

## TABLE DES MATIERES

Pages	
REMERCIEMENTS .....	i
ABREVIATIONS .....	iii
GLOSSAIRE .....	iv
RESUME .....	v
INTRODUCTION GENERALE .....	1
<u>PREMIERE PARTIE : ETUDE CHIMIQUE DES PRINCIPES TOXIQUES</u>	4
1. Introduction .....	4
2. Matériels et méthodes	7
2.1. Matériels .....	7
2.1.1. Matériel végétal .....	8
2.1.1.1. Description botanique de <i>Deinbollia boinensis</i> .....	8
2.1.1.2. Distribution géographique et lieu de récolte .....	8
2.1.1.3. Mode de préparation et conservation du matériel végétal .....	9
2.1.2. Les produits chimiques .....	9
2.2. Méthodes .....	10
2.2.1. Méthodes d'extraction .....	11
2.2.1.1. Extraction à froid .....	11
2.2.1.2. Extraction à chaud à reflux .....	11
2.2.2. Méthodes de purification .....	12
2.2.2.1. Précipitation par l'éthanol 50% .....	12
2.2.2.1.1. Principe .....	13

.....	13
2.2.2.1.2. Mode opératoire .....	13
.....	13
2.2.2.2. Dialyse .....	13
.....	13
2.2.2.2.1. Principe .....	13
.....	14
2.2.2.2.2. Mode opératoire .....	14
.....	14
2.2.2.3. Fractionnement par le n-butanol .....	15
.....	15
2.2.2.3.1. Principe .....	16
.....	16
2.2.2.3.2. Mode opératoire .....	16
.....	16
2.2.2.4. Précipitation par le mélange acétone / éther .....	16
.....	17
2.2.2.4.1. Principe .....	17
.....	17
2.2.2.4.2. Mode opératoire .....	17
.....	18
2.2.2.5. Précipitation par l'acéate neutre de plomb .....	18
.....	18
2.2.2.5.1. Principe .....	18
.....	18
2.2.2.5.2. Mode opératoire .....	19
.....	20
2.2.2.6. Filtration sur charbon actif .....	20
.....	20
2.2.2.6.1. Principe .....	21
.....	21
2.2.2.6.2. Mode opératoire .....	21
.....	21
2.2.3. Méthode de concentration .....	22
.....	22
.....	23
.....	23
2.2.4. Méthodes d'analyse .....	24
.....	
2.2.4.1. Chromatographie sur couche mince .....	25
.....	
2.2.4.1.1. Principe .....	
.....	
2.2.4.1.2. Mode opératoire .....	27
.....	
2.2.4.1.2.1. Dépôt des échantillons .....	27
.....	
2.2.4.1.2.2. Développement .....	27
.....	
2.2.4.1.2.3. Révélation des chromatogrammes .....	27

.....	27
2.2.4.2. Détection des familles chimiques (criblage phytochimique) .....	27
.....	28
2.2.4.2.1. Les alcaloïdes.....	28
.....	28
2.2.4.2.2. Les flavonoïdes et les leucoanthocyanes.....	28
.....	28
2.2.4.2.2.1. Les flavonoïdes : test de WILSTATER (test à la cyanidine).....	28
...	29
2.2.4.2.2.2. Les leucoanthocyanes : test de BATE – SMITH.....	29
...	29
2.2.4.2.3. Les tanins et les polyphénols.....	29
.....	29
2.2.4.2.3.1. Test à la gélatine.....	29
...	29
2.2.4.2.3.2. Test à la gélatine salée.....	29
...	29
2.2.4.2.3.3. Test au chlorure ferrique.....	30
...	30
2.2.4.2.4. Les anthraquinones.....	31
.....	31
2.2.4.2.5. Les saponines.....	31
.....	32
2.2.4.2.6. Les stéroïdes et triterpènes et les stérols insaturés.....	32
.....	32
2.2.4.2.6.1. Les stéroïdes et triterpènes : test de LIEBERMANN-BÜRCHARD.	32
...	33
2.2.4.2.6.2. Les stérols insaturés : test de SALKOWSKI.....	33
...	34
2.2.4.2.7. Les désoxyoses.....	34
...	34
2.2.4.2.8. Les iridoïdes.....	34
...	35
...	35
3. Résultats .....	35
.....	36
3.1. Extraction .....	36
.....	36
3.2. Purification .....	36
.....	36
3.2.1. Précipitation par l'éthanol 50% .....	37
...	37
3.2.2. Dialyse .....	37
...	38
3.2.3. Fractionnement par le n-butanol .....	38
...	38
3.2.4. Précipitation par le mélange acétone / éther .....	39
...	39
3.2.5. Précipitation par l'acétate neutre de plomb .....	39
...	40

3.2.6. Filtration sur charbon actif .....	40
.....	40
3.2.7. Degré d'homogénéité des différents extraits .....	42
.....	42
3.2.8. Rendement .....	42
.....	42
3.3. Caractérisation chimique .....	42
.....	42
3.3.1. Propriétés physico-chimiques .....	42
.....	42
3.3.2. Nature chimique .....	43
.....	44
4. Discussions et conclusion .....	50
.....	50
	51
<b><u>DEUXIEME PARTIE : ETUDE DES PROPRIETES TOXICOLOGIQUES DES</u></b>	51
<b><u>EXTRAITS DE FEUILLES DE <i>Deinbollia boinensis</i></u></b>	51
	52
1. Introduction .....	52
.....	52
	53
2. Matériels et méthodes .....	58
.....	59
2.1. Matériels .....	59
.....	59
2.1.1. Les animaux d'expérimentation .....	60
.....	60
2.1.1.1. Les animaux à sang chaud .....	62
.....	62
2.1.1.1.1. Les souris .....	63
.....	63
2.1.1.1.2. Les autres espèces .....	70
.....	70
2.1.1.2. Les animaux à sang froid .....	.....
.....	.....
2.1.1.2.1. Les alevins de poisson .....	.....
.....	.....
2.1.1.2.2. Les têtards de grenouille .....	.....
.....	.....
2.1.1.3. Les insectes .....	.....
.....	.....
2.1.2. Les végétaux d'expérimentation .....	.....
.....	.....
2.1.3. Les souches microbiennes utilisées comme germes-test .....	.....
.....	.....
2.1.4. Les milieux de culture .....	.....
.....	.....
2.1.5. Stérilisation .....	.....

2.2. Méthodes .....	.....
2.2.1. Méthodes d'étude de l'extrait sur les animaux .....	.....
2.2.1.1. Tests sur des animaux à sang chaud .....	.....
2.2.1.1.1. Expérience sur la souris .....	.....
2.2.1.1.1.1. Estimation de la toxicité .....	.....
2.2.1.1.1.2. Détermination de la DL <sub>50</sub> (24 h) .....	.....
2.2.1.1.1.3. Examens histopathologiques .....	.....
2.2.1.1.1.3.1. Prélèvement et fixation des organes .....	.....
2.2.1.1.1.3.2. Inclusion .....	.....
2.2.1.1.1.3.3. Microtomie et étalement des coupes .....	.....
2.2.1.1.1.3.4. Coloration des coupes et montage des lames .....	.....
2.2.1.1.2. Test de sensibilité avec d'autres espèces .....	.....
2.2.1.1.3. Test hémolytique .....	.....
2.2.1.1.3.1. Principe .....	.....
2.2.1.1.3.2. Mode opératoire .....	.....
2.2.1.2. Tests sur des animaux à sang froid .....	.....
2.2.1.2.1. Principe .....	.....
2.2.1.2.2. Mode opératoire .....	.....
2.2.1.2.2.1. Test sur les alevins de carpe .....	.....
2.2.1.2.2.2. Test sur les têtards de grenouille .....	.....
2.2.1.3. Test sur les insectes .....	.....
2.2.2. Méthodes d'étude des effets sur les végétaux .....	.....
2.2.2.1. Effets sur le pouvoir germinatif des graines .....	.....
2.2.2.2. Effets sur la croissance des jeunes plantules .....	.....
2.2.2.3. Effets sur le développement des bourgeons axillaires .....	.....

2.2.3. Méthodes d'étude des effets des extraits sur la croissance des micro-organismes .....	.....
2.2.3.1. Isolement et purification des germes .....	.....
2.2.3.1. Isolement .....	.....
2.2.3.2. Purification .....	.....
2.2.3.2. Identification des germes .....	.....
2.2.3.2.1. Méthode de coloration GRAM .....	.....
2.2.3.2.2. Identification .....	.....
2.2.3.2.2.1. Milieu de SIMMONS (citrate de sodium) .....	.....
2.2.3.2.2.2. Milieu mannitol-mobilité-nitrate .....	.....
2.2.3.2.2.3. Milieu HAJNA - KLIGLER (lactose-glucose-H <sub>2</sub> S) .....	.....
2.2.3.2.2.4. Milieu lysine-fer .....	.....
2.2.3.2.2.5. Milieu urée-indole .....	.....
2.2.3.3. Spectre d'activité anti-microbienne des extraits .....	.....
2.2.3.3.1. Principe .....	.....
2.2.3.3.2. Mode opératoire .....	.....
3. Résultats .....	.....
3.1. Effets de l'extrait sur les animaux .....	.....
3.1.1. Effets de l'extrait sur les animaux à sang chaud .....	.....
3.1.1.1. Effets sur la souris .....	.....
3.1.1.1.1. Description des symptômes développés après injection d'une dose létale .....	.....
3.1.1.1.2. Description des symptômes développés après injection d'une dose sublétale .....	.....
3.1.1.1.3. Evaluation de la toxicité (DL <sub>50</sub> 24 h) .....	.....
3.1.1.1.4. Examens histopathologiques .....	.....

3.1.1.2. Etude de la sensibilité des autres espèces .....	.....
3.1.1.3. Effets de l'extrait sur les hématies de mouton .....	.....
3.1.2. Effets de l'extrait sur les animaux à sang froid .....	.....
3.1.2.1. Effets sur les alevins de carpe .....	.....
3.1.2.2. Effets sur les têtards de grenouille .....	.....
3.1.3. Effet de l'extrait sur les larves de moustique .....	.....
3.2. Effets des extraits sur les végétaux .....	.....
3.2.1. Effets de l'extrait brut sur le pouvoir germinatif des graines .....	.....
3.2.2. Effets de l'extrait brut sur la croissance de jeunes plantules .....	.....
3.2.3. Effets des extraits sur la levée de la dominance apicale .....	.....
3.3. Effets des extraits sur la croissance des microorganismes .....	.....
3.3.1. Isolement et identification des germes .....	.....
3.3.2. Recherche des propriétés anti-microbiennes des extraits .....	.....
4. Discussions et conclusion .....	.....
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....	.....
ANNEXES .....	.....
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	.....



## **REMERCIEMENTS**

*Le présent travail a été réalisé :*

- au Laboratoire du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo
- au Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement (LME) du Centre National de Recherches sur l'Environnement (CNRE)
- au Laboratoire Central d'Anatomie pathologique du CHU Joseph RAVOAHANGY ANDRIANAVALONA

*Je voudrais exprimer toute ma gratitude à Monsieur le Professeur Victor JEANNODA, Chef du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, Responsable de la formation en troisième cycle de Biochimie, encadreur de mon stage et rapporteur de ce mémoire, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je tiens à le remercier pour ses conseils et son aide dans l'élaboration et la finition de ce mémoire, malgré ses nombreuses responsabilités.*

*Je témoigne ma profonde reconnaissance à Madame le Docteur Doll A. D. RAKOTO-RANOROMALALA, Maître de conférences, co-encadreur de mon stage pour les conseils et suggestions qu'elle m'a prodigués tout au long de ce travail ainsi que son apport précieux dans la réalisation du présent manuscrit, malgré ses multiples occupations.*

*J'adresse mes vifs et sincères remerciements à Madame le Professeur Louisette RAZANAMPARANY qui me fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.*

*Que Madame le Docteur Ando RANDRIANIERENANA et Monsieur le Professeur Marson RAHERIMANDIMBY, qui ont aimablement accepté d'examiner ce travail malgré leurs multiples obligations, trouvent ici mes chaleureux remerciements.*

*Mes plus vifs remerciements s'adressent également à :*

- Monsieur le Docteur L.A. RAMAROSON, Chef du Laboratoire, et Monsieur A.P. RASAMIARIMANANA, Responsable scientifique, qui m'ont accueillie dans le LME pour l'étude des propriétés anti-microbiennes des principes actifs.



- Madame le Docteur C.F. RAJEMARIMOELISOA, Directeur des Pharmacies et Laboratoires du Ministère de la Santé, qui a aimablement accepté d'étudier l'anatomie pathologique.

*Je tiens à remercier aussi toutes les personnes qui ont apporté une aide technique pour la réalisation de ce travail, en particulier, Monsieur le Docteur H.R. RANDRIANARIVO, Monsieur L. RAKOTONDRAZANAKA, Mademoiselle O.N. RABEARIMANANA ainsi que l'équipe du Laboratoire du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, l'équipe du Laboratoire Central d'Anatomie pathologique du CHU-JRA et l'équipe du LME du CNRE.*

*Enfin, j'adresse toute ma reconnaissance à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.*



## ABREVIATIONS

ANP	: Acétate Neutre de Plomb
B/A/E	: Butanol / Acide acétique / Eau distillée
° C	: Degré Celsius
CCM	: Chromatographie sur Couche Mince
CL <sub>50</sub>	: Concentration Létale 50%
cm	: Centimètre
CNRE	: Centre National de Recherches sur l'Environnement
Da	: Dalton
DL <sub>50</sub>	: Dose Létale 50%
FOFIFA	: Foibe Fikarohana ho amin'ny Fampandrosoana ny eny Ambanivohitra
g	: Gramme
h	: Heure
HCl	: Acide Chlorhydrique
i.p	: Intra-péritonéale
IPM	: Institut Pasteur de Madagascar
kg	: Kilogramme
LABASM	: Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales
LME	: Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement
mg	: Milligramme
min	: Minute
ml	: Millilitre
mm	: Millimètre
N	: Normale
NaCl	: Chlorure de Sodium
nm	: Nanomètre
p/p	: Poids par poids
p/v	: Poids par volume
pH	: Potentiel à Hydrogène
s	: Seconde
UV	: Ultraviolette
v/v	: Volume par volume
µg	: Microgramme
µl	: Microlitre

$\mu\text{m}$  : Micromètre

## **GLOSSAIRE**

**Ataxie** : incoordination avec conservation de la force musculaire

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

**Cyanose** : coloration bleue des téguments due à un trouble de l’oxygénation

**Exophthalmie** : saillie anormale des globes oculaires

**Hyperémie** : individualisation des artères des pavillons

**Piloérection** : érection des poils



## RESUME

*Une activité toxique a été mise en évidence dans les feuilles de **Deinbollia boinensis**, une SAPINDACEE endémique de Madagascar.*

*A partir de l'extrait brut aqueux, un procédé de purification comprenant une précipitation par l'éthanol à 50%, une dialyse et un fractionnement par le n-butanol, a permis d'obtenir un extrait toxique partiellement purifié avec un rendement en toxines de 1,32% et un rendement de purification de 7,73%.*

*Les principes actifs sont thermostables, solubles dans l'eau, l'éthanol et le n-butanol. Ils sont précipitables par l'acétate neutre de plomb et sont adsorbés sur le charbon actif. Un criblage phytochimique de l'extrait brut et de l'extrait a révélé la présence de tanins et polyphénols, de saponosides, de désoxyoses, de triterpènes et de stérols. Les principes toxiques pourraient être alors des saponosides avec des génines stéroïdiennes et/ou triterpéniques.*

*L'extrait provoque chez la souris des symptômes qui suggèrent une atteinte du système nerveux et aussi des lésions tissulaires caractérisées principalement par des dilatations des capillaires et des nappes hémorragiques au niveau du cerveau, du poumon et des reins. Au niveau du foie, une destruction architecturale a été observée. La DL<sub>50</sub> est de l'ordre de 60,25 à 66,55 mg/kg de souris.*

*L'extrait est également toxique pour d'autres animaux tels le cobaye, le rat et le poussin, les larves de moustique, les alevins de carpe et les têtards de grenouille. Il entraîne aussi la lyse des hématies.*

*L'extrait brut inhibe la germination de graines de quelques plantes potagères et aussi la croissance de jeunes plantules de maïs et de haricot dolique.*

**Mots clés :**

***Deinbollia boinensis***, Sapindaceae, toxine, toxique, ichtyotoxique, inhibition germination, saponoside, tanin, stéroïde





# **INTRODUCTION GENERALE**



## **INTRODUCTION GENERALE**

Les poisons sont des substances susceptibles d'altérer plus ou moins gravement les fonctions vitales d'un organisme vivant. On compte parmi eux les toxines qui sont d'origine naturelle.

Bien que conscient des dangers auxquels il s'expose, l'homme, depuis des temps immémoriaux, utilise des extraits d'organismes toxiques dans plusieurs de ses activités. Ainsi, il les emploie pour chasser, pêcher, lutter contre les animaux nuisibles, mais aussi pour se soigner. Il les utilise également à des fins criminelles.

Plus tard, avec les progrès enregistrés dans diverses disciplines scientifiques telles la chimie, la biochimie, la physiologie, la pharmacologie, la médecine, les connaissances sur plusieurs organismes toxiques se sont améliorées. Les nouvelles données sur la chimie et les propriétés pharmacologiques de leurs principes actifs ont conduit à des utilisations scientifiques des poisons. Ainsi, ils ont été employés pour élucider des phénomènes biologiques, des voies métaboliques, mais aussi à des fins thérapeutiques. A titre d'illustration, on peut citer :

- la ricine et l'abrine, toxines végétales isolées respectivement des graines de *Ricinus communis* et de *Abrus precatorius*, ont beaucoup servi dans l'élucidation de la voie de biosynthèse des protéines et de son mécanisme de régulation (OLSNES et PIHL, 1977).
- la roténone, principe toxique de plusieurs Papilionacées, est connue pour son action inhibitrice du complexe I de la chaîne respiratoire.
- la colicine E<sub>3</sub> a servi dans la compréhension de la structure et de la fonction des membranes (HOLLAND, 1977) ;

- la toxine tétanique ou tétanospasmine, protéine toxique isolée de la bactérie *Clostridium tetani*, est un outil précieux dans l'exploration du fonctionnement du système nerveux central (BIZZINI, 1977) ;
- la cobrotoxine du serpent *Naja naja*, ayant une activité analgésique puissante identique à celle de la morphine, est utilisée dans le traitement du cancer au stade terminal (ROCHAT et coll., 1976 ; HABERMEHL, 1981) ;
- les antibiotiques (pénicilline, chloramphénicol, ...), toxines d'origine bactérienne, sont employées dans les traitements de plusieurs maladies infectieuses.

Un des buts de la toxicologie moderne consiste à rechercher de nouvelles toxines, à les caractériser sur les plans chimique et pharmacologique afin de prospecter des propriétés utiles.

De nombreux organismes toxiques n'ont pas encore fait l'objet d'étude. Parmi les sources de toxines, les plantes s'avèrent intéressantes.

A Madagascar, plusieurs plantes sont réputées toxiques (HECKEL, 1910 ; TERRAC, 1947 ; BOST, 1961 ; DEBRAY et coll., 1971 ; BOITEAU, 1979 et 1993 ; RASOANAIVO et coll., 1993). Le LABASM, par le biais de son unité de recherche sur les toxines, s'est intéressé aux plantes toxiques. Plusieurs plantes issues de différentes familles y ont été déjà étudiées. On peut citer entre autres :

- une AMARANTHACEE, *Henonia scoparia* (RAMAHAFALY, 2002) ;
- une ASCLEPIADACEE, *Pentatropis madagascariensis* (HARINJATOVO, 2001) ;
- des CONNARACEES, *Rourea orientalis* (RAKOTO-RANOROMALALA, 1984), *Cnestis glabra* et *Cnestis polyphylla* (JEANNODA, 1986) ;
- des CUCURBITACEES : *Xeroscicyos danguyi* (RAKOTONDRAZANAKA, 1999) et *Xeroscicyos perrieri* (RANDRIAMIHARISOA, 2000) ;
- une EUPHORBIACEE : *Croton mongue* (RALISON, 1987) ;
- des FABACEES, *Albizia lebbeck* (ANDRIANTSOA, 1983) ; *Albizia arenicola* (RANDRIANARIVO, 1996 et 2003); *Albizia polyphylla* (RAJEMIARIMOELISOA,

## *Introduction générale*

- 1996), *Albizia species* (RAMAMONJISON, 1998) ; *Albizia boivini* (RAHERINIAINA, 1999) et *Albizia odorata* (RAJEMIARIMOELISOA, 2000) ;
- une GENTIANACEE, *Tachiadanus longiflorus* (RAKOTO-RANOROMALALA, 1989) ;
  - une LECITHYDACEE, *Barringtonia butonica* (RATIARIVELO, 2000).
  - une BOLETACEE, *Boletus affinis* (RAZANAMPARANY, 1987) ;

Pour notre part, notre choix s'est fixée sur une SAPINDACEE malgache, ***Deinbollia boinensis***, notamment pour les raisons suivantes :

- les rumeurs sur sa toxicité, que nous avions vérifiées par des tests préliminaires
- l'inexistence d'étude scientifique autre que botanique effectuée sur la plante
- son endémicité

Nos travaux ont principalement consisté à :

- mettre au point des procédés d'extraction et de purification afin de préparer des extraits toxiques suffisamment clarifiés ;
- caractériser les principes toxiques sur les plans chimique, biologique.

