

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	i
LISTE DES FIGURES.....	iii
LISTE DES TABLEAUX	v
INTRODUCTION.....	1
PARTIE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE SUR <i>RAZAFIMANDIMBISONIA MINOR</i> ET LA FAMILLE VEGETALE RUBIACEAE	
I-1-Données botaniques	2
I-1-1- Systématique botanique.....	2
I-1-2- Brève description de la famille de Rubiaceae	2
I-1-3- Description du genre <i>Razafimandimbisonia</i>	3
I-1-4- Espèce <i>Razafimandimbisonia minor</i> (Baill.) Kainul. &B.Bremer	3
I-1-4-1-Description botanique	3
I-1-4-2-Utilisation traditionnelle	4
I-1-4-3-Distribution géographique	4
I-2-Données chimiques et biologiques antérieures	6
I-2-1-Données chimiques antérieures	6
I-2-1-1-Quelques données chimiques d'une espèce de la tribu Alberteae	6
I-2-1-2-Quelques données chimiques des espèces de la tribu Gardenieae.....	6
I-2-2-Données biologiques antérieures	8
I-3- Notions générales sur une famille chimique caractéristique des Ixoroïdeae : terpénoïde ...	9
I-3-1-Monoterpènes	9
I-3-2-Sesquiterpènes	10
I-3-3-Diterpènes	11
I-3-4-Stéroïdes et triterpènes.....	11
PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODES	
II-1-Matériels	13
II-1-1-Matériel végétal.....	13
II-1-2- Matériels techniques.....	13
II-2-Méthodes d'études chimiques préliminaires	14
II-2-1 Criblages phytochimiques	14
II-2-1-1-Criblage des alcaloïdes	14
II-2-1-2-Screening des stéroïdes, triterpénoïdes et hétérosides cardiotoniques	15

II-2-1-3-Screening des iridoïdes.....	16
II-2-1-4-Screening des flavonoïdes	16
II-2-1-5-Screening des coumarines	17
II-2-1-6-Screening des anthraquinones et des anthracénosides.....	18
II-2-1-7-Screening des hétérosides cyanogènes	18
II-2-1-8-Screening des tanins et polyphénols.....	19
II-2-1-9-Screening des saponines	19
II-2-1-10-Screening des polysaccharides	20
II-2-2- Extractions et CCM préliminaires.....	20
II-3-Techniques d'extraction et fractionnement par partage liquide-liquide.....	20
II-3-1- Extraction par macération	20
II-3-2-Extraction par partage liquide-liquide.....	21
II-4-Purification et isolement par chromatographie.....	22
II-4-1-Chromatographie sur couche mince (CCM)	23
II-4-1-1-Principe.....	23
II-4-1-2-Mode opératoire	23
II-4-2-Chromatographie sur colonne ouverte	23
II-4-2-1-Principe.....	23
II-4-2-2-Mode opératoire	24
II-5-Techniques d'analyses spectrales	24
II-5-1- Spectrométrie de masse.....	24
II-5-2- Spectroscopie de RMN	25
II-6-Etudes biologiques.....	25
II-6-1-Recherche de l'activité antibactérienne	25
II-6-1-1-Souches et milieux de cultures utilisées	25
II-6-1-2- Méthode bioautography.....	26
II-6-1-3-Antibiogramme.....	27
II-6-2-Recherche d'activité antiplasmodiale.....	27
II-6-2-1-Paludisme	27
II-6-2-2-Test antiplasmodial.....	28

PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS

III-1- Résultats chimiques préliminaires	29
---	-----------

III-1-1- Résultats de criblage phytochimique	29
III-1-2- Résultats des extractions à petites échelles et des CCM préliminaires sur les tiges et les feuilles de <i>R. Minor</i>	30
III-2- Résultats d'extraction à grande échelle et de partage liquide-liquide.....	31
III-3- Purification et Isolement	32
III-3-1-Fractionnement de l'extrait AcOEt de ROL734LF1	32
III-3-2-Purification des fractions LF7 et LF8	34
III-3-3-Purification de la fraction LF9	34
III-3-4-Purification des fractions LF12, LF13 et LF14	35
III-3-5-Purification des fractions LF15, L16 et LF17.....	36
III-3-6- Purification des fractions LF18 et LF19	37
III-3-7-Purification des fractions LF20 et LF21	37
III-3-8-Conclusion sur les purifications.....	38
III-4- Analyses spectrales des produits isolés.....	39
III-4-1-Résultats spectrales sur l'ensemble des produits isolés	39
III-4-2- Détermination structurale du produit LF9-4.....	39
III-4-2-1- Identification des spectres sur le produit LF9-4.....	39
III-4-2-2-Etude du spectre de masse.....	41
III-4-2-3-Examen des spectres RMN 1D	41
III-4-2-3-1- Spectre RMN ¹ H de LF9-4.....	41
III-4-2-3-2-Spectre RMN ¹³ C J modulé de LF9-4	44
III-4-2-3-3-Spectre DEPT 135 du produit LF9-4	45
III-4-2-4-Examen des spectres RMN 2D	46
III-4-2-4-1-Spectre HSQCed du produit LF9-4.....	46
III-4-2-4-2- Spectre RMN COSY de LF9-4	50
III-4-2-4-3-Spectre HMBC de LF9-4	53
III-5- Résultats biologiques	60
III-5-1- Evaluation de l'activité antibactérienne.....	60
III-5-1-1-Par méthode bioautography	60
III-5-1-2-Par méthode d'antibiogramme	62
III-5-2-Evaluation de l'activité antiplasmodiale.....	63
III-5-3-Conclusion partielle sur les résultats et discussions	65
CONCLUSION GENERALE	66

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES WEBOGRAPHIQUES

ANNEXES

LISTE DES ABBREVIATIONS

%	: Pourcent
–	: Négatif
+	: Positif
°C	: Degré Celsius
µg	: microgramme
µl	: microlitre
δ	: déplacement chimique
λ	: longueur d'onde
1D	: monodimensionnel
2D	: bidimensionnel
AcOEt	: Acétate d'éthyle
Bi(NO ₃) ₃	: Nitrate de Bismuth
¹³ C	: Carbone 13
CCM	: Chromatographie sur Couche Mince
CD ₃ OD	: Méthanol deutérié
CH ₂ Cl ₂	: Dichlorométhane
CI	: Concentration d'inhibition
cm	: centimètre
COSY	: COrrélation SpectroscopY
CuSO ₄	: Sulfate de Cuivre
(d)	: doublet
(dd)	: doublet dédoublé
DEPT	: Distorsionless Enhancement by Polarization Transfert
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
ESI	: ElectroSpray Ionisation
FeCl ₃	: Chlorure ferrique
h	: heure
¹ H	: proton
HCl	: Acide chlorhydrique
HCN	: Cyanure d'hydrogène
HgCl ₂	: Chlorure mercurique (II)
H ₂ O	: Eau

H ₂ SO ₄	: Acide sulfurique
H ₃ PO ₄	: Acide phosphorique
HSQCed	: Heteronuclear Single Quantum Correlation édité
HMBC	: Heteronuclear Multiple Bound Correlation
Hz	: Hertz
ICM	: Incomplet Media
J	: Constante de couplage
KI	: Iodure de potassium
m	: mètre
(m)	: multiplet
MeOH	: Méthanol
Mg	: Magnesium
ml	: millilitre
mm	: millimètre
mn	: minute
(m/v)	: masse/volume
m/z	: rapport de masse à la charge
N	: Normalité
n°	: numéro
NaCl	: Chlorure de sodium
NH ₄ OH	: Ammoniaque
nm	: nanomètre
ppm	: partie par million
r	: rendement
R _f	: Référence frontale
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
(s)	: Singulet
UV	: Ultraviolet
(v/v)	: volume/volume

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Photo de <i>Razafimandimbisonia minor</i>	4
Figure 2: Carte de distribution géographique de <i>Razafimandimbisonia minor</i>	5
Figure 3: Terpenoïdes isolés chez des espèces appartenant à la sous famille Ixoroideae	7
Figure 4: Exemples de quelques monoterpènes	9
Figure 5: Squelette iridoïde	10
Figure 6: Exemples de quelques sesquiterpènes	10
Figure 7: Exemples de quelques diterpènes	11
Figure 8: Exemples de quelques triterpènes et stéroïdes.....	12
Figure 9: Diagramme d'extraction par partage liquide-liquide.....	22
Figure 10: Résultats de CCM des fractions hexanique, AcOEt et aqueuse de <i>Razafimandimbisonia minor</i> (feuilles et tiges).....	30
Figure 11: Résultats et protocole d'extraction à grande échelle	31
Figure 12: Diagramme de fractionnement de ROL734LF1	33
Figure 13: Isolement de LF7-5	34
Figure 14: Profil CCM de la fraction LF7-5	34
Figure 15: Isolement de LF9-1, LF9-4, LF9-6 et LF9-7	35
Figure 16: Chromatogramme des fractions LF9-1, LF9-4, LF9-6 et LF9-7	35
Figure 17: Isolement de LF12-5	35
Figure 18: Profil CCM de la fraction LF12-5	36
Figure 19: Isolement de LF15-2 et LF15-7.....	36
Figure 20: Profil CCM des fractions LF12-5 et LF12-7	36
Figure 21: Isolement de LF18-4.....	37
Figure 22: Profil CCM de la fraction LF18-4	37
Figure 23: Isolement de LF20-4 et LF20-12	38
Figure 24: Profil CCM des fractions LF20-4 et LF20-12	38
Figure 25: Spectre de masse en ESI ⁻ (S1a) et ESI ⁺ (S1b) de LF9-4	41
Figure 26: Spectres RMN ¹ H S2a et S2b de LF9-4	42
Figure 27: Spectre RMN ¹³ C J modulé S3 de LF9-4	44
Figure 28: Squelette ursane d'un triterpène pentacyclique	45
Figure 29: Spectre DEPT 135 S4 de LF9-4	45
Figure 30: Spectre HSQCed S6 de LF9-4.....	47
Figure 31: Structure probable de LF9-4.....	49

Figure 32: Spectre COSY (S5a et S5b) de LF9-4	51
Figure 33: Spectre HMBC S7 de LF9-4	53
Figure 34: Structure du produit LF9-4	60
Figure 35: Exemples des résultats montrant l'inhibition de la souche bactérienne par méthode Bioautography par les extraits : Zones d'inhibitions (entourées en rouge).....	61
Figure 36: Activité des 4 extraits de ROL734LF1	62
Figure 37: Résultats des tests antiplasmodiaux sur les extraits.....	64

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Données biologiques des espèces de la sous-famille Ixoroideae	8
Tableau 2: Les matériels utilisés au cours de ce travail	13
Tableau 3: Les germes utilisés pour les tests	26
Tableau 4: Norme utilisée pour la lecture des résultats par la méthode d'antibiogramme	27
Tableau 5: Résultats de criblage phytochimique des feuilles et des tiges de <i>Razafimandimbisonia minor</i>	29
Tableau 6: Résultat de l'extraction à petite échelle de tiges et feuilles de la plante	30
Tableau 7: Résultats d'extraction à grande échelle et de partage liquide-liquide.....	31
Tableau 8: Résultats d'analyses spectrales des produits envoyés et analysés en RMN.....	39
Tableau 9: Identifications des spectres de LF9-4.....	40
Tableau 10: Informations tirées du spectre RMN ¹ H de rm-4	43
Tableau 11: Corrélations observées dans le spectre HSQC	48
Tableau 12: Déplacements chimiques de ¹ H et de ¹³ C dans CD ₃ OD de LF9-4.....	50
Tableau 13: Différentes corrélations observées sur le spectre COSY de LF9-4.....	52
Tableau 14: Corrélations observées sur le spectre HMBC	54
Tableau 15: Liste des extraits de ROL734LF1 testés	60
Tableau 16: Effet des extraits bruts de ROL 734 LFI et de ROL 734 STI sur la croissance des bactéries	61
Tableau 17: Effet des extraits sur la croissance des bactéries.....	63

INTRODUCTION

Madagascar est reconnue pour sa richesse en biodiversité floristique et faunistique. En effet, sa flore est une des plus riches et des plus diversifiées au Monde [33]. Il compte environ 12 000 espèces avec un taux d'endémisme élevé de 96% [32]. L'utilisation thérapeutique des vertus des plantes pour le traitement des maladies est très ancienne. Plus de 80% de la population mondiale ont recours à des plantes médicinales pour se soigner [30] et 60% de la population malgache utilisent la pharmacopée et la médecine traditionnelle pour résoudre leur problème de santé [31]. De plus, les industries pharmaceutiques modernes s'appuient largement sur la recherche des métabolites secondaires des plantes ayant une propriété biologique intéressante.

Compte-tenu de ce concept, le Centre National d'Application de Recherches Pharmaceutiques (CNARP) ayant pour mission l'investigation sur les produits naturels et la production de phytomédicaments se focalise sur la recherche de plantes médicinales de Madagascar. Parmi ses projets, l'étude des espèces de Rubiaceae s'est développée depuis quelques années au sein du CNARP. Une de ces plantes nous a été proposée comme sujet de mémoire dans le cadre de collaboration avec le Laboratoire de Chimie Organique-Spectrométrie de Masse (Faculté des Sciences) : l'espèce végétale *Razafimandimbisonia minor*. A notre connaissance, aucune étude chimique ni biologique antérieure n'a été faite sur le genre *Razafimandimbisonia*.

L'objectif principal de ce travail consiste à l'étude phytochimique et biologique des feuilles de *Razafimandimbisonia minor* en procédant à l'isolement et à la détermination structurale de ces constituants

Le présent mémoire comporte trois grandes parties :

- La première partie comprend la synthèse bibliographique sur la plante
- La deuxième partie consiste les matériels et méthodes utilisés
- La troisième partie rapporte les résultats et discussions

Des conclusions et perspectives terminent le manuscrit.

PARTIE I-SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE
SUR *RAZAFIMANDIMBISONIA MINOR* ET
LA FAMILLE VEGETALE RUBIACEAE

I-1- Données botaniques

I-1-1-Systématique botanique [1], [2]

Selon la classification de **Judd et al (1999) et de l'APG III, (2009)**, la systématique botanique de *Razafimandimbisonia minor* peut être définie comme suit :

Domaine :	EUCARYOTE
Règne :	VEGETAL
Phylum :	ANGIOSPERMAE
Sous phylum :	EUDICOTYLEDONAE
Classe :	ASTERIDAE
Ordre :	GENTIANALES
Famille :	RUBIACEAE Juss.
Sous famille :	IXOROIDEAE Raf.
Tribu :	Albeteae (APG III, 2009)
Genre :	<i>Razafimandimbisonia</i>
Espèce :	<i>Razafimandimbisonia minor</i> (Baill.) Kainul. & B. Bremer
Synonyme :	<i>Alberta minor</i>
Nom vernaculaire :	<i>Hazomborondreo, Tapialahy, Voamalitony</i>

I-1-2-Brève description de la famille Rubiaceae [3][4][5][6][7]

Au niveau mondial, la famille Rubiaceae, appelée aussi famille des caféiers sont en quatrième place parmi les plus importantes familles des plantes à fleurs et contiennent approximativement 13.200 espèces réparties dans 650 genres.

Plusieurs espèces de cette famille restent encore non identifiées ou mal décrites. Les Rubiaceae sont abondantes et omniprésentes dans les forêts tropicales humides et sèches représentant de 7 à 9 % de la phytodiversité de Madagascar.

La famille Rubiaceae compte 35 tribus regroupées en 3 grandes sous familles en fonction de la présence ou absence de raphides ou du type de fruits :

- les Rubioideae (raphides généralement présentes) : 20 tribus
- les Cinchonoideae (fruits secs, raphides absentes) : 10 tribus
- les Ixoroideae (fruits charnus, raphides absentes) : 5 tribus

I-1-3- Description du genre *Razafimandimbisonia* [2][8][9]

Le genre végétal *Razafimandimbisonia* appartient à la sous famille Ixoroideae, tribu Alberteae. Cette sous famille est définie de point de vue morphologique par les caractères des fruits, des graines et les types de placentation qui permettent de la subdiviser en cinq tribus dont l'alberteae, vangerieae, pavetteae, coffeae et gardenieae.

Le genre *Razafimandimbisonia* est endémique de Madagascar, il contient cinq espèces dont *Razafimandimbisonia minor*, *Razafimandimbisonia sambiranensis*, *Razafimandimbisonia humbotii*, *Razafimandimbisonia Orientalis* et *Razafimandimbisonia regalis*

I-1-4-Espèce *Razafimandimbisonia minor* (Baill.) Kainul. & B.Bremer

I-1-4-1-Description botanique [W3][W4]

C'est un arbre de 15m de haut et de diamètre de 25 cm, les feuilles sont simples, opposées, décussées. Le limbe oblongue, elliptique, lisse et brillant se situe à la face supérieure tandis que la nervure médiane et secondaire proéminente se trouve à la face inférieure. Les stipules sont interpétiolaires et triangulaires et l'inflorescence terminale est corymbiforme.

Les fleurs sont grandes et à 5-mères et que les calices élargis et pétaloïdes sont de couleur rouge, persistants et accrescents dans le fruit. La corolle est soudée et un peu courbée, tandis que les lobes sont un peu triangulaires, tordus et se recouvrant vers la gauche. Les étamines sont insérées vers l'apex du tube et l'ovaire infère à 2 loges avec un ovule par loge.

Le fruit est généralement grand et sec mais couronné par les lobes accrescents du calice, qui déhiscent en 2 fruits.



Figure 1: Photo de *Razafimandimbisonia minor* Source : RAKOTONANDRASANA Stéphan

I-1-4-2-Utilisation traditionnelle [10]

Les feuilles sont utilisées pour traiter les maux néphrologiques.

I-1-4-3- Distribution géographique [W1]

Razafimandimbisonia minor est endémique de Madagascar et elle est distribuée dans les montagnes et les forêts subhumides à une altitude de 500 à 2499m. Elle est rencontrée presque dans toutes les provinces notamment dans les régions d'Analamanga, Diana, Sava, Haute Matsiatra, Ihorombe, Alaotra Mangoro, Atsinanana, Atsimo-Andrefana

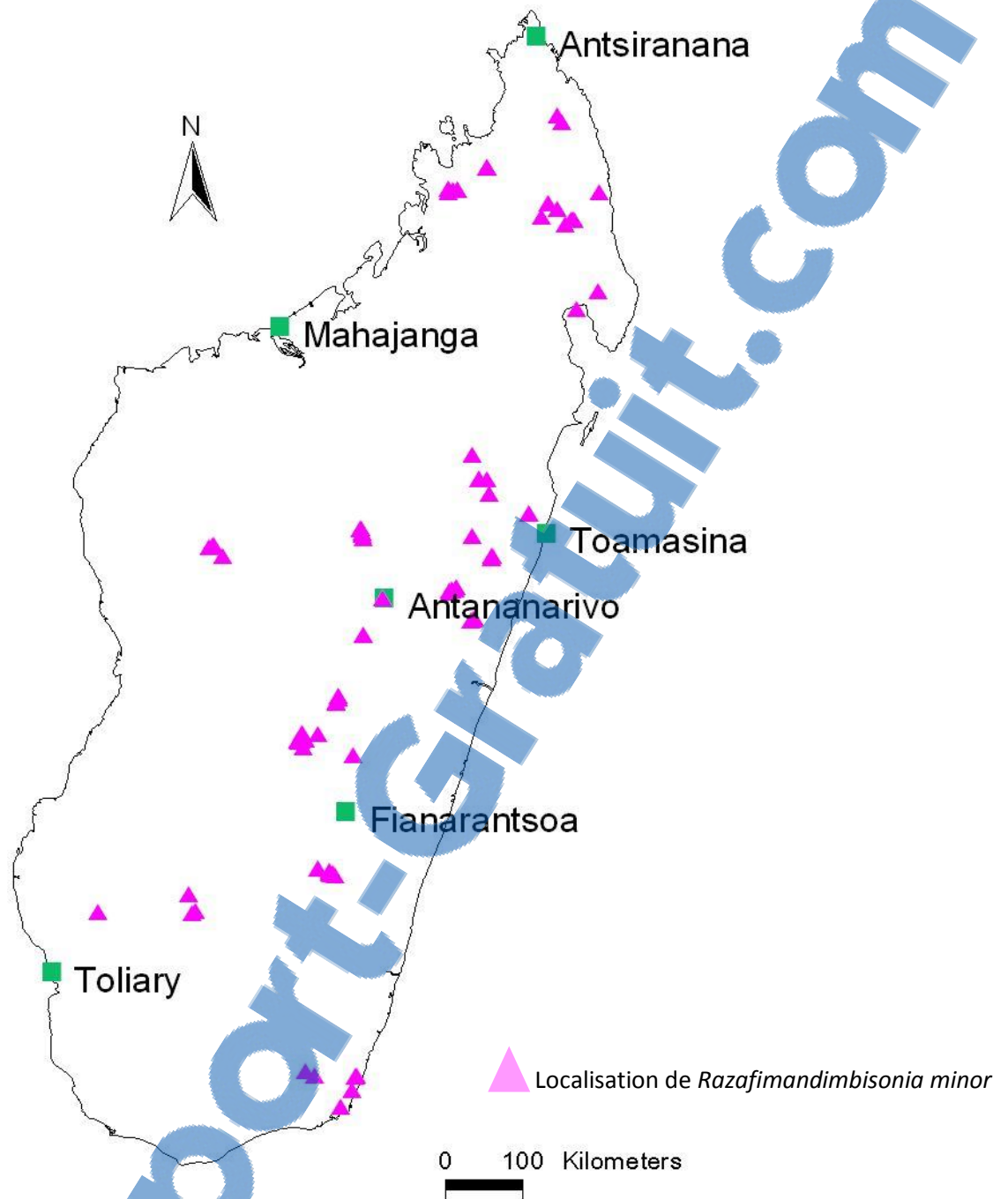


Figure 2 : Carte de distribution géographique de *Razafimandimbisonia minor*
(RAKOTONANDRASANA Stéphane)

I-2-Données chimiques et biologiques antérieures

Parmi les différentes espèces végétales de la famille Rubiaceae utilisées en médecine traditionnelle, les études bibliographiques que nous avons effectuées concernant les données chimiques et biologiques antérieures portent notamment sur les espèces des tribus de la sous-famille Ixoroideae à laquelle appartient le genre *Razafimandimbisonia*.

