

TABLE DES MATIERES

	Page
DEDICACE	i
REMERCIEMENTS	ii
LISTE DES ABREVIATIONS	ix
GLOSSAIRE	x
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xii
INTRODUCTION GENERALE	1
<u>Première partie : ETUDE CHIMIQUE</u>	
1-INTRODUCTION	5
2-MATERIELS ET METHODES	5
2.1- MATERIELS.....	5
2.1.1-LA PLANTE.....	5
2.1.1.1-Classification.....	5
2.1.1.2-Identification.....	6
2.1.1.3-Description botanique.....	6
2.1.1.3-Distribution géographique.....	6
2.1.1.4-Date et lieu de récolte.....	6
2.1.1.5-Préparation et conservation du matériel végétal.....	6
2.1.2-LES PRODUITS CHIMIQUES.....	6
2.2- METHODES.....	9
2.2.1- METHODES D'EXTRACTION.....	9
2.2.1.1-Extraction à froid.....	9
2.2.1.2-Extraction à chaud.....	9
2.2.2- METHODES DE PURIFICATION.....	9
2.2.2.1-Précipitation par l'acétone.....	9
2.2.2.1.1-Principe.....	9
2.2.2.1.2-Mode opératoire.....	10
2.2.2.2-Précipitation par l'éthanol 50%.....	10

2.2.2.2.1-Principe.....	10
2.2.2.2.2-Mode opératoire.....	10
2.2.2.3-Précipitation par l'acétate neutre de plomb.....	10
2.2.2.3.1-Principe.....	10
2.2.2.3.2-Mode opératoire.....	11
2.2.2.4-Filtration sur charbon actif.....	11
2.2.2.4.1-Principe.....	11
2.2.2.4.2-Mode opératoire.....	11
2.2.2.5-Traitement par la chaleur.....	11
2.2.2.5.1-Principe.....	11
2.2.2.5.2-Mode opératoire.....	12
2.2.2.6-Fractionnement par le n-butanol.....	12
2.2.2.6.1-Principe.....	12
2.2.2.6.2-Mode opératoire.....	12
2.2.2.7-Dialyse.....	12
2.2.2.7.1-Principe.....	12
2.2.2.7.2-Mode opératoire.....	13
2.2.3- METHODE DE CONCENTRATION.....	13
2.2.4-METHODE DE DETERMINATION DU RENDEMENT.....	14
2.2.5- METHODES D'ANALYSE.....	14
2.2.5.1-Chromatographie sur couche mince.....	14
2.2.5.1.1- Principe.....	14
2.2.5.1.2- Mode opératoire.....	15
2.2.5.2-Réaction de détection des familles chimiques.....	15
2.2.5.2.1- Les alcaloïdes.....	16
2.2.5.2.1.1-Test de MAYER.....	16
2.2.5.2.1.2- Test de WAGNER.....	16
2.2.5.2.1.3- Test de DRAGENDORFF.....	16
2.2.5.2.2- Les flavonoïdes et les leucoanthocyanes.....	17
2.2.5.2.2.1- Les flavonoïdes (Test de WILSTATER).....	17
2.2.5.2.2.2- les leucoanthocyanes (Test de BATE-SMITH).....	17
2.2.5.2.3- Les tanins et les polyphénols.....	17
2.2.5.2.3.1- Test à la gélatine.....	17
2.2.5.2.3.2- Test à la gélatine salée.....	17

2.2.5.2.3.3- Test au chlorure ferrique.....	17
2.2.5.2.4- Les anthraquinones (Test de BORNSTRÄGER).....	18
2.2.5.2.5- Les désoxyoses (Test de KELLER-KILIANI).....	18
2.2.5.2.6- Les iridoïdes.....	18
2.2.5.2.7- Les stéroïdes, les triterpènes et les stérols insaturés.....	18
2.2.5.2.7.1- Test de LIEBERMANN-BURCHARD.....	18
2.2.5.2.7.2- Test de SALKOWSKI.....	19
2.2.5.2.8- Les saponines (Test de mousse).....	19
3- RESULTATS.....	19
3.1- EXTRACTION.....	19
3.1.1- EXTRACTION A FROID.....	19
3.1.1.1- Extraction aqueuse.....	19
3.1.1.2- Extraction hydroalcoolique 75%.....	20
3.1.2- EXTRACTION A CHAUD.....	20
3.1.2.1- Extraction aqueuse.....	20
3.1.2.2- Extraction hydroalcoolique 75%.....	20
3.2- PURIFICATION.....	21
3.2.1-METHODES NON RETENUES DANS LE PROCEDE DE PURIFICATION	22
3.2.1.1- Précipitation par l'acétone.....	22
3.2.1.2- Précipitation par l'éthanol 50%.....	22
3.2.1.3- Précipitation par l'acétate neutre de plomb.....	22
3.2.1.4- Filtration sur charbon actif.....	22
3.2.2-METHODES RETENUES DANS LE PROCEDE DE PURIFICATION.....	
23	
3.2.2.1- Traitement par la chaleur.....	23
3.2.2.2- Fractionnement par le n-butanol.....	23
3.2.2.3- Dialyse.....	23
3.3- DEGRE D'HOMOGENEITE DES DIFFERENTS EXTRAITS.....	
25	
3.4- RENDEMENT EN TOXINES.....	26
3.5- CARACTERISATION CHIMIQUE.....	26
3.5.1- Propriétés physico-chimiques.....	26

3.5.2- Nature chimique.....	26
4- DISCUSSION ET CONCLUSION.....	28

Deuxième partie : ETUDE TOXICOLOGIQUE

1-INTRODUCTION.....	29
2-MATERIELS ET METHODES.....	29
2.1-MATERIELS.....	29
2.1.1-LES ANIMAUX D'EXPERIMENTATION.....	29
2.1.1.1-Les animaux à sang chaud.....	29
2.1.1.1.1-Les souris.....	29
2.1.1.1.2-Le sang de mouton.....	30
2.1.1.2-Les animaux à sang froid.....	30
2.1.1.2.1-Les poissons.....	30
2.1.1.2.2-Les têtards de grenouille.....	30
2.1.1.2.3-Les larves de moustique.....	30
2.1.2-LES VEGETAUX D'EXPERIMENTATION.....	30
2.1.3-LES MICRO-ORGANISMES UTILISES.....	31
2.1.4-LES MILIEUX DE CULTURE.....	31
2.1.5-LES DISQUES POUR LES TESTS D'ANTIBIOGRAMME.....	32
2.1.6-LES STERILISATEURS.....	32
2.2-METHODES.....	32
2.2.1-METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES ANIMAUX.....	32
2.2.1.1-Méthodes d'étude des effets sur les animaux à sang chaud.....	32
2.2.1.1.1-Test sur souris.....	32
2.2.1.1.1.1-Influence des voies d'administration.....	32
2.2.1.1.1.2-Estimation de la toxicité sur souris.....	33
2.2.1.1.1.3-Détermination de la DL ₅₀ (24h).....	33
2.2.1.1.2-Test hémolytique.....	34
2.2.1.1.2.1-Principe.....	34
2.2.1.1.2.2-Mode opératoire.....	34
2.2.1.2-Méthodes d'étude des effets sur les animaux à sang froid.....	35
2.2.1.2.1-Principe.....	35

2.2.1.2.2-Mode opératoire.....	36
2.2.1.2.3-Détermination de la concentration létale 50% (CL ₅₀) 24h	36
2.2.1.2.3.1-Test sur les alevins de carpe	36
2.2.1.2.3.2-Test sur les têtards de grenouille.....	36
2.2.1.2.3.3-Test sur les larves de moustique (OMS, 1970).....	37
2.2.2-METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES VEGETAUX.....	
37	
2.2.2.1-Effets sur le pouvoir germinatif de graines.....	37
2.2.2.2-Effets sur la croissance des jeunes plantules	37
2.2.2.2.1-Principe.....	38
2.2.2.2.2-Mode opératoire.....	38
2.2.2.2.2.1-Trempage.....	38
2.2.2.2.2.2-Germination.....	38
2.2.2.3-Effet sur le développement des bourgeons axillaires.....	38
2.2.3-METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LA CROISSANCE	
DES MICRO-ORGANISMES.....	39
2.2.3.1-Identification des germes.....	39
2.2.3.1.1-Méthode de coloration GRAM.....	39
2.2.3.1.1.1-Principe.....	39
2.2.3.1.1.2-Mode opératoire.....	40
2.2.3.1.1.2.1-Préparation et fixation.....	40
2.2.3.1.1.2.2-Coloration.....	40
2.2.3.2- Etude de l'activité antimicrobienne des extraits.....	41
2.2.3.2.1 Principe	41
2.2.3.2.2-Mode opératoire.....	41
2.2.3.3-Détermination de la CMI par la méthode des disques	42
3-RESULTATS.....	42
3.1-EFFETS SUR LES ANIMAUX.....	42
3.1.1-EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG CHAUD.....	42
3.1.1.1-Effets de l'extrait sur les souris.....	42
3.1.1.1.1-Influence des différentes voies d'administration.....	42
3.1.1.1.2-Description des symptômes.....	43

3.1.1.1.3-Détermination de la DL ₅₀ (24h).....	43
3.1.1.2-Effets de l'extrait brut et de l'extrait sur les hématies de mouton.....	45
3.1.2-EFFETS DE L'EXTRAIT BRUT SUR LES ANIMAUX A SANG FROID.....	47
3.1.2.1-Effets sur les alevins de carpe.....	47
3.1.2.2-Effets sur les têtards de grenouille.....	47
3.1.2.3-Effets sur les larves de moustique.....	48
3.1.4-EFFETS DES EXTRAITS SUR LES VEGETAUX.....	48
3.1.4.1-Effets de l'extrait brut sur le pouvoir germinatif des graines.....	48
3.1.4.2-Effets de l'extrait brut sur la croissance des jeunes plantules.....	49
3.1.4.3-Effets des extraits sur le développement des bourgeons axillaires.....	54
3.1.5-EFFETS DES EXTRAITS SUR LES MICROORGANISMES.....	54
3.1.5.1- Identification des germes.....	54
3.1.5.2-Activité antimicrobienne des extraits.....	55
3.1.5.2.1.-Sensibilité des germes.....	55
3.1.5.2.2-Détermination de la CMI.....	56
4-DISCUSSION ET CONCLUSION	58
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	60
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	61
ANNEXES	

LISTE DES ABREVIATIONS

ANP : Acétate Neutre de Plomb

B/A/E : Butanol/Acide acétique/Eau

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CL₅₀ : Concentration létale 50%

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNARP : Centre National d'Application des Recherches Pharmaceutiques

coll. : collaborateurs

Da : Dalton

DL₅₀ : Dose létale à 50%

E₃ : Extrait purifié final

EB : Extrait brut

FOFIFA : Foibem-Pirenena momba ny Fikarohana ho amin'ny Fampanandrosoana ny eny
Ambanivohitra

h : heure

IMVAVET : Institut Malgache de Vaccins Vétérinaires

ip : intrapéritonéal

IPM : Institut Pasteur de Madagascar

min : minute

PVP: polyvinyle pyrrolidone

PBS : Phosphate Buffered Saline

P/V : Poids par volume

qsp : quantité suffisante pour

trs : tours

V/V : Volume par volume

°C : Degré Celsius

GLOSSAIRE

Antibiotique: substance capable d'empêcher le développement des micro-organismes

Ataxie: incapacité à coordonner les mouvements

Contorsion abdominale: étirement de l'animal avec des torsions du corps (traduction d'une douleur abdominale)

Convulsions cloniques: contractions saccadées, brèves et répétées à courts intervalles

Enophtalmie: enfoncement du globe oculaire

Hyperhémie: rougissement des oreilles suite à une dilatation des vaisseaux sanguins

Piloérection: hérissément des poils du corps

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau n°1 : Caractéristiques des extraits bruts obtenus par les différentes techniques d'extraction.....	21
Tableau n°2 : Résultats du criblage phytochimique de l'extrait brut et de l'extrait E ₃	27
Tableau n°3 : Graines utilisées lors des tests de toxicité sur les végétaux.....	31
Tableau n°4 : Liste des germes utilisés.....	31
Tableau n°5 : Composition du milieu pour le test hémolytique.....	35
Tableau n°6 : Normes utilisées pour l'expression des résultats obtenus par la méthode des disques (normes utilisées par l'IPM).....	42
Tableau n°7 : Influence de la voie d'administration.....	43
Tableau n°8 : Résultats de la détermination de la DL ₅₀ (24h) chez la souris.....	44
Tableau n°9 : Résultats expérimentaux pour l'estimation de la DL ₅₀ (24h) de E ₃ sur souris par la méthode graphique des totaux cumulatifs.....	44
Tableau n°10 : Résultats des tests hémolytiques de l'extrait brut et de l'extrait à différentes concentrations.....	45
Tableau n°11 : Effets des différentes concentrations de l'extrait brut sur les alevins de carpe.....	47
Tableau n°12 : Effets des différentes concentrations de l'extrait brut sur les têtards de grenouille.....	48
Tableau n°13 : Effets de l'extrait brut à 1mg/ml sur la germination des graines de quelques espèces des plantes potagères.....	49
Tableau n°14 : Taux d'inhibition de la croissance des hypocotyles et des épicotyles de haricot et de riz au 15 ^{ème} jour de l'expérience.....	53
Tableau n°15 : Caractéristiques des souches utilisées.....	54

Tableau n°16 : Activité des extraits sur les germes testés.....	55
Tableau n°17 : Résultats de la détermination de la CMI de l'extrait brut.....	57

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure n°1 : <i>Anacardium occidentale</i> , a) arbre ; b) feuilles ; c) fleurs ; d) fruits.....	7
Figure n°2 : Répartition géographique de <i>Anacardium occidentale</i>	8
Figure n°3 : Schéma récapitulatif de l'extraction et des différentes étapes du procédé de purification des principes toxiques de <i>Anacardium occidentale</i>	24
Figure n°4 : CCM des différents extraits toxiques de <i>Anacardium occidentale</i> dans le système B/A/E 60/20/20(p/p/p).....	25
Figure n°5 : Détermination de la DL ₅₀ (24h) par la méthode graphique de REED et MUENCH(1938).....	45
Figure n°6 : Effets des différentes concentrations de l'extrait brut et de l'extrait sur les hématies de mouton.....	46
Figure n°7 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'étude des effets de l'extrait brut sur la croissance des jeunes plantules.....	51
Figure n°8 : Développement de l'épicotyle du petit pois en présence des différentes concentrations de l'extrait brut.....	51
Figure n°9 : Développement de l'hypocotyle du petit pois en présence des différentes concentrations de l'extrait brut.....	52
Figure n°10 : Développement de l'épicotyle de riz en présence des différentes concentrations de l'extrait brut.....	52
Figure n°11 : Développement de l'hypocotyle de riz en présence des différentes concentrations de l'extrait brut.....	51
Figure n°12 : Effets de l'extrait brut et de l'extrait sur le développement des bourgeons axillaires.....	54
Figure n°13: Sensibilité de <i>Klebsiella pneumoniae</i> vis-à-vis de EB et de l'extrait.....	56
Figure n°14: Sensibilité de <i>Staphylococcus aureus</i> vis-à-vis de EB et de l'extrait.....	56

Figure n°15:Détermination de la CMI vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* de l'extrait brut....57

Figure n°16:Détermination de la CMI vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* de l'extrait brut....57



INTRODUCTION GENERALE

Les poisons sont des substances capables de troubler gravement ou d'interrompre les fonctions vitales d'un organisme auquel ils ont été administrés volontairement ou accidentellement. On appelle toxines, les poisons d'origine naturelle provenant d'animaux, de végétaux ou encore des micro-organismes comme les bactéries et les algues. L'intoxication pourrait être due à la morsure ou à la piqûre d'animaux venimeux, ou à la consommation d'aliments ou d'organismes toxiques.

La connaissance et l'exploitation des toxines ne datent pas d'aujourd'hui, mais remontent à des temps très anciens. L'homme, bien que conscient des grands dangers que les toxines peuvent représenter, a toujours su tirer profit des propriétés de nombreux organismes animaux et végétaux. Ainsi il les utilise :

- pour pêcher :
Des extraits de tubercule de « faganga », *Dioscorea sansibarensis* Pax (Dioscoraceae), et des tiges de « famatalaro » *Euphorbia laro* D. (Euphorbiaceae) sont utilisés comme poisons de pêche (RAKOTO-RATSIMAMANGA, 1998 ; RAHERINIAINA, 2004) ;
- pour lutter contre certains animaux nuisibles :
Les feuilles, les fruits ou les racines de « famehivala » *Paullina pinnata* (Sapindaceae) sont utilisées contre les insectes ; les bulbes de « famonontotozy » *Rhodocodon madagascariense* (Liliaceae) ou les écorces de « antalihazo » *Rauvolfia media* Pichon (Apocynaceae) servent à tuer les rats et les chiens errants (RAKOTO-RATSIMAMANGA, 1998) ;
- pour traiter des maladies :
Le venin d'abeille est utilisé pour soigner les douleurs musculaires et celui du crapaud pour soigner les maladies du cœur (HABERMEHL, 1981) ;
- pour nuire à autrui ou par ignorance :
Les extraits de feuilles de *Cerbera venenifera* (Apocynaceae) sont utilisés à Madagascar à des fins criminelles (RAKOTO-RATSIMAMANGA, 1998).
- pour rendre la justice :
Plusieurs plantes sont utilisées comme poisons d'épreuves.

La toxicologie est une science traitant des substances toxiques, de leurs effets sur l'organisme et de leurs mécanismes d'action. Son évolution est tributaire des progrès de nombreuses disciplines scientifiques telles que la médecine, la chimie, la biologie, la pharmacologie, la physiologie et la biologie moléculaire.

Actuellement, un grand nombre de toxines ont été isolées. Leur nature chimique et leurs propriétés biologiques sont connues. Celles-ci ont été exploitées à des fins thérapeutiques et dans l'élucidation de mécanismes biologiques.

