).

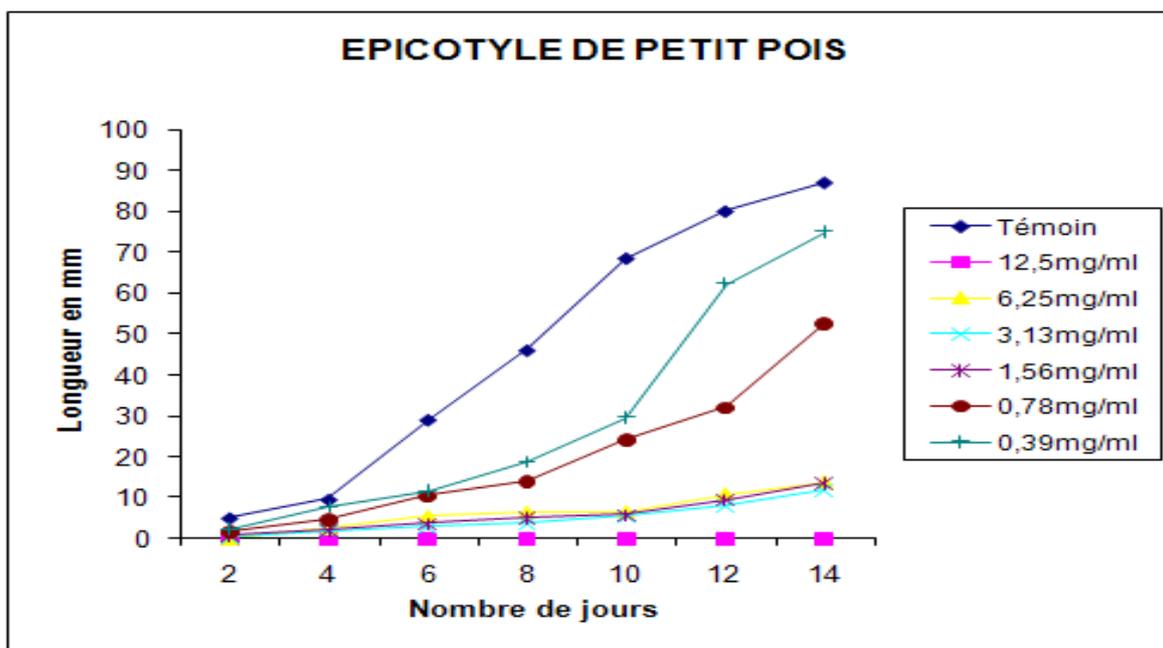


**Figure 12:** Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur le développement de l'épicotyle de maïs

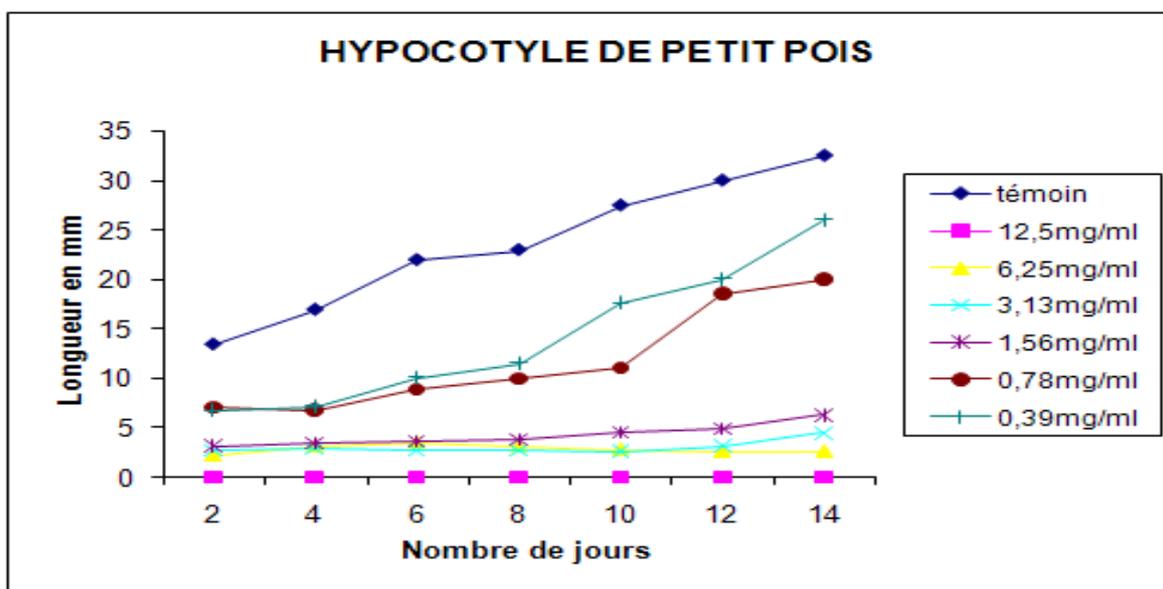


**Figure 13:** Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur le développement de l'hypocotyle de maïs

Pour les épicotyles et les hypocotyles de petit pois, une inhibition de la croissance est notée. Elle est aussi remarquable pour les concentrations allant de 1,56 mg/ml à 12,5 mg/ml (voir figure 14 et 15 p. 55).