I-2-1-Données chimiques antérieures

I-2-1-1-Quelques données chimiques d'une espèce de la tribu Alberteae

❖ Genre *Razafimandimbisonia*

A notre connaissance, aucune étude chimique approfondie n'a été publiée sur ce genre jusqu'à présent.

❖ Genre *Alberta* [64]

Un iridolactone nommé amagnalactone (1), une autre iridoïde (2) ainsi que de cyclopentene dialdéhyde ont été isolés de l'espèce *Alberta magna*.

I-2-1-2-Quelques données chimiques des espèces de la tribu Gardenieae

❖ Genre *Duroia* [65][66]

L'espèce *Duroia hirsuta* contient une flavone, un flavonol, un iridoïde lactonique et un iridoïde tetracyclique tandis que deux terpenoïdes tels que l'acide ursolique (3) et l'acide oléanolique (4) ont été isolés de *Duroia macrophylla* Huber

❖ Genre *Rudgea* [67]

Des triterpènes et stéroïdes ont été isolés de l'espèce *Rudgea jasminoïde* : acide canarique, acide ursolique (3), acide oléanolique (4), sitostérol et stigmastérol (5)

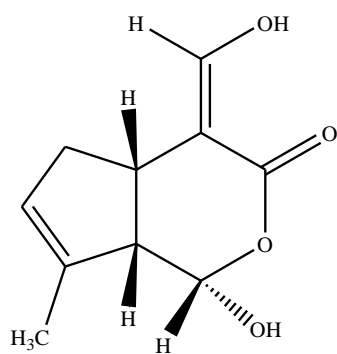
❖ Genre *Gardenia* et *Genipa* [68][69][70]

Les produits isolés de quelques espèces de *Genipa* sont essentiellement des iridoïdes comme, la génipine (6), l'acide génipinique, la géniposide (7), l'acide géniposidique isolés de *Genipa americana* tandis que les résines de *Gardenia gummifera* et de *Gardenia lucida* contiennent des cycloartanes (dikamaliartanes) et un flavonoïde (gardénine E)

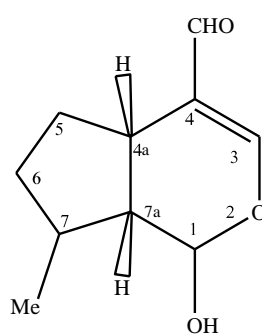
❖ Genre *Mussaenda* [71]

Des monoterpènes ont été isolés de l'espèce *Mussaenda pubescens* : mussaénins A (8), mussaénins B (9), mussaénins C (10), argyol.

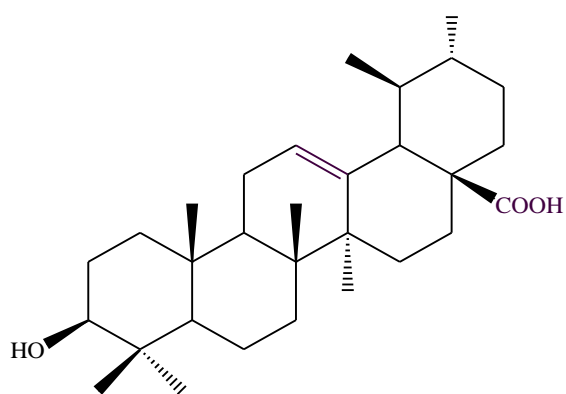
Les structures chimiques de ces produits isolés sont données dans la figure 3:



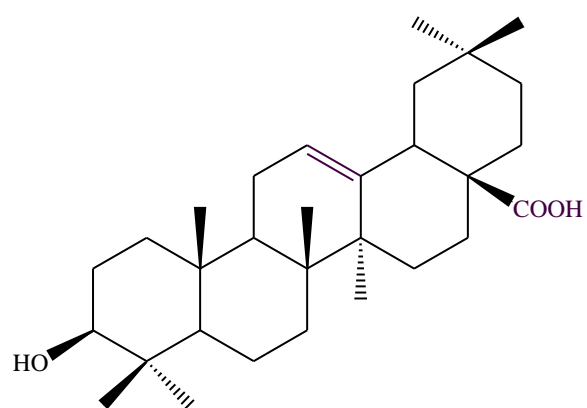
(1)
Amagnalacton



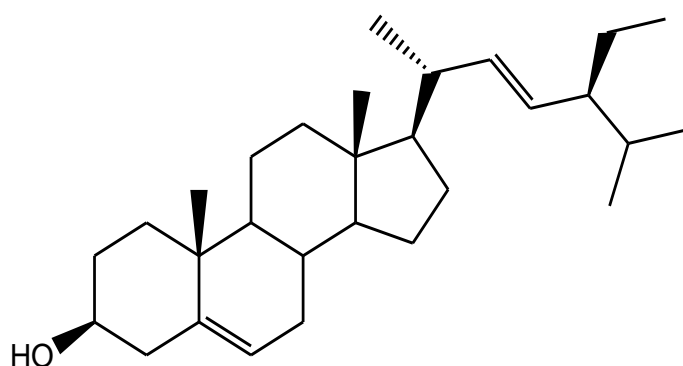
(2)
1,4a,5,6,7ahexahydro-1-hydroxy-7-methyl-cyclopenta[c]pyran-4-carboxaldehyde



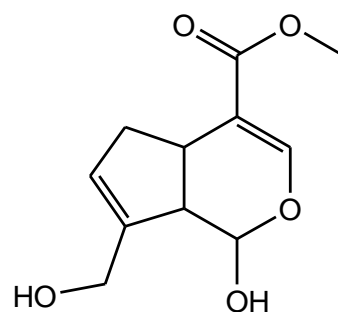
(3)
Acide ursolique



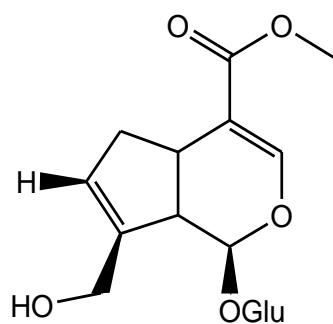
(4)
Acide oleanolique



(5)
Stigmastérol

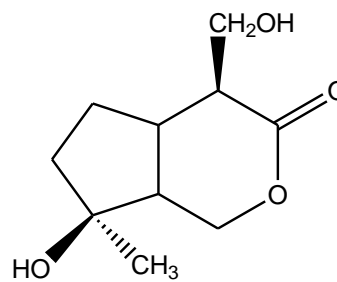


(6)
Génipine



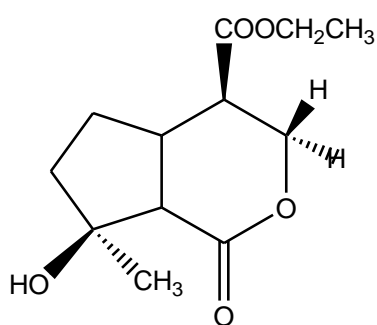
(7)

Géniposide



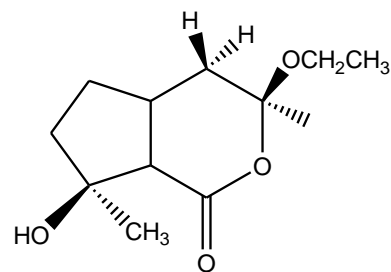
(8)

Mussaenin A



(9)

Mussaenin B



(10)

Mussaenin C

Figure 3: Terpénoïdes isolés chez des espèces appartenant à la sous famille Ixoroideae

I-2-2-Données biologiques antérieures

Les travaux biologiques réalisés sur les espèces des quelques tribus de la sous-famille Ixoroideae sont résumés dans le tableau 1:

Tableau 1: Données biologiques des espèces de la sous-famille Ixoroideae

Espèces	Activités
<i>Razafimandimbisonia minor</i>	Aucune étude biologique publiée
<i>Alberta magna</i>	Antimoustique et antipaludique [64]
<i>Duroia hirsuta</i>	Antimycobactérienne et antiviral [73]
<i>Duroia macrophylla</i>	Antimycobactérienne [66]
<i>Mussaenda pubescens</i>	Diurétique, anti-inflammatoire, antipyrétique [71]
<i>Rudgea jasminoide</i>	Traitement contre le rhumatisme, la syphilis, la tumeur [74]
<i>Genipa americana</i>	Anti-dépressive, anti-tumorale [68][69]

I-3-Notions générales sur une famille chimique caractéristique des Ixoroïdeae : terpénoïde [11][37]

Les terpénoïdes sont des métabolites secondaires synthétisés par les plantes, les organismes marins, les champignons et les animaux. Les triterpènes sont largement rencontrés dans le règne végétal. Les terpènes sont des hydrocarbures naturels provenant de la condensation tête-queue d'unités isopréniques de formule (C_5H_8) (ou unités à cinq atomes de carbone). Leurs structures peuvent être cycliques ou à chaîne ouverte. Leur formule brute est $(C_5H_x)_n$ dont x est le variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs (1-8) sauf dans les polyterpènes où n peut être plus de 100 (le caoutchouc). Les terpènes sont classés en fonction du nombre de répétition de l'unité de base isoprène. Ce sont les hémiterpènes (C_5), les monoterpènes (C_{10}), les sesquiterpènes (C_{15}), les diterpènes (C_{20}), les sesterpènes (C_{25}), les triterpènes (C_{30}), les tetraterpènes (C_{40}) et les polyterpènes

I-3-1- Monoterpènes [38][39][40]

Les monoterpènes sont des terpènes à 10 atomes de carbone ou deux unités isopréniques. Ils sont volatils, entraînaibles à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des huiles essentielles. Ils existent sous la forme des hydrocarbures simples (limonène, myrcène..), d'aldéhydes (géraniol, néral, citronellal, citral), d'alcools (géraniol, nerol, citronellol, citrol, linalol,..) et d'acides (acide linalique, acide gérannique) voire d'esters (acétate de linalyle..). Ils se trouvent également sous trois catégories de structure : les monoterpènes acycliques (comme le geraniol qui est largement répandu dans le règne végétal), monocycliques (tous les composés aromatiques comme p-cymène et ses dérivés hydroxylés) et bicycliques (tous les composés issues des conifères) suivant la condensation tête-queue des unités isopréniques.

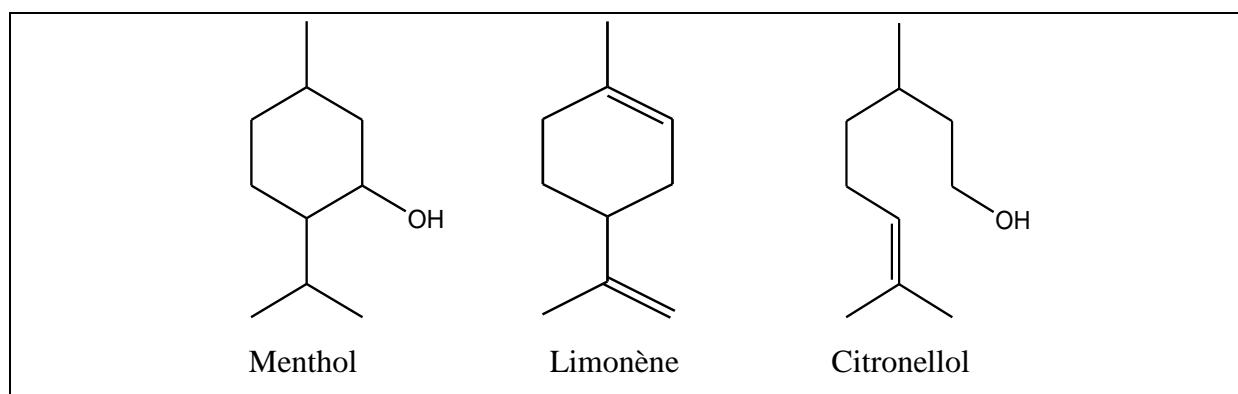


Figure 4 :Exemples de quelques monoterpènes

Parmi ces monoterpènes, les iridoïdes et les pyréthrine forment deux classes de composés tout à fait particulières des monoterpènes. Ils sont des monoterpènes caractérisés par un squelette «cyclopenta[c] pyrane », ou le squelette « iridane »

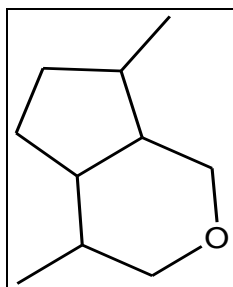


Figure 5:Squelette iridoïde

Les monoterpènes existent à l'état halogéné chez les algues et sont largement distribués chez les végétaux.

I-3-2-Sesquiterpènes [41][42]

Les sesquiterpènes sont des terpènes constitués de 15 atomes de carbones. ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme : les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature. On peut également rencontrer dans les plantes des sesquiterpènes lactones, ces métabolites secondaires issus par l'oxydation d'un groupe méthyle du groupe isopropyle attaché au squelette de base sesquiterpénique pour engendrer le groupe lactone. Les sesquiterpènes et les monoterpènes sont souvent en mélange dans les huiles essentielles des plantes, notamment chez les espèces des familles labiateae, myrtaceae, pinaceae et rutaceae.

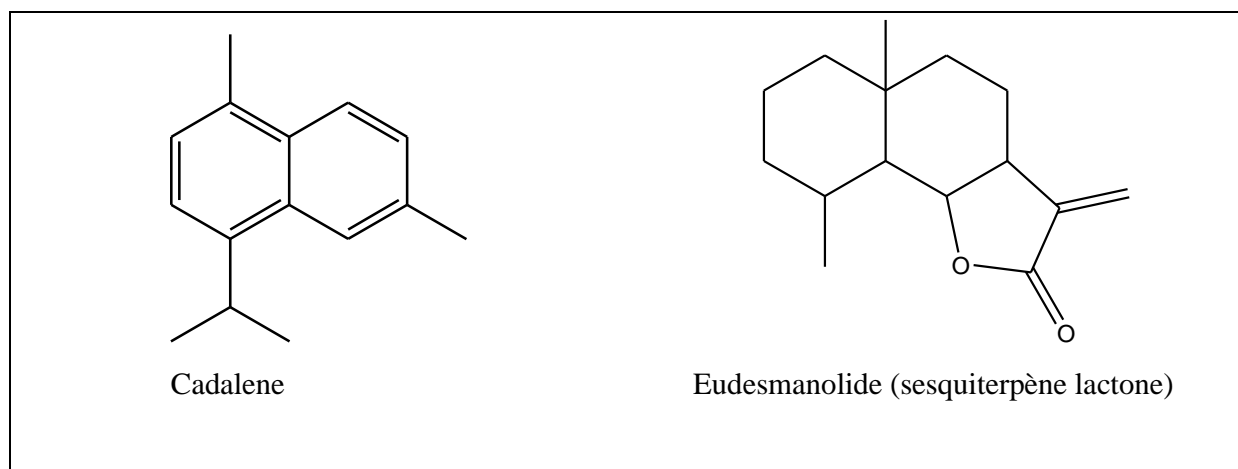


Figure 6 : Exemples de quelques sesquiterpènes

I-3-3-Diterpènes [43][44][45]

Les diterpènes forment une série des composés qui renferment de 20 carbones. Ce sont des composés formés par quatre unités isopréniques qui sont très répandus dans les végétaux supérieurs et sont présent également chez les insectes et les organismes marins. Ils peuvent aussi être trouvés dans les résines ou les gommages naturelles. Il est rare de rencontrer les diterpènes comme constituants des huiles essentielles, à cause de leurs points d'ébullition très élevés. Ils peuvent être acycliques ou cycliques. Le phytol et la vitamine A sont les alcools les plus importants dans la série des diterpènes qui sont indispensables à la croissance et à la vue des mammifères.

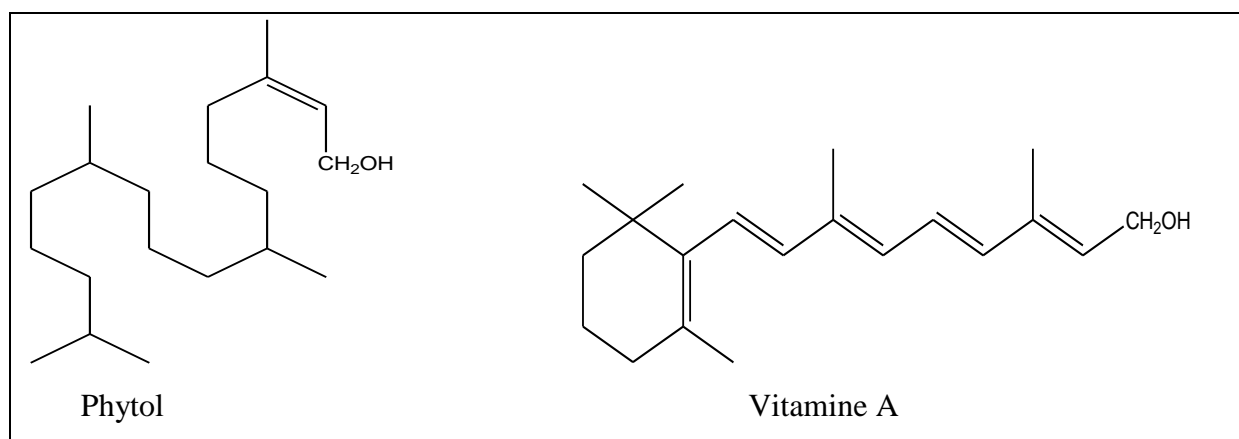


Figure 7 : Exemples de quelques diterpènes

I-3-4- Triterpènes et stéroïdes [46][47][48]

Les triterpènes comportent six unités isopréniques. Ils diffèrent des stéroïdes par l'absence de trois groupements méthyles (CH₃-) sur le squelette de base. Les stéroïdes et les triterpènes peuvent être acycliques ou cycliques. Les triterpènes tétra et pentacycliques sont courants.

La famille des triterpènes tetracycliques présente une importance particulière par son homogénéité et surtout par ses rapports étroits avec les stéroïdes. Leur structure de base commune est le noyau stérane, et ils peuvent se trouver à l'état libre ou sous forme d'ester (stéride) ou sous forme d'hétéroside dans les résines. Les triterpènes et leurs dérivés sont intégralement biosynthétisés par tous les êtres vivants avec deux exceptions : les bactéries qui ne les utilisent pas et les insectes qui les empruntent aux plantes souvent de façon spécifique puis les transforment.

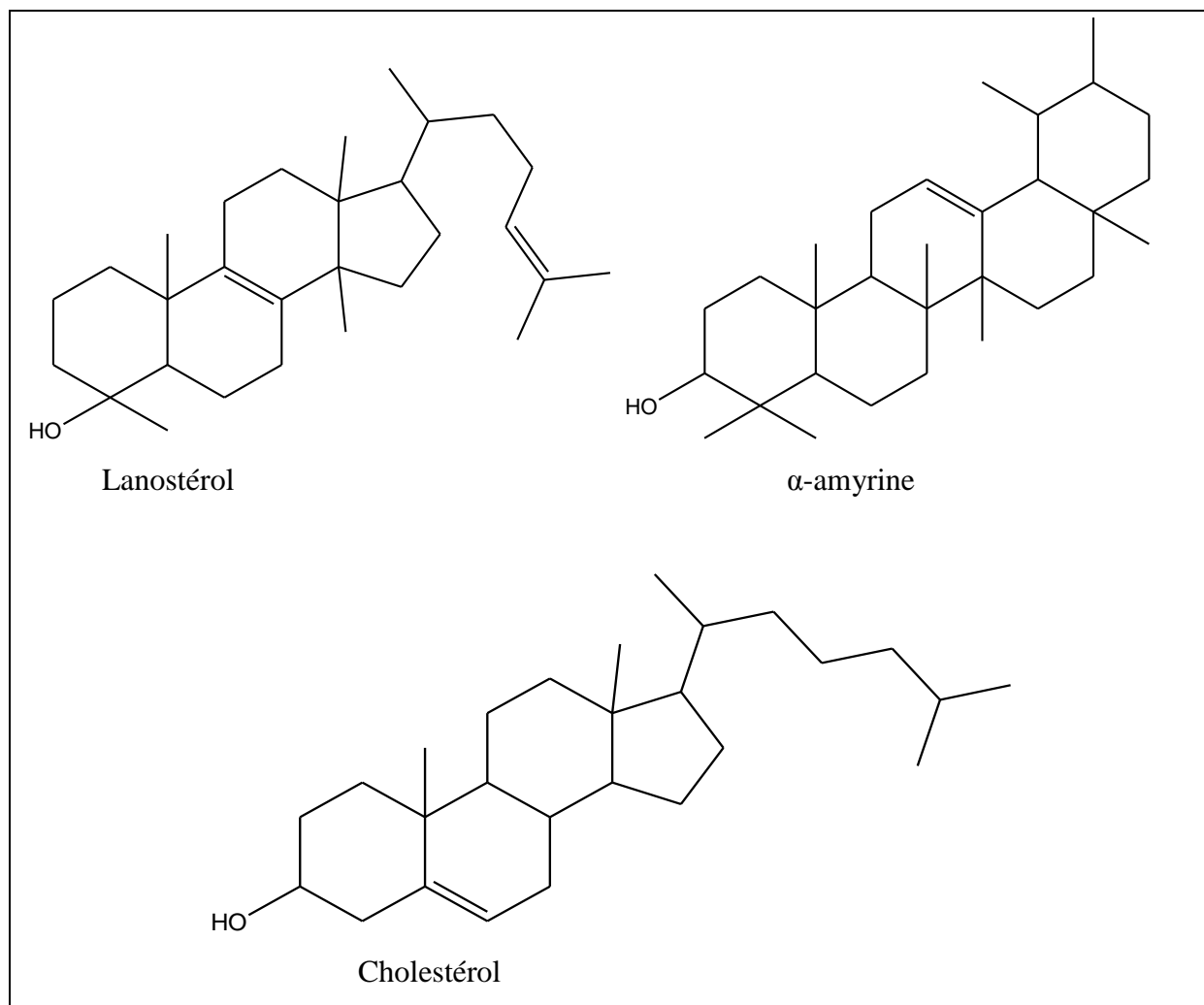


Figure 8 : Exemples de quelques triterpènes et stéroïdes

PARTIE II- MATERIELS ET METHODES

II-1- Matériels

II-1-1-Matériel végétal

L'échantillon a été récolté le mois d'Octobre 2014 par RAKOTONDRAJAONA Rolland et RAKOTONANDRASANA Stéphan à Andaingomadinika fokontany Ampitambe district de Moramanga. La plante a été identifiée par les botanistes du CNARP et un herbier de référence y est déposé.

