

SOMMAIRE

	Pages
Remerciements.....	i
Liste des abréviations.....	ii
Glossaire.....	iii
Liste des tableaux.....	iv
Liste des figures et courbes.....	v
INTRODUCTION GENERALE :.....	1
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	3
Le matériel végétal :.....	4
1. Position systématique	4
2. Description botanique	4
3. Distribution géographique et écologie	4
4. Utilisations.....	5
DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES :	6
A- EXTRACTION ET ETUDES DES CONSTITUANTS CHIMIQUES:	7
I. -PROCEDE D'EXTRACTION	7
II. -TESTS PRELIMINAIRES.....	7
1. Criblage phytochimique.....	7
1.1. Détection des alcaloïdes.....	7
1.2. Détection des saponines.....	7
1.3. Détection des flavonoides et des leucoanthocyanes.....	7
1.4. Détection des tanins et polyphénols.....	8
1.5. Détection des stérols insaturés et des triterpènes.....	8
1.6. Détection des anthraquinones.....	8
2. Méthode de purification.....	8
2.1. Traitement par le charbon actif.....	8
2.2. Essai d'analyse en chromatographie sur couches minces.....	9
B- LES ACTIVITES BIOLOGIQUES.....	10
I – TEST DE LA TOXICITE AIGUE:.....	10
1- But et Principe.....	10
2- Etude de la toxicité aiguë par injection unique.....	10
II- ETUDES MICROBIOLOGIQUES:.....	11
II.1. Les souches bactériennes utilisées.....	11
II.1.1. Rappels bibliographiques.....	11
II.1.2. Entretien et contrôle d'identité des souches au laboratoire.....	13
II.2. Tests d'activité antibactérienne.....	15

II.2.1. Test d'antibiogramme.....	15
II.2.2. Test d'antibiogramme avec les antibiotiques de référence.....	
.....15	
II.3. Les tests d'évaluation de l'activité antibactérienne.....	16
II.3.1. Matériels.....	16
II.3.2. Méthodes :.....	17
II.3.2.1. Test sur milieu solide:.....	17
.a La méthode des disques.....	17
.b La méthode des puits.....	17
.c Evaluation des résultats.....	17
II.3.2.2. Test sur milieu liquide.....	17
a. Méthode de dilution.....	17
b. Test de la bactéricidie.....	18
TROISIEME PARTIE : LES EXPERIMENTATIONS ET RESULTATS	19
I. RESULTATS DE L'ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE LA PANTE	20
I.1. Résultat de l'extraction chimique.....	20
I.2. Résultats du criblage phytochimique des extraits	20
I.3. Résultats de la chromatographie sur couche mince.....	21
II. LES ACTIVITES BIOLOGIQUES.....	26
II.1. La toxicité aigue de l'extrait de PSB.....	26
II1.1. Observation des symptômes.....	26
II1.2. Détermination des doses létales du produit.....	26
II.2. L'étude microbiologique.....	29
II.2.1. Observation au microscope des souches bactériennes utilisées.....	29
II.2.2. Les tests d'activité antimicrobienne.....	30
II.2.2.1. Système de référence.....	30
II.2.2.2. Les tests en milieu solide.....	30
a- Méthode des disques.....	30
b- Méthode des puits.....	31
II.2.2.3. Les tests en milieu liquide.....	32
a- Résultats de la méthode de dilution.....	32
b- Résultat de test de la bactéricidie sur filtre millipore.....	34
II.3. Test de liaison entre la concentration de la substance antibactérienne et l'activité observée.....	34
II.3.1. Introduction.....	34
II.3.2. Test de référence avec la Furadantine.....	35
II.3.3. Test avec l'extrait partiellement purifié EAQ/R4/Lyo.....	37

CONCLUSION :.....	41
LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :.....	43
ANNEXES :.....	48

REMERCIEMENTS

Ce mémoire est le fruit de l'entraide et de la collaboration de plusieurs personnes.

Je tiens à remercier vivement tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je voudrais témoigner ici de ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur Victor JEANNODA, Chef du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo et Responsable de la Formation doctorale en biochimie, de m'avoir autorisé à faire ce mémoire et accepté à présider ce jury.

Je tiens également à exprimer toute ma gratitude au Docteur Maminirina ANDRIANTSOA, Chef du Département de Pharmacodynamie auprès du Centre National d'Application des Recherches Pharmaceutiques, encadreur et rapporteur de ce travail, pour l'aide qu'il m'a apportée, pour sa grande contribution, pour son dévouement à la réalisation de mon stage, malgré ses lourdes responsabilités.

Je voudrais aussi exprimer toute ma reconnaissance au Docteur Daniel RAMAMONJISOA, Co-encadreur de ce mémoire, pour les conseils et les suggestions qu'il m'a prodigués, malgré ses nombreuses occupations. Merci profondément.

Je remercie aussi vivement Madame le Professeur ANDRIANARISOA Blandine et Madame le Professeur RAZANAMPARANY Julia Louisette, pour avoir accepté d'examiner ce mémoire en apportant critiques et suggestions.

Mes plus vifs remerciements s'adressent aussi :

- Au Docteur RAKOTOBE Etienne, Directeur du Centre National d'Applications de Recherches Pharmaceutiques (CNARP), et Chef du Département d'Ethnobotanique et de Botanique pour m'avoir gracieusement autorisée au sein des laboratoires de l'Institution dont il a la charge.
- Au Docteur RAVELONJATO Bernard, Chef du Département de Chimie au CNARP et toute son équipe, pour les travaux qu'il ont bien voulu entreprendre sur la Chimie de la plante sur laquelle nous avions travaillé
- A Monsieur RAKOTONANDRASANA Stephan, Chercheur au Département d'Ethnobotanique et de Botanique du CNARP, pour son aide précieuse à la collecte du descriptif botanique de la plante
- A tout le personnel du CNARP, plus particulièrement les équipes de pharmacodynamie et de chimie.

Qu'ils trouvent ici mes sincères remerciements.

A tout le Corps enseignant de la Faculté des Sciences, et plus particulièrement ceux du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée qui a déployé leurs efforts pour notre bien, j'adresse mes vifs remerciements.

Enfin, nos remerciements vont s'adresser à mes parents pour leur grande affection ; mes sœurs et mon frère, et toute ma famille pour leur soutien moral et financier.

GLOSSAIRE

- Antibiotique** : se dit de substances médicamenteuses comme la penicilline, les sulfamides etc., qui empêche le développement de divers microorganismes. [12]
- Colonie bactérienne** : Amas formé par des bactéries cultivées sur un milieu de culture solide et issu de la multiplication d'une seule bactérie. [12]
- Extraction** : Opération qui a pour but d'entraîner une substance à l'aide d'un solvant particulier. [10]
- Lyophilisation** : Déshydratation par sublimation à basse température et sous vide que l'on fait subir à certaines substances pour les conserver. [10]
- Macération** : Mise en contact prolongé et à froid d'une substance dans un liquide dissolvant. [10]
- Oenolé** : Médicament liquide dans lequel l'excipient est le vin. [25]
- Pathogène** : Qui provoque une maladie. [12]
- Perfusion** : Injection intraveineuse prolongée d'une quantité importante de soluté isotonique ou hypertonique généralement salé ou sucré, contenant ou non des médicaments. [12]
- Pharmacocinétique** : Etude du sort des médicaments dans l'organisme : de leur pénétration, de leur métabolisme, de leur distribution par la circulation sanguine, de leur action sur les récepteurs, de leur élimination. [25]
- Pharmacodynamie** : Partie de la pharmacologie (étude des médicaments) qui a pour objet l'étude de l'action exercée par des agents médicaux sur l'organisme sain. [25]
- Toxicité** : Propriété d'une substance (poison) capable de tuer un être vivant. [12]

LISTE DES ABREVIATIONS ET SIGLES

CCM	: Chromatographie sur couche mince
CNARP	: Centre National d'Application des Recherches Pharmaceutiques
DMSO	: Dimethylsulfoxyde
°C	: Degré Celcius
DL	: Dose létale
DO	: Densité optique
g	: gramme
h	: heure
kg	: Kilogramme
mg	: Milligramme
MH	: Mueller Hinton
min	: minute
ml	: millilitre
mm	: millimètre
pH	: potentiel hydrogène
PSB	: plante sèche et broyée
UI	: unité internationale
µ	: micron
µg	: microgramme
µl	: microlitre
%	: pourcent

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n° 01 :	Activité des antibiotiques pris comme référence.
Tableau n° 02 :	Criblage phytochimique de PSB et EAQ/R4/Lyo
Tableau n° 03 :	Résultats de la chromatographie sur couche mince
Tableau n° 04 :	Les symptômes observés après administration du produit par injection unique.
Tableau n° 05 :	Doses des produits administrés et taux de mortalité.
Tableau n° 06 :	Application numérique du calcul de la DL_{50} .
Tableau n° 07 :	Totaux cumulatifs.
Tableau n° 08 :	Caractéristiques au microscope des souches isolées.
Tableau n° 09 :	Numération bactérienne.
Tableau n° 10 :	Test de sensibilité de 3 germe- tests aux antibiotiques de référence.
Tableau n° 11 :	Test de sensibilité des germes par la méthode de disques.
Tableau n° 12 :	Spectre d'activité antibactérienne.
Tableau n° 13 :	Préparation de la méthode de dilution.
Tableau n° 14 :	Résultats de la méthode de dilution.
Tableau n° 15 :	Nombre de colonies obtenues.
Tableau n° 16 :	Test du pouvoir bactéricide.
Tableau n° 17 :	Variation du diamètre d'inhibition de la croissance de <i>Salmonella anatum</i> en fonction de la concentration de la Furadantine.
Tableau n° 18 :	Tableau récapitulatif de la variation de la pente.
Tableau n° 19 :	Variation du diamètre d'inhibition de la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> en fonction de la concentration de l'extrait EAQ/R4/Lyo.
Tableau n° 20 :	Tableau récapitulatif de la variation de la pente.

LISTE DES FIGURES ET COURBES

- Figure n° 1 :** Photo de la plante
- Figure n° 2 :** Test de la bactéricidie
- Figure n° 3 :** Extraction de la plante
- Figure n° 4 :** Détermination de la DL50.
- Figure n° 5 :** Activité de Furadantine et Néomycine sur *Staphylococcus aureus*.
- Figure n° 6 :** Sensibilisation de *Salmonella anatum* à l'extrait EAQ/R4/Lyo.
- Figure n° 7 :** Relation entre l'activité de la Furadantine et la multiplication de *Salmonella anatum*.
- Figure n° 8 :** Variation de l'activité de la Furadantine en fonction de la concentration testée.
- Figure n° 9 :** Relation de l'activité de EAQ/R4/Lyo et la multiplication de *Salmonella anatum*.
- Figure n° 10 :** Variation de l'activité de l'extrait EAQ/R4/Lyo en fonction de la concentration testée.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis longtemps, l'homme a eu recours aux végétaux pour sa subsistance ou pour sa survie. Mais là ne s'arrête pas l'utilisation des végétaux par l'homme. Il a tout naturellement étendu leur emploi pour résoudre ses problèmes de santé [49]. Ainsi était né l'ancêtre de notre phytothérapie, à base de plantes entières, de feuilles, de fleurs, d'écorces, de racines, etc., prises sous forme entière, en infusion, décoction, macération, alcoolats, oenolés, huiles ou autres solvants [30].

Mais avant d'être introduit en thérapeutique, tout nouveau médicament suit un long processus dont [17]:

-La préparation :

- Extraction à partir d'une matière première.
- Mise sous forme pharmaceutique.

-L'essai chez l'animal : *Toxicité:

- toxicité aigue (évaluation de la mortalité).
- toxicité à long terme (observation des effets induits.)

***Pharmacologie:**

- pharmacodynamie
- pharmacocinétique

Madagascar est, dans le monde, l'un des pays les plus riches en plantes médicinales. [31] Parmi ces plantes, 80% sont endémiques, et la plupart d'entre elles n'ont pas encore fait l'objet d'études approfondies.

Le CNARP, ou Centre National d'Application des Recherches Pharmaceutique est l'une des institutions qui s'intéresse aux plantes pour la recherche des médicaments. Les études se rapportant à notre plante s'inscrivent dans ce cadre. Notre choix repose sur les raisons suivantes :

- Un test préliminaire de criblage a révélé, sur un extrait brut de la plante, une activité antibactérienne
- La plante est très abondante presque dans toute la grande Ile.
- Elle n'a pas encore fait l'objet d'études scientifiques approfondies en dehors du domaine d'ethnobotanique et de botanique.

Le but de notre travail est de préparer des extraits suffisamment purifiés qui permettront de confirmer l'activité de la plante et de déterminer les produits antibactériens existants.

Ce travail comporte trois parties :

- La première partie présentera l'étude bibliographique de la plante.
- La deuxième traitera des matériels et méthodes utilisés pour le travail
- La troisième partie discutera des résultats obtenus.

PREMIERE PARTIE :

**ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE**

LE MATERIEL VEGETAL

1. POSITION SYSTEMATIQUE [6]

Selon la classification de Cronquist en 1981 [26], la plante étudiée, appartient à:

Règne :.....VEGETAL
Classe :.....MAGNOLIOPSIDA
Sous-Classe :.....ROSIDAE
Ordre :.....SAPINDALES
Famille :.....ANACARDIACEAE
Genre et espèce : *Protorhus ditimena*

Noms vernaculaires : Ditimena, Tsiramiramy, Vahitsifotra, Robary, Bodofootsy, Volanary, Vorettra, Mahabibo ala.

2. DESCRIPTION BOTANIQUE : [4; 5; 29; 31]

C'est un arbuste dioïque pouvant atteindre 3 m de haut, à exsudation d'abord incolore et devenant rouge à l'état sec.

Les feuilles sont persistantes, simples, entières, sub-opposées et sans stipules; avec un limbe oboval, atténué à la base et émarginé au sommet. Elles ne dépassent pas 7 cm de longueur. Elles portent 25 paires de nervures secondaires presque horizontales, parallèles et rapprochées, plus saillantes sur la face supérieure.

La plante a une inflorescence en panicule, courte, couverte de poils roux, et axillaire.

Elle a des fleurs courtes et pédicellées, petites et ne dépassant pas 4 mm; avec calice à 5 sépales libres, couvert de poils roux; corolles à 5 pétales blancs, libres et à préfloraison imbriquée; cinq étamines alternipétales, libres, plus courtes chez les fleurs mâles. Les ovaires supérieurs, initialement à 3 loges, deviennent à 1 loge fertile à la fin, couverts de petits poils, terminés par un style court divisé en 3 lobes courts. Les fruits ont une forme de drupe, oblongue, de 2.5 cm x 1.5 cm de dimension, couverts de poils roux.

3. DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE ET ECOLOGIE [15 ; 31 ; 32]

C'est une plante endémique de Madagascar.

Elle est rencontrée depuis le niveau de la mer jusqu'à 1400 m d'altitude. Elle pousse dans les différents types de formations forestières de Madagascar: c'est-à-dire qu'elle se rencontre depuis la forêt humide de basse altitude jusqu'à la forêt sclérophylle de montagne, dans le fourré sec décidu du sud jusqu'à la forêt caducifoliée du nord et du nord-est.

Notre plante a été récoltée dans le fourré sec caducifolié sur sable consolidé à Antsiranana.

Du fait de sa distribution très large à Madagascar, la plante possède plusieurs noms vernaculaires. Elle est connue localement sous le nom de « **Mahabibo ala** ».

4. UTILISATIONS

La plante est peu connue en médecine traditionnelle. Cependant, d'après les enquêtes menées par les botanistes du CNARP, la plante est toxique, et est utilisée par ailleurs comme antidiarrhéique [16].

Deux autres espèces du même genre : *Protorhus Grandidieri* Engler et *Protorhus sericea* Engler sont également toxiques. [31 ; 32]



Figure n° 01 : Schéma d'une branche de *Protorhus ditimena*

DEUXIEME PARTIE :

MATERIELS ET METHODES

A. EXTRACTION ET ETUDES DES CONSTITUANTS CHIMIQUES :

I. PROCEDES D'EXTRACTION [14]

Les tiges et feuilles de *Protorhus ditimena* constituent notre matériel d'étude.