**Figure 14:** Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur le développement de l'épicotyle de petit pois



**Figure 15:** Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur le développement de l'hypocotyle de petit pois

### 3.2.3 Effets de l'extrait brut et de l'extrait sur le développement des bourgeons axillaires

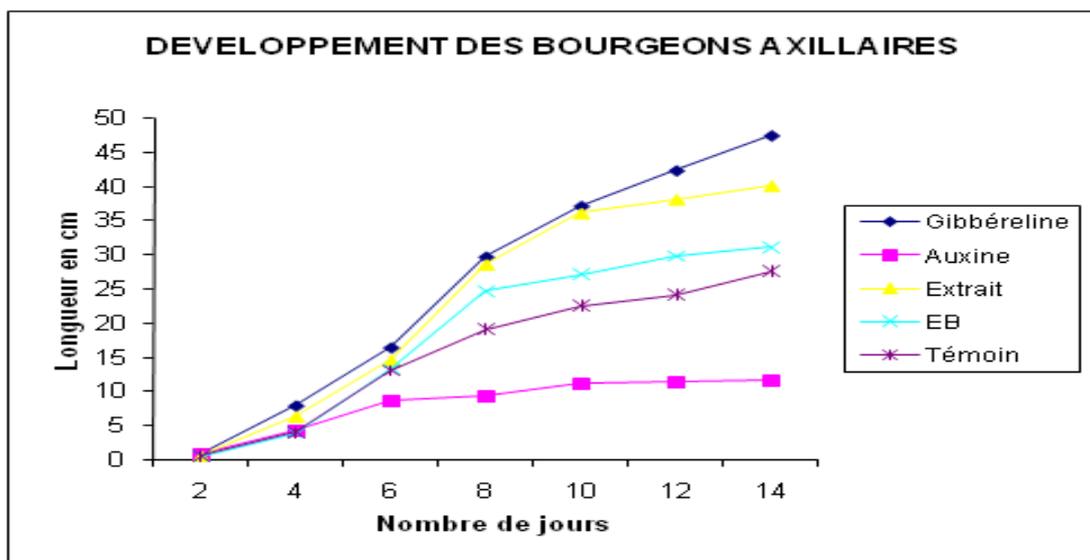
Le but de cette expérience, est d'étudier si les extraits **EB** et **extrait** ont des effets sur le développement des bourgeons axillaires. La méthode est décrite au paragraphe 2.2.2.3 (p. 37).

L'expérience a été réalisée sur un lot de cinq jeunes plantules de petit pois (*Pisum sativum*).

Sur ces cinq plantules :

- l'une reçoit de la lanoline mélangée avec 1 µl d'eau distillée sert de témoin ;
- une deuxième, servant de témoin négatif, reçoit 50 µg d'auxine ;
- une autre, utilisée comme témoin positif, reçoit 50 µg de gibbérelline ;
- les deux dernières reçoivent chacune 50 µg d'extrait à tester (**EB** ou **extrait**).

Les résultats sont présentés sur la figure 16 ci-dessous.



**Figure 16:** Effets de l'extrait brut, de l'extrait, de la gibbérelline et de l'auxine sur la croissance des bourgeons axillaires

D'après ces résultats, **EB** exerce un effet stimulateur, mais inférieur à celui de la gibbérelline. En ce qui concerne l'**extrait**, il exerce aussi un effet stimulateur, presque similaire à celui de la gibbérelline jusqu'au 10<sup>ème</sup> jour. Au-delà, l'effet commence à régresser mais reste encore plus actif que **EB**.

### 3.3 EFFETS DES EXTRAITS SUR LES MICROORGANISMES

D'éventuelles propriétés antimicrobiennes de **EB** et de l'**extrait** ont été recherchées sur cinq souches microbiennes.

#### 3.3.1 Caractères d'identification morphologique

Les cinq souches de bactéries utilisées comme germes-tests ont été caractérisées suivant la coloration GRAM (paragraphe 2.2.3.1 p. 38). Leurs caractères morphologiques sont consignés dans le tableau 13 ci-dessous.

**Tableau 13:** Caractéristiques morphologiques des souches utilisées

Noms des souches	Gram	Morphologie
<i>Escherichia coli</i>	-	Bacille
<i>Salmonella typhi murium</i>	-	Bacille
<i>Vibrio fischeri</i>	-	Vibrion
<i>Vibrio harveyi</i>	-	Vibrion
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Coque

#### 3.3.2 Activité en milieu solide des extraits sur les microorganismes

L'activité antimicrobienne de **EB** et de l'**extrait** a été déterminée à la concentration initiale de chaque extrait, c'est-à-dire 154 mg/ml pour **EB** et 47,3 mg/ml pour l'**extrait**. La méthode utilisée est celle des disques en milieu solide décrite au paragraphe 2.2.3.2 (p. 39).

Les résultats sont présentés dans le tableau 14 (p. 58).

**Tableau 14:** Activité en milieu solide de l'extrait brut et de l'extrait sur les germes testés par la méthode des disques

Germes à tester	Extrait brut		Extrait	
	Diamètre du halo d'inhibition (mm)	Degré de sensibilité	Diamètre du halo d'inhibition (mm)	Degré de sensibilité
<i>Escherichia coli</i>	0	-	0	-
<i>Salmonella typhi murium</i>	0	-	0	-
<i>Vibrio fischeri</i>	13	+++	12	+++
<i>Vibrio harveyi</i>	17	+++	15	+++
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	-	6	-

+++ : très sensible

- : insensible

D'après ces résultats, parmi les germes testés, *Vibrio fischeri* et *Vibrio harveyi* sont très sensibles vis-à-vis de **EB** et de **l'extrait**.