Les échantillons ont été cueillis avec leurs rameaux, les feuilles sont ensuite arrachées manuellement et les tiges sont coupées avec un sécateur. Les deux parties ont été ensuite séchées puis broyées à l'aide d'un broyeur mécanique à hélice jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Les différentes poudres ont été conservées dans des sachets scellés dans un endroit sec à l'abri de la lumière et de la chaleur.

II-1-2-Matériels techniques

Ils constituent tous les matériels et appareils ainsi que les verreries utilisés dans le laboratoire. Ils sont cités dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2 : Matériels utilisés au cours de ce travail

Appareils	<ul style="list-style-type: none">- Evaporateur rotatif (BUCHI R-210 Waterbath B-180)- Lampe UV SPECTROLINE $\lambda = 254\text{nm}$- Pulvérisateur- Pistolet chauffante- Balance METTLER TYPE AM100, de portée max=100g ;- Balance METTLER TYPE AM 300 de portée max=300g ;- Bain thermostaté MEMMERT à température réglable de 20°C à 110°C- Déssicateur- Azote liquide
------------------	--

Matériels d'analyse	<p>Plaque CCM : plaques CCM ALUGRAM SIL G/UV254 couche 0,20mm/gel de silice 60 avec indicateur de fluorescence UV254</p> <p>Colonne : colonne en verre de longueur et de diamètre variables</p> <p>Adsorbants : gel de silice (silicagel 60A 200micron)</p>
Verreries du Laboratoire	<p>Pipettes pasteur, pipettes jaugées, tubes à essais</p> <p>éprouvettes graduées, cristallisoirs, flacons, erlenmeyers, entonnoirs, ballons à fond rond, colonnes, cuves chromatographiques (rectangulaire), ampoule à décanter</p>

II-2-Méthodes d'études chimiques préliminaires

Des études préliminaires ont été faites sur l'organe de *Razafimandimbisonia minor* (tiges codé ROL734ST1 et feuilles codé ROL734LF1) afin de caractériser les différents types de métabolites secondaires susceptibles d'être présents et de choisir la partie à utiliser pour la suite de l'étude ainsi que les techniques à adopter. Ces études comportent des criblages phytochimiques, des extractions à petite échelle et des CCM préliminaires.

II-2-1- Criblages phytochimiques [34][W2][35]

Le criblage phytochimique est une analyse chimique qualitative basée sur des réactions de coloration ou de précipitation, plus ou moins spécifiques à chaque classe de principes actifs.

Les criblages sont effectués le plus souvent sur l'extrait brut hydroéthanolique, chloroformique et aqueux.

II-2-1-1-Criblage des alcaloïdes

Macération chlorhydrique

2,5g de poudre de matière végétale sèche sont macérés avec 25 ml de HCl 12% pendant 15mn. Après filtration sur coton, la solution acide obtenue est répartie en volumes égaux dans quatre tubes à essais; le tube n°1 sert de témoin, dans le deuxième tube est ajouté 5 gouttes du réactif de Wagner, dans le troisième tube 5 gouttes du réactif de Mayer et dans le quatrième

tube 5 gouttes du réactif de Dragendorff. L'apparition de précipités indique que le test est positif.

Test avec l'extrait hydroéthanolique:

A 500 mg d'extrait hydroéthanolique sont ajoutés 10 ml de HCl 2N aqueux. Le mélange est ensuite porté au bain marie bouillant pendant 5 min tout en agitant avec une baguette de verre. Après refroidissement, 0,5 g de NaCl sont ajoutés. Le mélange est alors agité et filtré. Le précipité est lavé avec un volume suffisant de HCl 2N pour ramener le filtrat à 10ml. Le filtrat est réparti en fractions égales dans 4 tubes à essai et les tests précédents (avec les 3 réactifs généraux des alcaloïdes) sont réalisés.

II-2-1-2-Screening des stéroïdes, triterpénoïdes et hétérosides cardiotoniques

Les tests sont réalisés sur l'extrait chloroformique obtenu par macération directe de poudre végétale pendant 30 min et sur l'extrait chloroformique obtenu de l'extrait hydroéthanolique. L'extrait hydroéthanolique est dépigmenté par de l'éther de pétrole, puis dissout dans du chloroforme. L'extrait chloroformique est récupéré après filtration.

➤ *Caractérisation des génines :*

Test de Liebermann-Burchard : A 2 ml de solution d'extrait sont additionnées 4 gouttes d'anhydride acétique puis 4 gouttes de H₂SO₄ concentré. Après repos, une coloration pourpre indique la présence des triterpénoïdes et une coloration bleu-vert celle des stéroïdes.

Test avec l'antimoine : Quelques gouttes de solution saturée d'antimoine sont ajoutées à 2 ml de solution d'extrait. S'il y a apparition d'une fluorescence bleue, les triterpènes sont présents, et si la fluorescence est jaune, il s'agit de stéroïdes.

Test de Salkowsky : le tube à essai contenant la solution d'extrait est incliné d'un angle de 45°. 1 ml d'acide sulfurique concentré est versé lentement. Si l'anneau de séparation de phase est rouge après 30 mn, les stéroïdes insaturés sont présents.

Test de Badget : à 2 ml de solution d'extrait sont additionnées 4 gouttes de solution aqueuse d'acide picrique à 1 % et 4 gouttes de solution aqueuse de soude à 20 % (m/v). L'apparition d'une coloration orange indique la présence de stéroïdes lactoniques.

Test de Kedde : à 2 ml de solution d'extrait sont ajoutés 4 gouttes d'une solution méthanolique d'acide 3,5-dinitrobenzoïque à 2 % (m/v) puis 1 ml d'une solution aqueuse de KOH à 6 % (m/v). L'apparition de coloration rouge indique la présence de stéroïdes lactoniques.

Test de Pesez : à 2 ml de solution d'extrait sont ajoutées 4 gouttes d'une solution méthanolique de H_3PO_4 à 2 %. L'apparition de fluorescence sous U.V. indique la présence des cardénolides.

Test de Swendsen-Jensen : à 2 ml de solution d'extrait sont ajoutées 4 gouttes d'une solution aqueuse d'acide trichloracétique à 20 % (m/v). L'apparition de fluorescence sous U.V. indique la présence des cardénolides.

➤ *Caractérisation des hétérosides :*

Réaction de Keller-Killiani

Le tube à essai contenant la solution d'extrait est incliné d'un angle de 45° . Quelques gouttes d'une solution hydroéthanolique de FeCl_3 10 % (m/v) sont versées puis quelques gouttes d'acide acétique glacial. Si l'anneau de séparation des deux phases est rouge pourpre, les hétérosides désoxy-2-sucres sont présents.

II-2-1-3-Screening des iridoïdes

Les tests sont réalisés sur l'extrait aqueux et l'extrait hydroéthanolique de matériel végétal. Trois réactions sont utilisées pour la détection des iridoïdes :

Réaction avec HCl dilué suivi de chauffage: à 1 ml de solution limpide d'extrait est ajouté 0,5 ml de HCl 12 % aqueux. Le mélange est ensuite chauffé au bain marie à 80°C pendant 2 à 3 minutes.

Réaction en présence de glycérol : le réactif est constitué d'un mélange à volume égal d'éthanol 80 %, de glycérol et de HCl 12 % aqueux préparé juste avant le test. A 1 ml de solution limpide d'extrait est ajouté 0,5 ml de ce réactif. Le mélange est ensuite chauffé au bain marie à 80°C pendant 2 à 3 minutes.

Réaction de Trim et Hill: le réactif est constitué d'un mélange à volume égal d'une solution aqueuse de CuSO_4 à 5 % (m/v) et de HCl 12 % aqueux préparé juste avant le test. A 1 ml de solution limpide d'extrait est ajouté 0,5 ml de ce réactif. Le mélange est ensuite chauffé au bain marie à 80°C pendant 2 à 3 minutes.

Pour chaque réaction, l'apparition de précipité noir après chauffage indique la présence des iridoïdes.

II-2-1-4-Screening des flavonoïdes

➤ Détection des flavones, flavonols, flavanones et flavanonols

200 mg d'extrait hydroéthanolique sont dépigmentés par 3 x 10 ml d'éther de pétrole puis dissouts dans de l'éthanol 80 %. Après filtration, la solution d'extrait est soumise aux réactions suivantes :

Test de Wilstater: 1 ml de l'échantillon est additionné de 0,5 ml de HCl concentré et de 3 tournures de magnésium. Après 10 min, l'apparition d'une coloration rouge indique la présence des flavones, l'apparition d'une coloration pourpre indique la présence de flavonols et l'apparition d'une couleur rouge violacé indique la présence de flavanones et flavanonols .

Test de Wilstater modifié: 1 ml de l'échantillon est additionné de 0,5 ml de HCl concentré et de 3 tournures de magnésium. Après dissolution du magnésium, 1 ml d'eau suivi de 1 ml d'alcool isoamylique sont ajoutés. Après 10 min l'apparition d'une coloration rouge indique la présence des flavones et l'apparition d'une coloration pourpre indique la présence de flavonols.

➤ Détection des anthocyanes

Le test est réalisé sur l'extrait aqueux et l'extrait hydroéthanolique. A 2 ml de solution d'extrait est additionné 2 ml de HCl 25 % aqueux.

L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacée par addition d'ammoniaque concentré indique la présence des anthocyanes.

➤ Détection des leucoanthocyanes (Réaction de Bate-Smith)

Le test est réalisé sur l'extrait aqueux et l'extrait hydroéthanolique. A 2 ml de solution d'extrait est additionné 2 ml de HCl concentré. Le mélange est placé au bain marie bouillant pendant une vingtaine de minutes. L'apparition d'une coloration rouge grenat indique une réaction positive.

II-2-1-5-Screening des coumarines

Les tests sont basés sur la propriété des coumarines à présenter une fluorescence nette aux rayons UV.

Test sur l'extrait hydroéthanolique : sous une lampe UV (254 nm et 366 nm), à 5 ml de solution d'extrait est ajoutée goutte à goutte une solution aqueuse de soude à 20 %.

L'apparition de fluorescence indique un test positif.

Test sur la poudre de plante: la poudre de plante est introduite au fond d'un tube à essai avec de l'eau. Dans la partie supérieure du tube est placé un papier imbibé d'une solution aqueuse de soude à 20 % (m/v). Une fluorescence nette de ce papier à la lumière UV indique une réaction positive.

II-2-1-6-Screening des anthraquinones et des anthracénosides

➤ Réaction de Bornträger

C'est une réaction colorée obtenue en dissolvant les quinones en milieu alcalin aqueux.

Test sur l'extrait hydroéthanolique : 200 mg d'extrait sont dissous dans de l'eau distillée, puis filtrés. Le filtrat est extrait deux fois au benzène. A 10 ml d'extrait benzénique est ajouté 5 ml de solution aqueuse d'ammoniaque à 20 %, puis agité. Après décantation, une coloration rouge orangé ou rouge violacé de la phase ammoniacale indique un test positif.

Test sur l'extrait chloroformique: la poudre végétale est macérée dans du chloroforme pendant 30 min. La solution extractive chloroformique est filtrée. A 2 ml de cette solution est ajoutée 1 ml de solution aqueuse d'ammoniaque à 20 %. La présence d'anthraquinones libres se traduit par une coloration rouge orangé ou rouge violacé de la phase ammoniacale.

➤ Hydrolyse acide

Détection des hétérosides anthraquinones par leur transformation en anthraquinones

Réaction avec l'acide sulfurique et le chlorure ferrique: 2 ml d'infusé est additionné de 0,5 ml d'acide sulfurique concentré et de 0,5 ml de solution aqueuse de chlorure ferrique à 5%. Le mélange est porté au bain marie bouillant pendant 30 min. Après refroidissement, la solution est épuisée par 5 ml de chloroforme. La solution organique est additionnée de 0,5 ml d'une solution aqueuse d'ammoniaque à 10 %. La présence d'hétérosides anthraquinones est révélée par une coloration rouge de la phase aqueuse.

Réaction avec HCl: le test est réalisé sur l'extrait aqueux et sur l'extrait hydroéthanolique. 100 mg d'extrait sont dissout dans une solution aqueuse de HCl 12 % par chauffage dans un bain marie bouillant. Après refroidissement, la solution est épuisée par du chloroforme.

La solution chloroformique est évaporée à sec, et l'extrait est dissout dans une solution aqueuse d'ammoniaque à 20 %. Une coloration jaune qui vire au rouge par chauffage au bain marie apparaît en présence des hétérosides anthracéniques.

II-2-1-7-Screening des hétérosides cyanogènes :

Le test, appelé test de Grignard, consiste à hydrolyser les hétérosides cyanogènes dans la poudre végétale en composés carbonylés et acide cyanhydrique. Cet acide sera détecté par la variation de la coloration du papier Whatmann, imprégné de solution aqueuse de picrate de sodium.

3 g de poudre végétale sont introduits au fond d'un tube à essai avec 1 ml d'eau. A la plante humectée sont ajoutés 1,5 ml de chloroforme. Le tube est bouché en coinçant une bandelette de papier Whatmann imprégné de solution de picrate de sodium (le papier est initialement

jaune). Le tube à essai fermé est laissé au bain marie à 35 °C pendant une nuit. Le papier coloré prend une teinte rouge en cas de libération de HCN par la plante (c'est-à-dire que les hétérosides cyanogènes sont présents).

II-2-1-8-Screening des tanins et polyphénols :

➤ Tests généraux des composés phénoliques :

Les tests sont effectués sur l'infusé et sur l'extrait hydroéthanolique.

Réaction avec FeCl₃: 5 gouttes de FeCl₃ en solution méthanolique à 10% sont ajoutées à la solution limpide de l'extrait. Une coloration brun-vert indique la présence de tanins condensés (tanins catéchiques ou flavanols-3 condensés et leucoanthocyanes ou flavanediols-3,4) tandis qu'une coloration bleu-noir indique la présence de tanins hydrolysables (tanins galliques ou ellagiques).

Réaction avec la vanilline chlorhydrique: A 2 ml de solution d'extrait hydroéthanolique est additionné 1 ml d'une solution hydroéthanolique à 2 % de vanilline (m/v) et 12 % de HCl. L'apparition d'une coloration rouge indique une réaction positive (présence des phénols et des flavanes).

Réactions avec la gélatine: 200 mg d'extrait hydroéthanolique sont dissout dans 15ml d'eau distillée par chauffage puis filtré. Au filtrat obtenu sont ajoutées 4 gouttes de solution aqueuse de NaCl à 10 % (m/v). Le mélange est réparti dans 3 tubes à essai :

Tube n°1: témoin

Tube n°2: ajout de 5 gouttes de solution aqueuse de gélatine à 1 % (m/v), l'apparition d'un précipité indique la présence de polyphénols.

Tube n°3: ajout de 5 gouttes de solution aqueuse de gélatine salée 1 %, l'apparition d'un précipité indique la présence de tanins.

II-2-1-9-Screening des saponines

Les saponines sont des hétérosides à génines triterpéniques ou stéroïdiques, solubles dans l'eau en formant une solution moussante après agitation. La détection des saponines repose sur la mesure de la hauteur de la mousse persistante après agitation du mélange eau – poudre végétal.

1 g de poudre végétale est agité vigoureusement et horizontalement pendant 30 s avec 10 ml d'eau distillée dans un tube à essai. La lecture est effectuée par mesure de la hauteur de mousse formée après agitation et après 10 min de repos. Le test est positif si cette hauteur de mousse atteint 3 cm et qu'elle persiste.

II-2-1-10-Screening des polysaccharides

Le test est basé sur la propriété des polysaccharides à former des précipités colloïdaux avec l'éthanol.

A un décocté limpide de poudre végétal sont additionnés 3 volumes d'éthanol 90 %. La formation d'un précipité indique la présence de polysaccharides.

II-2-2-Extractions et CCM préliminaires

Lors des études préliminaires, 25g de poudres végétales de deux organes de *Razafimandimbisonia minor* ont été macérées trois fois dans le méthanol. Les deux extraits bruts obtenus ont été subis d'un partage liquide-liquide avec l'hexane/ acétate d'éthyle puis le méthanol/eau. Des CCM ont été réalisées avec les différentes fractions obtenues en utilisant les systèmes d'éluant suivants: AcOEt 100%, CH₂Cl₂/MeOH (80/20) et CH₂Cl₂/MeOH (88/12).

II-3-Techniques d'extraction et fractionnement par partage liquide-liquide [12][13]

La méthode d'extraction consiste à obtenir la plus grande quantité possible d'une substance à extraire. Il existe deux types d'extraction :

- L'extraction liquide-liquide qui consiste en un transfert d'un soluté initialement contenu dans une phase liquide vers un solvant non miscible en fonction de sa solubilité.
- L'extraction solide –liquide qui consiste à faire passer un composé d'une matière solide (matériel végétal) dans un liquide (solvant) avec un contact prolongé à la température ambiante.

II-3-1- Extraction par macération

400g de poudres de feuilles ont été macérés dans 800ml de méthanol soumis à une agitation pendant quelques minutes à la température ambiante puis le mélange est laissé reposer dans un bocal hermétique pendant 24 heures. Les macérats obtenus sont filtrés sur coton et les marcs récupérés sont mis de nouveau en suspension dans le méthanol. Les filtrats obtenus sont ensuite évaporés à sec à l'aide d'un rotavapor dans un ballon préalablement taré à la température de 54°C.

Les extraits obtenus sont pesés et l'opération est répétée jusqu'à épuisement des poudres de la plante. Le rendement de l'extraction est calculé à partir de la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{\text{Masse d'extrait brut}}{\text{Masse de la poudre de plante sèche}} \times 100$$

II-3-2-Extraction par partage liquide-liquide

Cette étape consiste à reprendre successivement l'extrait brut méthanolique dans trois solvants de polarité différente. Il s'agit de l'hexane, l'acétate d'éthyle et de l'eau. Pour ce faire, on dissout l'extrait brut dans 300ml de méthanol puis on verse 3× 200ml d'hexane pour enlever les chlorophylles, les pigments et les matières grasses. Le mélange est agité puis laissé décanter pendant quelques minutes dans une ampoule à décanter. On récupère séparément les deux phases c'est-à-dire la phase hexanique et la phase méthanolique. Cette dernière est évaporée à sec puis dissoute de nouveau dans 300ml d'eau. On verse ensuite 3×200ml d'acétate d'éthyle dans cette solution aqueuse, après agitation, le mélange est laissé décanter puis les deux phases sont récupérées séparément. Nous avons obtenu au final trois fractions différentes : fraction hexanique, fraction acétate d'éthyle et fraction aqueuse.

Ces trois fractions sont évaporées sous vide et sont pesées, puis elles ont été testées biologiquement afin de voir les extraits les plus actifs à utiliser pour les analyses chromatographiques.

Le protocole expérimental de cette extraction est résumé dans la figure 9.

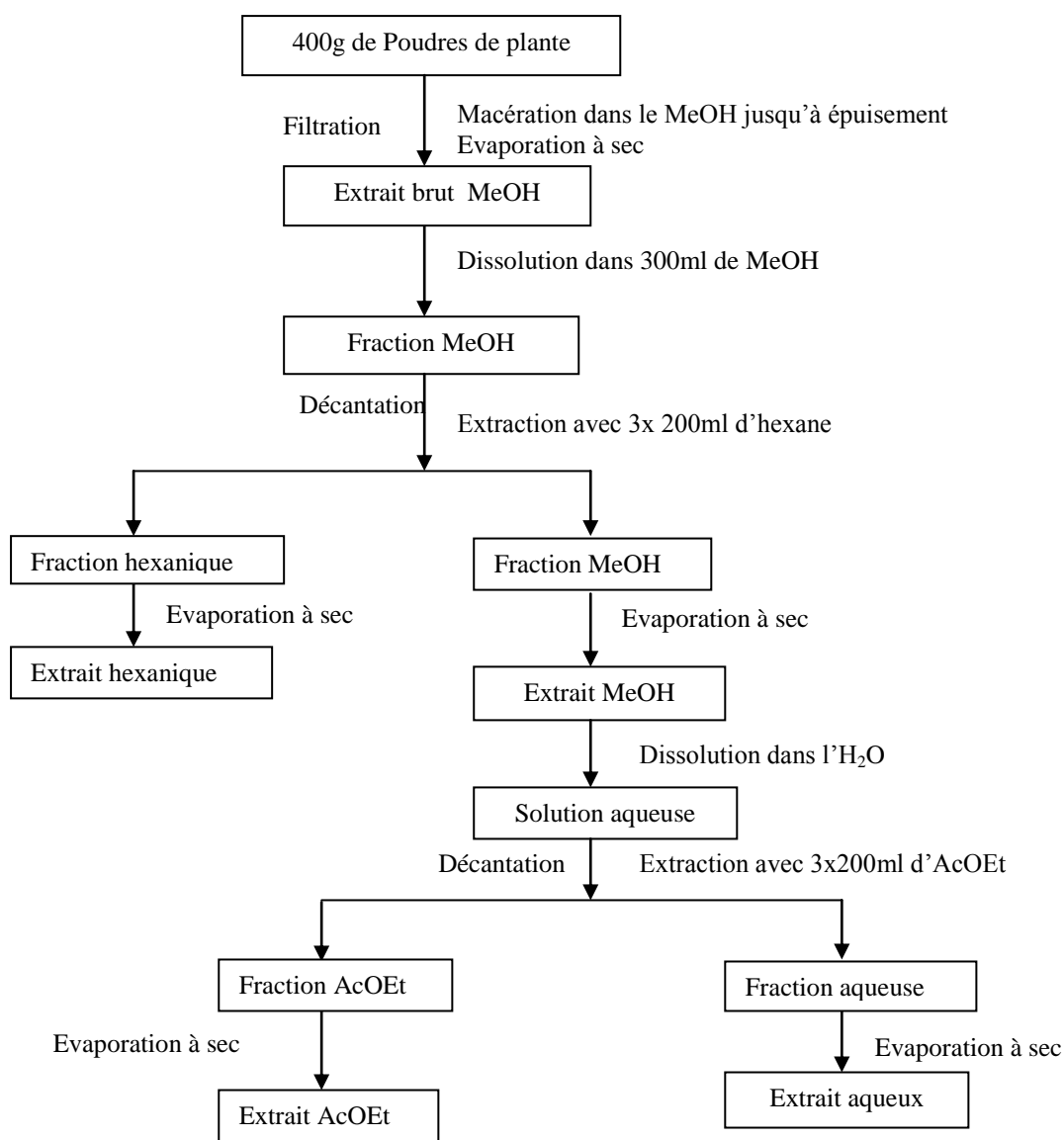


Figure9 : Diagramme d'extraction par partage liquide-liquide

II-4-Purification et isolement par chromatographie

La méthode chromatographique est une des méthodes les plus courantes pour la séparation, l'isolement, la purification des molécules

II-4-1-Chromatographie sur Couche Mince (CCM) [16][17]

II-4-1-1-Principe

C'est une chromatographie d'adsorption où la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire (généralement le gel de silice ou autre adsorbant) fixée au préalable sur une plaque de verre ou sur une feuille d'aluminium ou sur une matière plastique. Après que l'échantillon ait été déposé avec un tube capillaire, l'éluant migre par capillarité le long de la phase stationnaire en entraînant les constituants du mélange. En outre chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant et que les constituants migrent à une vitesse dépendant de leur nature et de celle du solvant. La localisation de ces constituants se fait soit par observation à l'œil nu et au rayonnement ultraviolet (UV) généralement aux longueurs d'ondes 254 nm et 365 nm, soit par révélation à l'aide de réactifs appropriés. Leurs vitesses de déplacement appelées Référence frontal (Rf) sont définies comme le rapport entre la distance parcourue par le constituant (dx) et la distance parcourue par le front du solvant à partir de la ligne de dépôts (ds).