Les résultats des travaux entrepris dans le cadre de ce mémoire sont présentés dans deux parties. Dans la première nous décrivons les méthodes utilisées ainsi que les résultats obtenus de l'étude chimique des principes toxiques de la plante. Nous rapportons dans la deuxième partie les résultats de l'étude de leurs propriétés biologiques et toxicologiques avec les méthodes employées. Les deux parties sont précédées d'une introduction générale et suivies d'une conclusion générale et des perspectives d'avenir.

1

# ETUDE CHIMIQUE

REC

## **1. INTRODUCTION**

D'après la littérature, aucune étude autre que botanique, n'a été entreprise sur l'espèce *Deinbollia boinensis*, une plante endémique malgache.

Des tests préliminaires sur souris nous ont permis de vérifier la toxicité des feuilles de cette plante, ce qui nous a amené à essayer :

- de mettre au point des procédés d'extraction et de purification visant à obtenir un extrait toxique suffisamment purifié à partir des feuilles ;
- d'étudier les propriétés physico-chimiques du (ou des) principe(s) toxique(s) ;
- de déterminer la nature chimique de ce (ou ces) principe(s) toxique(s).

## **2. MATERIELS ET METHODES**

### **2.1. MATERIELS**

#### **2.1.1. MATERIEL VEGETAL**

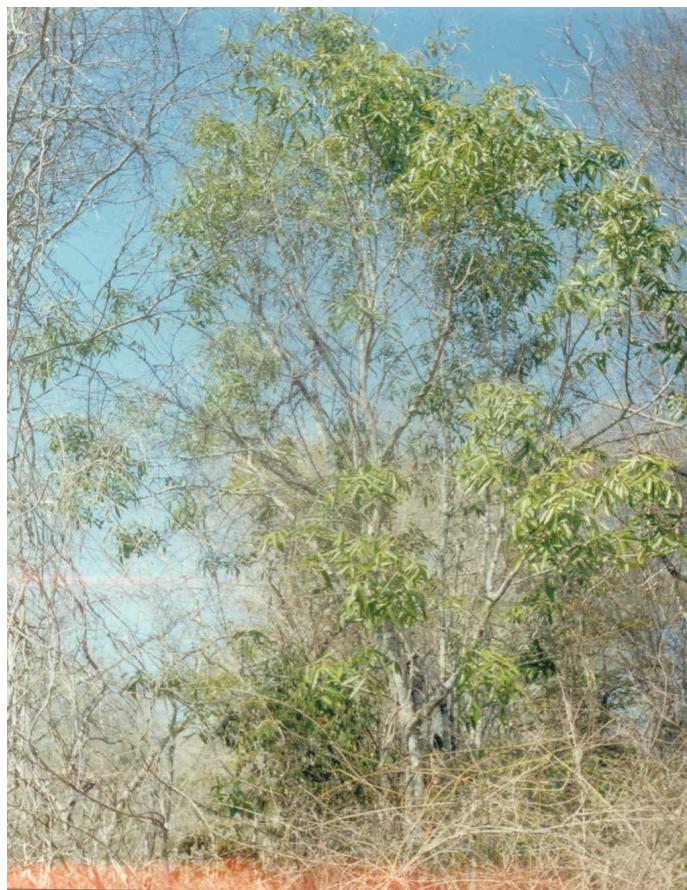
### **2.1.1.1. Description botanique de *Deinbollia boinensis* (CHOUX, 1927 ; CAPURON, 1969 ; SCHATZ, 2001)**

Les principales caractéristiques permettant de décrire l'espèce ainsi que sa classification sont données en annexe I (p.63).

### **2.1.1.2. Distribution géographique et lieu de récolte**

L'espèce ***Deinbollia boinensis*** (figure 1) paraît localisée sur les sols calcaires et est trouvée dans le domaine de l'Ouest depuis la presqu'île d'Antonibe jusqu'au bassin du fleuve Onilahy.

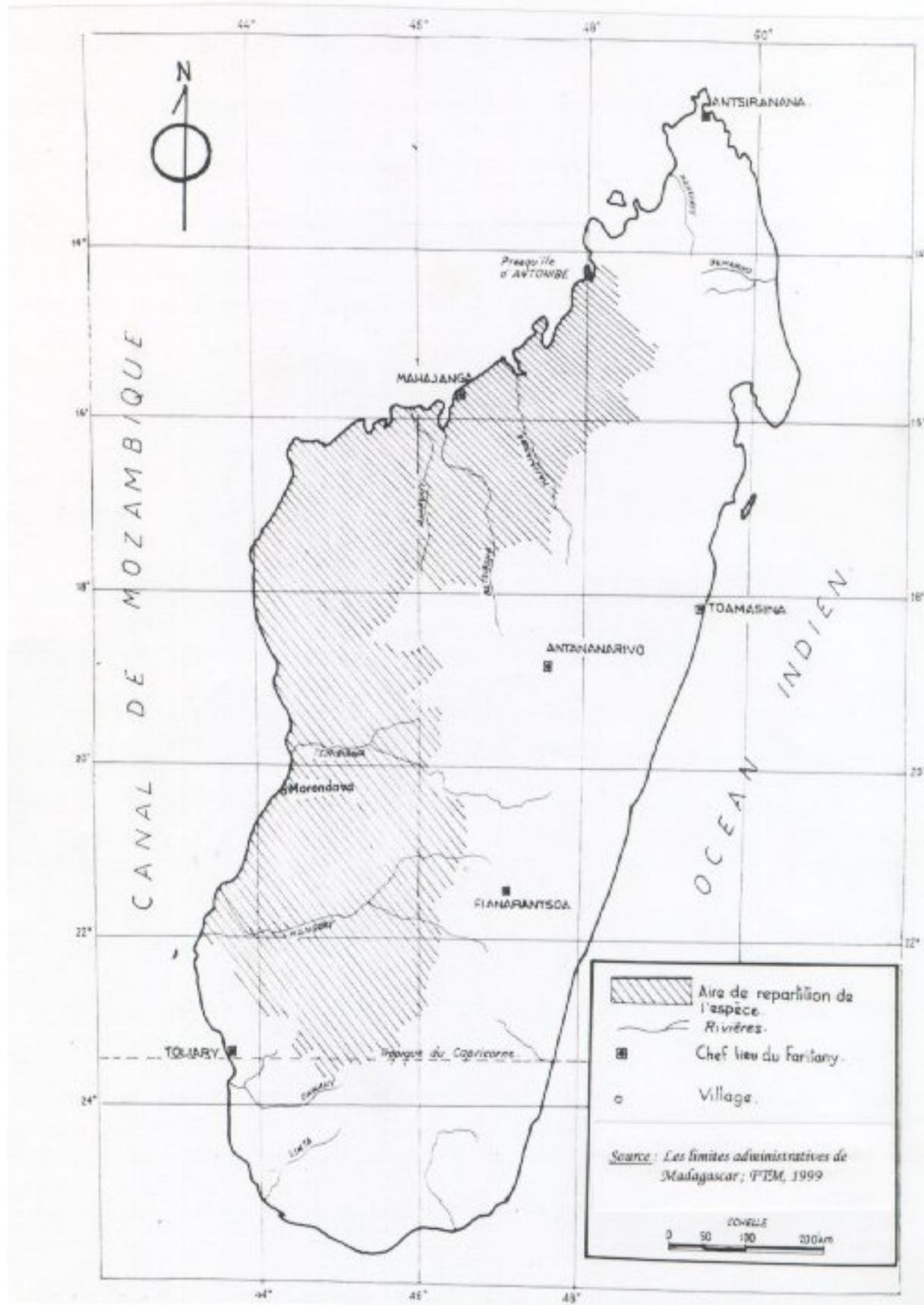
a)



**b)**



*Figure 1 : Deinbollia boinensis : a) plante entière ; b) rameau*



*Figure 2 : Distribution géographique de *Deinbollia boinensis**

La carte de la *figure 2* présente la distribution géographique de la plante qui est connue sous les noms vernaculaires de « *ampelamainty*, *ampoly fotsy*, *dovy*, *fandriatotoroka*, *kamoty*, *lanary*, *mampoly*, *manditokana*, *moramenavavy*, *sagnira*, *somatsohy*, *tatao*, *tsiramiramy* ».

Des rameaux ont été récoltés dans la forêt de Marofandilihy, sise dans la localité de Bemanonga, dans la région de Morondava, en Septembre 2001. Pendant cette période, aucun autre organe, à part les feuilles, ne s'est développé sur la plante.

#### **2.1.1.3. Mode de préparation et conservation du matériel végétal**

Les feuilles fraîches sont séchées au soleil. Elles sont ensuite broyées au moyen d'un microbroyeur (CULATTI) jusqu'à pulvérisation. La poudre fine ainsi obtenue est conservée à la température ambiante. Elle constitue notre matériel végétal de départ.

#### **2.1.2. LES PRODUITS CHIMIQUES**

Les produits chimiques utilisés sont des produits de qualité pure ou pour analyse et sont essentiellement de marque MERCK, PROLABO, BDH, ....

Des plaques de gel de silice KIESELGEL 60 F254 de marque MERCK, de dimension 20 cm x 20 cm, sont utilisées pour la chromatographie sur couche mince. Il s'agit d'un gel de silice pourvu d'indicateur fluorescent étalé sur feuille plastique et dont l'épaisseur de la couche est de 0,2 mm.

#### **2.2. METHODES**

##### **2.2.1. METHODES D' EXTRACTION**

### **2.2.1.1. Extraction à froid**

La poudre de feuille est mise en suspension dans le solvant d'extraction (eau distillée ou éthanol absolu), suivant un rapport 1/10 (p/v). Le mélange, soumis à une agitation magnétique pendant 3 h à la température ambiante, est ensuite laissé macérer pendant une nuit à 4° C. Le macérat est filtré sur quatre épaisseurs de gaze pour éliminer les tourteaux. Le filtrat obtenu est centrifugé à 3000 tours par min pendant 30 min à l'aide d'une centrifugeuse de marque PARIS LABO (cette même centrifugeuse sera employée pour toutes les opérations de centrifugation ultérieures). Le surnageant est récupéré et le culot éliminé.

Dans l'extraction aqueuse, le surnageant est concentré tandis que dans l'extraction alcoolique, il est débarrassé du solvant par évaporation sous pression réduite (cf. § 2.2.3. p.13). Dans les deux cas, le volume final est de 1 ml pour 1 g de matériel de départ.

Une autre centrifugation à 3000 tours par min pendant 15 min est nécessaire afin d'éliminer le précipité apparu lors de la concentration pour que l'extrait brut obtenu soit limpide.

### **2.2.1.2. Extraction à chaud à reflux**

La poudre de feuille est délayée dans de l'eau distillée selon le rapport 1/10 (p/v). Le mélange ainsi obtenu est chauffé à reflux sous agitation magnétique à 70° C pendant 2 h, puis laissé macérer pendant une nuit à 4° C.

Le macérat est filtré sur quatre épaisseurs de gaze afin de le débarrasser des tourteaux. Le filtrat obtenu est centrifugé à 3000 tours par min pendant 30 min. Le culot est éliminé et le surnageant concentré jusqu'à un volume final de 1 ml pour 1 g de matériel de départ.

## **2.2.2. METHODES DE PURIFICATION**

### **2.2.2.1. Précipitation par l'éthanol 50%**

#### **2.2.2.1.1. Principe**

Le pouvoir dissolvant de l'eau est diminué par addition d'un solvant organique peu polaire miscible à l'eau. Un tel traitement décroît la solubilité des molécules dissoutes et entraîne leur précipitation.

#### **2.2.2.1.2. Mode opératoire**

L'extrait, sous agitation magnétique, est additionné goutte-à-goutte d'un égal volume d'éthanol absolu. Le mélange est laissé au repos à 4° C pendant 15 min, temps nécessaire pour parfaire la formation de précipité, puis centrifugé à 3000 tours par min pendant 15 min.

L'éthanol contenu dans le surnageant est éliminé par évaporation, tandis que le culot est repris dans de l'eau distillée.

### **2.2.2.2. Dialyse**

#### **2.2.2.2.1. Principe**

La dialyse est une technique permettant de séparer des substances en utilisant leur capacité respective à franchir les pores d'une membrane appelée membrane de dialyse qui est constituée par du cellophane sous forme de cylindre allongé, fermé aux deux extrémités et qui contient le liquide à dialyser. Ce cylindre prend alors le nom de boudin de dialyse. La perméabilité sélective de la membrane permet la séparation des grosses molécules des petites en établissant un phénomène d'osmose et de diffusion. La membrane sépare ainsi deux solutions de concentrations différentes : le liquide à dialyser et le liquide de contre-dialyse contenu dans un récipient dans lequel est placé le boudin de dialyse et contre lequel s'effectue la dialyse. Les solutés diffusent de la solution la plus concentrée vers la plus diluée. Le phénomène s'achève dès que l'équilibre de concentration entre les deux solutions est atteint (MAHUZIER et HAMON, 1990 ; KAMOUN, 1991 ; AUDIGIER, 1992).

La vitesse de la dialyse est influencée par :

- la température
- le rapport surface de la membrane / volume de la solution à dialyser
- le calibre des pores de la membrane
- le temps de contact
- la différence de concentrations entre les deux milieux.

#### **2.2.2.2.2. Mode opératoire**

##### **Préparation de la membrane de dialyse**

La membrane de dialyse contient de la glycérine, des composés sulfurés et des métaux lourds qu'il faut préalablement éliminer. Pour ce faire, elle est mise à bouillir dans de l'eau distillée pendant 15 min. L'eau est ensuite changée et l'opération est répétée trois fois. La membrane ainsi préparée peut être conservée dans de l'eau distillée à 4° C pendant quelques jours.

### **Préparation du boudin de dialyse et mise en marche de la dialyse**

Le boudin de dialyse contenant l'extrait à dialyser est noué à ses deux extrémités en prévoyant suffisamment d'espace pour les échanges. Il est immergé complètement dans le liquide de contre-dialyse. La formation de gradient de concentration des substances diffusibles dans le bécher qui contient le liquide de contre-dialyse est évitée par agitation magnétique. L'utilisation d'un volume important de liquide de contre-dialyse ou son fréquent renouvellement permet d'accélérer la dialyse.

#### **2.2.2.3. Fractionnement par le n-butanol**

##### **2.2.2.3.1. Principe**

C'est une technique d'extraction liquide-liquide basée sur la solubilité relative d'une ou de plusieurs substances vis-à-vis de deux solvants non miscibles, et utilisant son ou leur transfert d'une phase liquide (phase aqueuse) à une autre phase liquide (phase butanolique) (MAHUZIER et HAMON, 1990).

##### **2.2.2.3.2. Mode opératoire**

A l'extrait aqueux placé dans une ampoule à décanter est ajouté un égal volume de n-butanol. Le mélange est agité fortement, puis laissé reposer jusqu'à décantation totale aboutissant à la formation de deux phases bien nettes : une phase supérieure butanolique ou phase organique et une phase inférieure aqueuse. Les deux phases sont récupérées séparément et la phase aqueuse est soumise de nouveau à deux autres fractionnements successifs.

Les trois phases butanoliques obtenues sont rassemblées, puis filtrées sur papier filtre afin d'éliminer les gouttelettes d'eau de saturation. Un grand volume d'eau distillée est ajouté au filtrat ainsi obtenu, le butanol est ensuite évaporé.

La phase aqueuse est débarrassée des traces de butanol par évaporation après addition d'eau distillée.

#### **2.2.2.4. Précipitation par le mélange acétone / éther**

##### **2.2.2.4.1. Principe**

Il s'agit d'un procédé de fractionnement basé sur les différences de solubilité. Les substances les moins solubles précipitent par diminution du pouvoir dissolvant du milieu, consécutive à l'addition d'un solvant moins polaire.

##### **2.2.2.4.2. Mode opératoire**

L'extrait à traiter est évaporé à sec. Le résidu obtenu est repris dans du méthanol selon le rapport 3/5 (p/v). Les substances peu solubles sont précipitées par addition goutte-à-goutte d'un volume déterminé du mélange acétone / éther (v/v). Le traitement se poursuit jusqu'à ce qu'il n'y ait plus formation de précipité. Toute cette opération est réalisée à basse température dans un bac à glace et sous agitation magnétique. Le mélange est ensuite laissé reposer à froid jusqu'à décantation complète du précipité formé. Le surnageant est aspiré puis éliminé, tandis que le précipité est récupéré dans de l'eau distillée. Les traces de solvant sont éliminées par évaporation.

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

##### **2.2.2.5.1. Principe**

L'acétate neutre de plomb (ANP), tout comme d'autres sels de métaux lourds, permet la défécation d'extraits biologiques en précipitant les grosses molécules comme les protéines, les acides nucléiques, les polysaccharides ainsi que d'autres molécules telles que les acides organiques.

##### **2.2.2.5.2. Mode opératoire**

Une solution aqueuse d'ANP à 20% (p/v) de volume déterminé est ajoutée goutte-à-goutte dans l'extrait soumis à une agitation magnétique. Le précipité formé est écarté par centrifugation à 3000 tours par min pendant 10 min.

Un volume déterminé d'une solution aqueuse de phosphate disodique à 10% (p/v) est versé goutte-à-goutte au surnageant afin d'éliminer l'excès de plomb qui s'y trouve. Une autre centrifugation à 3000 tours par min pendant 10 min est réalisée afin d'écartier le précipité formé. Le surnageant est récupéré.

## **2.2.2.6. Filtration sur charbon actif**

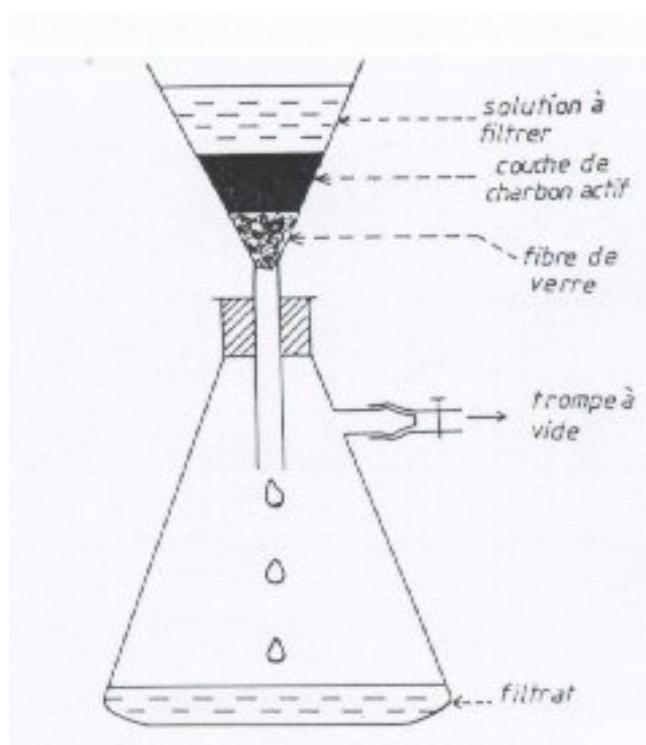
### **2.2.2.6.1. Principe**

Le charbon est un adsorbant peu spécifique ayant une affinité pour des substances de nature aromatique. Il est utilisé en chromatographie pour la déprotéinisation ou la décoloration des extraits liquides ainsi que pour la séparation des acides aminés aromatiques.

### **2.2.2.6.2. Mode opératoire**

La technique utilisée est celle développée par JEANNODA (1986). Une couche de charbon actif (MERCK) est déposée dans un entonnoir bouché avec de la laine de verre. L'entonnoir muni d'un bouchon en caoutchouc est monté sur une fiole à vide. La couche de charbon est préalablement humectée d'eau distillée avant d'y déposer l'extrait à purifier. La filtration est assurée par une légère aspiration à l'aide d'une pompe à vide. Le filtrat obtenu est filtré sur membrane millipore de porosité  $0,45 \mu\text{m}$  afin d'éliminer les éventuelles fines particules de charbon, rendant le filtrat grisâtre. Ce filtrat est par la suite concentré.

Le schéma du dispositif est représenté sur la *figure 3*.



*Figure 3 : Dispositif de filtration sous pression réduite sur une couche de charbon actif*

### **2.2.3. METHODE DE CONCENTRATION**

Toute opération de réduction de volume, de concentration et d'évaporation de solvant est réalisée à l'aide d'un évaporateur rotatif HEIDOLPH. La température est de 55° C et la pression est réduite au moyen d'une pompe à vide.

### **2.2.4. METHODES D' ANALYSE**

#### **2.2.4.1. Chromatographie sur couche mince**

##### **2.2.4.1.1. Principe**

C'est une technique d'analyse permettant d'apprécier l'homogénéité d'extraits. Elle fait intervenir des phénomènes de partage et d'adsorption. Elle utilise le transfert des substances à séparer d'une phase stationnaire ou fixe vers une autre qui est mobile. La vitesse de déplacement est fonction de l'affinité des substances pour la phase mobile organique d'une part, et des forces d'adsorption dues au support stationnaire d'autre part (RANDERATH, 1964 ; VERNIN, 1970 ; AUDIGIER, 1989 ; MAHUZIER et HAMON, 1990).

##### **2.2.4.1.2. Mode opératoire**

###### **2.2.4.1.2.1. Dépôt des échantillons**

Sur une plaque découpée aux dimensions voulues, les extraits à chromatographier sont déposés à l'aide d'un capillaire en fins tirets horizontaux de 7 mm de long, espacés de 6 mm et situés à 1,5 cm du bord inférieur et à 1,3 cm des bords latéraux de la plaque. Les dépôts sont séchés à l'aide d'un séchoir à main.