Voici quelques exemples :

- ⇒ La toxine cholérique, isolée du bacille *Vibrio cholerae* est un activateur universel de l'adénylate cyclase (BENNET et CUATRECASAS, 1977) ;
- ⇒ La toxine tétanique est une protéine isolée de la bactérie *Clostridium tetani*, qui est utilisée dans l'exploration du fonctionnement du système nerveux central (BIZZINI, 1977) ;
- ⇒ La toxine botulinique est une neurotoxine bactérienne produite par différentes espèces de bactéries anaérobies du genre *Clostridium*, la plus connue étant *Clostridium botulinum*. La toxine inhibe la libération de **l'acétylcholine** au niveau des jonctions neuromusculaires (WIKIPEDIA : l'encyclopédie scientifique, 2006) ;
- ⇒ La morphine, extraite de la plante *Papaver somniferum*, est utilisée comme analgésique (BRUNETON, 1993) ;
- ⇒ La méthionine sulfoximine, un acide aminé isolé de *Cnestis glabra* et de *Cnestis polyphylla*, est une neurotoxine inhibant la glutamine synthétase (JEANNODA, 1986) ;
- ⇒ Les antibiotiques comme la pénicilline (acide 6-aminopénicillamique) synthétisée par certains champignons microscopiques du genre *Penicillium* (TULKENS et SPINOWINE, 2002) et la streptomycine, un aminoside isolé à partir d'une souche d'actinobactérie *Streptomyces griseus* sont utilisées pour traiter plusieurs maladies infectieuses (WIKIPEDIA : l'encyclopédie scientifique, 2006).

La flore malgache renferme beaucoup d'espèces toxiques, qu'elles soient endémiques ou introduites (PERNET et MEYER, 1957 ; BOST, 1961 ; DEBRAY et JAQUEMIN, 1971 ; BOITEAU, 1979). Toutefois, la plupart d'entre elles n'ont pas encore fait l'objet d'une étude approfondie.

C'est pour cette raison que le laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales (LABASM) de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo, s'est engagé dans l'étude de toxines de plantes issues de différentes familles.

A titre d'exemples, on peut citer :

- la famille des BOLETACEAE : avec *Boletus affinis* Peck (RAZANAMPARANY, 1987) et *Boletus sp* (RAMIARIMBELOSOA, 2003) ;
- la famille des CONNARACEAE : *Rourea orientalis* (RAKOTO-RANOROMALALA, 1984) ; *Cnestis glabra* et *Cnestis polyphylla* (JEANNODA, 1986) ;
- la famille des CUCURBITACEAE : *Xerosicyos danguyi* (RAKOTONDRAZANAKA, 1999) ; *Xerosicyos perrieri* (RANDRIAMIHARISOA, 2000) et *Odosicyos bosseri* (RAKOTONDRAZANAKA, 2003) ;
- la famille des DIOSCOREACEAE : *Dioscorea esculenta* (RANDRIANAMBISOA, 2006) ; *Dioscorea antaly* (RANDRIAMAMONJY, 2005) ; et *Dioscorea esculenta* (RAKOTONDRAZANAKA, 2005) ;
- la famille des EUPHORBIACEAE : *Croton mongue* (RALISON, 1987) ; *Uapaca thourarsii* (RANDRIANANDRASANA, 2004) ; et RAHERINIAINA, 2004) ;
- la famille des FABACEAE : *Albizia lebbeck* (ANDRIANTSOA, 1989) ; *Albizia arenicola* (RANDRIANARIVO, 1996 et 2003) ; *Albizia polyphylla* (RAJEMIARIMOELISOA, 1996) ; *Albizia sp* (RAMAMONJISON, 1998) ; *Albizia bernieri* (RAHARISOA, 1999) ; *Albizia tulearensis* (RAONIHARISOA, 2003) ;
- la famille des LAURACEAE : *Ocotea madagascariensis* (RANDRIAMAHAVALISOA, 2003) ; *Ravensara anisata* (RAHANTARINORO, 2004) ;
- la famille des SAPOTACEAE : *Mimusops commersonii* (RAMAMONJISOA RAKOTOARIVELO, 2004) ; *Gambea boiviniana* (RASOATAHINA, 2005).

En ce qui nous concerne, nous avons étudié les toxines de feuilles de *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae), pour plusieurs raisons :

- La plante existe en grande quantité à Madagascar et aux Comores ;
- D'après la littérature (RAKOTO-RATSIMAMANGA, et coll., 1969), la poudre des feuilles sèches est appliquée en topique dans le traitement du penfugus et des brûlures ; elle aurait des propriétés désinfectantes et faciliterait la régénération de l'épiderme

(ANDRIAMIHAJA, 1986). D'après les enquêtes que nous avons menées auprès des villageois, le jus des feuilles à une action antidiarrhéique. Les fruits sont comestibles à maturité.

- Cette plante n'a pas encore fait l'objet d'une étude toxicologique approfondie.

L'objectif de notre travail consiste à préparer des extraits suffisamment purifiés de feuilles de *Anacardium occidentale* et à étudier les propriétés physico-chimiques et toxicologiques des extraits obtenus.

Par conséquent, ce travail est divisé en deux grandes parties :

- La première partie est consacrée à l'étude chimique des principes toxiques (extraction, purification et caractérisation chimique). ;
- La deuxième partie rapporte l'étude des propriétés toxicologiques des extraits de feuilles de *Anacardium occidentale*.

1-INTRODUCTION

A notre connaissance, *Anacardium occidentale* n'a pas encore fait l'objet d'une étude biologique approfondie, l'étude chimique faite par RAKOTO-RATSIMAMANGA (1998) a révélé la présence de tanins et de traces de saponines dans les feuilles et les fruits. La toxicité des feuilles a été démontrée par des tests préliminaires sur souris. Dans la première partie de ce mémoire, nous avons alors cherché à extraire et à purifier le ou les principe(s) toxique(s), à obtenir des informations sur leurs propriétés physico-chimiques et à étudier leur nature chimique.

2-MATERIELS ET METHODES

2.1-MATERIELS

2.1.1-LA PLANTE

2.1.1.1-Classification

Règne	: Végétal
Embranchement	: Spermaphytes
Sous-embranchement	: Angiospermes
Classe	: Dicotylédones
Sous-classe	: Magnoliopsida
Ordre	: Sapindales
Famille	: Anacardiaceae
Genre	: <i>Anacardium</i>
Espèce	: <i>occidentale</i>
Noms vernaculaires :	
- nom français	: Pomme d'acajou ou noix d'acajou
- noms malgaches	: Abiba (Sakalava) ; Koro (Sakalava) ; Koroso (Sakalava) ; Korosy (Sakalava) ; Mabiba (Sakalava) ; Mahabibo (Sakalava) ; Mahabiby ; Voambarika (Betsimisaraka)
- nom comorien	: Mbibo

2.1.1.2-Identification

La plante a été identifiée au département flore du Parc Botanique et Zoologique de Tsimbazaza à Antananarivo avec le numéro d'herbier (4927).

2.1.1.3-Description botanique

La description botanique détaillée de la plante *Anacardium occidentale* figure 1(p. 7) est donnée en annexe 1.

2.1.1.4-Distribution géographique

La carte de la figure 2 (p. 8) montre la distribution géographique de *Anacardium occidentale* à Madagascar.

Cet arbre est trouvé, planté ou subspontané, près de nombreuses localités habitées, sur toutes les côtes et dans toutes les parties chaudes de l'île à basse altitude. Il a donné son nom au faubourg bien connu de Majunga : Mahabibo. Mais il s'est surtout largement naturalisé sur les côtes Nord-Est et Nord-Ouest, en particulier dans le canton d'Antsakoamanondro (sous-préfecture d'Ambanja), dans toute la presque île d'Ambato et la petite île de Nosy Faly. Il pousse sur le sable près de la mer.

2.1.1-5-Date et lieu de récolte

Les échantillons de la plante ont été récoltés dans la forêt littorale d'Amparafana, dans la région de Mahanoro (commune de Mahatsara), au mois d'avril 2006.

2.1.1.6-Préparation et conservation du matériel végétal

Les feuilles fraîchement récoltées sont séchées au soleil pendant une semaine.

Elles sont ensuite broyées à l'aide d'un mixer. La poudre fine ainsi obtenue est conservée dans un bocal à la température ambiante. Elle constitue notre matériel de départ.

2.1.2-LES PRODUITS CHIMIQUES

La plupart des produits chimiques utilisés sont de qualité pour analyse et de marque MERCK, PROLABO ou BDH.

Le support utilisé pour la chromatographie sur couche mince est le gel de silice 60F 254 de marque MERCK. Ce gel est étalé avec une épaisseur de 0,2mm sur des feuilles plastiques qui peuvent être découpées aux dimensions voulues.



a



b

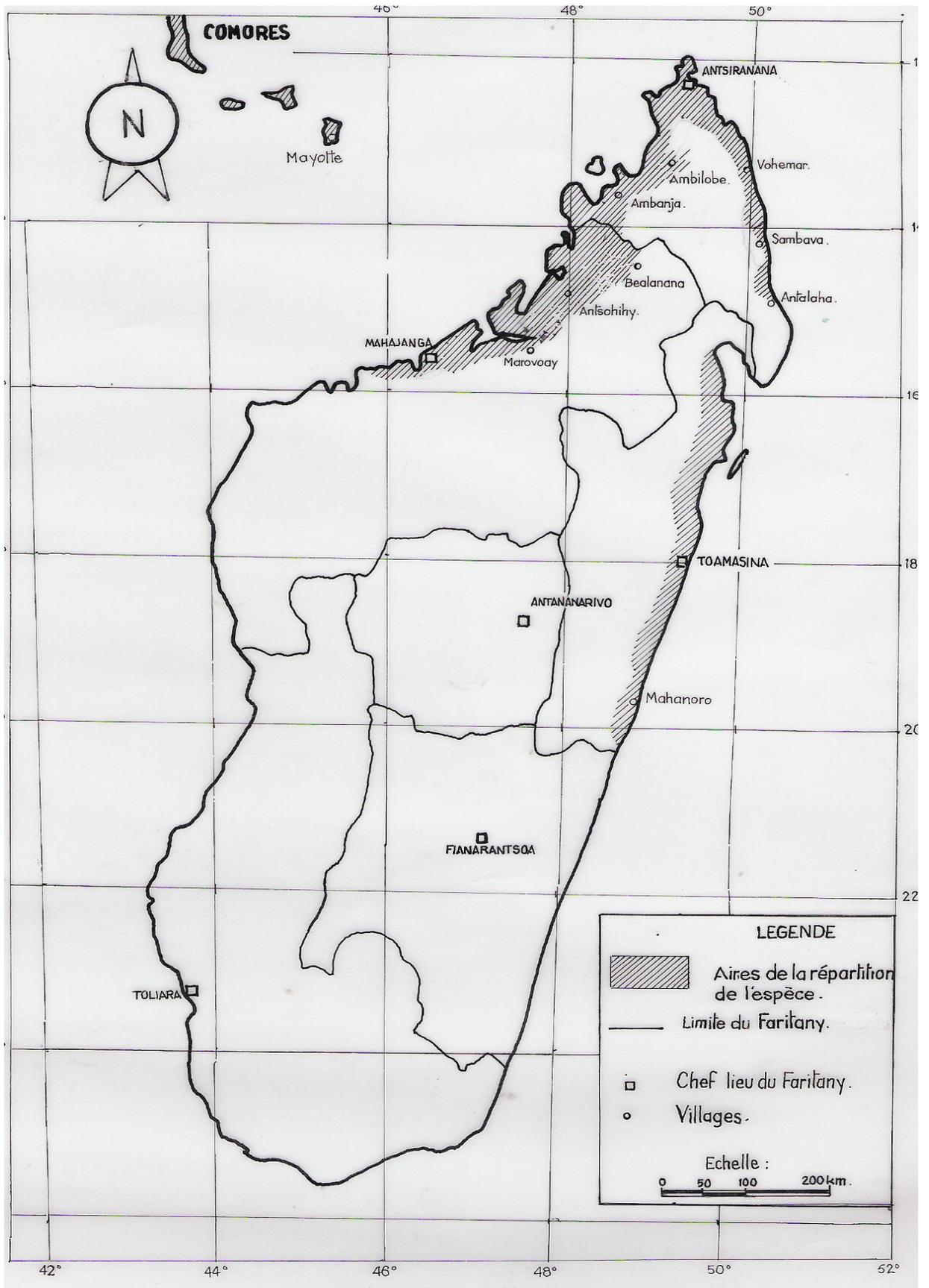


c



d

Figure n°1 : Anacardium occidentale, a) arbre ; b) feuilles ; c) fleurs ; d) fruits



(Source : Carte des limites administratives de Madagascar, FTM-1984)

Figure n° 2 : Répartition géographique de *Anacardium occidentale*

2.2-METHODES

2.2.1-METHODES D'EXTRACTION DES PRINCIPES TOXIQUES

2.2.1.1-Extraction à froid

La poudre végétale est délayée dans le solvant d'extraction (eau distillée ou mélange hydroalcoolique 75%) suivant le rapport 1/10 (P/V) (1g de poudre dans 10ml de solvant). Le mélange, soumis à une agitation magnétique durant 3h à la température ambiante, est laissé macérer à + 4° C pendant une nuit. Puis, le macérat est filtré sur quatre épaisseurs de gaze, après avoir été agité de nouveau pendant 1h. Le filtrat obtenu est centrifugé à 10000trs/min pendant 30min à l'aide d'une centrifugeuse de marque JOUAN (modèle T52). Le culot est éliminé, alors que le surnageant est concentré selon le rapport 1/1 (1ml pour 1g de matériel de départ), par évaporation du solvant d'extraction au moyen d'un évaporateur rotatif (cf. § 2.2.3 p. 13). Une deuxième centrifugation à 12 000trs/min pendant 15min, avec une centrifugeuse de marque BREMSE (modèle TH12) est faite pour éliminer le précipité apparu au cours de l'opération de concentration. Le surnageant constitue l'extrait brut.

2.2.1.2 Extraction à chaud

La poudre végétale est mise en suspension dans le solvant d'extraction (eau distillée ou mélange hydroalcoolique 75%) selon le rapport 1/10 (P/V). Le mélange est chauffé à reflux sous agitation magnétique durant 3h à 60°C. Après refroidissement, il est laissé macérer pendant une nuit à + 4°C. La suite de l'opération est identique à celle de l'extraction à froid.

2.2.2-METHODES DE PURIFICATION

2.2.2.1-Précipitation par l'acétone

2.2.2.1.1 Principe

Cette technique consiste à abaisser le pouvoir dissolvant du milieu aqueux par addition d'un solvant moins polaire miscible. Il en résulte que les substances les moins solubles précipitent.

2.2.2.1.2 Mode opératoire

Le résidu de l'extrait à traiter, obtenu après évaporation à sec, est repris dans du méthanol selon le rapport (1/4) (P/V).

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

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

2.2.2.2-Précipitation par l'éthanol 50 %

2.2.2.2.1-Principe

Le principe est le même que pour la précipitation par l'acétone (§.2.2.2.1.1. p. 9).

2.2.2.2.2-Mode opératoire

De l'éthanol est ajouté petit à petit, volume à volume à l'extrait aqueux à traiter placé sous agitation magnétique. Le mélange est laissé reposer pendant 15min à + 4°C. Une centrifugation à 12 000trs/min pendant 15min avec une centrifugeuse de marque BREMSE (modèle TH 12) est nécessaire pour bien faire sédimenter le précipité formé. Celui-ci est repris dans de l'eau distillée. L'alcool est éliminé du surnageant par évaporation.

2.2.2.3-Précipitation par l'acétate neutre de plomb (ANP)

2.2.2.3.1-Principe

L'ANP, comme la plupart des sels de métaux lourds, a la capacité de précipiter certaines macromolécules telles que les acides nucléiques, les polysaccharides des protéines, des acides organiques etc....

2.2.2.3.2-Mode opératoire

La solution d'ANP à 20% (P/V) est versée goutte à goutte dans l'extrait à traiter sous agitation magnétique. Le précipité formé est éliminé par centrifugation à 12 000trs/min pendant 10 min avec une centrifugeuse de marque BREMSE (modèle TH 12).

L'addition 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 ramené à son volume initial par évaporation.

2.2.2.4-Filtration sur charbon actif

2.2.2.4.1-Principe

Le charbon actif est un support chromatographique permettant d'adsorber un grand nombre de composés, notamment ceux à structure aromatique. Son pouvoir adsorbant est très élevé.

2.2.2.4.2-Mode opératoire

Une couche de charbon actif est déposée dans un entonnoir bouché avec des fibres de verre et adapté à une fiole reliée à une pompe à vide (JEANNODA, 1986).

La solution à traiter est déposée avec précaution sur la couche de charbon actif imprégnée d'eau distillée, puis filtrée sous pression réduite. Le filtrat incolore obtenu est filtré sur une membrane Millipore (diamètre des pores : 0,45 μ m) pour éliminer les fines particules de charbon.

2.2.2.5-Traitement par la chaleur

2.2.2.5.1-Principe

Cette méthode est utilisée pour éliminer certaines macromolécules telles que les protéines ou les acides nucléiques qui coagulent sous l'effet de la chaleur.

2.2.2.5.2-Mode opératoire

L'extrait à traiter est chauffé dans un bain-marie à 96°C pendant 15min. Le précipité est éliminé par centrifugation à 12000trs/min pendant 15min avec une centrifugeuse de marque BREMSE (modèle TH 12). Le surnageant est recueilli et le culot est éliminé.

2.2.2.6-Fractionnement par le n-butanol

2.2.2.6.1-Principe

C'est une technique d'extraction liquide-liquide basée sur le transfert d'un (ou de plusieurs) constituant(s) d'une phase liquide (phase aqueuse) vers une autre phase liquide extractive (phase butanolique) non miscible (MAHUZIER et HAMON, 1990).

2.2.2.6.2-Mode opératoire

L'extrait à tester et le n-butanol sont mélangés volume à volume dans une ampoule à décanter. Après une forte agitation manuelle, le mélange est laissé décanter jusqu'à séparation nette de deux phases : une phases supérieure butanolique et une phase inférieure aqueuse.