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

II-4-1-2-Mode opératoire

Lors de l'analyse sur CCM, une cuve chromatographique préalablement préparée est utilisée en y introduisant de l'éluant qui a un niveau à environ 0,5cm du fond de la cuve pour qu'elle soit saturée de vapeur de solvant. Ensuite, la plaque chromatographique est préparée en déposant à l'aide d'un capillaire les extraits à analyser en un point situé à 1cm de son extrémité inférieure. Le diamètre des taches est environs 2mm et elles sont espacées de 8mm. La plaque a été séchée à l'aide d'un séchoir puis placée dans la cuve saturée de vapeur. Lorsque le front du solvant se trouve à 1cm de l'extrémité supérieure de la plaque, elle a été retirée et cette position a été marquée. Enfin la plaque a été séchée de nouveau à l'aide d'un séchoir puis observée sous une lampe UV avant de la pulvériser avec la vanilline sulfurique (dont la préparation est donnée dans l'annexe)

II-4-2-Chromatographie sur Colonne ouverte [14][15]

II-4-2-1-Principe

C'est une chromatographie reposant principalement sur le phénomène d'adsorption. La phase stationnaire est contenu dans une colonne et la phase mobile ou l'éluant qui est un solvant unique ou un mélange de solvant entre dans la colonne et migre par gravité le long de la phase

stationnaire. Le remplissage de la colonne se fait soit par voie humide soit par voie sèche et l'élution peut se faire soit en mode isocratique où le solvant reste constant tout au long de l'élution soit en mode par gradient si on le fait varier par augmentation progressive.

II-4-2-2-Mode opératoire

La technique de fractionnement que nous avons choisie est la chromatographie sur colonne de silice avec une méthode d'élution par gradient de solvant. Les solvants suivants sont utilisés comme éluant. L'hexane, le dichlorométhane et le méthanol.

Des colonnes en verre de différentes tailles sont utilisées suivant la quantité de produit à purifier. La phase stationnaire utilisée est le gel de silice normale 60 (0,05-0,2 mm) et les solvants cités ci-dessus sont utilisés comme phase mobile. Le mode opératoire est décrit comme suit :

L'extrait brut est dissout dans un volume minimal de solvant, puis la solution est additionnée de silice à environ 2 à 3 fois sa masse. Après évaporation sous vide, le résidu obtenu est sous forme de poudre.

La colonne a été préparée en y introduisant au fond, un petit coton hydrophile puis lavée avec quelques volumes d'hexane. La colonne a été remplie par voie humide avec une silice à environ 40 fois la masse de produit à fractionner.

Une fois la colonne est préparée, le résidu sous forme de poudre est introduit tout doucement au sommet de la phase stationnaire et une petite quantité de sable de fontaine bleu est versé au dessus du résidu pulvérisé. Les fractions recueillies sont contrôlées par CCM et sont regroupées suivant la similitude de leur chromatogramme.

II-5-Techniques d'analyses spectrales

II-5-1-Spectrométrie de masse [20][63]

La spectrométrie de masse est une méthode qui sert à déterminer la masse moléculaire d'une substance. Le spectre obtenu représente une abondance statistique de chaque type d'ion formé suivant son rapport de masse par la charge. En effet l'échantillon à analyser est introduit dans une enceinte sous vide, soumis au bombardement d'un canon à électron de grandes énergies provoquant la formation de l'ion moléculaire. Ce dernier va se fragmenter à cause de l'énergie du faisceau ionisant pour donner des pics positifs de masse plus faibles qui pourront se fragmenter à nouveau. Ces ions sont ensuite accélérés dans le champ électrique puis dirigés dans les champs magnétiques selon une trajectoire circulaire qui dépend de leur rapport masse/charge.

Il existe différents modes d'ionisation en spectrométrie de masse mais dans notre cas, nous avons utilisés le mode d'ionisation par électrospray (ESI) qui est un phénomène produit par application d'un fort champ électrique sur l'analyte en solution provoquant une accumulation de charges à la surface du liquide en sortie du capillaire pour former de fines gouttelettes hautement chargées. L'évaporation de solvant conduit au rétrécissement de la taille de ces gouttelettes jusqu'à ce que le champ électrique à leur surface soit suffisant pour provoquer la désorption des ions.

II-5-2- Spectroscopie de RMN [18] [19]

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire est une technique plus fiable pour la détermination structurale d'une molécule organique grâce au développement de la RMN à deux dimensions. Cette méthode repose sur le phénomène de magnétisme et est basée sur les noyaux possédant une propriété magnétique à spin non nul principalement le ^1H et le ^{13}C . En effet, les noyaux de ces atomes possèdent un moment magnétique nucléaire et caractérisés par une grandeur quantique appelée «spin». L'application d'un champ magnétique fort aux produits entraîne un dédoublement de niveau d'énergie de ce spin et l'absorption d'une radiofréquence adéquate par l'échantillon à analyser permet d'obtenir les spectres utiles pour la détermination structurale d'une molécule après transformé de Fourier et une interprétation bien définie. Les spectres mono et bidimensionnels sont les plus utilisés en RMN. Pour le présent travail, les produits isolés ont été analysés en RMN 1D (^1H , ^{13}C , DEPT) et en RMN 2D (COSY, HSQCed, HMBC) à l'université Paris Descartes.

II-6-Etudes biologiques

Les extraits et produits sortis des feuilles de *Razafimandimbisonia minor* ont été soumis à des tests antimicrobiens.

II-6-1-Recherche de l'activité antibactérienne [24]

Le test antibactérien est une évaluation qui permet de tester la réaction d'une bactérie vis-à-vis d'un antibiotique.

II-6-1-1-Souches et milieux de cultures utilisées

❖ Souches bactériennes utilisées

Les types des germes utilisés sont groupés dans le tableau 3

Tableau 3 : Germes utilisés pour les tests

SOUCHES	TYPES
<i>Staphylococcus aureus</i>	GRAM+
<i>Clostridium perfringens</i>	GRAM+
<i>Bacillus cereus</i>	GRAM+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	GRAM-
<i>Salmonella enterica</i>	GRAM-
<i>Escherichia coli</i>	GRAM-
<i>Shigella flexnerii</i>	GRAM-
<i>Proteus mirabilis</i>	GRAM-

❖ *Milieux de cultures utilisés*

Les milieux de cultures utilisés sont tous de qualité « pour analyse » et de marques FLUKA ANALYTICAL et DIFCO. Il s'agit de :

La gélose Mueller-Hinton est un milieu polyvalent, non sélectif utilisé pour la réalisation de l'antibiogramme standard.

L'eau peptonée et le bouillon Mueller-Hinton sont des milieux liquides servant la culture des bactéries qui ne présentent pas d'exigences particulières.

❖ *Disques utilisés*

Les disques utilisés sont des disques en papier filtre (Whatman n°3) de 6 mm de diamètre fournis par Biomérieux.

❖ *Antibiotique de référence*

La néomycine (30µg/disque) est utilisée comme antibiotique de référence

II-6-1-2-Méthode bioautography [25][26]

C'est une méthode analytique qui combine la chromatographie sur couche mince avec un test biologique. Elle étudie l'effet biologique de chaque constituant de l'extrait séparé préalablement sur CCM. Chaque constituant actif est entouré par une zone claire permettant ainsi l'isolement et l'identification des différents constituants actifs de l'extrait testé. Pour ce faire, une plaque de verre chromatographique de gel de silice est nécessaire pour déposer l'extrait à tester. Après développement du chromatogramme dans un système d'éluant adéquat (CH₂Cl₂/MeOH, 98/2), la plaque est déposée dans une boîte de Pétri. 1ml de l'inoculum à 1,5 10⁸ bactéries/ml est ajouté dans 19ml (dilué 20 fois) de milieu de culture (Mueller Hinton

agar) gardé à 45°C pour avoir un milieu pré-ensemencé. Le tout est ensuite coulé dans la boîte de Pétri contenant la plaque CCM. La boîte de Pétri est séchée sous la hotte pendant 20 min avant son incubation sous une atmosphère humide pendant 24h à 37°C.

L'apparition d'un halo d'inhibition exprimée par une zone claire sur le dépôt et/ou au niveau des autres taches indique l'activité de l'extrait.

II-6-1-3-Antibiogramme [27][28]

Le principe de cette méthode consiste à déposer des disques de papier imprégnés de l'extrait à tester sur la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Après incubation, si l'extrait a des propriétés antimicrobiennes, les disques sont entourés par des zones circulaires appelées halo d'inhibition. L'inhibition de la croissance de la bactérie est évaluée en mesurant le diamètre de cette zone d'inhibition avec une règle graduée.

Les résultats sont interprétés selon les normes de **Ponce *et al.*** (2003) et sont consignés dans le tableau 4.

Tableau4 : Norme utilisée pour la lecture des résultats par la méthode d'antibiogramme

Diamètre du halo d'inhibition (x)	Sensibilité des souches	Résultats
$x < 8 \text{ mm}$	Insensible	-
$9 \text{ mm} \leq x \leq 14 \text{ mm}$	Sensible	+
$15 \text{ mm} \leq x \leq 19 \text{ mm}$	Très sensible	++
$x > 20 \text{ mm}$	Extrêmement sensible	+++

II-6-2-Recherche de l'activité antiplasmodiale

❖ *Paludisme* [21][22][23]

Le paludisme, appelé aussi malaria, est une maladie qui provoque des fièvres intermittentes due à un protozoaire transmis par la pique de la femelle d'un moustique. Il affecte les êtres humains depuis plus de 50 000 ans et aurait été un pathogène depuis le début de l'histoire de notre espèce. Sa recrudescence est actuellement une entrave importante à la transition sanitaire dans les pays du Sud, et plus particulièrement en Afrique au sud du Sahara où cette maladie est l'une des principales causes de décès des enfants de moins de cinq ans. Les cinq espèces connues responsables de la maladie sont : le *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium knowlesi* mais *Plasmodium falciparum* cause la forme la plus grave et la plus dangereuse de la maladie. En effet elle est

la cause de décès d'environ deux millions chaque année et plus de 90 % des cas de mortalité surviennent en Afrique au sud du Sahara et principalement chez les jeunes enfants.

❖ *Test antiplasmodial*

Le test anti-plasmodial consiste à réaliser des expériences directes sur les parasites *Plasmodium falciparum* cultivé in-vitro pour observer leur résistance et leur sensibilité en présence d'extrait (méthode de fluorescence avec SYBR Green I) Le test s'effectue en quatre étapes :

- Détermination de la parasitémie des cultures par la réalisation d'un frottis mince afin de savoir la quelle est utilisée.

- Préparation des extraits :

Les extraits sont dilués par une quantité fixe de DMSO (20µl) et une quantité variable de média incomplet (ICM) pour aboutir à une concentration finale égale à 1µg/µl (= 1mg/ml).

- Préparation de la microplaque à fond U :

200µl d'ICM sont versées dans tous les puits du rangée H contre 125µl pour les autres. 50 µl des extraits préparées précédemment sont versées dans les puits du rangée H allant de 1 à 12. Une dilution en cascade est effectuée à partir des puits du rangée H jusqu'aux puits du rangée A.

- Test proprement dit :

Des microplaques sont préparées à raison de 50µl d'ICM par puits, le test est réalisé en double. A partir de la microplaque à fond U, 100 µl d'extrait sont prélevées d'un puits bien déterminé puis réparti équitablement entre 2 puits d'une microplaque test à fond plat ayant la même rangée que l'extrait prélevé. Ensuite une solution composée de globules rouges infectées, de globules rouges et d'ICM sont répartis dans tous les puits à raison de 100 µl par puits. Le tout est ensuite incubé pendant 72h à l'étuve 37°C puis le résultat est lu sur un lecteur de microplaque à fluorescence et analysé en calculant les valeurs de CI_{50} ou les concentrations minimales qui réduisent à 50% la croissance des parasites.

PARTIE III- RESULTATS ET DISCUSSIONS

III-1- Résultats chimiques préliminaires

III-1-1- Résultats de criblage phytochimique

Les résultats de criblage phytochimique des deux organes de la plante sont donnés dans le tableau 5. Ils montrent la richesse en iridoïdes et triterpénoides ainsi que des polyphénols et tanins dans les feuilles de ROL734LF1.

Tableau5 : Résultats de criblage phytochimique des feuilles et des tiges de *R minor*

Familles chimiques	Réactifs de caractérisation	ROL734LF1	ROL734ST1
coumarines	NaOH, lampe U.V. de λ 254 nm et 366 nm	-	-
Flavones	HCl, Mg, Alcool isoamylique	+	++
Flavonols	HCl, Mg, Alcool isoamylique	+	-
Flavanones, flavanonols	HCl, Mg	-	-
Anthocyanes	HCl, NH_4OH	-	-
Leucoanthocyanes	HCl à chaud	+	+
Anthraquinones libres	Eau, Benzène, NH_4OH	+	+
Hétérosides anthracéniques	HCl, CHCl_3 , NH_4OH	-	-
Tanins	NaCl, Gélatine	++	++
Tanins condensés	FeCl_3	++	++
Tanins hydrolysables	FeCl_3	-	-
Polyphénols	Gélatine	++	++
Phénols, flavane	Vanilline chlorhydrique	+	+
Stérols insaturés	H_2SO_4	-	-
Stéroïdes lactoniques	Acide picrique, NaOH, Acide 3,5-dinitrobenzoïque, KOH	+	-
Triterpénoïdes	Anhydride acétique, H_2SO_4	+++	+
Stéroïdes	Anhydride acétique, H_2SO_4	+	+
Iridoïdes	HCl, Ethanol, Glycérol, CuSO_4	+++	+
Saponines	Hauteur mousse	-	-
Hétérosides désoxy-2-sucre	FeCl_3 , Acide acétique	-	-
Alcaloïdes	KI, I_2 , HgCl_2 , $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, Acide tartrique	+	-
Polysaccharides	Ethanol	-	-

- : Test négatif (aucune réaction observée)

+: Coloration ou précipité faible

++ : Coloration ou précipité abondante

+++ : Coloration intense ou floculation immédiate

III-1-2- Résultats des extractions à petites échelles et des CCM préliminaires sur les tiges et les feuilles de *Razafimandimbisonia. Minor*

25g de poudres végétales ont été macérées trois fois dans le méthanol et 4,68g d'extrait pour ROL734ST1 de rendement 17,8% et 3,94g d'extrait pour ROL734LF1 de rendement 15,7% ont été obtenus.

Ces deux extraits ont subi un fractionnement par partage liquide-liquide hexane/l'acétate d'éthyle puis méthanol/eau, les résultats sont présentés dans le tableau 6.

Tableau6 : Résultat de l'extraction à petite échelle de tiges et feuilles de la plante

Echantillon	Masse de l'extrait brut de départ	Masse de l'extrait hexanique	Masse de l'extrait AcOEt
ROL734LF1	3,65g	0,07g	0,42g
ROL734ST1	4,2g	0,06g	0,78g

Les extraits obtenus et fractions obtenues ont été analysés par CCM (figure 10).

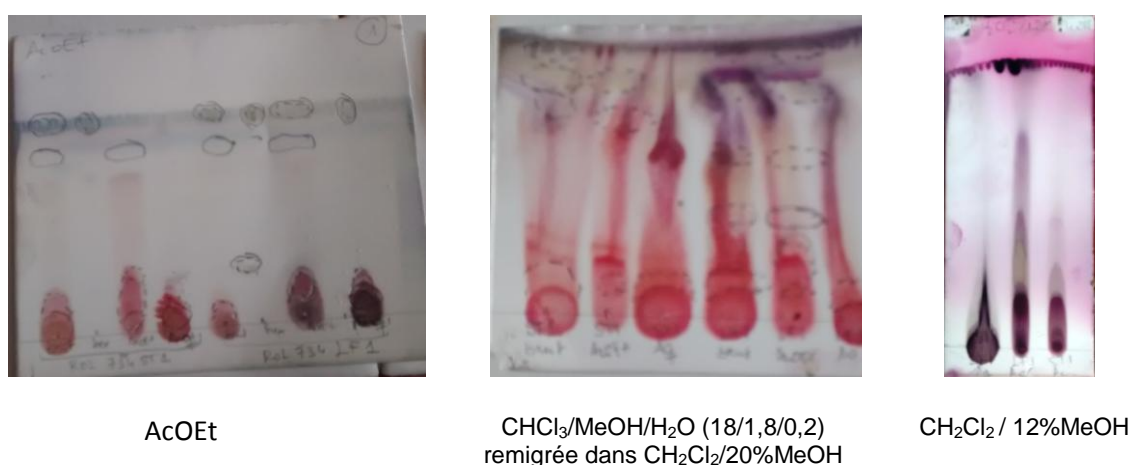


Figure 10 : Résultats de CCM des fractions hexanique, AcOEt et aqueuse de *Razafimandimbisonia minor* (feuilles et tiges)

Au vu de ces résultats, ils montrent que :

Chaque organe contient des produits sortant en tâches rouges et foncés, polaires parce qu'ils ne migrent qu'avec un système d'éluant contenant du méthanol. Ces produits ne sont pas retrouvés dans la fraction hexanique, mais seulement dans les fractions acétate d'éthyle et aqueuse.

En tenant compte des résultats de criblage phytochimique, ces produits peuvent correspondre à des composés phénoliques et des terpénoïdes.

III-2-Résultats d'extraction à grande échelle et de partage liquide-liquide

Les résultats d'extraction et de partage liquide-liquide sont consignés dans le tableau 7

Tableau 7 : Résultats d'extraction à grande échelle et de partage liquide-liquide

	Extrait brut	Partie hexanique	Partie acétate d'éthyle	Partie aqueuse
Masse de produit	49g	2,08g	8,02g	26g
Rendement	12,25%	4,24%	16,36%	53,06%
Caractéristiques	Brun foncé	Vert foncé	Jaune orangé	Rouge orangé

Le protocole de cette extraction est résumé dans la figure 11

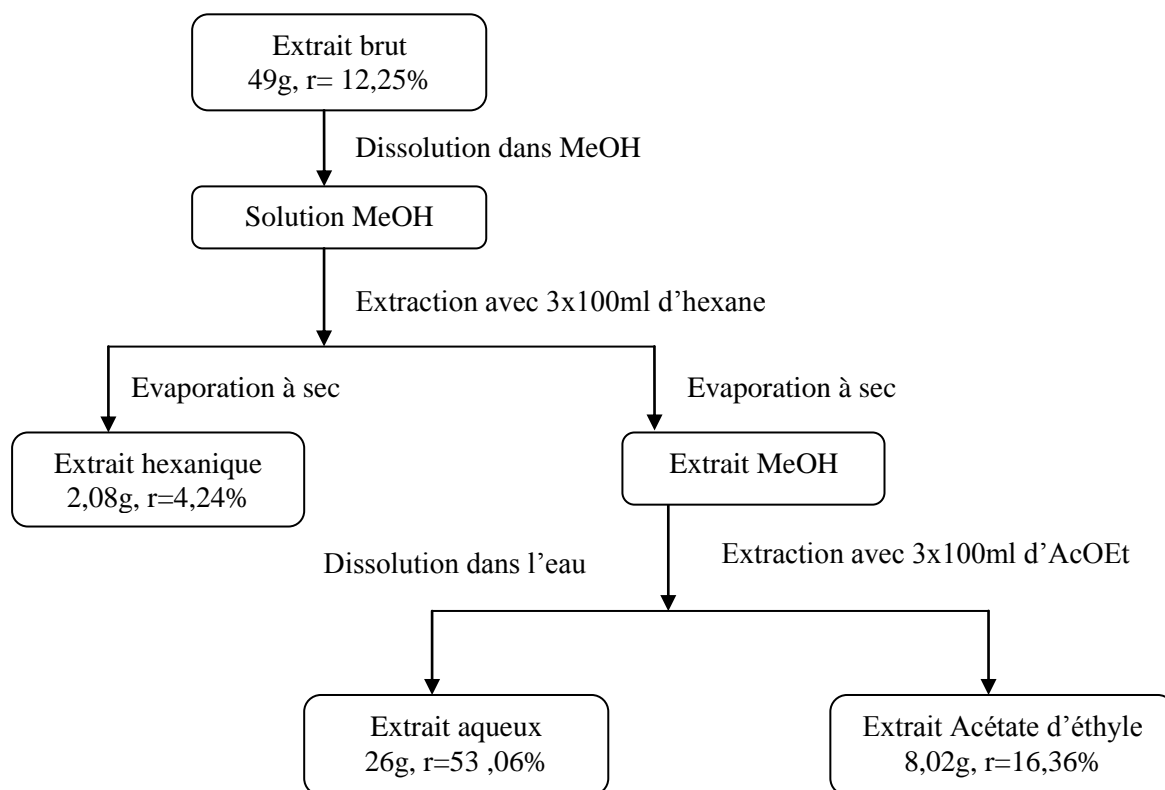


Figure 11 : Résultats et protocole d'extraction à grande échelle

III-3- Purification et Isolement

III-3-1-Fractionnement de l'extrait AcOEt de ROL734LF1

Les résultats de l'extraction par partage liquide-liquide nous a permis de séparer tous les groupes des constituants ; les produits apolaires sont dans la fraction hexanique, les produits moyennement polaires dans la fraction acétate d'éthyle et les produits polaires dans la fraction aqueuse. De plus les résultats observés lors du test indiquent que l'extrait acétate d'éthyle présente une activité intéressante, 8g de l'extrait acétate d'éthyle a été fractionné sur colonne de silice. Le gradient de méthanol dans le dichlorométhane est utilisé comme éluant et vingt et huit fractions notées LF1 à LF28 ont été obtenues.