La préparation brute initiale notée **PSB**, correspond à la plante déjà séchée et broyée.

Plusieurs schémas d'extraction ont été proposés et effectués au département de Chimie du CNARP, mais nous ne rapporterons dans le cadre de ce travail que celui qui a amené aux extraits sur lequel nous avions effectué nos expérimentations. (Fractionnement n° 02 dans l'annexe 05). [51 ; 52]

II. TESTS PRELIMINAIRES :

1. Criblage phytochimique : [7 ; 13 ; 28]

Le criblage phytochimique est un ensemble de tests permettant de répertorier les différentes familles chimiques présentes dans un extrait d'une plante donnée. Ceci constitue une étape capitale pour l'orientation des opérations ultérieures, de fractionnement chimiques destinées à l'isolement du principe responsable de l'activité objet de l'investigation.

1.1. Détection des alcaloïdes :

Ce sont des réactions générales de précipitation fondées sur la capacité qu'ont les alcaloïdes de se combiner avec des métaux et des métalloïdes : bismuth, mercure, tungstène, iode.

Dans la pratique, on utilise :

- La solution iodo- iodurée,
- Le tétraiodomercurate de potassium (réactif de **MAYER**)
- Le tétraiodobismuthate de potassium (réactif de **DRAGGENDORFF**).

1.2. Détection des saponines (Froth test):

La propriété tensioactive des saponines, c'est à dire leur capacité à former une solution moussante dans l'eau, est utilisée pour leur caractérisation. Le test consiste à mesurer la hauteur de mousse persistante après un temps déterminé, et ce, faisant suite à une agitation de l'extrait dans l'eau distillée. Une hauteur supérieure ou égale à 3 cm indique leur présence.

1.3. Détection des flavonoïdes et leucoanthocyanes :

Diverses réactions colorées peuvent être utilisées pour les mettre en évidence et différencier leurs classes :

◆ Test de WILSTATER :

Ce test est basé sur la formation d'anthocyanidol à partir d'un flavonoïde, en présence d'acide chlorhydrique concentré et de magnésium en tournure.

L'obtention d'une coloration rouge traduit la présence de flavones ; celle du rouge à pourpre, la présence de flavonols et celle du rouge violacé, la présence de flavanones et flavanols.

◆ **Test de BATE SMITH :**

Ce test est utilisé pour mettre en évidence les leucoanthocyanes. Ce sont des dérivés du flavan- 3, 4- diol qui, en présence d'acide chlorhydrique concentré et à chaud, donnent une coloration rouge violette caractéristique des anthocyanidols.

1.4. Détection des tannins et des polyphénols :

La précipitation par la gélatine salée signifie la présence de tannins alors qu'une réaction négative avec du trichlorure ferrique note l'absence de ces composés.

Par ailleurs, l'addition de FeCl_3 peut provoquer une coloration :

- Bleu- vert ou vert- noir due à la présence de tannins de type catéchols.
- Noir bleuâtre indicateur de la présence de tanins pyrogallols.

Une réaction négative à la gélatine salée accompagnée d'une coloration verte ou bleu noir avec FeCl_3 , est due à la présence d'autres types de composés phénoliques.

1.5. Détection des stérols insaturés et triterpènes :

Ces composés peuvent être détectés par des réactions de coloration :

- ◆ Le test de **LIEBERMANN- BUSCHARD**, qui utilise l'anhydride acétique et l'acide sulfurique concentré, donne une coloration des stérols en bleu- vert, et des triterpènes en rouge violacée.
- ◆ Le test de **SALKOWSKI**, qui emploie uniquement l'acide sulfurique concentré, provoque une coloration de l'anneau rouge des stérols.

1.6. Détection des anthraquinones :

Le changement de couleur en rouge de la phase alcaline, de la réaction de l'extrait benzénique avec le NH_4OH , indique la présence d'anthraquinones.

2-Méthode de purification :

2.1. Traitement par le charbon actif : [15]

Principe :

Le charbon actif est un support chromatographique capable d'adsorber un grand nombre de substances, en particulier les composées aromatiques. Cette technique est couramment utilisée pour décolorer les extraits.

Mode opératoire :

Le charbon actif est tassé dans un entonnoir en verre, dont le fond a été au préalable bouché avec de la laine de verre. L'entonnoir ainsi préparé est adapté à une fiole vide. L'extrait végétal est déposé sur la couche de charbon et élué avec de l'eau distillée sous une légère aspiration provoquée par une pompe à vide.

L'extrait recueilli est filtré sur papier filtre pour éliminer les fines particules de charbon, avant d'être concentré par une évaporation à l'évaporateur rotatif jusqu'à un rapport final de 1/1 (p/v).

2.2. Analyse en chromatographie sur couche mince : [22 ; 35]

Principe :

La chromatographie est un procédé de microanalyse au cours duquel les molécules à séparer sont amenées à migrer dans une direction bien déterminée. La séparation des substances se fait en fonction de leur affinité pour l'absorbant d'une part et de leur solubilité dans les solvants d'autre part.

Mode opératoire :

On distingue essentiellement trois étapes :

- ◆ Dépôts de l'échantillon :

Sur une plaque de silice ou de cellulose les extraits à analyser sont déposés à l'aide d'un capillaire. Les dépôts sont placés à 1 cm du bord inférieur de la plaque, et 0,5 cm des bords latéraux ; puis séchés.

- ◆ Développement :

La plaque ainsi préparée est placée dans une cuve de verre saturée par la vapeur du solvant de migration. Pour notre cas qui est une «chromatographie ascendante», la réaction s'arrête lorsque le front du solvant arrive à 0,5 cm du bord supérieur de la plaque. Cette dernière est séchée rapidement à l'air libre.

- ◆ Révélation du chromatogramme :

Deux méthodes de révélation peuvent être réalisées :

- Observation des substances sous forme de bandes ou spots sous rayon ultra violet à 254 nm et 366 nm.
- Révélation par pulvérisation d'une solution très caustique sur la plaque, suivie d'un éventuel chauffage à 110° C.

Les substances de révélation sont :

- Acide sulfurique
- Réactif de Godin (Annexe 5)

B- LES ACTIVITES BIOLOGIQUES :

I. TEST DE LA TOXICITE AIGUE :

1- But et principe : [2 ; 24]

La détermination de la toxicité aiguë est la première étape de tout programme de criblage, ou d'étude pharmacodynamique d'une substance présumée médicamenteuse.

Le principe du test consiste à évaluer la mortalité provoquée chez l'animal par l'administration en une seule fois de doses croissantes du produit à tester. Chaque animal d'un même lot reçoit une dose identique en fonction de son poids.

Selon la voie d'administration, deux méthodes peuvent être utilisées pour la détermination de la toxicité aiguë :

- Méthode par perfusion
- Méthode par injection unique.

Nous avons choisi dans notre expérience, l'étude de la toxicité aiguë par injection unique, et par voie intra-péritonéale.

2. Etude de la toxicité aiguë par injection unique : [20 ; 48]

L'objectif est de déterminer la plus grande dose qui ne tue aucun animal (DL_{00}), la dose qui tue 50% des animaux (DL_{50}), et la plus petite dose qui entraîne la mort de 100% des animaux (DL_{100}).

2.1. Matériels et réactifs :

- 20 souris femelles, d'espèce SWISS, âgées de 10 mois, pesant plus ou moins de 30g, sont reparties en 4 lots différents, à raison de 5 souris par lot.

- Lyophilisats de PSB.
- Véhicule : Cyclodextrine à 2%. [Annexe 02]

2.2. Protocole expérimental :

- **Préparation du véhicule** : 600mg de cyclodextrine sont solubilisés dans 30 ml d'eau distillée (20 mg/ml)

- Préparation de la solution mère de l'extrait à tester :

- 200 g de PSB sont mises à décocter dans 2l d'eau distillée pendant 30 minutes. Après filtration, les filtrats sont lyophilisés pendant 3 jours pour obtenir des lyophilisats.

- 14 ml du véhicule sont ajoutés à 500 mg de lyophilisats pour préparer une solution notée D1.
- La solution D1 est ensuite diluée de moitié avec le véhicule pour avoir la solution D2. La même technique de dilution est répétée pour l'obtention de D3 et D4.

- **Préparation des souris** : Chaque animal est marqué, pesé puis distribué en lots numérotés de 1 à 4.

- **Administration de la solution** : [24]

La solution D1 est injectée chez les souris du lot **1** à raison de 0.5 ml par animal par voie intra péritonéale ; les souris du lot **2** recevront de la même manière une injection de la solution D2, ceux du lot **3** de la solution D3 et ceux du lot **4** de la solution D4.

N.B. : L'heure d'administration sera notée, ainsi que les symptômes présentés par les animaux, et le nombre des morts.

2.3. Interprétation des résultats et détermination de la DL_{50} :

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées, mais nous avons opté pour deux méthodes :

- Méthode algébrique de Behrens et Karber
- Méthode graphique de Reed et Muench

II. ETUDES MICROBIOLOGIQUES :

II.1. Les souches bactériennes utilisées :

10 souches d'espèces bactériennes provenant d'une collection disponibles au CNARP ont été utilisées pour nos expérimentations :

- ◆ *Escherichia coli*
- ◆ *Klebsiella pneumoniae*
- ◆ *Salmonella typhi*
- ◆ *Salmonella typhi murium*
- ◆ *Salmonella du groupe C*
- ◆ *Salmonella anatum*
- ◆ *Salmonella cholerae suis*
- ◆ *Shigella flexneri*
- ◆ *Shigella sonnei*
- ◆ *Staphylococcus aureus*

II.1.1. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES :

* LES ENTEROBACTERIES [9]

Descriptions : La famille des Entérobactériaceae comprend de nombreuses espèces répondant à la définition et caractéristiques suivantes :

- Bacilles à gram négatif, long de 2 à 3 μm et large de 0,6 μm .
- Aéro- anaérobies
- Mobiles ou immobiles
- Facilement cultivables
- Fermentant le glucose
- Réduisant les nitrates en nitrites
- Dépourvue d'oxydase.

Culture :

Elles se développent rapidement, *in vitro*, sur des milieux ordinaires. La température optimale de croissance est 37° C mais la culture est possible entre 20 et 40°C. Leur temps de division varie de 20 à 40 minutes.

Les caractères biochimiques :

Les propriétés qui définissent la famille doivent être mises en évidence pour affirmer que la souche est une Entérobactérie. Les caractères d'identification sont essentiellement biochimique et utilisent des tests qui étudient :

-Le métabolisme protéique (présence d'uréase, production d'indole, dégradation de tryptophane)

- La fermentation des sucres (glucose, lactose, saccharose)
- La capacité d'utiliser le citrate
- La présence d'enzyme (décarboxylases, désaminases)
- La production d'hydrogène sulfuré
- La formation de gaz

Habitat :

Les Entérobactéries se trouvent en général, dans le tube digestif des animaux et de l'homme, et aussi dans la nature (eaux, airs, sols).

***LE GENRE STAPHYLOCOQUE : [11 ; 19]**

Ce genre appartient à la famille des **Micrococcaceae** et à la tribu des **Staphylococceae**

Ils sont qualifiés aussi : « **microbe de pus.** »

Habitat :

C'est un saprophyte de la peau et des muqueuses de l'homme. Mais il se trouve aussi dans l'eau, l'air, et le sol.

Caractères généraux :

Les Staphylocoques sont des :

- cocci groupés souvent en grappes de raisin,
- Gram positifs,
- Aérobies facultatifs,
- Sécréteurs de toxine (utilisé parfois comme vaccin).

Variétés :

Il existe des Staphylocoques blanc, citrin, et doré selon les pigments secrétés.

Pouvoir pathogène :

Nous utilisons pour nos essais les Staphylocoques doré ou *Staphylococcus aureus* qui ont un pouvoir pathogène entre 90 et 95%.

10 à 15% des Staphylocoques blancs sont pathogènes, tandis que les staphylocoques citrins sont généralement non pathogènes.

II.1.2. ENTRETIEN ET CONTROLE D'IDENTITE DES SOUCHES AU LABORATOIRE :

Les souches bactériennes que nous avions utilisées pour nos tests sont conservées sur des *géloses en pente*, au réfrigérateur à 4°C. Un nouveau tube est utilisé pour chaque session de test, d'une part, pour limiter le nombre de passage des cultures, et d'autre part pour avoir une assurance quant à la pureté de la sous culture utilisée.

Périodiquement, nous procédon à un renouvellement du lot par un isolement pour confirmer la pureté de la souche utilisée.

II.1.2.1- Isolement : [19 ; 21 ; 23]

La méthode consiste à étaler une anse de suspension bactérienne jusqu' à l'épuisement sur un milieu de gélose ordinaire. Cette manipulation est poursuivie jusqu' à l'obtention de colonies bien individualisées formées par le même type de cellule.

II.1.2.2 - Identification :

a- La coloration gram : [42]

La première étape d'identification de la bactérie est effectuée par la coloration Gram.

La coloration Gram est une technique de coloration différentielle mise au point par un médecin danois **C. Gram** en 1884. Elle permet de distinguer les bactéries Gram positives des bactéries Gram négatives sur la base tinctoriale des bactéries vis-à-vis du violet de gentiane.

Par ailleurs, elle permet également d'identifier les souches microbiennes d'après leur forme et leur mode de regroupement.

La méthode de coloration Gram comporte les étapes suivantes :

- réalisation d'un frottis
- coloration au violet de gentiane, suivi du lugol,
- décoloration à l'alcool,
- coloration à la fuchine.

Réalisation d'un frottis :

Une oese de pré culture préalablement incubée pendant une nuit à 37°C, est étalée sur une lame bien propre. L'étalement doit être uniforme pour permettre une bonne répartition des bactéries. La lame est séchée par un passage à la flamme d'un bec Bunsen. Ainsi, elle est prête pour la coloration.

Coloration au violet de gentiane et lugol :

La lame est colorée au violet de gentiane pendant 2 minutes. Cette coloration est fixée par un lavage pendant une minute avec la solution iodo-iodurée ou lugol. Cette dernière est appelée la **coloration de Gram**.

Décoloration à l'alcool :

La lame est ensuite rincée à l'alcool 70° pendant 6 secondes, puis ce rinçage est suivi d'un lavage rapide à l'eau de robinet.

Coloration à la fuschine :

La lame est enfin recolorée par la fuschine pendant 30 secondes puis rincée à l'eau, séchée entre deux papiers buvards avant l'observation au microscope optique à l'aide de l'objectif fois 100, dans une goutte d'huile à immersion.

b - Caractères culturaux et morphologiques [9 ; 23]

Il faut décrire les caractères culturaux et morphologiques de chaque souche. A travers un examen macroscopique, nous observons les caractéristiques des colonies qui s'ajouteront aux aspects des bactéries vus en microscopie.

***Escherichia coli :* [39]**

Sur milieu solide, elle se présente sous forme de colonies rondes, de 2 à 3 mm de diamètre, lisses, à contour régulier.

La culture en bouillon est homogène et elle donne une onde moirée observable en agitant le tube.

Au microscope, la cellule est sous forme de bâtonnet, à bout arrondi, souvent isolée ou groupée par deux.

Klebsiella pneumoniae :

Sur milieu gélosé, les bactéries forment des colonies rondes de 3 à 4 mm de diamètre, volumineuses, translucides et muqueuses.

En milieu liquide, elle présente un dépôt visqueux avec une collerette visqueuse en surface.

L'examen microscopique présente des cellules en forme de bâtonnet assez grande et de coloration bipolaire fréquente. Elles sont isolées ou en chaînettes.

Salmonella :

Les colonies sont identiques à celles d'*Escherichia coli*. L'examen microscopique montre des cellules en forme de petit bâtonnet, groupées par deux ou isolées.

Shigella :

Les colonies sont de grande taille. La culture en milieu liquide est limpide et présente une petite voile à la surface.

Staphylococcus aureus :

Les colonies sont dorées, de petite taille et ronde. L'examen microscopique montre des cocci, isolées ou en amas rappelant des grappes de raisin.