### 3.3.3 Détermination de la CMI

#### 3.3.3.1 Détermination de la CMI par la méthode de diffusion en milieu solide

La CMI de **EB** et de **l'extrait** a été évaluée seulement sur *Vibrio harveyi*, l'une des deux souches très sensibles à ces extraits.

Six concentrations allant de 4,81 mg/ml à 154 mg/ml pour **EB**, et six autres allant de 1,48 mg/ml à 47,3 mg/ml pour **l'extrait**, obtenues par dilution de demi en demi, ont été utilisées. Ensuite, 10 µl de chaque concentration sont déposés par disque.

Un autre disque chargé de 30 µg (quantité utilisée habituellement par les microbiologistes) d'antibiotique de référence (tétracycline : Tétr) sert de témoin positif.

La méthode utilisée est celle décrite au paragraphe 2.2.3.3.1 (p. 41).

Le tableau 15 (p. 59) et la figure 17 (p. 59) montrent les résultats de la détermination de la CMI en milieu solide de **EB** et de **l'extrait** sur *Vibrio harveyi*.

**Tableau 15:** Détermination de la CMI de l'**extrait brut** et de l'**extrait** sur *Vibrio harveyi*

N° de tube	1	2	3	4	5	6
Concentration de <b>EB</b> (mg/ml)	154	77	<b>38,5</b>	19,25	9,625	4,81
Diamètre du halo	17	14	11	6	6	6
Concentration de l' <b>extrait</b> (mg/ml)	47,3	23,65	11,83	<b>5,91</b>	2,96	1,48
Diamètre du halo	16	14	13	7	6	6

**a) Quantité de EB par disque**

1 : 1540 µg

2 : 770 µg

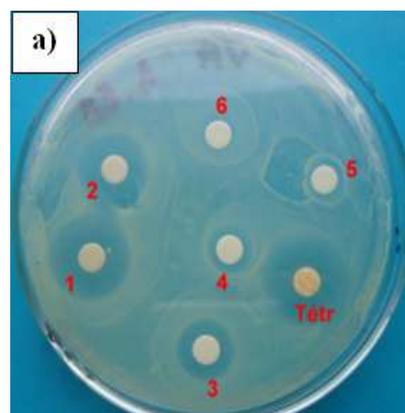
3 : 385 µg

4 : 192,5 µg

5 : 96,25 µg

6 : 48,125 µg

Tétr : 30µg



**b) Quantité de l'extrait par disque**

1 : 473 µg

2 : 236,5 µg

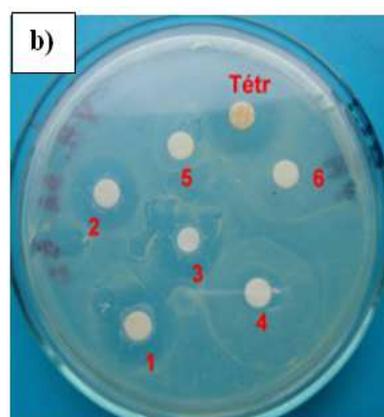
3 : 118,25 µg

4 : 59,125 µg

5 : 29,525 µg

6 : 14,78 µg

Tétr : 30 µg



**Figure 17:** CMI de l'**extrait brut** et de l'**extrait** sur *Vibrio harveyi* en milieu solide

D'après ces résultats, la valeur de la CMI vis-à-vis de *Vibrio harveyi* de **EB** est de **38,5 mg/ml** et celle de **l'extrait** est de **5,91mg/ml**.

Nous remarquons que **l'extrait** est plus actif sur le germe à tester que **EB**.

### 3.3.3.2 Détermination de la CMI en milieu liquide

La détermination de la CMI en milieu liquide a été effectuée par mesure de la DO à 600 nm. Seul **EB** a été utilisé à cause d'une insuffisance en **extrait**. La méthode utilisée est celle décrite au paragraphe 2.2.3.3.2 (p. 41).

Les résultats sont présentés dans le tableau 16 suivant :

**Tableau 16:** Détermination de la CMI de **l'extrait brut** en milieu liquide

N° de tube	T	1	2	3	4	5	6
Concentration de <b>EB</b> (mg/ml)	0	154	77	<b>38,5</b>	19,25	9,265	4,81
DO à t <sub>0</sub>	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
DO à t = 24h	0,18	0,000	0,000	0,000	0,006	0,018	0,018
Résultats	+	-	-	-	+	+	+

+ : croissance bactérienne

- : inhibition de la croissance bactérienne

T : témoin sans extrait

De ces résultats, la valeur de la CMI en milieu liquide de **EB** vis-à-vis de *Vibrio harveyi* est de **38,5 mg/ml**. Cette valeur est la même que celle trouvée par la méthode des disques en milieu solide.

### 3.3.4 Détermination de la CMB

La méthode utilisée est celle décrite au paragraphe 2.2.3.4 (p. 42).

Les contenus des trois tubes (1 à 3) sontensemencés séparément sur milieu gélosé coulé en boîte de Petri à l'aide d'une anse de platine calibrée à 10 µl, selon la technique d'épuisement. La valeur de la CMB pour laquelle aucune croissance n'est observée est de **38,5mg/ml**.