Les résultats sont présentés dans la figure 12

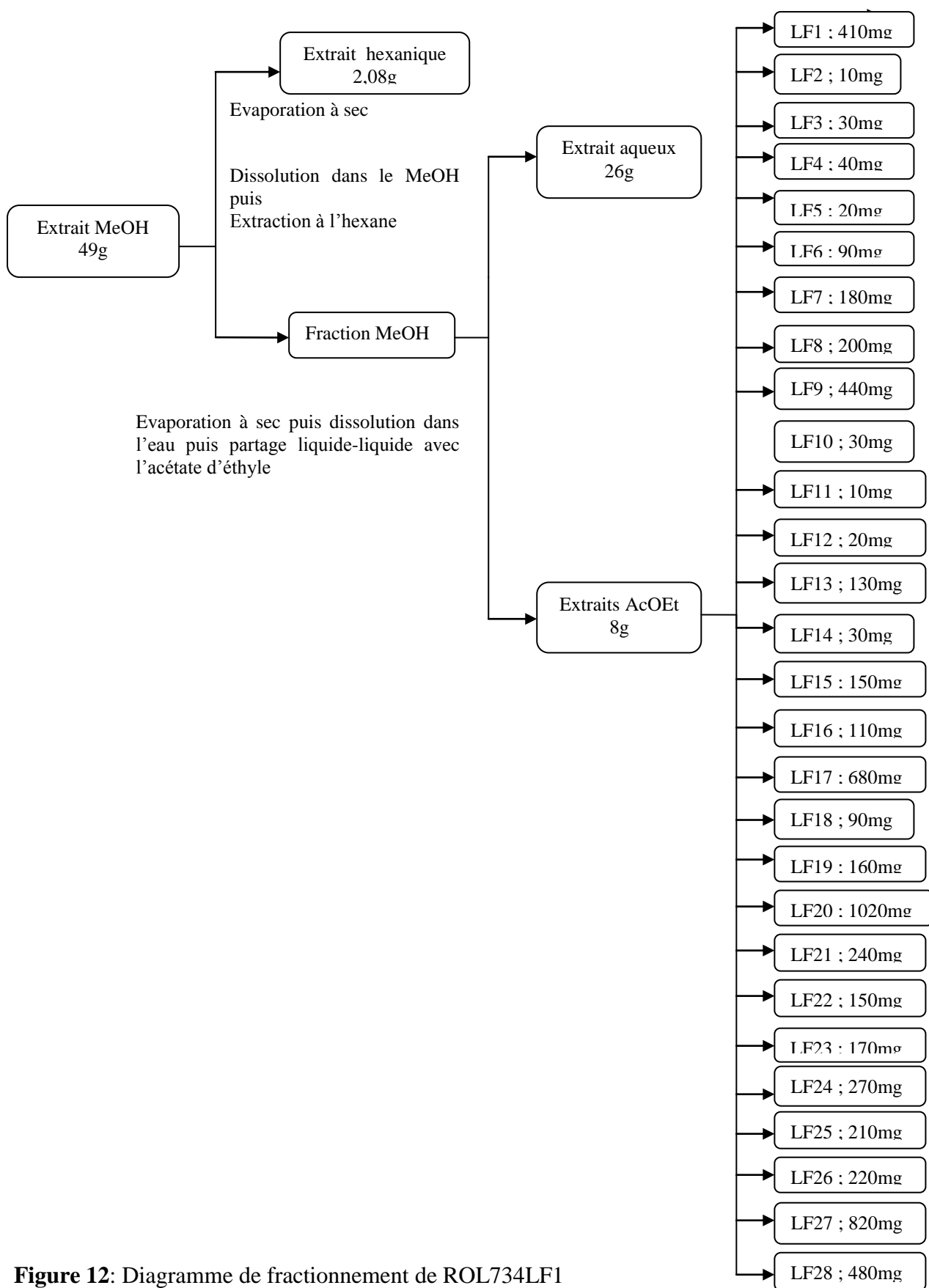


Figure 12: Diagramme de fractionnement de ROL734LF1

III-3-2-Purification des fractions LF7 et LF8

Les fractions LF7 et LF8 ont été fractionnées sur gel de silice suivant le gradient d'éluant hexane/CH₂Cl₂/MeOH. Le suivi par CCM sur plaque normale de silice F₂₅₄ a permis de rassembler dix sous fractions dont l'une se présente sous forme d'une monotache et codée LF7-5. Ce dernier a été isolé sous forme de poudre jaune verte de masse 3,8 mg.

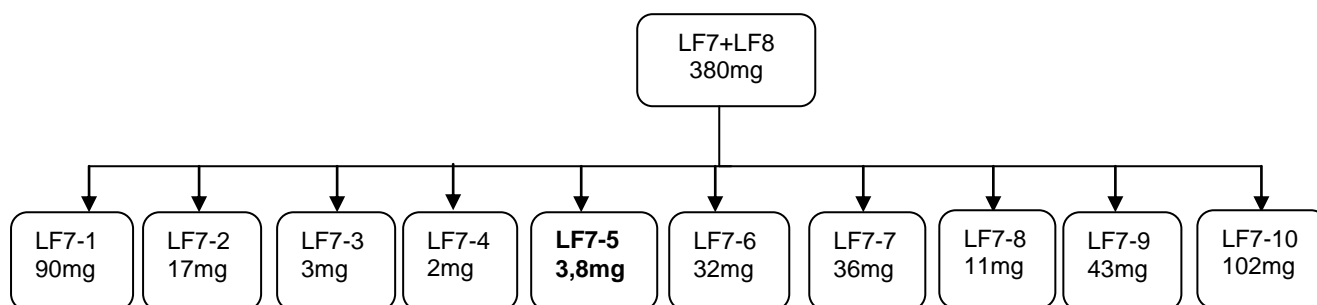
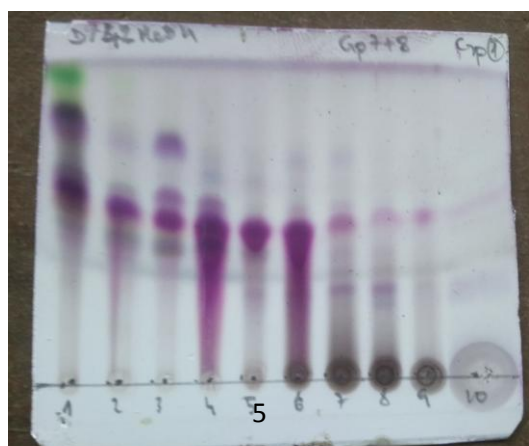


Figure 13 : Isolement de LF7-5



Adsorbant : gel de silice 60 F 254 sur support en aluminium

Eluant : CH₂Cl₂/4%MeOH

Observation : UV : 1 254 nm et 365 nm

Révélation : vanilline sulfurique

Figure 14 : Profil CCM de la fraction LF7-5

III-3-3-Purification de la fraction LF9

La fraction LF9 a été chromatographiée sur colonne de gel de silice. Le mélange hexane/AcOEt/MeOH a été utilisé comme éluant. Quatre produits ont été obtenus sous forme de monotache ainsi que trois autres sous-fractions. Ces quatre produits codés LF9-1, LF9-4, LF9-5 et LF9-6 ont respectivement une masse de 19 mg, 20 mg, 7 mg et 5,9 mg.

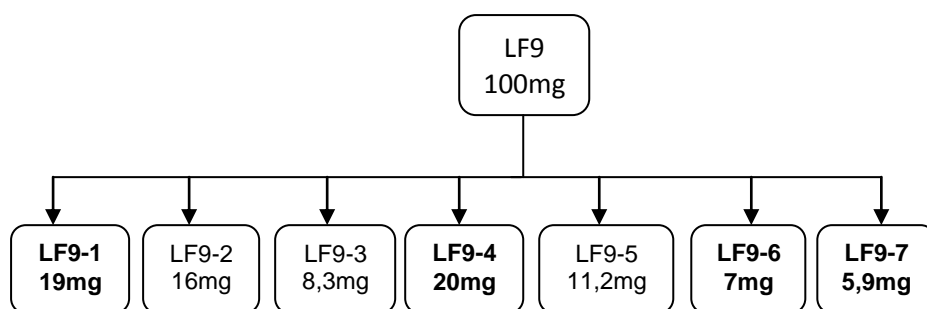
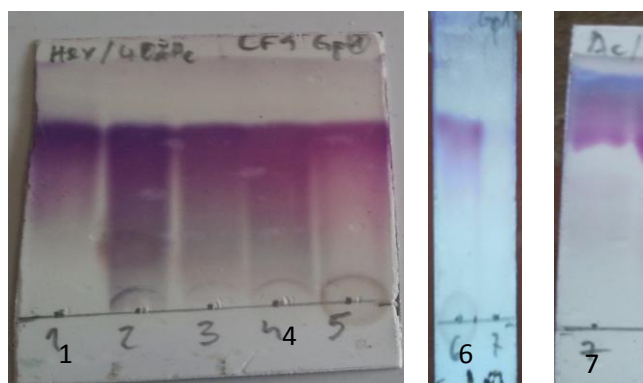


Figure 15 : Isolement de LF9-1, LF9-4, LF9-6 et LF9-7



Adsorbant : gel de silice 60 F 254 sur support en aluminium
 Eluant : Hexane/4% AcOEt
 Observation : UV : 1 254 nm et 365 nm
 Révélation : vanilline sulfurique

Figure 16 : Chromatogramme des fractions LF9-1, LF9-4, LF9-6

III-3-4- Purification des fractions LF12, LF13 et LF14

La chromatographie sur colonne de gel de silice des fractions LF12, LF13 et LF14 a conduit à l'obtention de douze sous-fractions notées LF12-1 à LF12-12. Le produit LF12-5 ayant une masse de 25,3 mg a été isolé sous forme d'une monotache.

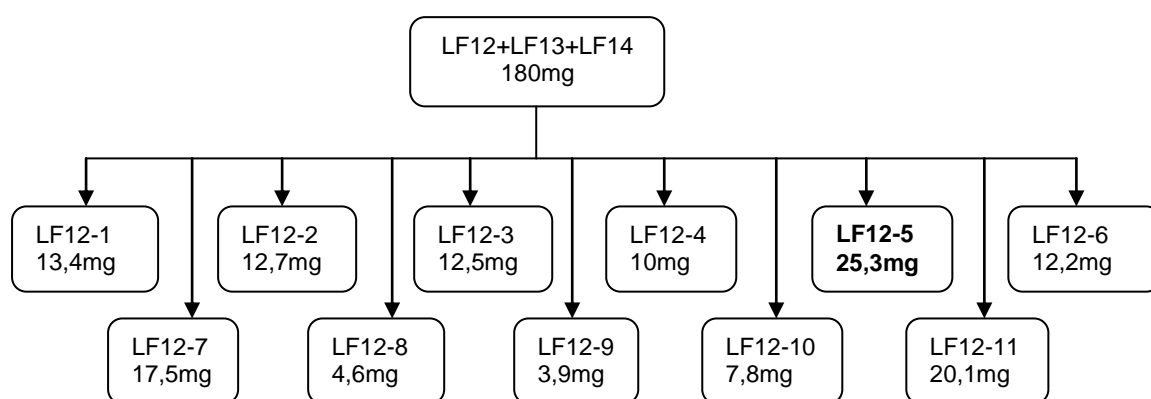
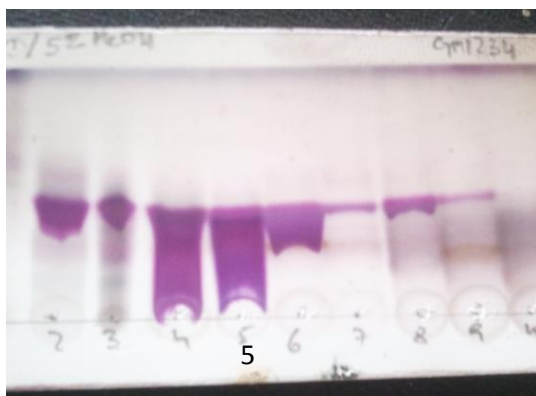


Figure 17 : Isolement de LF12-5



Adsorbant : gel de silice 60 F 254 sur support en aluminium

Eluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/5\%\text{MeOH}$

Observation : UV : 1 254 nm et 365 nm

Révélation : vanilline sulfurique

Figure 18 : Profil CCM de la fraction LF12-5

III-3-5-Purification des fractions LF15, L16 et LF17

Les fractions LF15, LF16 et LF17 ont été filtré sur colonne de gel de silice en utilisant le système d'éluant hexane/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. Seize sous-fractions dont deux sous forme de monotache ont été obtenues. La masse de deux produits isolés notés LF15-2 et LF15-7 est respectivement de 1,3 mg et de 1,8 mg.

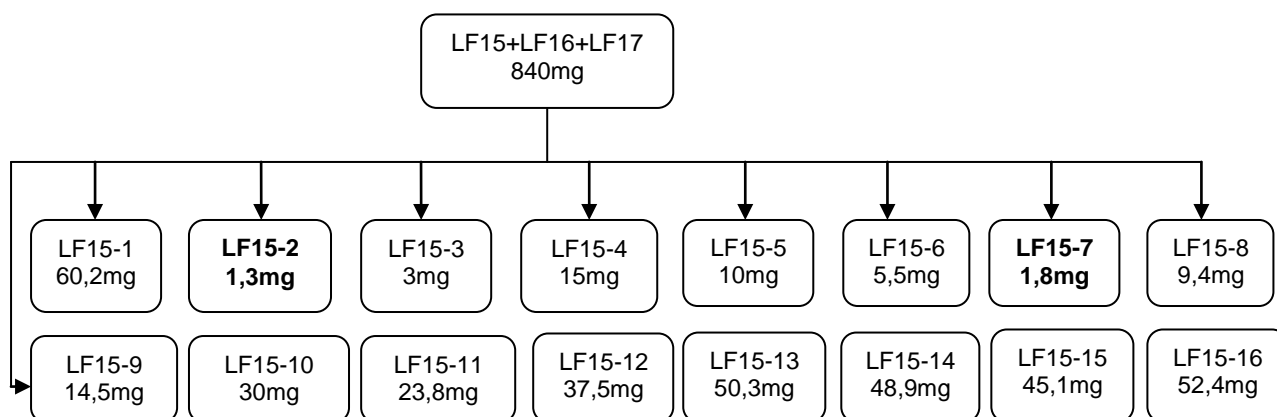
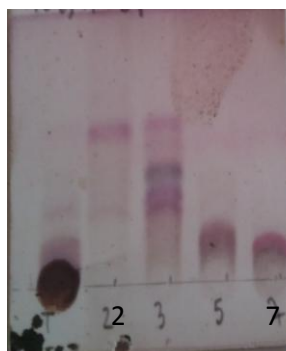


Figure 19 : Isolement de LF15-2 et LF15-7



Adsorbant : gel de silice 60 F 254 sur support en aluminium

Eluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/3\%\text{MeOH}$

Observation : UV : 1 254 nm et 365 nm

Révélation : vanilline sulfurique

Figure 20 : Profil CCM des fractions LF12-5 et LF12-7

III-3-6- Purification des fractions LF18 et LF19

La purification de LF18 et LF19 à travers une colonne de gel de silice a conduit à l'isolement de trois produits monotaches notés LF18-4, LF18-5 et LF18-6 et à l'obtention de treize autres sous-fractions. Les trois produits monotaches sont rassemblés en un seul produit du fait de leurs faibles masses et est codé LF18-4 de masse 2,8 mg.

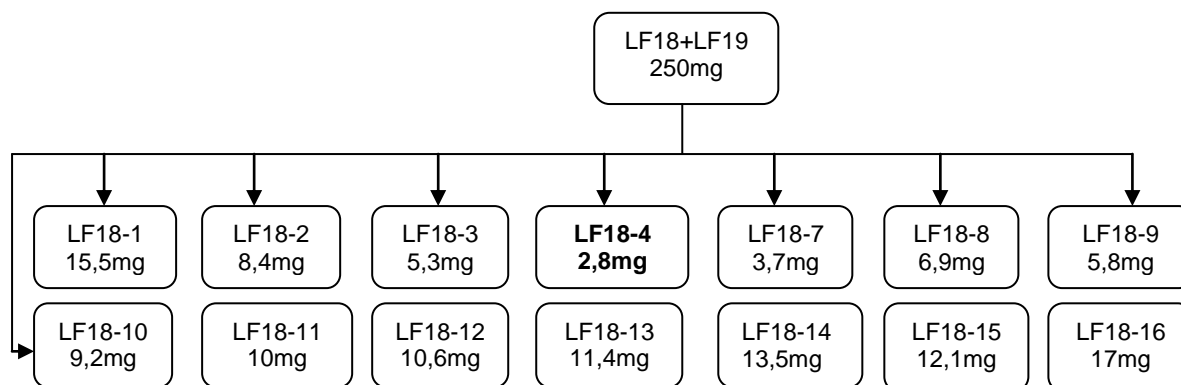


Figure 21: Isolement de LF18-4



Adsorbant : gel de silice 60 F 254 sur support en aluminium

Eluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/2,5\%\text{MeOH}$

Observation : UV : 254 nm et 365 nm

Révélation : vanilline sulfurique

Figure 22 : Profil CCM de la fraction LF18-4

III-3-7-Purification des fractions LF20 et LF21

Une chromatographie sur colonne a été effectuée sur les fractions LF20 et LF21 en utilisant le système d'éluant hexane/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. Le suivi par CCM des fractions a permis d'isoler deux produits nommés LF20-4 et LF20-12 ayant respectivement la masse de 3 mg et de 0,9 mg ainsi que vingt autres sous-fractions (mg).

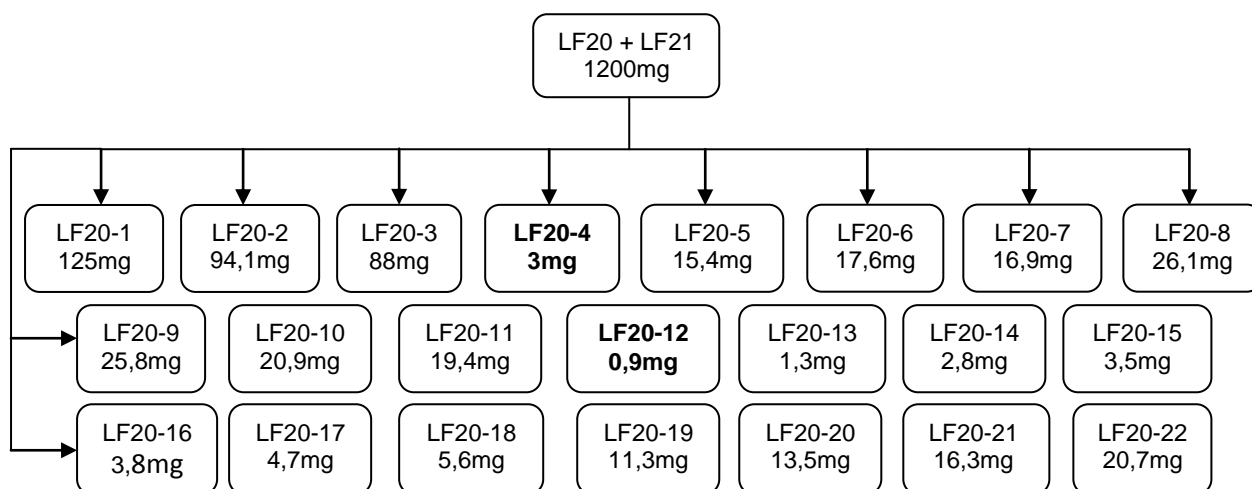
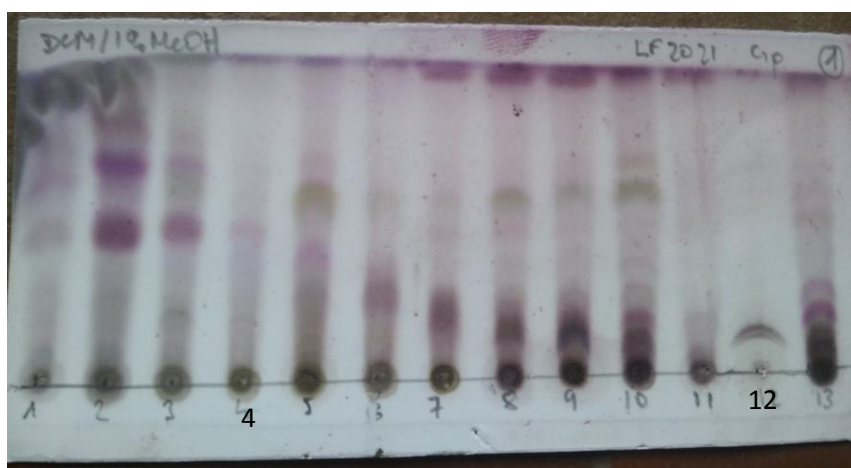


Figure 23 : Isolement de LF20-4 et LF20-12



Adsorbant : gel de silice 60 F 254 sur support en aluminium

Eluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/1\%\text{MeOH}$

Observation : UV : 254 nm et 365 nm

Révélation : vanilline sulfurique

Figure 24 : Profil CCM des fractions LF20-4 et LF20-12

III-3-8-Conclusion sur les purifications

Après partage liquide-liquide de l'extrait brut méthanolique des feuilles de *Razafimandimbisonia minor*, 3 fractions ont été obtenues : partie hexanique, partie acétate d'éthyle et partie aqueuse. Compte tenu de leurs profils chimiques et biologiques, nous avons procédé à la purification de la partie acétate d'éthyle. Quelques chromatographies sur colonnes ont été réalisées et ont conduit à l'obtention de onze composés monotaches en CCM : **LF7-5, LF9-1, LF9-4, LF9-5, LF9-6, LF12-5, LF15-2, LF15-7, LF18-4, LF20-2 et LF20-12**. Ces produits ont été envoyés à l'Université Paris Descartes pour analyses spectrales.