###### **2.2.4.1.2.2. Développement**

La plaque précédemment préparée est placée verticalement dans une cuve à chromatographie DESAGA préalablement saturée par les vapeurs du solvant de migration en tapissant ses parois internes de papier filtre imprégné de solvant.

Le système de solvant Butanol / Acide acétique / Eau distillée (B/A/E) 60/20/20 (p/p) est utilisé comme solvant de migration.

Il s'agit d'une migration ascendante qui est arrêtée dès que le front du solvant arrive à 0,5 cm du bord supérieur de la plaque. La plaque est retirée de la cuve puis séchée au moyen d'un séchoir à main.

#### **2.2.4.1.2.3. Révélation des chromatogrammes**

La révélation des chromatogrammes est assurée par deux méthodes :

- 1ère méthode : examen des spots en lumière ultraviolette à 254 nm et à 366 nm.
- 2ème méthode : pulvérisation sur la plaque du réactif à la ninhydrine ou celui à la vanilline-sulfurique. La pulvérisation du premier réactif entraîne des taches roses ou violettes quelques minutes après séchage à l'air chaud. Pour le second réactif, sa pulvérisation provoque l'apparition de taches roses violacées qui noircissent après chauffage à l'étuve à 120° C pendant 5 min.

Les compositions de ces réactifs peuvent être consultées en annexe II (p.64).

#### **2.2.4.2. Détection des familles chimiques (criblage phytochimique)**

Pour chaque opération de détection, le résidu d'évaporation à sec de 1 ml de l'extrait à étudier est utilisé.

##### **2.2.4.2.1. Les alcaloïdes**

- Macération chlorhydrique

Le résidu d'évaporation à sec est macéré dans 3 ml d'acide chlorhydrique (HCl) 2N. Le mélange obtenu est filtré sur du papier filtre. Le filtrat est ensuite réparti dans quatre tubes à essai dont un sert de témoin et les trois autres pour les tests préliminaires. Ces derniers sont relatifs à ceux de MAYER, de WAGNER et de DRAGENDORFF.

Les compositions des réactifs sont données en annexe II (p.64).

- Déroulement des tests

Cinq gouttes de chaque réactif sont ajoutées dans chacun des trois tubes.

L'apparition d'un précipité ou d'une flocculation démontre la présence d'alcaloïdes dans l'extrait à analyser (DALTON, 1979 ; CORDELL, 1981 ; BRUNETON, 1993 ).

### - Tests de confirmation

La réalisation des tests de confirmation s'avère nécessaire dans le cas où les résultats des tests préliminaires seraient positifs.

Le résidu d'évaporation à sec est repris dans 3 ml d'HCl 5%. La solution obtenue est agitée dans un bain-marie bouillant pendant 5 min. Après refroidissement, le milieu est alcalinisé par l'ammoniaque, puis la solution est extraite trois fois par le chloroforme. Les solutions chloroformiques obtenues sont rassemblées puis évaporées à sec. Les substances à groupement ammonium quaternaire et N-oxyde éventuellement présentes se retrouvent dans la phase aqueuse alcaline qui est alors acidifiée par l'HCl 2N. La solution obtenue est filtrée. Le filtrat est réparti dans quatre tubes dont un sert de témoin. Les trois autres tubes sont testés respectivement par les réactifs de MAYER, de WAGNER et de DRAGENDORFF. La formation d'un précipité blanc soluble dans l'éthanol confirme la présence d'alcaloïdes dans l'extrait à tester.

#### **2.2.4.2.2. Les flavonoïdes et les leucoanthocyanes (FONG et coll., 1977)**

Le résidu d'évaporation à sec est repris dans 3 ml d'éthanol 80%, puis filtré sur papier filtre. Le filtrat obtenu est réparti dans quatre tubes à essai dont un sert de témoin.

##### ***2.2.4.2.2.1. Les flavonoïdes : test de WILSTATER (test à la cyanidine)***

Dans le premier tube, 0,5 ml d'acide chlorhydrique concentré et deux tournures de magnésium sont additionnés.

Dans le deuxième tube, outre les composants précédents, 1 ml d'eau distillée et 1 ml d'alcool isoamylique sont versés.

La présence de flavonoïdes est indiquée par les virages de coloration suivants :

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

#### **2.2.4.2.2.2. Les leucoanthocyanes : test de BATE – SMITH** (FONG et coll., 1977)

Dans le troisième tube : 0,5 ml d'acide chlorhydrique concentré est additionné, puis le tout est porté au bain-marie bouillant pendant 30 min.

Si après refroidissement, l'apparition d'une coloration rouge est observée, l'extrait renferme alors des leucoanthocyanes.

#### **2.2.4.2.3. Les tanins et les polyphénols** (HEMINGWAY et KARCHESY, 1989)

Le résidu d'évaporation à sec est dissous dans 3 ml d'eau distillée chaude. Le mélange est partagé dans quatre tubes à essai dont le premier sert de témoin et les trois autres pour analyser la présence ou non de tanins et pour identifier les types éventuellement présents.

##### **2.2.4.2.3.1. Test à la gélatine**

Au contenu du premier tube sont ajoutées quatre gouttes de gélatine aqueuse à 1% (p/v).

L'apparition d'un précipité révèle la présence de tanins hydrosolubles de type catéchique.

##### **2.2.4.2.3.2. Test à la gélatine salée**

Au contenu du deuxième tube sont additionnées quatre gouttes de gélatine salée (gélatine aqueuse à 1% mélangée avec du NaCl à 10%).

La formation d'un précipité démontre la présence de tanins condensés de type pyrogallique.

##### **2.2.4.2.3.3. Test au chlorure ferrique**

Au contenu du troisième tube sont versées quatre gouttes de chlorure ferrique 10% en solution méthanolique.

La présence de tanins se manifeste par un changement de la coloration du contenu du tube en :

- bleu verdâtre pour les tanins de type catéchol ;
- bleuâtre pour ceux de type pyrogallol.

Si le test à la gélatine est négatif alors que le test au chlorure ferrique est positif, l'extrait à analyser contient des composés polyphénoliques autres que les tanins.

#### **2.2.4.2.4. Les anthraquinones : test de BORNTRÄGER**

Le résidu d'évaporation à sec est dissous dans 3 ml d'eau distillée. La solution ainsi obtenue est transvasée dans une ampoule à décanter puis additionnée d'un égal volume de benzène. Le mélange est secoué énergiquement puis laissé au repos. La formation de deux phases est observée : une phase aqueuse et une phase benzénique. Cette dernière est recueillie puis ajoutée de cinq gouttes d'ammoniaque à 25%.

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

#### **2.2.4.2.5. Les saponines (FONG et coll., 1977)**

Le résidu d'évaporation à sec est dissous dans 3 ml d'eau distillée. La solution obtenue est fortement agitée pendant 30 s.

La présence de saponines dans l'extrait à analyser se traduit par la formation d'une mousse d'une hauteur de 3 cm, persistante pendant 30 min.

#### **2.2.4.2.6. Les stéroïdes et triterpènes et les stérols insaturés (FONG et coll., 1977)**

Le résidu d'évaporation est repris dans 3 ml de chloroforme. La solution obtenue est filtrée sur papier filtre. Le filtrat est distribué dans trois tubes à essai dont le premier sert de témoin.

##### **2.2.4.2.6.1. Les stéroïdes et triterpènes : test de LIEBERMANN – BÜRCHARD**

Dans le deuxième tube, deux gouttes d'anhydride acétique sont ajoutées au filtrat précédemment obtenu. Le mélange est ensuite soumis à une légère agitation. Quelques gouttes d'acide sulfurique concentré sont ensuite additionnées au mélange en inclinant le tube.

L'observation se fait au bout d'une heure. La présence de triterpènes est révélée par l'apparition d'un anneau rouge ou violet à l'interface, tandis que celle des stéroïdes se manifeste par une coloration verdâtre de la phase aqueuse. Les deux phénomènes peuvent être observés simultanément.

##### **2.2.4.2.6.2. Les stérols insaturés : test de SALKOWSKI**

Le filtrat contenu dans le dernier tube est additionné de 1 ml d'acide sulfurique concentré tout en inclinant le tube.

La présence des stérols insaturés dans l'extrait à analyser est caractérisée par l'apparition à l'interface d'un anneau rouge ou violet.

#### **2.2.4.2.7. Les désoxyoses : test de KELLER – KILIANI (FONG et coll., 1977)**

Le résidu d'évaporation à sec est repris dans une solution aqueuse de chlorure ferrique à 10% additionnée d'acide acétique glacial. Après une douce agitation du mélange, de l'acide sulfurique concentré y est versé volume-à-volume en inclinant légèrement le tube.

La présence de désoxyoses dans l'extrait à analyser est indiquée par la formation d'un anneau pourpre à l'interface.

#### **2.2.4.2.8. Les iridoïdes**

Le résidu d'évaporation à sec est dissous dans de l'eau distillée puis de l'acide chlorhydrique concentré est ajouté au mélange. Le tout est ensuite chauffé au bain-marie bouillant durant 30 min.

La présence d'iridoïdes dans l'extrait à analyser se traduit par le virage de sa coloration en bleu.

### **3. RESULTATS**

Tout au long de nos manipulations, il a été observé que l'activité des principes toxiques contenus dans les feuilles de *Deinbollia boinensis* n'est pas affectée par les variations de température. Ils sont résistants non seulement à des opérations de congélation et de décongélation mais aussi à des températures élevées. En conséquence, toutes les expériences ont été réalisées à la température ambiante, les opérations de concentration et d'évaporation de solvants à 55° C et la conservation des différents extraits à -20° C.

#### **3.1. EXTRACTION**

Pour obtenir l'extrait brut, les principes toxiques contenus dans 50 g de poudre de feuilles ont été extraits de deux manières différentes :

- à froid avec comme solvants d'extraction l'eau distillée d'une part et l'éthanol d'autre part. Pour ce faire, les 50 g de poudre de feuille sont délayés dans 500 ml de solvant d'extraction (rapport 1/10, p/v). La suite des opérations est décrite au § 2.2.1.1.
- à chaud à reflux avec l'eau distillée comme solvant d'extraction. Le déroulement de cette opération est indiqué au § 2.2.1.2.

Les résultats de ces deux méthodes d'extraction sont présentés dans le *tableau 1*.

*Tableau 1 : Résultats des différentes méthodes d'extraction*

Type d'extraction	Extraction aqueuse à froid	Extraction aqueuse à chaud	Extraction alcoolique à froid
pH de l'extrait brut	5,7	5,6	5,4
Couleur	brun noir	brun noir	brun clair
Aspect	lumineux, sirupeux	lumineux, sirupeux, mousseux	lumineux, sirupeux, mousseux
Goût	amer	amer	amer
Echelle de toxicité (en temps de survie)	20 à 40 min	60 à 90 min	60 à 90 min

Ces différents extraits bruts sont tous toxiques pour la souris. Néanmoins, la technique d'extraction aqueuse à froid été la seule retenue pour la suite de notre travail pour les raisons suivantes :

- elle présente un avantage du point de vue économique car elle est la moins onéreuse ;
- elle procure les meilleurs résultats. En effet, l'extrait brut obtenu présente moins de contaminants. En outre, en se référant au temps de survie des souris testées dans les mêmes conditions, l'extrait s'avère le plus毒ique ;
- elle est intéressante sur le plan pratique car elle permet d'obtenir un extrait moins moussant ce qui facilite beaucoup la manipulation et diminue davantage les pertes d'extrait.

### **3.2. PURIFICATION**

A partir de l'extrait brut, plusieurs techniques ont été éprouvées afin de purifier le (ou les) principe(s) toxique(s). Ces techniques sont fondées sur plusieurs propriétés telles que le

poids moléculaire ou la solubilité. Trois d'entre ces quelques techniques ont été retenues pour constituer le procédé de purification. Ces étapes de purification ont été guidées par des tests de toxicité sur souris et d'homogénéité par CCM.

### **3.2.1. PRECIPITATION PAR L' ETHANOL 50%**

50 ml d'extrait brut sont additionnés d'un égal volume d'éthanol pur, selon la méthode décrite au § 2.2.2.1.

Nous avons ainsi obtenu un surnageant de couleur brune qui est toxique pour la souris.

Cette technique a permis d'éliminer certains contaminants de l'extrait brut tout en gardant les principes toxiques dans le surnageant. Ainsi, elle a été retenue dans notre protocole de purification et constitue sa première étape. Le surnageant obtenu est appelé extrait E<sub>1</sub>.

### **3.2.2. DIALYSE**

L'extrait E<sub>1</sub>, de volume égal à 50 ml, est dialysé contre de l'eau distillée, (cf. § 2.2.2.2. p.)

L'adialysat ou dialysant, c'est-à-dire le liquide restant dans le boudin, de couleur brun clair atteint un volume de 120 ml. Ce volume est ramené à 50 ml par concentration.

Le dialysat, ou liquide de contre-dialyse se trouvant à l'extérieur du boudin, de couleur jaune paille, atteint au total un volume de 3000 ml. Il est aussi concentré à 50 ml.

Les tests sur souris ont révélé que seul l'adialysat est toxique.

A cette étape de purification, toutes les petites molécules dont le poids moléculaire est inférieur au seuil (15000 da) sont éliminées. D'où l'importance de la technique de dialyse qui constitue la deuxième étape de notre procédé de purification. L'adialysat constitue alors l'extrait E<sub>2</sub>.

### **3.2.3. FRACTIONNEMENT PAR LE n - BUTANOL**

Aux 50 ml d'extrait E<sub>2</sub> sont ajoutés 50 ml de n-butanol. L'opération de fractionnement est répétée trois fois selon la méthode décrite au § 2.2.2.3.

Les deux phases, butanolique de couleur jaune paille d'une part et aqueuse de couleur rougeâtre d'autre part, sont testées sur souris. Seule la phase organique est toxique : elle forme l'extrait E<sub>3</sub>.

### **3.2.4. PRECIPITATION PAR LE MELANGE ACETONE / ETHER**

Le précipité obtenu selon la technique décrite au § 2.2.2.4.2. est repris dans de l'eau distillée.

Les souris testées avec cette solution développent des symptômes d'intoxication et ne meurent qu'au-delà de 24 h. Du fait de cette perte d'activité, la technique n'a pas été retenue dans le protocole de purification.

### **3.2.5. PRECIPITATION PAR L' ACETATE NEUTRE DE PLOMB**

3 ml de solution aqueuse d'ANP à 20% (p/v) sont ajoutés à 50 ml d'extrait à purifier. La suite de l'opération est décrite au § 2.2.2.5.2. L'excès de plomb est éliminé avec 3 ml de solution aqueuse de phosphate disodique.

A la fin de l'opération, nous avons obtenu un extrait très peu coloré, limpide mais qui n'est pas toxique pour les souris. Les principes actifs sont donc précipités par l'ANP. Aussi, cette méthode n'a-t-elle pas été retenue dans le procédé de purification.

### **3.2.6. FILTRATION SUR CHARBON ACTIF**

L'extrait à purifier de volume 5 ml est déposé sur une couche de charbon actif préalablement humectée (cf. § 2.2.2.6.2.).

Le filtrat incolore n'a provoqué aucun symptôme d'intoxication sur souris. Ainsi, cette étape n'a pas été retenue.

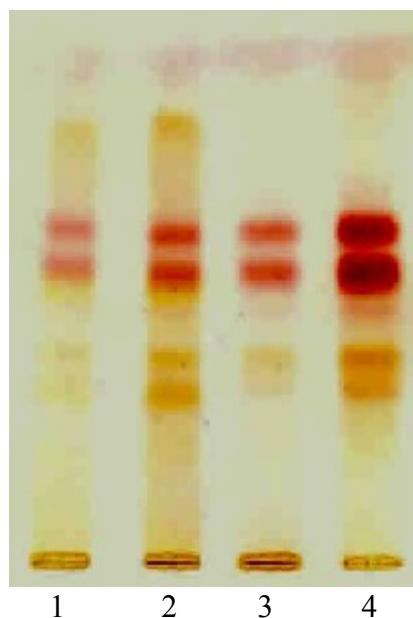
### **3.2.7. DEGRE D' HOMOGENEITE DES DIFFERENTS EXTRAITS**

Le chromatogramme de la *figure4* représente l'évolution de l'homogénéité des différents extraits toxiques obtenus aux différentes étapes de purification.

Les chromatogrammes sont d'abord visualisés à la lumière UV de 254 nm de longueur d'onde.

Ils sont ensuite révélés à l'aide du réactif à la vanilline sulfurique.

L'extrait brut comporte six bandes majeures révélables, alors que l'extrait  $E_3$  n'en comporte que quatre. La purification a donc permis d'éliminer deux bandes majeures.



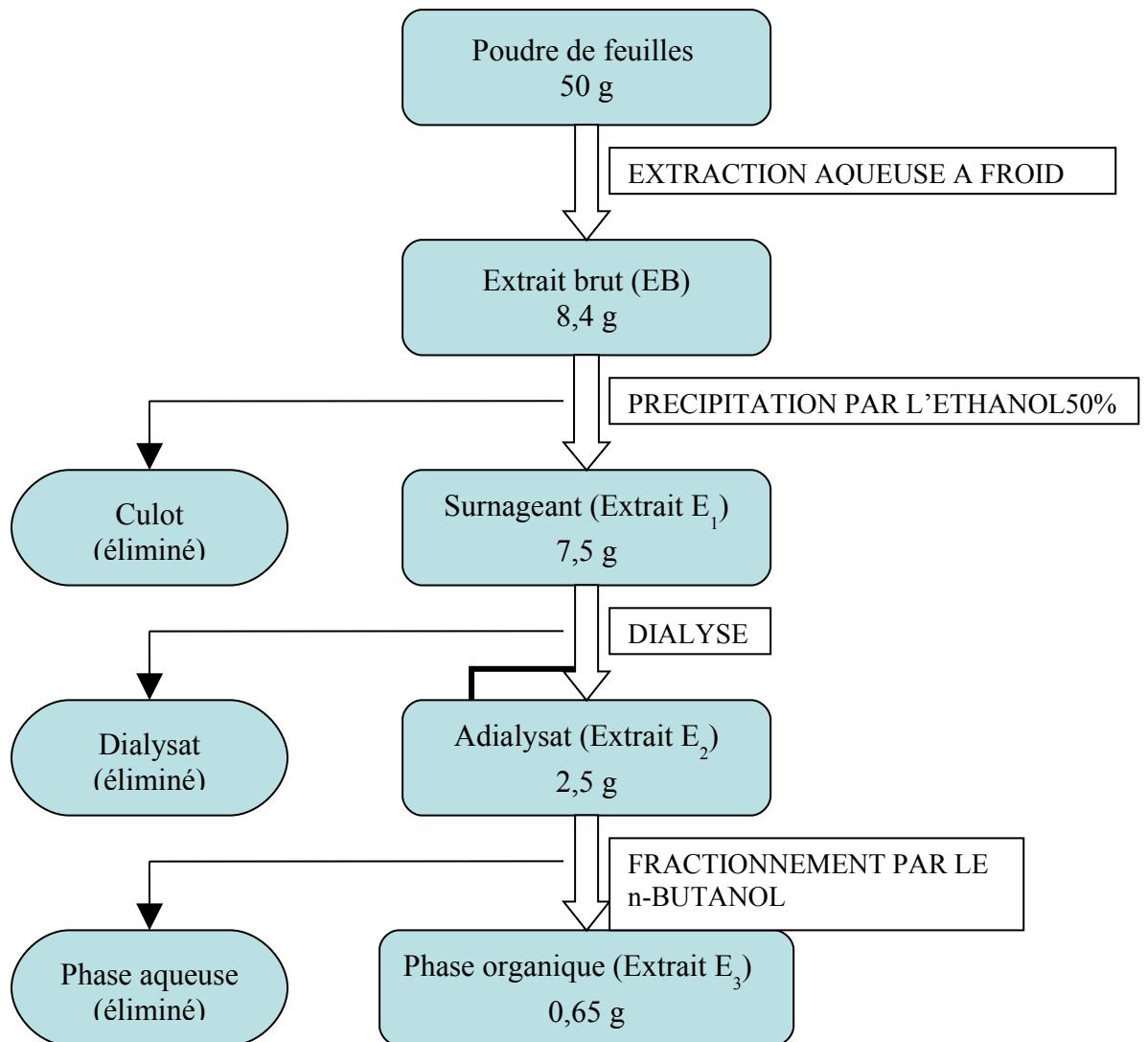
*Figure 4.: 1) Extrait brut ; 2) Extrait  $E_1$ ; 3) Extrait  $E_2$ ; 4) Extrait  $E_3$*

### 3.2.8. RENDEMENT

A l'issue de chaque étape de la purification, l'extrait toxique obtenu est évaporé à sec et le résidu sec est pesé.

A partir de 50 g de poudre de feuilles de *Deinbollia boinensis*, nous avons obtenu 0,65 g de résidu sec de l'extrait  $E_3$ . Le rendement en toxine calculé par rapport au matériel de départ est ainsi évalué à 1,3%. Le rendement de purification calculé à partir de l'extrait brut est de l'ordre de 7,73%.

Les différentes étapes du procédé de préparation des extraits toxiques sont résumées sur la *figure 5*.



**Figure 5: Schéma récapitulatif des étapes dans la préparation des différents extraits toxiques**  
*Les chiffres indiquent les poids des résidus d'évaporation à sec des extraits.*

### 3.3. CARACTERISATION CHIMIQUE

#### 3.3.1. PROPRIETES PHYSICO - CHIMIQUES

Les divers types d'extraction et de purification ont permis d'apprécier certaines propriétés physico-chimiques des principes toxiques des feuilles de *Deinbollia boinensis* :

- ils sont solubles dans l'eau et dans certains solvants organiques polaires tels que l'éthanol et le butanol ;
- ils sont thermostables puisque leur activité毒ique ne change pas à la température ambiante, ou à des températures élevées et après des opérations de congélation et de décongélation répétées ;

- ils sont précipitables par l'acétate neutre de plomb ;
- ils ne traversent pas les pores de la membrane de dialyse ;
- ils sont retenus par le charbon actif ;
- les différents extraits ont un goût amer.