Nous remarquons que les valeurs de la CMB et de la CMI de **EB** sont les mêmes vis-vis de *Vibrio harveyi*.

#### **4 DISCUSSION ET CONCLUSION**

D'après les résultats de l'étude biologique, on peut dire que l'extrait brut (**EB**) et l'**extrait** d'écorces de tronc de *Conchopetalum madagascariense* ont des effets toxiques sur divers organismes animaux, végétaux et microbiens.

Chez la souris, l'administration par voie ip de **EB** ou de l'**extrait** provoque des symptômes tels que l'hypoactivité, l'hyperhémie, la tachycardie, l'ataxie et les convulsions. Ces symptômes supposent une atteinte au niveau du système nerveux et cardiovasculaire.

La valeur de la DL<sub>50</sub> (24 h) de l'**extrait** est comprise entre **44,25 à 44,66 mg/kg** de souris. L'extrait est ainsi plus toxique que ceux de feuilles de *Deinbollia boinensis*, une plante de la même famille que notre matériel d'étude, pour laquelle la DL<sub>50</sub> (24 h) se situe entre 66,25 et 66,55 mg/ml de souris (RAKOTOBE, 2003). L'**extrait** présente une toxicité qui se rapproche de celle de l'extrait purifié de l'amande de graines de *Mimusops commersonii* qui a une DL<sub>50</sub> (24 h) de 44,5 mg/kg de souris (RAMAMONJISOA-RAKOTOARIVELO, 2004), mais il est 58 fois plus toxique que l'extrait des feuilles de *Phyllarthron madagascariense* qui a une DL<sub>50</sub> (24 h) de 2517mg/kg de souris (IBRAHIM, 2005). Il est par contre 14 fois moins toxique que l'extrait de graines d'*Albizia tullearensis* dont la DL<sub>50</sub> (24 h) est de 2,9 à 3,2mg/kg de souris (RAONIHARISOA, 2003).

La présence de saponosides dans **EB** et l'**extrait** est confirmée par leur activité hémolytique, mise en évidence sur les hématies de mouton. L'**extrait** est plus actif que **EB**. Cela est dû du fait qu'il est purifié. Le pouvoir hémolytique des saponosides est attribué à leur l'interaction avec le cholestérol de la membrane érythrocytaire (BRUNETON, 1987, 1993).

Chez les animaux à sang froid, **EB** est très toxique pour les alevins de carpe et les têtards de grenouille. En effet, il agit à de très faibles doses jusqu'à 2,13 µg/ml (limite inférieure, 100% mortalité) pour les alevins de carpe, et jusqu'à 3,95 µg/ml (limite inférieure, 100% mortalité) pour les têtards de grenouille. Les valeurs respectives de la CL<sub>50</sub> (24 h) pour ces deux animaux n'ont pas pu être déterminées puisqu'elles obéissent à la « **loi du tout ou rien** ». Cette sensibilité assez élevée pourrait être due à une facilité relative de pénétration des principes actifs par les branchies.

Chez les larves de moustique, **EB** agit, mais à des doses élevées et la valeur de la CL<sub>50</sub> (24 h) est estimée à **1,51 mg/ml**. Dans ce cas, une étude sur l'utilisation de **EB** comme

insecticide pourrait être envisageable. Cette perspective s'avère intéressante dans la lutte contre les vecteurs de maladies, comme le paludisme ou la dengue.

Chez les végétaux, **EB** inhibe la germination de certaines graines de plantes à des taux variables. Cette inhibition pourrait être due, soit à un effet direct sur les graines entraînant leur destruction, soit à un effet indirect par inactivation des enzymes nécessaires contenus dans les embryons.

Sur les jeunes plantules de maïs et de petit pois, l'extrait brut inhibe le développement des épicotyles et des hypocotyles. Cette inhibition est fonction de la dose utilisée. Les hypocotyles de maïs sont plus affectés que ceux de petit pois. Par contre, les épicotyles de petit pois sont plus affectés que ceux des hypocotyles. L'effet dépend ainsi de la plante étudiée. L'inhibition au niveau des hypocotyles pourrait être due au fait que les principes toxiques empêchent l'enracinement ou limitent l'absorption. Dans les deux cas, il y a une mauvaise absorption des nutriments par les hypocotyles. A la dose de 12,5 mg/ml l'inhibition est totale.

