

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
Table des matières.....	i
Dédicace.....	vi
Remerciements.....	vii
Liste des abréviations.....	viii
Glossaire.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des tableaux.....	xi
 INTRODUCTION GENERALE.....	 1
 PREMIERE PARTIE : ETUDE CHIMIQUE	
 I. INTRODUCTION.....	 5
II. MATERIELS ET METHODES.....	5
II.1. MATERIELS.....	5
II.1.1. Matériel végétal.....	5
II.1.1.1. Position systématique.....	5
II.1.1.2. Description botanique.....	6
II.1.1.2.1. Description du genre <i>Schefflera</i>	6
II.1.1.2.2. Description de l'espèce <i>Schefflera longipedicellata</i>	6
II.1.1.3. Localisation géographique.....	8
II.1.1.4. Date et lieu de récolte.....	8
II.1.1.5. Préparation et conservation du matériel végétal.....	8
II.1.2. Les produits chimiques.....	8
II.2. METHODES.....	9
II.2.1. Méthodes d'extraction des principes toxiques.....	9
II.2.1.1. Extraction à froid.....	9
II.2.1.2. Extraction à chaud.....	9
II.2.2. Méthodes de purification.....	10
II.2.2.1. Fractionnement par le n-butanol.....	10

II.2.2.1.1.	Principe.....	10
II.2.2.1.2.	Mode opératoire.....	10
II.2.2.2.	Précipitation par l'acétate neutre de plomb.....	10
II.2.2.2.1.	Principe.....	10
II.2.2.2.2.	Mode opératoire.....	10
II.2.2.3.	Dialyse.....	11
II.2.2.3.1.	Principe.....	11
II.2.2.3.2.	Mode opératoire.....	11
II.2.2.3.2.1.	Préparation de la membrane de dialyse.....	11
II.2.2.3.2.2.	Déroulement de la dialyse.....	12
II.2.2.4.	Précipitation par l'éthanol 50%.....	12
II.2.2.4.1.	Principe.....	12
II.2.2.4.2.	Mode opératoire.....	12
II.2.2.5.	Fractionnement par l'acétate d'éthyle.....	12
II.2.2.5.1.	Principe.....	12
II.2.2.5.2.	Mode opératoire.....	13
II.2.3.	Méthode de concentration.....	13
II.2.4.	Calcul de rendement.....	13
II.2.5.	Méthodes d'analyse.....	13
II.2.5.1.	Chromatographie sur couche mince.....	13
II.2.5.1.1.	Principe.....	13
II.2.5.1.2.	Mode opératoire.....	14
II.2.5.1.2.1.	Préparation de la plaque.....	14
II.2.5.1.2.2.	Développement du chromatogramme.....	14
II.2.5.1.2.3.	Révélation du chromatogramme.....	14
II.2.5.1.2.3.1.	Examen sous lumière ultraviolette.....	14
II.2.5.1.2.3.2.	Réactions colorées.....	15
II.2.5.2.	Criblage phytochimique.....	15
II.2.5.2.1.	Préparation des extraits à tester.....	16
II.2.5.2.1.1.	Extraits aqueux.....	16
II.2.5.2.1.2.	Extraits chloroformiques.....	16
II.2.5.2.1.3.	Extraits hydroéthanoliques.....	16
II.2.5.2.1.4.	Extraits acides.....	16
II.2.5.2.2.	Détermination des familles chimiques.....	16

II.2.5.2.2.1.	Alcaloïdes.....	16
II.2.5.2.2.2.	Flavonoïdes et leucoanthocyanes.....	16
II.2.5.2.2.3.	Tanins et polyphénols.....	17
II.2.5.2.2.4.	Stéroïdes et triterpènes.....	17
II.2.5.2.2.5.	Anthraquinones.....	18
II.2.5.2.2.6.	Désoxyoses.....	18
II.2.5.2.2.7.	Iridoïdes.....	18
II.2.5.2.2.8.	Saponines.....	18
III.	RESULTATS.....	18
III.1.	PREPARATION DES EXTRAITS TOXIQUES.....	18
III.1.1.	Extraction.....	18
III.1.2.	Purification.....	20
III.1.2.1.	Méthodes adoptées dans le protocole de purification.....	20
III.1.2.1.1.	Précipitation par l'éthanol 50%.....	20
III.1.2.1.2.	Fractionnement par le n-butanol.....	20
III.1.2.1.3.	Dialyse.....	20
III.1.2.2.	Méthodes non adoptées dans le protocole de purification.....	21
III.1.2.2.1.	Précipitation par l'acétate neutre de plomb.....	21
III.1.2.2.2.	Fractionnement par l'acétate d'éthyle.....	21
III.2.	CONCENTRATION DES SUBSTANCES TOXIQUES.....	23
III.3.	RENDEMENT DE PURIFICATION.....	23
III.4.	ANALYSE DES EXTRAITS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE.....	23
III.5.	CARACTERISATION CHIMIQUE.....	24
III.5.1.	Propriétés physico-chimiques.....	24
III.5.2.	Nature chimique.....	25
IV.	DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	26

DEUXIEME PARTIE : ETUDE TOXICOLOGIQUE

I. INTRODUCTION.....	27
II. MATERIELS ET METHODES.....	27
II.1. MATERIELS.....	27
II.1.1. Les animaux d'expérimentation.....	27
II.1.1.1. Les animaux à sang chaud : la souris.....	27
II.1.1.2. Les animaux à sang froid.....	27
II.1.1.2.1. Les têtards.....	27
II.1.1.2.2. Les alevins.....	28
II.1.1.3. Les insectes : les larves de moustique.....	28
II.1.2. Les végétaux d'expérimentation.....	28
II.1.3. Les microorganismes.....	29
II.1.3.1. Les souches.....	29
II.1.3.2. Les milieux de culture.....	29
II.2. METHODES.....	29
II.2.1. Méthodes d'étude des effets sur les animaux.....	29
II.2.1.1. Sur les animaux à sang chaud.....	29
II.2.1.1.1. Chez la souris.....	29
II.2.1.1.1.1. Estimation de la toxicité.....	29
II.2.1.1.1.2. Détermination de la DL50.....	30
II.2.1.2. Sur les animaux à sang froid.....	30
II.2.1.2.1. Principe.....	30
II.2.1.2.2. Mode opératoire.....	31
II.2.1.2.2.1. Test sur les têtards.....	31
II.2.1.2.2.2. Test sur les alevins de Baraoa.....	31
II.2.1.2.2.3. Test sur les larves de moustique.....	31
II.2.2. Méthodes d'étude des effets sur les végétaux.....	32
II.2.2.1. Expériences sur le pouvoir germinatif.....	32
II.2.2.1.1. Principe.....	32
II.2.2.1.2. Mode opératoire.....	32
II.2.2.2. Expériences sur la croissance des plantules.....	33
II.2.2.2.1. Principe.....	33

II.2.2.2.2.	Mode opératoire.....	33
II.2.2.2.2.1.	Trempage.....	33
II.2.2.2.2.2.	Germination.....	33
II.2.2.3.	Expériences sur le développement des bourgeons axillaires.....	33
II.2.2.3.1.	Principe.....	33
II.2.2.3.2.	Mode opératoire.....	33
II.2.3.	Méthodes d'étude sur les microorganismes.....	34
II.2.3.1.	Test de sensibilité des microorganismes.....	34
II.2.3.1.1.	Principe.....	34
II.2.3.1.2.	Mode opératoire.....	34
II.2.3.1.2.1.	Stérilisation.....	34
II.2.3.1.2.2.	Test.....	35
II.2.3.2.	Détermination de la CMI.....	35
III.	RESULTATS.....	35
III.1.	EFFETS DE L'EXTRAIT BRUT SUR LES ANIMAUX.....	36
III.1.1.	Sur les animaux à sang chaud.....	36
III.1.1.1.	Sur souris.....	36
III.1.1.1.1.	Description des symptômes d'intoxication.....	36
III.1.1.1.2.	Détermination de la DL50 (24h).....	36
III.1.2.	Sur les animaux à sang froid.....	38
III.1.2.1.	Sur les têtards.....	38
III.1.2.2.	Sur les alevins de Baraoa.....	39
III.1.3.	Sur les insectes : les larves de moustique.....	39
III.2.	EFFETS DES EXTRAITS SUR LES VEGETAUX.....	40
III.2.1.	Sur le pouvoir germinatif des graines.....	40
III.2.2.	Sur la croissance des jeunes plantules.....	41
III.2.3.	Sur le développement des bourgeons axillaires.....	48
III.3.	EFFETS SUR LES MICROORGANISMES.....	48
IV.	DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	49
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	52	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	53	
ANNEXES		

Je dédie ce mémoire à :

Mon seigneur Dieu qui a exaucé mon souhait et m'a donné les atouts qui m'ont permis de réaliser ce mémoire.

Ma mère et mon père qui m'ont soutenu moralement et matériellement tout au long de mes études. Qu'ils trouvent ici le fruit de leurs efforts.

Mon petit frère, pour son affection, . . .

REMERCIEMENTS

Notre stage a été réalisé au sein du **LABASM** (Laboratoire de Biochimie appliquée aux Sciences médicales) du département de Biochimie fondamentale et appliquée de la Faculté des Sciences (Université d'Antananarivo).

Ce travail ne serait parvenu à terme sans l'aide et les conseils de nombreuses personnes.

Ma profonde reconnaissance est adressée à :

Monsieur le Professeur **JEANNODA Victor**, Chef du Département de Biochimie fondamentale et appliquée, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, mais aussi pour avoir accepté d'être mon encadreur, malgré ses lourdes responsabilités.

Madame le Docteur **RAKOTO-RANOROMALALA Danielle A. Doll**, co-encadreur de mon stage, pour la qualité de son encadrement, son dévouement sans égal et son aide pour la finition de ce travail malgré ses nombreuses occupations.

Mes vifs remerciements vont à l'endroit de :

Monsieur le Professeur **ANDRIANTSIMAHAVANDY Abel** qui, malgré son emploi du temps bien rempli, me fait le grand honneur de présider le jury de ce mémoire.

Madame le Docteur **RANDRIANIERENANA Ando** et le Professeur **RAHERIMANDIMBY Marson**, qui malgré leurs multiples engagements, ont l'amabilité d'apporter leur compétence dans le jugement de ce travail.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail, en particulier le Docteur **Randrianarivo Ranjana** et Madame **Rakotobe Lolona**, ainsi que mes camarades de promotion pour leur solidarité, tant sur terrain qu'au laboratoire.

Enfin, je voudrais exprimer toute ma gratitude à tous ceux qui, de près ou de loin, ont participé à l'élaboration de ce travail.

LISTE DES ABBREVIATIONS

DBFA	: Département de Biochimie fondamentale et appliquée
LABASM	: Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales
min	: minute
h	: heure
trs	: tours
ANP	: Acétate Neutre de Plomb
CCM	: Chromatographie sur Couche Mince
B/A/E	: Butanol/Acide acétique/Eau
M/E	: Méthanol/Eau
EB	: Extrait brut
UV	: Ultraviolet
IPM	: Institut Pasteur de Madagascar
MPE	: Maison du Petit Elevage
DL₅₀	: Dose létale qui tue 50% des souris en 24h
CL₅₀	: Concentration létale qui tue les animaux testés en 24h
DO	: Densité Optique
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
I.P	: Intrapéritonéale
v/v	: volume par volume
q.s.p	: quantité suffisante pour
p/v	: poids par volume
IMRA	: Institut Malgache de Recherches Appliquées

GLOSSAIRE

Antibiotique	: médicament qui a pour effet de tuer les bactéries de façon ciblée ou d'empêcher leur multiplication
Antihelminthique	: qui détruit et expulse les parasites intestinaux
Aromathérapie	: traitement de maladie à l'aide d'arome de plantes
Contorsion abdominale	: étirement du corps de l'animal avec torsion
Diurétique	: provoque l'évacuation urinaire
Emétique	: provoque le vomissement
Enophtalmie	: enfoncement des globes oculaires
Fréquence respiratoire	: nombre de respirations effectuées par minute
Piloérection	: hérississement des poils
Pisciculture	: élevage de poissons

LISTE DES FIGURES

	<u>Page</u>
<u>Figure 1</u> : Pied de <i>Schefflera longipedicellata</i>	7
<u>Figure 2</u> : Feuilles de <i>Schefflera longipedicellata</i>	7
<u>Figure 3</u> : Schéma récapitulatif des étapes de purification des principes toxiques de <i>Schefflera longipedicellata</i>	22
<u>Figure 4</u> : Chromatogramme montrant l'évolution de l'homogénéité des divers extraits.....	24
<u>Figure 5</u> : Détermination graphique de la DL ₅₀ (24h).....	38
<u>Figure 6</u> : Résumé de l'expérience sur la croissance des jeunes plantules	42
<u>Figure 7</u> : Croissance des épicotyles de riz en fonction du trempage	43
<u>Figure 8</u> : Croissance des hypocotyles de riz en fonction du trempage	44
<u>Figure 9</u> : Croissance des épicotyles de haricot en fonction du trempage	45
<u>Figure 10</u> : Croissance des hypocotyles de haricot en fonction du trempage	45
<u>Figure 11</u> : Effets de l'extrait brut à différentes concentrations sur la croissance des épicotyles de riz	46
<u>Figure 12</u> : Effets de l'extrait brut à différentes concentrations sur la croissance des hypocotyles de riz	46
<u>Figure 13</u> : Effets de l'extrait brut à différentes concentrations sur la croissance des épicotyles de haricot	47
<u>Figure 14</u> : Effets de l'extrait brut à différentes concentrations sur la croissance des hypocotyles de haricot	47
<u>Figure 15</u> : Effet des différentes substances sur la croissance des bourgeons axillaires.....	48

LISTE DES TABLEAUX

Page

<u>Tableau 1</u> : Caractéristiques des extraits bruts issus des différentes techniques d'extraction .	19
<u>Tableau 2</u> : Concentration des extraits	23
<u>Tableau 3</u> : Résultats du criblage phytochimique de la poudre de feuille, de l'extrait brut et l'extrait E ₃	25
<u>Tableau 4</u> : Les végétaux d'expérimentation	28
<u>Tableau 5</u> : Norme de lecture des résultats d'un antibiogramme	34
<u>Tableau 6</u> : Résultats expérimentaux de la détermination de la DL ₅₀ (24h) sur souris.....	37
<u>Tableau 7</u> : Totaux cumulatifs des souris vivantes et des souris mortes.....	37
<u>Tableau 8</u> : Résultats expérimentaux des tests effectués sur les têtards de grenouille.....	38
<u>Tableau 9</u> : Résultats expérimentaux des tests effectués sur les alevins de poissons	39
<u>Tableau 10</u> : Résultats des expériences sur les larves de moustique.....	40
<u>Tableau 11</u> : Effets de EB à 1mg/ml sur le pouvoir germinatif des graines.....	41
<u>Tableau 12</u> : Effets de EB 10,02 mg/ml sur les souches microbiennes.....	49

INTRODUCTION GENERALE



Depuis toujours, l'homme utilise les plantes à différentes fins. Elles sont principalement employées comme source d'aliments. D'autre part, les feuilles et limbes des plantes peuvent être transformés en engrais naturel suite à leur dégradation et transformation en humus. Les plantes sont aussi cultivées pour servir d'ornementation ou pour protéger contre l'érosion. Actuellement, les huiles essentielles extraites de plantes trouvent des applications variées dans le domaine alimentaire (aromes), cosmétique ou pharmaceutique (aromathérapie). Dans ce dernier secteur, plusieurs huiles essentielles sont connues pour leurs propriétés antibactériennes.

Par ailleurs, depuis des siècles, les plantes sont traditionnellement utilisées pour résoudre divers problèmes de santé. Cette tradition continue à s'épanouir, à tel point que la majorité de la population a recours à la thérapeutique à base de plantes, à Madagascar comme dans des pays tel que la Chine et le Japon.

Actuellement à Madagascar, cette manière d'utiliser les plantes est encore très fréquente et évolue avec la technologie. Des sociétés et laboratoires de recherche ont même fait leur apparition pour exploiter cette utilisation des plantes à des fins thérapeutiques, pour ne citer que l'IMRA, l'HOMEOPHARMA, le RIRA,...Et même dans les pays développés, il y a un regain d'intérêt pour la recherche sur les plantes médicinales.

Notre île est un grand bénéficiaire de cette richesse naturelle car sa biodiversité végétale est très importante avec un taux d'endémisme élevé à tous les niveaux taxonomiques (famille, genre, espèce). Actuellement, plus de 12000 espèces végétales ont été recensées (RABESA ZAFERA, 1986) dont 80 % sont endémiques. Plusieurs d'entre elles sont utilisées par les paysans malagasy de nos jours dans le « Raokandro », ou la médecine traditionnelle à base de plantes. Ceci est dû à leur coût peu élevé et aussi à la facilité dont on se les procure.

Leurs utilisations sont multiples. Il y a celles qu'on peut utiliser pour soigner des maladies internes (comme les maux d'estomac ou les maladies du foie et bien d'autres), et celles qui servent à soigner les maladies externes (maladies de la peau ou plaies diverses). A titre d'illustration, on peut citer :

- le *talapetraka* ou *Centella asiatica* : le décocté de la plante entière, administré par voie orale, est utilisé pour guérir les maux d'estomac et de foie (RABESA ZAFERA, 1986).
- le *rambiazina* ou *Helichrysum gymnocephalum* : le décocté de tiges et de feuilles, administré par voie orale, est utilisé pour guérir les maladies du foie (BOST, 1961).