### 3.3.2. NATURE CHIMIQUE

Un criblage phytochimique, dont les résultats sont récapitulés dans le *tableau 2*, a été effectué sur l'extrait brut et l'extrait E<sub>3</sub> afin de déterminer la nature chimique des principes toxiques.

D'après ces résultats, les deux extraits réagissent positivement aux tests des tanins et des polyphénols, des saponines, des stérols insaturés et des triterpènes ainsi que des désoxyoses.

*Tableau 2: Résultats du criblage phytochimique de l'extrait brut et de l'extrait E<sub>3</sub>*

FAMILLE CHIMIQUE	TEST	RESULTAT	
		Extrait brut	Extrait E <sub>3</sub>
ALCALOÏDES	MAYER	—	—
	WAGNER	—	—
	DRAGENDORFF	—	—
FLAVONOÏDES et LEUCANTHOCYANES	WILSTATER	—	—
	BATE-SMITH	—	—
TANINS et POLYPHENOLS	Gélatine	+	+
	Gélatine salée	+	+
	Chlorure ferrique	+	+
ANTHRAQUINONES	BORNTRÄGER	—	—
SAPONINES	Indice de mousse	+	+
STEROLS INSATURES et TRITERPENES	SALKOWSKI	+	+
	LIEBERMANN-BÜRCHARD	+	+
DESOXYOSES	KELLER-KILIANI	+	+
IRIDOÏDES	Acide chlorhydrique à chaud	—	—

+ : résultat positif

—: résultat négatif

### 4. DISCUSSIONS ET CONCLUSION

Les résultats de l'étude chimique ont permis de mettre en évidence la toxicité des feuilles de ***Deinbollia boinensis***.

Plusieurs techniques d'extraction et de purification ont été essayées. La méthode d'extraction aqueuse à froid a été choisie pour la préparation de l'extrait brut. En effet, à performances sensiblement comparables à celles des autres méthodes testées, du point de vue de la toxicité et de l'homogénéité des extraits bruts, elle est nettement plus économique.

Parmi les techniques de purification éprouvées, trois d'entre elles ont été retenues, à savoir la précipitation par l'éthanol 50%, la dialyse et le fractionnement par le n-butanol. Elles constituent les étapes du procédé de purification aboutissant à un extrait partiellement purifié.

La purification des extraits aurait pu être améliorée à l'aide de techniques plus résolutives comme la chromatographie sur gel de silice, mais le faible rendement de l'extrait E<sub>3</sub> (1,32%) ne l'a pas permis.

Néanmoins, les techniques testées, retenues ou non dans le procédé de purification, ont fourni des renseignements sur les propriétés physico-chimiques de ces principes toxiques. En effet, ce sont des composés thermostables, solubles dans les solvants polaires tels l'eau et l'éthanol, et dans les solvants organiques comme le butanol. Ils sont précipitables par les sels de métaux lourds comme l'ANP.

Leur incapacité à passer à travers la membrane de dialyse porte à penser qu'il s'agit de composés de poids moléculaire relativement élevé s'il n'y a pas interférence (adsorption aspécifique) avec la membrane de dialyse. D'autres techniques comme le gel filtration ou l'ultrafiltration dans des conditions qui ne favorisent pas les interactions non spécifiques (par exemple l'utilisation de NaCl) devraient être utilisées pour vérifier ce résultat.

Leur forte adsorption sur le charbon actif laisse suggérer qu'ils possèdent probablement dans leur structure des noyaux aromatiques ou cycliques.

En conclusion, les résultats de notre étude révèlent la présence dans les feuilles de ***Deinbollia boinensis*** de principes toxiques dont le nombre et la nature exacte restent à

préciser ultérieurement. Ces principes toxiques pourraient être des saponosides avec des génines stéroïdiques et triterpéniques.

## **Deuxième partie**

ETUDE DES PROPRIETES  
TOXICOLOGIQUES DES  
FEUILLES  
DE *Deinbollia boinensis*



## 1. INTRODUCTION

Les travaux relatifs à l'étude chimique ont permis d'obtenir un extrait partiellement purifié, toxique pour la souris. Pour des raisons de commodité, ce dernier sera appelé « extrait » pour la suite de nos travaux.

Dans cette deuxième partie nous nous sommes fixés comme objectif d'approfondir cette propriété et d'en explorer d'autres. Ainsi, nous avons :

- sur la souris, estimé la toxicité de l'extrait, étudié les symptômes qu'il provoque chez l'animal ainsi que les lésions au niveau de différents organes ;
- sur d'autres espèces animales à sang chaud, comparé la sensibilité vis-à-vis de l'extrait ;
- sur les larves de moustique, sur les alevins de carpe et les têtards de grenouille, observé les effets de l'extrait ;
- sur le système végétal, étudié les effets des extraits sur le pouvoir germinatif des graines et sur la croissance des plantules ;
- sur divers micro-organismes, examiné l'influence des principes toxiques sur leur croissance.

## 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

Les animaux (*Mus musculus*), mâles âgés de 4 à 5 semaines dont le poids est de  $25 \pm 2$  g, issus de la race TANA-SWISS stabilisée depuis plusieurs années à l'IPM, proviennent de l'élevage du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée.

### **2.1.1.1.2. Les autres espèces**

Les cobayes tricolores (*Rattus norvegicus*) proviennent d'un fournisseur privé agréé, les rats blancs (*Rattus rattus*) de souche WISTAR de l'élevage du Département de Physiologie Animale et les poussins de un jour (*Gallus gallus*) ont été achetés auprès d'un centre avicole (Avitech).

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

#### **2.1.1.2.1. Les alevins de poisson**

Des alevins de *Cyprinus carpio* ont été fournis par un pisciculteur agréé par le Ministère de la Pêche et des Ressources Halieutiques à Ampandrianomby, Antananarivo. Les tests sur ces alevins ont lieu après une semaine d'adaptation dans un aquarium.

#### **2.1.1.2.2. Les têtards de grenouille**

Les têtards de *Ptychadena mascareniensis* ont été capturés dans les rizières sises aux alentours du campus d'Ankatso (Université d'Antananarivo).

#### **2.1.1.3. Les insectes**

Les larves de *Culex quinquefasciatus* sont élevées au sein du LABASM.

### **2.1.2. LES VEGETAUX D' EXPERIMENTATION**

Les graines ayant fait l'objet d'étude ont été gracieusement fournies par le FOFIFA.

Ce sont :

Famille	Nom vernaculaire	Espèce
APIACEAE	Carotte Persil chinois	<i>Ducus carotta</i> <i>Petroselinum crispum</i>
ASTERACEAE	Laitue	<i>Lactuca sativa</i>
BRASSICACEAE	Tissam blanc	<i>Brassica sp</i>
CUCURBITACEAE	Courgette	<i>Cucurbita pepo</i> <i>medullosa</i>
FABACEAE	Haricot Petit pois Haricot dolique Pois bambara	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Pisum sativa</i> <i>Vigna inguiculata</i> <i>Vigna subterranea</i>
LAMIACEAE	Basilic	<i>Occimum basilicum</i>
LILIACEAE	Oignon	<i>Allium cepa</i>
POACEAE	Riz Maïs	<i>Oriza sativa</i> <i>Zea mays</i>
SOLANACEAE	Morelle noire	<i>Solanum nigrum</i>

	Pomme de terre	<i>Solanum tuberosum</i>
<b>2.1.3. LES SOUCHES MICROBIENNES UTILISEES COMME GERMES - TESTS</b>		

Les différentes souches ont été fournies par le Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement (LME) du CNRE.

#### **2.1.4. LES MILIEUX DE CULTURE**

Les milieux de culture utilisés sont ceux déjà disponibles au sein du LME. Leurs compositions sont données en *annexe IV* (p.65).

#### **2.1.5. STERILISATION**

Les disques d'antibiogramme, les cônes des micropipettes (PIPETMAN) ainsi que les milieux de culture sont stérilisés à l'autoclave (STERICLAVE) à 120° C et la verrerie au stérilisateur (THERMOSI SR-1000).

### **2.2. METHODES**

#### **2.2.1. METHODES D' ETUDE DES EFFETS SUR LES ANIMAUX**

##### **2.2.1.1. Tests sur des animaux à sang chaud**

###### **2.2.1.1.1. Expérience sur la souris**

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

La toxicité des divers extraits est estimée sur souris par injection par voie i.p. d'un volume de 0,3 ml d'extrait pour chaque animal.

Chaque test nécessite un lot de deux souris d'environ 25 g chacun. Un autre lot de deux souris recevant chacune 0,3 ml de sérum physiologique sert de témoin.

###### **2.2.1.1.1.2. Détermination de la DL<sub>50</sub> (24 h)**

La dose tuant 50% des animaux testés en 24 h ou DL<sub>50</sub> (24 h) est appréciée selon la méthode de REED et MUEENCH (1938) sur six lots de cinq souris mâles par administration par voie i.p. de six doses d'extrait en progression géométrique de raison 0,8. Le volume injecté est de 0,3 ml par animal. La valeur de la DL<sub>50</sub> peut être ainsi obtenue :

- soit par la formule suivante :

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

où: B : dose immédiatement inférieure à la  $\text{DL}_{50}$

N : mortalité provoquée par la dose B

M : mortalité provoquée par la dose immédiatement supérieure à la  $\text{DL}_{50}$

R : raison de la progression géométrique

- soit par la méthode graphique en projetant le point d'intersection de la courbe des totaux cumulatifs des survivants et de celle des morts en fonction des doses injectées.

#### **2.2.1.1.3. Examens histopathologiques (VERNE, 1960 ; HOULD, 1984)**

Les examens histopathologiques comprennent quatre étapes :

- ① le prélèvement et la fixation d'organes ;
- ② l'inclusion ;
- ③ la microtomie et l'étalement des coupes ;
- ④ la coloration des coupes et le montage des lames .

##### **2.2.1.1.3.1. *Prélèvement et fixation des organes***

###### **♦ Principe**

La fixation des prélèvements consiste à garder les cellules dans l'état le plus proche possible du normal. Ce traitement évite ainsi la déshydratation et la putréfaction des tissus.

###### **♦ Mode opératoire**

Des souris ayant un temps de survie compris entre 3 et 20 h et dont les symptômes d'intoxication se sont bien développés sont sacrifiées par élongation. Les différents organes (cerveau, cœur, estomac, foie, intestin, poumons, reins) sont prélevés rapidement puis plongés immédiatement dans du liquide fixateur ou liquide de BOUIN dont la composition est donnée en annexe VI (p.65).

Les mêmes organes traités de la même manière, provenant de souris non intoxiquées, sont utilisés comme témoins.

Au bout de 48 h, chaque organe est sectionné en coupes minces de 5 mm d'épaisseur à l'aide d'un bistouri.

#### **2.2.1.1.3.2. *Inclusion***

##### ◆ ***Principe***

L'inclusion consiste à incorporer les fragments tissulaires dans des blocs de paraffine afin d'obtenir de très fines coupes ultérieurement.

##### ◆ ***Mode opératoire***

Avant de procéder à l'étape d'inclusion proprement dite, une série de préparations appelée « circulation » doit être effectuée préalablement. Les fragments tissulaires placés dans des cassettes (TISSUE-TEK) sont mis dans un circulateur automatique (SHANDON-CITADEL 1000) pendant 24 h, ceci permet :

- une déshydratation des fragments par l'alcool (l'eau tissulaire est remplacée par l'alcool) ;
- une imprégnation des fragments par le toluène (solvant de la paraffine facilitant sa pénétration ultérieure) ;
- une imprégnation des fragments par la paraffine.

Les fragments tissulaires issus de chaque cassette sont plongés dans la paraffine liquide à 56° C coulé dans un moule métallique (TISSUE-TEK). L'ensemble est ensuite placé à 4° C afin de solidifier la paraffine. Les fragments sont ainsi inclus dans un bloc de paraffine à partir duquel la microtomie va être effectuée.

#### **2.2.1.1.3.3. *Microtomie et étalement des coupes***

Des coupes minces de 5 µm d'épaisseur sont confectionnées à l'aide d'un microtome rotatif (LEKA). Après avoir été déplissées délicatement, ces coupes sont étalées sur une lame de verre préalablement enduite de colle d'albumine de MAYER.

#### **2.2.1.1.3.4. *Coloration des coupes et montage des lames***

Les coupes tissulaires, débarrassées de la paraffine et du toluène, sont réhydratées. Elles deviennent par la suite incolores. Elles sont alors colorées à l'aide de l'hématoxyline

(colorant basique qui teinte le noyau en bleu ou noir) et de l'éosine (colorant acide qui teinte le cytoplasme en rouge ou rose). D'autres colorants (safran, bleu d'aniline) fixent le tissu conjonctif.

Le liquide de montage usuel des lames est miscible au toluène mais pas à l'eau. En effet, les coupes ainsi colorées sont déshydratées par l'alcool, puis rincées par le toluène. Les lames ainsi préparées sont recouvertes de lamelles de verre badigeonnées d'une goutte de baume de Canada.

L'observation des coupes s'effectue au microscope optique (ZEISS) à un grossissement de 400 fois.

#### **2.2.1.1.2. Test de sensibilité avec d'autres espèces**

Pour apprécier la sensibilité à l'extrait de diverses espèces animales à sang chaud, la dose létale pour la souris est ramenée aux poids des animaux testés. L'administration de l'extrait se fait par voie i.p.

#### **2.2.1.1.3. Test hémolytique**

##### **2.2.1.1.3.1. Principe**

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

##### **2.2.1.1.3.2. Mode opératoire**

Une suspension de sang frais citraté de mouton est utilisée.

Trois lavages successifs avec du sérum physiologique sont effectués aux hématies, suivis à chaque fois d'une centrifugation à 3000 tours/min pendant 5 min (centrifugeuse BRESME T52). Le culot est récupéré tandis que le surnageant est éliminé par aspiration. Une suspension d'hématies à 100% est obtenue au bout du troisième lavage.

Un mélange volume à volume de cette suspension d'hématies à 100% avec du sérum physiologique donne une suspension d'hématies à 50%. Une suspension d'hématies à 2% est obtenue à partir de 0,2 ml de la suspension d'hématies à 50% dilués dans 4,8 ml de tampon PBS (« Phosphate Buffered Saline ») dont la composition est donnée en *annexe VII* (p.69).

La suspension d'hématies à 2% est répartie dans les cupules d'une microplaqué à fond en « V ». Les extraits à tester, dilués en cascade avec du PBS (progression géométrique de raison 0,5), sont versés dans les cupules. Deux témoins sont réalisés :

- un témoin positif (T+): mélange d'eau distillée et d'hématies à 2% (présence d'hémolyse sans sédimentation des hématies) ;
- un témoin négatif (T-): mélange de PBS et d'hématies à 2% (absence d'hémolyse avec sédimentation des hématies).

*Tableau 3 : Test hémolytique : composition des milieux dans les puits de la Microplaqué*

	T+	T-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentration en extrait ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	0	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,90	1,95
Extrait à 1mg/ ml ( $\mu\text{l}$ )	0	0	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,19	0,09
PBS ( $\mu\text{l}$ )	0	50	0	25	37,5	43,75	46,87	48,44	49,22	49,61	49,81	49,1
Eau distillée ( $\mu\text{l}$ )	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hématies à 2% ( $\mu\text{l}$ )	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Volume final du mélange ( $\mu\text{l}$ )	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

La plaque est secouée très doucement, puis incubée à l'étuve à 37° C pendant 3 h, ensuite à 4° C durant une nuit. La lecture des résultats se fait à l'œil nu :

- en présence d'hémolyse (test positif) : la solution reste colorée en rouge ;
- en absence d'hémolyse (test négatif) : la solution devient incolore avec une sédimentation des hématies au fond du puits ;
- en présence d'hémolyse partielle : un culot d'hématies est observé, mais la solution reste colorée en rouge.

### **2.2.1.2. Tests sur des animaux à sang froid**

#### **2.2.1.2.1. Principe**

Il s'agit de tests toxicologiques à court terme se limitant aux seuls effets directs des substances toxiques se trouvant dans l'eau, sur des animaux aquatiques.

### **2.2.1.2.2. Mode opératoire**

Des lots d'animaux de même âge sont testés. Ils sont placés dans des cristallisoirs contenant 200 ml d'eau de source. L'extrait à étudier y est ajouté de manière à avoir des concentrations en progression géométrique de raison r. Ces concentrations sont déterminées par des tests préliminaires. La durée de l'expérimentation est de 24h.

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

La CL<sub>50</sub> (24h) est déterminée à partir de la méthode graphique de régression linéaire.

On a :

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

où : C : concentration (en mg/ml)

L'équation de la droite de régression est donnée par la relation :  $Y = A + BX$

où : Y : le pourcentage de mortalité

A : une constante

B : le coefficient de régression

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

#### **2.2.1.2.2.1. Test sur les alevins de carpe**

Six lots de dix alevins de quatre semaines sont testés avec six concentrations différentes de l'extrait en progression géométrique.

#### **2.2.1.2.2.2. Test sur les têtards de grenouille**

Six lots de dix têtards sans pattes sont testés avec six concentrations différentes de l'extrait en progression géométrique.

#### **2.2.1.3. Test sur les insectes** (OMS, 1970)

Un lot de larves au stade trois de développement est utilisé pour le test. Ces larves sont placées dans des cristallisoirs contenant 100 ml d'eau de robinet à une concentration déterminée de l'extrait. Un autre lot de larves placé dans de l'eau sans extrait est utilisé comme témoin.

## 2.2.2. METHODES D' ETUDE DES EFFETS SUR LES VEGETAUX

### 2.2.2.1. Effets sur le pouvoir germinatif des graines

L'expérience consiste à étudier l'action des principes actifs sur la germination de diverses graines appartenant à différentes familles végétales (cf. § 2.1.2.).

#### Conditions de l'expérience

Pour chaque type de graine, des lots composés de dix graines sont utilisés. Ces graines sont d'abord trempées dans l'eau à 30° C et à l'obscurité pendant 48 h.

Après trempage, chaque lot est placé sur du coton, imbibé d'extrait brut de concentration déterminée, dans une boîte de Pétri. Pour les lots témoins, l'eau de robinet est utilisé. Les boîtes sont ensuite placées à l'obscurité, à 30° C pendant 72 h.

Au bout de 72 h, les boîtes sont sorties de l'obscurité et l'appréciation de la germination se fait à partir de ce jour en observant la levée ou non de dormance de l'embryon (développement ou non des hypocotyles et des épicotyles).

### 2.2.2.2. Effets sur la croissance des plantules

L'expérience est faite sur deux espèces : le riz pour les Monocotylédones et le haricot dolique pour les Dicotylédones.

#### Conditions de l'expérience

Huit lots de graines de chaque espèce sont utilisés. Chaque lot est composé de dix graines et l'expérience est réalisée en double. Les huit lots sont séparés en deux groupes :

- le premier groupe comprend deux lots trempés dans l'extrait brut à une concentration déterminée ;
- le deuxième groupe est composé des six autres lots trempés dans l'eau.

Le tout est placé à l'obscurité, à 30° C pendant 48 h.

Après trempage, les lots sont sortis de l'obscurité et chaque lot est mis à croître sur une couche de coton dans une boîte de Pétri :

- pour le premier groupe, en présence du même extrait pour le premier lot et en présence d'eau pour le deuxième lot après lavage à l'eau ;

- pour le deuxième groupe, d'abord en présence d'eau, puis après 72 h, la croissance se poursuit par suite d'un arrosage quotidien d'extrait brut de concentrations différentes pour les cinq lots et d'eau pour le sixième lot servant de témoin.

Les effets de différentes concentrations d'extrait brut sur la croissance des plantules sont appréciés par la mesure des longueurs des hypocotyles et des épicotyles ainsi que des jeunes plantules. Cette mesure se fait tous les deux jours et ce pendant deux semaines.

#### **2.2.2.3. Effets sur le développement des bourgeons axillaires**

(HELLER et coll., 1995)

L'expérience est réalisée sur cinq lots de quatre jeunes plantules de dix jours de petits pois. Ces plantules sont préalablement décapitées au-dessus du deuxième bourgeon axillaire. Sur les parties sectionnées sont déposés, enrobés dans de la lanoline, 28 µg d'extraits à étudier (extrait brut ou extrait) ou d'hormone stimulatrice (gibbérelline) ou d'hormone inhibitrice (auxine) de la croissance des bourgeons axillaires, ou d'une goutte d'eau distillée pour le lot témoin.

Les effets sont estimés par les impacts des extraits et des hormones sur le développement des bourgeons axillaires.

### **2.2.3. METHODES D' ETUDE DES EFFETS DES EXTRAITS SUR LA CROISSANCE DES MICROORGANISMES**

#### **2.2.3.1. Isolement et purification des germes**

##### **2.2.3.1.1. Isolation**

La technique consiste à différencier et à isoler chaque souche microbienne à partir de plusieurs germes contenus dans une culture.

La culture est d'abord relancée dans l'eau peptonée par incubation à 37° C pendant 24 h. La croissance des souches se traduit par l'aspect trouble du milieu. L'inoculum issu de la précédente culture est ensemencé en stries et selon la technique d'épuisement sur de la gélose ordinaire en boîtes de Pétri. Ces dernières sont incubées à 37° C durant 24 h.