La phase butanolique est recueillie, tandis que la phase aqueuse est soumise à deux autres traitements identiques au premier. Les trois phases butanoliques rassemblées sont filtrées sur papier filtre, pour éliminer les éléments insolubles. Pour la phase butanolique, le butanol est évaporé après addition préalable d'un grand volume d'eau. Pour la phase aqueuse, le butanol résiduel est évaporé.

2.2.2.7-Dialyse

2.2.2.7.1-Principe

La dialyse est une technique de séparation des molécules en fonction de leur taille. Au cours de la dialyse, la membrane poreuse du boudin de dialyse joue le rôle de tamis, ce qui explique la perméabilité à certaines substances et l'imperméabilité à d'autres en fonction de leur taille. Les molécules traversent la membrane en diffusant vers le liquide de contre-dialyse (à l'extérieur de la membrane). La diffusion des grosses molécules étant

lente ou nulle, celle des petites est peu freinée par les frottements sur les parois (AUDIGIER et coll., 1982).

D'autres phénomènes peuvent aussi intervenir pendant la dialyse :

- l'adsorption de certains solutés à la membrane, entraînant des modifications locales de concentration ;
- le phénomène d'osmose.

2.2.2.7.2-Mode opératoire

La membrane de dialyse utilisée se présente sous forme de cylindre en cellophane (référence 27/32) de 3,3cm de largeur à plat, appelé boudin ou sac à dialyse. Elle laisse passer les substances dont le poids moléculaire est inférieur à 15 000Da.

Préparation de la membrane de dialyse

Le boudin à dialyse est bouilli dans de l'eau distillée pendant 15min, afin d'éliminer les glycérols, les composés sulfurés et les métaux lourds que la membrane contient. Cette opération est répétée 3 à 4 fois. Après refroidissement, le boudin ainsi préparé peut-être conservé à + 4°C pendant quelques jours dans l'eau distillée bouillie.

Avant utilisation, le boudin est de nouveau rincé à l'eau distillée.

Mise en route de la dialyse

Le boudin à dialyse contenant l'extrait à dialyser est fermé à ses extrémités par un nœud. Il est immergé dans le liquide de contre-dialyse (100 fois le volume de l'extrait à dialyser) placé dans un bécher. Une agitation magnétique de l'ensemble est nécessaire pour éviter la formation d'un gradient de concentration. La dialyse dure 24h au cours desquelles le liquide de contre-dialyse est changé 3 fois afin d'accélérer la diffusion des substances diffusibles et de maintenir la différence de concentration entre les deux milieux.

2.2.3- METHODE DE CONCENTRATION

Toutes les opérations d'évaporation de solvant et de réduction de volume d'extrait sont effectuées à 50 – 55°C à l'aide d'un évaporateur rotatif HEIDOPH. La pression est réduite au moyen d'une pompe à vide.

2.2.4-METHODES DE DETERMINATION DU RENDEMENT

L'extrait à étudier est mis dans un ballon vide préalablement séché à l'étuve à 121°C pendant 10min environ, et pesé sur une balance de précision. Le ballon rempli est ensuite placé dans un évaporateur rotatif et l'extrait est évaporé à sec. A la fin de l'opération, le ballon contenant le résidu sec est pesé. Le rendement est calculé d'après la formule suivante :

$$R = \frac{P_c - P_v}{Q} \times 100$$

R : rendement en %

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

P_v : poids du ballon vide (en g)

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

2.2.5-METHODES D'ANALYSE

2.2.5.1-Chromatographie sur couche mince

2.2.5.1.1-Principe

La chromatographie sur couche mince est une méthode simple et rapide qui permet de tester l'homogénéité des extraits. La séparation est basée sur le transfert des solutés d'une phase aqueuse stationnaire, qui est un adsorbant maintenu sur une plaque en plastique, vers une phase organique mobile qui est un solvant ou un mélange de solvants.

La vitesse de migration des substances dépend de leur affinité pour la phase mobile d'une part, et des forces d'adsorption dues au support stationnaire d'autre part (RANDERATH, 1964 ; AUDIGIER et coll., 1989 ; MAHUZIER et HAMON, 1990).

2.2.5.1.2-Mode opératoire

Dépôt des échantillons

La plaque de gel de silice (voir § 2.1.2 p. 6) est découpée aux dimensions voulues. Les extraits à analyser sont déposés au moyen d'un capillaire, sous forme de fins traits

horizontaux de 7mm espacés de 6mm, situés à 1,5cm du bord inférieur de la plaque, et à 1,3cm de chaque bord latéral. Chaque dépôt est suivi d'un séchage à l'aide d'un séchoir à main.

Développement

La plaque préparée est placée dans une cuve à chromatographie (DESAGA) préalablement saturée en vapeurs du solvant : le système butanol/acide acétique/eau distillée ou BAE 60/20/20 (P/P/P). La saturation est obtenue par application de papier filtre imbibé du solvant de migration contre les parois internes du récipient.

Le solvant migre par capillarité vers le haut de la plaque, et quand il se trouve à 0,5cm du bord supérieur, la chromatographie est arrêtée. La plaque est retirée de la cuve, puis séchée au séchoir à main.

Révélation du chromatogramme

La révélation se fait :

- ✓ par visualisation directe des substances ayant migré, sous lumière ultra-violette à 254nm et à 366nm. Les constituants apparaissent sous forme de taches fluorescentes.
- ✓ par pulvérisation du réactif à la vanilline sulfurique sur la plaque (voir la composition en *annexe 2*). Les constituants apparaissent sous forme de taches rose-violacé qui deviennent noires après chauffage à 120°C pendant 5min.

2.2.5.2 Réactions de détection des familles chimiques

(FONG et coll., 1977 ; HEMINGWAY et KARCHESY, 1989)

Pour toutes les réactions, l'extrait à analyser (1ml) est évaporé à sec.

2.2.5.2.1 Les alcaloïdes

Le résidu d'évaporation à sec de l'extrait est macéré dans 3ml d'acide chlorhydrique (HCl) 2N. La solution est répartie dans 4 tubes à essai dont le premier sert de témoin et les 3 autres sont utilisés pour la détection des alcaloïdes, respectivement à l'aide des réactifs de MAYER, de WAGNER et de DRAGENDORFF.

La composition de ces réactifs est donnée en *annexe 3*.

2.2.5.2.1.1 Test de MAYER

Le second tube est additionné de 5 gouttes de réactif de MAYER. L'apparition d'un précipité ou d'une floculation montre la présence d'alcaloïdes.

2.2.5.2.1.2 Test de WAGNER

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

2.2.5.2.1.3 Test de DRAGENDORFF

Cinq gouttes de réactif de DRAGENDORFF sont versées dans le dernier tube. Le résultat est positif s'il y a apparition d'un précipité.

Notons que si les précipités formés dans les tests précédents sont solubilisés par addition dans chaque tube de 0,5ml de mélange hydroalcoolique 80%, la présence d'alcaloïdes dans l'extrait est confirmée.

2.2.5.2.2 Les flavonoïdes et les leucoanthocyanes

Le résidu d'évaporation à sec de l'extrait à tester est repris dans 10ml de mélange hydroalcoolique 80%. La solution obtenue est répartie dans 4 tubes à essai : le premier contenant 1ml de solution sert de témoin, et les 3 autres, contenant chacun 3ml de solution, sont utilisés pour les tests.

2.2.5.2.2.1 Les flavonoïdes (test de WILSTATER)

Dans le deuxième tube, 0,5ml de HCl (12N) et 2 tournures de magnésium sont ajoutés.

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

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

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

2.2.5.2.2.2 Les leucoanthocyanes : (test de BATE-SMITH)

Dans le quatrième tube, 0,5ml de HCl 12N est versé, puis la solution est chauffée dans un bain-marie à 100°C pendant 30min.

L'apparition d'une coloration rouge après refroidissement, indique la présence de leucoanthocyanes.

2.2.5.2.3 Les tanins et les polyphénols

Le résidu d'évaporation à sec est dissous dans 3ml d'eau distillée chaude. Le mélange obtenu est réparti dans 4 tubes à essai. Le premier tube est utilisé comme témoin, les 3 autres sont destinés aux 3 tests suivants.

2.2.5.2.3.1 Test à la gélatine

Le contenu du deuxième tube reçoit 4 gouttes de gélatine à 1% (P/V). L'apparition d'une floculation blanche indique la présence d'un tanin hydrosoluble de type catéchique, dans l'extrait.

2.2.5.2.3.2 Test à la gélatine salée

Quatre gouttes de gélatine salée (10g de NaCl dans 100ml de gélatine aqueuse à 1%) sont versées dans le troisième tube. La présence de tanins condensés de type pyrogallique se traduit par la formation d'un précipité.

2.2.5.2.3.3 Test au chlorure ferrique

Quatre gouttes de chlorure ferrique 10% en solution méthanolique sont ajoutées dans le quatrième 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 de composés phénoliques différents des tanins.

2.2.5.2.4 Les anthraquinones (*test de BORNSTRÄGER*)

Le résidu sec est repris dans 1ml d'eau distillée. La solution aqueuse obtenue est mélangée à 5ml de benzène. L'ensemble est placé dans une ampoule à décanter, puis agité énergiquement. Après décantation, la phase organique (phase supérieure) est recueillie, puis mélangée avec 1ml d'ammoniaque 25%.

Après agitation, le changement de la coloration de la solution en rouge indique la présence d'anthraquinones dans l'extrait.

2.2.5.2.5 Les désoxyoses (*test de KELLER-KILIANI*)

Dans un tube à essai, le résidu sec est redissous dans 1ml de solution aqueuse de chlorure ferrique à 10% et de 4ml d'acide acétique glacial. Après une légère agitation, le mélange est additionné de 0,5ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) 4N en inclinant le tube à 45°.

L'apparition d'un anneau pourpre à l'interface montre la présence de désoxyoses.

2.2.5.2.6 Les iridoïdes

Le résidu d'évaporation à sec de l'extrait à tester est repris dans 1ml d'eau distillée. Le mélange obtenu est agité, puis ajouté de 0,5ml de HCl 12N. Le tout est chauffé au bain-marie bouillant pendant 30min. La présence d'iridoïdes est marquée par l'apparition d'une coloration bleue, après refroidissement.

2.2.5.2.7 Les stéroïdes, les triterpènes et les stérols insaturés

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

2.2.5.2.7.1 Test de LIEBERMANN-BURCHARD

Deux gouttes d'anhydride acétique sont ajoutées dans le deuxième tube. L'ensemble est agité légèrement, puis un ajout de quelques gouttes de H₂SO₄ 4N est effectué

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

- si la coloration est verdâtre, des stéroïdes sont présents ;
- si un anneau rouge ou violet apparaît à l'interface la solution contient des triterpènes.

Les 2 phénomènes peuvent être observés simultanément.

2.2.5.2.7.2 Test de SALKOWSKI

Un ml de H₂SO₄ 4N est versé dans le troisième tube incliné. L'apparition d'un anneau rouge au niveau de l'interface indique la présence de stérols insaturés.

2.2.5.2.8 Les saponines (Test de mousse)

Le résidu sec est mis en suspension dans 1 ml d'eau distillée. La solution aqueuse obtenue est soumise à une agitation énergique pendant 30s. La présence de saponines se traduit par la formation d'une mousse de 3cm de hauteur, qui persiste pendant 30min.

3 - RESULTATS

3.1 EXTRACTION

Dans cette étude, deux types d'extraction ont été réalisés : l'un à froid et l'autre à chaud. Les solvants d'extraction utilisés sont l'eau distillée et le mélange hydroalcoolique 75%.

3.1.1 EXTRACTION A FROID

3.1.1.1-Extraction aqueuse

Dix grammes de poudre de feuilles sont délayés dans 100ml (rapport 1/10 ; P/V) d'eau distillée et l'extraction se poursuit selon la méthode décrite au §.2.2.1.1. (p. 9). Le surnageant obtenu après centrifugation est concentré jusqu'au volume final de 10ml (rapport 1/1 ; P/V). L'apparition d'un précipité au cours de l'évaporation de l'extrait rend nécessaire la réalisation d'une nouvelle centrifugation à 12000trs/min pendant 15min avec une centrifugeuse de marque BREMSE (modèle TH 12). Le dernier surnageant limpide, non visqueux, de couleur marron foncé est toxique pour la souris (voir méthode d'estimation de la toxicité, (§.2.2.1.1.1.2.p. 33) : il constitue l'extrait brut (EB).

3.1.1.2-Extraction hydroalcoolique 75%

Dix grammes de poudre de feuilles sont extraits selon la méthode décrite au §. 2.2.1.1. (p. 9), le solvant d'extraction étant le mélange hydroalcoolique 75%. L'extrait brut obtenu, limpide, non visqueux, de volume final 10ml, de couleur marron foncé, est toxique pour la souris.

3.1.2 EXTRACTION A CHAUD

3.1.2.1-Extraction aqueuse

Dix grammes de poudre de feuilles sont mis en suspension dans 100ml d'eau distillée. Le mélange est chauffé à reflux en appliquant la méthode décrite au §.2.2.1.2. (p. 9). L'extrait brut obtenu, de volume 10ml, limpide non visqueux de couleur marron foncé, n'est pas toxique pour la souris.

3.1.2.2-Extraction hydroalcoolique 75%

Dix grammes de poudre de feuilles sont mis en suspension dans 100ml de solvant d'extraction (mélange hydroalcoolique 75%). Le mélange est chauffé à reflux et l'extraction se poursuit en appliquant la méthode décrite au §.2.2.1.2. (p. 9). L'extrait brut obtenu, de volume 10ml, limpide, de couleur marron clair non visqueux, est toxique pour la souris.

Les caractéristiques (pH, couleur, aspect, temps de survie des souris, etc...) des différents extraits bruts sont résumés dans le tableau n°1 (p. 21).

Tableau n°1 : Caractéristiques des extraits bruts obtenus par les différentes techniques d'extraction_

Extraction Caractéristiques des extraits bruts	Aqueuse à froid	Aqueuse à chaud	Hydro- alcoolique 75% à froid	Hydro- alcoolique 75% à chaud
Couleur	Marron foncé	Marron	Marron foncé	Marron
Consistance	Non visqueuse	Non visqueuse	Non visqueuse	Non visqueuse
Aspect	Limpide	Limpide	Limpide	Limpide
pH	5,93	5,78	5,40	5,12
Goût	Astringent	Astringent	Astringent	Astringent
Toxicité (en temps de survie)	8 à 12h	Non toxique	8 à 12h	12h
Rendement de l'extraction	13,918%	13,326%	11,73%	10,176%

Ce tableau nous montre que les extraits bruts obtenus ont à peu près les mêmes caractéristiques. Il sont tous toxiques sur souris, sauf l'extrait aqueux à chaud. La méthode d'extraction aqueuse à froid a été adoptée pour la suite des travaux, car elle donne le rendement le plus élevé, et de plus elle est la moins coûteuse.

3.2 PURIFICATION

L'extrait brut est purifié à l'aide de techniques basées sur les différences de propriétés physico-chimiques telles que la solubilité ou le poids moléculaire.

Les résultats de toutes les méthodes de purification sont rapportés ici, même si certaines d'entre elles n'ont pas été retenues dans le procédé de purification définitif. En effet, elles nous ont apporté des informations sur les propriétés physico-chimiques des principes toxiques.

Toutes ces étapes de purifications ont été guidées par des testes de toxicité sur souris (cf. §.2.2.1.1.1. p. 32) et d'homogénéité par CCM (cf. §.2.2.5.1. p. 14).

3.2.1 METHODES NON RETENUES DANS LE PROCEDE DE PURIFICATION DEFINITIF

3.2.1.1 Précipitation par l'acétone

L'extrait brut aqueux à froid de volume 2ml à été traité par l'acétone selon la méthode décrite au §.2.2.2.1. (p. 9). Nous avons obtenu un surnageant limpide, marron foncé et toxique pour la souris.

Nos principes toxiques ne sont donc pas précipitables par l'acétone. Mais cette technique n'a pas été utilisée dans le protocole de purification car il n'y a pas eu de précipité. De plus d'après la CCM, elle ne permet pas d'éliminer des contaminants.

3.2.1.2 Précipitation par l'éthanol 50%

L'extrait brut (5ml) est traité par l'éthanol 50% selon la méthode décrite au §.2.2.2.2. (p. 10). Le culot, repris dans de l'eau distillée et testé sur souris, n'est pas toxique. Le surnageant obtenu après l'opération est limpide, de couleur marron foncé. Il a provoqué 50% de mortalité sur les souris testées.

Cette technique n'a pas été retenue dans le protocole de purification car la toxicité du surnageant a fortement diminué par rapport à celle de l'extrait brut. Par conséquent, une partie de la toxicité a été éliminée par précipitation par l'éthanol 50%.

3.2.1.3 Précipitation par l'ANP

L'extrait brut de volume 2ml est traité par 0,2ml d'ANP à 20% selon la méthode décrite au paragraphe. §.2.2.2.3. (p. 10). L'excès de plomb est éliminé par 0,1ml de phosphate disodique à 10%. L'extrait obtenu, de couleur jaune clair, limpide n'est pas toxique pour la souris. Cette étape de purification n'a pas été retenue dans le procédé de purification car la toxine est sans doute précipitée par l'ANP.

3.2.1.4 Filtration sur charbon actif

L'extrait brut (2ml) est filtré sur une couche de charbon actif (4g), en appliquant la méthode décrite au paragraphe §.2.2.2.4. (p. 11). Le filtrat obtenu est incolore, mais non toxique pour la souris.

Le charbon actif adsorbe les principes actifs. Par conséquent, nous n'avons pas retenu cette technique.

3.2.2 METHODES RETENUES DANS LE PROCEDE DE PURIFICATION DEFINITIF

3.2.2.1 Traitement par la chaleur

L'extrait brut aqueux à froid, de volume 60ml, est traité par la chaleur selon la méthode décrite au paragraphe (cf. §.2.2.2.5. p. 11). Le surnageant obtenu (60ml) est limpide, de couleur marron foncé et toxique pour la souris. Il constitue l'extrait E₁.

3.2.2.2 Fractionnement par le n-butanol

L'extrait E₁ de volume 60 ml est traité trois fois par le n-butanol, selon la technique décrite au paragraphe §.2.2.2.6. (p. 12). Nous avons obtenu deux extraits :

- un extrait organique limpide, de couleur marron clair, non toxique pour la souris ;
- un extrait aqueux de couleur marron foncé, limpide et toxique pour la souris.