II.1.2.3 - Numération des souches :

Pour assurer une bonne reproductibilité des essais, il faut utiliser une préculture qui contient toujours le même nombre de cellules. La numération a pour objectif d'établir une correspondance entre la valeur de la Densité Optique de la suspension de cellules bactériennes et le nombre de cellules qui s'y trouvent

Protocole : - *préparation de la préculture :*

- Une oese de chaque souche prélevée sur une culture en milieu solide est ensemencée dans 4,5 ml d'eau peptonnée puis incubée dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

- La croissance des bactéries se traduit par la présence de trouble dans le milieu de culture. Le dénombrement des cellules présentes s'effectue comme suit :

- *Numération :*

La numération se réalise en trois étapes :

- Dilution de l'inoculum jusqu'à 10^{-9} suivi de la mesure de la densité optique à une longueur d'onde caractéristique de l'espèce.
- Ensemencement en boîte de Pétri sur un milieu gélosé par la méthode de quadrant et mise en incubation pendant une nuit dans une étuve à 37°C.
- Comptage des colonies viables

C'est à partir de ce dernier que nous pouvons déduire les nombres des cellules existantes.

II.1.2.4 - Conservation des souches au laboratoire :

La colonie isolée et préalablement mise en culture en milieu liquide pendant 1 nuit est ensemencée sur une gélose en pente. L'inoculum est placé à 1 cm du fond du tube de gélose ordinaire et l'ensemencement est effectué en stries parallèles allant du fond vers l'ouverture du tube.

La culture est mise en incubation dans l'étuve à 37°C pendant une nuit, avant le stockage au réfrigérateur.

II.2. TESTS D'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE :

Le test antibiogramme nous permet de procéder à l'évaluation de la sensibilité d'une souche bactérienne à une substance antibiotique. Deux types d'effets peuvent ainsi être observés : [20]

- Effet bactériostatique si l'antibiotique inhibe la croissance des bactéries
- Effet bactéricide si l'antibiotique tue les bactéries.

II.2.1-Test d'antibiogramme : [19 ; 41]

L'évaluation de la sensibilité ou résistance des bactéries aux antibiotiques peut être effectuée par un antibiogramme. Cette opération contribue à la caractérisation du mode d'action de la substance antibactérienne en cours d'investigation.

- S'ils détruisent les bactéries présentes et amènent ainsi à une diminution de l'effectif initial, ils sont dits bactéricides.
- S'ils altèrent le développement des bactéries et perturbent leur multiplication, ils sont des bactériostatiques.
- Ils peuvent être aussi bactéricides à des doses élevées et bactériostatiques à des doses moyennes ou faibles.

II.2.2. Test d'antibiogramme avec les antibiotiques de référence :

Principe : Le test a pour objectif d'évaluer la sensibilité des souches bactériennes utilisées par rapport à l'action de quelques antibiotiques de référence chimiquement défini et à des doses connues.

a- Choix de l'antibiotique :

Nous avons utilisé 6 antibiotiques disponibles au laboratoire pour servir de référence quant à la sensibilité de nos germe-tests.

Protocole expérimental :

Une anse de souche microbienne est ensemencée dans 4,5 ml d'eau peptonnée, puis incubée à l'étuve 37° C pendant 24 heures. La pré culture obtenue est dilué au 1/1000^{ème}.

Cet inoculum est utilisé pour ensemencer une boite de pétri contenant 20 ml de Muëller Hinton, par la technique d'inondation. La boite est ensuite séchée à 37° C pendant 15 minutes.

Les disques de cellulose de 6 mm de diamètre, préchargées en antibiotique sont déposés sur la surface du milieu. Une boite peut contenir 3 à 6 disques.

L'incubation se fait dans l'étuve à 37° C pendant 18 à 24 heures.

Lecture : La sensibilité des souches bactériennes à la substance antibiotique testée est proportionnelle au diamètre de la zone sans microbe autour du disque.

Les disques d'antibiotiques que nous avons utilisés comme référence sont produites par « LIOFILCHEM Bacteriology products » [3]. Leurs activités de référence sont rapportées dans le tableau suivant :

Tableau n° 01: Activités des antibiotiques prises comme référence.

N°	Noms des antibiotiques	Indice et quantité par disques	Zone d'inhibition (mm)					
			sensible		intermédiaire	Résistant		
			Staph. a.	Enterob.		Staph. a.	Enterob.	
1	Pénicilline G	P 10 UI	29	15		28	14	
2	Néomycine	N 30 μ g		17	13-16		12	
3	Trimethoprime	TM 5 μ g		16	11-15		10	
4	Polymyxine B	PB 100UI		12	9-11		8	
5	Bacitracine	BA 10UI		13	9-12		8	
6	Nitrofurantoine	F 300 μ g		17	15-16		14	

(*Staph. a*: *Staphylococcus aureus* ; *Enterob.* : *Enterobactéries*).

II.3. LES TESTS D'EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

II.3.1- Matériels :

Solution mère :

80 mg de l'extrait à tester sont dilués dans 500 μ l de Dimethylsulfoxyde (annexe 02), puis dilué de moitié avec l'eau distillée, pour obtenir une concentration finale de 80 mg/ml.

Germes- test :

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhi murium*, *Salmonella anatum*, *Salmonella groupe C*, *Salmonella cholerae suis*, *Staphylococcus aureus*.

Milieux de culture : Eau peptonnée et Muëller hinton.

II.3.2- Méthodes :

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour évaluer la sensibilité des germes à une substance antibactérienne donnée. Nous avons pour notre part choisi la méthode sur milieu solide ou méthode de diffusion, et la méthode sur milieu liquide.

II.3.2.1. Test sur milieu solide : [21]

a- La méthode des disques :

Nous utilisons pour ce faire des disques de cellulose de 6 mm, « non chargés » (produits par Institut Pasteur Production). 30 µl de la solution à tester sont déposées sur le disque que l'on met ensuite à sécher avant de le disposer sur le milieu d'essai tel qu'on a procédé pour la conduite de l'antibiogramme

b- La méthode des puits : [21]

Pour cette méthode, les disques seront remplacés par des puits creusés dans la masse de la gélose avec une seringue stérile muni d'un bout de 6 mm de diamètre. Le produit à tester est délivré dans le puit. Par ailleurs, dans l'incubateur, les boîtes seront disposées en position non renversées et une feuille de papier Kraft tapisse le couvercle de la boîte pour piéger l'eau de transpiration de la culture.

c- Evaluation des résultats

La valeur du diamètre du halo autour du lieu de dépôt de la substance à tester traduit l'importance de l'activité antibactérienne : c'est le « **diamètre d'inhibition** » ou « **zone d'inhibition** » (exprimé en mm).

II.3.2.2. Le test sur milieu liquide : [21]

a- Méthode de dilution :

Les produits à tester sont dilués dans des milieux de culture déjà ensemencés. Cette méthode permet d'évaluer la CMI et la CMB.

La CMI est la plus faible concentration d'une substance antibiotique capable d'inhiber toute croissance visible à l'œil nu d'une bactérie déterminée.

La CMB est la plus faible concentration d'antibiotique donnée qui laisse subsister une proportion inférieure à 10^{-4} (moins de 0,01 %) des bactéries de l'inoculum après 18 heures d'incubation à 37° C.

Mode opératoire :

- *Préparation de la solution mère :*

150 mg de l'extrait sont solubilisés dans 4 ml d'eau distillée pour la solution mère.

- *Préparation de l'inoculum :*

Nous avons préparé quelques milieux de culture contenant une dose croissante de la solution mère dans des tubes à essai numérotés de 1 à 8, puis une goutte de préculture est ajoutée dans chaque tube. L'ensemble est incubé pendant une nuit dans l'étuve à 37 ° C.

Evaluation des résultats :

Le premier tube qui ne présenterait aucun trouble appréciable à l'œil nu correspond à la valeur de la CMI.

Le contenu de chaque tube sans troubles est repiqué sur un milieu solide stérile. Ceci permet de définir la valeur de la CMB.

La bactéricidie est définie par l'absence de cellule viable sur ce milieu.

Par ailleurs, un antibiotique est bactéricide lorsqu'il a une CMB proche de la CMI.

b- Test du pouvoir bactéricide :**Principe :**

Pour ce test, les cellules bactériennes seront disposées en couches monocellulaires sur un filtre millipore stérile (avec des pores à $0,45\mu\text{m}$ de diamètre). L'action de la substance antibactérienne sera évaluée à travers la variation éventuelle du nombre de cellules viables sur le filtre après la période de mise en contact

Le test comprend 3 composants:

- Préparation d'un filtre qui sert de témoin (ensemencé et sans produit antibactérien)
- Préparation d'un filtre d'essai (ensemencé et traité avec un antibiotique de référence)
- Préparation d'un filtre d'essai (ensemencé et traité avec l'extrait végétal à tester)

Chaque filtre est délicatement déposé à la surface du milieu d'essai conditionné en boîte de pétri de 100 mm de diamètre. Les éléments nutritifs contenus dans le milieu vont diffuser à travers les pores du filtre pour permettre l'éventuelle multiplication du germe-test.

Matériels :

- Germe-test : *Salmonella anatum* dilué au 10^{-4}
- Produits antibactériens : furadantine et EAQ/R4/Lyo
- Milieux de culture
- Filtre millipore

Protocole :

Après la dilution de l'inoculum dans l'eau distillée stérile, il faut solubiliser le produit antibactérien à tester, avec de l'eau distillée, à une concentration finale de 40 mg/ml pour obtenir une solution mère.

Le test est résumé dans le schéma ci-après :

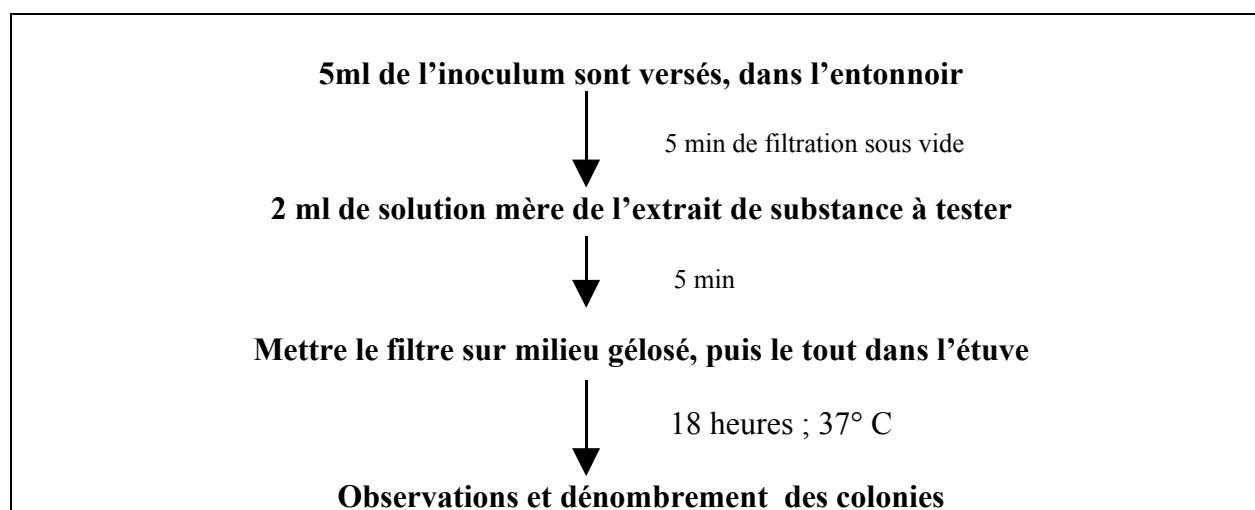


Figure n° 02 : Test de la bactéricidie

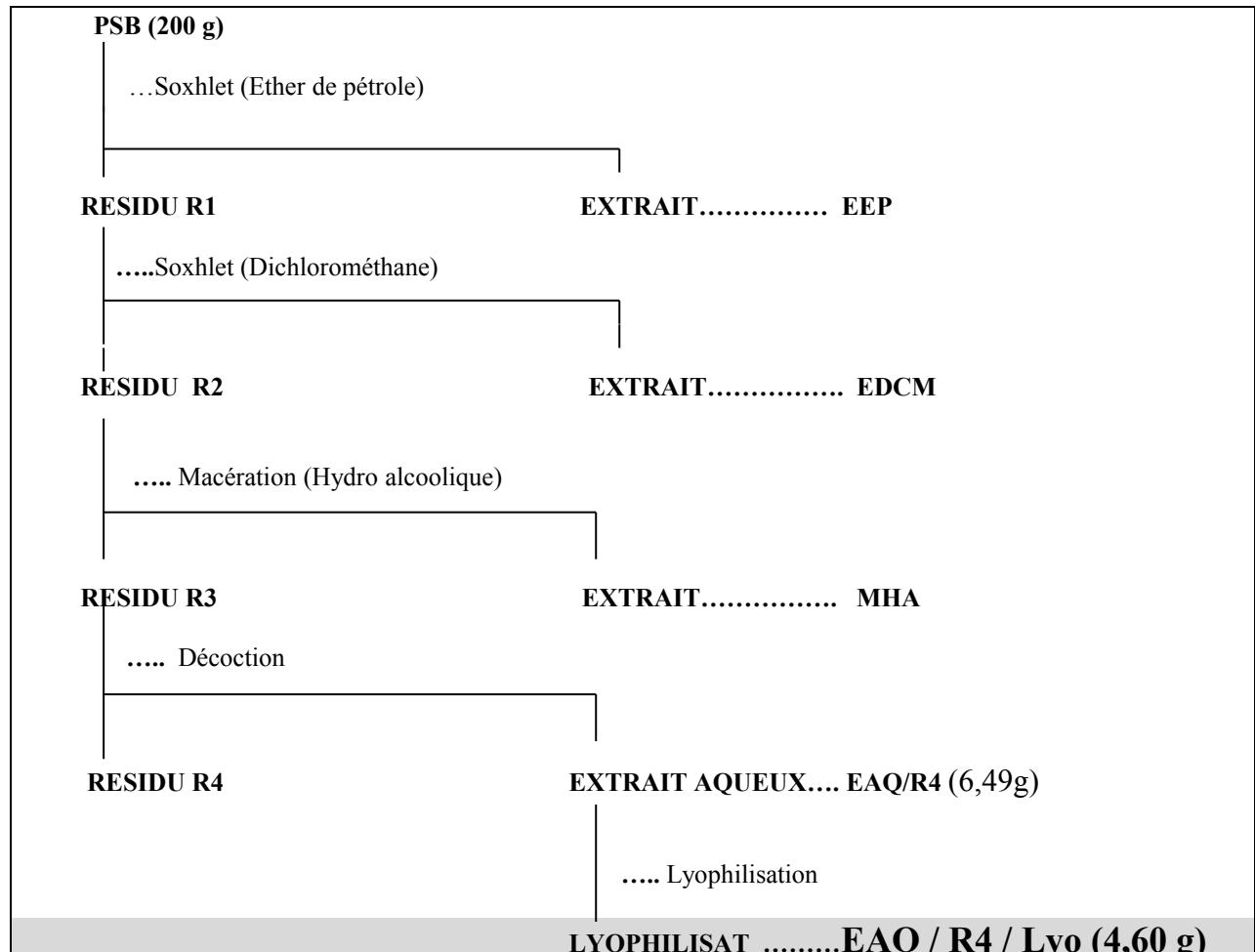
TROISIEME PARTIE :

LES EXPERIMENTATIONS ET RESULTATS

I. RESULTATS DE L'ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE LA PLANTE :

I.1. RESULTAT DE L'EXTRACTION CHIMIQUE :

L'obtention de notre extrait est résumée dans le schéma suivant :



(**PSB** : Extrait brut de la plante).

Figure n° 03 : Extraction de la plante.

4,6 mg de lyophilisat ont été ainsi obtenus à partir de 200g de **PSB**; soit avec un rendement de 2,3 %.

I.2. RESULTATS DU CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE DES EXTRAITS [45]

Le tableau n° 2 rapporte les résultats du criblage effectué sur **PSB**. Ces données serviront de référence pour les essais ultérieurs de purifications chimiques.