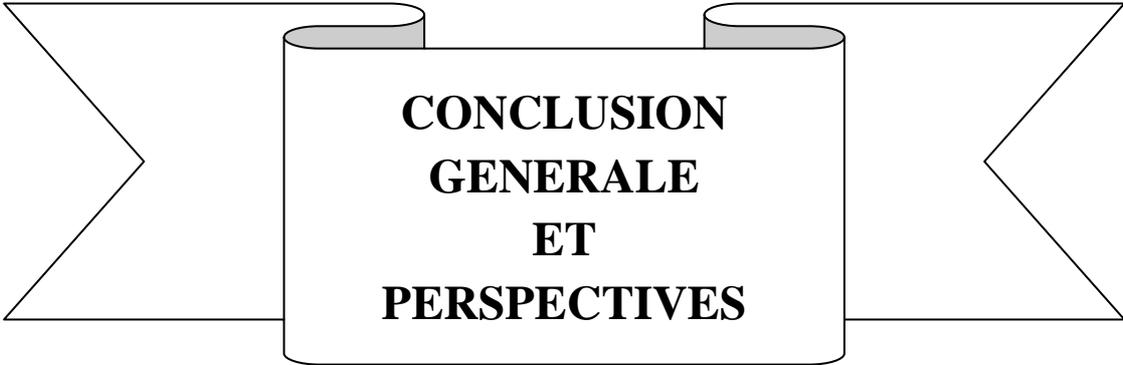
**EB** et **l'extrait** ont un effet stimulateur sur le développement des bourgeons axillaires. Mais **l'extrait** exerce un effet stimulateur comparable à celui de la gibbérelline. Cette stimulation beaucoup plus importante de **l'extrait** s'explique encore une fois par son degré de purification.

Chez les microorganismes, **EB** et **l'extrait** sont actifs aux doses utilisées vis-à-vis des deux souches de *Vibrio*. Pour les autres souches, aucune sensibilité n'a été notée.

La valeur de la CMI vis-à-vis de *Vibrio harveyi* est estimée à **38,5 mg/ml** pour **EB** en milieu solide et liquide. Elle est de **5,91 mg/ml** pour **l'extrait** vis-vis du même germe en milieu solide. **L'extrait** est beaucoup plus actif, toujours compte tenu du fait qu'il est plus purifié. La CMB de **EB** sur le germe est aussi de **38,5 mg/ml**.

Ainsi, du point de l'efficacité, **EB** et **l'extrait** de *Conchopetalum madagascariense* agissent à des concentrations élevées par rapport aux extraits de téguments d'*Albizia arenicola* pour lesquels les valeurs de la CMI sont de l'ordre de 1,87 mg/ml pour l'extrait brut et de 0,62 mg/ml pour l'extrait purifié (MOUNIDATI, 2009). **EB** et **l'extrait** sont beaucoup moins actifs que l'antibiotique de référence, la tétracycline (30 µg). La poursuite de la purification pourrait permettre d'améliorer leur pouvoir antibiotique.

Les résultats montrent que les principes toxiques contenus dans les extraits d'écorces de branches de *Conchopetalum madagascariense* qui pourraient être des saponosides ou des stérols insaturés ont un large spectre d'activité. Ainsi, leur exploitation en thérapeutique pourrait être envisageable du fait de leurs propriétés biologiques, en particulier leur activité larvicide et antimicrobienne. Cependant, il ne faut pas perdre de vue la toxicité des extraits pour les animaux à sang chaud.



**CONCLUSION  
GENERALE  
ET  
PERSPECTIVES**

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

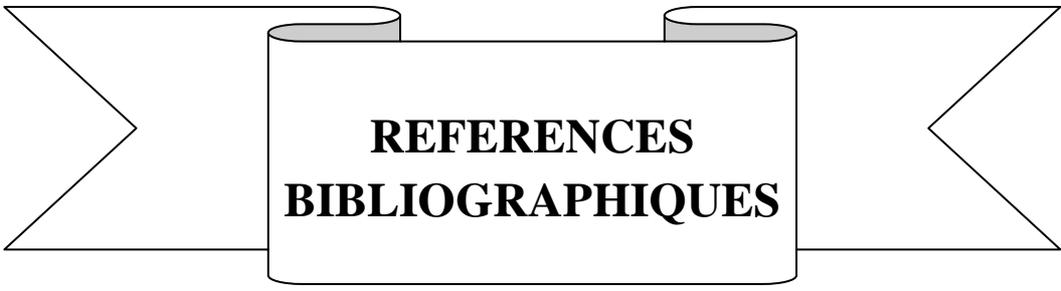
**En conclusion**, les résultats obtenus tout au long de cette étude, sont encore préliminaires, mais ont permis de :

- montrer que les écorces de branches de *Conchopetalum madagascariense* sont très toxiques pour des animaux à sang chaud et à sang froid, pour quelques représentants de végétaux et pour des bactéries ;
- déterminer certaines de leurs propriétés physico-chimiques et leur nature chimique ;
- connaître quelques-unes de leurs propriétés biologiques.

Nos résultats constituent les premières données sur la chimie et la toxicologie de *Conchopetalum madagascariense*.

**Dans l'avenir**, nous envisageons:

- d'améliorer les procédés d'extraction et de purification de manière à obtenir les principes actifs à l'état pur ;
- de poursuivre davantage l'étude de leurs propriétés physico-chimiques et déterminer leur nature chimique ;
- d'étudier leur mécanisme d'action ;
- d'approfondir les propriétés biologiques déjà mises en évidence tout en prospectant d'autres effets qui permettront de mieux utiliser cette plante.



**REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

**Références bibliographiques**

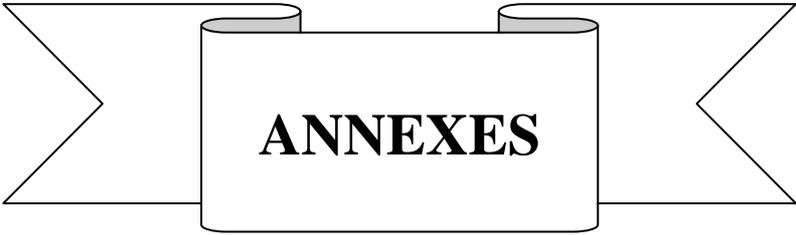
- 1- ANDRIANTSOA–RAZAFIMALALA H. Contribution à la purification et à la caractérisation d'un principe antimicrobien d'une légumineuse *Albizia lebbek* [Mémoire de DEA : Biochimie] : Université d'Antananarivo, 1983 ; 82p.
- 2- AUDIGIE C, DUPONT G, ZONZAIN F. Principes des méthodes d'analyses biochimiques. Paris : Doin éditeur, 1989, T2 ; 190p.
- 3- BARBIER B, LEYNAUD, CHAMP P. Les tests de toxicité sur les poissons. Techniques et Sciences Municipales, 1974 ; **69**(6) : 346-350.
- 4- BENNET V, CUATRECASAS P. Cholera toxin : Membrane gangliosides and activation of adenylate cyclase. In: The specificity and action of animal, bacterial and plant toxins. (Receptions and recognition, série B, vol.1). Edited by Cuatrecasas .P., London: Chapman and Hall, 1977; 1-66.
- 5- BIZZINI B. Tetanos toxin structure as a basis for elucidation, its immunological and neuropharmacological activities. In: The specificity and action of animal, bacterial and plant toxins (receptors and recognition, série B, vol.1). Edited by Cuatrecasas P., London: Chapman and Hall, 1977; 75-218.
- 6- BOITEAU P, ALLORGE-BOITEAU L. Plantes médicinales de Madagascar : cinquante-huit plantes médicinales utilisées sur le marché de Tananarive (Zoma) à Madagascar : Kartala, Paris ; 1993 ; 133p.
- 7- BOYD. Fundamentals of immunology, 4<sup>ème</sup> Ed. New York: Wiley and Sons, 1966; 503p.
- 8- BRUNETON J. Pharmacognosie, phytochimie, Plantes médicinales, 2<sup>ème</sup> éd. Paris : Technique et Documentation, 1993 ; 915p.
- 9- CORDELL G.A. Introduction to alkaloids, a biogenetic approach. New York: John wiley, 1981.
- 10-DUVAL J, SOUSSY C.J. Antibiothérapie ; 4<sup>ème</sup> éd. Paris : Masson 1990.
- 11-DALTON D.R. The alkaloid-the fundamental chemistry, a biogenetic approach. New York : Marcel Dekker, 1979.
- 12-FERRON A. Bactériologie médicale, 15<sup>ème</sup> éd. Paris : C et R, 1994 ; 442p.
- 13-FONG H.H.J, TIN W.A.M, FARNSWORTH N.R. Phytochemical Screening. Chicago: review University of Illinois, 1977: 73-126.

- 14-HELLER R, ESNAULT R, LANCE C. Abrégé de Physiologie Végétale : développement, 5<sup>e</sup> éd. Paris : Masson, 1995 ; 90-126.
- 15-HEMINGWAY R.W, KARCHESY J.J. Chemistry and significance of condensed tannins. New York: Plenum press, 1989.
- 16-IBRAHIM S.A. Etude chimique, biochimique et biologique des feuilles de *Phyllarthron madagascariense* (Bignoniaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2005 ; 82p.
- 17-JEANNODA V. Etudes chimique, biochimique et toxicologique du principe convulsivant des Connaracées de Madagascar. [Thèse de doctorat d'Etat en Sciences]. Strasbourg : Université Louis Pasteur de Strasbourg, 1986 ; 273p.
- 18-KAMOUM P. Appareil et méthodes en biochimie, Flammarion 1997 ; 237p.
- 19-LE MINOR L, VERON M. Bactériologie médicale, 2<sup>ème</sup> éd. Paris : Médecine-Sciences Flammarion, 1989.
- 20-MAHUZIER G, HAMON M. Méthode de séparation, 2<sup>ème</sup> éd. Paris : Masson, 1990 ; 262p. (Abrégé de chimie analytique, T2).
- 21-MEYER A, DEIANA J, LECLERE H. Cours de microbiologie générale (nouveau programme). Paris : Doin éditeur, 2000.
- 22-HADDAD M, LAURENS V, LACAILLE-DUBOIS M.A. Induction of apoptosis in a leukemia cell line by triterpene saponins from *Albizia adianthifolia*. In: Bioorganic and Medicinal Chemistry 12, 2004 ; 4725-4734.
- 23-MORELAND D. Effects of toxicants on oxidative and photophosphorylation. In: Introduction to biochemical. Toxicology. Edited by HODGSON E. and GUTHRIE E.F., 1980 ; 245-260.
- 24-MOUNIDATI E.B.M. Purification et caractérisation partielle des principes antimicrobiens des téguments de graines d'*Albizia arenicola* (Mimosoïdeae, Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2009 ; 72 p.
- 25-NOHARA T. Analysis of steroid and another biologically significant steroids. Son Diego: Nes. W. D. et Parish E. J, 1989 ; 119-132.
- 26-OMS. Résistance aux insecticides et lutte antivectorielle. 17<sup>e</sup> rapport du Comité OMS d'experts des insecticides. Série de rapports techniques n° 443, Genève, 1970 ; 306p.