Nous avons retenu cette technique comme deuxième étape de purification. L'extrait aqueux est non seulement toxique, mais il ne contient que peu de contaminants en CCM. Il est dénommé extrait E₂.

3.2.2.3 Dialyse

L'extrait E₂ (60ml) est dialysé contre de l'eau distillée pendant 24h, selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.2.7. (p. 12).

Le dialysat, ou liquide à l'extérieur du boudin de dialyse, concentré à 60ml, de couleur marron clair, limpide, est non toxique pour la souris.

Le dialysant, ou adialysat, c'est-à-dire le liquide qui se trouve à l'intérieur du boudin de dialyse, de couleur marron clair, limpide, est aussi concentré aussi à 60ml. Il est toxique pour la souris et présente moins de bandes que l'extrait E₂ en CCM.

La dialyse constitue donc la troisième et dernière étape du procédé de purification et l'adialysat est appelé extrait E₃.

Le procédé de purification définitif présente donc trois étapes consécutives : un traitement par la chaleur suivi d'un fractionnement par le n-butanol et enfin une dialyse. Ce procédé est résumé sur la *figure n°3* (p. 24).

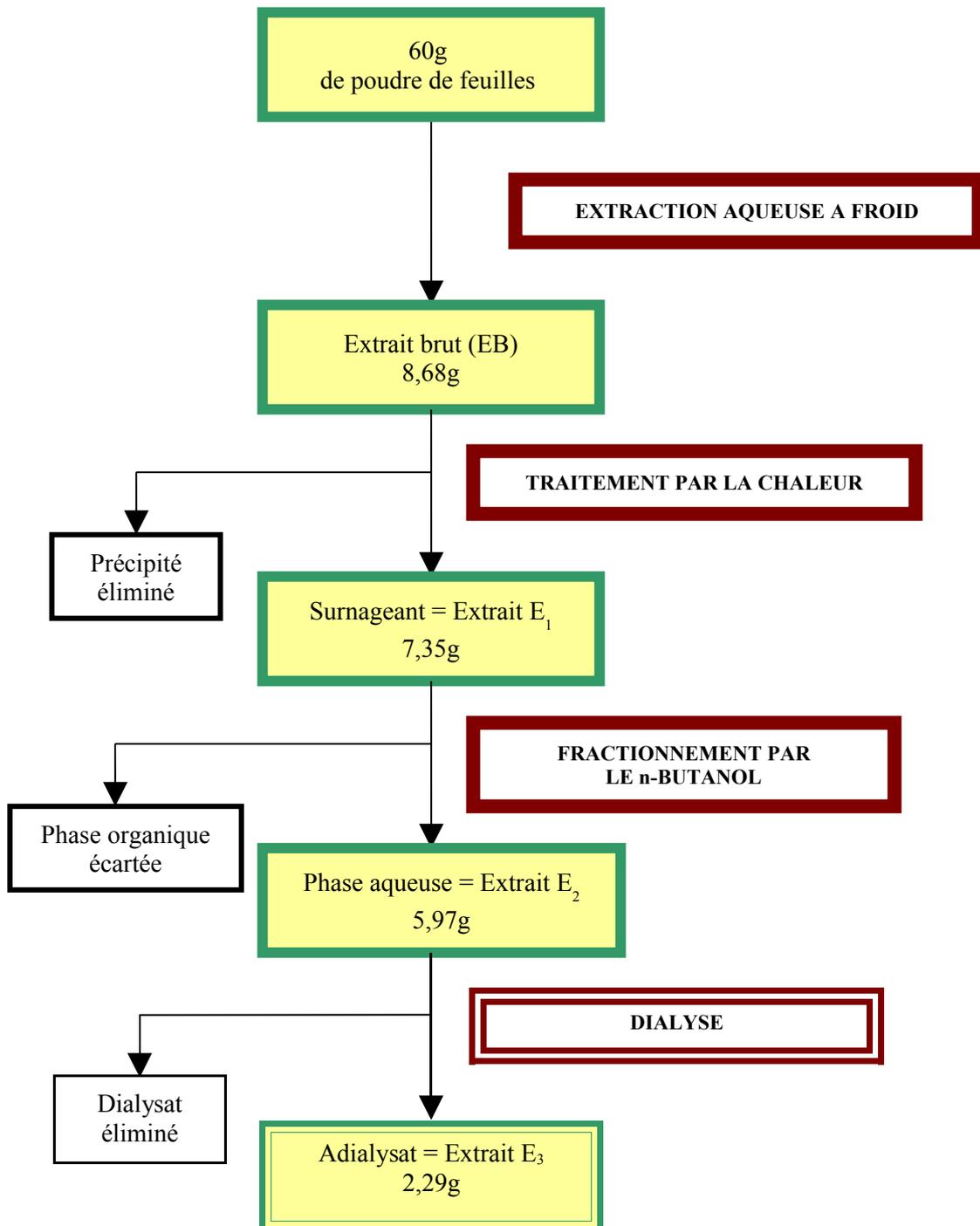


Figure n°3 : Schéma récapitulatif de l'extraction et du procédé de purification des principes toxiques de *Anacardium occidentale*.

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

3.3 DEGRE D'HOMOGENEITE DES DIFFERENTS EXTRAITS

Le chromatogramme représenté sur la *figure n°4* ci-dessous montre l'évolution de l'homogénéité des différents extraits obtenus au cours de la purification.

Après avoir été observé à la lumière ultraviolette de longueurs d'ondes égales à 254nm et 366nm, le chromatogramme est révélé par le réactif à la vanilline sulfurique (cf. § 2.2.5 p. 14). La composition du révélateur est donnée en *annexe 2*.

L'extrait brut comporte six bandes majeures révélables sous UV à 366nm, alors que l'extrait E₃ n'en présente que deux. La purification a permis d'éliminer quatre bandes majeures.

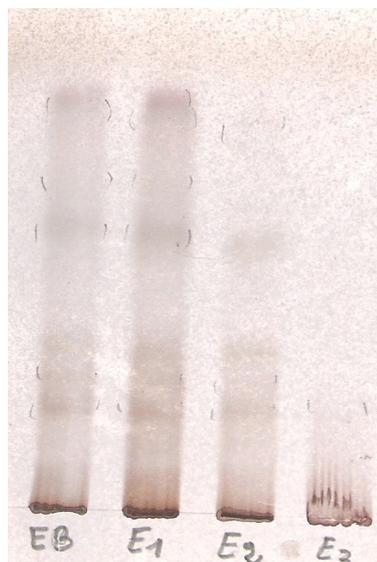


Figure n°4 : CCM des différents extraits toxiques de *Anacardium occidentale* dans le système B/A/E 60/20/20 (p/p/p).

EB = extrait brut ; E₁ = extrait E₁ (traitement par la chaleur) ;

E₂ = Extrait E₂ (fractionnement par le n-butanol) ; E₃ = Extrait E₃ (dialyse).

3.4 RENDEMENT EN TOXINES

A chaque étape de la purification, le résidu obtenu par évaporation à sec de l'extrait obtenu est pesé.

A partir de 60g de poudre de feuilles de *Anacardium occidentale*, le résidu d'évaporation à sec de l'extrait purifié E₃ pèse 2,29g. Le rendement en toxines calculé (voir méthode §.2.2.4 p. 14) à partir de la poudre de feuilles est évalué à 3,81%. Le rendement de purification calculé à partir de l'extrait brut (8,68g) est estimé à 14,47%.

3.5 CARACTERISATION CHIMIQUE

3.5.1 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Les méthodes de purification, performantes ou non, ont apporté des renseignements importants sur les propriétés physico-chimiques des principes toxiques des feuilles de *Anacardium occidentale*. Ainsi :

- Le résidu d'évaporation à sec de l'extrait E₃ se présente comme des cristaux de couleur marron foncé brillant ;
- L'extrait brut à une légère odeur et un goût astringent ;
- Les principes actifs sont solubles dans l'eau, peu solubles dans l'éthanol 50% et insolubles dans le n-butanol et dans l'acétone ;
- Ils résistent à de hautes températures et à des opérations répétées de congélation et de décongélation ;
- Ils sont incapables de traverser la membrane à dialyse (seuil de filtration inférieur à 15000Da) ;
- Ils sont précipitables par l'acétate neutre de plomb et par l'éthanol 50% ;
- Ils sont retenus par le charbon actif.

3.5.2 NATURE CHIMIQUE

Un criblage phytochimique de l'extrait brut et de l'extrait E₃ a été effectué afin de déterminer la nature chimique des principes toxiques. Les résultats sont montrés dans le *tableau n°2* (p. 27).

Tableau n°2 : Résultats du criblage phytochimique de l'extrait brut et de l'extrait E₃

Famille chimique	TEST	RESULTAT	
		Extrait brut	Extrait E ₃
Alcaloïdes	MAYER	-	-
	WAGNER	-	-
	DRAGENDORFF	-	-
Flavonoïdes	WILSTATER	+	-
Leucoanthocyanes	BATE-SMITH	+	+
Tanins	Gélatine 1%	-	-
	Gélatine salée	+	+
Polyphénols	Chlorure ferrique	+	+
Sterols insaturés	SALKOWSKI	+	-
Triterpènes	LIEBERMANN-	+	-
Stéroïdes	BÜRCHARD		
Désoxyoses	KELLER-KILLIANI	-	-
Iridoïdes	HCL concentré à chaud	-	-
Saponines	Test de mousse	-	-
Anthraquinones	BORNSTRÄGER	-	-

+ : test positif

- : test négatif

D'après le criblage phytochimique, l'extrait brut et l'extrait E₃ contiennent des tanins, des polyphénols et des leucoanthocyanes. Seul l'extrait brut réagit positivement aux tests des stérols insaturés, des flavonoïdes, des stéroïdes et triterpènes. Ces substances ont donc été éliminées lors de la purification.

4 - DISCUSSION ET CONCLUSION

L'étude chimique nous a permis de mettre en évidence la toxicité des feuilles de *Anacardium occidentale*.

A partir de l'extrait brut aqueux à froid, plusieurs méthodes de purification ont été essayées. Un procédé de purification simple comportant un traitement par la chaleur, un fractionnement par le n-butanol et une dialyse, a permis d'obtenir un extrait toxique suffisamment purifié. Le rendement en toxines est de 3,81% et le rendement de purification de 14,47%.

Du point de vue physico-chimique, les principes toxiques sont des composés thermostables. Ils sont solubles dans les solvants polaires comme l'eau, peu solubles dans l'éthanol et non solubles dans les solvants organiques tels que le n-butanol. Ils sont précipitables par les sels de métaux lourds comme l'acétate neutre de plomb, ce qui suppose qu'ils présentent des groupements acides ou qu'ils ont un poids moléculaire élevé. Incapables de traverser la membrane de dialyse, ils ont un poids moléculaire supérieur à 15000Da, à moins d'interférer avec la membrane. Ces principes toxiques auraient probablement une structure aromatique car ils sont retenus par le charbon actif.

Les propriétés physico-chimiques et les résultats du criblage phytochimique nous permettent de penser que les principes toxiques pourraient être des **tanins** de type **pyrogallique** et de type **catéchique**, des **leucoanthocyanes** ou des **polyphénols**.

Deuxième partie



1-INTRODUCTION

L'étude chimique réalisée sur les feuilles de *Anacardium occidentale* a permis d'obtenir un extrait partiellement purifié (E₃) toxique sur souris.

Dans cette partie, nous allons étudier les effets de l'extrait E₃ sur des organismes animaux, végétaux et microbiens.

Ainsi, nous avons étudié :

- la toxicité sur la souris ;
- le pouvoir hémolytique sur les hématies de mouton ;
- la toxicité sur les alevins de carpe, les têtards de grenouille et les larves de moustique ;
- la germination de graines d'espèces différentes, la croissance des jeunes plantules et le développement des bourgeons axillaires en présence de l'extrait toxique ;
- et enfin l'activité sur les micro-organismes.

Pour des raisons de commodité, l'extrait E₃ sera désormais appelé « extrait » dans les tests toxicologiques. Pour tous les tests nécessitant une quantité importante de toxines, l'extrait brut (EB) sera préférentiellement utilisé.

2-MATERIELS ET METHODES

2.1-MATERIELS

2.1.1-LES ANIMAUX D'EXPERIMENTATION

2.1.1.1-Les animaux à sang chaud

2.1.1.1.1-Les souris

Des souris blanches (*Mus musculus*) sont utilisées dans nos expériences. Elles proviennent de l'animalerie du Laboratoire de Biochimie Fondamentale et Appliquée de la Faculté des Sciences d'Antananarivo. Elles sont de race SWISS stabilisée depuis plusieurs années à l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM).

2.1.1.1.2-Le sang de mouton

Le sang de mouton utilisé pour le test hémolytique a été fourni par l'Institut Malgache de Vaccins Vétérinaires (IMVAVET) d'Ampanandrianomby.

2.1.1.2-Les animaux à sang froid

2.1.1.2.1-Les poissons

Les alevins de carpe (*Cyprinus carpio*) âgés de 2mois ont été fournis par un pisciculteur de Manjakandriana (Pisciculteur PAPY, Lauréat Fier MADA 1999). Avant le test, ces alevins sont stabilisés pendant 48h dans un aquarium aéré.

2.1.1.2.2-Les têtards de grenouille

Les têtards de grenouille (*Ptychadena mascareniensis*) au stade sans patte sont capturés dans les rizières du campus de l'Université d'Antananarivo. Les tests sont réalisés le jour même de la capture.

2.1.1.2.3-Les larves de moustique

Les larves de moustique (*Culex quinquefasciatus*) au 3^{ème} stade de développement ont été capturées dans les eaux stagnantes des environs du campus de l'université d'Antananarivo le jour du test.

2.1.2-LES VEGETAUX D'EXPERIMENTATION

Les graines utilisées au cours de ces différentes expérimentations, présentées dans le tableau n°3 (p. 31), proviennent de la collection du centre de production de semences du Foibem-Pirena momba ny Fikarohana ho amin'ny Fampanandrosoana ny eny Ambanivohitra (FOFIFA), à Ambatobe.

2.1.3-LES MICRO-ORGANISMES UTILISES

Les souches microbiennes pures utilisées pour les tests d'activité antimicrobienne des extraits toxiques, ont été fournies par le laboratoire de microbiologie du CNARP. Il s'agit :

- de bactéries Gram positif
- d'une bactérie Gram négatif

Ces micro-organismes sont présentés dans le *tableau n°4* ci-dessous.

Tableau n°3 : Graines utilisées lors des tests de toxicité sur les végétaux

Classe	Famille	Nom scientifique	Nom vernaculaire
DICOTYLEDONES	APIACEAE	<i>Daucus carotta</i>	
		<i>Petroselinium crispum</i>	Persil
	ASTERACEAE	<i>Lactuca sativa</i>	Laitue
	BRASSICACEAE	<i>Brassica sp</i>	Tissam white
	CUCURBITACEAE	<i>Cucumis sp</i>	Concombre
	FABACEAE	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Haricot
		<i>Pisum sativum</i>	Petit pois
	LILIACEAE	<i>Allium cepa</i>	Oignon
	SOLANACEAE	<i>Solanum nigrum</i>	Morelle noire
		<i>Lycopersicum esculentum</i>	Tomate
MONOCOTYLEDONES	POACEAE	<i>Oryza sativa</i>	Riz
		<i>Zea mays</i>	Maïs

Tableau n°4 : Liste des germes utilisés

Nom des germes	Gram
<i>Escherichia coli</i>	Négatif
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positif
<i>Salmonella typhi</i>	Positif
<i>Streptococcus aureus</i>	Positif

2.1.4-LES MILIEUX DE CULTURE

Les milieux de culture utilisés pour l'isolement et la purification des germes sont tous de qualité pour analyse et de marque LIOFILCHEM. Il s'agit :

- du BOUILLON NUTRITIF, un milieu liquide, qui permet de relancer la culture microbienne.
- du milieu de MUELLER-HINTON, un milieu solide, pour étudier la sensibilité des micro-organismes aux antibiotiques.

2.1.5-LES DISQUES POUR LES TESTS D'ANTIBIOGRAMME

Les disques utilisés pour les tests d'antibiogramme sont des disques de papier stériles de 6mm de diamètre. Ils sont fournis par Institut Pasteur Production.

2.1.6-LES STERILISATEURS

Il s'agit de :

- l'autoclave (Webeco) : la stérilisation des milieux de culture, des disques d'antibiogramme et des cônes des micropipettes (PIPETMAN) se fait à l'aide de cet appareil à 121°C pendant 20min ;
- l'étuve (JOUAN) : la verrerie (boîtes de Pétri, tubes...) et les pinces y sont stérilisées à 121°C pendant 30min.

2.2-METHODES

2.2.1-METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES ANIMAUX

2.2.1.1-Méthodes d'étude des effets sur les animaux à sang chaud

2.2.1.1.1-Test sur souris

2.2.1.1.1.1-Influence des voies d'administration

La vitesse de pénétration des principes toxiques chez un organisme animal et leurs effets varient en fonction des voies d'administration. La voie intrapéritonéale (ip) et la voie orale (gavage) sont testées.

- Voie intrapéritonéale (ip)

La nuque de la souris est maintenue entre le pouce et l'index, et la queue entre les autres doigts d'une main. L'autre main injecte l'extrait à tester dans la partie abdominale gauche ou droite de la souris, l'animale est secouée légèrement après l'injection.

- Voie orale (gavage)

Pour cette voie d'administration, l'animal est tenu verticalement et l'aiguille à gaver est introduite dans la bouche de l'animal jusqu'à l'estomac, l'extrait est alors injecté lentement.

2.2.1.1.1.2-Estimation de la toxicité sur souris

La toxicité est déterminée par injection par voie ip ou par voie orale (gavage) de l'extrait à tester. Pour chaque voie, un volume de 0,3ml est injecté à un lot de 3 souris de 25g. Les animaux sont observés pendant 24h.

Pour chaque test, un lot de 3 souris ayant reçu 0,3 ml de sérum physiologique sert de témoin.