Tableau n° 02 : Criblage phytochimique de PSB et EAQ/R4/Lyo

FAMILLES CHIMIQUES	PSB	EAQ/R4/Lyo
Stéroïdes	+	+
Flavones ou flavonols	+	+/-
Leuco anthocyanes	+	+/-
Alcaloïdes	-	-
Tannins	+/-	-
Saponines	-	-
Anthraquinones	-	-
Composés phénoliques	+	+

Légendes : - : absence

+/- : traces

+ : présence

Interprétation des résultats :

La nature des familles chimiques décelées dans les deux types d'extrait est pratiquement identique. Toutefois, on observe :

- Un appauvrissement des teneurs en flavones ou flavonols et des leucoanthocyanes
- Une élimination des traces de tannins observés initialement dans PSB

Les composés phénoliques et les stéroïdes restent par contre bien présents

Nous pensons que l'amélioration de l'activité antibactérienne avec l'extrait purifié EAQ/R4/Lyo serait due à une présence plus importante de ces composées dans la solution d'essai.

Par ailleurs, compte tenu du fait que la méthode de fractionnement adoptée est basée sur un traitement successif avec des solvants de polarité croissante, nous pensons que le principe actif est moyennement ou très polaire. [34]

I.3. RESULTATS DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE :

Deux systèmes de solvant de migration ont été utilisés :

- un mélange de butanol, d'acide acétique et d'eau préparé dans le rapport 4/1/5 (BAE 415)
- un mélange de cyclohexane acétate d'éthyle (CE) 8/2 ou 6/4.

Chaque substance est repérée par son **rf** qui est le rapport entre la distance parcourue notée « **dx** » par le centre de la tache de la substance considérée, et celle du front du solvant, notée « **ds** ».

$$Rf = \frac{dx}{ds}$$

Tableau n° 3 : Résultats de la chromatographie sur couche mince

N°	Nature de la plaque	Système solvant de migration	Substance déposée	Système de révélation							
				Chimique				fluorescence			
				H2SO4		Godin		254 nm		366 nm	
				N. Tâches	Rf	N. Tâches	Rf	N. Tâches	Rf	N. Tâches	Rf
01	Plaque de Silice	BAE 415	PSB	01 tache intense	0,70			03 tâches jaunes	0,70	02 tâches jaunâtres	0,70
				2 taches floues	0,57				0,57		
					0,50				0,50		0,50
				2 tâches	0,71			02 taches jaunes	0,71		0,71
			EAQ/R4/Lyo		0,50						
								01 tâche jaunâtre			
02	Plaque de silice	BAE 415	EAQ /R4/Lyo			5 taches	0,89 0,74 0,66 0,38 0,13	5 tâches	0,89 0,74 0,66 0,38 0,13	3 tâches	0,89 0,74 0,13
03	Plaque de silice	CE 64	EAQ /R4/Lyo			2 taches	0,29 0,09	2 tâches	0,29 0,09	1 tâche	
04	Plaque de silice	CE 82	EAQ /R4/Lyo					1 tâche	0,05	aucune	
05	Plaque de cellulose	CE 82	EAQ /R4/Lyo			aucune		aucune		aucune	
06	Plaque de cellulose	CE 64	EAQ /R4/Lyo			aucune		aucune		aucune	
07	Plaque de cellulose	BAE 415	EAQ /R4/Lyo			2 tâches	0,60 0,13	2 tâches	0,60 0,13	01 tache	

NB : Rf : Rapport entre la distance parcourue **dx** par le centre de la tâches de la substance et le front du solvant **ds**.

N. Tâches : Nombre de tâches.

BAE : Butanol acide acétique

CE : Cyclohexane acétate d'éthyle

PSB : Extrait brut ;

EAQ/ R4/Lyo : Extrait purifié

Interprétations :

Rappelons que :

- ◆ Le terme de composé phénolique est utilisé pour désigner un groupe important de substances d'origine végétale qui possèdent en commun un noyau aromatique comportant un ou plusieurs substituants hydroxylés. [13]

Parmi les composés phénoliques naturels, on peut citer en premier **les flavonoïdes** qui constituent le groupe le plus important; le **tannin**, qui est une substance polymérique; et les unités phénoliques dans la structure des protéines, des alcaloïdes ou des terpenoides.

Toutefois, la présence des composés phénoliques chez la plante constitue aussi bien souvent un inconvénient de par leur aptitude à se combiner avec les protéines par une liaison hydrogène.

Ainsi quand les membranes sont détruites au cours des fractionnements, les phénols ont tendance à se combiner rapidement avec les protéines; ce qui peut dans certains cas conduire à l'inhibition d'une activité enzymatique essentielle au niveau de l'extrait brut de la plante. D'un autre côté les composés phénoliques eux-mêmes peuvent être sujets à une oxydation enzymatique et peuvent ainsi être éliminés au cours du fractionnement.

- ◆ Les stéroïdes, dont le squelette de base renferme 17 atomes de carbone constituent la classe de substances naturelles la plus représentée. Ils sont présents aussi bien dans le règne animal que végétal et en particulier au niveau de composés essentiels d'importance vitale tels que les vitamines, les hormones et les antibiotiques. [18]

Si l'on se réfère aux résultats du criblage phytochimique rapportés au tableau n° 02, l'extrait purifié EAQ/R4/Lyo contient essentiellement à la fois des stéroïdes et des composés phénoliques. Notons toutefois que ce screening n'est pas exclusif mais était le seul exécutable dans notre laboratoire.

Les substances analysées en chromatographie sur couche mince dont les résultats sont rapportés au tableau n° 3 ont été préalablement solubilisées dans l'eau. Le test concerne donc essentiellement des produits à polarité élevée.

Lorsque le mélange « BAE 415 » a été utilisé comme solvant de migration,

- à l'essai n° 02, 5 taches bien séparées ont pu être observées avec l'extrait EAQ/R4/lyo lorsqu'on a utilisé le réactif de Godin pour la révélation.

- Si on y ajoute d'une part les deux taches observées à l'essai n° 01 et ayant respectivement comme R_f 0,57 et 0,50 et d'autre part
- la tache observée au test n° 07 et ayant un $R_f = 0,60$

Nous avons au total 8 taches potentiellement intéressantes

Le développement de ce travail consisterait donc à

- fractionner l'extrait EAQ/R4/Lyo pour obtenir des extraits enrichis avec ces substances révélées ci-dessus
- déterminer à travers les tests biologiques les fractions actives.

Par ailleurs, les résultats obtenus au test de fluorescence seront pris en compte pour l'identification de ces produits.

II. LES ACTIVITES BIOLOGIQUES :

II.1. LA TOXICITE AIGUE DE PSB :

II.1.1. Observation des symptômes sur les animaux : [44]

Les symptômes observés après l'administration du produit sont rapportés dans le tableau 04.

Tableau 04 : Les symptômes observés après administration du produit par injection unique.

Lo t N°	Doses du produit injecté	Les observations et les nombres de morts				
		Immédiat	Après 10 min	Après 20 min.	Après 12 heures	Après 24 heures
1	0,91 g/kg	Agitation et augmentation du rythme de la respiration (90 par min)	Les animaux sont flasques	1 mort	2 morts	5 morts /5
2	0,45 g/kg	Agitation et augmentation du rythme de la respiration (90 par min)	Les animaux sont flasques	Quelques souris restent flasques, les autres commencent à bouger	1 mort	2 morts /5
3	0,23 g/kg	Agitation et augmentation du rythme de la respiration (90 par min)	Les animaux traînent les pattes	Quelques souris restent flasques, les autres commencent à bouger	1 mort	1 mort /5
4	0,11 g/kg	Agitation et augmentation du rythme de la respiration (90 par min)	Diminution de l'activité motrice et hérissement des poils	Diminution de l'activité motrice et hérissement des poils	Diminution de l'activité motrice et hérissement des poils	0 mort.

Interprétation : [44]

L'évaluation de la respiration doit être faite comparativement à un témoin. Donc :

- L'augmentation du rythme de la respiration plus haut indique une diminution importante de la respiration de l'animal.
- Les mouvements des animaux et la diminution de l'activité motrice seraient liés à une dépression du système nerveux central.

II.1.2- Détermination des doses létales du produit : [35]

Les doses des produits administrés et le taux de mortalité des animaux sont les suivants :
Tableau n° 05 : Doses des produits administrées et taux de mortalité

Lot n°	1	2	3	4
Dilution du produit	½	¼	1/8	1/16
Doses correspondantes (g/kg)	0,91	0,45	0,23	0,11
Effectif initial	5	5	5	5
Nombre des morts par lot	5	2	1	0
Mortalité (%)	100	40	20	0

La dose létale qui tue les animaux à :

100% est égale à la DL₁₀₀ : **0,91 g / kg**

0% est égale à la DL₀₀ : **0,11 g / kg**

50% est calculée en appliquant deux méthodes :

- Méthode algébrique
- Méthode graphique

Détermination de la DL₅₀ : [24]

II.1.2.1-Par la méthode algébrique :

La DL 50 est obtenue en appliquant la formule suivante :

$$\mathbf{DL}_{50} = \mathbf{DL}_{100} - \Sigma (a \times b) / m$$

Dont : **a** : différence entre 2 doses successives

b : moyenne de la somme des morts à 2 doses successives

m : nombre d' animaux utilisés par l'expérience

Application numérique :

Tableau n°06 : Application numérique du calcul de la DL50

Lot N°	1	2	3	4
Nombre des animaux utilisés	5	5	5	5
Doses correspondantes (g/kg)	0,91	0,45	0,23	0,11
Nombre des morts /lot	5	2	1	0
a	0,46	0,22	0,12	
b	3,5	1,5	0,5	
a × b	1,61	0,33	0,06	

$$\mathbf{DL} \ 50 = 0,91 - \frac{1,61 + 0,33 + 0,06}{5} = 0,51 \text{ g/kg}$$

Donc la dose qui tue la moitié des animaux d'un même lot est **0,51 g/kg**.

II.1.2.2-Par la méthode graphique :

La DL 50 est déterminée à partir de l'intersection de deux courbes :

- Variation du nombre des souris survivantes en fonction de la dose administrée.
- Variation du nombre des souris mortes en fonction de la dose administrée.

Les totaux cumulatifs sont observés dans le tableau 07:

Tableau n°07 : Totaux cumulatifs

Lot N°	1	2	3	4
Nombres de souris par lot	5	5	5	5
Nombres de survivantes	0	3	4	5
Nombres des mortes	5	2	1	0
Doses des produits (g/kg)	0,91	0,45	0,23	0,11

Courbes de détermination de DL50

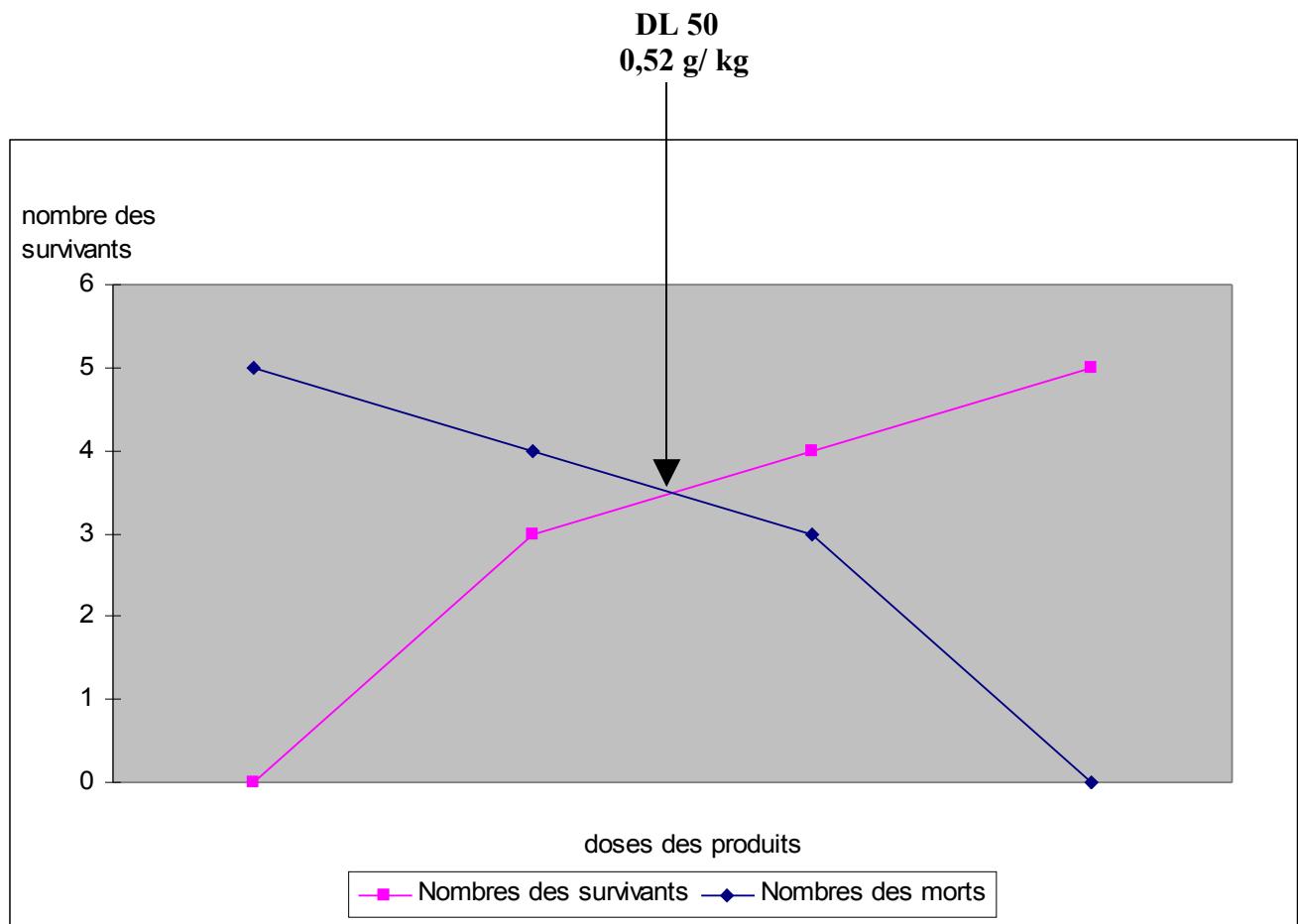


Figure n°04 : Détermination de la DL 50

Avec la méthode graphique, la DL_{50} est obtenue à partir de la projection de l'intersection des deux courbes à l'axe des abscisses ou les valeurs des doses des produits injectées, qui est égale à **0,52 g/kg**.

Donc avec les deux méthodes, nous avons obtenu deux valeurs presque égales.

II.2. L'ETUDE MICROBIOLOGIQUE :

II.2.1- Observation au microscope des souches bactériennes utilisées

Nous avons observé au microscope, 09 souches bactériennes appartenant à la famille des Enterobacteriaceae et une Micrococcaceae après la coloration Gram.

Leurs caractéristiques respectives sont rapportées dans le tableau 08.

Tableau n° 08 : Caractéristiques au microscope des souches isolées.

N°	NOM DES GERMES	FORME	COULEUR	GRAM	GROUPEMENT
01	<i>Escherichia Coli</i>	Bâtonnet bout arrondi	Rose	Négatif	Isolé ou groupé en deux
02	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bâtonnet	Rose	Négatif	Isole ou en chaînettes
03	<i>Salmonella typhi</i>	Petit bâtonnet	Rose	Négatif	Isolé ou groupé en deux
04	<i>Salmonella typhi murium</i>	Petit bâtonnet	Rose	Négatif	Isolé
05	<i>Salmonella groupe C</i>	Bâtonnet	Rose	Négatif	Isolé
06	<i>Salmonella anatum</i>	Bâtonnet	Rose	Négatif	Isolé ou groupé en deux
07	<i>Salmonella Cholerae suis</i>	Bâtonnet	Rose	Négatif	Isolé
08	<i>Shigella sonnei</i>	Bâtonnet	Rose	Négatif	Isole ou en chaînette
09	<i>Shigella flexneri</i>	Bâtonnet	Rose	Négatif	Isolé
10	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocci	Violet	Positif	En grappe de raisin

Numération bactérienne :

L'objet de cette expérimentation est de pouvoir évaluer le nombre des cellules bactériennes contenues dans chaque préculture.