- le *dingadingana* ou *Psiadia altissima* : le décocté de feuilles peut servir à nettoyer les plaies (la gale) (RABESA ZAFERA, 1986).
- le *voandelaka* ou *Melia azedarach* ou lilas : la racine et l'écorce de tige ont des propriétés anti-helminthiques. Ces organes sont bouillis puis additionnés d'un peu de sucre si nécessaire. La solution est administrée par voie orale à raison d'une cuillerée à soupe par jour pour un enfant de moins de 1an (RABESA ZAFERA, 1986).
- le *hofika* ou *Dioscorea bulbifera* : la poudre des bulbilles aériennes séchées et râpées, appliquée sur les blessures et les plaies, entraîne leur guérison (DEBRAY et coll., 1971).

Les plantes sont aussi employées pour calmer les douleurs ou résoudre des problèmes physiologiques. Ainsi par exemple :

- le décocté de feuilles de *Psiadia altissima*, administré par voie orale, est efficace pour calmer les maux de ventre, rétablir une indigestion et guérir la blénnorrhagie (RABESA ZAFERA, 1986).
- la mangue ou *Mangifera indica* est utilisée pour dégriser les ivrognes. En effet, on leur fait manger les feuilles pilées qui sont émétiques (JAQUEMIN, 1971).
- le *anampatsa* ou *Amaranthus spinosus* est utilisé pour soigner l'hypertension artérielle car le décocté de la plante entière, administré par voie orale, est un diurétique (BOST, 1961).
- le *romba* ou *Ocimum gratissimum* dont le décocté de feuilles est administré par voie orale est un anti-diarrhéique et un anti-vomitif (PERNET, 1957).
- le *aviavy* ou *Ficus megapoda* est un antitussif et peut stopper les éternuements fréquents. Les feuilles fraîches pilées sont à aspirer par le patient (DEBRAY et coll., 1971).

Comme nous l'avons vu précédemment, les plantes peuvent être utilisées séparément pour guérir de nombreuses maladies ; mais elles peuvent aussi être combinées. Ainsi par exemple, le décocté de feuilles de *Ricinus communis* ou ricin ou *tanantanamanga* et de feuilles de *Paullinia pinnata* ou *vahimasinaombilahy* est administré par voie orale pour guérir le rhume, une hypothermie prolongée ou la malaria (*tazo*) (RABESA ZAFERA, 1986).

Malgré l'abondance des plantes à vertus thérapeutiques ou celles réputées toxiques recensées dans les ouvrages scientifiques, les effets secondaires indésirables ou la toxicité ne

sont déclarés que pour un nombre restreint d'entre elles. En outre, peu d'entre elles ont fait l'objet d'une étude approfondie.

Afin de vérifier que l'utilisation d'une plante est sans risque, une étude toxicologique est d'une importance capitale pour :

- évaluer la toxicité des feuilles de cette plante en déterminant les doses correspondantes ;
- déterminer les propriétés chimiques des extraits de la plante.

C'est pour ces différentes raisons que l'unité de toxicologie au sein du laboratoire du Département de Biochimie fondamentale et appliquée (DBFA) a orienté ses travaux de recherche sur les plantes, afin d'étudier les propriétés physico-chimiques de leurs principes actifs et d'évaluer leur toxicité et leurs effets biologiques.

Des plantes utilisées en médecine traditionnelle ont fait ainsi l'objet d'études toxicologiques.

Ainsi, au sein du laboratoire du DBFA seulement, nous pouvons citer l'étude sur :

- *Tachadenus longiflorus* de la famille des GENTIANACEAE (RAKOTOMALALA, 1989), utilisé pour soigner les diarrhées ;
- *Xylopia humblotiana* de la famille des ANNONACEAE (RASOLONDRAIBE, 2007) : le décocté du mélange de feuilles et de graines de la plante est préconisé pour atténuer la fatigue.
- *Gambeya boiviana* de la famille des SAPOTACEAE (RASOATAHINA, 2005) : les feuilles pilées sont utilisées comme emplâtre contre les piqûres de scorpion (AUBREVILLE, 1974) et le décocté de feuilles est utilisé pour guérir l'enfant à sujet des crises convulsives hyperthermiques simples.
- *Pittosporum senacia* de la famille des PITTOSPORACEAE (RAZAFINTSALAMA, 2005) : les feuilles sont utilisées pour soigner les piqûres d'araignées venimeuses.
- *Xerocycos danguyi* de la famille des CUCURBITACEAE (RAKOTONDRAZANAKA, 1999) : les racines râpées servent à bourrer les dents cariées, et les feuilles en infusion sont utilisées contre la syphilis.
- *Olex lanceolata* de la famille des OLACACEAE (RAHELINAINAMANDIMBY, 2003) : les feuilles servent à stopper les troubles d'origines diverses comme la fatigue et pour faciliter la cicatrisation des plaies.

Des principes toxiques mis en évidence dans ces végétaux ont été purifiés et étudiés du point de vue physico-chimique et toxicologique. Leurs propriétés pharmacologiques (antimicrobienne, insecticide, larvicide, ...) ont été étudiées.

Pour notre part, nous avons choisi comme matériel d'étude *Schefflera longipedicellata* ou *Voantsilana* ou *Vantsilana*, une ARALIACEE pour les raisons suivantes :

- d'après une enquête effectuée auprès des paysans aux alentours d'Anjozorobe, zone de récolte de la plante, cette plante possède une propriété pharmacologique intéressante car elle est utilisée comme antidote contre les empoisonnements par les venins d'insectes, d'araignées, de scorpions ou de serpents. En effet, suite à une piqûre d'animaux venimeux, trois à quatre feuilles de cette plante sont mâchées, puis la mixture (broyat de feuilles et salive) est appliquée sur la plaie.
- aucune étude même préliminaire concernant les principes actifs contenus dans cette plante n'a été entreprise ;
- cette plante est largement répandue et d'une grande disponibilité sur notre île ;
- pendant les tests préliminaires, une toxicité des extraits de feuilles a été mise en évidence.

Ce travail comprend deux parties : l'étude chimique qui comporte l'extraction et la purification des principes actifs et l'étude toxicologique des extraits obtenus.

Une conclusion générale accompagnée des perspectives termine ce travail pour résumer l'essentiel de cette étude et afin de s'orienter vers les nouvelles applications de cette recherche. Une introduction précède les deux parties, et elle est suivie de la description des matériels et méthodes utilisés.

ETUDE CHIMIQUE



I. INTRODUCTION

A part l'étude systématique effectuée par GOVAERT (2003), aucune étude approfondie n'a été faite jusqu'à présent sur *Schefflera longipedicellata* (ARALIACEAE). Ainsi, dans le cadre de l'étude chimique des principes toxiques de cette plante, nous avons établi un plan de recherche axé sur les points suivants :

- extraction des principes toxiques à l'aide de différentes techniques à partir de la poudre de feuilles ;
- établissement d'un procédé de purification permettant d'obtenir un extrait suffisamment purifié ;
- caractérisation physico-chimique des substances toxiques et détermination de leur nature chimique.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. MATERIELS

II.1.1. MATERIEL VEGETAL

II.1.1.1. POSITION SYSTEMATIQUE

(GOVAERTS, 2003)

La classification de la plante est la suivante :

Règne	: VEGETAL
Sous-règne	: TRACHEOBIONTA
Division	: MAGNOLIOPHYTA
Classe	: MAGNOLIOPSIDA
Sous-classe	: ROSIDAE
Ordre	: APIALES
Famille	: ARALIACEAE
Genre	: <i>Schefflera</i>
Espèce	: <i>longipedicellata</i>
Noms vernaculaires	: Voantsilana, vantsilana

La plante a été identifiée au laboratoire de botanique du Parc botanique et zoologique de Tsimbazaza où elle porte la référence d'herbier N° 2080, établie par PHILLIPSON en juillet 1987.

II.1.1.2. DESCRIPTION BOTANIQUE

II.1.1.2.1. Description du genre *Schefflera* **(GOVAERTS, 2003)**

Arbustes ou arbres, souvent grimpants ou épiphytes, à feuilles persistantes, hermaphrodites ou monoïques, non épineux. Les feuilles sont palmées composées, rarement unifoliolées, à bord entier, sans poil ; les stipules sont unis à l'intérieur du pétiole. L'inflorescence est terminale ou pseudolatérale en panicule ou en racème composée. Les bractées sont pubescentes, caduques ou persistantes. Le pédicelle est non articulé en dessous de l'ovaire. Le calice est à bord entier ou pentadenté. Les pétales sont au nombre de 5 à 11, valvaires. Il y a 5 à 11 étamines. L'ovaire possède 4 (ou 5) à 11 carpelles. Le style est en partie ou totalement uni en colonne ou stigmaté sans pédoncule. Les fruits sont en grappe, arrondis ou ovoïdes. Les graines 4 (ou 5) à 11, sont latéralement comprimées à endosperme uniforme, ou légèrement ruminées.

II.1.1.2.2. Description de l'espèce *Schefflera longipedicellata* **(FRODIN, 1988)**

Arbre pouvant atteindre 8 m de haut, l'espèce a des feuilles ternes, de couleur vert sombre au-dessus, pâles et concaves en dessous. Ce sont des feuilles composées, digitées, alternes. Les tiges portent de petites inflorescences pâles, vert-jaune, souvent groupées en 4. Les fleurs sont constituées de pétales vert-jaune. Les anthères sont en évidence, réfléchis de couleur jaune. Les fruits immatures sont ronds, verts, devenant rouge-noir à maturité sur une infructescence en racème, ombelliforme (voir figures 1 et 2, p. 7).



Figure 1 : Pied de *Schefflera longipedicellata*



Figure 2 : Feuilles de *Schefflera longipedicellata*

II.1.1.3. LOCALISATION GEOGRAPHIQUE

Notre plante *Schefflera longipedicellata* est trouvée dans les forêts denses et humides de l'Est de l'Île.

En effet, elle a été localisée dans la forêt de Betatao et d'Antsaralahy, district d'Anjozorobe, province d'Antananarivo et à Ambatovy, district de Moramanga, province de Toamasina.

Elle pousse aussi dans d'autres provinces comme celles de Fianarantsoa, plus précisément dans la commune de Farafangana, district de Vondrozo ou dans la forêt de Ranomafana ; dans la province d'Antsiranana : dans la réserve nationale d'Ambohitra (Montagne d'Ambre).

II.1.1.4. LIEU ET DATE DE RECOLTE

Notre plante a été récoltée dans le district d'Anjozorobe (sur la RN3, PK90), plus précisément dans le fokontany d'Antsahabe Est, forêt d'Antsaralahy, au mois d'août 2007, période où la plante est en phase végétative.

II.1.1.5. PREPARATION ET CONSERVATION DU MATERIEL VEGETAL

Les feuilles ont servi de matériel d'étude. Elles sont séchées à l'abri du soleil pendant trois semaines. Ensuite, à l'aide d'un mixer (BLENDER, GT500), elles sont broyées jusqu'à l'obtention d'une poudre fine qui constitue le matériel de départ. Celle-ci est conservée dans une boîte hermétiquement fermée, à la température ambiante.

II.1.2. LES PRODUITS CHIMIQUES

Dans notre laboratoire, les produits chimiques, c'est-à-dire les réactifs et solvants utilisés sont de qualité pour analyse et de marque MERCK ou PROLABO.

Les supports chromatographiques utilisés sont des plaques de gel de silice (MERCK) 60F₂₅₄, d'épaisseur 0,2 mm, étalé sur une feuille en plastique de dimensions 20 x 20 cm, immédiatement utilisables.

II.1. METHODES

II.2.1. METHODES D'EXTRACTION DES PRINCIPES TOXIQUES

II.2.1.1. EXTRACTION A FROID

La poudre végétale est mise en suspension dans le solvant d'extraction (eau distillée ou mélange hydroéthanolique 75 % ou éthanol absolu) suivant le rapport 1/10 (p/v), c'est-à-dire 1g de poudre dans 10 ml de solvant. Le mélange est soumis à une agitation magnétique pendant 3 h à la température ambiante, puis laissé macérer à +4°C pendant au moins 12 h.

Le macérat est de nouveau agité pendant 30 min à la température ambiante avant sa filtration sur quatre épaisseurs de gaze pour éliminer le marc.

Le filtrat est ensuite centrifugé à 12 000 trs/min pendant 20 min au moyen d'une centrifugeuse BREMSE (modèle T52).

Pour l'extraction aqueuse, le surnageant qui constituera ultérieurement l'extrait brut est concentré, alors que pour l'extraction hydroéthanolique ou éthanolique, il est débarrassé du solvant d'extraction par évaporation sous pression réduite au moyen d'un évaporateur rotatif (voir méthode de concentration au paragraphe II.2.3, p. 13).

Pour les trois types de solvant d'extraction, le volume final est réduit à 1ml pour chaque gramme de poudre de départ, c'est-à-dire suivant le rapport 1/1 (p/v).

Une deuxième centrifugation à 12 000 trs/min pendant 15 min à l'aide d'une centrifugeuse JOUAN (modèle TH12), est nécessaire pour éliminer le précipité éventuel.

II.2.1.2. EXTRACTION A CHAUD

La poudre est mélangée avec le solvant d'extraction (eau distillée ou mélange hydroéthanolique 75 %), dans le rapport 1/10 (p/v).

L'extraction est effectuée à reflux. La solution est chauffée sur une plaque chauffante sous agitation magnétique à la température d'ébullition du solvant d'extraction, c'est-à-dire 100 °C pour l'eau distillée et +65 °C pour l'éthanol (GAUTIER et MIOCQUE, 1968).

Après 3 h de chauffage, le décocté est enlevé du dispositif d'extraction, puis laissé refroidir à la température ambiante. Il est ensuite laissé macérer à +4°C pendant au moins 12 h.

La suite de la manipulation est la même que pour l'extraction à froid.

II.2.2. METHODES DE PURIFICATION

II.2.2.1. FRACTIONNEMENT PAR LE n-BUTANOL

II.2.2.1.1. Principe

La technique est fondée sur la distribution d'un soluté entre deux solvants non miscibles, l'eau et le n-butanol, en fonction de sa solubilité dans chacun d'eux (MAHUZIER et HAMON, 1986 ; KAMOUN, 1987).

II.2.2.1.2. Mode opératoire

Dans une ampoule à décanter sont introduits un volume de l'extrait à traiter préalablement dilué 2 fois (pour diminuer sa viscosité) et le même volume de n-butanol. Après agitation énergique, le mélange est laissé au repos dans l'ampoule débouchée jusqu'à la décantation totale des deux liquides, donnant deux phases nettes : la phase supérieure organique et la phase inférieure aqueuse. Les deux phases sont alors récupérées et leur volume mesuré. L'opération est répétée deux fois en remplaçant le n-butanol.

Les trois phases organiques sont alors réunies, débarrassées du solvant organique par évaporation après ajout d'un grand volume d'eau, puis concentrées pour avoir le rapport 1/1 (p/v).

La phase aqueuse est débarrassée du n-butanol résiduel par évaporation.

II.2.2.2. PRECIPITATION PAR L'ECETATE NEUTRE DE PLOMB

II.2.2.2.1. Principe

Divers sels de métaux lourds comme l'acétate neutre de plomb (ANP) permettent d'éliminer différentes substances comme les protéines, les acides organiques, les acides nucléiques, les polysaccharides, les tanins et d'autres substances phénoliques,... en les précipitant (MAHUZIER et HAMON, 1986).

II.2.2.2.2. Mode opératoire

La solution d'acétate neutre de plomb à 20 % (p/v) de volume déterminé est versée goutte à goutte dans l'extrait placé sous agitation magnétique. Le précipité formé est éliminé par centrifugation à l'aide de la centrifugeuse BREMSE (modèle T52), à 12 000 trs/min pendant 5 min à +5 °C. Le traitement est répété jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de précipité.

L'excès de plomb est éliminé par précipitation à l'aide d'une solution aqueuse de phosphate disodique à 10 % (p/v). Le précipité formé est écarté par centrifugation comme précédemment.

II.2.2.3. DIALYSE

II.2.2.3.1. Principe

Cette technique est basée sur la capacité des molécules de traverser une membrane héli-perméable suivant leurs poids moléculaires. Cette membrane cylindrique appelée sac à dialyse ou boudin à dialyse agit comme un tamis moléculaire et possède un seuil de filtration bien déterminé. Elle sépare ainsi les petites molécules des grosses molécules en induisant deux phénomènes :

- ***L'osmose*** : définie comme le mouvement d'eau du milieu le plus dilué (liquide de contre-dialyse) vers le milieu le plus concentré (extrait à dialyser).
- ***La diffusion*** : les substances de faible poids moléculaire sortent vers le liquide contre-dialyse.

Plusieurs paramètres influencent la vitesse de la dialyse :

- le diamètre des pores de la membrane
- la différence de concentration, entre les deux compartiments
- le temps de contact
- la température
- le pH.

(AUDIGIER et coll., 1989, KAMOUN, 1991, MAHUZIER et HAMON, 1990)

II.2.2.3.2. Mode opératoire

II.2.2.3.2.1. Préparation de la membrane de dialyse

Le boudin à dialyse (marque Cellu Sep, 33mm de large, seuil 6000 à 8000 Da) est bouilli trois fois dans l'eau distillée pendant 5 min tout en remplaçant chaque fois l'eau distillée. Cela permet d'éliminer la couche protectrice formée de glycérine, de métaux lourds et de composés sulfurés. Après ce traitement, le boudin est conservé à +4 °C dans la dernière eau bouillie.

Avant chaque utilisation, il est nécessaire de rincer le boudin à dialyse avec de l'eau distillée.