- 27-RABESA Z.A. Pharmacopée d'Alaotra CIDST, Imprimerie Tatsinanana, Antananarivo, 1986 ; 288p.
- 28-RAHARISOA N. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes toxiques d'*Albizia bernieri* (Mimosoïdeae, Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1999 ; 72 p.
- 29-RAHERINAINA C.E. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes toxiques d'*Albizia boivini* (Mimosoïdeae, Fabaceae). [mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1999 ; 74p.
- 30-RAJEMIARIMOELISOA C. Contribution à l'étude chimique des principes actifs de *Albizia polyphylla* (Mimosoïdeae, Légumineuseae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1996 ; 76p.
- 31-RAJEMIARIMOELISOA C. Isolement, caractérisation chimique et biologique du principe toxique d'*Albizia odorata* (Mimosoïdeae, Fabaceae). [Thèse de doctorat de 3<sup>ème</sup> cycle : Sciences]. Antananarivo : Université d'Antananarivo ; 2000 ; 113p.
- 32-RAKOTOBE L. Etude chimique et toxicologique des extraits de feuilles de *Deinbollia boinensis* (Sapindaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003 ; 74p.
- 33-RAKOTONDRA SOA N.S. Etudes chimique et biologique des extraits toxiques de feuilles d'*Albizia polyphylla* (Mimosoïdeae, Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2000 ; 72p.
- 34-RAKOTONDRAZANAKA L. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes toxiques de *Xerosicyos danguyi* (Cucurbitaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo Université d'Antananarivo, 1999 ; 67p.
- 35-RAKOTONDRAZANAKA L. Caractérisation chimique et biologique du principe toxique des *Odosicyos bosseri* (Cucurbitaceae). [Thèse de doctorat de 3<sup>e</sup> cycle : biochimie]. Antananarivo, 2003 ; 132p.
- 36-RAKOTO-RANOROMALALA D.A.D. Purification et caractérisation partielle du principe toxique de *Rouera orientalis* (Connaraceae). (Mémoire de DEA : Biochimie) Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1984 ; 44p.
- 37-RAKOTO-RANOROMALALA D.A.D. Purification et étude des propriétés physico-chimique et biologiques des principes toxiques de *Tachiadenus longiflorus*

- (Gentianaceae) [Thèse de doctorat de 3<sup>e</sup> cycle : Sciences]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1989 ; 88p.
- 38-RAKOTO-RATSIMAMANGA A. Un inventaire des pesticides naturels d'origines végétales à Madagascar : VOARISOA. L'environnement et les produits toxiques, 1998 ; 291p.
- 39-RALISON C. Isolement et étude biochimique, toxicologique et biologique, de la monguine, principe toxique de *Croton mongue* (Euphorbiaceae). [thèse de Doctorat d'Etat : Sciences]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1987 ; 261p.
- 40-RAMAMONJISOA E.D. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes toxiques d'*Albizia species* (Mimosoïdeae, Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1998 ; 66p.
- 41-RAMAMONJISOA-RAKOTOARIVELO N.S.A. Etude chimique et toxicologique des principaux toxiques de graines de *Mimusops commersonii* (Sapotaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2004 ; 81p.
- 42-RANDERATH K. Chromatographie sur couches minces. Paris : édition GAUTHIER-VILLARS, 1964 ; 296p.
- 43-RANDRIAMAHAVALISOA T.F. Etudes chimique et toxicologique des extraits toxiques des feuilles de *Ocotea madagascariensis* (Lauraceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo: Université d'Antananarivo, 2003 ; 68p.
- 44-RANDRIAMIHARISOA F. Etudes chimique et biologique d'extraits toxiques de feuilles de *Xerosicyos perrieri* (Cucurbitaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2000 ; 71p.
- 45-RANDRIANANDRASANA J. Etudes chimique et toxicologique des extraits toxiques d'écorces de tige de *Uapaca thouarsii* (Euphorbiaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie] Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2004 ; 69p.
- 46-RANDRIANARIVO H.R. Isolement, caractérisation chimique et biologique des principes toxiques d'*Albizia arenicola* (Mimosoïdeae, Fabaceae). [Thèse de Doctorat : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003 ; 159p.
- 47-RANDRIANARIVO H.R. Purification et caractérisation partielle des principes actifs d'*Albizia arenicola* (Mimosoïdeae, Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1996 ; 63p.