Nous avons dilué la suspension bactérienne objet de la numération jusqu'à 10^{-9} . Après le repiquage sur milieu solide, seules seront prises en compte les boîtes de pétri contenant au plus 300 colonies viables. Les valeurs rapportées dans le tableau 09 correspondent à des valeurs moyennes.

Tableau n°09 : Numération bactérienne

Germes	dilution	D. O. à 525 nm	Nombre de colonies	Nombre des bactéries/ ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	10^{-7}	0, 022	127	$127 \cdot 10^7$
<i>Escherichia coli</i>	10^{-8}	0, 022	261	$261 \cdot 10^9$

II.2.2- Les tests d'activité antimicrobienne:

II.2.2.1- Système de référence

Les résultats de la sensibilité de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhi* aux 6 antibiotiques de référence retenus pour nos travaux sont consignés dans ce tableau.

Tableau n° 10: Test de sensibilité de 3 germe-tests aux antibiotiques de référence

NOMS DES ANTIBIOTIQUES	INDICES	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Salmonella typhi</i>	
		Z.I (mm)	Observations	Z.I (mm)	Observations	Z.I (mm)	Observations
Bacitracine	BAC	07	Résistant	06	Résistant	06	Résistant
Néomycine	N 30µg	17	Sensible	16	Intermédiaire	12	Résistant
Nitrofurantoine	F300µg	26	Sensible	27	Sensible	26	Sensible
Pénicilline G	P 10 UI	11	Résistant	06	Résistant	06	Résistant
Polymyxine B	PB100 UI	08	Résistant	12	Sensible	08	Résistant
Trimethoprime	TM 5µg	06	Résistant			06	Résistant

(Z.I : Zone d'inhibition)

Ces disques d'antibiotiques pré chargés sont des produits de Liofilchem. [3]

Le Nitrofurantoine est le plus actif parmi les 6 antibiotiques. Il a servi comme référence dans tout le reste de nos travaux.

Dans la pratique, nous avons utilisé le **furanadantine**, gélule de 50mg qui contient le Nitrofurantoine. [50]

II.2.2.2. Les tests en milieu solide:

a. Méthode des disques :

Nous avons étudié la sensibilité de *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhi* aux deux extraits MHA et EHAS/1 (L'obtention et les caractéristiques des extraits sont vus dans l'annexe 05). Les disques sont chargés de 30µl de solution mère à des concentrations différentes.

Tableau n° 11 : Test de sensibilité des germes par la méthode de disque

N°	Identification de l'extrait	[Solution mère] (mg/ml)	Diamètre d'inhibition (mm)	
			<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella typhi</i>
1	MHA	100	12	10
2		50	10	06
3		25	07	06
4	EHAS / 1	100	10	10
5		50	08	06
6		25	06	06

Nous avons trouvé que les extraits peuvent être testés avec des disques. Les zones d'inhibition autour des disques sont proportionnelles aux concentrations des extraits.

Schéma montrant un exemple de méthode de disques :

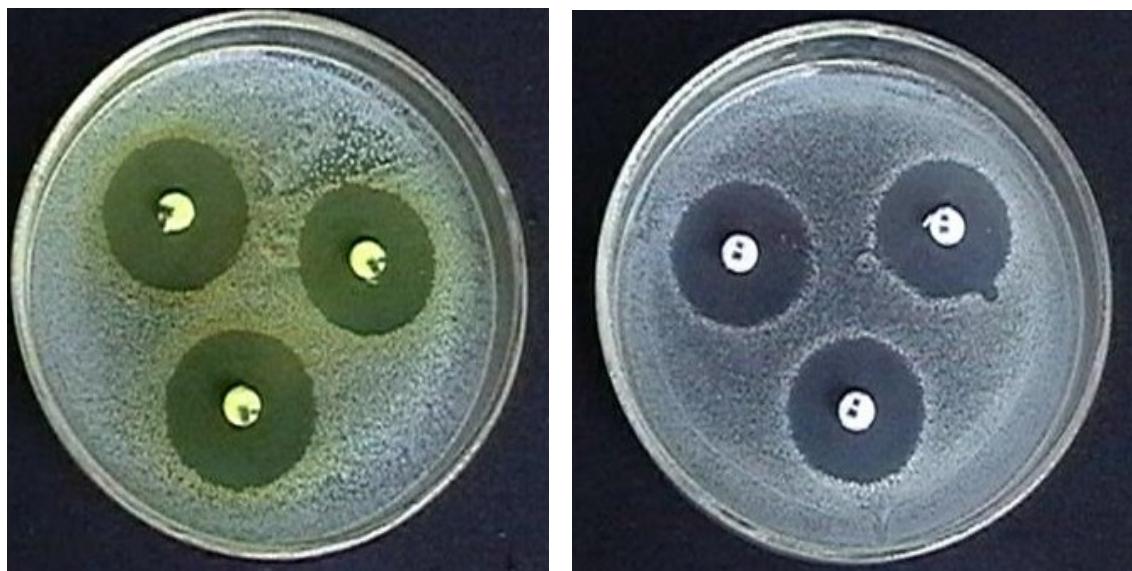


Figure n° 05 : Activité des disques préchargées en Furadantine (à gauche) et Néomycine (à droite) sur *Staphylococcus aureus*.

b. Méthode des puits :

La préparation des extraits est rapportée dans l'annexe 05.

Tableau n°12 : Spectre d'activité antibactérienne

Schéma de fractionnement N°	Identification des extraits	Diamètre d'inhibition (mm)								
		<i>S.a</i>	<i>E.c</i>	<i>K.p</i>	<i>S.t</i>	<i>S.tm</i>	<i>S.g.c</i>	<i>S.anat</i>	<i>S.ch.s</i>	<i>Sh.s</i>
I	EHAQ	08	09	06	09	07	NT	NT	07	NT
	EHAS/1	13	15	13	16	08	13	11	15	09
	EAQ/Lyo	10	NT	07	NT	NT	NT	NT	NT	NT
II	EEP	06	08	10	07	06	NT	NT	06	NT
	EDCM	12	09	10	06	09	NT	NT	09	NT
	MHA	13	16	15	08	07	10	15	16	13
	EAQ/R4	13	12	06	10	09	NT	NT	12	NT
	EAQ/R4/Lyo	14	12	09	13	NT	14	12	10	08
III	EHAS / 3	12	12	14	08	07	12	14	14	12
	EAQ / 3	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	EAQ / Lyo / 3	12	NT	08	NT	NT	NT	NT	NT	NT

(*S.a*: *Staphylococcus aureus*; *E.c*: *Escherichia coli*; *Kp*: *Klebsiella pneumoniae*; *St*: *Salmonella typhi*; *Stm*: *Salmonella typhi murium*; *Sg.c*: *Salmonella groupe C*; *S anat*: *Salmonella anatum*; *S ch. s*: *Salmonella cholerae suis*; *Sh s*: *Shigella sonnei*)

NT : Non testé

Les germes les plus sensibles sont ceux qui ont une zone d'inhibition supérieure ou égale à 14 mm autour du puit.

Pour :

- Staphylocoques et *Salmonella* groupe C, la meilleure activité est avec EAQ/R4/Lyo.
- *Escherichia coli*, EHAS/1 et MHA sont les plus actifs.
- Le *Salmonella cholerae suis* est sensible aux 3 extraits qui sont EHAS/1, MHA, EHAS/3.
- *Salmonella anatum* est sensible avec MHA et EHAS/3.

Schéma d'un exemple de méthode des puits :



Figure n° 06 : Sensibilisation de *Salmonella anatum* à l'extrait EAQ/R4/Lyo (80 mg/ml).

II.2.2.3. Les tests en milieu liquide :

a. Résultats de la méthode de dilution :

8 tubes à essai contenant une concentration croissante de l'extrait à tester sont préparés tel que décrits dans le tableau 13. Chaque tube est ensuiteensemencé avec une goutte de pré culture de Staphylocoques.

La solution mère de l'extrait est préparée en solubilisant l'extrait EAQ/R4/Lyo dans l'eau distillée à une concentration finale de 37,5 mg/ml.

Tableau n° 13 : Préparation de la méthode de dilution.

N° du tube	Contenu des tubes d'essai				Concentration finale de l'extrait dans chaque tube (mg/ml)
	Milieu de culture AB (ml)	Eau distillée (µl)	Solution mère de l'extrait à tester (µl)	Volume de préculture (µl)	
1	4,5	1400	0	50	0
2	4,5	1200	200	50	1.26
3	4,5	1000	400	50	2.54
4	4,5	800	600	50	3.81
5	4,5	600	800	50	5.08
6	4,5	400	1000	50	6.35
7	4,5	200	1200	50	7.62

8	4,5	0	1400	50	8,9	
---	-----	---	------	----	-----	--

Après une incubation de 24 heures dans l'étuve à 37° C, les résultats du test appréciés à l'œil nu sont rapportés dans le tableau 14. Ainsi dans les tubes 5 à 8 la multiplication bactérienne est faible ou inexiste car on n'observe pas de trouble. Par contre, dans les tubes 1 à 5, on observe un trouble intense.

Tableau n° 14 : Résultats de la méthode de dilution

Tube n°	Aspect du milieu
1(témoin)	Présence de trouble intense
2	Présence de trouble moyen
3	Présence de trouble moyen
4	Présence de trouble moyen
5	Absence de trouble
6	Absence de trouble
7	Absence de trouble
8	Absence de trouble

Le contenu des tubes 5 à 8 a été repiqué sur des milieux gélosés sans antibiotiques conditionnés en boite de pétri. Les colonies viables sont comptées après 24 heures d'incubation, à 37 °C.

Tableau n°15 : Nombre de colonies obtenues

Boite n°	Nombre de colonie
5	Incomptable
6	Incomptable
7	48
8	2

Nous avons observé la reprise de la croissance des bactéries dans les boites n° 5 et 6, tandis que dans les deux autres, l'inhibition persiste.

Mesure de la CMI et CMB

Les valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de concentration minimale bactéricide (CMB) sont déduites des résultats obtenus avec la méthode de dilution.

→ La CMI correspond à la concentration de l'extrait correspondant au tube N° 5 où aucun trouble n'est apparu.

Donc la valeur de CMI est ainsi égale à **5,08 mg/ ml**

→ La CMB correspond à la concentration de l'agent antibactérien qui laisse subsister une proportion inférieure à 10 des bactéries de l'inoculum. Ceci correspond pour notre cas au tube n° 8 et/ou boite n°8.

Donc la valeur de CMB est **8,90 mg / ml**.

Ces valeurs sont en relation avec le pouvoir bactéricide et bactériostatique de l'extrait EAQ/R4/Lyo pour Staphylocoques.

b. Résultat du test de la bactéricidie sur filtre millipore :

Ce test est effectué pour déterminer la sensibilité de *Salmonella anatum* vis-à-vis de l'extrait EAQ/R4/Lyo.

Après 18 heures d'incubation, nous avons obtenu les résultats consignés dans le tableau 16:

Tableau n°16 : Test du pouvoir bactéricide.

N°	PRODUITS ANTIBACTERIENS	OBSERVATIONS
01	Pas d'antibiotique (témoin)	Les bactéries poussent normalement
02	Furadantine (référence)	Aucune bactérie ne pousse
03	EAQ/R ₄ /Lyo (extrait)	Multiplication réduite des bactéries

Interprétation : Ce résultat justifie que :

- Notre plante a un effet **bactériostatique**.
- Notre produit de référence Furadantine est un **bactéricide**.

II.3- Test de liaison entre la concentration de la substance antibactérienne et l'activité observée :

II.3.1. Introduction :

Le test a pour objectif de vérifier s'il existe une relation entre les valeurs de X qui désignent la concentration de la substance antibactérienne concernée et les valeurs de Y correspondant au diamètre d'inhibition exprimant l'activité antibactérienne.

Les 02 variables jouent ici un rôle dissymétrique où la variable X prend des valeurs contrôlées, non aléatoires et antérieures à celles de Y. X est ainsi considéré comme la cause, et Y l'effet.

Il s'agit en sorte d'un problème de régression de Y en fonction de X.

II.3.2. Test de référence avec la Furadantine :

II.3.2.1 Variation de l'activité avec la concentration testée :

Nous avions utilisé comme référence la variation du diamètre d'inhibition exprimant la sensibilité du germe-test, *Salmonella anatum*, lorsqu'on le met en présence d'une concentration croissante de Furadantine (annexe 01). L'évaluation a été effectuée par la méthode de diffusion en milieu gélosé et utilisant la technique des puits.

Les valeurs des différentes concentrations testées et les diamètres d'inhibition correspondants sont consignés dans le tableau 17 et représentés graphiquement par les figures 7 et 8. [38]

Tableau 17: Variation du diamètre d'inhibition de la croissance de *Salmonella anatum* en fonction de la concentration de la Furadantine

Identification	C1a	C2a	C3a	C4a	C5a	C6a	C7a	C8a
X (en mg/ml)	6.6	10.0	16.0	24.0	36.1	54.2	81.3	122
Y (mm)	13	16	16	18	20	21	22	23
	12	16	17	18	19	19	21	22
	12	16	17	19	20	21	22	23
	11	14	16	17	18	18	19	21
	12	16	17	18	20	20	21	22
	13	16	17	18	19	20	21	23
	12.17	15.67	16.7	18	19.3	19.83	21	22.3

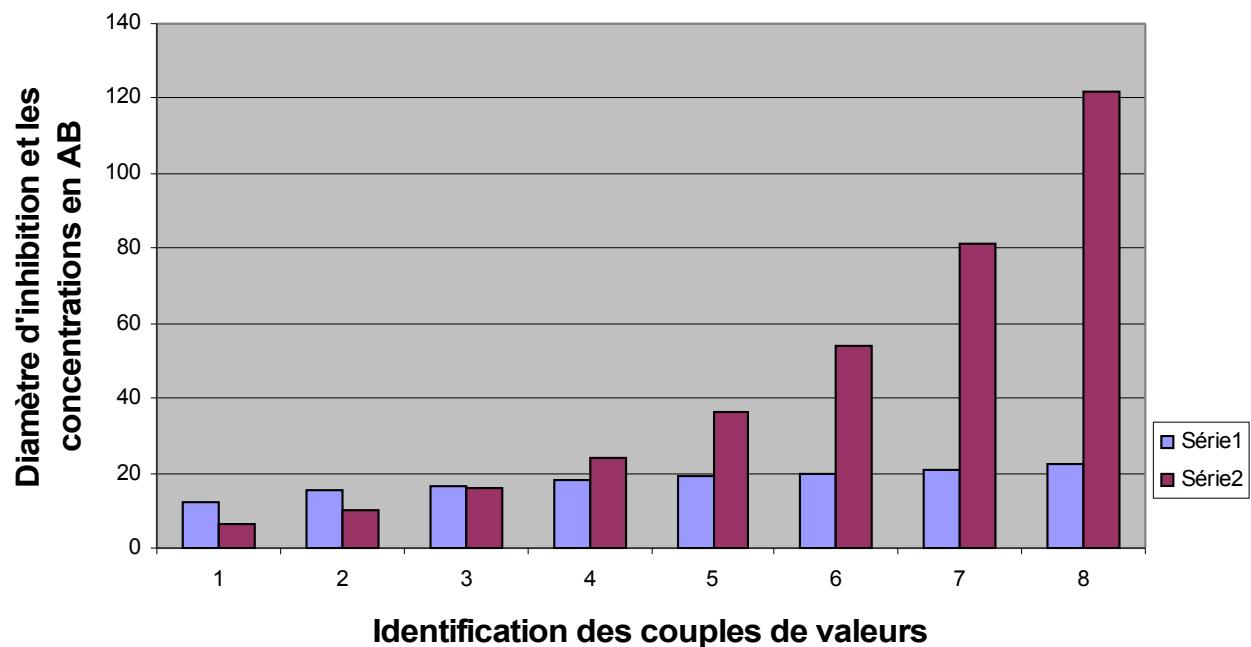


Figure n°7: Relation entre l'activité de la Furadantine et la multiplication de *Salmonella anatum*