II.2.2.3.2.2. Déroulement de la dialyse

Le boudin de dialyse est rempli au tiers avec l'extrait à traiter, laissant ainsi un espace suffisant pour les échanges. Ceci permet d'éviter l'éclatement du boudin par augmentation de volume de l'extrait à traiter.

Avant de nouer les deux extrémités du boudin à dialyse, l'air est éliminé pour permettre son immersion totale dans de l'eau distillée de volume égal à cent fois celui de l'extrait à dialyser. Une agitation continue du liquide de contre-dialyse est nécessaire pour éviter la formation d'un gradient de concentration des molécules diffusibles autour du boudin.

Le liquide de contre-dialyse est changé trois fois en 48 h.

A la fin de l'opération, le dialysat, liquide à l'extérieur du boudin et l'adialysat, liquide à l'intérieur du boudin, sont concentrés jusqu'au rapport 1/1 (p/v).

II.2.2.4. PRECIPITATION PAR L'ETHANOL 50%

II.2.2.4.1. Principe

Elle est basée sur la diminution de la solubilité de certaines substances dans l'eau, après addition d'un solvant organique moins polaire miscible tel que l'éthanol. Cela va entraîner la précipitation de ces substances (MAHUZIER et HAMON, 1986).

II.2.2.4.2. Mode opératoire

L'extrait à traiter de volume déterminé, soumis à une agitation magnétique continue, est additionné goutte à goutte d'éthanol absolu de même volume.

Le mélange est ensuite laissé macérer à +4°C pendant 15 min. Le précipité formé est éliminé à 12 000 trs/min pendant 15 min à l'aide de la centrifugeuse JOUAN, TH12.

Enfin, le solvant contenu dans le surnageant est éliminé par évaporation au moyen d'un évaporateur rotatif.

II.2.2.5. FRACTIONNEMENT PAR L'ACETATE D'ETHYLE

II.2.2.5.1. Principe

Elle est basée sur la distribution d'une substance en fonction de son affinité relative dans deux solvants non miscibles (MAHUZIER et KAMON, 1986 ; KAMOUN, 1987).

II.2.5.2. Mode opératoire

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

II.2.3. METHODE DE CONCENTRATION

L'évaporateur rotatif (HEIDOLPH) est l'appareil utilisé pour évaporer les solvants organiques ou concentrer un extrait. Une pompe à vide est nécessaire pour réduire la pression au cours de l'évaporation. L'opération est effectuée à 60°C.

La concentration initiale des extraits (rapport 1/1, P/V) à étudier peut être calculée à partir de la relation ci-après :

$$\text{Concentration (mg/ml)} = \frac{\text{Poids du résidu sec (mg)}}{\text{Volume de l'extrait de départ (ml)}}$$

II.2.4. CALCUL DE RENDEMENT

L'extrait résultant d'une extraction ou d'une étape de purification est évaporé à sec. Le résidu sec obtenu est pesé. Le rendement est le rapport entre le poids du résidu sec et celui du matériel de départ selon la formule :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Poids du résidu sec (g)}}{\text{Poids du matériel de départ (g)}} * 100$$

II.2.5. METHODES D'ANALYSE

II.1.2.1. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

II.2.5.1.1. Principe

La chromatographie sur couche mince (CCM) est un procédé de microanalyse utilisant comme support le gel de silice 60 F₂₅₄ étalé sur une feuille plastique. Le long de ce support, une phase liquide entraîne à vitesse inégale les substances à séparer, suivant une direction déterminée.

La vitesse de migration est fonction de l'affinité des constituants vis-à-vis de la phase liquide mobile et/ou de la phase fixe adhérent au support chromatographique (RANDERATH, 1964 ; VERNIN, 1970 ; BOREL et RANDOUX, 1987 ; MAHUZIER et coll., 1990).

II.2.5.1.2. Mode opératoire

II.2.5.1.2.1. Préparation de la plaque

Avant le dépôt des extraits sur la plaque, la ligne de dépôt est tracée à 1,5 cm du bord inférieur de la plaque. A 1,3 cm des bords latéraux sont déposés les extraits sous forme de tirets de 0,8 cm, espacés de 0,6 cm. Les dépôts sont séchés à l'aide d'un séchoir à main.

II.2.5.1.2.2. Développement du chromatogramme

Dans une cuve chromatographique (DESAGA) contenant le solvant de chromatographie dont les vapeurs ont préalablement saturé l'enceinte, la plaque préparée est introduite. Cette dernière est positionnée verticalement (c'est-à-dire la ligne de dépôt en bas). Le solvant migre par capillarité vers le haut le long de la plaque (chromatographie ascendante). La migration est arrêtée lorsque le front du solvant arrive à 0,5 cm du bord supérieur de la plaque. Elle est ensuite retirée de la cuve et séchée par un courant d'air chaud pour évaporer le solvant.

II.2.5.1.2.3. Révélation du chromatogramme

II.2.5.1.2.3.1. Examen sous lumière ultraviolette (UV)

A des longueurs d'onde égales à 254 nm et 366 nm, de nombreuses substances deviennent visibles sous forme de taches violettes ou roses ou fluorescentes sous l'effet de la lumière UV.

II.2.5.1.2.3.2. Réactions colorées

La vanilline sulfurique (voir composition en annexe I) est le révélateur universel utilisé pour révéler les composés carbonés ayant au minimum 2 atomes de carbone. Elle est pulvérisée à la surface du chromatogramme. Après séchage à l'étuve de la plaque, des taches violettes ou roses apparaissent.

II.2.5.2. CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE

Les tests de criblage nécessitent au préalable la préparation de quatre extraits.

II.2.5.2.1. Préparation des extraits à tester

II.2.5.2.1.1. Extrait aqueux

Une quantité égale à 2 g de poudre d'organe (feuilles) ou 2 g de résidu d'évaporation à sec de l'extrait à tester est mélangée à 10 ml d'eau distillée. Le mélange est chauffé jusqu'à l'ébullition.

II.2.5.2.1.2. Extrait chloroformique

Du chloroforme (10 ml) sont additionnés à la poudre végétale pesant 2 g, ou à 2 g de résidu d'évaporation à sec de l'extrait à étudier.

II.2.5.2.1.3. Extrait hydroéthanolique

De l'éthanol 75 % (10 ml) est mélangé avec 2 g de poudre de feuille ou 2 g de résidu d'évaporation à sec de l'extrait à étudier.

II.2.5.2.1.4. Extrait acide

De l'acide chlorhydrique (HCl) 2N de volume égal à 10 ml est mélangé avec 2 g de poudre de feuilles ou 2 g de résidu d'évaporation à sec de l'extrait à étudier.

Notons que tous ces extraits sont laissés macérer au moins 12 h à +4°C. Avant l'utilisation de chacun d'eux, il est essentiel de bien mélanger la suspension obtenue et de la filtrer ensuite pour avoir un extrait limpide.

II.2.5.2.2. Détermination des familles chimiques

II.2.5.2.2.1. Alcaloïdes

Le test des alcaloïdes nécessite quatre tubes à essai contenant chacun 1ml d'extrait acide ci-dessus. Le premier tube sert de témoin. Les autres tubes sont utilisés pour les tests spécifiques (voir la composition des réactifs en annexe III).

II.2.5.2.2.1.1. Test de Mayer

Le réactif de MAYER (4 gouttes) est versé dans le second tube. L'apparition d'un précipité blanc ou d'une floculation témoigne de l'existence d'alcaloïdes dans l'extrait étudié.

II.2.5.2.2.1.2. Test de WAGNER

Dans le troisième tube sont versées 4 gouttes de réactif de WAGNER. La formation d'un précipité blanc indique la présence d'alcaloïdes.

II.2.5.2.2.1.3. Test de DRAGENDORFF

Quatre gouttes de réactif de DRAGENDORFF sont ajoutées dans le dernier tube. Une floculation blanche apparaît si l'extrait contient des alcaloïdes.

Il est essentiel d'effectuer le test de confirmation des résultats même si les trois tests précédents s'avèrent positifs. Cela consiste à solubiliser les précipités formés dans de l'éthanol (80 %) de volume 0,5 ml. Si les précipités sont solubles, on a des alcaloïdes.

II.2.5.2.2.2. Flavonoïdes et leucoanthocyanes

Leur détection est effectuée sur l'extrait hydroéthanolique.

II.2.5.2.2.2.1. Flavonoïdes (Test de WILSTATER)

La réaction colorée, dite de la cyanidine, met en évidence les flavones, flavonols et flavonones par traitement avec du magnésium en milieu chlorhydrique (BRUNETON, 1987).

Deux tests sont à effectuer :

- Pour le premier, 2 ml d'extrait sont additionnés de 4 gouttes de HCl 12N et de deux tournures de magnésium. Après 10 min, le virage de la couleur au rouge indique la présence de flavones, au rouge pourpre celle des flavonols et au rouge violacé celle des flavonones et flavonols.

- Pour le deuxième, le mélange précédent (2 ml d'extrait + 4 gouttes de HCl 12N + 2 tournures de magnésium) est également préparé mais cette fois ci, il est additionné de 0,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'alcool isoamylique. Une coloration rouge à rouge violacé de la phase supérieure indique la présence de flavonoïdes.

II.2.5.2.2.2.2. Leucoanthocyanes (Test de BATE-SMITH)

L'extrait de volume égal à 2 ml, est additionné de 0,5ml de HCl 12 N. Le tout est chauffé dans un bain-marie bouillant pendant 30 min. La réaction positive correspond à l'apparition de la couleur rouge après refroidissement.

II.2.5.2.2.3. Tanins et polyphénols

L'extrait aqueux est utilisé pour la détection des tanins et polyphénols.

Trois tests sont nécessaires pour observer la présence des variétés de tanins.

II.2.5.2.2.3.1. Test à la gélatine

Quatre gouttes de gélatine salée à 1 % (p/v) sont versées dans 0,5 ml d'extrait. Ce test indique la présence des tanins condensés de type catéchique, qui se traduit par la formation d'un précipité blanc.

II.2.5.2.2.3.2. Test à la gélatine salée

Quatre gouttes de gélatine salée 10 % (c'est-à-dire de la gélatine 1 % dans une solution de NaCl 10 %). La formation d'un précipité montre la présence de tanins hydrolysables de type pyrogallique.

II.2.5.2.2.3.3. Test au chlorure ferrique

Quatre gouttes de chlorure ferrique en solution méthanolique sont mélangées avec 0,5 ml d'extrait. Le virage de la couleur au bleu-noir ou au bleu-vert met en évidence l'existence des composés phénoliques autres que tanin (HEMINGWAY et KARCHESY, 1989).

II.2.5.2.2.4. Stéroïdes et triterpènes

L'extrait chloroformique est utilisé pour les tests.

II.2.5.2.2.4.1. Test de LIBERMANN- BURCHARD

L'extrait de volume égal à 1 ml est ajouté de trois gouttes d'anhydride acétique. Après une légère agitation, 2 gouttes d'acide sulfurique (H_2SO_4) 36 N sont versées le long de la paroi du tube en position inclinée. L'apparition d'un anneau rouge violacé indique la présence de triterpènes alors que la coloration verte de la phase supérieure du mélange montre celle des stéroïdes.

II.2.5.2.2.4.2. Test de SALKOWSKI

La présence de stérols insaturés se traduit par la coloration rouge de la phase au fond du tube à essai après l'ajout de 0,5 ml de H_2SO_4 36 N et de trois gouttes d'anhydride acétique, à 0,5 ml d'extrait.

II.2.5.2.2.5. Anthraquinones (Test de BORNTRÄGER)

0,5 ml d'extrait est mélangé avec 1 ml de benzène. Le mélange est laissé au repos. Après la décantation, 0,5 ml d'ammoniaque 25 % est ajouté dans le tube contenant le mélange. La coloration rouge de la phase alcaline indique la présence d'anthraquinones.

II.2.5.2.2.6. Désoxyoses (Test de KELLER-KILLIANI)

A l'extrait aqueux de volume égal à 0,5 ml sont ajoutés successivement 0,5 ml d'acide acétique glacial, 0,5 ml de chlorure ferrique 10 % en solution aqueuse et 0,5 ml de H₂SO₄ 36 N coulé le long de la paroi du tube incliné. Une réaction positive est caractérisée par la formation d'un anneau pourpre à l'interface (FONG et coll., 1977).

II.2.5.2.2.7. Iridoïdes

L'addition de quelques gouttes de HCl 12 N à l'extrait aqueux de volume égal à 0,5 ml, suivie d'un chauffage du mélange dans un bain-marie bouillant pendant 30 min sert à tester les iridoïdes. Une réaction positive se traduit alors par la formation d'un précipité ou d'une coloration vert foncé ou bleu foncé.

II.2.5.2.2.8. Saponines

Les saponosides se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes par agitation (BALANSARD et BERNARD, 1950 ; BRUNETON, 1987 et 1993).

L'extrait aqueux de volume égal à 1 ml est soumis à une agitation énergique pendant 30 min. Si la formation de mousse alvéolée à la surface persiste pendant 30 min, avec une hauteur de 3 cm, l'extrait renferme des saponines.

III. RESULTATS

III.1. PREPARATION DES EXTRAITS TOXIQUES

III.1.1.EXTRACTION

Diverses techniques d'extraction ont été effectuées à partir de la poudre de feuilles dans le but de déterminer la méthode d'extraction des principes toxiques la plus performante et d'obtenir un extrait facile à manipuler.

Pour chaque extraction, 45 g de poudre sont utilisés :

- Extraction à froid : les solvants utilisés sont l'eau distillée, le mélange hydroéthanolique 75 % et l'éthanol absolu (100 %). (Voir paragraphe II.2.1.1, p. 9)
- Extraction à chaud et à reflux : les solvants utilisés sont : l'eau distillée, le mélange hydroéthanolique 75 % (voir paragraphe II.2.1.2, p. 9).

Quant au volume des extraits après l'extraction, il est réduit au volume initial du matériel de départ c'est-à-dire 45 ml, pour obtenir le rapport 1/1 (p/v).

La toxicité des différents extraits est appréciée grâce à des tests sur souris (voir méthode au paragraphe II.2.1.1.1.1, p. 29).

Le tableau 1, p. 19 résume les caractéristiques des différents extraits.

Tableau 1 : Caractéristiques des extraits bruts issus des différentes techniques d'extraction

Technique d'extraction	Aqueuse à froid	Hydroéthanolique 75 % à froid	Ethanolique à froid	Aqueuse à chaud	Hydroéthanolique 75 % à chaud
Caractéristiques					
Couleur	Marron foncé	Marron verdâtre	Marron verdâtre	Marron foncé	Marron verdâtre
Aspect	Trouble	Trouble	Trouble	Trouble	Trouble
Consistance	Visqueuse	Visqueuse	Visqueuse	Visqueuse	Visqueuse
pH	5,41	5,36	5,49	5,36	5,48
Goût	Amer	Amer	Amer	Amer	Amer
Temps de survie des souris	12h	Entre 5h et 10h	Entre 6h et 12h	Entre 4h et 5h	Entre 6h et 7h
Rendement (%)	62,67	27,66	29,1	23,13	43,14

Les extraits bruts obtenus provoquent tous la mort des souris mais ils n'ont pas la même toxicité.

Pour diverses raisons, nous utiliserons la méthode d'extraction aqueuse à chaud pour la suite de notre travail. En effet, l'extrait brut aqueux à chaud est l'un des plus toxiques car il donne le temps de survie le plus court. Par ailleurs, il montre peu de contaminants (huit bandes majeures en CCM) et enfin, l'extraction aqueuse à chaud est peu coûteuse par rapport à l'extraction hydroéthanolique à chaud qui donne pourtant un bon rendement.

III.1.2. PURIFICATION

Nous avons établi un protocole de purification qui comporte des techniques basées sur des propriétés telles que l'affinité des produits pour un solvant ou leur poids moléculaire. Certes, nombreuses sont les méthodes de purification testées mais certaines d'entre elles seulement ont été adoptées car elles se sont montrées efficaces. Cette efficacité a été vérifiée par des analyses par chromatographie sur couche mince et des tests de toxicité sur souris.

III.1.2.1. METHODES ADOPTEES DANS LE PROTOCOLE DE PURIFICATION

Trois techniques de purification sur les cinq effectuées ont été adoptées.

III.1.2.1.1. Précipitation par l'éthanol 50 %

Le traitement de l'extrait brut avec de l'éthanol 50 % (voir paragraphe II.2.2.4, p. 12) a permis d'éliminer un culot volumineux d'aspect boueux et d'obtenir un extrait limpide moins visqueux que l'extrait brut, de couleur marron et avec un goût amer. Ce surnageant tue les souris testées en moins de 24 h. L'extrait obtenu est nommé E₁.

III.1.2.1.2. Fractionnement par le n-butanol

L'extrait E₁ a été fractionné avec le n-butanol (voir paragraphe II.2.2.1, p. 10) ; ce qui a permis d'obtenir deux extraits : l'extrait organique qui, après injection par voie intra péritonéale à des souris, ne provoque pas leur mort.

L'extrait aqueux au contraire provoque la mort des souris testées. Ce sera l'extrait utilisé pour la suite de la purification. Nommé E₂, il est de couleur marron, limpide, peu visqueux et de goût amer.

Cette technique a aussi permis d'éliminer certaines bandes de l'extrait E₁ d'après l'analyse par CCM. Elle constitue alors la seconde étape de notre purification.

III.1.2.1.3. Dialyse

L'extrait E₂ a été dialysé contre de l'eau distillée (voir paragraphe II.2.2.3, p. 11) donnant deux extraits :

- Le dialysat, c'est-à-dire la fraction à l'extérieur de boudin à dialyse qui n'est pas toxique chez les souris.
- L'adialysat, c'est-à-dire le liquide à l'intérieur du sac à dialyse, toxique sur toutes les souris testées.