##### **2.2.3.1.2. Purification**

La pureté des colonies isolées est estimée par la méthode de coloration GRAM. Si une éventuelle impureté des colonies est observée, l'isolement sur boîtes de Pétri est renouvelé autant de fois que c'est nécessaire pour l'obtention d'une souche pure.

Les souches pures obtenues sont repiquées sur gélose pente afin d'être identifiées.

### **2.2.3.2. Identification des germes**

#### **2.2.3.2.1. Méthode de coloration GRAM**

Une colonie isolée du germe à étudier, prélevée à l'aide d'une anse de platine, est mise en suspension dans trois gouttes d'eau distillée. Un prélèvement de cette suspension est déposé sur une lame de verre en frottis concentrique. Le frottis obtenu est séché au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen. Après séchage, il est fixé par trois passages sur la même flamme.

La suite de la méthode consiste en la coloration proprement dite comprenant les étapes suivantes :

- ① la coloration du frottis fixé avec le violet de gentiane phéniqué pendant 1 min ;
- ② le mordançage ou rejet du violet de gentiane en l'entraînant avec le lugol (solution iodo-iodurée) pour faire disparaître l'éclat métallique dû au violet de gentiane. Le lugol est laissé quelques secondes sur la lame avant d'être renouvelé. Ce temps de mordançage est de 2 min ;
- ③ la décoloration par l'alcool/acétone pendant 3 ou 4 s, suivie d'un rinçage de la lame à l'eau ;
- ④ la recoloration à la fuschine phéniquée de ZIEHL consiste à recouvrir la lame d'eau et à y verser quelques gouttes de fuschine à chaque extrémité, et jamais au-dessus du frottis. Après 10 à 20 s, la fuschine est rincée à l'eau. La lame colorée est ensuite séchée entre deux couches de papier buvard.

Le frottis ainsi préparé est recouvert d'une goutte d'huile d'immersion (huile de cèdre) puis observé sous microscope optique (LEITZ) (grossissement x 100).

Selon leur coloration, les germes sont classés :

- en bactéries GRAM positif, pour ceux colorés en violet ;
- en bactéries GRAM négatif, pour ceux colorés en rose.

#### **2.2.3.2.2. Identification (FERRON, 1994)**

L'identification des bactéries GRAM positif, sauf pour *Staphylococcus aureus*, s'effectue par simple coloration GRAM suivie d'un examen microscopique de l'aspect, de la forme et du mode de groupement de leurs colonies.

Pour *Staphylococcus aureus*, une espèce pathogène pour l'Homme, l'identification se fait par inoculation de la colonie dans un milieu liquide « cœur-cervelle ». Après une incubation de 24 h à 37° C, un volume déterminé de cet inoculum est ajouté d'un égal volume de plasma de lapin. Le mélange obtenu est incubé à 37° C. Au bout de 24 h, si la colonie étudiée est celle de *Staphylococcus aureus*, une coagulation du milieu est observée.

L'identification des bactéries GRAM négatif nécessite une galerie réduite sur des milieux spécifiques :

##### **2.2.3.2.2.1. Milieu de SIMMONS (citrate de sodium)**

Il s'agit d'un milieu solide en pente, de couleur verte, dans lequel le citrate de sodium est l'unique source de carbone et d'énergie. L'indicateur de pH est le bleu de bromothymol. Les bactéries possédant la citrate perméase sont les seules à pouvoir s'y développer.

L'ensemencement se fait à l'aide d'une öse, en stries de bas en haut sur la pente. Après incubation à 37° C pendant 24 h, le virage de coloration du milieu au bleu ou bleu-vert démontre que les bactéries sont citrate positif.

##### **2.2.3.2.2.2. Milieu mannitol-mobilité-nitrate**

C'est un milieu semi-mou, de couleur rouge et dans lequel l'indicateur de pH est le rouge de phénol. Il permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol ainsi que la mobilité des bactéries.

L'ensemencement se fait par piqûre centrale du milieu à l'aide d'une pipette Pasteur. L'incubation a lieu à 37° C pendant 24 h. Le virage au jaune du milieu traduit la fermentation

du manitol par les bactéries. D'autre part, la turbidité du milieu démontre la mobilité des bactéries.

#### **2.2.3.2.2.3. Milieu HAJNA-KLIGLER (lactose-glucose-H<sub>2</sub>S)**

Ce milieu solide de couleur rouge, composé de deux parties, le culot et la pente, permet d'étudier la fermentation du glucose et celle du lactose ainsi que la production de gaz et de sulfure d'hydrogène par la bactérie. L'indicateur de pH est le rouge de phénol.

L'ensemencement se fait à l'aide d'une öse par piqûre centrale du culot (pour le glucose) suivie d'une strie verticale à la surface de la pente (pour le lactose). La culture est incubée à 37° C pendant 24 h.

- Le virage de la coloration rouge au jaune du culot et/ou de la pente indique l'utilisation du glucose et/ou du lactose par les bactéries.
- Le noircissement du culot traduit la production de sulfure d'hydrogène par les bactéries.

#### **2.2.3.2.2.4. Milieu lysine-fer**

C'est un milieu solide de couleur violette, enrichi en lysine et comprenant deux parties, le culot et la pente. L'indicateur de pH est le pourpre de bromocrésol. Ce milieu permet de mettre en évidence l'utilisation du glucose et la production de sulfure d'hydrogène par les bactéries.

L'inoculation s'effectue de la même manière que précédemment (cf §.2.2.3.2.2.3 p.38)

- L'utilisation du glucose se traduit par le virage de la coloration pourpre du milieu au jaune.
- L'apparition d'une coloration noire met en évidence la formation de sulfure d'hydrogène.

#### **2.2.3.2.2.5. Milieu urée-indole**

Il s'agit d'un milieu liquide de couleur orange permettant la recherche de l'uréase, de la tryptophane désaminase (TDA) ainsi que la production d'indole. L'indicateur de pH est le rouge de phénol.

Après ensemencement, la culture est incubée à 37° C durant 24 h.

- Le virage au rouge du milieu traduit une réaction urée positive.
- La détection d'indole est faite par ajout de 3 gouttes de réactif de KOVACS dans le milieu urée-indole préalablement ensemencé. La composition de ce réactif est donnée en annexe V (p.68). Une réaction d'indole positive se traduit par l'apparition d'un anneau rouge à la surface du milieu.
- La présence de TDA est démontrée par la formation d'un précipité blanc après addition de 3 gouttes d'hyperchloration de fer dans le milieu urée-indole ensemencé.

La conservation de chaque souche purifiée et identifiée se fait sur gélose pente à une température de 4° C. Les cultures sont renouvelées toutes les 48 h.

#### **2.2.3.3. Spectre d'activité anti-microbienne des extraits**

L'appréciation de la sensibilité des souches aux agents anti-microbiens est faite selon la méthode de diffusion en gélose (milieu de MUELLER-HINTON) ou méthode des disques.

##### **2.2.3.3.1. Principe (DUVAL et SOUSSY, 1990 ; FERRON, 1994)**

L'antibiotique, déposé sur le disque à la surface de la gélose uniformément ensemencée avec le germe à étudier, diffuse dans le milieu en créant une zone circulaire. Dans cette zone, les concentrations de l'antibiotique décroissent du centre vers la périphérie.

L'activité anti-microbienne est caractérisée par la création d'un halo d'inhibition autour du disque imprégné d'antibiotique. Le diamètre de ce halo d'inhibition est fonction du degré de sensibilité du germe à l'antibiotique.

##### **2.2.3.3.2. Mode opératoire**

Le test se déroule pendant trois jours successifs :

###### **Premier jour :**

Chaque souche pure est ensemencée sur gélose pente, puis incubée à 37° C pendant 24h.

### **Deuxième jour :**

La culture est diluée dans de l'eau peptonée de manière à obtenir une concentration de  $10^5$  germes/ml. La suspension ainsi préparée est ensemencée uniformément selon la technique d'inondation dans une boîte de Pétri contenant le milieu de MUELLER-HINTON. La boîte est laissée à la température ambiante pendant 1 min afin que les germes puissent bien adhérer à la surface de la gélose. L'excès de suspension est éliminé par aspiration, puis la boîte est séchée à l'étuve à 37° C pendant 15 min.

Des disques d'antibiogramme, de 6 mm de diamètre, imprégnés de 20 µl d'extraits toxiques sont déposés à l'aide d'une pince fine à la surface du milieu ensemencé. La préparation est incubée à 37° C pendant 24 h.

Chaque test est effectué en trois exemplaires.

### **Troisième jour :**

Pour la lecture du spectre d'activité anti-microbienne des extraits, le diamètre du halo d'inhibition formé autour de chaque disque est mesuré.

Les normes utilisées dans l'expression des résultats des tests de diffusion sur gélose sont exprimées dans le tableau 4.

*Tableau 4: Normes utilisées dans l'expression des résultats des tests de diffusion sur gélose*

Diamètre du halo d'inhibition	Degré de sensibilité du germe	Résultat
x < 7 mm	Insensible	—
7 mm < x < 8 mm	Assez sensible	+
8 mm < x < 9 mm	Sensible	++
9 mm < x	Très sensible	+++

### **3. RESULTATS**

#### **3.1. EFFETS DE L' EXTRAIT SUR LES ANIMAUX**

##### **3.1.1. EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG CHAUD**

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

###### **3.1.1.1.1. Description des symptômes développés après injection d'une dose létale**

Il s'agit d'un test de toxicité aiguë par injection d'une dose létale unique de 115 mg/kg de poids déterminée d'après les expériences préliminaires. Les symptômes observés sont groupés en quatre phases :

Phase 1 : Juste après l'injection, l'animal présente une contorsion de l'abdomen, suivie d'une hyperexcitation.

Phase 2: Après 20 min, son activité motrice diminue brusquement. Une incoordination des membres est observée au cours de ses rares déplacements.

Phase 3 : Une heure après l'injection, il traîne difficilement ses pattes postérieures.

Phase 4 : Après 2 h, l'animal respire difficilement et très profondément. Les pavillons de ses oreilles deviennent hyperémiques et se trouvent tirées vers l'arrière. Une piloérection généralisée ainsi qu'une exophtalmie et une cyanose sont aussi observées. A partir de ce moment, il ne bouge plus.

La mort, précédée d'une ataxie et de convulsions cloniques, survient au bout de 3 h.

### 3.1.1.1.2. Description des symptômes développés après injection d'une dose sub-létale

L'injection d'une dose sublétale de 38,5 mg/kg provoque chez la souris les symptômes suivants : un état passif, une incoordination des membres lors des rares déplacements accompagnés d'une hyperémie et d'une piloérection. Elle reste immobile durant plusieurs heures. Une rémission progressive est observée au bout de la dixième heure.

### 3.1.1.1.3. Evaluation de la toxicité (DL<sub>50</sub> 24 h)

Sept doses en progression géométrique de raison  $r = 1,2$  variant entre 38,5 mg/kg (0% de mortalité) et 115 mg/kg (100% de mortalité) sont utilisées. Chaque dose est injectée à un lot composé de 6 souris. Un autre lot de 6 souris sert de témoin.

Les résultats sont récapitulés dans le tableau 5.

*Tableau 5: Résultats expérimentaux de la détermination de la DL<sub>50</sub> (24h) de l'extrait sur la souris*

Dose en mg/kg de souris	Nombre de décès après :								Total des décès	Total des survivants	% de mortalité
	3h	6h	9h	12 h	15 h	18 h	21 h	24 h			
115	3	2	0	1	0	0	0	0	6	0	100

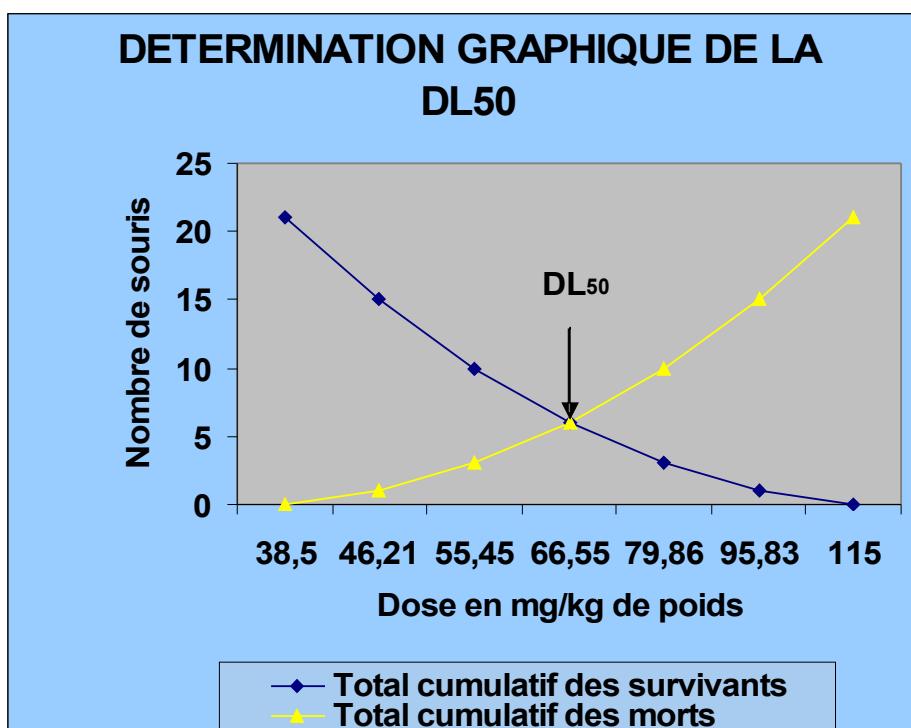
95,83	2	0	3	0	0	0	0	0	5	1	83,33
79,86	1	0	2	0	1	0	0	0	4	2	66,66
66,55	0	0	0	1	1	1	0	0	3	3	50
55,45	0	0	0	0	0	1	1	0	2	4	33,33
46,21	0	0	0	0	0	0	1	0	1	5	16,66
38,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0

Avec la formule de REED et MUEENCH (1938), la valeur de la  $DL_{50}$  (24 h) de l'extrait est évaluée à 60,25 mg/kg de souris.

D'après la méthode graphique de ces mêmes auteurs, elle est estimée à 66,55 mg/kg de souris (tableau 6 et figure 6).

*Tableau 6: Données pour l'estimation de la  $DL_{50}$  (24 h) de l'extrait sur souris par la méthode graphique des totaux cumulatifs*

Dose en mg/kg de souris	Nombre de souris testées	Nombre des survivants	Nombre des morts	Total cumulatif des survivants	Total cumulatif des morts
115	6	0	6	0	21
95,83	6	1	5	1	15
79,86	6	2	4	3	10
66,55	6	3	3	6	6
55,45	6	4	2	10	3
46,21	6	5	1	15	1
38,5	6	6	0	21	0



*Figure 6: Détermination graphique de la DL<sub>50</sub> (24h) par la méthode graphique de REED et MUENCH*

### 3.1.1.1.4. Examens histopathologiques

L'étude des lésions tissulaires dues aux effets de l'extrait est faite chez des souris ayant reçu une dose létale de 115 mg/kg de poids. Cette dose est injectée par voie i.p. Les souris sont sacrifiées au bout de 3 h, période à laquelle les symptômes d'intoxication se sont bien développés. Les organes (cerveau, cœur, estomac, foie, intestin, poumons, reins) sont prélevés.

Macroscopiquement, aucune atteinte n'est visible sur les différents organes prélevés.

Les organes sont préparés selon la technique décrite au § 2.2.1.1.3. Les organes d'une souris saine (non traitée) prélevés et préparés de la même manière que précédemment servent de témoins.

Le *tableau 7* résume les observations faites sur les coupes histologiques réalisées.

*Tableau 7: Les principales lésions histopathologiques provoquées par l'extrait à la dose de 115 mg/kg de souris*

ORGANE	OBSERVATIONS CHEZ LES SOURIS TRAITEES
Cerveau	Capillaires du parenchyme cérébral dilatés
Cœur	Tissu myocardique normal
Estomac	Aucune lésion visible
Foie	Capillaires sinusoïdes fortement dilatés Hépatocytes altérés
Intestin	Aucune lésion visible
Poumons	Capillaires interalvéolaires dilatés
Reins	Floculus glomérulaires rétractés Nappe hémorragique

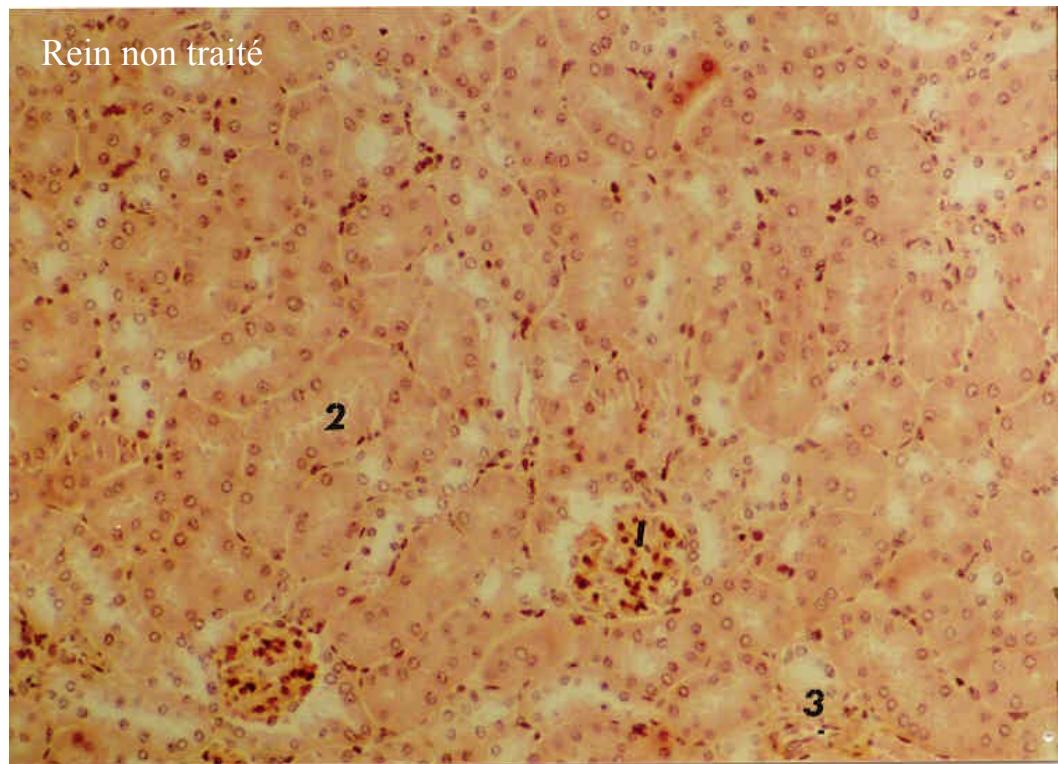
Microscopiquement, des lésions histopathologiques sont observées au niveau du cerveau, du foie, des poumons et des reins (*figures 7 à 10*). Les principaux organes détoxifiants (le foie et les reins) sont les plus affectés.

Une importante atteinte rénale caractérisée par une rétraction des floculus glomérulaires et une nappe hémorragique sont observées.

Au niveau du foie, une forte dilatation des capillaires sinusoïdes ainsi qu'une altération des hépatocytes ont entraîné une désorganisation architecturale de l'organe.

Au niveau du cerveau et des poumons, les lésions sont caractérisées surtout par une dilatation des capillaires.

Le cœur, l'estomac et l'intestin ne présentent aucune anomalie apparente.