III-4- Analyses spectrales des produits isolés

III-4-1-Résultats spectrales sur l'ensemble des produits isolés

11 produits sortis des feuilles de *Razafimandimbisonia minor* ont été analysés en RMN, les Résultats obtenus sont résumés dans le tableau 8.

Tableau8 : Résultats d'analyses spectrales des produits envoyés et analysés en RMN

Référence colonne	Masse	Polarité / solubilité	Code RMN	Spectres reçus	Interprétation globale du profil
ROL 734 LF10	19mg	CH ₂ Cl ₂ / 0,5 % MeOH	LF10	RMN ¹ H	Chaîne grasse
ROL 734 LF7-5	3,8mg	CH ₂ Cl ₂ / 1 % MeOH	LF7-5	RMN ¹ H	Triterpénoïde
ROL 734 LF12-5	25mg	CH ₂ Cl ₂ / 1 % MeOH	LF12-5	RMN ¹ H	Spectre non résolu
ROL 734 LF15-2	1,3mg	CH ₂ Cl ₂ /0,4%MeOH	LF15-2	RMN ¹ H	très peu de signaux
ROL 734 LF15-7	1,8mg	CH ₂ Cl ₂ /2%MeOH	LF15-7	RMN ¹ H	très peu de signaux
ROL 734 LF18-4, 5,6	2,8mg	CH ₂ Cl ₂ /0,5% MeOH	LF18-4	RMN ¹ H	Chaîne grasse
ROL 734 LF20-4	3mg	CH ₂ Cl ₂ /0,2%MeOH	LF20-4	RMN ¹ H	très peu de signaux
ROL 734 LF20-12	0,9mg	CH ₂ Cl ₂ /2%MeOH	LF20-12	RMN ¹ H	très peu de signaux
ROL 734LF9-1	19mg	Hexane/50%AcOEt	LF9-1	RMN ¹ H	Mélange contenant triterpénoïde
ROL 734LF9-4	20mg	Hexane/50%AcOEt	LF9-4	RMN ¹ H, DEPT, Jmod, COSY, HSQCed, HMBC, SM	Triterpénoïde
ROL 734LF9-5	7mg	100% AcOEt	LF9-5	RMN ¹ H, SM	Triterpénoïde
ROL 734LF9-6	5,9mg	100% AcOEt	LF9-6	RMN ¹ H, SM	Triterpénoïde

Les spectres RMN du proton des composés LF7-5, LF9-5, LF9-6 et LF9-4 sont identiques, donc il s'agit du même produit, de profil triterpénoïde. Les analyses spectrales sont alors poursuivies sur LF9-4 qui est plus abondante. Nous présentons l'identification structurale de ce produit dans les paragraphes suivants.

III-4-2- Détermination structurale du produit LF9-4

III-4-2-1- Identification des spectres sur le produit LF9-4

Tous les spectres de RMN et de masse ont été effectués à l'Université Paris Descartes France. L'identification de ces spectres est consignée dans le tableau 10.

Tableau 9 : Identifications des spectres de LF9-4

Nom du spectre	Identification	Type de spectre et information à tirer
Spectres S1a et S1b	Présence des pics pseudo-moléculaires Autres pics fragments	Spectres de masse en mode ESI ou electrospray de LF9-4 (ESI ⁻ et ESI ⁺) Masse moléculaire et formule brute
Spectre S2a et S2b	$0 \leq \delta \text{ (ppm)} \leq 15$ Présence de singulet et multiplet Présence de courbe d'intégration $\delta \text{ (ppm)}=5,4$; Solvant : CD ₃ OD	Spectre RMN ¹ H 1D classique de LF9-4 et étalement de la zone 0 – 3,2ppm Il informe sur les nombres de sites protoniques et les protons couplés
Spectre S3	$0 \leq \delta \text{ (ppm)} \leq 250$ Présence uniquement des singulets Absence de courbe d'intégration Présence des pics vers le bas et vers le haut $\delta \text{ (ppm)}=180$; solvant : CD ₃ OD	Spectre RMN ¹³ C J modulé de LF9-4 Il donne le nombre de carbone dans la molécule à condition qu'il n'y ait pas superposition des signaux
Spectre S4	$0 \leq \delta \text{ (ppm)} \leq 250$ Présence uniquement des singulets $\delta \text{ (ppm)}=130$; solvant : CD ₃ OD	Spectre DEPT de LF9-4 Pics positifs (CH ₃ et CH) ;pics négatifs (CH ₂)
Spectre S5a et S5b	En abscisse : δ des ¹ H En ordonnée : δ des ¹ H Spectre 2D homonucléaire	Spectre COSY de LF9-4 et étalement de la zone 0-5 ,5ppm Il donne les corrélations entre ¹ H- ¹ H
Spectre S6	En abscisse : δ des ¹ H En ordonnée : δ des DEPT Spectre 2D hétéronucléaire	Spectre HSQC édité de LF9-4 Il donne les corrélations entre proton et carbone directement lié
Spectre S7	En abscisse : δ des ¹ H En ordonnée : δ des ¹³ C Jmodulé Spectre 2D hétéronucléaire	Spectre HMBC de LF9-4 Il donne les corrélations entre proton et carbone distant de deux ou trois liaisons

III-4-2-2-Etude du spectre de masse

Pour le spectre de masse, la technique d'ionisation electrospray (ESI) a été faite en deux modes d'ionisation : l'ionisation en mode négatif et l'ionisation en mode positif.

- ❖ Sur le spectre de masse en ESI⁻, nous observons un pic à m/z 455 correspondant à un ion quasi-moléculaire [M-H]⁻ suggérant à une masse atomique de 456uma.
L'ion de faible intensité observé à m/z 912 peut correspondre au dimère du composé formé dans la source [2M-H]⁻.
- ❖ L'analyse du spectre de masse en ESI⁺ montre la présence d'ion à m/z 479 [M+Na]⁺ et un ion de faible intensité à m/z 936 [2M+Na]⁺ qui confirme la masse atomique de 456uma en accord avec une formule brute de C₃₀H₄₈O₃ d'après les littératures dont le degré d'insaturation est égale à 7.[49][50]

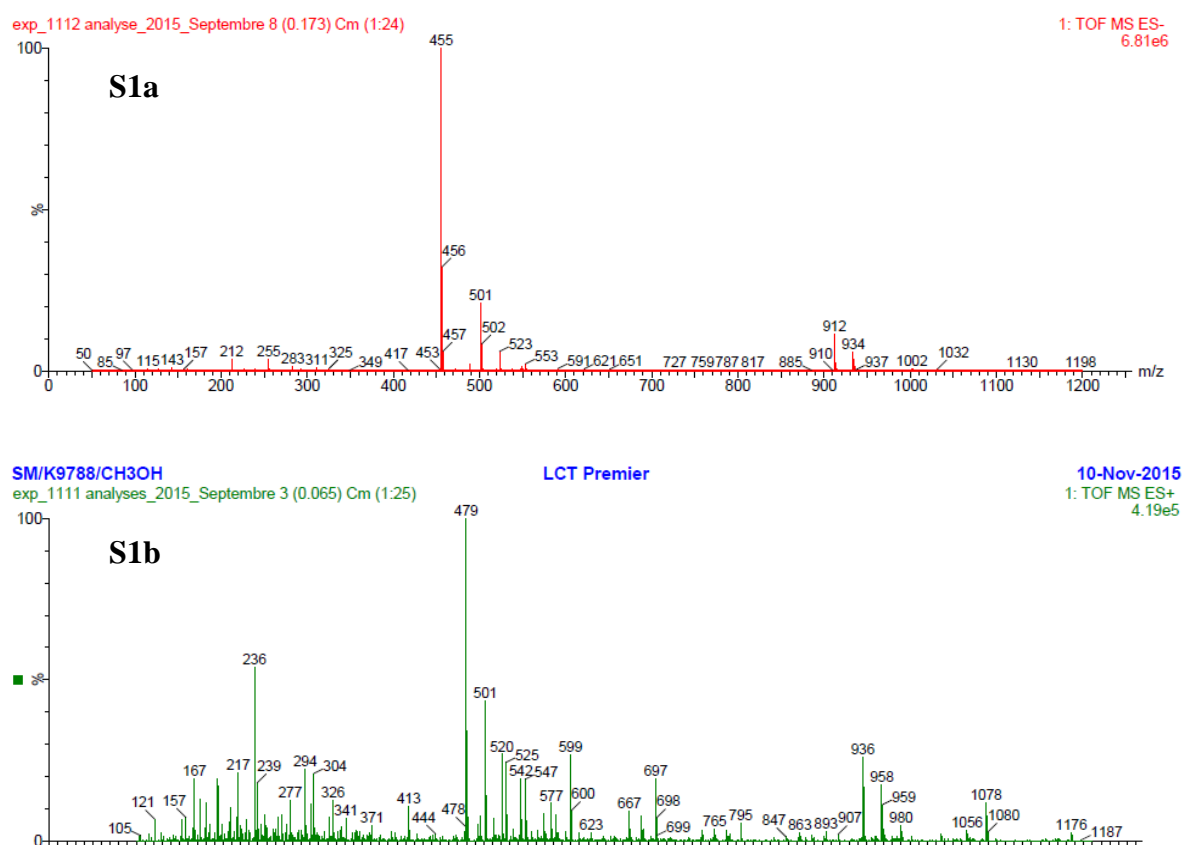


Figure 25: Spectre de masse en ESI⁻ (S1a) et ESI⁺ (S1b) de LF9-4

III-4-2-3-Examen des spectres RMN 1D

III-4-2-3-1- Spectre RMN ¹H de LF9-4

Le spectre S2a et le spectre S2b de la zone 0-3,2ppm agrandie représentent le spectre RMN ¹H de LF9-4.

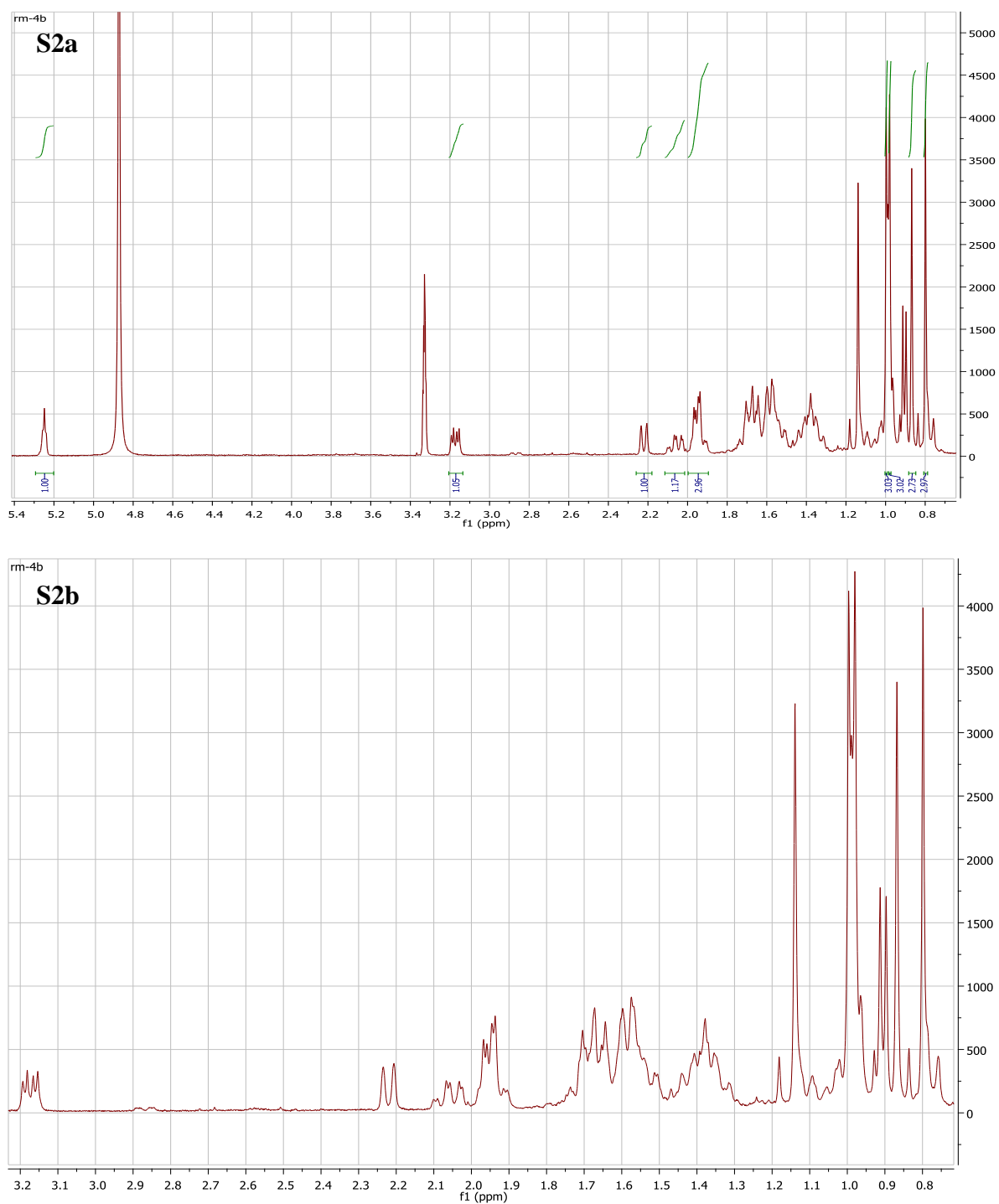


Figure 26 : Spectre RMN ^1H S2a et S2b de LF9-4

L'analyse dans ces spectres RMN ^1H de l'allure des signaux des protons ainsi que des courbes d'intégration des pics nous a permis de faire les observations suivantes :

- Les deux pics apparaissant aux valeurs de $\delta=3,32\text{ppm}$ et $\delta=4,87\text{ppm}$ correspondent aux signaux de solvant utilisé qui est le méthanol deutérié (CD_3OD)

- Tous les déplacements chimiques se situent entre 0-5,4ppm. Ceci nous a guidé à penser aux protons éthyléniques ou aux protons portés par un carbone lié à un hétéroatome ou aux protons aliphatiques
- En effet, un singulet de un proton à $\delta=5,25$ ppm est attribuable à un proton éthylénique.
- On note la présence d'un doublet dédoublé de un proton de constante de couplage $J=11,0$; $4,7\text{Hz}$ à $\delta=3,17$ ppm. L'utilisation des tables de référence permet d'attribuer ce signal à un proton déblindé par un atome d'oxygène.
- Un doublet de un proton de constante de couplage $J=11,4\text{Hz}$ à la valeur de δ (ppm) 2,22 peut être assigné au proton en α d'une double liaison. La valeur de la constante de couplage indique qu'il est en position cis de la double liaison.
- Un multiplet entre δ (ppm) 2,11 et 1,99 peut être attribué à un proton d'un groupement méthine CH ou méthylène CH_2 .
- Un signal sous forme d'un doublet dédoublé à $\delta=1,95$ ppm intégrant pour trois protons est attribuable à un groupement méthyle en α d'un carbone oléfinique.
- Un multiplet entre 1,77 et 1,29ppm peut être assigné à une série de CH et CH_2 dans un cycle
- Quatre singulets intégrant pour trois protons chacun apparaissent aux déplacements chimiques 1,14ppm, 0,97ppm, 0,87ppm et 0,80ppm pouvant être assignés à des groupements méthyles.
- Deux doublets de trois protons chacun ayant la même constante de couplage $J=6,6\text{Hz}$ se trouvent à $\delta=0,99\text{ppm}$ et $\delta=0,90$ ppm. Cela indique que ces sites protoniques sont probablement voisin l'un de l'autre.

Les informations tirées de spectre RMN ^1H sont résumé dans le tableau 11

Tableau 10 : Informations tirées du spectre RMN ^1H de LF9-4

Structure	δ (ppm)
7CH_3	1,14 ; 1,95 ; 0,99 ; 0,97 ; 0,90 ; 0,87 ; 0,80
$=\text{CH}-$	5,25
$\text{CH}-\text{O}-$	3,17

III-4-2-3-2-Spectre RMN ^{13}C J modulé de LF9-4

Le spectre ^{13}C Jmod donne le nombre de carbone présent dans la molécule à condition qu'il n'y ait pas chevauchement ou superposition des signaux. Le spectre S3 représente le spectre ^{13}C du produit LF9-4

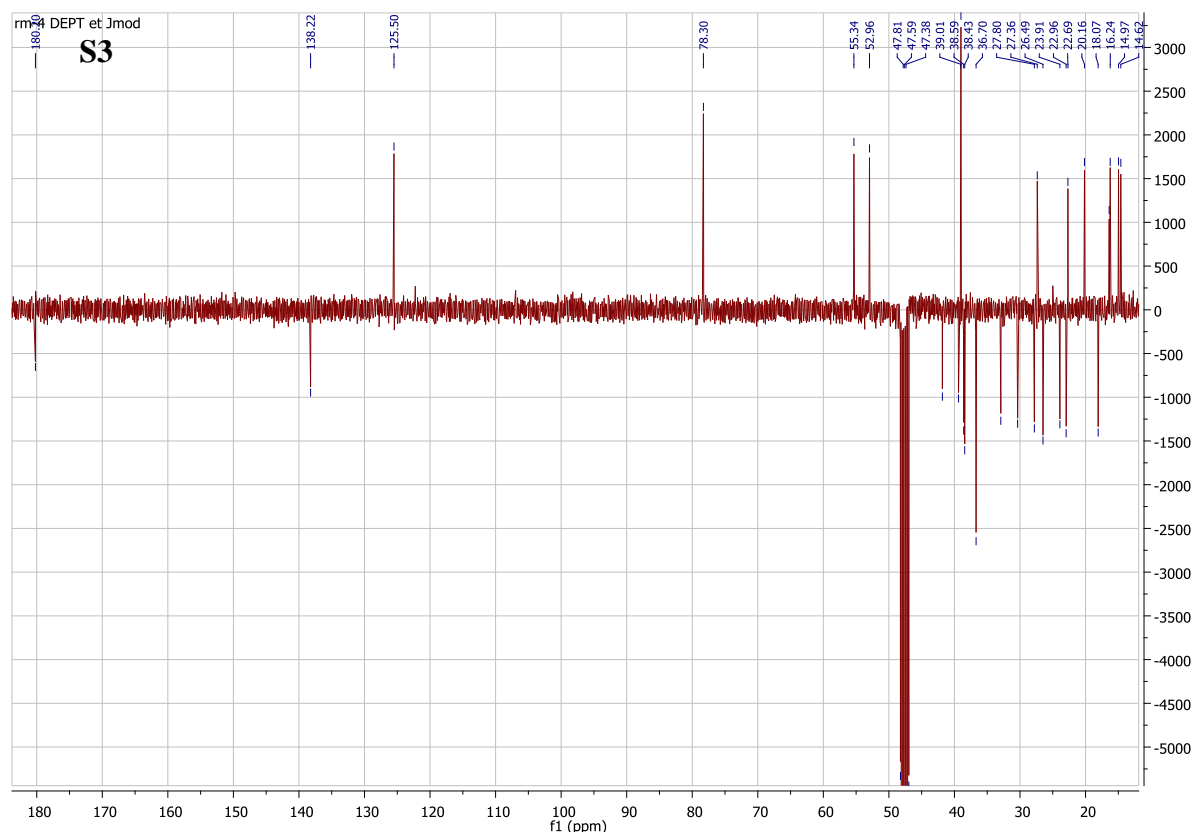


Figure 27 : Spectre RMN ^{13}C J modulé S3 de LF9-4

Sur ce spectre, le signal de solvant est retrouvé à la valeur de déplacement chimique $\delta=47,5\text{ppm}$. Le spectre présente 30 signaux signifiant que la molécule contient 30 carbones indiquant une structure du type triterpène sans les problèmes de superposition. L'observation d'un signal à $\delta=180,2\text{ppm}$ nous a permis de suggérer la présence d'une fonction acide dans la structure. La présence d'un carbone éthylénique est confirmée par le signal à δ ppm 125,5. Un carbone quaternaire oléfinique est observé d'après la table de référence à 138,2ppm. La présence de ces deux dernières valeurs confirmées par le signal d'un proton oléfinique à δ 5,25ppm sur le spectre de proton suggère que le composé a un groupement caractéristique $\Delta^{12,13}$ d'un triterpène pentacyclique du type ursane (urs-12-ène) (figure28) [51]. Le déplacement chimique à 78,3ppm confirme la présence d'un groupement hydroxyle. Les signaux dans la zone des champs forts notamment à δ 14,7 ; 15,0 ; 16,2 ; 16,4 ; 18,1 ; 20,2 ; 22,7 ; 23,0 ; 23,9 ; 26,5 ; 27,4 ; 27,8 ; 30,4 ; 32,9 ; 36,7 ; 38,4 ; 38,6 ; 39,0 ; 39,4 ; 41,8 ; 53,0 ; 55,3ppm sont attribuables à des groupements hydrocarbonés.