2.2.1.1.1.3-Détermination de la DL₅₀ (24h)

La DL₅₀ (24h) ou dose provoquant la mort de 50% des animaux testés pendant 24h est estimée par la méthode REED et MUENCH (1938).

Plusieurs doses d'extrait à tester, en progression géométrique de raison R sont préparées. La première dose est la dose la plus élevée donnant 0% de mortalité et la dernière dose est la dose la plus faible donnant 100% de mortalité.

La DL₅₀ peut être déterminée de deux façons :

- une méthode algébrique utilisant la formule suivante :

$$\text{Log DL}_{50} = \log B + \frac{(0,5 - N)}{(M - N)} \log R$$

Où :

B : dose immédiatement inférieure à la DL₅₀

N : mortalité provoquée par la dose B (exprimée en fonction décimale)

M : mortalité provoquée par la dose immédiatement supérieure à la DL_{50} (en fonction décimale)

R : raison de la progression géométrique

- une méthode graphique par laquelle la DL_{50} est déterminée à partir de l'intersection de la courbe des totaux cumulatifs des souris survivantes et celle des totaux cumulatifs des souris mortes en fonction des doses injectées. La projection de ce point d'intersection sur l'axe des abscisses donne la DL_{50} .

2.2.1.1.2-Test hémolytique

2.2.1.1.2.1-Principe

L'hémolyse est due aux substances hémolytiques comme les saponines qui ont le pouvoir de se lier avec les hématies entraînant l'éclatement de celle-ci, et la libération de leur hémoglobine dans le surnageant (BRUNETON, 1987).

2.2.1.1.2.2-Mode opératoire

Une suspension de sang de mouton subit trois lavages successifs avec du sérum physiologique. A chaque lavage, une centrifugation à 5000trs/min avec une centrifugeuse de marque JOUAN (modèle T52) pendant 5min est nécessaire. Après la dernière centrifugation, le surnageant est éliminé par simple aspiration, tandis que le culot est récupéré. Le culot obtenu au cours du troisième lavage constitue les 100% d'hématies. Le mélange volume à volume de sérum physiologique et du culot permet d'obtenir une suspension d'hématies à 50%. 0,2ml de cette dernière est additionné de 4,8ml de PBS (phosphate buffered saline) pour obtenir une suspension à 2%.

La composition du tampon PBS est donnée en annexe5.

L'extrait à tester est dilué en cascade avec du PBS (coefficient de dilution 0,5) dans les cupules en forme de V d'une microplaque, pour avoir différentes concentrations décroissantes (volume final 50 μ l) (voir tableau n°5 ci-dessous).

Une suspension d'hématies à 2% de volume 50 μ l est additionnée dans les cupules.

Deux témoins sont utilisés :

✓ Un témoin positif (T⁺) constitué de 50µl d'eau distillée et de 50µl de suspension d'hématies à 2 %. Ce mélange présente une hémolyse totale.

✓ Un témoin négatif (T⁻) constitué de 50µl de PBS de 50µl de suspension d'hématies à 2 %. Aucune hémolyse n'est observée dans ce mélange.

Tableau n°5 : Composition du milieu pour le test hémolytique.

Puits n°	T ⁺	T ⁻	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Extrait (µl) à tester	0	0	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,19	0,09
PBS (µl)	0	50		25	37,5	43,75	46,87	48,44	49,22	49,61	49,81	49,91
Eau distillée (µl)	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Concentration finale (mg/ml)	0	0	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,0155	0,0077	0,004	0,002
Suspension d'hématies à 2%.	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Volume total (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

T⁺: témoin positif

T⁻ : témoin négatif

La plaque est recouverte, puis incubée à l'étuve à 37° C pendant 3h et ensuite à +4°C pendant une nuit.

La lecture des résultats se fait le lendemain à l'œil nu:

- Le test est positif si la solution est colorée en rouge (hémolyse totale) ;
- Le test est négatif si la solution est incolore et si un culot d'hématies se dépose au fond du puits (absence d'hémolyse) ;
- Une hémolyse partielle est observée si le surnageant se colore en rouge et des hématies intactes se déposent au fond du puits.

Le test se fait en deux exemplaires.

2.2.1.2-Méthodes d'étude des effets sur les animaux à sang froid

2.2.1.2.1-Principe

Cette technique consiste à tester la résistance d'animaux aquatiques vis-à-vis de l'addition de l'extrait à étudier dans leur milieu.

2.2.1.2.2-Mode opératoire

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

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

(BOYD, 1966)

La CL₅₀ (24h) ou concentration létale qui tue 50% des animaux testés en 24h, est déterminée graphiquement, en appliquant la régression linéaire de la relation suivante :

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

Où : C : concentration en mg/ml

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

$$Y = A + BX$$

Où Y : pourcentage de mortalité
 A : une constante
 B : coefficient de régression
 X : logarithme de la concentration

2.2.1.2.3.1-Test sur les alevins de carpe

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

2.2.1.2.3.2-Test sur les têtards de grenouille

Sept concentrations en progression géométrique de l'extrait à étudier sont testées sur 7 lots de 10 têtards de grenouille sans patte.

2.2.1.2.3.3-Test sur les larves de moustique

(OMS, 1970)

Le test est effectué sur des larves de moustique *Culex quinquefasciatus* : 5 lots de 7 larves au stade trois de développement sont utilisés. Ces larves sont prélevées au moyen d'un tamis et placées dans un récipient contenant 200ml de l'eau de pluie avec différentes concentrations de l'extrait à tester. Un autre lot placé dans de l'eau de pluie sert de témoin.

Le dénombrement des larves mortes est fait au bout de 24h. Pour calculer le pourcentage de mortalité à chaque concentration de l'extrait à tester, on additionne le nombre de larves moribondes et de larves mortes.

Les larves sont considérées comme :

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

2.2.2-METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES VEGETAUX

2.2.2.1-Effets sur le pouvoir germinatif des graines

Pour chaque espèce de graines étudiées, présentées dans le *tableau n°3* (p. 31), nous avons trempé en parallèle 2 lots de graines dans de l'eau de robinet pendant 24h à l'obscurité et à 30° C. Le premier lot est ensuite mis à germer sur du coton imbibé d'eau (témoin), tandis que le deuxième lot est mis à germer sur du coton imprégné de l'extrait à tester de concentration déterminée.

Les résultats sont observés 72h après le trempage.

2.2.2.2-Effets sur la croissance des jeunes plantules

De jeunes plantules âgées de 4 jours, issues de graines des représentants des deux classes (Monocotylédones et Dicotylédones), sont utilisées.

2.2.2.2.1-Principe

Cette méthode est basée sur l'observation des effets de l'extrait à étudier à différentes concentrations sur le développement des hypocotyles et des épicotyles des graines mises à germer en présence de l'extrait à étudier.

2.2.2.2.2-Mode opératoire

L'expérience se déroule en deux étapes : le trempage et la germination.

2.2.2.2.2.1-Trempage

Neuf lots de 10 graines sont utilisés. Deux d'entre eux sont trempés dans l'extrait à tester à une concentration déterminée et les 7 lots restants sont trempés dans l'eau de robinet.

L'ensemble est placé à l'obscurité à 30° C pendant 48h.

2.2.2.2.2.2-Germination

Après le trempage, chaque lot est lavé à l'eau de javel 10% pour désinfecter les graines, puis celles-ci sont transférées dans des boîtes de Pétri contenant du coton imprégné d'eau.

Après lavage, l'un des deux lots trempés dans l'extrait à étudier est mis à germer dans le même extrait, tandis que le deuxième lot est placé sur du coton imbibé d'eau de robinet.

Six lots parmi les sept autres trempés dans l'eau sont mis à germer en présence de l'extrait à tester à différentes concentrations et le dernier servant de témoin est mis à germer dans de l'eau.

L'estimation des effets sur la croissance des plantules est effectuée par la mesure de la longueur des hypocotyles et des épicotyles, tous les deux jours pendant deux semaines. Chaque expérience est faite en double.

2.2.2.3-Effets sur le développement des bourgeons axillaires

(HELLER et coll., 1995)

Dans cette expérience, on utilise comme matériel végétal des jeunes plantules de petit pois, âgées de deux semaines.

Ces jeunes plantules sont obtenues après trempage à l'eau et germination des graines en présence d'eau, selon les mêmes conditions décrites dans le §. 2.2.2.2.2 ci-dessus.

L'expérience est effectuée sur 5 lots de 5 jeunes plantules préalablement décapitées au-dessus du deuxième bourgeon axillaire. Les solutions à analyser, de volume 1µl, sont mélangées avec de la lanoline puis déposées sur la partie sectionnée des plantules :

- ⇒ le premier lot qui sert de témoin positif, reçoit 50µg de gibbérelline, une hormone végétale qui stimule la croissance des bourgeons axillaires ;
- ⇒ le deuxième lot, utilisé comme témoin négatif, reçoit 50µg d'auxine, hormone qui inhibe la croissance des bourgeons axillaires ;
- ⇒ le troisième lot reçoit 1µl d'eau distillée ;
- ⇒ les autres lots reçoivent 50µg d'extrait à tester ;

Les résultats sont observés pendant une semaine et l'effet des substances à analyser se traduit par l'inhibition ou la stimulation du développement du bourgeon axillaire.

2.2.3-METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LA CROISSANCE DES MICRO-ORGANISMES

Les effets des extraits sur les micro-organismes sont étudiés selon les techniques de mesure de sensibilité aux antibiotiques. Il s'agit :

- du test de l'antibiogramme : par la méthode de diffusion en milieu solide ou la méthode des disques ;
- de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide.

2.2.3.1-Identification des germes

2.2.3.1.1-Méthode de coloration GRAM

2.2.3.1.1.1-Principe

La coloration GRAM se base sur la propriété du Cristal violet de se combiner avec l'iode, formant des composés non décolorables avec l'alcool ou avec le mélange

alcool-acétone. Certaines bactéries ont une affinité spéciale pour le Cristal violet et, une fois colorées avec ce colorant, demeurent colorées en bleu même si elles sont traitées avec l'alcool ou avec le mélange alcool-acétone (bactéries Gram positif). D'autres perdent la couleur bleue et prennent une coloration rouge en présence de la solution Safranine (bactéries Gram négatif).

2.2.3.1.1.2-Mode opératoire

2.2.3.1.1.2.1-Préparation et fixation

La souche à étudier est mise en suspension dans trois gouttes d'eau distillée. Un prélèvement de la suspension ainsi obtenue est étalé sur une lame en verre. Le frottis est séché à l'air et fixé à la chaleur à proximité de la flamme d'un bec Bunsen tout en évitant l'excès de chaleur.

2.2.3.1.1.2.2-Coloration

- La lame est recouverte de la solution Cristal violet pendant une minute puis lavée délicatement à l'eau ;
- Elle est ensuite recouverte de la Solution Lugol-PVP (polyvinylpyrrolidone), puis lavée délicatement à l'eau après une minute d'attente;
- La lame est en suite décolorée avec la solution Décolorante jusqu'à ce que la préparation libère un colorant (environ 30-60s) : Elle est ensuite lavée délicatement à l'eau distillée ;
- Pour terminer, la préparation est recouverte de solution Safranine pendant 30 à 60s et lavée délicatement à l'eau distillée. Le frottis est essuyé, puis recouvert de 3 gouttes d'huile d'immersion. La lame est observée sous microscope optique (grossissement x100).

Selon leur coloration, les germes sont classés :

- en bactéries GRAM positif, pour celles colorées en bleu ;
- en bactéries GRAM négatif, pour celles colorées en rouge.

Notons que les colonies à soumettre à la coloration GRAM doivent être prélevées de cultures jeunes (18-24h), de préférence sur milieux gélosés (RICHARD et KIREDJIAN, 1995).

Les solutions qui composent le kit GRAM sont toutes des solutions aqueuses, excepté la solution décolorante. Leur composition est présentée en annexe 6.

2.2.3.2- Etude de l'activité antimicrobienne des extraits

Pour déterminer la sensibilité d'un micro-organisme aux agents antimicrobiens, nous avons utilisé la méthode des disques sur milieu solide (milieu de MUELLER-HINTON), connu sous le nom de test d'antibiogramme.

2.2.3.2.1 Principe

Un antibiotique déposé sur un disque à la surface de la gélose uniformémentensemencée avec le germe à étudier, diffuse dans le milieu en créant une zone circulaire autour du disque imprégné d'antibiotique. Dans cette zone, les concentrations de l'antibiotique diminuent du centre vers la périphérie. L'activité antimicrobienne est caractérisée par l'inhibition de la croissance du germe dans la zone circulaire. Le diamètre de ce halo d'inhibition est fonction du degré de sensibilité du germe à l'antibiotique (DUVAL et SOUSSY, 1990 ; FERROT, 1990 ; BERCHE et coll., 1991).

2.2.3.2.2-Mode opératoire

- **Premier jour** : la souche pure conservée sur gélose pente est mise en suspension dans du bouillon nutritif puis relancée à 37°C dans un bain-marie sous agitation pendant 24h.

- **Deuxième jour** : une dilution de 10^{-3} est faite sur la préculture précédente de manière à obtenir une suspension bactérienne contenant environ 10^5 cellules/ml. La suspension ainsi préparée estensemencée uniformément selon la technique d'inondation dans une boîte de Pétri contenant du milieu de MUELLER-HINTON. Le tout est incubé à 37°C pendant 15 à 20min afin que les germes puissent bien adhérer à la surface de la gélose. L'excès d'inoculum est ensuite aspiré avec une pipette stérile. Des disques d'antibiogramme préalablement imbibés de 20µl d'extrait à tester, de concentration bien déterminée, sont déposés à l'aide d'une pince fine à la surface du milieuensemencé. Enfin la préparation est incubée à 37°C pendant 24h.

- **Troisième jour** : la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre du halo d'inhibition formé autour de chaque disque.

Les normes utilisées dans l'expression des résultats des tests en milieu solide sont présentées dans le *tableau n°6*.

Tableau n°6 : Normes utilisées pour l'expression des résultats obtenus par la méthode des disques (normes utilisées par l'IPM)

Diamètre du halo (x)	Résultat	Sensibilité du germe
$x < 7\text{mm}$	-	Insensible
$7\text{mm} < x < 8\text{mm}$	+	Assez sensible
$8\text{mm} < x < 9\text{mm}$	++	Sensible
$x > 9\text{mm}$	+++	Très sensible

2.2.3.3-Détermination de la CMI par la méthode des disques

La Concentration Minimale Inhibitrice ou CMI est la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle on a une inhibition de la croissance bactérienne après 24h d'incubation. De ce fait, plusieurs concentrations sont préparées par dilution en cascade de l'extrait à étudier. La suite de la manipulation est la même que celle décrite au §.2.2.3.2.2 ci-dessus.

3-RESULTATS

3.1-EFFETS SUR LES ANIMAUX

3.1.1-EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG CHAUD

3.1.1.1-Effets de l'extrait sur les souris

3.1.1.1.1-Influence des différentes voies d'administration

Deux types de voie d'administration ont été testés sur les souris pour l'extrait E₃ (ou extrait) selon la méthode décrite au §. 2.2.1.1.1.1 (p. 32). Les réactions des souris varient selon la voie d'administration. Les résultats sont montrés dans le *tableau n°7* ci-dessous.

Tableau n°7 : Influence de la voie d'administration

Voie d'administration	intrapéritonéale	orale
Résultats	Mort au bout de 3h	Aucun symptôme d'intoxication

3.1.1.1.2-Description des symptômes

L'administration de l'extrait E₃ (extrait) par voie ip, à la dose létale 349,8mg/kg entraîne chez la souris, l'apparition des symptômes suivants :

- Juste après l'injection, les souris présentent des contorsions de l'abdomen et traînent leurs pattes postérieures ;
- Dix minutes après l'injection, elles respirent profondément et leur activité motrice diminue ;
- Une hyperhémie au niveau des pavillons des oreilles apparaît après 30min ;
- Après 1h15min, l'hypoactivité s'accroît, les animaux restent immobiles et se pelotonnent dans un coin ;
- Une piloérection générale et une enophtalmie sont observées au bout de 2h ;
- Après 2h 25min, des convulsions cloniques apparaissent et deviennent de plus en plus intenses, entraînant la mort des souris au bout de 3h.

L'injection de l'extrait à la dose sub-létale 246,576mg/kg provoque chez la souris les mêmes symptômes que la dose létale, sans les convulsions. Une rémission progressive est observée à partir de la 12^{ème} heure.

3.1.1.1.3-Détermination de la DL₅₀ (24h)

La DL₅₀ (24h) est déterminée selon la méthode de REED et MUENCH, 1938 (cf. §.2.2.1.1.1.3. p. 31). Pour cela sept doses en progression géométrique de raison R=1,06 et allant de la DL₀ = 246,576mg/kg à la DL₁₀₀ = 349,8mg/kg sont utilisées. Un lot témoin formé de 5 souris est nécessaire.

Les résultats expérimentaux sont résumés dans le tableau n°8.

Tableau n°8 : Résultats de la détermination de la DL₅₀ (24h) chez la souris

Dose en mg/kg de souris	Nombre de décès après								Total des décès	Total des survivantes	% de mortalité
	3h	5h	8h	12h	16h	19h	22h	24h			
246,576	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
261,372	0	0	0	0	0	0	1	0	1	4	20
277,056	0	0	0	0	1	0	1	0	2	3	40
293,688	0	0	0	0	2	1	0	0	3	2	60
330	0	2	0	1	1	0	0	0	4	1	80
331,316	1	0	1	0	2	0	0	0	4	1	80
349,8	2	0	2	1	0	0	0	0	5	0	100

D'après la formule de REED et MUENCH (cf. §.2.2.1.1.1.3. p. 33),
 $B=277,056\text{mg/kg}$; $N = 40\%$ soit 0,4 ; $M = 60\%$, soit 0,6 et $R = 1,06$.

La valeur de la DL_{50} est ainsi évaluée à **283,465mg/kg**.

Avec la représentation graphique de ces mêmes auteurs, elle est estimée à **281,56mg/kg** (*tableau n°9, figure n°5*, p. 45).