Cette étape a aussi permis d'éliminer de nombreux contaminants d'après la CCM.

L'adialysat constitue alors l'extrait E₃ qui est de couleur marron, de goût amer, limpide et fluide.

III.1.2.2. METHODES NON ADOPTÉES DANS LE PROTOCOLE DE PURIFICATION

III.1.2.2.1. Précipitation par l'acétate neutre de plomb (ANP)

L'extrait E₂, de volume égal à 45 ml traité avec 1 ml de ANP (voir paragraphe II.2.2.2, p. 10) est devenu incolore, mais n'a aucun effet sur les souris testées.

III.1.2.2.2. Fractionnement par l'acétate d'éthyle

Le fractionnement de E₂ (10 ml) à l'acétate d'éthyle (voir paragraphe II.2.2.5, p. 12) abouti à deux extraits :

- La phase organique, incolore est non toxique chez les souris.
- La phase aqueuse de couleur marron, au contraire est toxique chez les souris testées mais l'analyse sur chromatographie sur couche mince a montré que cette technique n'a permis d'enlever aucun contaminant.

Le protocole de purification adopté est résumé sur la figure 3, p. 22.

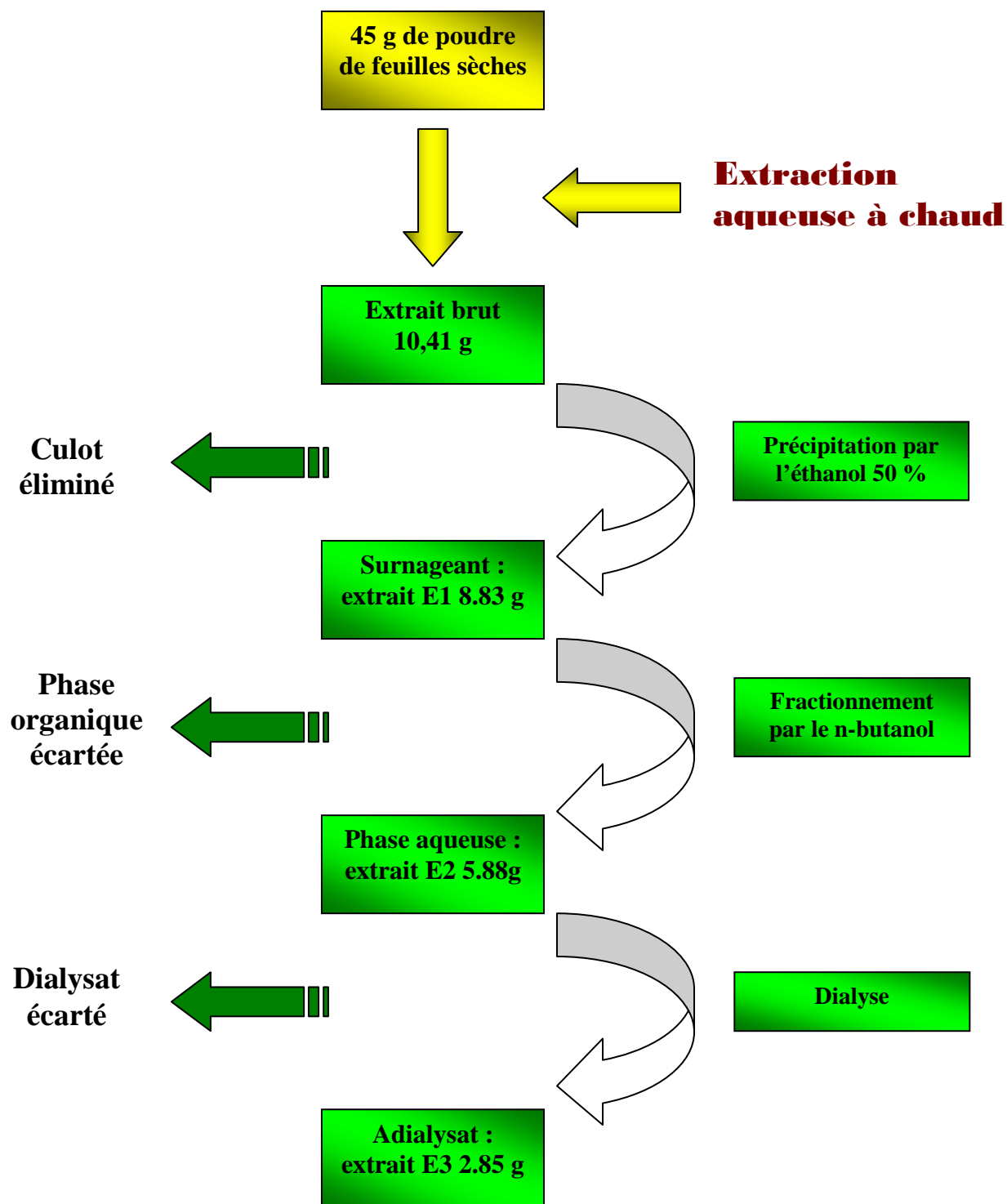


Figure 3 : Schéma récapitulatif des étapes de purification des principes toxiques de *Schefflera longipedicellata*.

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

III.2. CONCENTRATIONS DES SUBSTANCES TOXIQUES

Les valeurs des concentrations des extraits utilisés (voir méthode au paragraphe II.2.3, p. 13) sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Concentrations des extraits

Extraits à tester	Valeurs de la concentration (mg/ml)	Temps de survie des souris testées (h)
Extrait brut	231,25	5
Extrait E1	196,29	12
Extrait E2	130,60	11
Extrait E3	63,40	10

III.3. RENDEMENTS

Les poids des résidus d'évaporation à sec de EB et de E₃, obtenus à partir de 45 g de poudre de feuilles sont respectivement de 10,41 g et 2,85 g. Par conséquent, les rendements calculés à partir de la formule donnée dans le paragraphe II-2-4 (p. 13) sont les suivants :

- rendement d'extraction par rapport à la poudre de feuilles, égal à 23,13 %.
- rendement de purification par rapport à EB, égal à 27,38 %.
- rendement en toxines par rapport à la poudre de feuilles, égal à 6,33 %.

III.4. ANALYSE DES EXTRAITS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

L'évolution de l'homogénéité des extraits au cours des étapes de purification a été appréciée par chromatographie sur couche mince (voir méthode au paragraphe II.2.5.1, p. 13), utilisant 2 systèmes de solvants différents qui sont : le Butanol / Acide acétique / Eau (BAE) (60/20/20) (p/p/p) et le Méthanol / Eau (ME) (85/15) (v/v) (voir composition en annexe II).

L'extrait brut présente 8 bandes majeures sous lumière ultraviolette à 254 nm. Après la précipitation de l'extrait brut à l'éthanol 50 %, le surnageant présente encore 7 bandes majeures.

Le fractionnement par le n-butanol élimine 2 d'entre elles et à la fin, après la dialyse, E₃ ne possède plus que trois bandes.

La purification a donc permis d'éliminer 5 bandes majeures contaminantes.

Notons que le système BAE (60/20/20) (p/p/p) n'a pas donné une bonne séparation des constituants de E₂ et E₃, c'est pour cela que nous avons utilisé le deuxième système ME (85/15) (v/v) afin d'évaluer l'homogénéité de ces deux extraits.

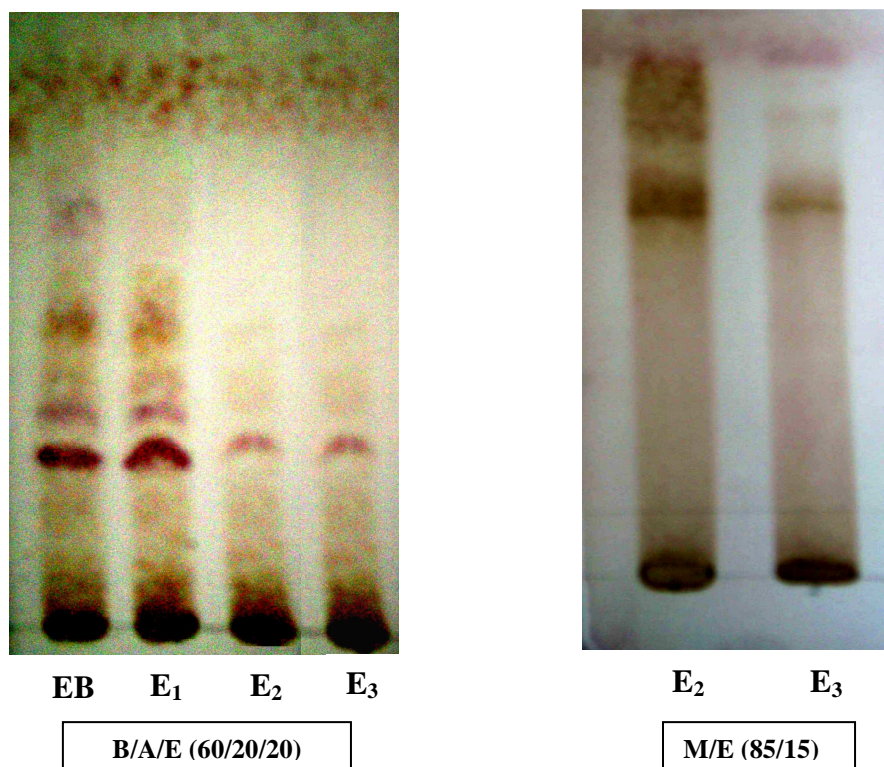


Figure 4 : Chromatogrammes montrant l'évolution de l'homogénéité des divers extraits

EB : Extrait brut

E₁ : Surnageant issu de la précipitation par l'éthanol 50 % de EB

E₂ : Extrait aqueux obtenu par fractionnement par le n-butanol de E₁

E₃ : Extrait obtenu par dialyse de E₂

III.5. CARACTERISATION CHIMIQUE

III.5.1. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Les propriétés physico-chimiques ont été déduites du comportement des principes pendant l'extraction et la purification. Ainsi,

- les principes actifs sont solubles dans les solvants tels que l'eau, l'éthanol et sont insolubles dans le n-butanol et l'acétate d'éthyle ;

- ils résistent à des opérations de congélation et de décongélation répétées et à des températures élevées ;
- ils sont précipités par l'acétate neutre de plomb ;
- ils ne traversent pas la membrane de dialyse ;
- ils ont un goût amer et une couleur marron avec un pH égal à 5,36.

III.5.2. NATURE CHIMIQUE

Les résultats de criblage phytochimique de la poudre de feuille et des deux extraits : brut et purifié E₃ sont récapitulés dans le tableau 3 ci-dessous afin de cerner la nature des principes et de comparer le contenu de ces trois matériels.

Tableau 3 : Résultats du criblage phytochimique de la poudre de feuilles, l'extrait brut et l'extrait E₃

Nature de l'extrait	Famille chimique	Réaction chimique	Résultats		
			Poudre	EB	E ₃
Acide	Alcaloïdes	MAYER	-	-	-
		DRAGENDORFF	-	-	-
		WAGNER	-	-	-
Hydroéthanolique	Flavonoïdes et Leucoanthocyanes	WILSTATER	-	-	-
		BATE-SMITH	+	+	+
Chloroformique	Stéroïdes	BURCHARD	+	+	-
	Triterpènes	LIEBERMANN	-	-	-
	Stérols insaturés	SALKOWSKI	-	-	-
Aqueux	Saponines	Test de mousse	-	-	-
	Tanins	Chlorure ferrique	+	+	+
		Gélatine	+	+	-
		Gélatine salée	+	+	+
	Anthraquinones	BORNTRÄGER	-	-	-
	Désoxyoses	KELLER-KILIANI	-	-	-
	Iridoïdes	HCl à chaud	-	-	-

+

Test positif

-

Test négatif

D'après ces résultats, les tanins, les leucoanthocyanes et les stéroïdes sont présents dans la poudre de feuilles. Les deux premiers sont présents dans l'extrait brut et dans E₃ tandis que les stéroïdes sont éliminés au cours des étapes de purification.

IV. DISCUSSION ET CONCLUSION

L'étude chimique réalisée sur les feuilles de *Schefflera longipedicellata* a permis d'apporter des informations sur les principes toxiques de cette plante malgache utilisée dans la médecine traditionnelle.

A l'issue des différents essais, la méthode d'extraction à chaud a été choisie pour les nombreux avantages qu'elle offre. Elle donne un extrait assez propre. L'extrait brut aqueux à chaud se montre le plus toxique avec le temps de survie le plus court après une injection par voie I.P. Le rendement en extrait brut est de 23,13 %.

Le protocole de purification établi comprenant le traitement par l'éthanol 50 %, le fractionnement par le n-butanol et la dialyse a permis l'obtention d'un extrait purifié à partir de l'extrait aqueux à chaud. Le rendement de purification est de 27,38 % tandis que le rendement en toxines est de 6,33 %.

Ces principes toxiques sont solubles dans l'eau, dans l'éthanol, insolubles dans le n-butanol, dans l'acétate d'éthyle, précipités par l'ANP, ce qui suggère qu'ils peuvent contenir dans leurs structures un groupement acide ou qu'ils ont un poids moléculaire élevé. Ils sont emprisonnés par la membrane à dialyse, ce qui peut être encore dû à leur poids moléculaire élevé à moins qu'ils n'interfèrent avec la membrane. Ils sont thermostables.

Le criblage phytochimique montre la présence de leucoanthocyanes, de tanins, de stéroïdes et d'autres structures phénoliques dans l'extrait brut. Par contre, dans E₃, le test pour la détection des stéroïdes est négatif. Ces molécules auraient donc été éliminées par les étapes de purification.

En résumé, les feuilles contiennent des principes actifs qui pourraient être des leucoanthocyanes ou des tanins.

Notons que la toxicité de l'extrait E₃ augmente après la purification de l'extrait aqueux à chaud.

ETUDE TOXICOLOGIQUE

I. INTRODUCTION

Au cours de l'étude chimique portant sur les feuilles de *Schefflera longipedicellata*, un extrait purifié (E3) a été obtenu à partir de l'extrait brut aqueux à chaud.

Des propriétés physico-chimiques des substances toxiques ont pu être déterminées.

Dans cette deuxième partie, nous avons testé EB et E₃ sur différents systèmes biologiques, c'est-à-dire sur des animaux, des végétaux et des microorganismes.

Ainsi : - sur les animaux, nous avons observé les effets des extraits ;

- sur les végétaux, nous avons analysé l'activité de ces substances sur la germination des graines ; sur la croissance des plantules et sur le développement des bourgeons axillaires ;

- sur les microorganismes, nous avons étudié leur sensibilité vis-à-vis des extraits.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. MATERIELS

II.1.1. LES ANIMAUX D'EXPERIMENTATION

II.1.1.1. LES ANIMAUX A SANG CHAUD : les souris

Les souris blanches *Mus musculus*, var. albinos, sont utilisées pour les expériences. Leur race a été stabilisée à l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) et elles sont élevées à l'animalerie du Département de Biochimie fondamentale et appliquée de la Faculté des Sciences. Elles sont âgées de trois semaines et pèsent en moyenne 23 ± 2 g.

II.1.1.2. LES ANIMAUX A SANG FROID

II.1.1.2.1. Les têtards

Les têtards utilisés pour le test ont été capturés dans les rizières de l'Etablissement supérieur des sciences agronomiques, à Ankatso, puis laissés s'adapter durant 24 h au laboratoire avant les tests. Appartenant à l'espèce *Ptychadena mascareniensis*, ce sont des têtards âgés d'une à deux semaines.

II.1.1.2.2. Les alevins

Les alevins appartiennent à l'espèce *Oreochromis niloticus* ou « Baraoa » en malgache. Ils proviennent de la Maison de petit élevage (MPE) de Nanisana, Antananarivo. Agés de 4 semaines, ils ont une longueur moyenne de 4,23 cm et un poids moyen de 2 g. Ces alevins sont laissés quelques jours dans un aquarium muni d'un aérateur à l'animalerie du Département de Biochimie fondamentale et appliquée, pour adaptation à leur nouvel habitat avant les tests.

II.1.1.3. LES INSECTES : les larves de moustique

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

II.1.2. LES VEGETAUX D'EXPERIMENTATION

Les échantillons utilisés pour les expériences sont des graines séchées, bien sélectionnées, conservées dans des emballages en aluminium bien scellés et mises en vente par AGRIVET Antananarivo. Ce sont des graines de Monocotylédones et de Dicotylédones dont les noms sont listés dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4 : Les végétaux d'expérimentation

CLASSE	FAMILLE	NOM SCIENTIFIQUE	NOM USUEL
DICOTYLEDONES	APIACEAE	<i>Daucus carotta</i>	Carotte
		<i>Petroselinum crispum</i>	Persil
	ASTERACEAE	<i>Lactuca sativa</i>	Laitue
	BRASSICACEAE	<i>Brassica chinensis</i>	Chou de Chine
		<i>Brassica oleracea</i>	Anantsonga
		<i>Brassica sp.</i>	Tissam blanc
	CUCURBITACEAE	<i>Cucumis sp.</i>	Concombre
		<i>Cucurbita pepo</i>	Courgette
	FABACEAE	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Haricot rouge
		<i>Pisum sativum</i>	Petit pois
	SOLANACEAE	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Tomate
MONOCOTYLEDONES	POACEAE	<i>Oryza sativa</i>	Riz
		<i>Zea mays</i>	Maïs

II.1.3. LES MICROORGANISMES

II.1.3.1. LES SOUCHES

Ce sont des souches déjà purifiées et identifiées, disponibles au laboratoire de Microbiologie du Département de Biochimie fondamentale et appliquée. Ce sont :

- des bactéries GRAM - : - *Escherichia coli*
 - *Salmonella typhi*
 - *Vibrio fischeri*
 - *Vibrio harveyi*
- des bactéries GRAM + : - *Staphylococcus aureus*

II.1.3.2. LES MILIEUX DE CULTURE

Au cours des manipulations, nous avons utilisé deux milieux de culture : le milieu de MUELLER-HINTON, de marque Liofilchem : un milieu solide employé pour l'étude de la sensibilité des microorganismes classiques tels que *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* et *Staphylococcus aureus*, et la MARINE AGAR de marque Difco : un milieu solide utilisé comme base servant à l'isolement, la culture et la numération des bactéries halophiles telles que *Vibrio harveyi* et *Vibrio fischeri*.