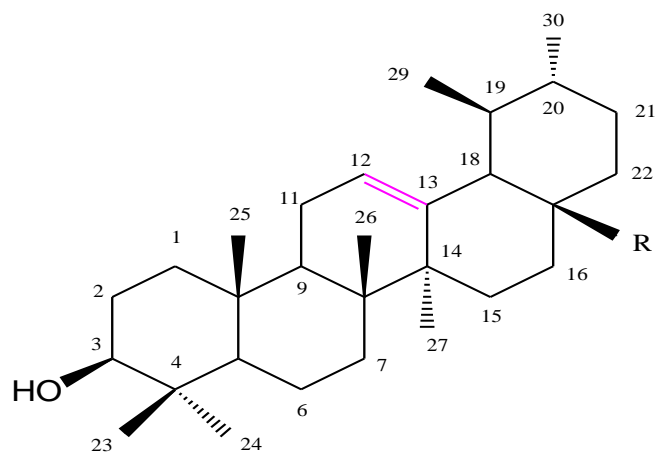


Figure 28 : Squelette ursane d'un triterpène pentacyclique

III-4-2-3-3-Spectre DEPT 135 du produit LF9-4

Nous avons analysé dans l'étape suivante le spectre DEPT afin de distinguer les groupements méthyles CH_3 et méthines CH des groupements méthylènes CH_2 , et de connaître s'il y a des carbones quaternaires dans la structure. Le spectre S4 représente le spectre DEPT 135 du produit LF9-4.

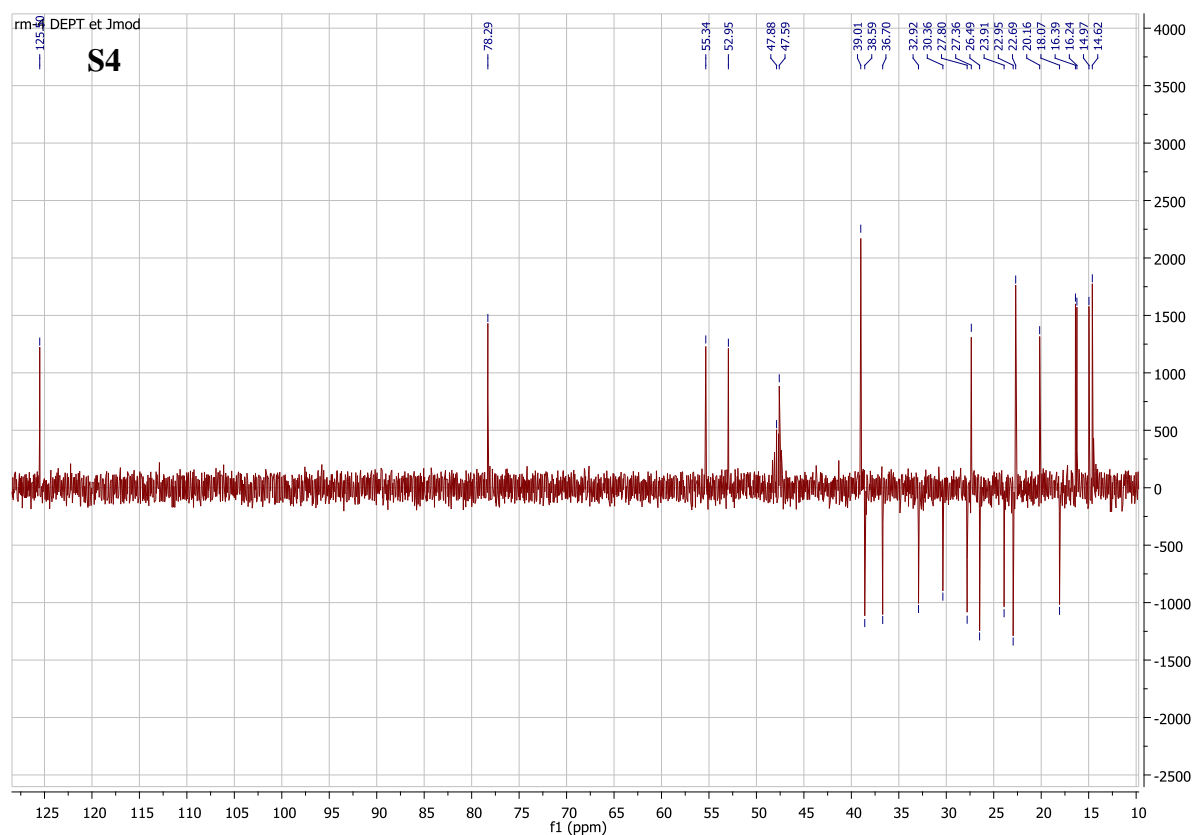


Figure 29 : Spectre DEPT 135 S4 de LF9-4

Le spectre S4 montre 23 signaux dirigés vers le haut et vers le bas. Les 14 signaux dirigés vers le haut sont des signaux de méthyles CH_3 ou de méthines CH tandis que les 9 signaux vers le bas sont ceux de méthylènes CH_2 . Les autres signaux n'apparaissant pas sur le spectre sont donc des carbones quaternaires.

Comme nous avons relevés sept groupements méthyles lors de l'analyse du spectre de ^1H précédent, les sept carbones restants parmi les quatorze observés sur le spectre DEPT sont ainsi probablement des carbones du groupement méthines.

La combinaison des informations tirées des spectres RMN ^1H , ^{13}C J-modulé, DEPT 135 obtenus nous a permis de donner une hypothèse de structure. En effet, la molécule renferme 30 atomes de carbone, dont 7 groupements méthyles, 9 groupements méthylènes, 7 groupements méthines et 7 carbones quaternaires. Compte tenu de ces informations ainsi que l'allure du spectre de ^1H , il apparaît que le composé LF9-4 est bien un triterpène pentacyclique qui présente à la fois une fonction alcool, une fonction acide carboxylique, un groupe éthylénique en position 12 d'un squelette ursane et 7 groupes méthyles.

III-4-2-4-Examen des spectres RMN 2D

III-4-2-4-1-Spectre HSQCed du produit LF9-4

Dans l'étape suivante, nous avons interprété le spectre HSQC édité afin de déterminer les carbones protonés en observant les taches de corrélation entre le proton et le carbone qui le porte

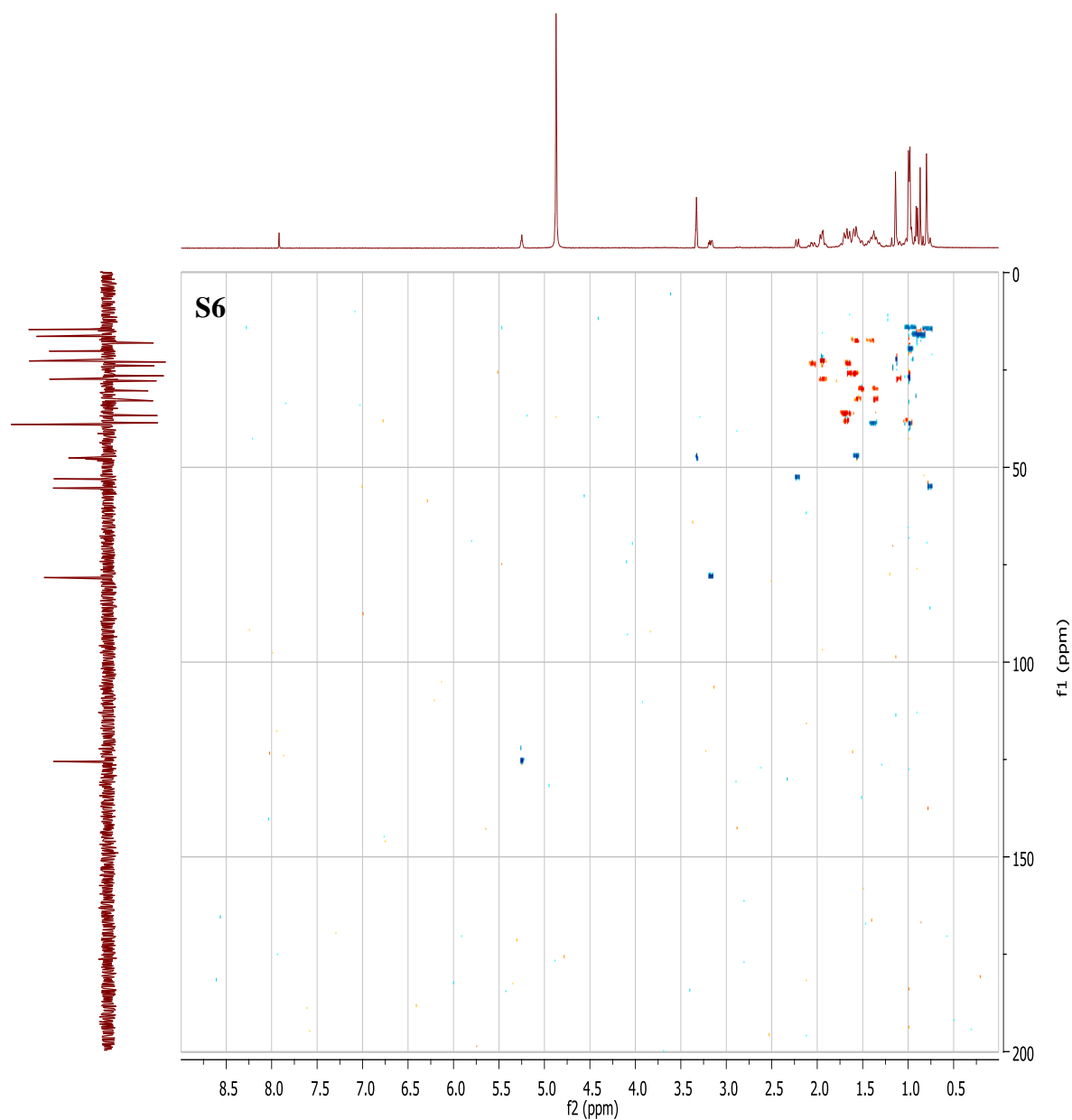


Figure 30 : Spectre HSQCed S6 de LF9-4

Les différentes corrélations observées dans le spectre HSQC sont consignés dans le tableau 11

Tableau 11 : Corrélations observées dans le spectre HSQC

$\delta\text{ppm } ^{13}\text{C}$	$\delta\text{ppm } ^1\text{H}$	Observation
125,5	5,25(s)	CH
78,3	3,17(dd)	CH
55,3	1,30-1,17(m)	CH
53,0	2,22(d)	CH
48,0	1,60-1,55(m)	CH
47,5	1,68-1,59(m)	CH
39,0	1,41-1,32(m)	CH
38,6	1,77-1,62(m)	CH ₂
36,7	1,77-1,63(m)	CH ₂
32,9	1,54-1,43(m)	CH ₂
30,4	1,52-1,40(m)	CH ₂
27,8	2,05-1,99(m)	CH ₂
26,5	1,75-1,58(m)	CH ₂
23,9	1,77-1,74(m)	CH ₂
23,0	2,11-2,0(m)	CH ₂
18,1	1,75-1,35(m)	CH ₂
27,4	1,14(s)	CH ₃
22,7	1,95(dd)	CH ₃
20,2	0,97(s)	CH ₃
16,4	0,90(d)	CH ₃
16,2	0,87(s)	CH ₃
15,0	0,80(s)	CH ₃
14,7	0,99(d)	CH ₃

L'analyse du spectre HSQCed montre la présence de

- ❖ Sept groupements méthyles confirmant le nombre de groupements méthyles observés sur le spectre ^1H
- ❖ Sept groupements méthines
- ❖ Neuf groupements méthylènes.

En combinant ces informations avec celles obtenus des spectres précédents, une hypothèse de structure peut être donnée. En effet, LF9-4 est un composé ayant cinq cycles, un carbonyle et une double liaison, soit sept insaturations en accord avec la formule brute. Les sept groupements méthyles dans la molécule seraient attribués en position 23, 24, 25, 26, 27, 29 et 30 sur le squelette ursane. Comme le squelette a déjà six carbones quaternaires, le septième carbone quaternaire qui est le carbone de la fonction acide serait donc probablement en position 28 dans la molécule.

La structure probable de LF9-4 serait ainsi :

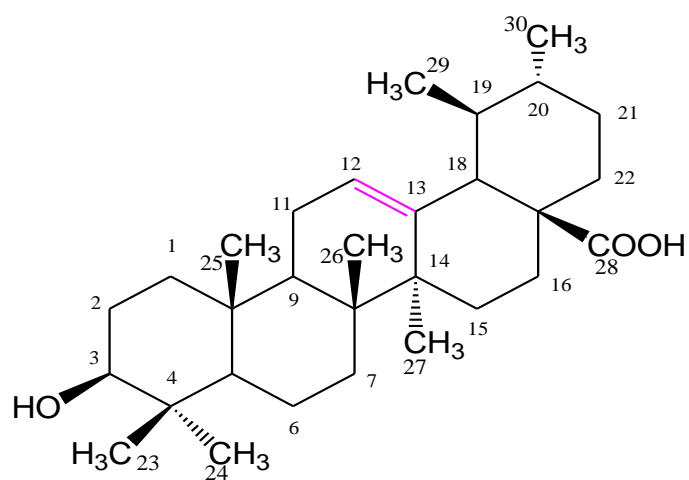


Figure 31 : Structure probable de LF9-4

Nous avons comparé les valeurs de déplacement chimique des RMN ^1H et ^{13}C du composé LF9-4 à celles des littératures afin d'attribuer les déplacements chimiques de chaque carbone et proton correspondant dans la molécule.

Tableau 12 : Déplacements chimiques de ^1H et de ^{13}C dans CD_3OD de LF9-4

Carbone	$\delta_{\text{ppm}}^{13}\text{C}$	$\delta_{\text{ppm}}^1\text{H}$	Groupe ment corrépondant	$\delta_{\text{ppm}}^1\text{H}$ Littérature[49][52][53]	$\delta_{\text{ppm}}^{13}\text{C}$ Littérature[49][52]] [53][54][55]
C-1	38,6		CH_2		39,1
C-2	26,5		CH_2		26,8
C-3	78,3	3,17(dd ;11,0 ;4,7)	CH	3,14(dd ;11,7 ;4,5)	78,4
C-4	39,4	-	C_q		39,5
C-5	55,3		CH		55,4
C-6	18,1		CH_2		18,1
C-7	32,9		CH_2		33,0
C-8	41,8	-	C_q		38,9
C-9	48,0		CH		47,8
C-10	38,4	-	C_q		38,5
C-11	23,0		CH_2		23,0
C-12	125,5	5,25(s)	CH	5,22(m)	125,6
C-13	138,2	-	C_q		138,3
C-14	47,0	-	C_q		41,9
C-15	27,8		CH_2		27,8
C-16	23,9		CH_2		26,5
C-17	47,4	-	C_q		48,1
C-18	53,0	2,22(d ; 11,4)	CH	2,18(d ; 10,5)	53,1
C-19	47,5		CH		39,5
C-20	39,0		CH		39,0
C-21	30,4		CH_2		30,4
C-22	36,7		CH_2		36,7
C-23	27,4	1,14(s)	CH_3	0,96(s)	27,4
C-24	15,0	0,80(s)	CH_3	0,77(s)	22,7
C-25	16,2	0,87(s)	CH_3	0,84(s)	15,7
C-26	20,2	0,97(s)	CH_3	0,89(s)	16,3
C-27	22,7	1,95(dd ; 8,8 ; 3,6)	CH_3	1,12(s)	24,0
C-28	180,2	-	C_q		180,1
C-29	14,7	0,99(d ; 6,5)	CH_3	0,90(d ; 6,4)	16,4
C-30	16,4	0,90(d ; 6,5)	CH_3	0,81(d ; 6,4)	20,2

L'interprétation des spectres COSY et HMBC permet d'établir les différentes enchainements pour confirmer cette hypothèse.

III-4-2-4-2-Spectre RMN COSY de LF9-4

Cette étude nous a permis de déterminer les couplages scalaires entre les protons géminés et vicinaux et pour les protons séparés par un nombre de liaisons plus important dans le cas d'un système conjugué. Les spectres (S5a et S5b) représentent les spectres COSY de LF9-4.

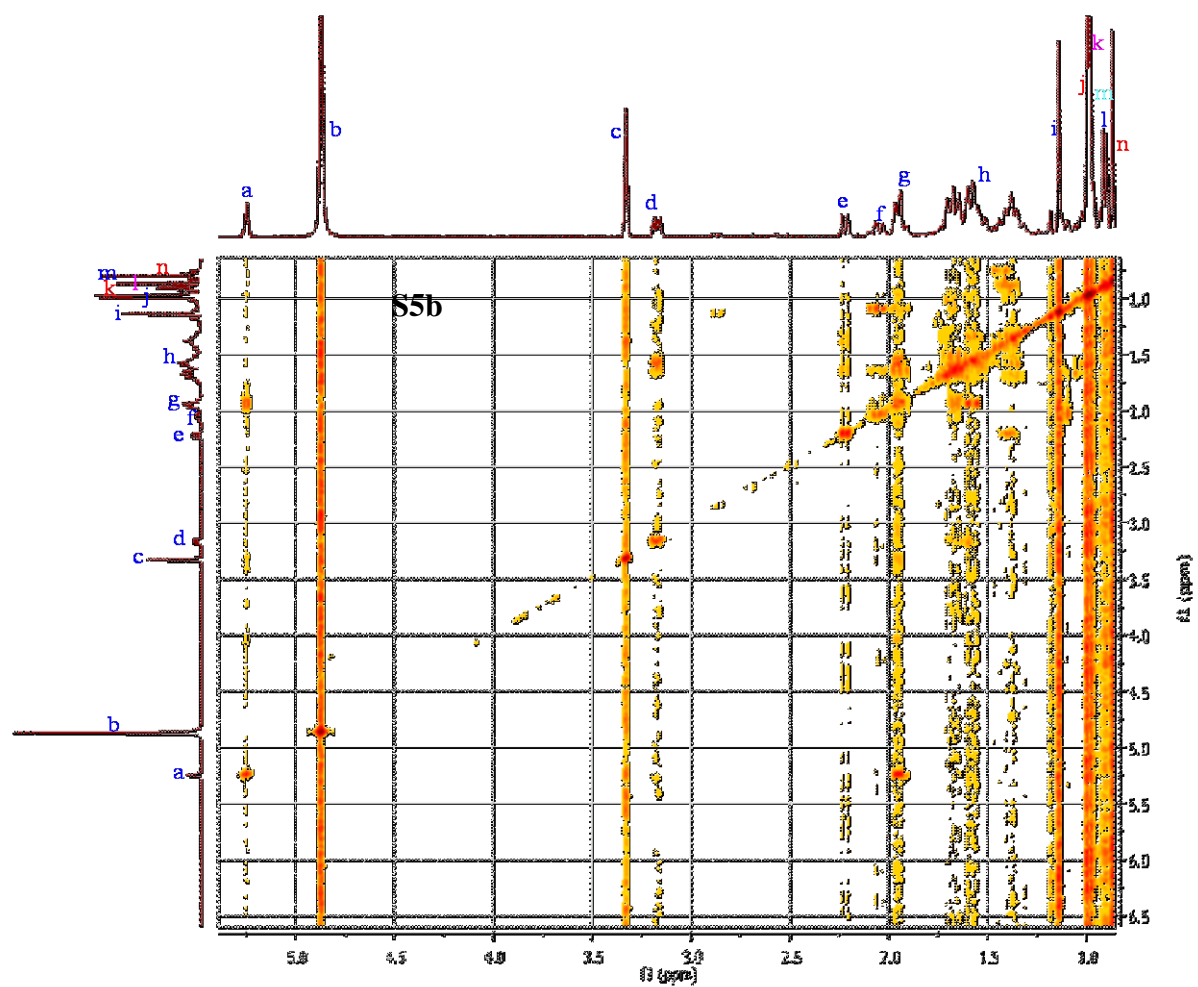
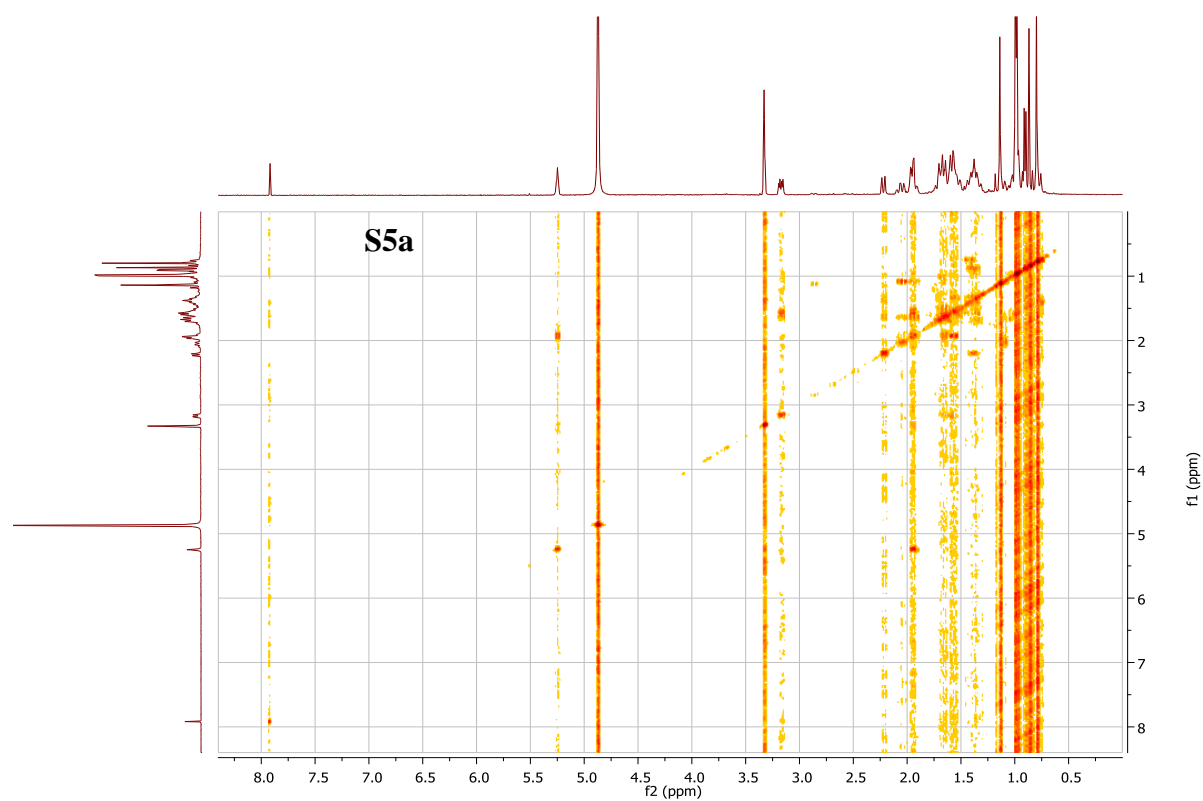


Figure32: Spectre COSY (S5a et S5b) de LF9-4

Le spectre montre l'absence de corrélation pour les protons dans le solvant (Hb et Hc). Ce qui confirme le proton du groupement hydroxyle. Les différentes corrélations observées sont relevées dans le tableau 13 :

Tableau 13 : Différentes corrélations observées sur le spectre COSY de LF9-4

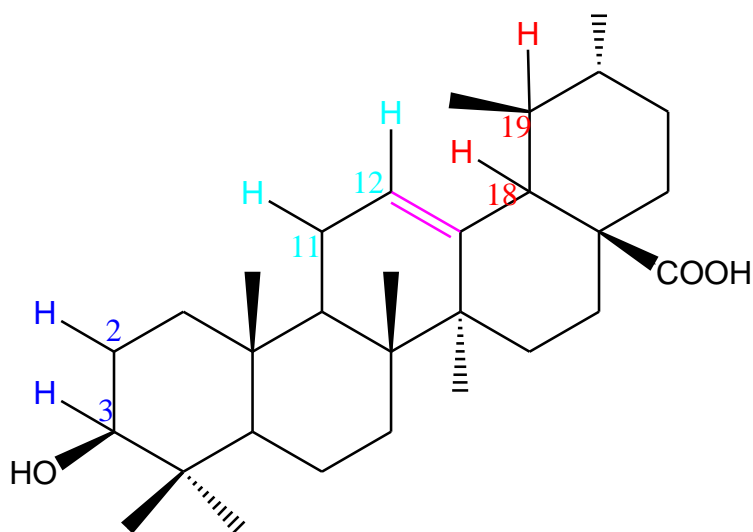
	a 5,25	b OH	c OH	d 3,17	e 2,22	f 2,11-1,99	g 1,95	h 1,77-1,29	i 1,14	j 0,99	k 0,97	l 0,90	m 0,87	n 0,80
a						x								
b														
c														
d								x						
e								x						
f	x								x					
g								x						
h				x	x		x							
i						x								
j														
k														
l														
m														
n														

Ce tableau montre que :

Le proton Ha à 5,25 ppm couple avec le proton Hf vers 1,99ppm qui indique le couplage entre le proton H-12 et le proton H-11

Le proton Hd à 3,17 ppm couple avec le proton Hh vers 1,75ppm ce qui confirme le couplage entre le proton H-3 et H-2.