La DL_{50} (24h) est donc comprise entre **281,56mg/kg** et **283,465mg/kg**

Tableau n°9 : Résultats expérimentaux pour l'estimation de la DL_{50} (24h) de E_3 sur souris par la méthode graphique des totaux cumulatifs

Dose en mg/kg de souris	Nombre de souris	Nombre de souris survivantes	Nombre de souris mortes	Totaux cumulatifs des souris survivantes	Totaux cumulatifs des souris mortes
246,576	5	5	0	16	0
261,372	5	4	1	11	1
277,056	5	3	2	7	3
293,688	5	2	3	4	6
330	5	1	4	2	10
331,316	5	1	4	1	14
349,8	5	0	5	0	19

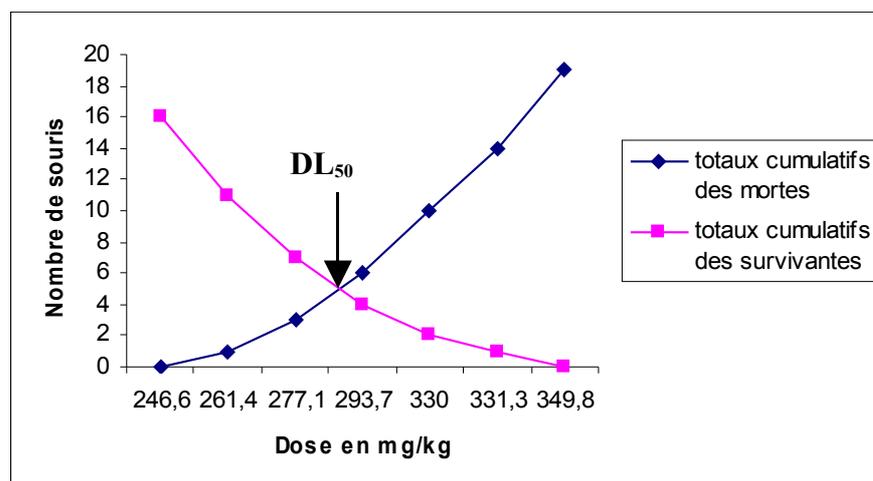


Figure n°5 : Détermination de la DL₅₀ (24h) par la méthode graphique de REED et MUENCH (1938)

3.1.1.2-Effets de l'extrait brut et de l'extrait sur les hématies de mouton

Le pouvoir hémolytique de l'extrait brut (EB) et de l'extrait a été testé sur une suspension d'hématies de mouton à 2% (voir méthode au §.2.2.1.1.2. p. 34). Les résultats sont présentés dans le *tableau n°10* ci-dessous.

Tableau n°10 : Résultats des tests hémolytiques de l'extrait brut et de l'extrait à différentes concentrations

Concentration (mg/ml)	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,008	0,004	0,002
Extrait brut	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-
Extrait	++	++	++	++	+	+	+	-	-	-

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

L'effet hémolytique est variable selon la concentration des extraits étudiés. Ainsi on obtient :

- une hémolyse totale à des concentrations supérieures ou égales à 0,25mg/ml pour l'extrait brut et 0,125mg/ml pour l'extrait.
- une hémolyse partielle avec sédimentation des hématies intactes à des valeurs comprises entre 0,062mg/ml et 0,125mg/ml pour l'extrait brut et entre 0,015mg/m et 0,062mg/ml pour l'extrait.
- une absence d'hémolyse à des concentrations inférieures ou égales à 0,031mg/ml pour EB et 0,008mg/ml pour l'extrait.

Ces résultats nous montrent qu'au cours de la purification, l'activité hémolytique a augmenté. Ces résultats sont visibles sur la *figure6* ci-dessous.

Le test est effectué en présence de deux témoins, l'un positif (T⁺) et l'autre négatif (T⁻)

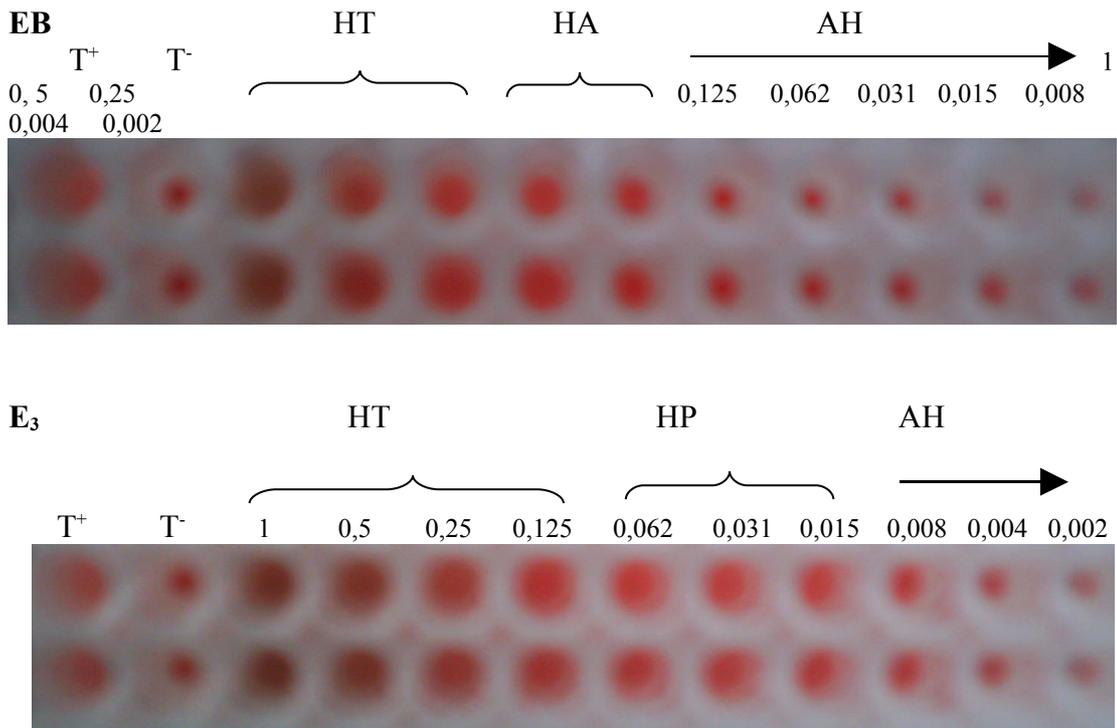


Figure n°6 : Effets des différentes concentrations de l'extrait brut et de l'extrait sur les hématies de mouton

T⁺ : témoin positif

HT : hémolyse totale

AH : aucune hémolyse

T⁻ : témoin négatif

HP : hémolyse partielle

3.1.2-EFFETS DE L'EXTRAIT BRUT SUR LES ANIMAUX A SANG FROID

3.1.2.1-Effets sur les alevins de carpe

Sept concentrations de EB allant de 8,73µg/ml à 34,94µg/ml (en progression géométrique de raison $r = 1,26$) sont testées sur 7 lots de 6 alevins de carpe âgés de trois mois.

EB est toxique sur les alevins de carpe et on observe un effet dose.

Les résultats sont présentés dans le *tableau n°11*.

Tableau n°11 : Effets des différentes concentrations de l'extrait brut sur les alevins de carpe

Lot n°	Concentration en $\mu\text{g/ml}$	Logarithme des concentrations (log C)	Nombre des alevins		% de mortalité
			morts	survivants	
1	8,73	0,941	0	6	0
2	11	1,041	1	5	16,66
3	13,86	1,142	2	4	33,33
4	17,46	1,242	2	4	33,33
5	22	1,342	4	2	66,66
6	27,73	1,443	5	1	83,33
7	34,94	1,543	6	0	100

L'équation de la droite de régression linéaire est $Y = -27,94 + 3,79X$ avec un coefficient de corrélation $R = 0,98$.

D'après cette équation, la CL_{50} (24h) est évaluée à **20,01 $\mu\text{g/ml}$** .

3.1.2.2-Effets sur les têtards de grenouille

Sept concentrations de EB allant de 17,89 $\mu\text{g/ml}$ à 68,26 $\mu\text{g/ml}$ (en progression géométrique de raison $r = 1,25$) sont testées sur 7 lots de 10 têtards de grenouille sans patte.

EB exerce une activité toxique sur les têtards de grenouille et un effet dose est observé.

Les résultats sont représentés dans le tableau n°12.

Tableau n°12 : Effets des différentes concentrations de l'extrait brut sur les têtards de grenouille

Lot n°	Concentration en $\mu\text{g/ml}$	Logarithme des concentrations (Log C)	Nombre des têtards de grenouille		% de mortalité
			morts	survivants	
1	17,89	1,552	0	10	0
2	22,36	1,349	1	9	10
3	27,95	1,449	3	7	30
4	34,94	1,543	4	6	60
5	43,68	1,640	7	3	70
6	54,60	1,737	8	2	80
7	68,26	1,834	10	0	100

L'équation de la droite de régression linéaire est $Y = -30,60 + 2,01X$ avec un coefficient de corrélation $R = 0,98$.

D'après cette équation, la CL_{50} (24h) est évaluée à **39,94 μ g/ml**.

3.1.2.3-Effets sur les larves de moustique

Cinq concentrations de l'extrait brut allant de 0,136mg/ml à 2,184mg/ml sont utilisées pour le test, (§.2.1.1.3. p. 37).

Aucune mortalité ni morbidité n'est observée au bout de 24h. On peut dire qu'à la concentration de 2,184mg/ml, l'extrait brut n'a aucun effet sur les larves de moustique.

3.1.4-EFFETS DES EXTRAITS SUR LES VEGETAUX

3.1.4.1-Effets de l'extrait brut sur le pouvoir germinatif de graines

Le but de cette expérience consiste à déterminer les effets de l'extrait brut sur le pouvoir germinatif de diverses graines selon la méthode décrite au §.2.2.2.1 (p. 37)

Les graines utilisées sont trempées dans de l'eau de robinet, puis mises à germer en présence de EB à une concentration unique de 1mg/ml. Les résultats sont donnés dans le tableau n°13 ci-dessous.

Tableau n°13 : Effets de l'extrait brut sur la germination des graines de quelques espèces des plantes potagères

Famille	Nom scientifique	Nom vernaculaire	% de germination	% d'inhibition
APIACEAE	<i>Daucus carotta</i>	Carotte	60	30
	<i>Petroselinium crispum</i>	Persil chinois	30	60
ASTERACEAE	<i>Lactuca sativa</i>	Laitue	100	0
BRASSICACEAE	<i>Brassica sp</i>	Tissam white	80	20
CUCURBITACEAE	<i>Cucumis sp</i>	Concombre	100	0
FABACEAE	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Haricot blanc	80	20
	<i>Pisum sativum</i>	Petit pois	100	0
LILIACEAE	<i>Allium cepa</i>	Oignon	10	90
SOLONACEAE	<i>Solanum nigrum</i>	Morelle noire	0	100
	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Tomate	90	10
POACEAE	<i>Oryza sativa</i>	Riz	100	0
	<i>Zea mays</i>	Maïs	90	10

Ce tableau montre que la sensibilité des graines vis-à-vis de EB est variable. Sur les 12 espèces de graines testées, 4 espèces (laitue, concombre, petit pois et le riz) sont insensibles et germent normalement comme le lot témoin. Une inhibition de la germination est observée, allant de 10% (pour la tomate et le maïs) à 100% (pour la morelle noire).

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

Dans cette expérience, nous avons évalué les effets de EB à des doses plus élevées sur un représentant des Monocotylédones (le riz) et un représentant des Dicotylédones (le petit pois). Nous avons voulu vérifier si l'absence ou le peu d'effets de l'extrait brut à 1mg/ml sur ces deux plantes n'est pas du à une question de dose. L'expérience se déroule selon la méthode décrite au §.2.2.2.2 (p. 37).

Neuf lots de 10 graines sont utilisés pour les plantes (riz et petit pois) : 2 lots sont trempés dans EB à 8,737mg/ml, alors que 6 parmi les 7 lots restants trempés dans l'eau, sont mis à germer en présence de différentes concentrations allant de 0,273mg/ml à 8,737mg/ml voir *figure n°7* ci-dessous. Le dernier lot toujours arrosé d'eau de robinet sert de témoin.

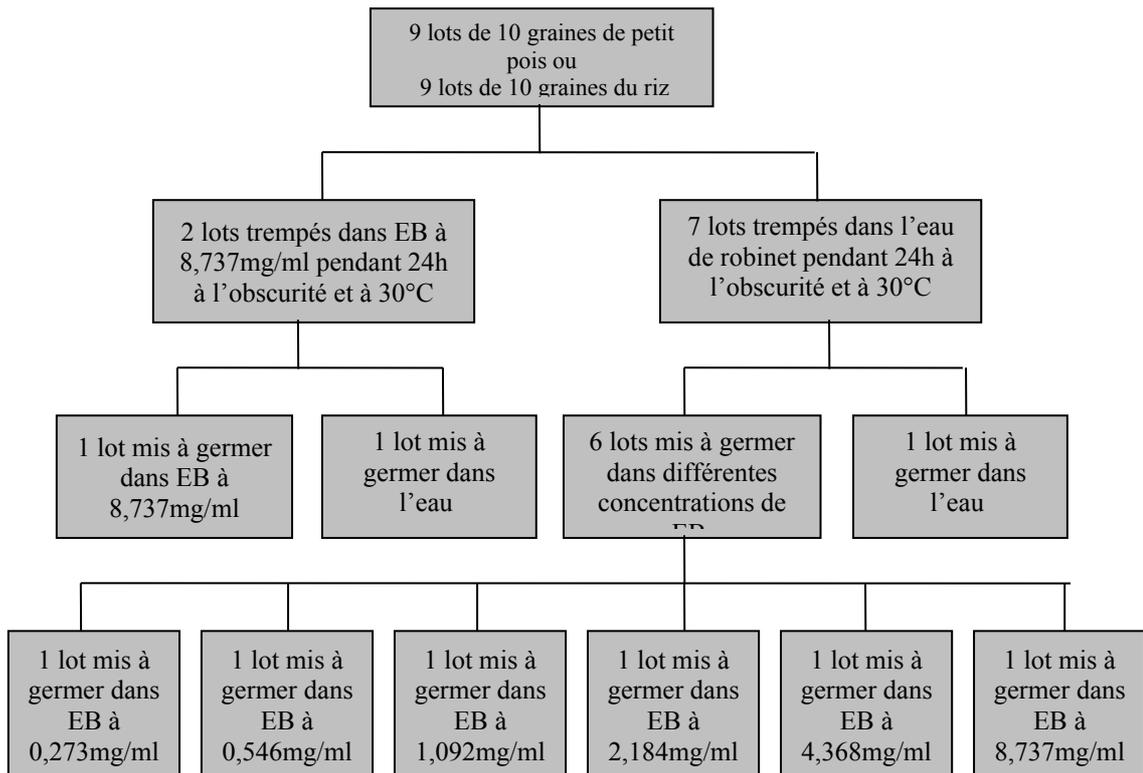


Figure n°7 : Schéma récapitulant les différentes étapes de l'étude des effets de l'extrait brut sur la croissance des jeunes plantules

- Pour les lots trempés dans EB à 8,737mg/ml et mis à germer en présence de ce même extrait, l'épicotyle germe lentement et l'hypocotyle ne germe pas. Par contre, celui mis à germer dans l'eau, après lavage, germe mais avec un petit retard par rapport au témoin.
- Quant aux lots trempés dans l'eau de robinet, puis mis à germer dans différentes concentrations de EB, l'inhibition est proportionnelle à la dose pour les deux espèces : au 15^{ème} jour, elle va de 11,54% (0,273mg/ml) à 78,46% (8,737mg/ml) pour l'hypocotyle du riz et de 10% (0,273mg/ml) à 80,35% (8,737mg/ml) pour l'épicotyle ; Pour l'épicotyle du petit pois elle va de 19,23% (0,273mg/ml) à 87,72% (8,737mg/ml) et de 11,81% (0,273mg/ml) à 88,18% (8,737mg/ml) pour l'hypocotyle.