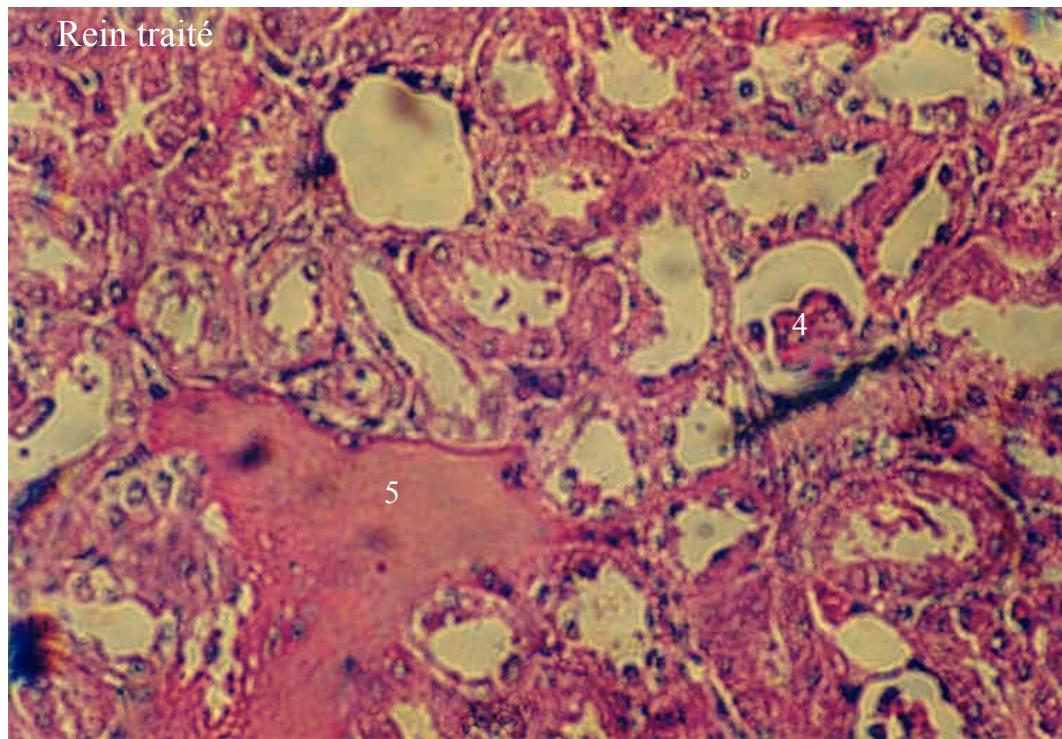
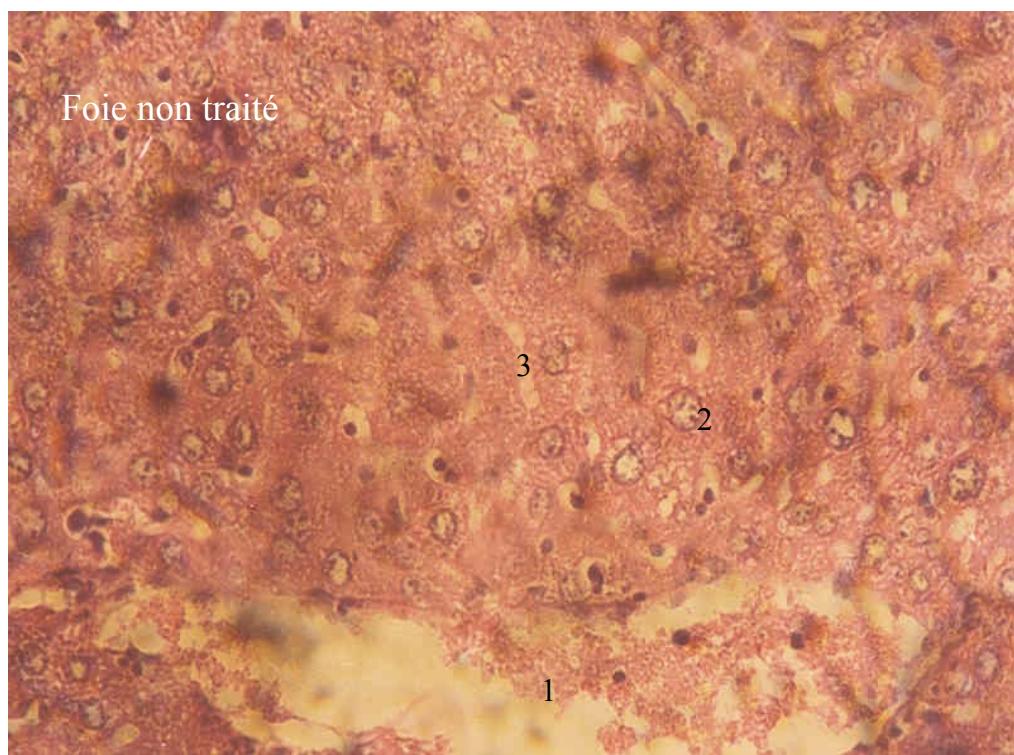


Figure 7 : Lésions histologiques au niveau des **reins** dues à l'administration par voie i.p. de l'extrait à la dose de 115 mg/kg de poids (Grossissement X 400)  
1 : glomérule normal ; 2 : tubule normal ; 3 : capillaire normal ; 4 : floculus glomérulaire retracté ; 5 : nappe hémorragique.



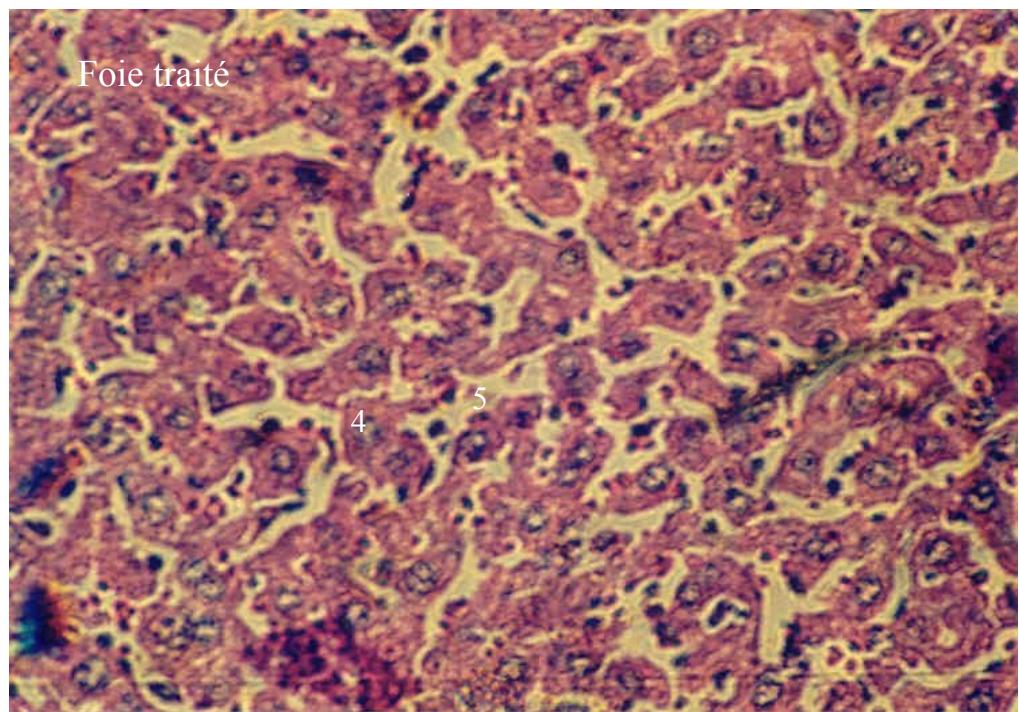
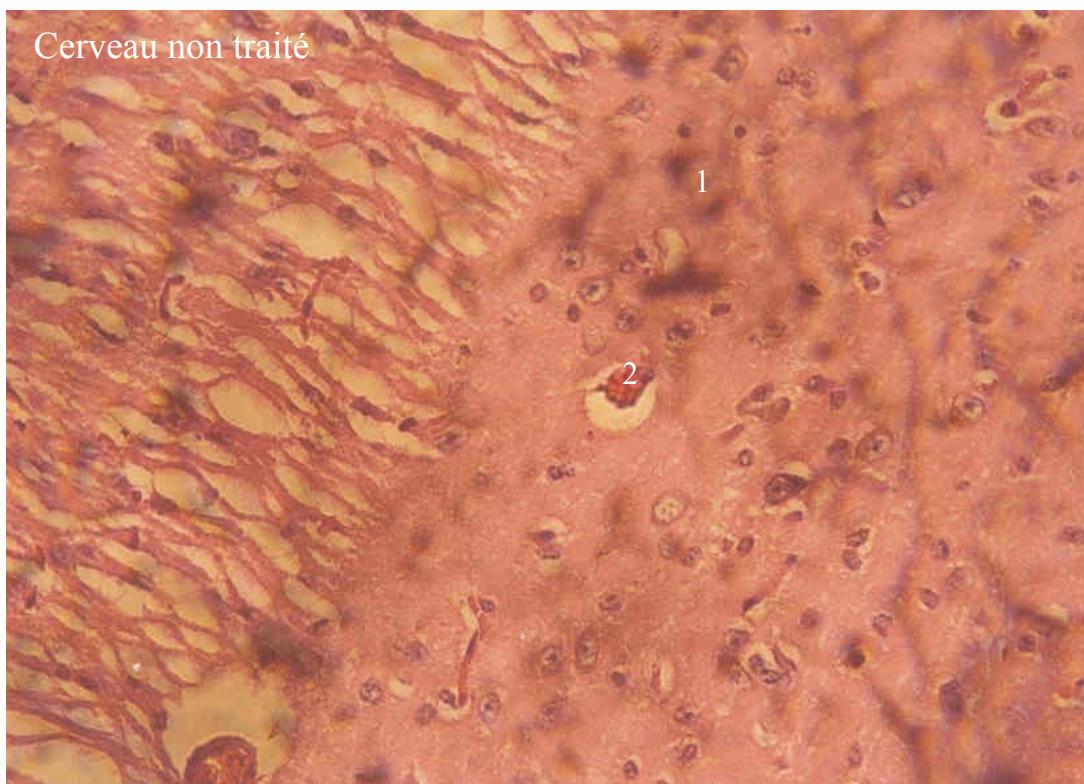


Figure 8 : Lésions histologiques au niveau du **foie** dues à l'administration par voie i.p. de l'extrait à la dose de 115 mg/kg de poids (Grossissement X 400).  
1 : veine centro-lobulaire ; 2 : hépatocyte ; 3 : capillaire sinusoïde normal ; 4 : hépatocyte altéré ; 5 : capillaire sinusoïde dilaté



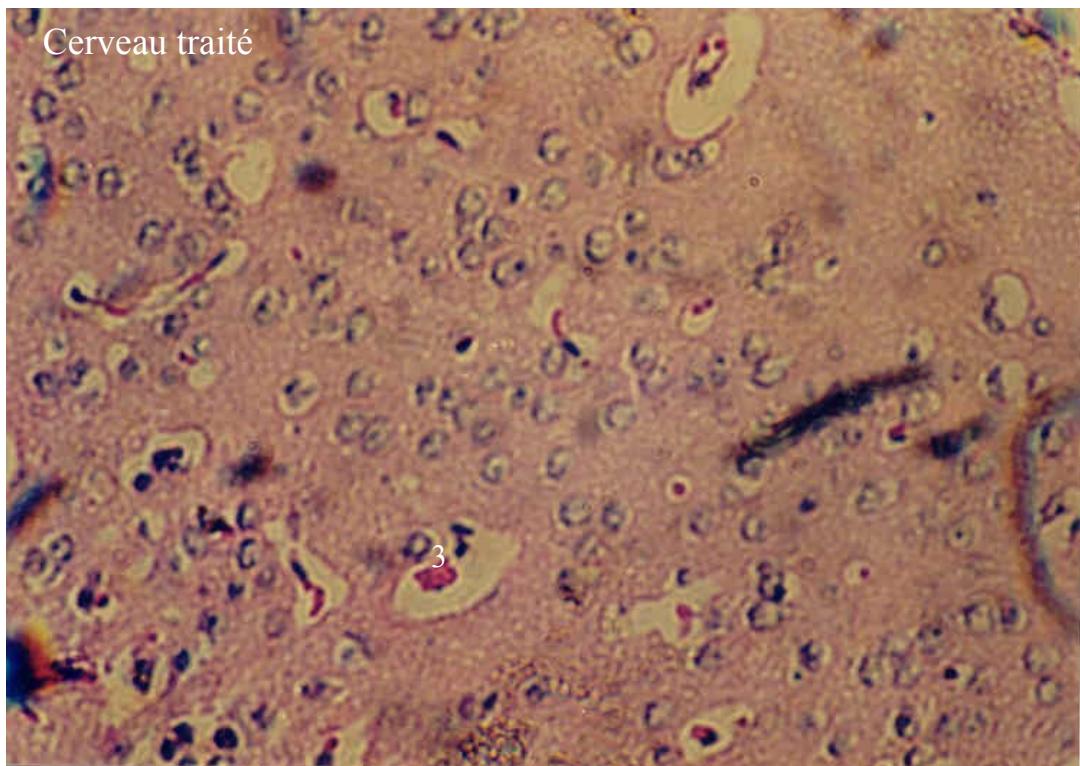
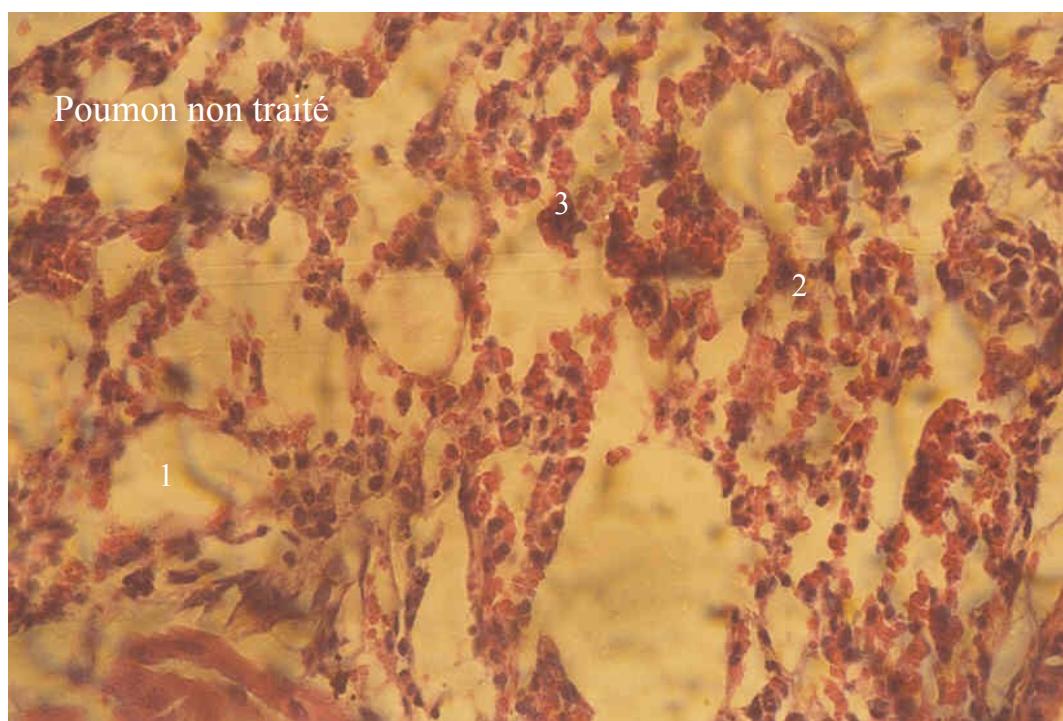
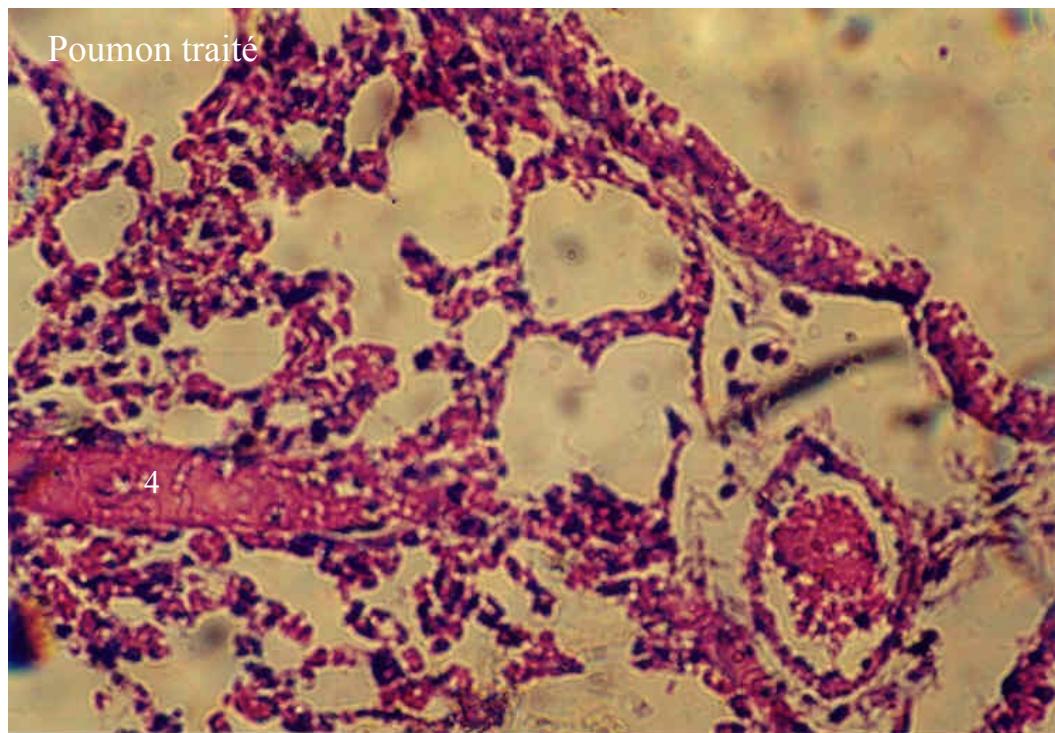


Figure 9: Lésions histologiques au niveau du **cerveau** dues à l'administration par voie i.p. de l'extrait à la dose de 115 mg/kg de poids (Grossissement X 400)  
1 : parenchyme cérébral; 2 : capillaire normal ; 3 : capillaire dilaté





*Figure 10 : Lésions histologiques au niveau du **poumon** dues à l'administration de l'extrait par voie i.p. à la dose de 115 mg/kg de poids (Grossissement X 400).*

1 : alvéole ; 2 : tissu inter-alvéolaire ; 3 : capillaire normal ; 4 : capillaire dilaté

### **3.1.1.2. Etude de la sensibilité des autres espèces**

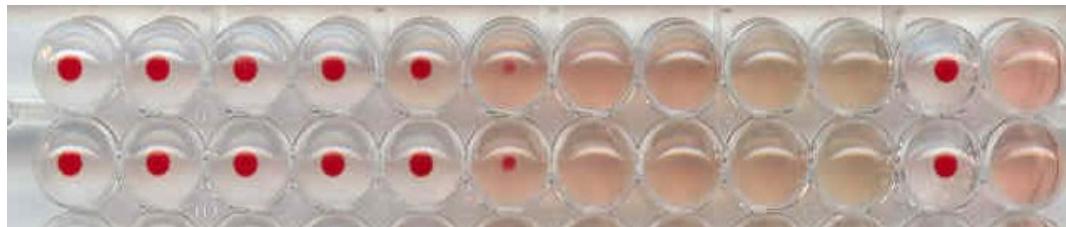
Chez le cobaye et le rat, les symptômes développés après injection de la dose 115mg/kg de poids, létale pour la souris, n'entraîne pas la mort. Généralement, les symptômes développés rappellent ceux observés chez la souris à l'exception de l'hyperémie, de la cyanose et de l'exophthalmie. Une rémission progressive survient au bout de la vingtième heure. Par contre, la mort survient par suite d'une ataxie et d'une série de convulsions chez le poussin de un jour, le temps de survie de l'animal est d'environ 40 min.

L'insuffisance en extrait n'a pas permis la recherche des DL<sub>50</sub> pour ces différentes espèces.

### **3.1.1.3. Effets de l'extrait sur les hématies de mouton**

D'après les résultats de l'étude chimique, l'extrait renferme des saponosides. Le test hémolytique est réalisé pour confirmer ce fait. Ce test est effectué selon les conditions expérimentales du § 2.2.1.1.3.2.

Le résultat de ce test est montré sur la *figure 11* et dans le *tableau 8*.



C10    C9    C8    C7    C6    C5    C4    C3    C2    C1    T-    T+

*Figure 11: Effets des différentes concentrations de l'extrait sur les hématies de mouton*

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

	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
Concentration (en µg/ml)	1,95	3,90	7,81	15,62	31,25	62,5	125	250	500	1000
Effet	-	-	-	-	-	+	++	++	++	++

++ : hémolyse totale

+ : hémolyse partielle

- : absence d'hémolyse

L'activité hémolytique de l'extrait est variable selon sa concentration. Ainsi, il y a :

- hémolyse totale à une concentration supérieure ou égale à 125 µg/ml ;
- hémolyse partielle avec sédimentation des hématies intactes à une concentration comprise entre 62,5 µg/ml et 31,25 µg/ml ;
- absence d'hémolyse à une concentration inférieure ou égale à 15,62 µg/ml.

La présence de saponosides dans l'extrait est confirmée par son pouvoir hémolytique.

### 3.1.2. EFFETS DE L' EXTRAIT SUR LES ANIMAUX A SANG FROID

#### 3.1.2.1. Effets sur les alevins de carpe

Huit concentrations de l'extrait allant de 40,65 à 45,12 µg/ml , avec une raison géométrique de 1,015, sont testées sur sept lots de six alevins de carpe. Les résultats obtenus sont exprimés dans le *tableau 9*.

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

Concentration (C) en µg/ml	Logarithme des concentrations (log C)	Nombre de morts sur 10	% de mortalité
45,12	1,654	10	100
44,45	1,647	10	100
43,79	1,641	10	100
43,14	1,634	10	100
42,51	1,628	10	100
41,88	1,622	0	0
41,26	1,615	0	0
40,65	1,609	0	0

A cause de la très faible fourchette de valeurs entre la concentration provoquant les 100% de mortalité et celle provoquant les 0% de mortalité, il n'a pas été possible de calculer la CL<sub>50</sub> (24 h). Aucun effet-dose n'a été observé, ainsi l'équation de la droite de régression linéaire n'a pu être obtenue. L'effet de l'extrait obéit à la « loi du tout ou rien ».

### 3.1.2.2. Effets sur les têtards de grenouille

Huit concentrations de l'extrait brut variant de 43,45 à 61,15 µg/ml (raison 1,8), sont testées sur sept lots de six têtards de grenouille. Les résultats de ces tests sont donnés dans le *tableau 10*.

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

Concentration (C) en µg/ml	Logarithme des concentrations (log C)	Nombre de morts sur 10	% de mortalité
61,15	1,786	10	100
58,23	1,765	10	100
55,46	1,743	10	100
52,82	1,722	10	100
50,30	1,701	10	100
47,91	1,680	10	100
45,63	1,659	0	0

D'après ces résultats, encore une fois, la « loi du tout ou rien » est observée et comme dans le cas des alevins, la CL<sub>50</sub> n'a pu être déterminée.