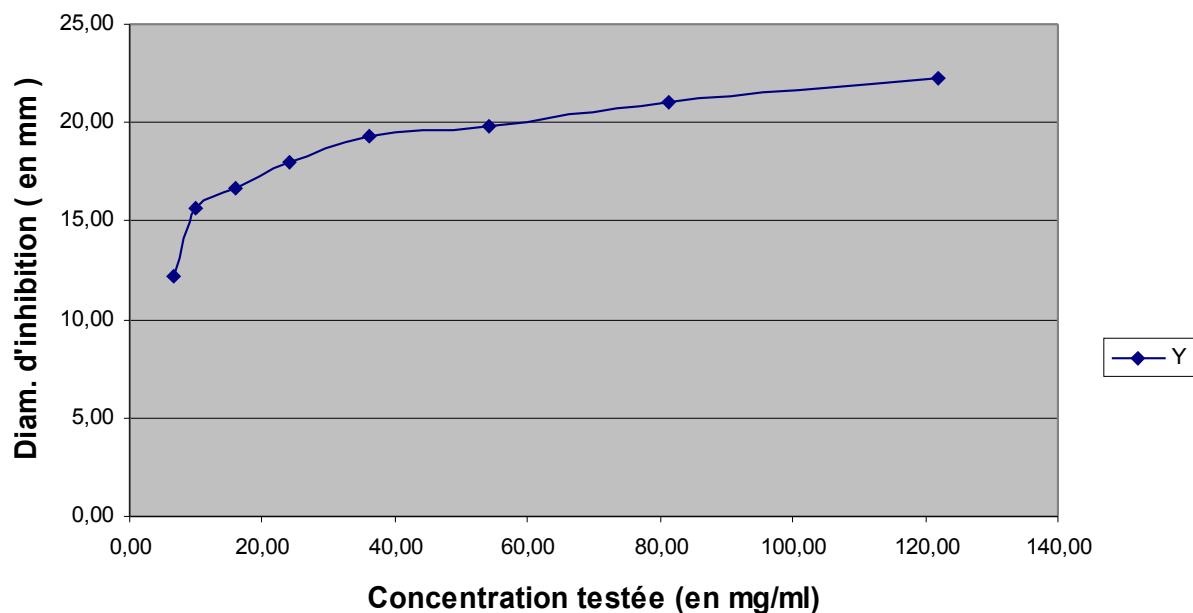


Figure n°08 : Variation de l'activité de la Furadantine en fonction de la concentration testée

Nous constatons que :

- La valeur de l'activité antibactérienne augmente avec celle de la concentration de la furadantine.
- Variant très rapidement au début les valeurs de l'activité tendent vers un plateau de saturation.

II.3.2.2 Test de liaison entre les deux variables : [46]

Le coefficient de corrélation r a comme formule générale :

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}}$$

(Les calculs intermédiaires sont rapportés dans l'annexe 06).

Et nous avons trouvé $r = 0.86$

Nous pouvons calculer la valeur de t par la formule suivante :

$$t = \frac{r}{\sqrt{1 - r^2}} \times \sqrt{n - 2}$$

n désigne le nombre de couple de valeurs

Et nous avons : $t = 4.164$

Le risque α correspondant peut être obtenu en consultant la table de t pour d.d.l. = 6. [46]
4,164 correspond à $\alpha < 0,05$

On peut alors en déduire que la liaison est significative à 0.5%

Calcul des pentes :

Les pentes sont obtenues à partir de cette formule:

$$P_0 = \frac{\sum ((X - m_X)(Y - m_Y))}{\sum (X - m_X)^2}$$

Tableau n° 18: Tableau récapitulatif de la variation de la pente

Intervalle de considération		Pentes
Limite inférieur	Limite supérieur	
6,6	10	1,029
10	16	0,167
16	26,1	0,127
36,1	54,2	0,029
54,2	122	0,020

II.3.3. Test avec l'extrait purifié EAQ/R4/Lyo :

II.3.3.1 Variation de l'activité avec la concentration testée :

La variation du diamètre d'inhibition en fonction de la concentration est rapportée dans le tableau 19.

Tableau n° 19 : Variation du diamètre d'inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus* en fonction de la concentration de l'extrait EAQ/R4/Lyo

Identification	C1b	C2b	C3b	C4b	C5b	C6b	C7b	C8b
X (en mg/ml)	4.5	8.5	12.5	23.8	36.1	54.2	81.3	150
Y (mm)	6	6	7	9	10	12	14	15
	6	6	7	9	08	10	13	14
	6	6	7	9	08	10	12	15
	6	6	7	9	10	12	14	15
	6	6	7	9	10	12	14	13
	6	6	7	9	10	12	14	14
	6	6	7	9	10	11	13	14
	6	6	7	9	10	12	13	14
	6	6	7	9	10	12	14	14
	6.0	6.0	7,0	9,0	9,6	11,4	13,4	14,2

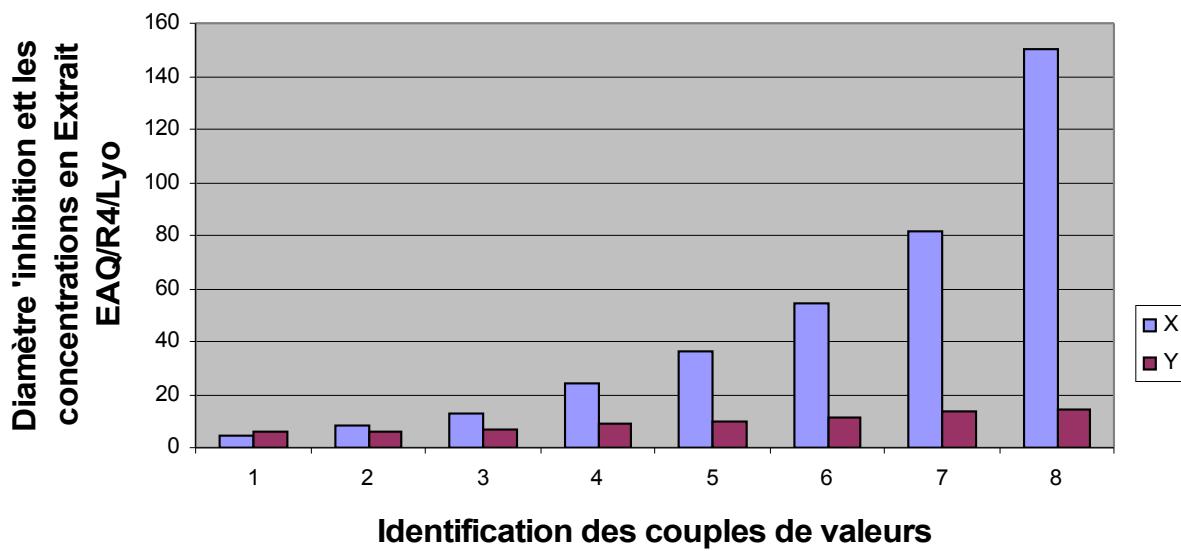


Figure n°09 : Relation entre l'activité de EAQ/R4/Lyo et la multiplication de *Salmonella anatum*

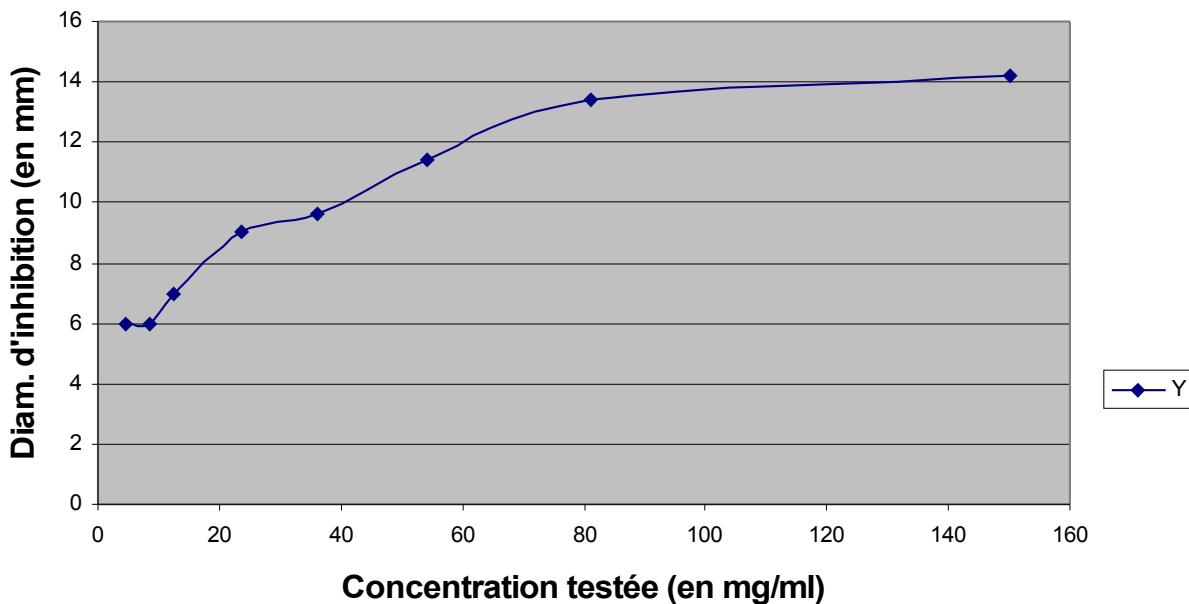


Figure n° 10 : Variation de l'activité de l'extrait EAQ/R4/Lyo en fonction de la concentration testée

II.3.3.2 Test de liaison entre les deux variables

La variation du diamètre d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait EAQ/R4/Lyo est rapportée dans l'annexe 06.

Le coefficient de corrélation r est : $r = 0.916$

La valeur de t est : $t = 5.592$

Le risque α correspondant peut être obtenu en consultant la table de t pour d.d.l. = 6 5.592 correspond à $\alpha < 0.05$

La valeur α est inférieure à 0.05.

On peut alors en déduire que **la liaison est significative**

Les valeurs des pentes :

Tableau n° 20 : Tableau récapitulatif de la variation de la pente

Intervalle de point concerné		Valeur de la pente
Point inférieur	Point supérieur	
12,5	23,8	0,177
23,8	36,1	0,049
36,1	81,3	0,083
81,3	150	0,012

Interprétation:

La Nitrofurantoine qui est le principe actif de la Furadantine, dont l'activité a été choisie comme référence est un antibiotique antibactérien de la famille des **nitrofuranes** [50]. Elle agit par inhibition de plusieurs systèmes enzymatiques sur des espèces Gram – et Gram +. Il s'agit donc d'une toxicité sélective qui agit au niveau de « **cible cellulaire** » précis évoqué précédemment. D'après les résultats de nos essais rapportant son action sur la croissance de *Salmonella anatum*, nous constatons que :

Sur notre modèle,

- La réponse traduisant l'ampleur de l'activité est bien liée à la concentration de la substance antibiotique testée.
- L'activité est évaluable dès la concentration de 6,6 mg/ml.
- Le diamètre d'inhibition de la croissance du germe-test augmente d'une manière régulière parallèlement à l'augmentation de la concentration bien que les pentes observées soient différentes.
- Les réponses augmentent plus rapidement aux faibles concentrations et deviennent plus modérées au fur et à mesure que la concentration testée augmente.

Concernant l'extrait dénommé « **EAQ/R4/Lyo** », nous constatons que :

- La réponse traduisant l'ampleur de l'activité est aussi bien liée à la concentration de la substance testée.
- La réponse commence à être mesurable à partir de 8,5 mg/ml.
- Aux faibles doses, la réponse augmente aussi rapidement mais pas autant qu'avec la Furadantine.
- La courbe 8 est bi phasique :

On observe au niveau de la première partie une réponse plus importante à l'augmentation de la concentration testée tandis qu'au niveau de la deuxième partie, la réponse est beaucoup plus modérée.

Au stade actuel de nos travaux, l'extrait EAQ/R4/Lyo n'est qu'un extrait partiellement purifié et nous ignorons pour le moment le nombre exact des composantes chimiques actives qu'il contient et leur nature. Des études chimiques plus approfondies seraient nécessaires pour mieux interpréter ces observations.

CONCLUSION

CONCLUSION GENERALE [1]

D'après les résultats d'une enquête ethnobotanique effectuée par le Département d'Ethnobotanique et de Botanique du Centre National d'Application des Recherches Pharmaceutiques, *Protorhus ditimena* est utilisé en médecine traditionnelle malgache comme antidiarrhéique mais qu'elle est aussi toxique. Toutefois les renseignements relatifs aux réelles circonstances ou type de diarrhée au cours de laquelle son efficacité a été constatée n'ont pas été explicitement rapportés.

L'objectif de ce travail a été ainsi de contribuer à l'élaboration d'un descriptif de l'activité d'un extrait de cette plante en tant que plante médicinale antidiarrhéique.

Cette partie s'est intéressée exclusivement au caractère antibactérien et toxique de l'extrait. [27]

Le test préliminaire de toxicité aigue de l'extrait brut sur un modèle expérimental *in vivo* utilisant la souris a permis d'observer :

- Aussitôt après l'administration de l'extrait, une agitation et augmentation du rythme de la respiration à toutes les doses testées
- après 10 minutes une baisse notable d'activité motrice pour les doses élevées; suivie par un traînement des pattes ainsi qu'une baisse d'activité motrice et une piloérection aux doses plus faibles

Les signes observés laissent penser à une dépression au niveau du système nerveux central.

La dose non toxique se situerait en dessous de 110 mg/kg.

Les tests d'activité antibactérienne effectués ont permis de constater que l'extrait de *Protorhus ditimena* peut être actif aussi bien sur les bactéries Gram + que les bactéries Gram-. La sensibilité des germes tests aux différents types d'extraits obtenus à travers les trois protocoles de fractionnement effectués est très diversifiée. Par ailleurs, nous avons pu constater que l'extrait purifié EAQ/R4/Lyo aurait à la concentration testée une activité bactériostatique.

Les extraits sur lesquels nous avions effectué nos tests ne sont que très partiellement purifiés, mais nous pouvons pu constater que les meilleurs résultats ont été obtenus sur les extraits à polarité élevée. Ceci nous a donné une orientation quant à la famille chimique au sein de laquelle nous devrions ultérieurement développer notre investigation pour la caractérisation chimique du principe actif.