L'évolution de la longueur des épicotyles et des hypocotyles est montrée sur les *figures n°8 à 11* (p. 51 et 52), et les taux d'inhibition au 15^{ème} jour de l'expérience, en fonction de la concentration, sont donnés dans le *tableau n°14*.(p. 53)

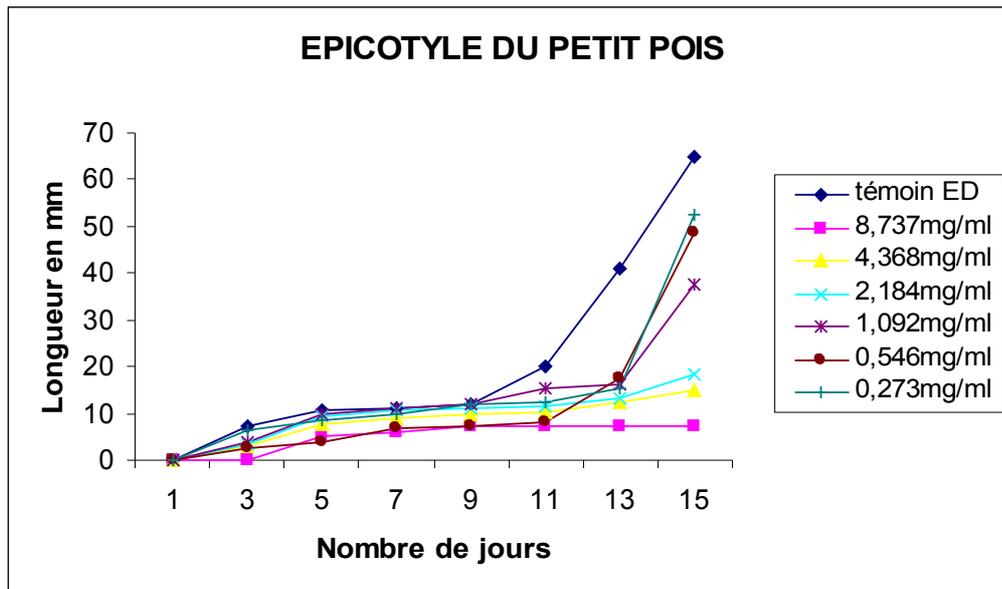


Figure n°8 : Développement de l'épicotyle du petit pois en présence des différentes concentrations de EB

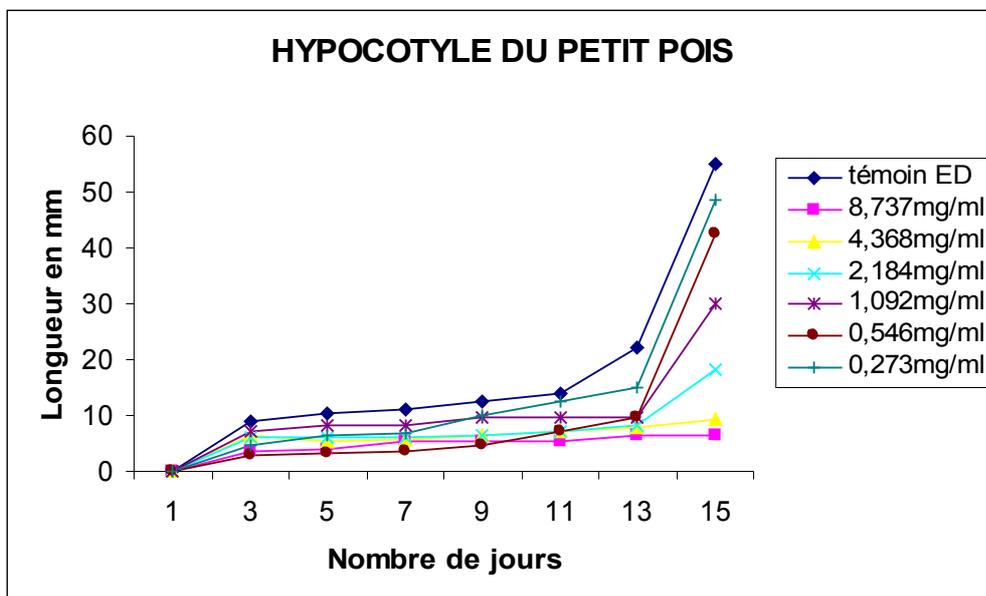


Figure n°9 : Développement de l'hypocotyle du petit pois en présence des différentes concentrations de EB

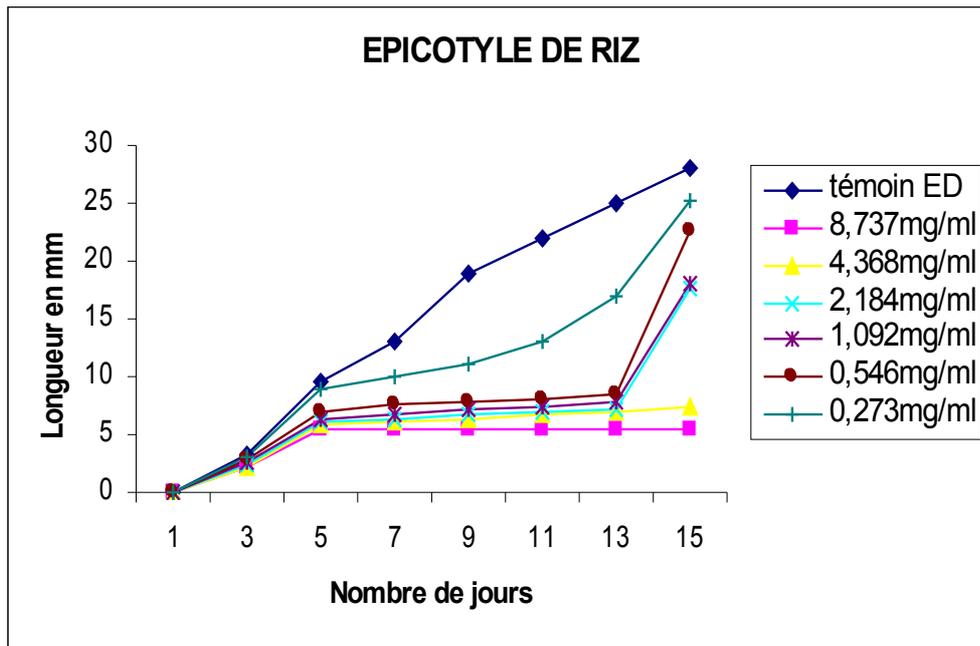


Figure n°10 : Développement de l'épicotyle de riz en présence des différentes concentrations de EB

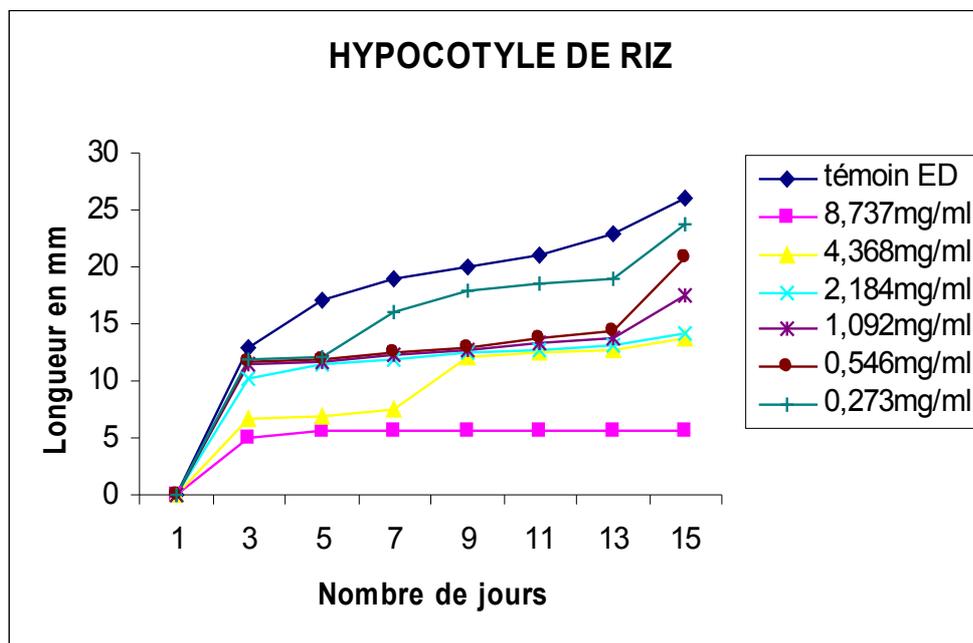


Figure n°11 : Développement de l'hypocotyle de riz en présence des différentes concentrations de EB

Tableau n°14 : Taux d'inhibition de la croissance des hypocotyles et des épicotyles de haricot et de riz au 15^{ème} jour de l'expérience :

		Extrait brut (mg/ml)						
			0,273	0,546	1,092	2,184	4,368	8,737
Riz	Longueur hypocotyle (mm)	26	23,26	20,8	17,4	14,1	13,8	5,6
	Inhibition (%)	0	10,54	20	33,07	45,76	46,92	78,46
	Longueur épicotyle (mm)	28	25,2	22,6	18	17,6	7,3	5,5
	Inhibition (%)	0	10	19,28	35,71	37,14	73,92	80,35
Petit pois	Longueur hypocotyle (mm)	55	48,5	42,6	30,1	18,3	9,4	6,5
	Inhibition (%)	0	11,81	22,54	45,27	66,72	82,90	88,18
	Longueur épicotyle (mm)	65	52,5	48,6	37,6	18,4	15	7,33
	Inhibition (%)	0	19,23	25,23	42,15	71,69	76,92	88,72

3.1.4.3-Effets des extraits sur le développement des bourgeons axillaires

Les effets de EB et de l'extrait sur la croissance des bourgeons axillaires, des jeunes plantules de petit pois âgées de 2 semaines, ont été étudiés par comparaison avec la gibbérelline et l'auxine (voir méthode §.2.2.2.3. p. 38).

Cette expérience a été réalisée pendant 11 jours et les résultats sont présentés sur la figure n°12 ci-dessous.

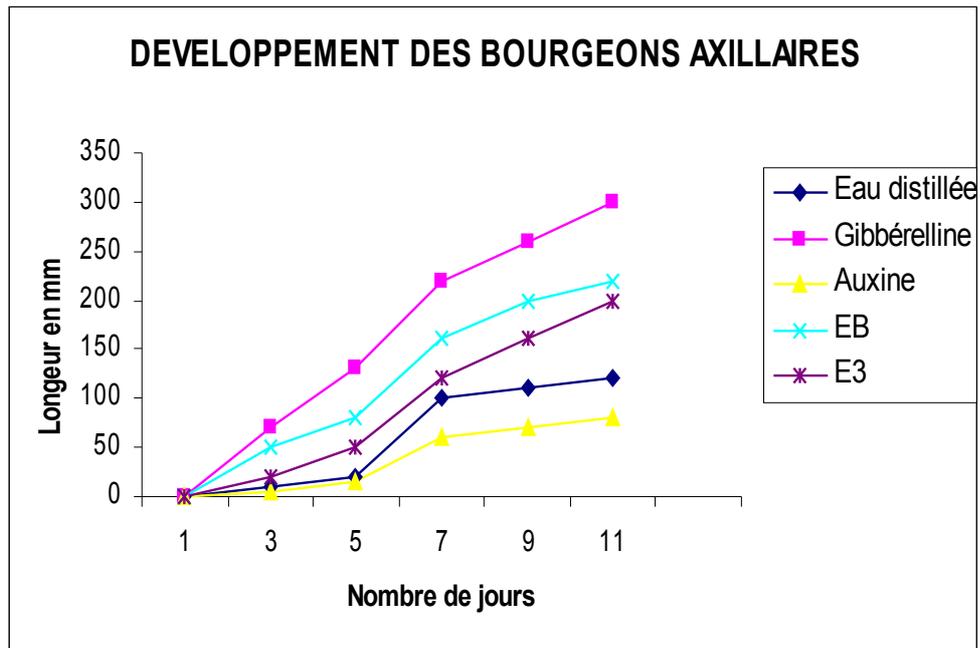


Figure n°12 : Effets de l'extrait brut et de l'extrait sur le développement des bourgeons axillaires

D'après ces résultats, l'extrait brut et l'extrait ont un effet stimulateur sur la croissance des bourgeons axillaires.

3.1.5-EFFETS DE L'EXTRAIT BRUT ET DE L'EXTRAIT SUR LES MICRO-ORGANISMES

3.1.5.1- Identification des germes

Les germes utilisés, identifiés en utilisant la méthode décrite au §.2.2.3.1.1 (p. 39), sont présentés dans le tableau n°15, avec leurs caractéristiques.

Tableau n°15 : Caractéristiques des souches utilisées

Nom des germes	Gram	Morphologie
<i>Escherichia coli</i>	négatif	bacille
<i>Staphylococcus aureus</i>	positif	coque
<i>Salmonella typhi</i>	négatif	bacille
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	négatif	bacille

3.1.5.2- Activité antimicrobienne des extraits

3.1.5.2.1.-Sensibilité des germes

Les micro-organismes identifiés ci-dessus ont été utilisés pour le test d'antibiogramme. Leur sensibilité à l'extrait brut et à l'extrait a été testée selon la méthode décrite au §.2.2.3.2. (p. 41). Les résultats des tests sont résumés dans le tableau n°16 ci-dessous.

Tableau n°16 : Activité des extraits sur les germes testés

Nom des souches	EB				Extrait			
	139,8mg/ml		69,9mg/ml		38,14mg/ml		19,07mg/ml	
	Diamètre (mm)	Sensibilité						
<i>Escherichia coli</i>	7-8	+	7	+	6	-	6	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	18	+++	15	+++	7-8	+	6	-
<i>Salmonella typhi</i>	7-8	+	7	+	6	-	6	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11	+++	9	+	7	+	6	-

- : insensible ; + : assez sensible ; ++ : sensible ; +++ : très sensible

Ces résultats nous montrent que *Staphylococcus aureus* est très sensible à EB à 69,9mg/ml et à 139,8mg/ml, *Klebsiella pneumoniae* lui est assez sensible à 69,9mg/ml et très sensible à 139,8mg/ml. *Escherichia coli* et *Salmonella typhi* lui sont assez sensibles, aux deux doses utilisées.

Pour l'extrait, les tests révèlent que *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae* lui sont assez sensibles à la dose de 38,14mg/ml. Par contre *Escherichia coli* et *Salmonella typhi* lui sont insensibles.

Tous les germes sont insensibles à l'extrait à 19,07mg/ml.

Ces résultats sont visibles sur la figure n°13 et 14 ci- dessous.



Figure n°13 : Sensibilité de *Klebsiella pneumoniae* vis-à-vis de EB et de l'extrait



Figure n°14 : Sensibilité de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis de EB et de l'extrait

- 1 : extrait brut à 139,8mg/ml
- 2 : extrait brut à 69,9mg/ml
- 3 : extrait à 38,14mg/ml
- 4 : extrait à 19,7mg/ml

3.1.5.2.2-Détermination de la CMI

La valeur de la CMI a été déterminée pour les germes qui sont très sensibles à EB. Ce sont *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae*.

EB a été dilué en cascade (coefficient de dilution $\frac{1}{2}$). Les cinq concentrations obtenues (139,8 ; 69,9 ; 34,95 ; 17,47 ; 8,73 mg/ml) ont été testées sur chacune des deux souches. Les résultats sont présentés dans le tableau n°17 ci-dessous.

Tableau n°17 : CMI de l'extrait brut sur les souches sensibles

Nom des souches	CMI en mg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	17,47
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	34,95

D'après ces résultats, la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour EB se situe à 17,47mg/ml pour *Staphylococcus aureus* et 34,95mg/ml pour *Klebsiella pneumoniae*. Ces résultats sont visibles sur les *figures n°15 et 16* ci-dessous.

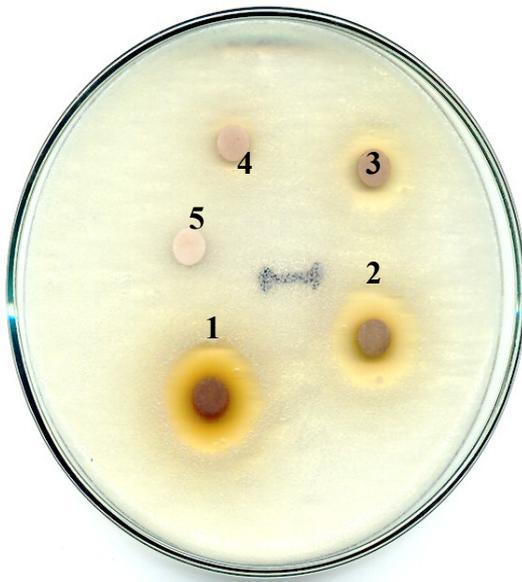


Figure n°15 : Détermination de la CMI de EB
Vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*

- 1 : extrait brut à 139,8mg/ml
- 2 : extrait brut à 69,9mg/ml
- 3 : extrait brut à 34,95mg/ml

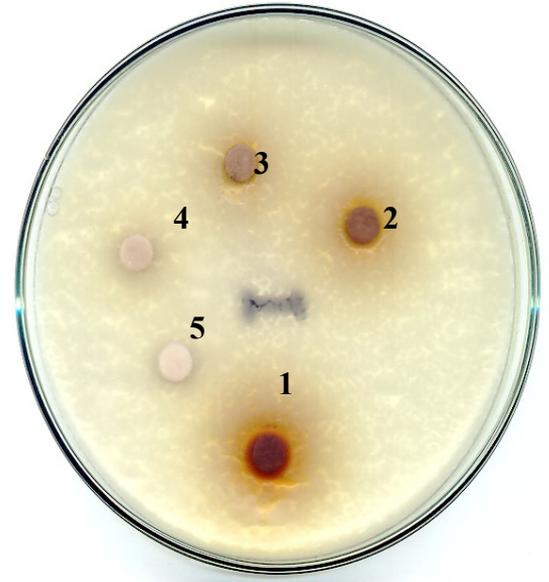


Figure n°16 : Détermination de la CMI
de EB vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae*

- 4 : extrait brut à 17,47mg/ml
- 5 : extrait brut à 8,73mg/ml

4-DISCUSSION ET CONCLUSION

D'après les résultats de l'étude toxicologique, les extraits des feuilles de *Anacardium occidentale* ont des effets toxiques pour divers organismes animaux, végétaux et microbiens.

Chez la souris, l'administration par voie ip, de l'extrait provoque les symptômes d'intoxication suivants : une contorsion abdominale suivie d'une ataxie, une hyperhémie, une piloérection, une enophtalmie et enfin des convulsions cloniques. Ces symptômes suggèrent que plusieurs tissus sont atteints par les principes toxiques, en particulier le système nerveux.

Par contre, l'administration de l'extrait par voie orale ne provoque aucun symptôme d'intoxication à la dose utilisée (38,14mg/ml). Ceci pourrait être dû soit à la destruction des principes toxiques par l'acidité du tractus digestif, soit à une inactivation enzymatique, soit encore à leur non absorption au niveau de la paroi intestinale.

La DL₅₀ (24h) de l'extrait est comprise entre 281,56mg/kg et 283,465mg/kg. Cette valeur nous permet de classer les principes actifs parmi les substances faiblement toxiques, car elle est loin des 25mg/kg, considérés comme dose de référence des substances très toxiques (RAMADE, 1979). En se référant aux toxines déjà étudiées au LABASM, l'extrait est beaucoup plus toxique que ceux du champignon *Cantharellus cf. congolensis* et des feuilles de *Phyllarthron madagascariense* qui ont une DL₅₀ respectivement comprise entre 537,5mg/kg et 547,64mg/kg (TONIMALALA, 2003), et 2,52g/kg et 2,6g/kg de souris (IBRAHIM, 2004). Cependant, il est beaucoup moins toxique que les extraits de graines de *Albizia tulearensis* et de *Albizia arenicola* dont la DL₅₀ est comprise entre 2,9mg/kg et 3,2mg/kg (RAONIHARISOA, 2003), et 50mg/kg et 55mg/kg de souris (RANDRIANARIVO, 2003).