Leurs compositions sont données en annexe IV.

II.2. METHODES

II.2.1. METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES ANIMAUX

II.2.1.1. SUR LES ANIMAUX A SANG CHAUD

(BRUN, 1963 ; FABRE et TRUHAUT, 1965 ; COLOT, 1972 ; CHAN et coll., 1984)

II.2.1.1.1. Chez la souris

II.2.1.1.1.1. Estimation de la toxicité

Généralement, la toxicité d'un extrait est estimée par administration par voie intra-péritonéale (IP), d'un volume égal à 0,3 ml pour 25 g de souris. L'observation s'effectue pendant au moins 24 h. Deux lots homogènes comprenant chacun trois souris sont utilisés. Un des lots servant de témoin reçoit du sérum physiologique et l'autre lot est destiné au test. Les symptômes qui apparaissent pendant l'expérience sont tous notés.

II.2.1.1.1.2. Détermination de la DL₅₀ (24h)

La dose létale 50 % (24 h) ou (DL₅₀ (24 h)) est la dose nécessaire pour provoquer la mort de 50 % des souris testées au bout de 24 h. C'est une estimation de la toxicité aiguë. Exprimée en g par kg des animaux testés en 24 h, elle est comprise entre la dose maximale tolérée par les animaux (DL₀) et la dose la plus faible qui provoque 100 % de mortalité (DL₁₀₀).

Mode opératoire :

Cinq lots homogènes de cinq souris pesant 23 ± 2 g en moyenne sont utilisés. Les animaux reçoivent cinq doses (une dose pour chaque lot) qui suivent une progression géométrique de raison déterminée, et sont comprises entre la DL₀ et la DL₁₀₀. Un lot témoin reçoit du sérum physiologique.

La DL₅₀ est déterminée par la méthode de REED et MUENCH (1938) utilisant :

1. la méthode algébrique, donnée par la formule :

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

Où :

B = dose immédiatement inférieure à la DL₅₀

N = mortalité provoquée par la dose immédiatement inférieure à la DL₅₀ (en fraction décimale)

M = mortalité provoquée par la dose immédiatement supérieure à la DL₅₀ (en fraction décimale)

r = raison de la progression géométrique

2. la méthode graphique, qui consiste à déterminer la dose correspondant au point d'intersection de la courbe des totaux cumulatifs des animaux qui ont survécu et celle des animaux qui ont succombé.

II.2.1.2. SUR LES ANIMAUX A SANG FROID

II.2.1.2.1. Principe

Il est basé sur l'intoxication du milieu aquatique où les animaux à tester vivent et sur l'observation de leurs réactions vis-à-vis de la concentration de l'extrait à tester.

II.2.1.2.2. Mode opératoire

Les animaux à tester sont répartis en lots dans des cristallisoirs contenant 100ml d'eau de rizière. Chaque lot est mis en présence de l'extrait à tester de concentration déterminée. Les concentrations suivent une progression géométrique de raison r . Elles sont comprises entre la CL_0 (concentration la plus élevée tolérée par les animaux) et la CL_{100} (la concentration la plus faible qui tue tous les animaux).

La CL_{50} (24h) ou concentration qui cause 50 % de mortalité des animaux testés en 24 h est déterminée graphiquement (BOYD, 1966) en utilisant la régression linéaire de la relation :

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

Où C = concentration en $\mu\text{g/ml}$

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

$$y = a x + b$$

y = pourcentage de mortalité

x = logarithme décimal de la concentration ou $\log C$

a = constante

b = coefficient de régression.

II.2.1.2.2.1. Test sur les têtards

Les têtards sont répartis en cinq lots de cinq têtards, testés avec cinq concentrations en progression géométrique de raison r , déterminées d'après des tests préliminaires.

II.2.1.2.2.2. Test sur les alevins de Baraoa

Cinq lots de cinq alevins sont testés en utilisant des concentrations en progression géométrique de raison déterminée.

II.2.1.2.2.3. Test sur les larves de moustique (OMS, 1970)

Les larves sont réparties en quatre lots de cinq larves dans des cristallisoirs contenant chacun 100 ml d'eau de rizière. L'extrait à étudier, déjà préparé à différentes concentrations

en progression géométrique de raison r , comprises entre la CL_{100} et la CL_0 , est versé dans les cristallisoirs. Le test dure 24 h.

Le calcul du pourcentage de mortalité à chaque concentration tient compte du nombre des larves moribondes (larves incapables de plonger ou de monter à la surface quand on agite l'eau) et des larves mortes (larves qui ne bougent plus même si on touche la région cervicale).

II.2.2. METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES VEGETAUX

II.2.2.1. EXPERIENCE SUR LE POUVOIR GERMINATIF

II.2.2.1.1. Principe

Les graines de différentes plantes (Monocotylédones et Dicotylédones) sont arrosées avec l'extrait à étudier de concentration connue pour observer l'effet sur leur pouvoir germinatif.

II.2.2.1.2. Mode opératoire

Treize espèces de plantes Monocotylédones et Dicotylédones sont utilisées (voir paragraphe II.1.2, p. 28). Deux lots de dix graines sont nécessaires pour chaque espèce. Un des lots sert de témoin et l'autre lot est testé.

Un trempage des graines dans de l'eau de javel 10% pendant 5 min, suivi d'un rinçage à l'eau permet de les désinfecter. Les graines sont ensuite trempées dans de l'eau pendant 48 h à 30°C et à l'obscurité.

Les lots de graines à tester sont tous transférés sur un même plateau (pour avoir les mêmes conditions d'expérimentation), couvert d'une couche de coton imbibée d'extrait à étudier. Les lots témoin sont aussi rassemblés sur un plateau sur une couche de coton humidifiée avec de l'eau.

Les deux plateaux sont placés à l'obscurité. L'observation accompagnée du dénombrement des graines ayant germé est effectuée au bout de 72 h.

II.2.2.2. EXPERIENCE SUR LA CROISSANCE DES PLANTULES

II.2.2.2.1. Principe

Les semences de Monocotylédones et de Dicotylédones sont arrosées avec l'extrait à tester de concentration variable pour observer son effet sur la croissance des plantules.

II.2.2.2.2. Mode opératoire

Un représentant des Monocotylédones et un représentant des Dicotylédones sont utilisés pour l'expérience. Huit lots de dix graines sont nécessaires pour chaque espèce.

II.2.2.2.2.1. Trempage

Un premier groupe composé de deux lots est trempé dans l'extrait à tester de concentration déterminée. Un deuxième groupe constitué des six lots restants est trempé dans de l'eau. Le trempage s'effectue à 30°C, à l'obscurité et pendant 48 h.

II.2.2.2.2.2. Germination

Après chaque trempage, les graines sont lavées à l'eau.

Pour le premier groupe, un lot est transféré sur une boîte de Petri dont l'intérieur est couvert d'une couche de coton humidifiée avec l'extrait de trempage et arrosé avec ce même extrait. L'autre lot est transféré sur une boîte de Petri et arrosé avec de l'eau.

Pour le deuxième groupe, cinq parmi les six lots sont mis à germer dans des boîtes de Petri différentes, puis arrosés avec des extraits à étudier à différentes concentrations. Le lot restant est arrosé avec de l'eau.

Notons que la germination s'opère à l'obscurité, pendant 72 h. La mesure des hypocotyles et épicotyles s'effectue tous les deux jours pendant deux semaines.

II.2.2.3. EXPERIENCE SUR LES BOURGEONS AXILLAIRES

II.2.2.3.1. Principe

Sur une partie excisée de la tige, les extraits à étudier sont appliqués pour observer leurs effets sur le développement des bourgeons axillaires, comparés à ceux d'hormones végétales (gibbérelline comme témoin positif et auxine comme témoin négatif) (DAVID, 1952 ; HELLER et coll., 1995).

II.2.2.3.2. Mode opératoire

Un lot renfermant cinq jeunes plantules de petits pois (*Pisum sativum*) de dix jours est utilisé. Les jeunes plantules sont coupées juste au-dessus du deuxième bourgeon axillaire. 1 µl d'extrait à tester ou d'hormone de croissance préalablement mélangé avec de la lanoline est ensuite déposé sur la partie sectionnée. Une plantule servant de témoin est traitée avec de la lanoline pure.

Cette expérience est réalisée en double. L'observation, accompagnée de la mesure des bourgeons axillaires s'effectue tous les deux jours et dure deux semaines.

II.2.3. METHODES D'ETUDE SUR LES MICROORGANISMES

II.2.3.1. TESTS DE SENSIBILITE DES MICROORGANISMES

(LECLERC, 1983 ; SIMONET, 1991 ; BILLE, 1998)

II.2.3.1.1. Principe

L'activité antimicrobienne *in vitro* de l'extrait à étudier est mise en évidence à l'aide de la méthode des disques. Elle repose sur la mesure du diamètre de la zone d'inhibition ou halo d'inhibition de la croissance microbienne autour du disque sur lequel une substance active a été déposée.

Les résultats sont interprétés par référence aux normes utilisées par l'IPM, récapitulées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Norme de lecture des résultats d'un antibiogramme

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

II.2.3.1.2. Mode opératoire

II.2.3.1.2.1. Stérilisation

Pour éviter toute contamination, il est nécessaire de stériliser les matériels. La verrerie, les milieux de culture, l'eau physiologique, les disques sont stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 20 min. La paillasse de travail et les mains du manipulateur sont nettoyées préalablement à l'alcool. Les manipulations sont effectuées entre deux flammes de bec Bunsen.

II.2.3.1.2.2. Test

A partir des tubes de conservation, les souches sont mises en culture sur des boîtes de Petri (milieu de MUELLER-HINTON pour *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*,

Staphylococcus aureus et MARINE AGAR pour *Vibrio fischeri* et *Vibrio harveyi*) suivant la méthode des quadrants. Les colonies sont ensuite prélevées après une incubation de 24 h avec une anse stérile, mises en suspension dans de l'eau physiologique jusqu'à avoir une densité optique (DO) égale à 0,125 à une longueur d'onde (λ) égale à 550 nm (DO équivalent à 10^6 bactéries/ml).

La suspension bactérienne est versée dans des boîtes de Petri renfermant un milieu gélosé solide approprié. L'excès de suspension est aspiré.

Les disques vierges sont par la suite déposés à la surface du milieu déjà ensemencé. Ils sont ensuite imbibés avec 10 μ l d'extrait préalablement filtré sur filtre Millipore stérile (PolyLabo) (diamètre de pores égal à 0,22 μ m).

L'incubation s'effectue à 25°C pendant 72 h pour *Vibrio fischeri* et *Vibrio harveyi* et à 37°C pendant 48 h pour *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* et *Staphylococcus aureus* dans un incubateur bactériologique (STABILTHERM, 77EB1).

II.2.3.2. DETERMINATION DE LA CMI

(BUTTIAUX et coll., 1974 ; MEYER et coll., 1984 ; KAMAGATE et coll., 2001 ; AMHIS, 2003)

La CMI ou concentration minimale inhibitrice est la plus faible concentration d'une solution qui inhibe totalement la prolifération d'une souche microbienne. C'est un moyen d'apprécier la sensibilité des souches microbiennes vis-à-vis des extraits à tester.

La CMI est déterminée par la méthode de diffusion sur disque d'antibiogramme en milieu solide. C'est la plus faible concentration d'extrait à tester qui donne un halo de 7 à 8 mm de diamètre. Les extraits à tester sont préparés par dilution en cascade d'une solution mère. La suite de la manipulation est la même que celle décrite dans le paragraphe II.2.3.1.2 (p. 34).

III. RESULTATS

La toxicité de l'extrait brut (EB) et de l'extrait purifié (E_3) a été estimée en observant leurs effets sur différents systèmes biologiques. Pour les expériences exigeant une quantité abondante d'extrait, nous avons eu recours à EB. Par contre, E_3 a été utilisé pour les expériences ne nécessitant qu'une quantité faible d'extrait.

III.1. EFFETS DE L'EXTRAIT BRUT SUR LES ANIMAUX

III.1.1.SUR LES ANIMAUX A SANG CHAUD

III.1.1.1. SUR SOURIS

L'EB a été testé sur souris par injection par voie IP (voir paragraphe II.2.1.1.1.1 p. 29)

III.1.1.1.1. Description des symptômes d'intoxication

Après l'administration d'une dose létale de 2,78 g/kg chez l'animal, les symptômes suivants sont apparus :

- immédiatement après l'injection, une contorsion abdominale est observée, accompagnée d'une augmentation de la fréquence respiratoire qui passe de 90 à 150/min.
- après 10 min, une difficulté de locomotion apparaît. Les souris traînent leurs pattes postérieures ;
- au bout de 20 min, elles deviennent de plus en plus passives et se pelotonnent dans un coin de la cage en montrant une enophtalmie et une piloérection ;
- la mort survient au bout de 4 à 5 h, devancée d'une immobilité et d'un ralentissement progressif du rythme respiratoire.

L'administration d'une dose sublétales de 1,64 g/kg provoque quelques-uns des symptômes énoncés au-dessus tels que l'augmentation de la fréquence respiratoire, l'hypoactivité. Puis, les souris redeviennent progressivement actives au bout de 24 h.

III.1.1.1.2. Détermination de la DL₅₀ (24h)

En utilisant la méthode décrite au paragraphe II.2.1.1.1.2. (p. 30), six doses en progression géométrique de raison 1,163 en partant de 1,03 g/kg ont été utilisées chez des souris pesant en moyenne 23 g. Les résultats sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Résultats expérimentaux de la détermination de la DL₅₀ (24h) sur souris

Dose en g/kg de souris	Nombre de décès après											Nombre de souris		Mortalité (%)
	5h	6h	7h	8h	9h	10h	12h	15h	18h	21h	24h	mortes	vivantes	
1,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
1,20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4	20
1,39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	4	20
1,69	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	3	2	60
1,88	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	3	1	60
2,19	1	0	2	0	0	0	0	1	0	1	0	5	0	100

D'après la formule de REED et MUENCH (1938), l'équation permettant de calculer la DL₅₀ (24h) s'écrit :

$$\log DL_{50} = \log 1,39 + \frac{(0,5 - 0,2)}{(0,6 - 0,2)} \log 1,163$$

La DL₅₀ (24h) est de l'ordre de **1,56 g/kg**.

Les valeurs des totaux cumulatifs permettant de déterminer la DL₅₀ (24h) par la méthode graphique sont récapitulées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Totaux cumulatifs des souris vivantes et des souris mortes

Dose en g/kg de souris	Nombre de souris			Totaux cumulatifs des souris	
	testées	mortes	vivantes	mortes	vivantes
1,03	5	0	5	0	17
1,20	5	1	4	1	12
1,39	5	1	4	2	8
1,69	5	3	2	5	4
1,88	5	3	2	8	2
2,19	5	5	0	13	0

La figure 5 montre l'obtention de la DL₅₀ (24 h) par projection de l'intersection de la courbe des totaux cumulatifs des vivantes et des mortes.

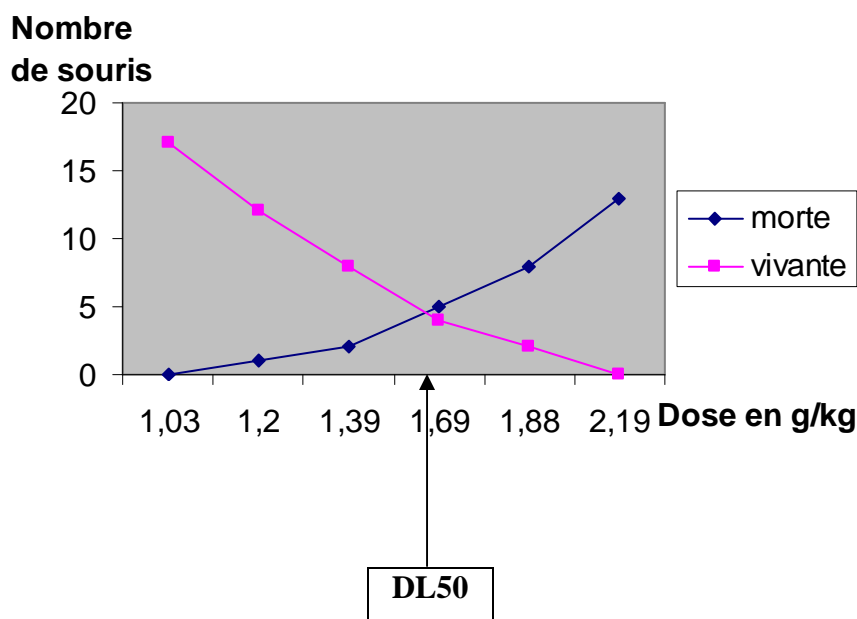


Figure 5 : Détermination graphique de la DL_{50} (24h)

D'après la représentation graphique, la DL_{50} (24h) est de l'ordre de **1,54 g/kg**.