Ce travail nous a permis d'initier aux pratiques et conduite en laboratoire d'une évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne sur les substances naturelles d'origine végétale.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail ont ainsi permis de constater qu'effectivement *Protorhus ditimena* contient des substances à caractères antibactériens dont l'activité est mesurable *in vitro*. Le descriptif plus complet de ses caractéristiques ferait l'objet de travaux ultérieurs. Par ailleurs l'existence d'une activité toxique chez la plante a été confirmée mais d'autres travaux seront nécessaires pour mieux caractériser ces effets parallèles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LISTE DES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) ANDRIAMAMONJISOA D. Contribution à l'étude chimique et biologique d'extraits de *Buddleia madagascariensis* Lam. (F. des Loganiacées). Mémoire de DEA (Option : Biochimie médicale) Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1998. 85 p.
- 1) Associations des enseignants de pharmacologies. Paris : Edition Marketing, 1987. 523 p.
- 2) Bacteriology products. www.Liofilchem.Com. Italy : Liofilchem, 2002. (17/11/06)
- 3) BELOT A. Dictionnaire des arbres et arbustes de jardin. Paris : Bordas, 1978 ; 383 p.
- 4) BOITEAU P. Précis de Matière Médicale Malgache (Médecine traditionnelle et pharmacopée). Paris : ACCT, 1986 ; 141 p.
- 5) BRUMMITT. R. K. Vascular plant: Families and genera. England/Royal botanic gardens Kew, 1992; 804 p.
- 6) Commission de l'Océan Indien (Projet FED/ COI/ AI RDOI). Travaux pratiques : Plantes médicinales. Avril- Mai- Juin, 1990 ; 30 p.
- 7) DE BONNEVAL P. Manuel pratique de l'herboriste. France : édition présence, p 1990 ; 417 p.
- 8) DECOSTER A., LEMAHIEU J. C., DEHECQ E., DUHAMEL M. Cours de bactériologie. <http://anne.decoster.free.fr/bgn/enterob.htm>
- 9) DUVAL C., DUVAL R. Dictionnaire de la chimie et de ses applications. 3° édition Paris : Maulde et Renou Aisne, 1978.1087 p.
- 10) GAILLARD A. La bactériologie, <http://www.maisadourseances.com/sélection.htm>.
- 11) GARNIER M., DELAMARE V. Dictionnaire des termes techniques de médecine. 20ème édition. Paris : Maloine, 1980 ; 1340 p.
- 12) HARBONE J. B. Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. 2^e édition. New York: Chapman and hall, 1984; p. 38.
- 13) HARINJATOVO H. Etude chimique et biologique d'extraits toxiques des feuilles de *Pentatropis madagascariensis* DEA de Biochimie. Antananarivo : ESS Sciences, 2001; 57 p.
- 14) HUMBERT H. Flore de Madagascar et des Comores (Plantes vasculaires) Tananarive : Imprimerie officielle ,1946 ; 85 p.
- 15) JEANNODA V. Etudes chimiques, biochimiques et toxicologique du principe convulsivant des CONNARACEES de Madagascar. [Thèse de Doctorat d'Etat en

- Sciences]. Strasbourg : Université Louis Pasteur, UFR des Sciences de la vie et de la terre, 1986.
- 16) JOUHANNEAU D. G. La médecine des plantes aromatiques. La Réunion : Azalée éditions, 1991 ; 153 p.
- 17) KORTE F. Methodicum chimicum: A critical survey of proven methods and their application in chemistry, natural science, and medicine. Volume 11, part 3. USA: Academic press; 1978.
- 18) LACHANCE W. Eléments de microbiologie et notion pratique de laboratoire. 37^è édition. Québec : Les presses de l'université Laval, 1963 ; 168 p.
- 19) LAUTIER J. Pharmacodynamie (T. P.) : Analyses biologiques et biochimiques. 2^{ème} année. Montpellier : Université des Sciences et techniques du Languedoc. p. 74.
- 20) LARPENT J. P., GOURGAUD M. L. Microbiologie pratique. Paris : Hermann Collection Méthode, 1970 ; 203 p.
- 21) LALANIRINA R. S. Rapport de stage au CNRP du 02 oct. au 21 oct. 1995. Antananarivo : Université d'Antananarivo (IAA) , 1 995. 30 p.
- 22) LAMBIN S., GERMAN A. Précis de microbiologie. Tome 1. Paris : Masson et Cie. P 56- 57.
- 23) LECHAT P. + coll. Abrégé de pharmacologie médicale. 3^è édition. Paris : Masson, 1978. 677 p.
- 24) LENDER T., DELAVAUT R., LE MOIGNE A. Dictionnaire de biologie. France : Presse universitaire, 1979. 437 p.
- 25) MABBERLEY D.J. The plant-book: A portable dictionary of the Vascular plants. 2^{ème} édition. Cambridge: University Press, 1997 ; 858 p.
- 26) MAMINILAINORO L. Etude de l'activité antidiarrhéique des extraits bruts de la plante D2. Mémoire de DEA de Pharmacologie. Université d'Antananarivo, 1996.
- 27) Ny AINA M. Contribution à l'étude d'une plante à activité antiplasmodiale : *Rhus taratana* (Anacardiacées). Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme d'ingénieur en génie chimique. Antananarivo : ESPA, 2005 ; p. 30- 35.
- 28) PERNET R. Les plantes médicinales malgaches: Mémoire de l'Institut Scientifique de Madagascar. Paris : Muséum de l'Histoire Naturelle, 1959. 217-303 p.
- 29) PERRIER H. Développe et fabrique vos extraits végétaux. France : [Nat'inov.](http://www.nat-inov.com/)
- 30) PERRIER H. Distribution et écologie à madagascar. <http://mobot-mobot.org/w3T/search/vast.html/>.

- 31) RABESA Z, RAKOTOBE E., RASOLOMANANA C., RANDRIANASOLO S., RAKOTOVAO J., RAMAROSON B. Pharmacopées de l' Ambongo et du Boina. Antananarivo : CIDST, 1993. 727 p.
- 32) RAKOTO- RATSIMAMANGA A., BOITEAU P., MOUTON M. Eléments de pharmacopée malagasy. Antananarivo : Imprimerie nationale, 1969. 306 p.
- 33) RAMANANJANAHARY A. R. Caractérisation de composant actif de l'HE d'écorce de cannelle : essai de quantification de leur effet inhibiteur sur *Staphylococcus aureus*. Mémoire de DTS en biotechnologie. Antananarivo : ISPM, 2003
- 34) RAMAMONJISOA N. S. Etude chimique et toxicologique des principes toxiques de graines de *Mimusops commersonii* (Sapotacée) ; Mémoire de DEA en Biochimie médicale. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2004.
- 35) RANAIVOARISOA S. L. Rapport de stage au CNRP. Antananarivo : IAA, 21 octobre 1995, 26p.
- 36) RANDRIANAIVO H. R. Purification et caractérisation des principes actifs d'*Albizia arenicola*. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1996 ; 63 p.
- 37) Rapport préliminaire d'une épidémie internationale d'infections à *Salmonella anatum* ; in Peer-reviewed European information on communicable disease surveillance and control. Volume 2. [<http://www.eurosurveillance.org/em/v02n03/0203.124.asp>], 1997. (25/07/07) ; p. 22- 24.
- 38) RASAMIARIMANANA A. P. Contribution à l'étude de quelques souches colibacillaires pathogènes chez les porcs. Mémoire de DEA (Biochimie Pharmacodynamie). Antananarivo : Université d'Antananarivo. 1996 ; 79 p.
- 39) RAZAFINDRAKOTO N. Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne d'extraits d'HE de l'écorce de cannelier (*Cinnamomum Zeylanicum*). Mémoire de DEA en Biotechnologie- Microbiologie. Antananarivo : Université d'Antananarivo.
- 40) RETBI J. M. Atlas de soins : Contrôle de l'infection. Paris : édition Vigot, 1983 ; 159 p.
- 41) RICHARD C., KIREDJIAN M. Méthodes de laboratoires pour l'identification des bacilles à gram négative, aérobies stricts. 2^{ème} édition. Paris : Institut Pasteur, 1995 ; 332 p.
- 42) ROULIER G. Les huiles essentielles pour votre santé. France : édition Dangles, 1990. 335 p
- 43) RUBIN M. Que sais-je ? La Phytothérapie. 1[°] édition. France : Presses Universitaires, 1988. 123p.
- 44) SANDBERG F. Criblage pharmacologique de plantes médicinales. Suède : Université d' Uppsala (Faculté de Pharmacie).

- 45) SCHWARTZ D. Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. 2^{ème} édition. Paris 1963.
- 46) SINGLETON P. Bactériologie. 2^{ème} édition Paris.
- 47) SOIFOINI T. Etude chimique et toxicologique des extraits de racines de *Rhodocodon madagascariensis* (LILIACEES). Mémoire de DEA de Biochimie Médicale. Antananarivo : Fac des Sciences, 2006.
- 48) VALNET J. Phytothérapie : traitement des maladies par les plantes. 6^{ème} édition. Paris : Maloine, 1992 ; 712 p.
- 49) VIDAL. Furadantine : nitrofurantoine. [\[file:///c:/program%20Files/Havas%20Mediamedia/Vidal%20CD/Bin/TEMP/3296449.htm\]](file:///c:/program%20Files/Havas%20Mediamedia/Vidal%20CD/Bin/TEMP/3296449.htm) (25/01/04).
- 50) WAKASASHI. Décoction. <http://terroirs.denfrance.free.fr>. (février 2007)
- 51) WAKASASHI. Macération. <http://terroirs.denfrance.free.fr/lexique/maceration.html>. (février 2007).
- 52) WINDHOLZ M. The Merck index. USA: Merck & CO., Inc., 1976; 1313 p.

ANNEXES

Annexe 01 : L'ANTIBIOTIQUE DE REFERENCE

La FURADANTINE :
(Données extrait du Vidal 2003)

Elle a comme principe actif la Nitrofurantoine, un antibactérien urinaire de la famille des « nitrofurane ». Elle agit par inhibition de plusieurs systèmes enzymatiques sur des espèces Gram- et Gram +.

Annexe 02 : COMPOSITION DES VEHICULES

1- DIMETHYLSULFOXIDE [53]

(CH3)2 SO
Poids moléculaire: 78.13
C: 30.74%
H: 7.74%
O: 20.48%
S: 41.03%

- Composé organique et sulfuré
- Liquide très hygroscopique
- Inodore incolore
- Soluble dans:
 - L'eau
 - L' Ethanol
 - L'Acétone
 - L' Ether
 - Le Benzène
 - Le Chloroforme

DL50 oral chez le rat : >20 g/kg

Activité secondaire : anti-inflammatoire topique

2- CYCLODEXTRINE : [53]

C'est un ensemble de dégradation cyclique de l'amidon contenant 6, 7, ou 8 résidus de glucose ayant la forme de molécules à grands cycles.

La dextrine a les caractéristiques suivantes :

- Le terme inclut des produits obtenus par l'hydrolyse de l'amidon par certaines substances enzymatiques ou par une hydrolyse contrôlé d'amidon humide.
- Les extraits de couleur blanche sont pratiquement inodores.
- Ils sont solubles dans 3 fois leur volume dans l'eau bouillants ; moins soluble dans l'eau froide et insoluble dans l'alcool et l'éther.

- Utilisation :

- Comme excipient pour les extraits secs
- Pour la préparation d'émulsion et de produit pour bandage sec.
- Pour notre cas, on l'utilise pour rendre gommeuse l'extrait à tester.

Annexe 03 : COMPOSITIONS ET PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE:

1. EAU PEPTONNEE :

- Composition en g/l d'eau distillée :
 - Peptone de macération de viande
 - Chlorure de sodium
 - Hydrogeno- phosphate disodique
 - Dihydrogeno - phosphate de potassium
- pH = 7,2 + 0,1

(Réf. : E. Merck ; code : 7228)

- Préparation :

25,5 g du milieu est solubilisé dans l'eau distillée chauffée, puis distribué dans des tubes de 16 à un stérilisé dans l'autoclave à 121°C pendant 15 mn.

2. MUELLER HINTON :

- Composition en g/l :

- Infusion de viande de bœuf	2
- Hydrolysat acide de caséine	17,5
- Amidon de maïs	9
- Agar bactériologique	15
- pH = 7,4 + 0,2

(Réf. : Liofilchem ; code : 610033)

- Préparation :

36 g du milieu dans 11 d'eau distillée, rendu à l'ébullition, puis autoclavé à 121°C pendant 15 mn, après la stérilisation, le milieu est distribué dans des boîtes de Pétri à raison de 20 ml par boîte, environ 3 à 4 mm d'épaisseur.

3. MILIEU HAJNA –KLIGLER :

- Composition en g/l :

- Peptone	20
- Extrait de viande	3
- Extrait de levure	3
- Lactose	10
- Glucose	1
- Sulfate ferreux	0,3
- Chlorure de sodium	5
- Hyposulfite de sodium	0,3
- Agar	15
- Rouge de phénol	0,025
- pH = 7,4

- Préparation :

56 g du milieu déshydraté est solubilisé dans 11 d'eau distillée, jusqu'à l'obtention de suspension homogène. Le milieu est porté à l'ébullition jusqu'à une complète dissolution.

Le pH doit ajuster avant de repartir une quantité suffisante par tube de façon à obtenir, après refroidissement, un culot de 2,5 cm et une tranche.

La stérilisation a été dans l'autoclave 115° c pendant 15 min

Enfin, les tubes sont inclinés en bonne position et les maintenus jusqu'à la solidification du milieu.

4. MILIEU MANNITOL- MOBILITE :_

- Composition (en g/ l)

- Peptone	20
- Nitrate de potassium	1
- Mannitol	2
- Rouge de phénol à 1%	4
- Agar	4

pH = 8,1 – 8,2

- Préparation :

28 g du milieu déshydraté est solubilisé dans 1l d'eau distillée .La dissolution des composants se fait par chauffage puis ébullition .Il faut ajuster le pH avant la distribution dans des tubes à essai, de façon à un obtenir un culot de 6 à 7 cm

Enfin, la stérilisation du milieu est par la chaleur humide de l'autoclave 120°C pendant 15mn.

5. MILIEU AB :

- Composition en g/l :

- Extrait de viande	1,5 g
- Extrait de levure	1,5 g
- Peptone bactériologique	7,5 g
- Glucose	1,5 g
- Chlorure de sodium	3,5 g
- Phosphate monoacide de potassium	3,68g
- Phosphate diacide de potassium	1,32 g

pH = 7

- Préparation :

Le milieu est solubilisé dans 1l d'eau distillée, puis autoclavé. La stérilisation se fait en absence du glucose, après la vérification du pH.

La stérilisation du glucose se fait par la filtration au microfiltre millipore (avec 25µm de diamètre de chaque pore)

Après le mélange des 2 solutions, le milieu est distribué dans des erlens meyers à un volume de 100ml.

Annexe 04 : COMPOSITIONS DES COLORANTS :

1. FUSCHINE DE ZIEL :

- Fuschine basique	0,3 g
- Alcool 95°	10 ml
- Phénol cristallisée	5 g
- Eau distillée	95 ml

Dissoudre la fuschine basique dans l'alcool. Dissoudre le phénol dans l'eau distillée. Mélanger les 2 solutions.

2. LUGOL :

- Iode 3 g
- Iodure de potassium 9 g
- Eau distillée 900ml

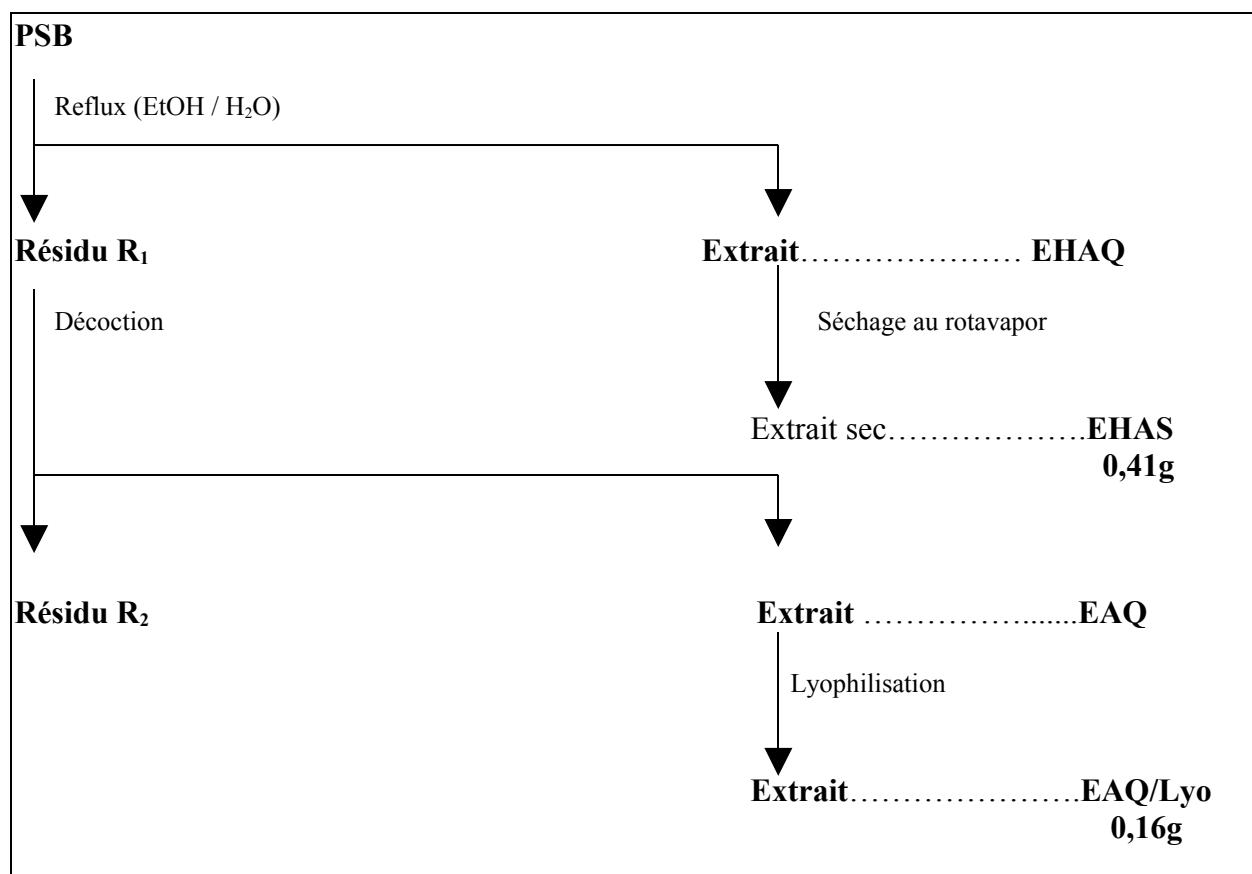
Broyer dans un mortier l'iode et l'iodure en présence de 1 à 2 ml d'eau, la dissolution est rapide. Verser peu à peu le complément d'eau distillée en continuant à broyer.