Les principes actifs des extraits des feuilles de *Anacardium occidentale* ont une activité lytique sur les hématies de mouton, l'extrait purifié étant plus actif que l'extrait brut. Or, le test de mousse a été négatif. Cette hémolyse est donc due à des substances hémolytiques autres que les saponines présentes dans les extraits qui ont le pouvoir de se lier avec les hématies, entraînant l'éclatement de celles-ci, et la libération de leur hémoglobine dans le milieu (BRUNETON, 1987, 1993).

L'extrait brut est toxique sur les alevins de carpe et les têtards de grenouille. Pour les alevins de carpe, la CL_{50} (24h) est de 20,01 μ g/ml et elle est de 39,94 μ g/ml pour les têtards de grenouille.

D'après ces résultats, les alevins de carpe sont plus sensibles que les têtards de grenouille. Ceci peut être dû au contact direct des principes toxiques de l'extrait avec les branchies des poissons.

L'extrait brut n'a aucun effet sur les larves de moustique à 2,184mg/ml.

Chez les végétaux, la germination des différentes graines de plantes potagères est inhibée à des taux variables par EB à 1mg/ml. Parmi les graines testées, celles de la morelle noire (Solanaceae) sont les plus sensibles avec une inhibition de 100%. Cette inhibition pourrait être due, soit à la destruction de l'embryon, soit à l'inactivation des enzymes nécessaires pour la germination.

L'extrait brut inhibe la croissance des épicotyles et des hypocotyles des jeunes plantules de riz et de petit pois. Cette inhibition qui est proportionnelle à la dose utilisée, peut être totale à des doses supérieures à 8,737mg/ml. En effet, les principes toxiques pourraient avoir des effets sur l'absorption des éléments nutritifs présents dans le milieu. D'autre part, les graines de petit pois sont beaucoup plus sensibles à l'extrait brut que celles du riz.

Les extraits EB et l'extrait ont un effet stimulateur sur le développement des bourgeons axillaires. Mais cet effet n'est pas comparable à celui de la gibbérelline.

Les principes toxiques agissent également sur les micro-organismes. Les bactéries telles que *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae* sont très sensibles à l'extrait brut. En milieu solide, la valeur de la CMI est respectivement 17,47 et 34,95 mg/ml.

Notre extrait brut est plus performant par rapport à l'extrait brut issu de feuilles de l'espèce *Gambeya boiviniana* (Sapotaceae) dont la CMI est estimée à 50mg/ml pour *Staphylococcus aureus* (RASOATAHINA, 2005) et moins performant par rapport à l'extrait brut issu de feuilles de l'espèce *Xerosicyos danguyi* (CUCURBITACEAE) dont la CMI est évaluée à 5mg/ml pour *Klebsiella pneumoniae* (RAKOTONDRAZANAKA, 2000).

A la lumière de ces résultats, l'utilisation traditionnelle de la plante par les villageois pour soigner la diarrhée (d'après les enquêtes menées au près des villageois) est scientifiquement vérifiée.



CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus dans les travaux réalisés sur les feuilles de *Anacardium occidentale*, bien qu'ils soient préliminaires, nous ont permis de :

- ⇒ mettre en évidence la toxicité des feuilles d'*Anacardium occidentale* ;
- ⇒ mettre au point un procédé d'extraction et de purification simple des principes toxiques ;
- ⇒ déterminer certaines de leurs propriétés physico-chimiques et leur nature chimique ;
- ⇒ connaître certaines propriétés toxicologiques des principes toxiques de ces feuilles sur les animaux, les végétaux et micro-organismes.

Dans l'avenir, nous envisagerons :

- ⇒ d'améliorer le procédé d'extraction et de purification, afin d'obtenir les principes actifs à l'état pur ;
- ⇒ de les caractériser du point de vue physico-chimique et de déterminer leur nature chimique ;
- ⇒ étudier le mécanisme d'action du ou de(s) principe(s) toxique(s) ;
- ⇒ d'approfondir l'étude de leurs propriétés toxicologiques sur d'autres modèles d'animaux, végétaux et micro-organismes.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1-ANDRIAMIHAJA S. Essai d'inventaire des plantes medico-dentaires Malgaches. Tome I. Antananarivo, 1986, 319p.
- 2-ANDRIANTSOA-RAZAFIMALALA H. Contribution à la purification et à la caractérisation d'un principe antibactérien d'une légumineuse *Albizia lebbek*. [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1983.
- 3-AUBREVILLE A. Flore de Madagascar et des Comores. Paris, 1974.
- 4-AUDIGIER C. DUPON G. et ZONZAIN F. Principes et méthodes d'analyse biochimique. Paris : Doin éditeur, 1992 ; T2, 174p.
- 5-BERCHE P et coll. Bactériologie, les bactéries des infections humaines. Paris : Flammarion, 1991 ; 660p.
- 6-BIZZINI B. Tetanos toxin structure as basic for elucidating its immunological and neuropharmacological activities. In: The specificity and action of animal, bacterial and plant toxins (Receptor and reconition, séries B, vol 1). Edited by Cuatrecasas P. London: Chapman and Hall, 1977; 75-218p.
- 7-BOITEAU P. Médecine traditionnelle et pharmacopée : Précis de matière médicale malgache. Madagascar : Agence de coopération culturelle et technique, 1986 ; 141p.
- 8-BOITEAU P. Précis de matières médicales malgaches. Antananarivo : La librairie de Madagascar, 1979 ; 97p.
- 9-BOITEAU P., ALLORGE- BOITEAU L. Plantes médicinales de Madagascar. Madagascar : Agence de coopération culturelle et technique, 1993 ; 210p.
- 10-BONNET H., NEVOT A. Travaux pratiques de bactériologie, 4^e éd. Paris : Masson et Cie éditeurs, 1955 ; 210p.
- 11-BOYD. Fundamentals of immunology, 4^e éd. New York: Wiley and Son, 1966; 408p.
- 12-BRUNETON J. Elément de phytochimie et de pharmacognosie. Paris : Technique et documentation Lavoisier, 1993 ; 210p.
- 13-BRUNETON J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinale. Paris : Technique et documentation Lavoisier, 1993 ; 893p.
- 14-DUVAL J. et SOUSSY C. J. Antibiothérapie, 4^e éd. Paris : Masson, 1990 ; 188p.
- 15-FERRON A. Bactériologie médicale. Paris : Masson, 1994 ; 472p.
- 16-FONG H.N S., TIN W. A. M. and FARNSWORTH N. R. Phytochemical screening. Review. 1969 ; 560p.
- 17-HECKEL L. Catalogue raisonné alphabétique des plantes médicinales et toxiques de Madagascar, avec leur emploi indigène. Marseille, 1910 ; 58-184.

- 18-HELLER R., ESNAULT T. R. et LANCE C. Abrégé de physiologie végétale: Développement Paris, Mansson.5^{em} éd. 1955 ; 90-126.
- 19-HEMINGWAY R. W. et KARCHESY J.J. Chemistry and significance of condensed tanins. New York: Plenum Press, 1989 ; 249-264.
- 20-HUMBERT H. 144^e famille Anacardiaceae (Flore de Madagascar et des Comores). Paris : Muséum national d'histoire naturelle, 1946 ; 47p.
- 21-IBRAHIM S.A. Etude chimique, Biochimique et Biologique des feuilles de *Phyllarthron madagascariense* (Bignoniaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2004 ; 68p.
- 22-JEANNODA V. Etudes chimique, biochimiques et toxicologique du principe convulsivant des Connaracées de Madagascar. [Thèse de doctorat d'Etat : Sciences].Strasbourg ; Université Louis Pasteur de Strasbourg, 1986 ; 273p.
- 23-KAMOOUN P. Appareils et méthodes en biochimie. Paris : Flammarion, 1977 ; 237p.
- 24-MAHUZIER G, HAMON H. Méthode de séparation, (Abrégé de chimie analytique, T2) 2^{ème} éd. Paris : Masson, 1990 ; 269p.
- 25-MEYER A., DEIANA J. et LECLERC H. Cours de microbiologie générale. Paris : Doin éditeur, 1994 ; 495p.
- 26-MULLER J.H., HINTON J. Milieu de culture. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1941; 48, 330-333.
- 27-OMS. Résistance aux insecticides et lutte antivectorielle. 17^e rapport du comité. OMS d'experts des insecticides. Série de rapport techniques n° 443, Genève, 1970 ; 306p.
- 28-PATRIK B. Eléments de microbiologie générale et agricole. Paris : librairie agricole, 1932 ; 327p.
- 29-PERNET R. et MEYER G. Pharmacopée de Madagascar. Publication de Institut de recherche Scientifique de Madagascar, 1957 ; 86p.
- 30-RADRIANARIVO H. R. Isolement, caractérisation chimique et biologique des principes toxiques de *Albizia arenicola* (Mimosoideae, Fabaceae). [Thèse de doctorat : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003 ; 159p.
- 31-RADRIANARIVO H. R. Purification et caractérisation partielle des principes actifs de *Albizia arenicola* (Mimosoideae, Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1996 ; 83p.
- 32-RAHANTARINORO J. Etude chimique et toxicologique des extraits toxiques de feuilles de *Ravensara anisata* (Lauraceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1999.

- 33-RAHARISOA N. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes toxiques de *Albizia bernieri* (Mimosoideae, Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1999.
- 34-RAHERINIAINA C. E. Etude chimique et toxicologique de *Euphorbia laro* (Euphorbiaceae)- Impact de la pêche au Laro. [Thèse de doctorat : Biochimie]. Tuléar : Université de Tuléar, 2004.
- 35-RAKOTONDRA SOA A. Etude chimique et toxicologique de tubercules *Dioscorea esculenta* (Dioscoreaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2005 ; 70p.
- 36-RAKOTONDRAZANAKA L. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes toxiques de *Xerosicyos danguyi* (Cucurbitaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2000 ; 67p.
- 37-RAKOTO-RANOROMALALA D. A. D. Purification et caractérisation partielle du principe toxique de *Rourea orientalis* (Connaraceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1984 ; 44p.
- 38-RAKOTO-RATSIMAMANGA A. Eléments de pharmacopée Malagasy. Tome I. Tananarive : Imprimerie Nationale, 1969 ; 579p.
- 39-RAKOTO-RATSIMAMANGA A. Un inventaire des pesticides naturels d'origines végétales à Madagascar. Madagascar : VOARISOA l'environnement et les produits toxiques, 1998 ; 291p.
- 40-RALISON C. Isolement et étude biochimique, toxicologique et biologique de la manguine, principe toxique du *Croton mongue* (Euphorbiaceae). [Thèse de doctorat d'Etat : Sciences]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1987 ; 261p.
- 41-RAMADE E. Ecotoxicologie. Paris : Masson, 1979 ; 228p.
- 42-RAMAMONJISOA-RAKOTOARIVELO N. S. E. Etude chimique et toxicologique des graines de *Mimuscops commersonii* (Sapotaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2004 ; 81p.
- 43-RAMAMONJISON E. D. Contribution à l'étude chimique et biologique du principe toxique des graines d' *Albizia sp* (Mimosoideae, Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1998 ; 66p.
- 44-RAMIARIMBELOSOA N. H. Etude chimique et toxicologique des extraits toxiques du champignon *Boletus sp* (Boletaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003 ; 76p.
- 45-RANDERATH K. Chromatographie sur couche mince. Paris : édition Gautier-Villars, 1964 ; 296p.

- 46-RANDRIAMAHAVALISOA F. Etude chimique et biologique d'extrait toxique de feuilles de *Ocotea madagascariensis* (Lauraceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003 ; 68p.
- 47-RANDRIAMAMONJY F.Y. Caractérisation chimique et toxicologique partiel des principes toxiques de tubercules de *Dioscorea antaly* (Dioscoreaceae) [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2005.
- 48-RANDRIAMIHARISOA F. Etude chimique et biologique d'extrait toxique de feuilles de *Xerosicyos perrieri* (Cucurbitaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2000 ; 71p.
- 49-RANDRIANANDRASANA J. Etude chimique et toxicologique d'écorces de tiges de *Upaca thouarsii* (Euphorbiaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2004 ; 69p.
- 50-RAONIHARISOA P. Etude chimique et toxicologique des extraits de feuilles de *Albizia tulearensis* (Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003 ; 83p.
- 51-RASOATAHINA V. Etude chimique et toxicologique des principes de feuilles de *Gambeya boiviniana* (Sapotaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2005 ; 75p.
- 52-RAZANAMPARANY L. Purification et étude des propriétés physico-chimique et biologique de la bolaffinine, toxine protéique extrait de *Boletus affinis* Peck (Boletaceae). [Thèse de doctorat d'Etat : Sciences]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1987 ; 216p.
- 53-REED et MUENCH H. A. Simple methode of estimating fifty percent points. Am. J. Hyg. 1938 ; 27 ; 293p.
- 54-RICHARD C. et KIREDJIAN M. Méthode de laboratoire pour l'identification des bacilles à Gram négatif aérobies stricts, 2^e éd. Paris : Institut Pasteur, 1995 ; 332p.
- 55-SIGLETON P. Bactériologie ; 2^{ème} éd. Paris : Masson, 1994 ; 247p.
- 56-TONIMALALA Miaritina Hélène. Etude chimique et toxicologique des extraits toxiques du champignon *Cantharellus cf congolinsis* (Cantharellaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003 ; 72p.
- 57-TULENS P et SPINEWINE A. Pharmacologie spéciale, 05/08/02, [<http://www.ud.ac.be/infect/antiinfectieux/PLS/PLS-Hom.html>], (02/02/07), 45Ko.
- 58-Wikipédia. Botulisme, 03/10/06, [<http://fr.Wikipedia.org/Wiki/Botulisme>], 13/12/06, 40Ko.
- 59-Wikipédia. Streptomycine, 10/11/06, [<http://fr.Wikipedia.org/Wiki/Streptomycyne>], (02/02/07), 22Ko.



ANNEXES

ANNEXES

ANNEXE I : Description botanique de la plante *Anacardium occidentale* (HUBERT, 1981 ; ANDRIAMIHAJA, 1986)

Anacardium occidentale est un arbre de 4 à 6 mètres à port souvent tortueux en sol aride, mais pouvant atteindre 20 mètres dans des conditions favorables, à rameaux étalés. Les feuilles sont persistantes, alternes, entières, grandes, largement obovales, en coin à la base, arrondies au sommet, généralement asymétriques et déprimées au sommet sur l'une de leurs moitiés, coriaces, souvent plus ou moins bullées, à nervures fortement marquées, courtement pétiolées.

Les fleurs sont polygames (les unes fertiles, les autres stériles), en panicules terminales formées de cymes, à rachis et pédicelles courtement pubescents comprenant un calice à 5 lobes lancéolés-aigus, une corolle à 5 pétales étroits, connivents en tube vers la moitié de leur longueur et réfléchis vers le bas dans leur partie libre, avec généralement une seule étamine fertile et 8 ou 9 étamines stériles ; l'étamine fertile 3 ou 4 fois plus longue que les stériles, dépasse toujours la longueur du style ; il y a un seul carpelle monoovulé, atrophié dans les fleurs stériles, à style latéral, simple, filiforme.

Le fruit a la forme d'un gros haricot ou d'un rein d'animal, de 2,5 à 3cm de long, communément appelé *noix d'acajou*, *noix de cajou* ou *noix à marquer* (nom malagasy : *koroso* ou *korosy*), à péricarpe mince, peu charnu sur le fruit vert, se desséchant complètement et devenant coriace à maturité ; à mésocarpe spongieux et endocarpe scléreux formant dans leur ensemble une coque très dure, épaisse de 3 à 4 mm parsemée de poches sécrétant une substance épaisse, sirupeuse, caustique nommée *baume de cajou* (nom malagasy : *tsiranoranon-koroso*). L'amande riche en matière grasse, d'odeur et de goût agréables, est très appréciée comme aliment. Elle fournit une huile d'excellente qualité dite huile d'anacarde ou huile des Caraïbes. Ce fruit est porté par un énorme renflement du pétiole, en forme de poire ou de toupie, qu'on appelle *pomme-cajou* ou *pomme d'acajou* (souvent prise par erreur pour le fruit lui-même), charnu, comestible, de saveur sucrée et acidulée à la fois, à parfum rappelant un peu celui de la fraise, mais avec une âcreté qui peut être très désagréable surtout si on le consomme sans enlever la peau de couleur jaune ou rouge à maturité, avec de nombreux types intermédiaires.

ANNEXE II : Composition du réactif à la vanilline sulfurique

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

ANNEXE III : Composition des réactifs utilisés dans la détection des alcaloïdes

Réactif de MAYER :

Chlorure de mercure.....	1.36g
Iodure de potassium.....	5g
Eau distillée qsp.....	100ml

Réactif de DRAGENDORFF :

Le mélange de la solution A avec la solution B constitue le réactif de DRAGENDORFF.

Solution A :

Nitrate de bismuth	1,7g
Acide tartrique concentré.....	20g
Eau distillée qsp.....	30ml

Solution B :

Iodure de potassium.....	10g
Eau distillée qsp	40ml

Réactifs de WAGNER :

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

ANNEXE IV : Composition des milieux de culture

Bouillon nutritif :

Peptone.....	10g
Chlorure de sodium.....	5g
Eau distillée qsp.....	1000ml
pH	7,2

Gélose nutritive :

Milieu de MUELLER-HINTON :

Extrait de viande.....	3g
Peptone.....	3g
Peptone tryptique de caséine.....	10g
Chlorure de sodium.....	5g
Dextrose (glucose).....	2g
Agar.....	10g
Eau distillée qsp	100ml

ANNEXE V : Composition du PBS

Chlorure de sodium.....	7,65g
Phosphate disodique.....	0,724g
Phosphate monosodique.....	0,210g
Eau distillée qsp.....	1000ml

ANNEXE VI : Composition des solutions qui composent le GRAM COLOR KIT

Solution Cristal violet :

Cristal violet.....	2%
Alcool éthylique.....	20%
Oxalate d'ammonium.....	0,8%

Solution lugol-PVP :

Iode.....	1,3%
Iodure de potassium.....	2%
PVP (polyvinylpyrrolidone).....	7%

Solution Décolorante :

Alcool 95° C.....	50%
Acétone.....	50%

Solution Safranine :

Safranine.....	0,25%
Alcool éthylique.....	10%