III.1.2.SUR LES ANIMAUX A SANG FROID

III.1.2.1. SUR LES TÊTARDS

Les tests ont été effectués d'après la méthode décrite au paragraphe II.2.1.2.2.1, (p. 31). Sept concentrations de EB formant une progression géométrique de raison 1,12, allant de 0,35 mg/ml à 0,70 mg/ml ont été testées sur sept lots de cinq têtards.

Les résultats sont affichés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Résultats expérimentaux des tests effectués sur les têtards de grenouille

Nº lot	Concentration EB (mg/ml)	log C	Nombre de morts	Nombre de vivants	Mortalité (%)
1	0,35	2,55	0	5	0
2	0,40	2,60	5	0	100
3	0,44	2,65	5	0	100
4	0,50	2,70	5	0	100
5	0,56	2,75	5	0	100
6	0,63	2,80	5	0	100
7	0,70	2,85	5	0	100

L'EB est toxique sur les têtards mais à cause de l'étroite différence entre la CL_0 (0,35 mg/ml) et la CL_{100} (0,40 mg/ml), il est impossible d'affiner les doses pour trouver la CL_{50} . La toxicité sur têtard semble obéir à la **loi du tout ou rien**.

III.1.2.2. SUR LES ALEVINS DE POISSONS

Cinq concentrations de EB en progression géométrique de raison égale à 1,12 en partant de 0,25 mg/ml (CL_{100} chez les têtards) sont utilisées (Voir méthode au paragraphe II-2-1-2-2-2, p. 31).

Les résultats sont groupés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Résultats expérimentaux des tests effectués sur les alevins de poissons

N° lot	Concentration de EB (mg/ml)	Nombre de morts	Nombre de vivants	Mortalité (%)
1	0,25	5	0	100
2	0,28	5	0	100
3	0,32	5	0	100
4	0,35	5	0	100
5	0,40	5	0	100

D'après ces résultats, EB est toxique pour les alevins de « Baraoa » à la concentration de 0,25 mg/ml, largement inférieure à celle qui tue les têtards. Ce qui présente un faible intérêt pour continuer les tests.

III.1.3.SUR LES LARVES DE MOUSTIQUE

Les expériences ont été effectuées selon la méthode décrite dans le paragraphe II-2-1-2-2-3, (p. 32). Six concentrations de EB en progression géométrique de raison 1,176 en partant de 1 mg/ml (CL_0) ont été employées.

Les résultats sont présentés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Résultats des expériences sur les larves de moustique

N° lot	Concentration EB (mg/ml)	log C	Nombre de mortes	Nombre de vivantes	Mortalité (%)
1	1	0	0	5	0
2	1,18	0,07	1	4	20
3	1,38	0,14	2	3	40
4	1,63	0,21	3	2	60
5	1,91	0,28	3	2	60
6	2,25	0,35	5	0	100

C = concentration de l'extrait brut

EB est toxique sur les larves de moustique. La toxicité de l'extrait est proportionnelle à la concentration.

La droite de régression linéaire a donc comme équation :

$$Y = 72,84 x - 66,83$$

Le coefficient de corrélation est de 0,97.

D'où, CL_{50} est égale à **1,60 mg/ml**

III.2. EFFETS DES EXTRAITS SUR LES VEGETAUX

III.2.1.SUR LE POUVOIR GERMINATIF DES GRAINES

L'évaluation des effets de EB à 1 mg/ml sur le pouvoir germinatif de graines (voir paragraphe II-1-2, p. 28) est effectuée selon la méthode décrite auparavant au paragraphe II-2-2-1 (p. 32).

Les résultats sont affichés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Effets de l'extrait brut à 1 mg/ml sur le pouvoir germinatif des graines

FAMILLE	NOM SCIENTIFIQUE	NOM USUEL	GERMINATION (%)	INHIBITION (%)
APIACEAE	<i>Daucus carotta</i>	Carotte	80	20
	<i>Petroselinum crispum</i>	Persil	20	80
ASTERACEAE	<i>Lactuca sativa</i>	Laitue	80	20
BRASSICACEAE	<i>Brassica chinensis</i>	Chou de Chine	90	10
	<i>Brassica oleracea</i>	Anantsonga	80	20
	<i>Brassica sp.</i>	Tissam blanc	40	60
CUCURBITACEAE	<i>Cucumis sp.</i>	Concombre	10	90
	<i>Cucurbita pepo</i>	Courgette	80	20
FABACEAE	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Haricot rouge	0	100
	<i>Pisum sativum</i>	Petit pois	10	90
SOLANACEAE	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Tomate	30	70
POACEAE	<i>Oryza sativa</i>	Riz	100	0
	<i>Zea mays</i>	Maïs	80	20

EB à la concentration de 1mg/ml inhibe la germination de la majorité des graines. En effet, une forte inhibition affecte les graines de tomate, persil, concombre, petit pois, *tissam* blanc et haricot rouge, avec un pourcentage allant de 60 % à 100 %.

Une faible inhibition de la germination (taux de 20 %) est observée chez les graines de carotte, laitue, *anantsonga*, courgette et maïs.

L'inhibition est de 10 % seulement pour les graines de chou de Chine et les graines de riz ne sont pas affectées par EB à 1mg/ml.

III.2.2.SUR LA CROISSANCE DES JEUNES PLANTULES

Pour les expériences, nous avons choisi les graines de riz (*Oryza sativa*) pour vérifier si l'absence d'inhibition n'est qu'une question de dose. Par contre, pour le haricot rouge

(*Phaseolus vulgaris*), l'objectif est d'approfondir l'étude de l'inhibition à 100% provoquée par l'extrait brut à 1 mg/ml sur la germination de ces graines (voir paragraphe III.2.1, p. 40).

Les expériences ont été effectuées selon la méthode décrite dans le paragraphe II-2-2-2, (p. 33).

Les étapes des tests sont récapitulées sur la figure 6 ci-dessous.

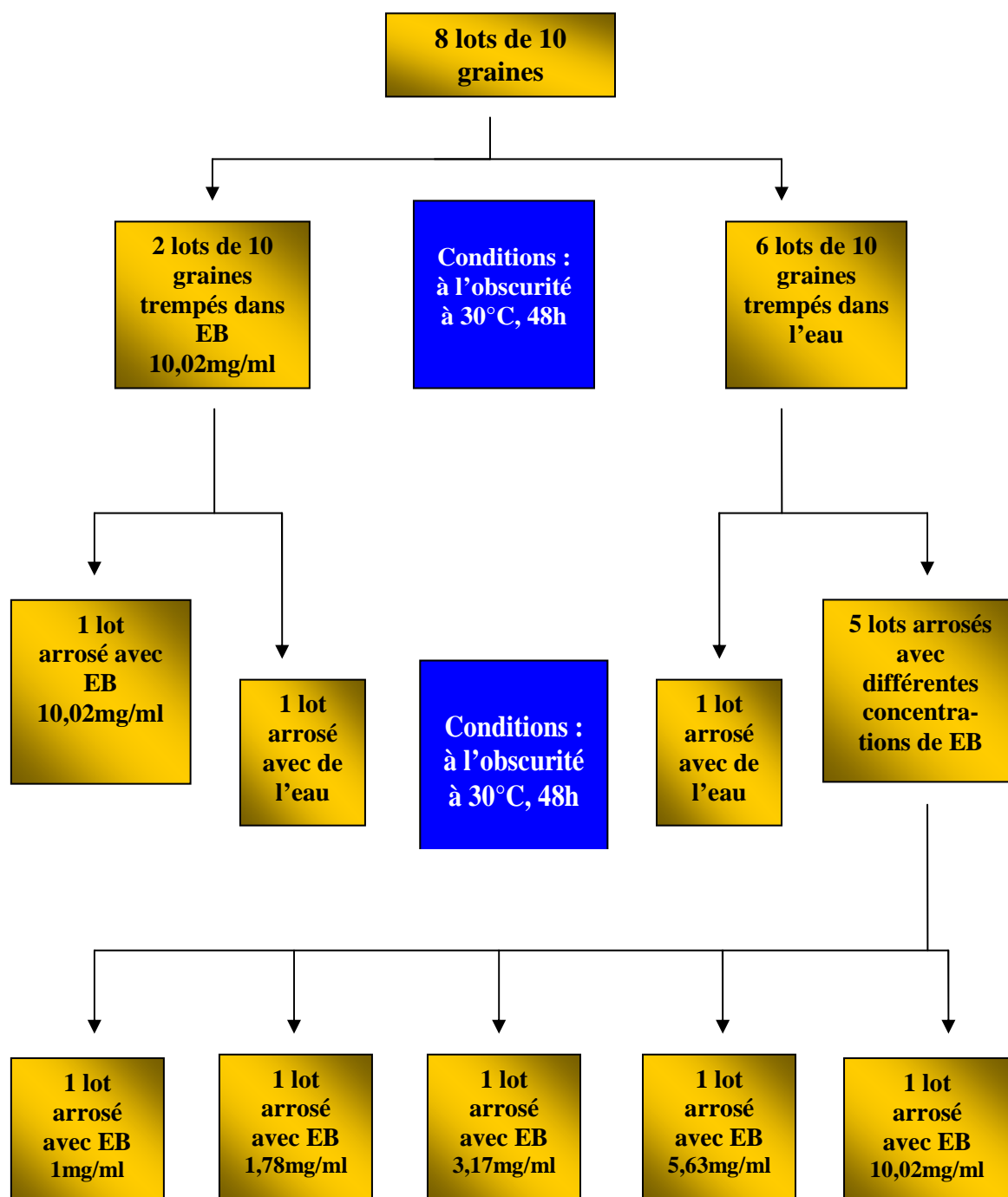


Figure 6 : Résumé de l'expérience sur la croissance des jeunes plantules

L'évolution de la longueur des épicotyles et hypocotyles de riz et de haricot rouge est montrée sur les figures 7 à 14.

Pour les graines de riz, les épicotyles du lot trempé dans EB 10,02 mg/ml puis arrosé avec de l'eau poussent rapidement et se développent assez bien comparé au lot témoin (lot trempé et arrosé avec de l'eau), tandis que la croissance des hypocotyles est inhibée.

Par contre, si EB à la même concentration est utilisée pour l'arrosage des graines trempées dans l'eau, la croissance des plantules (épicotyles et hypocotyles) est totalement inhibée (voir figure 7, 8).

De même, le trempage dans EB 10, 02 mg/ml et l'arrosage avec le même extrait ont un effet inhibiteur.

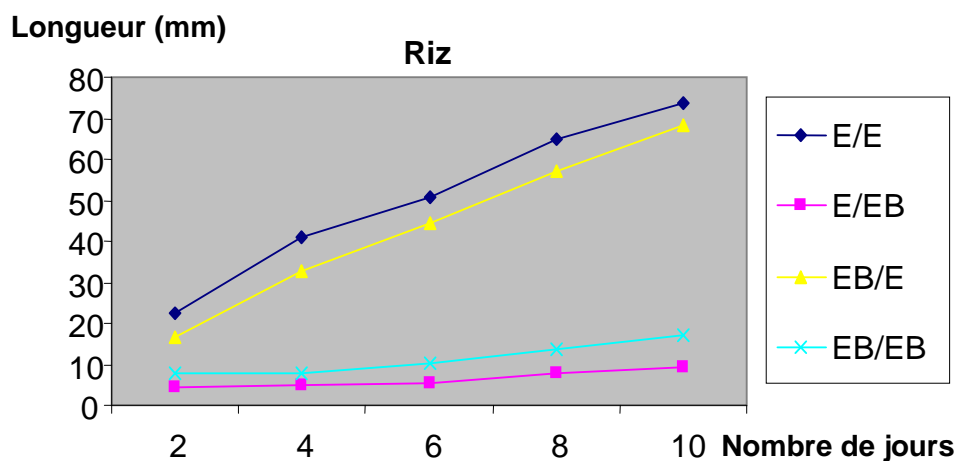


Figure 7 : Croissance des épicotyles de riz en fonction du trempage

E/E : lot trempé dans l'eau puis arrosé avec l'eau (témoin)

E/EB : lot trempé dans l'eau puis arrosé avec EB 10,02 mg/ml

EB/E : lot trempé dans EB10,02 mg/ml puis arrosé avec de l'eau

EB/EB : lot trempé dans EB 10,02 mg/ml puis arrosé avec ce même extrait

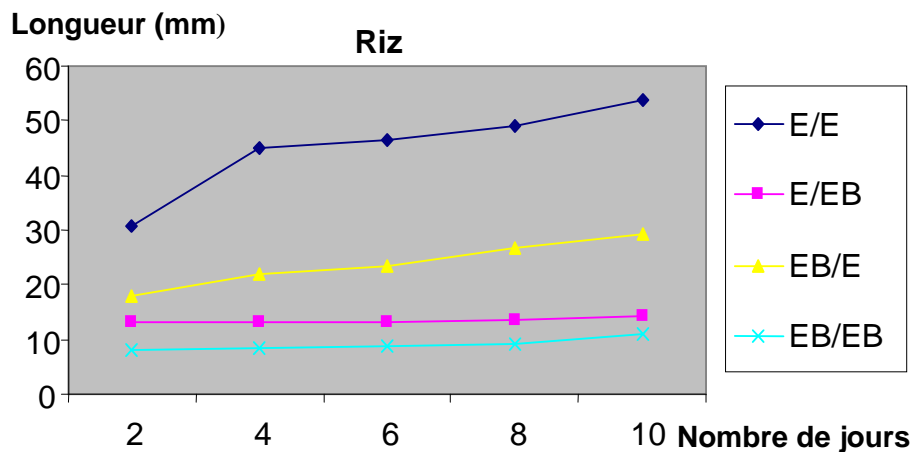


Figure 8 : Croissance des hypocotyles de riz en fonction du trempage

E/E : lot trempé dans l'eau puis arrosé avec l'eau (témoin)

E/EB : lot trempé dans l'eau puis arrosé avec EB 10,02 mg/ml

EB/E : lot trempé dans EB 10,02 mg/ml puis arrosé avec de l'eau

EB/EB : lot trempé dans EB 10,02 mg/ml puis arrosé avec ce même extrait

Pour le haricot, si le trempage des graines dans EB 10,02 mg/ml suivi de l'arrosage à l'eau est bénéfique pour la croissance, l'inverse (trempage dans l'eau et arrosage avec EB 10,02 mg/ml) l'inhibe totalement.

En outre, un retard de croissance accompagné d'un développement lent des epicotyles par rapport au témoin est observé en utilisant EB 10,02 mg/ml pour le trempage et l'arrosage. Ce même procédé n'affecte pas beaucoup la croissance des hypocotyles (voir figures 9,10).

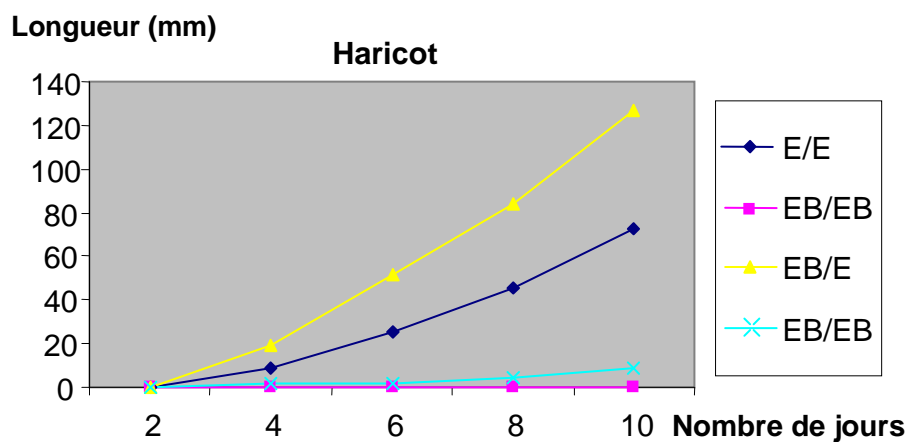


Figure9 : Croissance des epicotyles de haricot en fonction du trempage

E/E : lot trempé dans l'eau puis arrosé avec l'eau (témoin)

E/EB : lot trempé dans l'eau mais arrosé avec EB à 10,02 mg/ml

EB/E : lot trempé dans EB 10,02 mg/ml mais arrosé avec l'eau

EB/EB : lot trempé dans EB 10,02 mg/ml puis arrosé avec ce même extrait

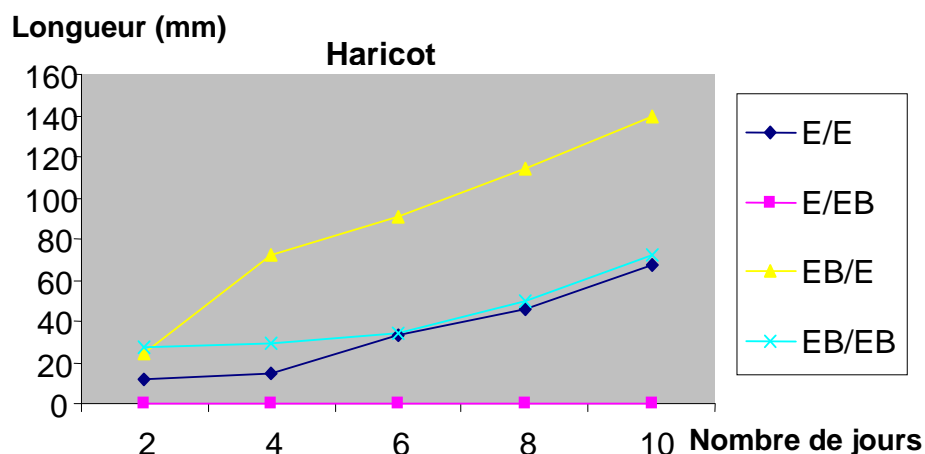


Figure 10 : Croissance des hypocotyles de haricot en fonction du trempage

E/E : lot trempé dans l'eau puis arrosé avec l'eau (témoin)

E/EB : lot trempé dans l'eau mais arrosé avec EB 10,02mg/ml

EB/E : lot trempé dans EB 10,02 mg/ml mais arrosé avec de l'eau

EB/EB : lot trempé dans EB 10,02 mg/ml puis arrosé avec ce même extrait

Concernant les lots trempés dans l'eau puis arrosés avec les différentes concentrations de EB, il y a inhibition de la croissance des plantules.