### 3.1.3. EFFET DE L' EXTRAIT SUR LES LARVES DE MOUSTIQUE

Un lot de vingt larves au troisième stade de développement a été testé. Au bout de 24h d'expérimentation (cf § 2.2.1.3.2.), dix des vingt larves testées sont mortes. Ainsi, la concentration en extrait de 2 mg/ml constitue la CL<sub>50</sub>(24 h) pour les larves de moustique.

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

Les effets des extraits toxiques ont été recherchés sur le pouvoir germinatif des graines, sur la croissance des jeunes plantules ainsi que sur la levée de la dominance apicale.

#### **3.2.1. EFFETS DE L' EXTRAIT BRUT SUR LE POUVOIR GERMINATIF DES GRAINES**

Dans une première expérience, nous avons recherché les graines dont la germination est influencée par l'extrait brut.

Pour ce faire, les graines de quinze espèces de plantes potagères sont mises à gonfler dans de l'eau de robinet, puis mises à germer en présence de l'extrait brut à une dose unique de 1 mg/ml. D'après les résultats donnés dans le *tableau 11* :

- les graines de riz, de petit pois, de haricot dolique et de pomme de terre germent normalement ;
- celles de laitue, de pois bambara, de basilic et d'oignon ne germent pas du tout ;
- pour le reste, l'inhibition de la germination varie de 10% (haricot) à 60% (courgette).

*Tableau 11: Effets de l'extrait brut sur la germination de graines de différentes espèces de plantes potagères*

Famille	Nom vernaculaire	Espèce	% de germination
APIACEAE	Carotte	<i>Ducus carotta</i>	50
	Persil chinois	<i>Petroselinum crispum</i>	60
ASTERACEAE	Laitue	<i>Lactuca sativa</i>	0
BRASSICACEAE	Tissam blanc	<i>Brassica sp</i>	80
CUCURBITACEAE	Courgette	<i>Cucurbita pepo medullosa</i>	40
FABACEAE	Haricot	<i>Phaseolus vulgaris</i>	90
	Petit pois	<i>Pisum sativa</i>	100
	Haricot dolique	<i>Vigna inguiculata</i>	100

	Pois bambara	<i>Vigna subterranea</i>	0
LAMIACEAE	Basilic	<i>Occimum basilicum</i>	0
LILIACEAE	Oignon	<i>Allium cepa</i>	0
POACEAE	Riz	<i>Oriza sativa</i>	100
	Maïs	<i>Zea mays</i>	80
SOLANACEAE	Morelle noire	<i>Solanum nigrum</i>	60
	Pomme de terre	<i>Solanum tuberosum</i>	100

### **3.2.2. EFFETS DE L' EXTRAIT BRUT SUR LA CROISSANCE DE JEUNES PLANTULES**

Les résultats obtenus des expériences précédentes démontraient que l'extrait brut a des effets sur le pouvoir germinatif des graines.

Dans une autre expérience, dont le protocole est présenté à la *figure 12*, nous avons vérifié si l'absence ou le peu d'effets de l'extrait brut à 1 mg/ml sur certaines graines n'est pas dû à une question de dose. Nous avons alors testé une concentration plus élevée (9,81 mg/ml) sur un représentant des monocotylédones, le maïs (80% de germination) et un représentant des dicotylédones, le haricot dolique (100% de germination). Dans les deux cas nous avons observé les résultats suivants :

- les lots de graines préalablement trempés dans l'extrait brut à 9,81 mg/ml, puis mis à germer en présence du même extrait après lavage à l'eau ne germent pas ;
  - les lots trempés dans l'extrait brut à 9,81 mg/ml, puis lavés à l'eau et mis à germer en présence d'eau, germent mais tardivement.

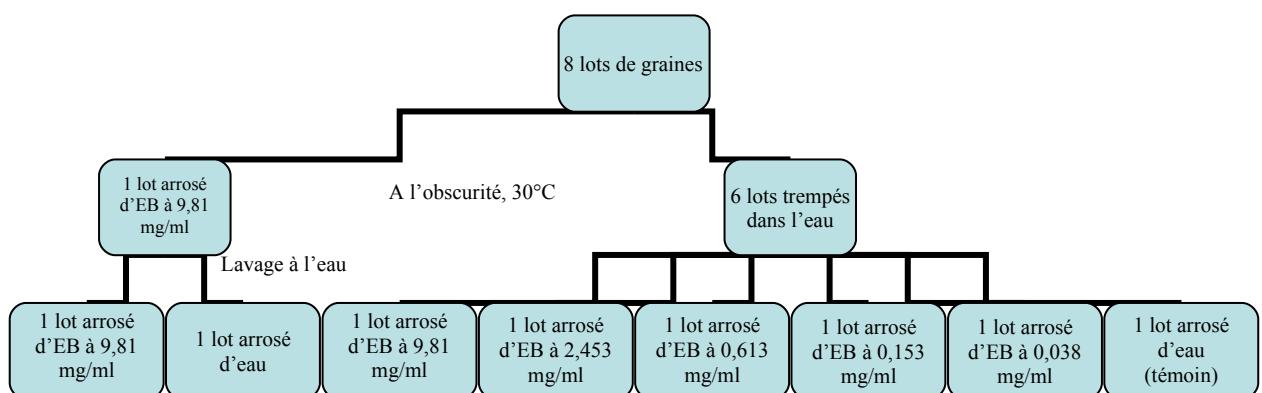


Figure 12 : Schéma résumant les conditions des expériences sur l'étude des effets de l'extrait brut sur la croissance des jeunes plantules

Nous avons ensuite étudié les effets de différentes doses d'extrait brut sur la croissance des jeunes plantules issues de graines germées en absence de l'extrait brut.

Les expériences ont été réalisées sur le maïs et l'haricot dolique avec des doses allant de 0,038 à 9,81 mg/ml (*figure 12*).

D'après les résultats (*figures 13 et 14 ; tableau 12*), les deux espèces de graine se comportent de la même manière :

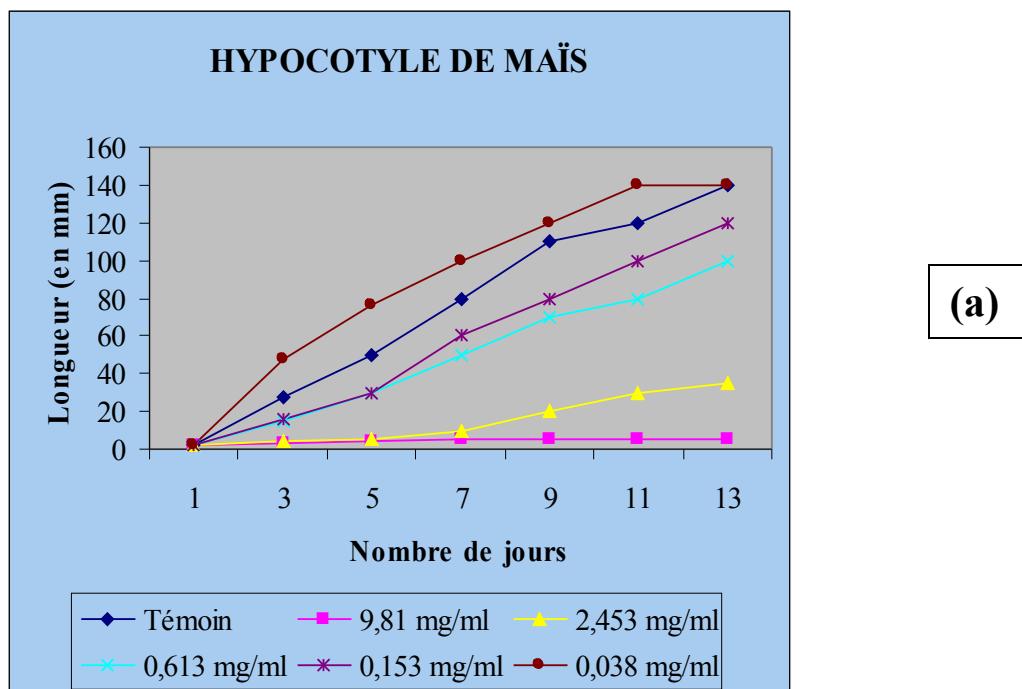
- à la concentration de 0,038 mg/ml, il n'y a pas de différence par rapport au témoin : l'extrait brut n'a pas donc d'effets sur le développement des hypocotyles et des épicotyles ;
- à des concentrations supérieures ou égales à 0,153 mg/ml, une inhibition de la croissance est observée. Cette inhibition augmente avec la dose. Ainsi, à la concentration de 9,81 mg/ml, elle est presque totale.

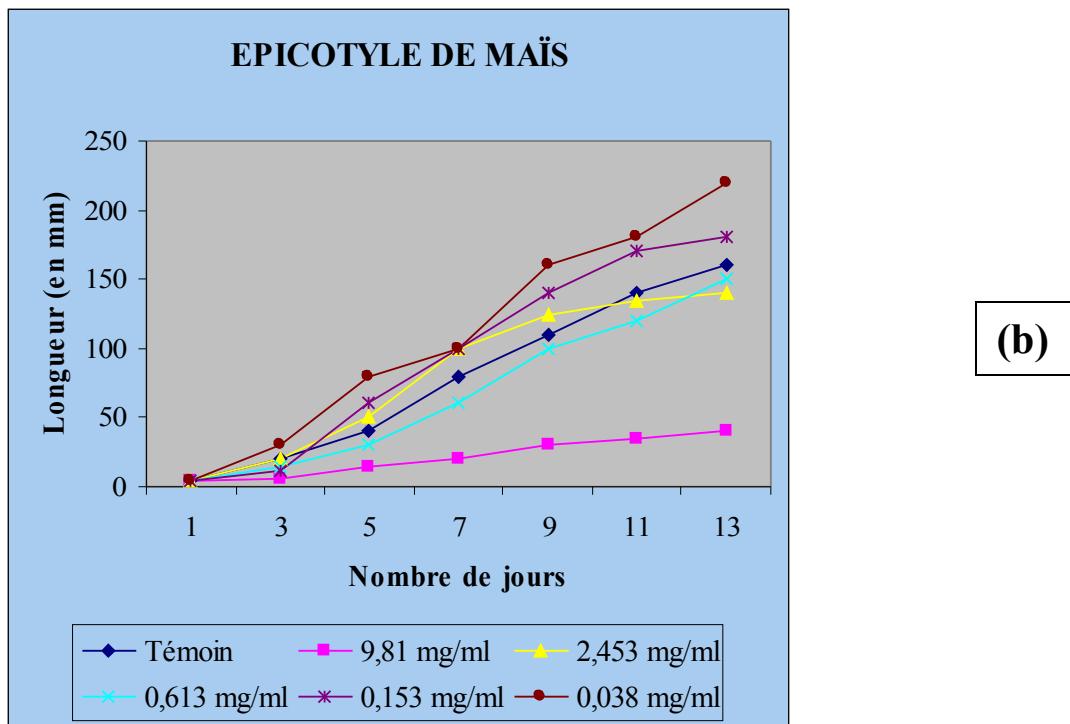
Les taux d'inhibition, en fonction de la concentration, sont donnés dans le *tableau 12*.

*Tableau 12: Taux d'inhibition de la croissance des hypocotyles et épicotyles de maïs et du haricot dolique au treizième jour de l'expérience*

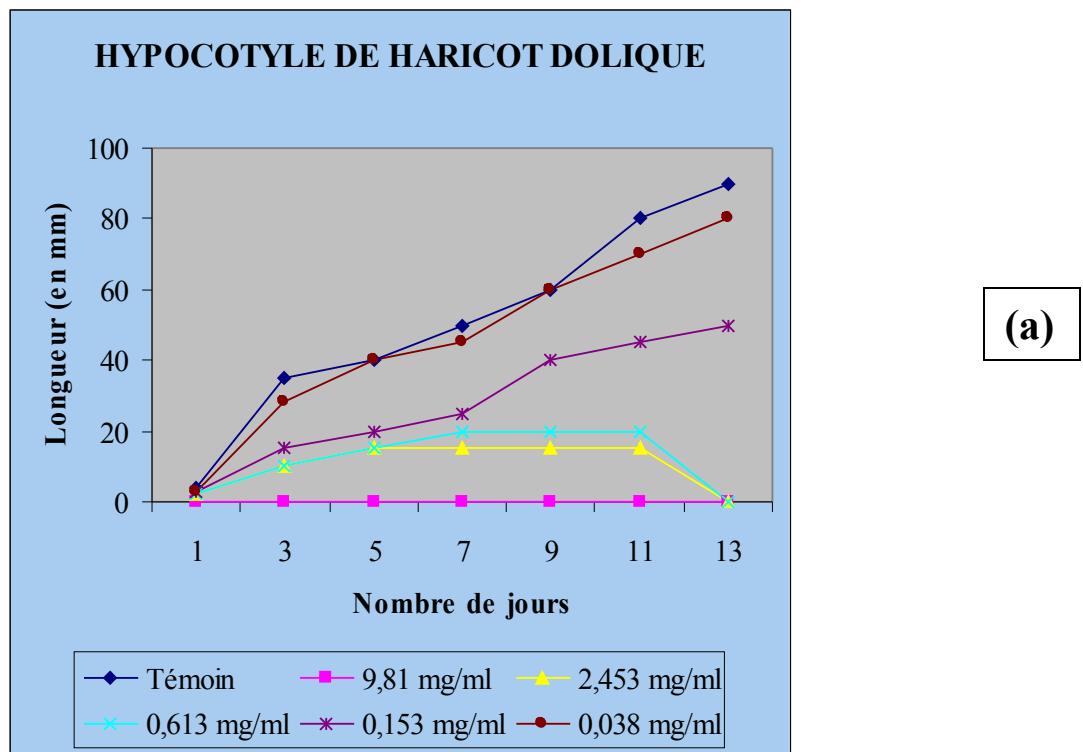
	Témoin (Eau distillée)	Extrait brut (mg/ml)				
		0,038	0,153	0,613	2,453	9,81
<i>Mais</i>	Longueur hypocotyle (cm)	<b>14</b>	14	12	10	3,5
	Inhibition (%)	<b>0</b>	0	14,28	28,57	75
	Longueur Epicotyle (cm)	<b>22</b>	20	18	15	14
	Inhibition (%)	<b>0</b>	9,09	18,18	31,81	36,36
						81,81

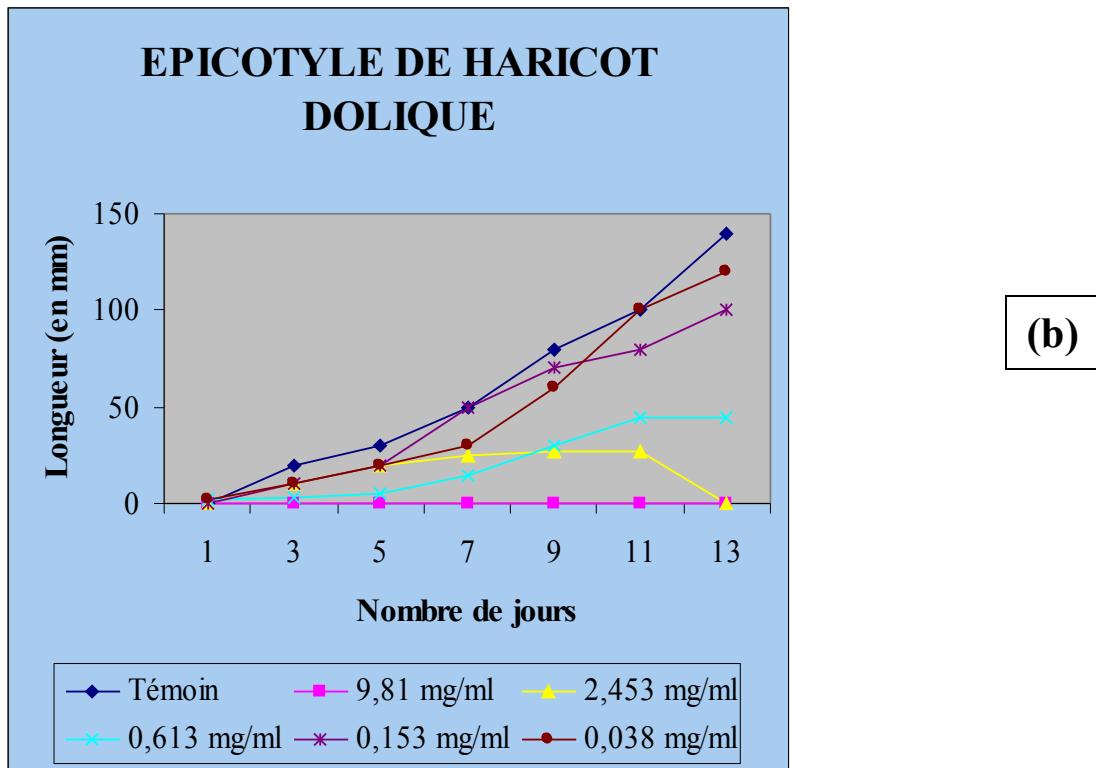
<b>Haricot dolique</b>	Longueur hypocotyle(cm)	<b>9</b>	8	5	0	0	0
	Inhibition (%)	<b>0</b>	11,11	44,44	100	100	100
	Longueur Epicotyle (cm)	<b>14</b>	12	10	4,5	0	0
	Inhibition (%)	<b>0</b>	14,28	28,57	67,85	100	100





*Figure 13: Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur la croissance des plantules de maïs : développement de l'hypocotyle (a) et de l'épicotyle (b)*



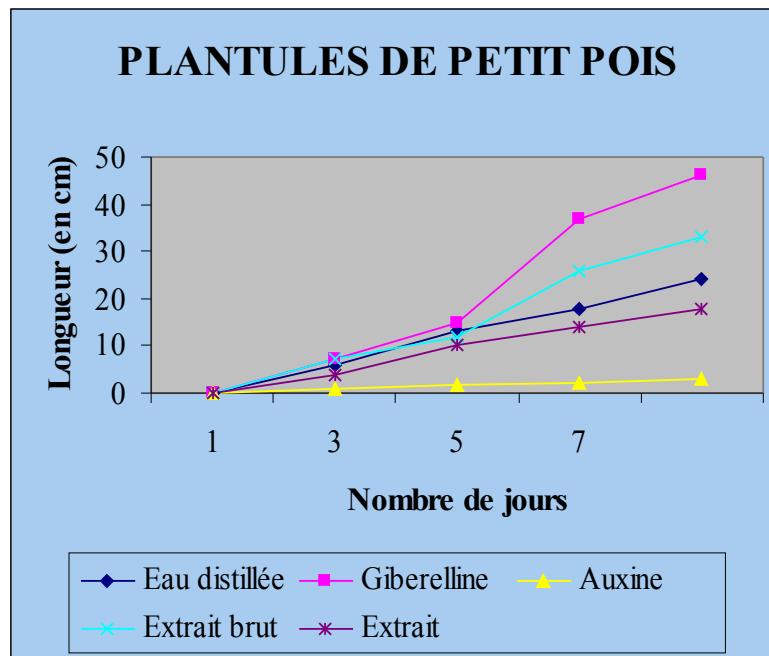


*Figure 14 : Effets de différentes concentrations de l'extrait brut sur la croissance des plantules de haricot dolique : développement de l'hypocotyle (a) et de l'épicotyle (b)*

### 3.2.3. EFFETS DES EXTRAITS SUR LA LEVEE DE LA DOMINANCE APICALE

Etant donné les effets toxiques de l'extrait brut observés sur la germination et la croissance des jeunes plantules, nous avons étudié ses effets et ceux de l'extrait sur la levée de la dominance apicale.

Les expériences sont réalisées sur des plantules de petit pois (*Pisum sativum*) selon la méthode décrite au § 2.2.2.3. Les effets des extraits sont estimés par mesure de la croissance des bourgeons axillaires des plantules traitées. La *figure 15* et le *tableau 13*, résument les résultats de ces expériences.



*Figure 15: Effets de l'application d'extraits et d'hormones végétales sur la croissance des bourgeons axillaires des plantules de petit pois*

*Tableau 13: Taux de croissance par rapport au témoin des bourgeons axillaires des plantules de petits pois traités par les différentes substances*

Solution testée	% de croissance par rapport au témoin	Effet sur la croissance
Eau distillée (témoin)	100	Normal
Gibbérelline	191,66	Stimulateur
Auxine	12,5	Inhibiteur
Extrait brut	137,5	Stimulateur
Extrait	75	Inhibiteur

Il en ressort que l'extrait brut stimule le développement des bourgeons axillaires. Toutefois, la stimulation est inférieure à celle de la gibbérelline, hormone végétale connue pour ses effets stimulateurs. Par contre, l'extrait a un effet inhibiteur qui est inférieur à celui de l'auxine, hormone inhibitrice de la croissance des bourgeons axillaires.

### 3.3. EFFETS DES EXTRAITS SUR LA CROISSANCE DES MICRO-ORGANISMES

Les éventuels effets de l'extrait brut et de l'extrait sont étudiés sur des divers micro-organismes. Dans un premier temps, nous avons isolé et identifié les germes.

#### 3.3.1. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES GERMES

A partir de la collection disponible au Laboratoire de Microbiologie de l’Environnement du CNRE, huit souches ont pu être isolées et identifiées. Leurs caractères morphologiques et biochimiques sont présentés dans le *tableau 13*.