Annexe 05 : ETUDES PHYSICO- CHIMIQUES :

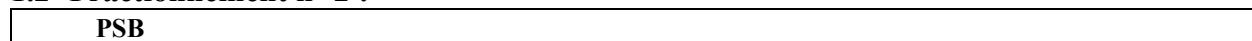
1. Extraction chimique :

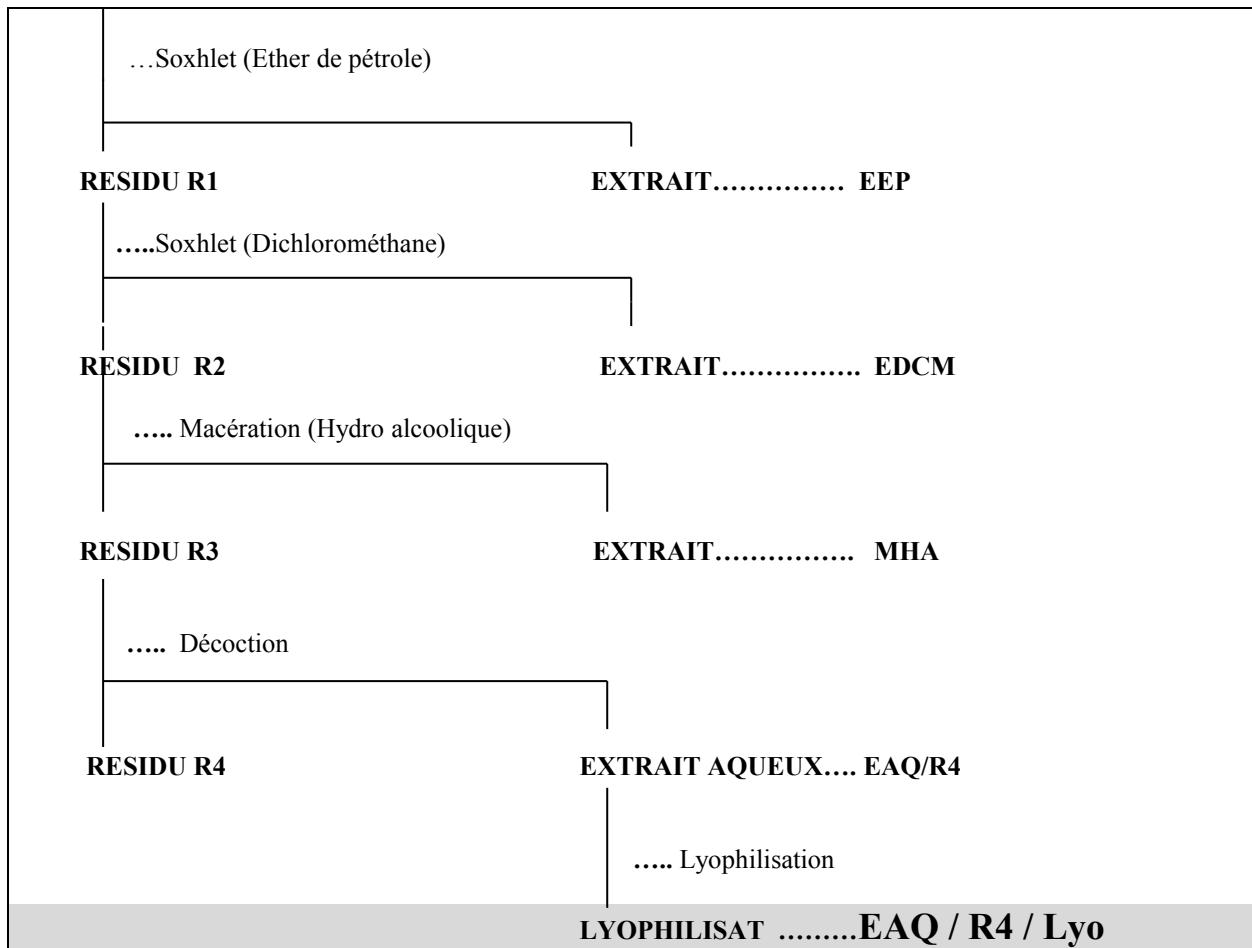
Les extraits chimiques utilisés pendant les tests antimicrobiens sont obtenus par ces fractionnements suivants :

1.1- Fractionnement n° 1 :

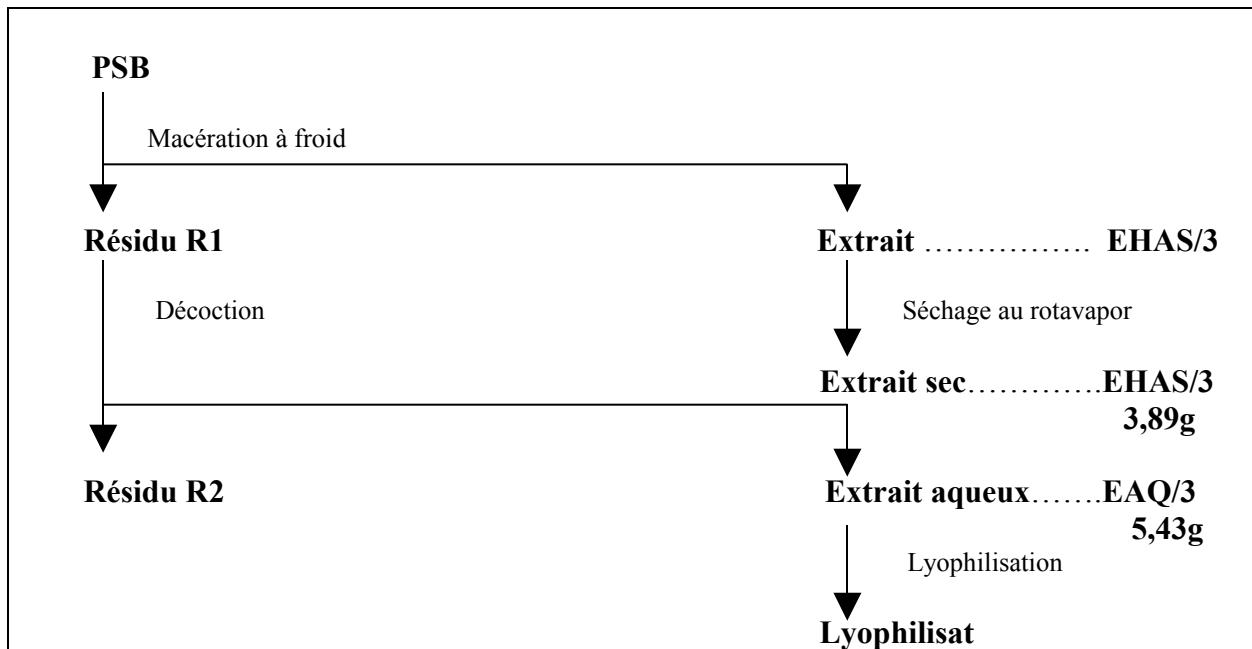


1.2- Fractionnement n° 2 :





1.3- Fractionnement n° 3 :



2- Caractéristiques des extraits obtenus :

Les caractéristiques des extraits obtenus sont résumés dans ce tableau :

Fractionnement n°	Identification des extraits	Noms des extraits	Texture
1	EHAQ	Extrait hydroalcoolique aqueux	Aqueux
	EHAS	Extrait hydroalcoolique sec	Sec
	EAQ/Lyo	Extrait aqueux lyophilisé	Lyophilisat
2	EEP	Extrait de l'éther de pétrole	Visqueux
	EDCM	Extrait dichlorométhane	Sec
	MHA	Extrait de macération hydroalcoolique	Visqueux
	EAQ/R4/Lyo	Extrait aqueux lyophilisé	Lyophilisat
3	EHA/3	Extrait hydroalcoolique 3	Aqueux
	EHAS/3	Extrait hydroalcoolique sec 3	Sec

3- Réactifs de Godin : (Godin en 1959)

Il est préparé en mélangeant des volumes égaux d'une solution éthanolique de Vanilline 1% avec une solution d'acide ferchlorique à 3%. Les plaques de Silice sont giclées successivement avec ce réactif, puis avec une solution éthanolique d'acide sulfurique à 10%. Elles sont ensuite chauffées avec une sèche cheveux jusqu'à l'apparition des taches colorées à la lumière visible. C'est un réactif polyvalent.

Annexe 06 : TEST DE LIAISON ENTRE LA CONCENTRATION DE LA SUBSTANCE ANTIBACTERIENNE ET L'ACTIVITE OBSERVEE :

I. Les calculs intermédiaires pour la détermination de liaison entre la croissance de *Salmonella anatum* et la concentration de la Furadantine, sont rapportés dans le tableau suivant.

N°	X	Y	(X-mX)	(Y-mY)	(X-mX) x (Y-mY)	(X-mX) ²	(Y-mY) ²
1	6.6	12.2	-37.18	-5.95	221.22	1382.35	35.4
2	10	15.7	-33.78	-2.45	82.76	1141.09	6.00
3	16	16.7	-27.78	-1.42	39.45	771.73	2.02
4	24	18.0	-19.78	-0.12	2.37	391.25	0.01
5	36.1	19.3	-7.68	1.18	-9.06	58.98	1.39
6	54.2	19.83	10.42	1.71	17.82	108.58	2.92
7	81.3	21	37.52	2.88	108.06	1407.75	8.29
8	122	22.3	78.22	4.18	326.96	6118.37	17.47
Total					789.58	11380.1	73.52
Moyenne	mx=43.78	my=18.12					

$$r = \frac{789.58}{\sqrt{11380.1 \times 73.52}} = 0,86$$

II. La variation du diamètre d'inhibition de la croissance de *Salmonella anatum* en fonction de la concentration de l'extrait EAQ/R4/Lyo est rapportée dans le tableau suivant :

N°	X	Y	(X-mX)	(Y-mY)	(X-mX) x (Y-mY)	(X-mX) ²	(Y-mY) ²
1	4.5	6.0	-41.86	-3.58	149.86	1752.26	12.82
2	8.5	6.0	-37.86	-3.58	135.54	1433.38	12.82
3	12.5	7.0	-33.86	-2.58	87.36	1146.50	6.66
4	23.8	9.0	-22.56	-0.58	13.08	506.95	0.34
5	36.1	9.6	-1.26	0.02	-0.21	105.27	0.00
6	54.2	11.4	7.84	1.82	14.27	61.47	3.31
7	81.3	13.4	34.94	3.82	133.47	1220.80	14.59
8	150	14.2	103.64	4.62	478.82	10741.25	21.34
Total					1012.19	16.969,9	71.88
Moy.	mx=46.36	My=9.58					

Le coefficient de corrélation r est :

$$\mathbf{r = 0.916}$$

Auteur : RABODOMALALA Violette

Titre : Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne et toxicologique d'un extrait de *Protorhus ditimena* (Anacardiacees)

ABSTRACT :

Protorhus ditimena is an endemic ANACARDIACEAE of Madagascar and traditionally used to treat diarrhoea. As part of this DEA memory, the toxicity and the antibacterial activity of the extracts obtained from the leaves and stems of *Protorhus ditimena* have been evaluated.

The extract PSB caused toxic effects to mice when administered by intraperitoneal route at a single injection, and produced symptoms which may be linked to a central nervous system depression. The LD 50 ranged between 0.51 and 0.525 mg/kg.

Fractionation of the extract PSB by partition involving solvents of increasing polarity yielded the active fraction coded EAQ/R4/Lyo.

The phytochemical screening of the extract PSB and EAQ/R4/Lyo particularly revealed the presence of steroids and phenolic compounds in appreciable amounts. Nevertheless, the thin layer chromatography assay demonstrated the presence of other compounds.

The extract EAQ/R4/Lyo showed good antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* (Gram +) and *Escherichia coli* (Gram -). The CMI and the CMB values were 5.08 and 8,9 mg/ml respectively. Moreover, the extract had a bacteriostatic effect at the concentration used. Assay against other gram negative bacteria gave a good glimpse of its antibacterial activity spectrum.

The results obtained during this works provide support to the traditional uses of this plant in some cases of diarrhoea of infections origin.

Encadreurs : Docteur ANDRIANTSOA Maminirina

Co- encadreur : Docteur RAMAMONJISOA Daniel

Mots clés : *Protorhus ditimena*, ANACARDIACEAE, phytochemistry, Toxicity, Antibacterial activity

Auteur : RABODOMALALA Violette

Titre : Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne et toxicologique de *Protorhus ditimena* (ANACARDIACEES)

RESUME :

Dans le cadre de ce mémoire, des activités toxiques et antibactériennes ont été étudiées dans des extraits de feuilles et de tiges de *Protorhus ditimena*, une ANACARDIACEAE endémique de Madagascar.

L'étude de la toxicité aigue, en injection unique, et par voie intra péritonéale, nous a montré que l'extrait brut dénommé **PSB** est toxique et provoque chez la souris des signes liés à une « dépression au niveau du système nerveux central ». La DL_{50} se situe entre 0,51 et 0,525 mg/kg.

Le fractionnement chimique effectué sur PSB par l'action successive de solvants à polarité croissante nous a conduit à l'extrait dénommé EAQ/R4/Lyo, qui est plus active, et retenu pour la suite de nos travaux.

Les tests de criblages phytochimiques effectués sur les extraits PSB que EAQ/R4/Lyo ont révélé en particulier la présence abondante de stéroïdes et de composés phénoliques. Toutefois, selon les résultats obtenus par chromatographie sur couche mince, d'autres familles chimiques seraient également présentes à ce stade de la purification.

L'étude de l'activité antibactérienne a démontré que :

- EAQ/R4/Lyo est actif aussi bien sur *Staphylococcus aureus*, une bactérie à Gram positif, et *Escherichia coli* un bactérie à Gram négatif.
- Par ailleurs, des tests effectués sur d'autres bactéries à Gram négatif ont donné un aperçu sur le spectre d'activité.
- Concernant son activité sur *Staphylococcus aureus*, la valeur de la CMI est de 5,08 mg/ml et celle de la CMB de 8,9 mg/ml.
- Aux concentrations testées, l'extrait a un effet bactériostatique.

La plante *Protorhus ditimena* est utilisée à Madagascar, en médecine traditionnelle comme antidiarrhéique. Les travaux effectués dans le cadre de ce mémoire apportent la preuve plaident en son utilisation dans certains cas de diarrhée d'origine infectieuse.

Encadreur : Docteur ANDRIANTSOA Maminirina

Co- encadreur : Docteur RAMAMONJISOA Daniel

Mots clés : *Protorhus ditimena*, ANACARDIACEES, phytochimie, Toxicité, Activité antibactérienne