Pour le riz, cette inhibition est fonction de la concentration. Il existe donc un phénomène d'**effet-dose** (voir figures 11 et 12).

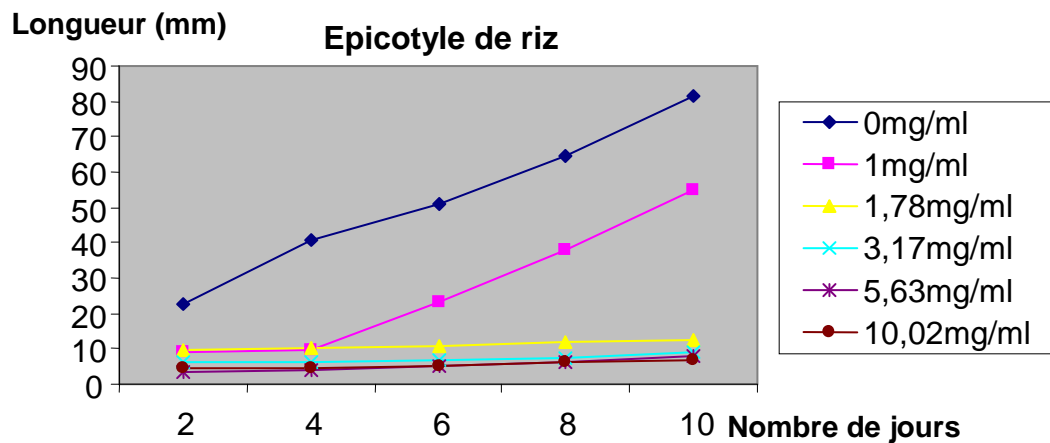


Figure 11 : Effets de l'extrait brut à différentes concentrations sur la croissance des épicotyles de riz

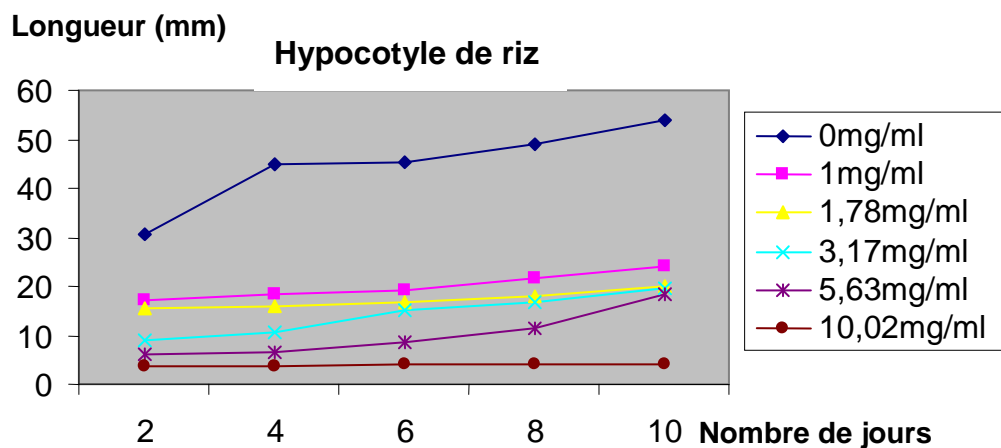


Figure 12 : Effets de l'extrait brut à différentes concentrations sur la croissance des hypocotyles de riz

Pour le haricot, il y a stimulation de la croissance des jeunes plantules pour les concentrations 1,78 mg/ml (épicotyles) ; 1,78 mg/ml et 3,17 mg/ml (hypocotyles).

Par ailleurs, une inhibition de la croissance des épicotyles s'installe sous l'effet d'une concentration de EB égale à 3,17 mg/ml. Au-delà de cette concentration, la croissance est totalement inhibée. Pour les hypocotyles, la croissance est inhibée par les solutions les plus concentrées (voir figures 13, 14).

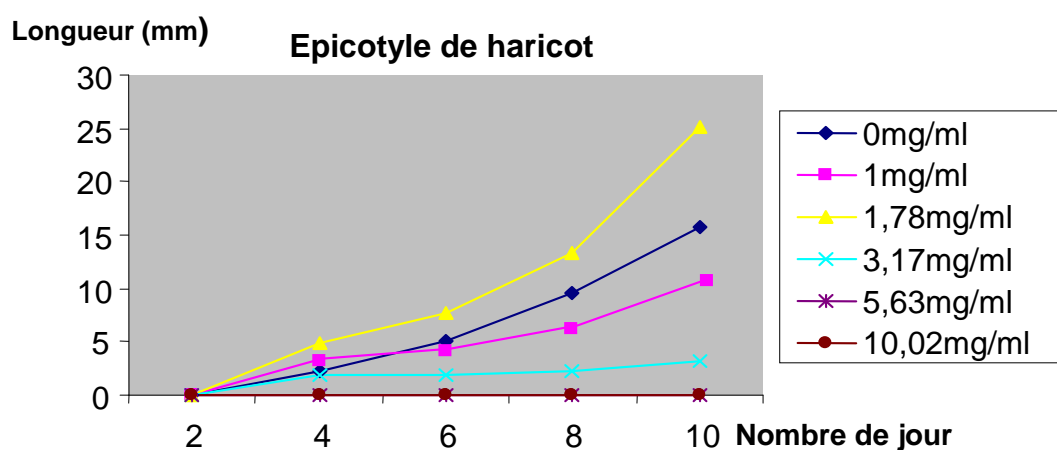


Figure 13: Effets de l'extrait brut à différentes concentrations sur la croissance des épicotyles de haricot

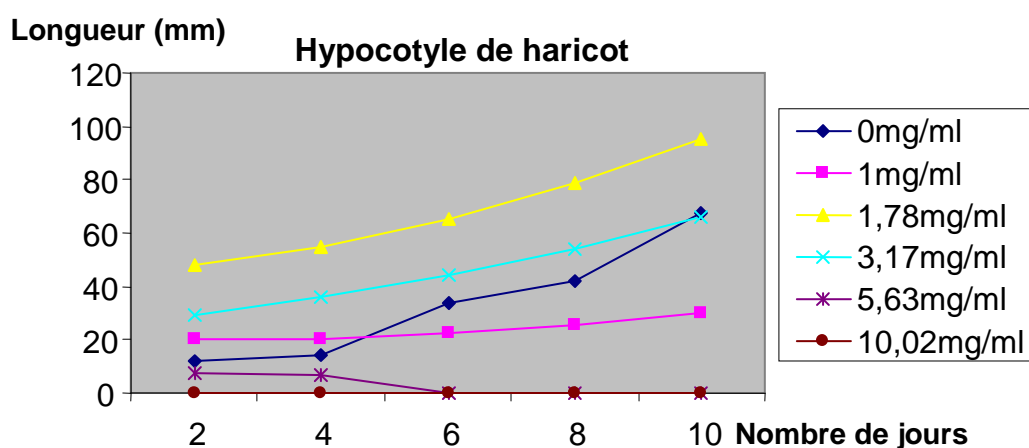


Figure 14 : Effets de l'extrait brut à différentes concentrations sur la croissance des hypocotyles de haricot

III.2.3.SUR LE DEVELOPPEMENT DES BOURGEONS AXILLAIRES

Les tests ont été effectués suivant la méthode décrite dans le paragraphe II.2.2.3, (p. 33).

Les extraits utilisés sont : EB, E₃, les hormones de croissance (gibbéréline comme témoin positif et auxine comme témoin négatif). La quantité déposée est de 50 µg/µl pour chaque extrait.

D'après les résultats présentés sur la figure 15, EB n'exerce pas d'effet apparent sur la croissance du bourgeon axillaire. La longueur de celui-ci est à peu près la même que celle du témoin. Par contre, avec E₃, la longueur du bourgeon axillaire dépasse celle du témoin neutre, et elle est même similaire à celle du témoin positif.

Longueur (mm)

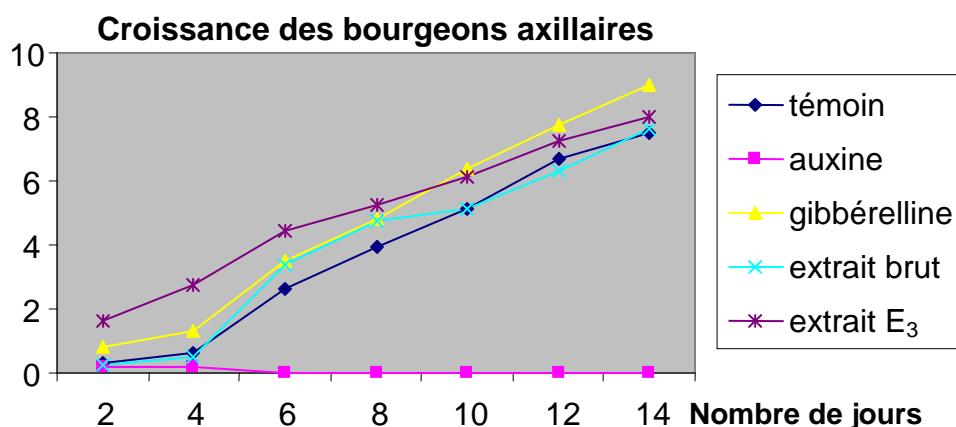


Figure 15 : Effet des différentes substances sur la croissance des bourgeons axillaires

III.3. EFFETS SUR LES MICROORGANISMES

Les effets de EB de concentration 231,25 mg/ml (concentration initiale) sur les microorganismes ont été testés selon la méthode décrite dans le paragraphe II.2.3, (p. 34).

Le tableau 12 montre pour les souches utilisées leurs caractéristiques et leur sensibilité envers EB.

D'après ce tableau, les germes microbiens utilisés sont insensibles à EB à la concentration testée.

Tableau 12 : Effets de EB à 231,25 mg/ml sur les souches microbiennes

Type	Forme	Nom des souches	Diamètre des halos (mm)	Sensibilité
Gram -	Bacille	<i>Escherichia coli</i>	6	-
		<i>Salmonella typhi</i>	6	-
	Vibrion	<i>Vibrio harveyi</i>	6	-
		<i>Vibrio fischeri</i>	6	-
Gram +	Coque	<i>Staphylococcus aureus</i>	6	-

IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les expériences réalisées sur divers organismes ont permis de connaître certaines propriétés biologiques de l'extrait brut (EB) et de l'extrait purifié (E₃).

EB est toxique pour la souris. Plusieurs symptômes confirmant cette propriété ont été révélés, dont principalement la contorsion abdominale, l'augmentation de la fréquence respiratoire, le traînement des pattes postérieures, l'enophtalmie et la piloérection. L'apparition d'une piloérection pourrait être due à une atteinte du système nerveux autonome, tandis que le traînement des pattes accompagné d'une hypoactivité suggèrent une défaillance au niveau du système nerveux central. En outre, l'augmentation de la fréquence respiratoire pourrait être due à un effet au niveau du système cardiovasculaire et du système respiratoire et/ou nerveux. Tous ces symptômes conduisent à la mort de l'animal.

La DL₅₀ (24h) sur souris est estimée entre 1,54 et 1,56 g/kg.

Comparé aux toxines déjà étudiées au LABASM, notre extrait est moins toxique que celui de graines de *Albizia tullearensis* qui est très toxique car il a une DL₅₀ comprise entre 2,9 mg/kg et 3,6 mg/kg (RAONIHARISOA, 2003). Mais il est plus toxique que l'extrait de tubercules de *Dioscorea antaly* (DL₅₀ comprise entre 2,88 g/kg et 2,93 g/kg) (RANDRIAMAMONJY, 2005).

Ces différentes valeurs de DL₅₀ permettent de classer l'extrait de feuilles de *Schefflera longipedicellata* parmi les substances les moins toxiques car elles sont 60 fois supérieures à la valeur de la toxicité aiguë, estimée à 25 mg/kg (RAMADE, 1979). Ceci confirme que

l'utilisation des feuilles de cette plante comme antidote pour guérir les empoisonnements par les venins d'insectes, d'arthropodes (scorpions, araignées...) ou de serpents est sans risque.

EB est aussi toxique pour les têtards avec une CL_{100} de 0,40 mg/ml. La CL_{50} n'a pu être calculée car la toxicité de EB sur les têtards semble obéir à **la loi du tout ou rien**.

Il est également toxique pour les alevins de Tilapia. La concentration de 0,25 mg/ml tue tous les poissons testés.

L'utilisation de EB pour tuer les têtards qui, sur le plan nutritionnel, sont en concurrence avec les alevins en rizipisciculture, est donc impossible. En effet, les alevins sont très sensibles à EB.

EB est toxique pour les larves de moustique avec une CL_{100} 2,25 mg/ml. La CL_{50} est estimée à 1,60 mg/ml.

L'extrait brut peut donc être utilisé comme larvicide dans les nappes d'eau, excepté celles où on pratique la pisciculture.

Concernant les expériences sur les végétaux, EB à 1mg/ml provoque un effet inhibiteur sur la germination de diverses graines. Cette inhibition varie suivant les espèces utilisées et même selon les familles. Cette variabilité de l'inhibition peut être due non seulement à l'effet de l'extrait mais elle peut aussi être liée à la différence de physiologie des espèces.

Le trempage dans EB 10,02 mg/ml accélère le réveil des graines de riz et de haricot rouge de leur état de dormance. Ceci peut être dû à l'effet de molécules présentes dans l'extrait, différentes des principes inhibiteurs.

L'utilisation de EB pour l'arrosage inhibe la croissance des plantules de riz et de haricot blanc. Ceci peut être dû à la destruction de l'embryon ou à l'inactivation des enzymes intervenant dans l'utilisation des substances de réserve contenues dans les cotylédons (RASOATAHINA, 2005).

Chez le riz, un phénomène d'**effet-dose** est constaté en utilisant les différentes concentrations de EB.

Chez le haricot, au delà de 3,17 mg/ml, l'inhibition est proportionnelle à la concentration de EB. Par contre, la concentration de 1,78 mg/ml stimule le développement des plantules. EB pourrait donc être utilisé comme herbicide mais à forte concentration.

L'extrait purifié (E_3) stimule le développement du bourgeon axillaire. Ceci peut être dû à la présence de substances de croissance dans l'extrait ou à un effet de synergie entre les principes actifs et les autres substances (MAYER and POLJAKOFF-MAYBER, 1963). EB

231,25 mg/ml n'a pas d'effet notable sur la croissance des bourgeons axillaires. Ceci peut être dû au masquage des substances de croissance par les contaminants.

Sur les microorganismes testés, EB n'a pas montré d'activité à la concentration utilisée.

La faible toxicité de l'extrait de feuilles de *Schefflera longipedicellata* confirme qu'on peut utiliser cette plante à des fins thérapeutiques. A cet effet, il serait intéressant d'approfondir l'activité antidote de la plante.

CONCLUSION et PERSPECTIVES



Bien que les études effectuées sur les feuilles de *Schefflera longipedicellata* (ARALIACEAE) ne soient que préliminaires, elles nous ont permis au terme de ce travail de :

- mettre en évidence la toxicité des extraits de feuille ;
- obtenir des renseignements sur les propriétés physico-chimiques des principes toxiques et leur nature ;
- obtenir un extrait suffisamment purifié ;
- observer les effets des extraits (EB et E₃) sur des organismes animaux, végétaux et microbiens.

Les résultats obtenus au cours de ce travail permettent de nombreuses orientations à partir des feuilles de cette plante.

A l'avenir, nous nous proposons :

- d'approfondir nos connaissances sur les effets des principes existants et leurs propriétés biologiques.
- d'étudier les relations entre ces propriétés et l'utilisation thérapeutique de la plante ;
- d'exploiter les activités larvicides et herbicides de l'extrait pour éviter ou diminuer au moins l'utilisation des produits chimiques dans ces domaines ;
- d'élucider le mécanisme d'action des substances actives des feuilles ;
- de tester les autres organes de la plante.

REFERENCES



BIBLIOGRAPHIQUES

AUBREVILLE A. 164^{ème} famille - Sapotaceae. Notes sup. Afr équa.: Not syst., 16 (3-4)1974 ; pp. 223-227.

AUDIGIE C., DUPONT G., ZONZAIN F. Principes des méthodes d'analyses biochimiques. Paris : Doin éditeur, 1989 ; 190 p.

BALANSARD J. et BERNARD P. Notes pratiques de chimie végétale. *Med trop*, n°6 Nov-Dec 1950 ; pp. 10-38.

BILLE J. Examen microbiologique et monitoring du traitement.

In: **SCHORDERET M.** Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. 3^{ème} Ed. Paris: FRISON-ROCHE, 1998 ; pp. 725-728.

BOREL J. et RANDOUX A. Méthodes chromatographiques.

In: **KAMOUN P.** Appareils et méthodes en biochimie. 3^{ème} Ed. Paris Médecine-Sciences FLAMMARION, 1987 ; pp. 129-192.

BOST R. Pharmacopée malgache. Mém. Int. Sci Madagascar, 1961 ; 159-234.

BOYD. Fundamentals of immunology, 4^{ème} Ed. New York : Wiley and Sons, 1966 ; 503 p.