*Tableau 14: Caractéristiques des souches isolées et identifiées*

Noms des souches	Forme	GRAM	Oxydase	Citrate	Mannitol	Mobilité	Glucose	Lactose	H <sub>2</sub> S	Gaz*	Urée	Indole	TDA
<i>Candida albicans</i>	Levure	+											
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocci	+											
<i>Yersinia pestis</i>	Bacille	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—
<i>Alcalensens dispar</i>	Bacille	—	—	—	+	+	+	±	—	+	—	+	—
<i>Escherichia coli</i>	Bacille	—	—	—	+	—	+	+	—	+	—	+	—
<i>Shigella sonnei</i>	Bacille	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Bacille	—	—	+	+	—	+	+	—	+	—	—	—
<i>Klebsiella rhinoscleromantis</i>	Bacille	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—

+ : réaction positive

— : réaction négative

\* : gaz provenant de la dégradation du glucose

### 3.3.2. RECHERCHE DES PROPRIETES ANTI-MICROBIENNES DES EXTRAITS

A des concentrations relativement élevées de l'extrait brut et de l'extrait (153 mg/ml et 11,5 mg/ml respectivement), aucune activité antimicrobienne n'a été observée.

## 4. DISCUSSIONS ET CONCLUSION

Les principes actifs contenus dans l'extrait de feuilles de *Deinbollia boinensis* sont toxiques pour divers organismes animaux et végétaux.

L'administration par voie i.p. de l'extrait provoque chez la souris des symptômes caractérisés essentiellement par une piloérection, une ataxie et de convulsions cloniques, des symptômes qui supposent une atteinte au niveau du système nerveux central.

D'après la valeur de sa DL<sub>50</sub> (24 h), qui est de l'ordre de 60,25 à 66,55 mg/kg de souris, l'extrait appartient à la catégorie des substances moyennement toxiques. Notons que le

seuil supérieur des substances qualifiées de très toxiques est de 25 mg/kg de poids frais (RAMADE, 1979).

Les examens histo-pathologiques ont révélé que le foie et les reins, principaux organes détoxifiants, sont les plus affectés par l'extrait. Le premier subit une destruction architecturale, tandis que pour le second, une forte rétraction glomérulaire ainsi que des nappes hémorragiques sont observées. Au niveau des poumons et du cerveau, des inflammations tissulaires caractérisées par des dilatations des capillaires ainsi que des nappes hémorragiques sont observées.

L'extrait possède aussi un effet hémolytique, ce qui confirme la présence de saponosides.

L'extrait est très毒ique pour les animaux à sang froid. En effet, il agit à de très faibles doses, de l'ordre de 40 µg/ml. Les alevins sont plus sensibles que les têtards. Chez les deux espèces, la « loi du tout ou rien » a été observée : les doses provoquant les 100% et 0% de mortalité sont très rapprochées. De ce fait, il n'a pas été possible de déterminer la valeur de la CL<sub>50</sub> (24 h).

Chez les végétaux, l'extrait brut inhibe la germination de différentes graines de plantes potagères à des taux variables. Cette inhibition pourrait être due soit à un effet direct des principes toxiques sur les embryons en entraînant leur destruction, soit à un effet indirect en empêchant les embryons d'utiliser les réserves contenues dans les cotylédons ou encore en inactivant les enzymes concernées pour leur germination. Dans les deux cas, la levée de dormance de l'embryon ne peut avoir lieu.

La croissance des jeunes plantules de maïs et de haricot dolique est aussi inhibée par l'extrait brut à différentes concentrations. Cette inhibition est proportionnelle à la dose et en présence d'une forte dose d'extrait brut, l'inhibition est totale, les graines pourrissent au bout de quelques jours.

L'extrait brut a un effet stimulateur sur le développement des bourgeons axillaires, alors que l'extrait exerce plutôt un effet inhibiteur.

L'extrait brut et l'extrait, aux doses utilisées, n'ont aucun effet sur les différentes souches étudiées (*Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia pestis*, *Alcalenscens dispar*, *Escherichia coli*, *Shigelle sonnei*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella rhinoscleromantis*).





## **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

**En conclusion**, les résultats que nous avons obtenus dans le cadre de ce mémoire, bien que préliminaires:

- confirment la présence de principes toxiques dans la plante ;
- constituent les premiers résultats scientifiques sur les propriétés physico-chimiques, la nature chimique ainsi que les propriétés biologiques et toxicologiques des principes toxiques contenues dans les feuilles de *Deinbollia boinensis* ;
- sont pour notre laboratoire les premiers acquis sur les SAPINDACEAE toxiques malgaches.

**Dans le cadre de nos travaux futurs, nous envisageons :**

- d'améliorer les procédés d'extraction et de purification en vue de parvenir à l'isolement des principes actifs à l'état pur ;
- de poursuivre l'étude de leurs propriétés physico-chimiques et la caractérisation de leur nature chimique ;
- d'approfondir les propriétés biologiques et toxicologiques déjà mises en évidence tout en prospectant d'autres ;
- d'étudier le mécanisme d'action des principes toxiques.

## ANNEXES

***Annexe I : DESCRIPTION BOTANIQUE*** (CHOUX, 1927 ; CAPURON, 1969 ; SCHATZ, 2001)

### **Généralités sur le genre *Deinbollia***

Le genre ***Deinbollia*** appartient à la classe des DICOTYLEDONAE, sous-classe des ROSIDAE, ordre des SAPINDALES, famille des SAPINDACEAE et tribu des SAPINDEAE. Cette tribu regroupe environ 7 genres et seul le genre ***Deinbollia*** Schum. et Thon., africano-malgache, représente la tribu à Madagascar.

Le genre ***Deinbollia*** est représenté par 30 à 40 espèces distribuées en Afrique, à Madagascar (avec 7 espèces endémiques) et aux Mascareignes. Les principales caractéristiques de ces différentes espèces sont les suivantes :

- ce sont des buissons ou petits abrisseaux grêles, au port palmiforme, rarement ramifiés et arborescents, dioïques ;
- les feuilles sont alternes, composées péripennées avec 4-10 folioles alternes, entières avec une base souvent asymétrique ;
- les inflorescences sont terminales en panicules ou axillaires mais apparaissant terminales. Les fleurs sont petites et régulières ;
- le fruit est grand, charnu, indéhiscent, souvent solitaire par avortement mais pouvant comporter jusqu'à 5 méricarpes presque séparés, globuleux et bacciformes, l'endocarpe charnu est adhérent à la graine.

### **L'espèce *Deinbollia boinensis***

Les caractéristiques du genre se retrouvent chez cette espèce. Mais si on se réfère directement à cette espèce, elle se caractérise comme suit :

- espèce se présentant toujours sous l'aspect d'un arbuste devenant parfois un petit arbre de 3 à 6 m, à tige simple ou rarement avec une ramification au sommet ;
- les feuilles sont souvent groupées en bouquet au sommet de la tige, alternes en général, quelques fois sensiblement opposées. Les folioles sont glabres, de consistance plus coriaces à nervures secondaires nettement moins saillantes,

- dépassant rarement 15 cm de longueur, obtuses ou brièvement acuminées, obtuses au sommet ;
- absence de vraies stipules ;
- sépales glabres ou munis seulement de quelques poils très épars sur la face externe ;
- écorce dont la tranche est jaunâtre.

**Annexe II : Composition des réactifs pour la révélation des chromatogrammes**

Le réactif à la ninhydrine :

- Ninhydrine .....	3 g
- Collidine .....	30 ml
- Acide acétique .....	100 ml
- Ethanol absolu .....	qsp 1000 ml

Le réactif à la vanilline sulfurique :

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

**Annexe III : Composition des réactifs pour les tests des alcaloïdes**

Le réactif de MAYER :

- Chlorure mercurique .....	13,5 g
- Iodure de potassium .....	60 ml
- Eau distillée .....	qsp 1000 ml

e réactif de WAGNER :

- |                             |         |
|-----------------------------|---------|
| - Iodure de potassium ..... | 2 g     |
| - Iode .....                | 1,27 g  |
| - Eau distillée ..... qsp   | 1000 ml |

Le réactif de DRAGENDORFF :

Solution A :

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

Solution B :

- |                             |       |
|-----------------------------|-------|
| - Iodure de potassium ..... | 10 g  |
| - Eau distillée .....       | 40 ml |

Un mélange volume à volume des solutions A et B est préparé. A ce mélange sont ajoutés 10g d'acide tartrique et de l'eau distillée (qsp 100ml).

#### **Annexe IV : Composition des différents milieux de culture**

##### **▪ Milieux utilisés pour l'isolement et la purification des germes**

- **Eau peptonée exempte d'indole :** c'est un milieu liquide permettant la croissance des bactéries sans exigence particulière, utilisé pour relancer la culture des souches microbiennes.

###### Composition (en g/l) :

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

- **Gélose ordinaire :** c'est un milieu solide utilisé pour l'isolement, le contrôle de la pureté et la conservation des colonies microbiennes.

###### Composition (en g/l) :

Peptone .....	
..... 5	
Extrait de viande .....	
..... 1	
Chlorure de sodium .....	
..... 5	
Extrait de levure .....	
..... 2	
Agar-agar .....	
....15	
Eau distillée .....	qsp 1000
ml	
pH = 7,4	

##### **▪ Milieu utilisé au cours des tests de toxicité**

- **Milieu de MUELLER-HINTON :** c'est une gélose de tonicité normale.

###### Composition (en g/l) :

	Infusion de viande de bœuf déshydratée .....
300	
	Hydrolysat acide de caséine .....
17,5	
	Amidon de maïs .....
1,5	
	Agar .....
... 10	
	Eau distillée ..... qsp 1000
ml	
	pH = 7,4

**Milieux d'identification des bactéries GRAM négatif** (Le MINOR et RICHARD, 1993)

➤ **Milieu de SIMMONS (citrate de sodium)**

Composition (en g/l) :

Citrate de sodium .....	
... 1	
Chlorure de sodium .....	
.... 5	
Sulfate de magnésium .....	
0,2	
Phosphate monoammoniaque .....	
.... 1	
Phosphate dipotassique .....	
..... 1	
Bleu de bromothymol .....	0,08
Agar .....	
15	
Eau distillée ..... qsp 1000	
ml	
pH = 7,1	

➤ **Milieu Mannitol-Mobilité-Nitrate** (Le MINOR et VERON, 1999)

Composition (en g/l):

Hydrolysat trypsique de caséine .....

10

Nitrate de potassium .....

... 1

Mannitol .....

7,5

Rouge de phénol à 1% ..... 0,04

Agar ..... 3,4

Eau distillée ..... qsp 1000 ml

pH = 7,6

➤ **Milieu HAJNA-KLIGLER (Lactose-Glucose-H<sub>2</sub>S)**

Composition (en g/l):

Pastone .....

15

Extrait de viande de bœuf .....

..... 3

Extrait de levure .....

..... 3

Peptone pepsique de viande .....

... 5

Chlorure de sodium .....

.... 5

Sulfate ferreux .....

0,2

Thiosulfate de sodium .....

0,3

Lactose .....

10

Glucose .....

... 1

Rouge de phénol .....	
0,024	
Agar .....	
... 11	
Eau distillée .....	qsp 1000
ml	
pH = 7,5	

➤ **Milieu Lysine-Fer**

Composition (en g/l) :

Peptone bactériologique .....	
..... 5	
Extrait de levure .....	
..... 3	
Glucose .....	
... 1	
Lysine .....	
.... 10	
Citrate de fer ammoniacal .....	0,5
Thiosulfate de sodium .....	
0,04	
Pourpre de bromocrésol .....	
0,02	
Gélose .....	14,5
Eau distillée .....	qsp 1000 ml
pH = 6,7	

➤ **Milieu Urée-Indole**

Composition :

L-tryptophane .....	0,3
g	
Phosphate monopotassique .....	0,1
g	

Phosphate dipotassique .....	0,1
g	
Chlorure de sodium .....	0,5
g	
Urée .....	2 g
Alcool 90° .....	1
ml	
Rouge de phénol 1% .....	0,25 ml
Eau distillée .....	qsp 100 ml

➤ **Milieu « cœur-cervelle »**

Composition (en g/l) :

Extrait cœur-cervelle .....	17,5
Peptone pancréatique de gélatine .....	10,0
Chlorure de sodium .....	5,0
Phosphate disodique .....	2,5
Glucose .....	2,0
pH = 7,4	

**Annexe V : Composition du réactif de KOVACS**

Para-méthylaminobenzaldéhyde .....	5
g	
Alcool isoamylique .....	75
ml	
Acide chlorhydrique .....	25
ml	

**Annexe VI : Composition du liquide de BOUIN**

Acide picrique .....	75
ml	

Formol à 40% .....	20
ml	
Acide acétique glacial .....	5
ml	

***Annexe VII : Composition du PBS***

Chlorure de sodium .....	7,650 g
Phosphate disodique .....	0,724 g
Phosphate monopotassique .....	0,210 g
Eau distillée .....	qsp 1000
ml	
pH = 7,2	

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANDRIANTSOA-RAZAFIMALALA H. Contribution à la purification et à la caractérisation d'un principe anti-microbien d'une légumineuse *Albizia lebbeck*. [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1983.
2. AUDIGIER C., DUPONT G., ZONSZAIN F. Principes des méthodes d'analyse biochimique. Paris : Doin éditeur, 1992.
3. BIZZINI B. Tetanos toxin structure as a basis for elucidating its immunological and neuropharmacological activities. In : The specificity and action of animal, bacterial and plant toxins. (Receptors and recognition, series B, 1). London: CUATRECASAS P., Chapman and Hall, 1977 ; 175-218.
4. BOITEAU P. Précis de matière médicale malgache (avec formulaire). Tananarive : La Librairie de Madagascar, 1979.
5. BOST R. Pharmacopée malgache. *Mém. Inst. Sci. Madagascar*. Paris : LAHURE, 1961 ; 159-234.
6. BRUNETON J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Paris : Technique et Documentation Lavoisier, 1993.
7. CAPURON R. Révision des Sapindacées de Madagascar et des Comores. Paris : Muséum Nationale d'Histoire Naturelle, 1969 ; XIX.
8. CHOUX P. Les Sapindacées de Madagascar, fascicule IV. Tananarive : Mémoire de l'Académie Malgache, 1927.
9. DEBRAY M., JACQUEMIN H., RAZAFINDRAMBAO R. Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar. Antananarivo : ORSTOM, 1971.
10. DUVAL J., SOUSSY C.J. Antibiothérapie, 4<sup>ème</sup> éd. Paris : C et R, 1990.
11. FERRON A. Bactériologie médicale, 15<sup>ème</sup> éd. Paris : C et R, 1994.
12. FONG H.H.S., TIN W.A.M., FARNSWORTH N.R. Phytochemical screening review. Chicago : University of Illinois, 1977.

13. GUERNET M., HAMON M. Abrégé de chimie analytique : chimie des solutions, 2<sup>ème</sup> éd. Paris : Masson, 1990.
14. HABERMEHL G. Venomous animals and their toxins. Springer-Verlag. Berlin : Heidelberg, 1981.
15. HARINJATOVO H. Etude chimique et biologique d'extraits toxiques de feuilles de *Pentatropis madagascariensis* (Asclepiadaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2001.
16. HECKEL E. Catalogue alphabétique des plantes utiles et en particulier des plantes médicinales et toxiques de Madagascar avec leurs noms malgache et leurs emplois indigènes. Marseille : 1910.
17. HELLER R., ESNAULT R., LANCE C. Abrégé de Physiologie Végétale : développement, 5<sup>ème</sup> éd. Paris : Masson, 1995 ; 90-126.
18. HEMINGWAY R.W., KARCHESY J.J. Chemistry and significance of condensed tannins. New York: Plenum press, 1989.
19. HOLLAND I.B. Colcin E<sub>3</sub> and related bacteriocins : penetration of the bacterial surface and mechanism of ribosomal inactivation. In : The specificity and action of animal, bacterial and plant toxins. (Receptors and recognition, series B, 1). London: CUATRECASAS P., Chapman and Hall, 1977 ; 99-127.
20. HOULD R. Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Paris : Maloine, 1984.
21. JEANNODA V. Etude chimique, biologique et toxicologique du principe convulsivant des Connaracées de Madagascar. [Thèse de Doctorat d'Etat : Sciences]. Strasbourg : Université Louis Pasteur de Strasbourg, 1986.
22. KAMOUN P. Appareils et méthodes en biochimie. Paris : Flammarion, 1977 ; 237 p.
23. LE MINOR L., RICHARD C. Méthodes de laboratoire pour l'identification des entérobactéries. Paris : Institut Pasteur, 1993.

24. LE MINOR L., VERON M. Bactériologie médicale, 2<sup>ème</sup> éd. Paris : Médecine-Sciences Flammarion, 1989.
25. LECLERC H., IZARD D., HUSSON M.O., WATTRE P., JAKUBCZAK E. Microbiologie générale, 3<sup>ème</sup> éd. Paris : Doin, 1992.
26. MAHUZIER G., HAMON M. Abrégé de chimie analytique. Méthode de séparation, 2<sup>ème</sup> éd. Paris : Masson, 1990 ; 2.
27. MARCHAL N., BOURDON J. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Paris : Doin éditeur, 1987.
28. MUELLER J.H., HINTON J. Milieu de culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **48**, 1941; 330-333.
29. NEUWINGER H.D. African Ethnobotany : Poisons and Drugs, Chemistry, Pharmacology, Toxicology. Germany : Chapman and Hall, 1996; 421-435.
30. OLNES S., PIHL A. Abrin, Ricin and their associated agglutinins. In: The specificity and action of animal, bacterial and plant toxins. (Receptors and recognition, series B, 1). London: CUATRECASAS P., Chapman and Hall, 1977; 129-173.
31. OMS. Résistance aux insecticides et lutte antivectorielle. 17<sup>ème</sup> rapport du Comité OMS d'experts des insecticides. Série de rapports techniques n° 443, Genève, 1970.
32. RAHERINIAINA C. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes toxiques de *Albizia boivini* (Mimosoïdeae, Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1999.
33. RAJEMIARIMOELISOA C. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes actifs de *Albizia polyphylla* (Mimosoïdeae, Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1996.
34. RAJEMIARIMOELISOA C. Isolement, caractérisation chimique et biologique du principe toxique de *Albizia odorata* (Mimosoïdeae, Fabaceae). [Thèse de Doctorat de 3<sup>ème</sup> cycle : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2000.

35. RAKONTONDRASOA N. Etude chimique et biologique d'extraits toxiques de feuilles de *Albizia polyphylla* (Mimosoïdeae, Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2000.
36. 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.
37. RAKOTO - RANOROMALALA D.A.D. Purification et étude des propriétés physico-chimiques et biologiques des principes toxiques de *Tachiadenus longifloris* (Gentianaceae). [Thèse de Doctorat de 3<sup>ème</sup> cycle : Sciences]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1989.
38. RAKOTONDRAZANAKA L. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes toxiques de *Xerosicyos danguyi* (Cucurbitaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1999.
39. RALISON C. Isolement et étude biochimique, toxicologique et biologique de la monguine, principe toxique du *Croton mongue* (Euphorbiaceae). [Thèse de Doctorat d'Etat : Sciences]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1987.
40. RAMADE E. Ecotoxicologie. Paris : Masson, 1979.
41. RAMAHAFALY R.M. Etude chimique et biologique d'extraits toxiques de rameaux de *Henonia scoparia* (Amaranthaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2002.
42. RAMAMONJISOA E.D. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes toxiques de graines de *Albizia species* (Mimosoïdeae, Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1998.
43. RANDERATH K. Chromatographie sur couches minces. Paris : édition GAUTHIER-VILLARS, 1964.
44. RANDRIAMIHARISOA F. Etude chimique et biologique d'extraits toxiques de feuilles de *Xerocicyos perrieri* (Cucurbitaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2000.

45. RANDRIANARIVO H.R. Isolement, caractérisation chimique et biologique des principes toxiques de *Albizia arenicola* (Mimosoïdeae, Fabaceae). [Thèse de Doctorat : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003.
46. RANDRIANARIVO H.R. Purification et caractérisation partielle des principes actifs de *Albizia arenicola* (Mimosoïdeae, Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1996.
47. RASOANOAIVO P., PETITJEAN A., CONAN J.Y. Toxic and poisonous plants of Madagascar : an ethnopharmacological survey. In : FITOTERAPIA, volume LXIV N°2, 1993; 113-130.
48. RATIARIVELO V. Etude chimique et biologique d'extraits toxiques de graines de *Barringtonia butonica* (Lecytidaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2000.
49. RAZANAMPARANY L. Purification et étude des propriétés physico-chimiques et biologiques de la bolaffinine, toxine protéique extraite de *Boletus affinis Peck* (Boletaceae). [Thèse de Doctorat d'Etat : Sciences]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1987.
50. REED L., MUENCH H.A. Simple method of estimating fifty per cent points. *Am. J. Hyg.* 27, 1938.
51. ROCHAT H., KOPEYANA C., GARCIA L.C., MARTINEZ G., ROSOS J.P., PAKARIS A., MARTIN M.F., GARCIA A., MARTIN-MOUTOT N., GREGOIRE J., MIRANDA F. Recent results on the structure of scorpion and snake toxins. In : Animal, plant and microbial toxins (Chemistry, Pharmacology and Immunology, 2). Edited by: HAYASHIA A.O.K. and SAWAY, 1976 ; 79-87.
52. SCHATZ G.E. Flore générique des arbres de Madagascar. Grande Bretagne : Linklater R., 2001.
53. TERRAC M.L. Contribution à l'étude des plantes médicinales de Madagascar et de l'île Maurice. [Thèse de Doctorat en Pharmacie]. Paris, 1947.
54. VERNE J. Précis d'histologie. 5<sup>ème</sup> ed. Paris : Masson et C<sup>ie</sup> éditeurs, 1960. VERNIN G. La chromatographie en couche mince : techniques et applications en chimie organique. Paris : Dunod, 1970.