- 48-RAONIHARISOA V. Etudes chimique et toxicologique des extraits de graines d'*Albizia tullearensis* (Mimosoïdeae, Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo Université d'Antananarivo, 2003 ; 79p.
- 49-RASOLOHARIJAONA F.Y. Etudes chimique et toxicologique d'une plante médicinale malgache, *Schefflera longipedicellata* (Araliaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2008 ; 57p.
- 50-RAZANAMPARANY L. Purification et étude des propriétés physico-chimiques et biologiques de la bolaffinine, toxine protéique extraite de *Boletus affinis* Peck (BOLETACEAE). [Thèse de Doctorat d'Etat : Sciences]. Antananarivo. Université d'Antananarivo, 1987 ; 261p.
- 51-REED L, MUENCH H.A. A simple method of estimating fifty per cent points. Am. J Hug. 27, 1938; 293p.
- 52-ROCHAT H, KOPEYANA C, GARCIA L.C, MARTINEZ G, ROSOS J.P, PAKARIS A, MARTIN F, GARCIA A, MARTIN-MOUTT N, GREGOIRE J, MIRANGA F. Recent results on the structure of scorpion and snake toxins. In: animal, plant and microbial toxins (Chemistry, Pharmacology and Immunology, 2). Edited by : HAYASHIA A.O.K., SAWAY, 1976 ; 79-87.
- 53-SCHATZ G. E. Flore générique des arbres de Madagascar. Grande-Bretagne : The Gromwell Press, 2001; 437p.
- 54-SINGLETON P. Bactériologie. 2<sup>ème</sup> éd. Paris : Masson, 1994, 245p.
- 55-TOILIBOU S. Etudes chimique et toxicologique des extraits de racines de *Rhodocodon madagascariensis* (Liliaceae). [mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2006 ; 76p.
- 56-TRIPATHI R. M., SEN P.C DASP. K. Studies on the mechanism of *Albizia lebbek*, an indian indigenous drug used in the treatment of atopic allergy. Journal of Ethnopharmacology 1, 1979 ; 385-380
- 57-TROPICOS. [[http://mbt.mobot.Org/W3t/Search/ Classic vast.html](http://mbt.mobot.Org/W3t/Search/Classic_vast.html)], (10 Novembre 2008).
- 58-WIKIPEDIA. L'encyclopédie libre, [[http:// fr. Wikipedia.org/Wiki/Sapindaceae](http://fr.Wikipedia.org/Wiki/Sapindaceae)], (28 Juillet 2008), 44k.



## **ANNEXES**

### **ANNEXE I**

#### **Composition des réactifs généraux pour les alcaloïdes**

##### **Réactif de MAYER :**

Chlorure de mercure	1,36 g
Iodure de potassium	5 g
Eau distillée	qsp 100 ml

##### **Réactif de WAGNER :**

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

##### **Réactif de DRAGENDORFF :**

Il s'agit d'un mélange (v/v) de deux solutions, A et B.

##### **Solution A :**

Nitrate de bismuth	1,7 g
Acide tartrique concentré	20 g
Eau distillée	qsp 100 ml

##### **Solution B :**

Iodure de potassium	10 g
Eau distillée	qsp 100 ml

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

### **ANNEXE II**

#### **A- Composition des différents milieux de culture**

##### **- Milieu de MUELLER-HINTON :**

*Formule-type (g/l)*

Extrait de viande	2,0
-------------------	-----

Peptone tryptique de caséine	17,5
Amidon	1,5
Agar	15,0
pH 7,3 ± 0,1 à 25°C	

**- Milieu MARINE –AGAR :**

*Formule approximative par litre*

Peptone	5,0 g
Extrait de levure	1,0 g
Citrate de fer	0,1 g
Chlorure de sodium	19,45 g
Chlorure de magnésium	8,8 g
Sulfate disodique	3,24 g
Chlorure de potassium	1,80 g
Chlorure de potassium	0,55 g
Bicarbonate de sodium	0,16 g
Bromure de potassium	0,08 g
Gélose	15,0 g
Chlorure de strontium	34,0 mg
Acide borique	22,0 mg
Silicate de sodium	4,0 mg
Fluorure de sodium	2,4 mg
Nitrate d'ammonium	1,6 mg
Phosphate disodique	8,0 mg

Ajoutée et/ou complétée en fonction des critères de performance imposés.

pH final 7,6 ± 0,2

**- Milieu ZOBELL (milieu liquide) :**

Peptone	4 g
Extrait de levure	1 g
Chlorure de sodium	30 g
Eau distillée	qsq 1 litre
Ajuster le pH à 7,4 avec du NaOH si nécessaire.	

## **B Préparation des milieux à partir de la poudre déshydratée**

### ▪ **Préparation du milieu de MUELLER-HINTON :**

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

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

- Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

### ▪ **Préparation du milieu MARINE –AGAR :**

- Mettre 55,1 g de poudre en suspension dans 1 litre d'eau distillée.

- Mélanger, chauffer sous agitation magnétique continue et touiller pendant une minute de manière à obtenir un mélange homogène.

- Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

### ▪ **Préparation du milieu ZOBELL :**

- Mettre 1 g d'extrait de levure, 4 g de peptone et 30 g de NaCl, dans un litre d'eau distillée ;

- Bien mélanger ;

Chauffer sous agitation magnétique de manière à avoir un mélange homogène ;

- Ajuster le pH à 7,4 ;

- Autoclaver à 121°C pendant 15 min.

## **ANNEXE III**

### **Composition du PBS (g/l) :**

- Chlorure de sodium	7,65 g
- Phosphate disodique	0,72 g
- Phosphate monopotassique	0,21 g
- Eau distillée	1 000 ml

pH = 7,2

## **ANNEXE IV**

### **Composition des colorants GRAM :**

*Formule théorique pour un litre :*

- Solution de Cristal violet oxalaté :

Cristal violet	20 g
Alcool éthylique dénaturé	200 ml
Oxalate d'ammonium	8 g
Eau déminéralisée	500 ml

- Lugol-PVP stabilisé :

Iode	13 g
Iodure de potassium	20 g
PVP (Polyvinyl-pyrrolidone)	100 g
Eau déminéralisée	1 000 ml

- Décolorants :

Alcool éthylique dénaturé	500 ml
Acétone	500 ml

- Solution de Safranine :

Safranine	2,5 g
Alcool éthylique dénaturé	100 ml
Eau déminéralisée	900 ml