BRUN P. Le problème des conservateurs alimentaires. Aspects biologiques et analytiques.

In: **GAUTIER J. A., MALANGEAU P.** Mise au point de chimie analytique pharmaceutique et bromatologique. 11^{ème} Série. Paris : Masson & Cie, 1963 ; pp. 63-187.

BRUNETON J. Eléments de phytochimie et de pharmacognosie. Paris : Technique et documentation Lavoisier, 1987 ; 585 p.

BRUNETON J. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. 2^{ème} Ed. Paris; Tech & Doc Lavoisier, 1993 ; 915 p.

BUTTIAUX R., BEERENS H., TACQUET A. Manuel de techniques bactériologiques. 4^{ème} Ed. Paris : Flammarion, 1974 ; 700 p.

CHAN P.K., O'HARA G. P., WALLACE HAYES A. Principles and methods for acute and subchronic toxicity.

In: **WALLACE HAYES A.** Principles and methods of toxicology. Student Ed. New York : Raven Press, 1984 ; pp. 1-51.

COLOT M. Notions techniques de pharmacologie générale. Paris : Masson & Cie, 1972 ; 137 p.

DAVID R. Les hormones végétales. Paris, 1952.

DEBRAY M., JACQUEMIN H., RAZAFINDRAMBAO R. Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar. (Travaux et documents de l'ORSTOM n°8) Paris : ORSTOM, 1971 ; 150 p.

FABRE R. et TRUHAUT R. Précis de toxicologie. Paris : Société d'Édition d'Enseignement Supérieur, 1965 ; 311 p.

FONG H. A. M., TIN W. A. M., FARNSWORTH N. R. Phytochemical screening. Review. Chicago : University of Illinois, 1977.

FRODIN D. *Schefflera longipedicellata*. Lecomte Bernardi, 1988, [<http://www.mobot.org/MissouriBotanicalGarden-w3TROPICOS/>], (21 juillet 2008), 74 Ko.

GAUTIER J. A. et MIOCQUE M. Précis de chimie organique: séries cycliques. (Collection de Précis de pharmacie) Paris ; Masson & Cie, 1968 ; 391 p.

GOVAERTS R. Latest taxonomic scrutiny. Lecomte Publication: Madag. Bois Analamaz. 2003 ; 117 p.

HELLER R., ESNAULT R., LANCE L. Abrégé de physiologie végétale. Paris, Milan, Barcelone : Développent, 1995 ; 90-126.

HEMINGWAY R. W. et KARCHESY J. J. Chemistry and significance of condensed tanins. New York : Plenum Press, 1989.

JACQUEMIN H. Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar (Suite). Plantes de l'Ile Sainte-marie. Centre ORSTOM de Tananarive, 3, 1971 ; 33p.

KAMOUN P. Appareils et méthodes en biochimie. 3^{ème} Ed. Paris : Médecine-Sciences FLAMMARION, 1987 ; 373 p.

LECLERC H., IZARD D., HUSSON M. O., WATTRE P., JAKUBCZAK E. Microbiologie générale. 2^{ème} Ed. Paris: Doins Editeurs, 1983 ; 369 p.

- MAHUZIER G. et HAMON M.** Abrégé de chimie analytique: méthode de séparation. 2^{ème} Ed. 1990 ; 261 p. (Collection Abrégé de pharmacie)
- MAYER A. M. et POLJAKOFF-MAYBER A.** The germination of seeds. London: Pergamon press, 1963 ; 236 p.
- MEYER A., DEIANA J., LECLERC H.,** Cours de microbiologie générale. Paris: Doins Editeurs, 1984 ; 309 p.
- OMS.** Résistance aux insecticides et lutte antivectorielle ; 17^{ème} rapport de comité OMS d'experts des insecticides. Série et rapports techniques n° 443. Genève, 1970 ; 306 p.
- PERNET R. et MEYER G.** Pharmacopée de Madagascar. Publication de l'Institut de recherches scientifiques de Madagascar, 1957 ; 86 p.
- RABESA ZAFERA. A.** Pharmacopée d'Alaotra. CIDST, Imprimerie Tatsinanana, Antananarivo, 1986 ; 288 p.
- RAHELINAINAMANDIMBY L.** Etude chimique et biologique d'extraits toxiques de *Olex lanceolata* (OLACACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo ; Université d'Antananarivo, 2003.
- 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 ; 67 p.
- RAKOTO-RANOROMALALA D. A. D.** Purification et étude des propriétés physico-chimiques et biologiques des principes toxiques de *Tachiadenus longiflorus* (GENTIANACEAE). [Thèse de Doctorat de 3^{ème} cycle : Biochimie]. Antananarivo ; Université d'Antananarivo, 1989 ; 68 p.
- RAMADE E.** Ecotoxicologie. Paris: Masson, 1979 ; 228 p.
- RANDERATH K.** Chromatographie sur couche mince. Paris: édition GAUTHIER-VILLARS, 1964 ; 296 p.

- RANDRIAMAHVALISOA T. F.** Etude chimique et toxicologique des extraits toxiques de feuilles d'*Ocotea madagascariensis* (LAURACEAE). [Mémoire de DEA: Biochimie]. Antananarivo ; Université d'Antananarivo, 2003 ; 74 p.
- RANDRIAMAMONJY F. Y.** Purification et caractérisation chimique et toxicologique partielle des principes toxiques des tubercules de *Dioscorea antaly*. (DIOSCOREACEAE). [Mémoire de DEA: Biochimie]. Antananarivo ; Université d'Antananarivo, 2005 ; 76 p.
- RAONIHARISOA P.** Etude chimique et toxicologique des extraits toxiques de graines de *Albizia tulearensis* (FABACEAE). [Mémoire de DEA: Biochimie]. Antananarivo ; Université d'Antananarivo, 2003 ; 79 p.
- RASOATAHINA V.** Etude chimique et toxicologique des principes toxiques de *Gambeya boiviniana* (SAPOTACEAE). [Mémoire de DEA: Biochimie]. Antananarivo ; Université d'Antananarivo, 2005 ; 75 p.
- RASOLONDRAIBE O. N.** Etude chimique et toxicologique des extraits toxiques de feuilles de *Xilopia humblotiana* (ANNONACEAE). [Mémoire de DEA: Biochimie]. Antananarivo ; Université d'Antananarivo, 2007 ; 67 p.
- RAZAFINTSALAMA V. E.** Etude chimique et toxicologique des extraits de feuilles de *Pittosporum senacia* (PITTOSPORACEAE). [Mémoire de DEA: Biochimie]. Antananarivo ; Université d'Antananarivo, 2006 ; 68 p.
- REED L. et MUENCH H. A.**, Simple methode of estimating fifty per cent points. Am. J. Hug. 27, 1938 ; 293 p.
- SCHORDERET M. et DAYERJ M.** Analgésiques, antipyrétiques, anti-inflammatoires et immunosuppresseurs.
In: SCHORDERET M. Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. 3^{ème} Ed. Paris: FRISON-ROCHE, 1998 ; pp. 583-606.
- SIMONET M.** Structure, mode d'action des antibiotiques et mecanismes de la résistance bactérienne.
In: BRECHE P., SIMONET M., GAILLARD J. L. Bactériologie des infections humaines. (Collection de la biologie à la clinique) Flammarion Médecine-Sciences, 1991 ; pp. 575-592.

VERNIN G. La chromatographie sur couche mince : Techniques et applications en chimie organique. Paris ; Dunod, 1970 ; 178 p.

ANNEXES



ANNEXE I : Réactifs utilisés pour la révélation des chromatogrammes

Réactif à la vanilline sulfurique

- Vanilline 0,5g
- Acide sulfurique 100ml

Le réactif est conservé au réfrigérateur après usage

ANNEXE II : Composition des solvants de migration en CCM

- Butanol/Acide acétique/Eau 60/20/20 (p/p/p)
- Méthanol/Eau 85/15 (v/v)

ANNEXE III : Réactifs généraux des alcaloïdes

Réactif de MAYER

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

Réactif de WAGNER

- Iodure de potassium 2g
- Iode 1,27g
- Eau distillée q.s.p 1000ml

Réactif de DRAGENDORFF

Solution A :

- Nitrate de Bismuth 1,7g
- Acide tartrique concentré 20g
- Eau distillée q.s.p 30ml

Solution B :

- Iodure de potassium 10g
- Eau distillée q.s.p 40ml

ANNEXE IV : A- Composition générale des milieux de culture

Milieu de MUELLER-HINTON

Formule-type (g/l)

– Extrait de viande	2,0
– Peptone tryptique de caséine	17,5
– Amidon	1,5
– Agar	15,0

pH=7,3±0.1 à 25°C

B- Préparation à partir des milieux déshydratés

Préparation du milieu de MUELLER-HINTON:

- Dissoudre dans de l'eau distillée 36g de milieu déshydraté en agitant continuellement puis ajuster à pH ;
- Sur une plaque chauffante munie d'un agitateur magnétique, chauffer le milieu jusqu'à la dissolution totale ;
- Stériliser le milieu puis le répartir dans des tubes à raison de 15ml par tube; autoclaver à 121°C à 2bars pendant 15min.

MARINE AGAR: formule approximative pour 1l

Peptone	5,0g
Extrait de levure	1,0g
Citrate de fer	0,1g
Chlorure de sodium	19,45g
Chlorure de magnésium	8,8g
Sulfate disodique	3,24g
Chlorure de calcium	1,80g
Chlorure de potassium	0,55g
Bicarbonate de sodium	0,16g
Bicarbonate de potassium	0,08g
Gélose	15,0g
Chlorure de strontium	34,0g
Acide borique	22,0g
Silicate de sodium	4,0g

Fluorure de sodium

2,4g

Nitrate d'ammonium :

1,6g

Phosphate disodique :

8,0g

ANNEXE V : Photos des appareils et montages utilisés



Photo 1 : Spectrophotomètre



Photo 2 : Lampe ultraviolette



Photo 3 : pHmètre



Photo 4 : Plaque chauffante



Photo 5 : Balance électronique

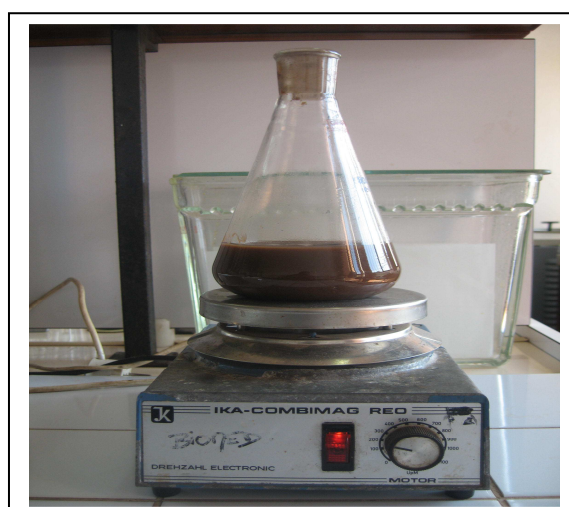


Photo 6 : Extraction à froid



Photo 7 : *Mus musculus*



Photo 8 : Dispositif de la dialyse



Photo 9 : Evaporateur rotatif



Photo 10 : Etuve électronique



Photo 10 : Fractionnement liquide/liquide



Photo 11 : Extraction à chaud

Nom: RASOLOHARIJAONA Franck Yvon

Titre du mémoire: Etudes chimique et toxicologique d'une plante médicinale malgache, *Schefflera longipedicellata* (ARALIACEAE)

RESUME

Les principes actifs des feuilles de *Schefflera longipedicellata*, une Araliacée, montrent une faible toxicité sur souris. La plante est utilisée en thérapeutique traditionnelle malgache, notamment comme antidote contre les empoisonnements par les venins d'animaux.

Un extrait brut aqueux de couleur marron foncé, de goût amer, obtenu par extraction aqueuse à chaud, a été purifié selon un protocole comprenant une étape de précipitation par l'éthanol, un fractionnement par le n-butanol et une dialyse. Un extrait purifié E₃ a été obtenu avec un rendement en toxines de 6,33 %.

Les principes toxiques contenus dans les extraits sont thermostables, solubles dans l'eau et l'éthanol 50 %. Ils pourraient être des tanins, des leucoanthocyanes ou des stéroïdes. Ils ont un poids moléculaire supérieur à 8000 Da.

Chez la souris, l'extrait brut injecté par voie intrapéritonéale à la dose létale de 2,78 g/kg entraîne des symptômes suggérant une atteinte du système nerveux autonome et central, du système cardiovasculaire et du système respiratoire. La DL₅₀ (24h) se situe entre 1,54 et 1,56 g/kg.

Sur les têtards de grenouille, l'extrait brut montre une activité toxique qui obéit à la « loi du tout ou rien ». Sur les alevins de Baraoa, il est létal à 100% dès la concentration 0,25 mg/ml. L'extrait brut est également toxique sur les larves de moustique (CL₅₀ = 1,60 mg/ml).

L'extrait brut inhibe la germination de diverses graines et la croissance des jeunes plantules de riz (Monocotylédones) et de haricot rouge (Dicotylédones). La croissance des bourgeons axillaires de petits pois est stimulée par E₃.

L'extrait brut de concentration égale à 231,25 mg/ml n'exerce aucune activité sur les souches de microorganismes testées.

Mots-clés : *Schefflera longipedicellata*, Araliaceae, thérapeutique, toxine, DL₅₀, CL₅₀, inhibition de la germination.

Encadreurs : Docteur RAKOTO-RANOROMALALA D. A. Doll

Professeur JEANNODA Victor

Name: RASOLOHARIJAONA Franck Yvon

Subject: Chemical and toxicological studies of a malagasy medicinal plant, *Schefflera longipedicellata* (ARALIACEAE)

ABSTRACT

The active principles of *Schefflera longipedicellata* leaves an Araliaceae, present a low toxicity on mouse. The plant is used in Malagasy traditional therapeutic, particularly as an antidote against the poisoning by animal venom.

A crude extract of dark brown colour, of bitter taste, obtained by hot aqueous extraction, was purified according to a procedure including a precipitation by ethanol, fractionation with n-butanol and dialysis. A purified extract E₃ was obtained, with the yield in toxins equivalent to 6.33%.

The toxic principles are heat resistant, soluble in water, in ethanol 50%, could be tannins, leucoanthocyanes and steroids. They have a molecular weight superior to 8000 DA.

On mouse, the crude extract administered by intraperitoneal route with the lethal dose of 2.78 g/kg causes symptoms suggesting a probable attack to the autonomous and central nervous systems and to the cardiovascular and respiratory systems. The LD₅₀ (24h) is estimated between 1.54 and 1.56 g/kg.

On frog tadpoles, the crude extract shows a toxic activity which obeys to the law of “all or nothing”. On Baraoa alevins, it is 100% lethal at 0.25 mg/ml. The crude extract is also toxic on mosquito larvae. (LC₅₀ = 1.60 mg/ml).

The crude extract inhibits the germination of various seeds and the growth of young plants of rice (Monocotyledons) and red beans (Dicotyledons). The growth of the axillary buds of pea is stimulated by E₃.

The crude extract with the dose at 231.25 mg/ml has non activity on tested microorganism germs.

Key words: *Schefflera longipedicellata*, Araliaceae, therapeutic virtue, LD₅₀, LC₅₀, toxin, germination inhibition

Supervisors: Doctor RAKOTO-RANOROMALALA D. A. Doll

Professor JEANNODA Victor

Nom : RASOLOHARIJAONA Franck Yvon

Titre du mémoire : Etudes chimique et toxicologique d'une plante médicinale malgache, *Schefflera longipedicellata* (ARALIACEAE)

RESUME

Les principes actifs des feuilles de *Schefflera longipedicellata*, une Araliacée, montrent une faible toxicité sur souris. La plante est utilisée en thérapeutique traditionnelle malgache, notamment comme antidote contre les empoisonnements par les venins d'animaux.

Un extrait brut aqueux de couleur marron foncé, de goût amer, obtenu par extraction aqueuse à chaud, a été purifié selon un protocole comprenant une étape de précipitation par l'éthanol, un fractionnement par le n-butanol et une dialyse. Un extrait purifié E₃ a été obtenu avec un rendement en toxines de 6,33 %.

Les principes toxiques contenus dans les extraits sont thermostables, solubles dans l'eau et l'éthanol 50 %. Ils pourraient être des tanins, des leucoanthocyanes ou des stéroïdes. Ils ont un poids moléculaire supérieur à 8000 Da.

Chez la souris, l'extrait brut injecté par voie intrapéritonéale à la dose létale de 2,78 g/kg entraîne des symptômes suggérant une atteinte du système nerveux autonome et central, du système cardiovasculaire et du système respiratoire. La DL₅₀ (24h) se situe entre 1,54 et 1,56 g/kg.

Sur les têtards de grenouille, l'extrait brut montre une activité toxique qui obéit à la « loi du tout ou rien ». Sur les alevins de Baraoa, il est létal à 100% dès la concentration 0,25 mg/ml. L'extrait brut est également toxique sur les larves de moustique (CL₅₀ = 1,60 mg/ml).

L'extrait brut inhibe la germination de diverses graines et la croissance des jeunes plantules de riz (Monocotylédones) et de haricot rouge (Dicotylédones). La croissance des bourgeons axillaires de petits pois est stimulée par E₃.

L'extrait brut de concentration égale à 231,25 mg/ml n'exerce aucune activité sur les souches de microorganismes testées.

Mots-clés : *Schefflera longipedicellata*, Araliaceae, thérapeutique, toxine, DL₅₀, CL₅₀, inhibition de la germination.

Encadreurs : Docteur RAKOTO-RANOROMALALA D. A. Doll

Professeur JEANNODA Victor