Le proton He sortant à 2,22 ppm a aussi montré un couplage avec le proton Hh vers 1,68ppm indiquant le couplage entre le proton H-18 et H-19.



III-4-2-4-3-Spectre HMBC de LF9-4

L'interprétation du spectre HMBC(S7) de LF9-4 nous a permis de déterminer les corrélations entre un proton et des carbones distant de deux ou trois liaisons ou plus dans le cas d'un système conjugué.

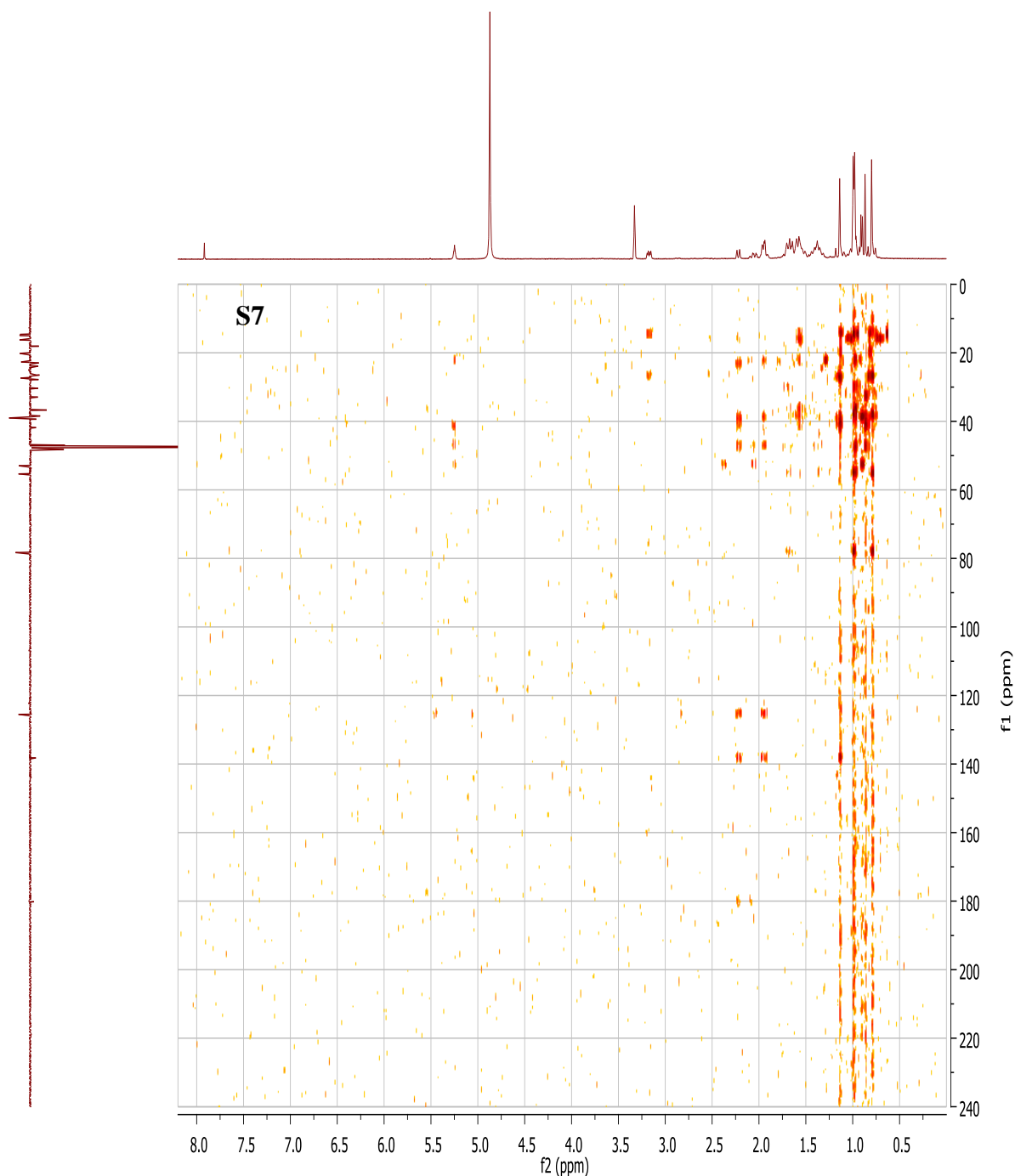


Figure 33 : Spectre HMBC S7 de LF9-4

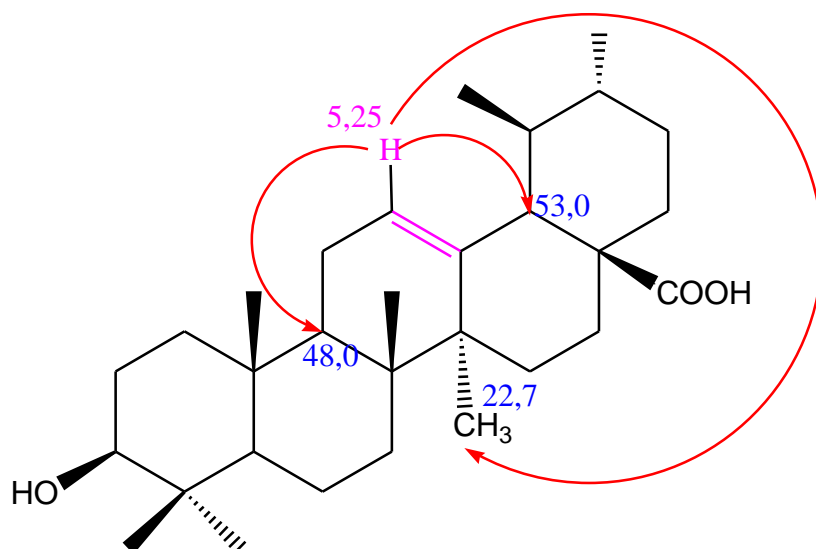
Les corrélations observées sur le spectre HMBC sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 14: Corrélations observées sur le spectre HMBC

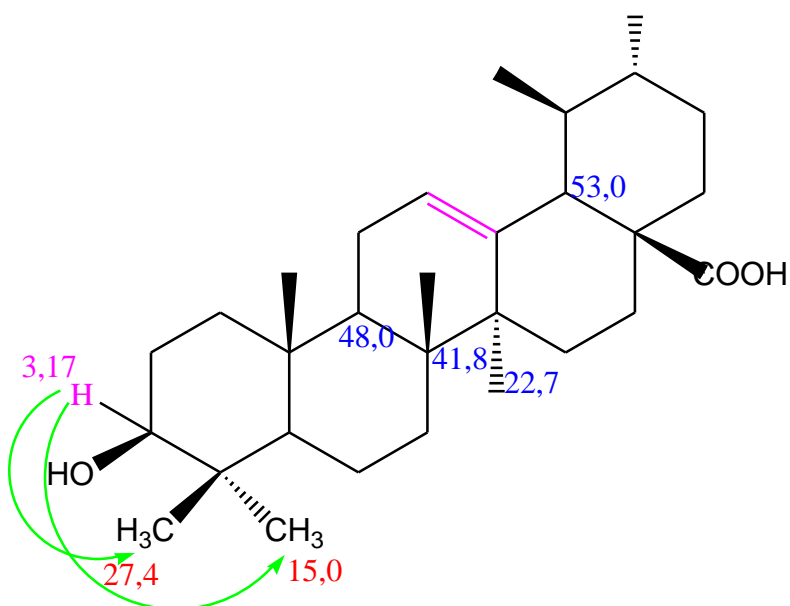
	5,25	3,17	2,22	2,11-1,99	1,95	1,77-1,29	1,14	0,99	0,97	0,90	0,87	0,80
180,2			x									
138,2			x		x							
125,5			x		x							
78,3						x						x
55,3												x
53,0	x			x						x		
48,0	x											
47,5			x	x				x				
47,4												
47,0					x							
41,8	x											
39,4			x				x					
39,0										x		
38,6											x	
38,4						x					x	
36,7								x				
32,9												
30,4								x				
27,8												
27,4		x										
26,5							x				x	x
23,9												
23,0			x									
22,7	x					x			x			
20,2												
18,1												
16,4						x		x				
16,2						x						
15,0		x					x		x			
14,7									x			

Ce tableau montre que :

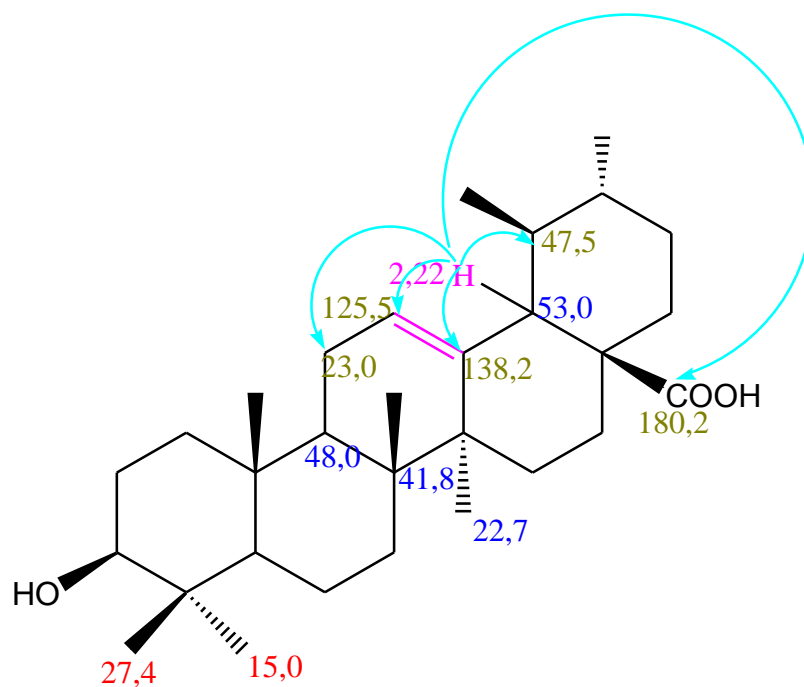
Le proton à 5,25 ppm (H-12) est corrélé avec les carbones à 53,0 ppm (C-18) et 48,0 ppm (C-9) ainsi qu'avec le carbone à 22,7 ppm (C-27) ce qui confirme la position du proton éthylénique en C-12.



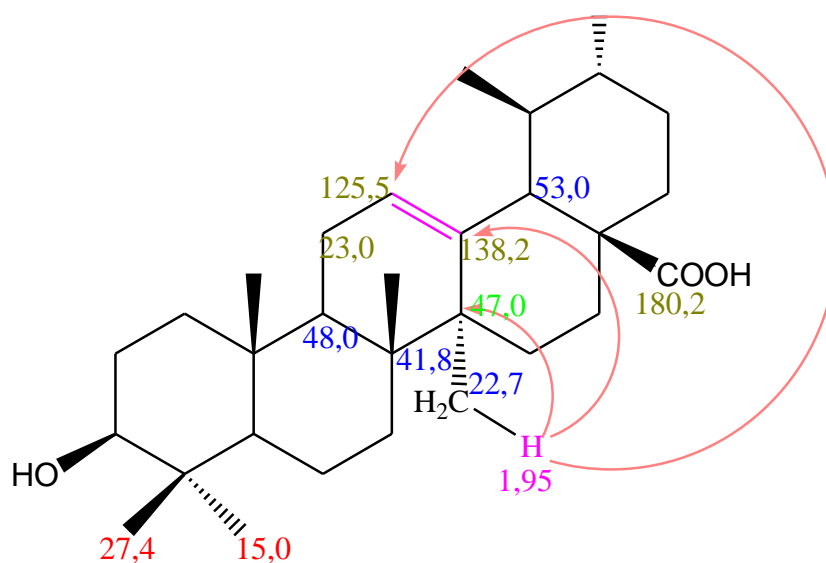
Le proton à $\delta=3,17$ ppm (H-3) a montré des taches de corrélation avec les carbones à 27,4 ppm (C-23) et 15,0 ppm (C-24)



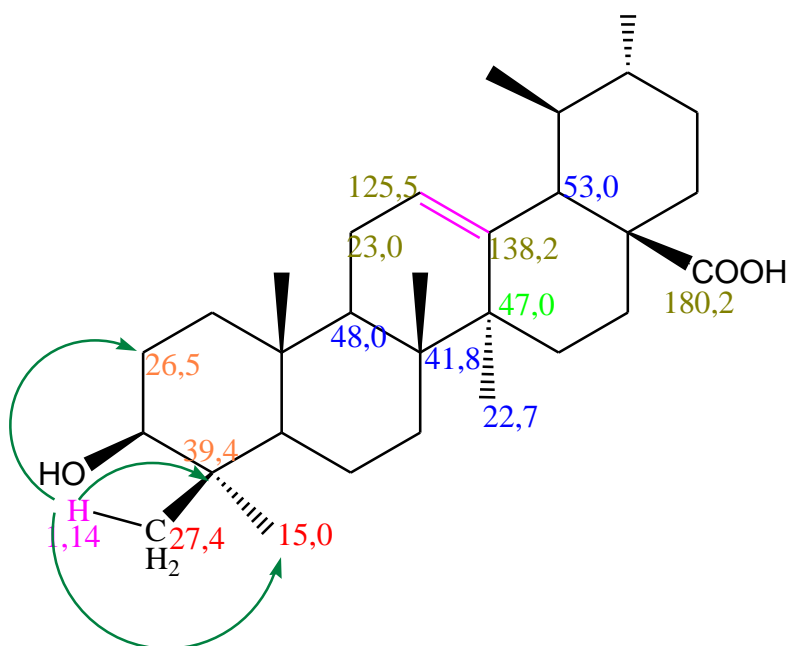
Le proton sortant à 2,22 ppm (H-18) possède des corrélations avec le carbone oléfinique non hydrogéné (C-13) à 138,2ppm ainsi que les carbones à 47,5ppm (C-19) et 23,0ppm(C-11). De plus, il est aussi corrélé avec le carbone éthylénique à 125,5ppm(C-12) et le carbone quaternaire à 180,2(C-28) confirmant la présence d'un carbone protoné (C-18) en α du carbone oléfinique.



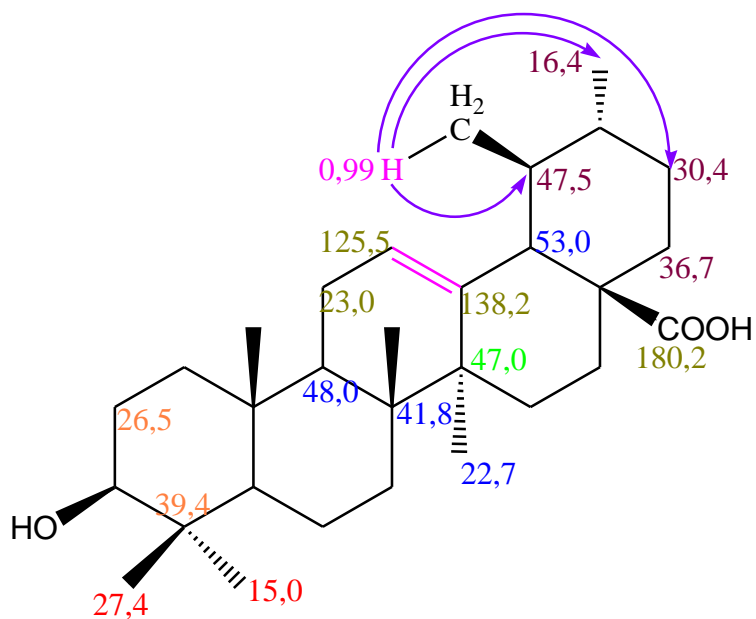
Le proton à 1,95ppm (H-27) a donné des taches de corrélations respectivement à 47,0ppm(C-14), 125,5ppm(C-12) et 138,2ppm(C-13).



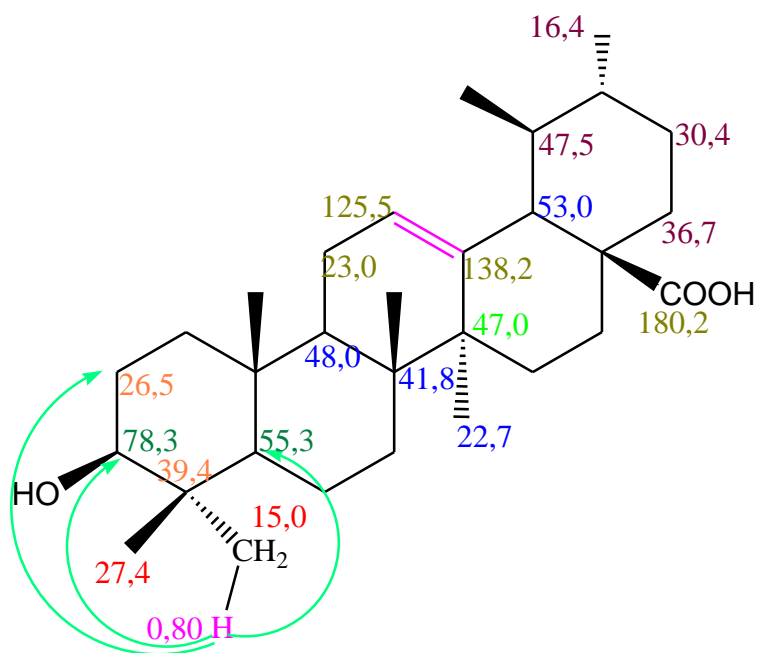
Le proton sortant à la valeur de déplacement chimique $\delta=1,14$ ppm (H-23) possède des corrélations avec les carbones localisés à 39,4ppm (C-4), 26,5ppm (C-2) et 15,0ppm



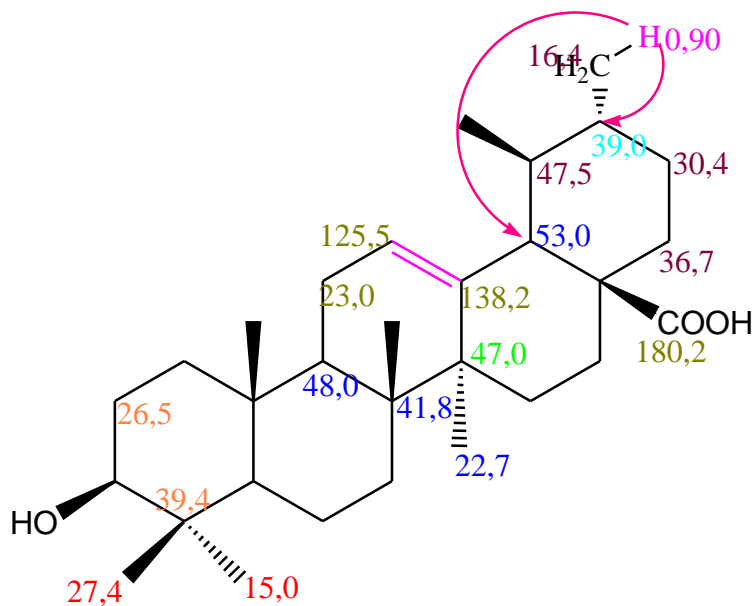
Pour le proton sortant à 0,99ppm (H-29), il est corrélé avec les carbones respectivement à 47,5ppm (C-19), 30,4ppm (C-21), et 16,4ppm (C-30).



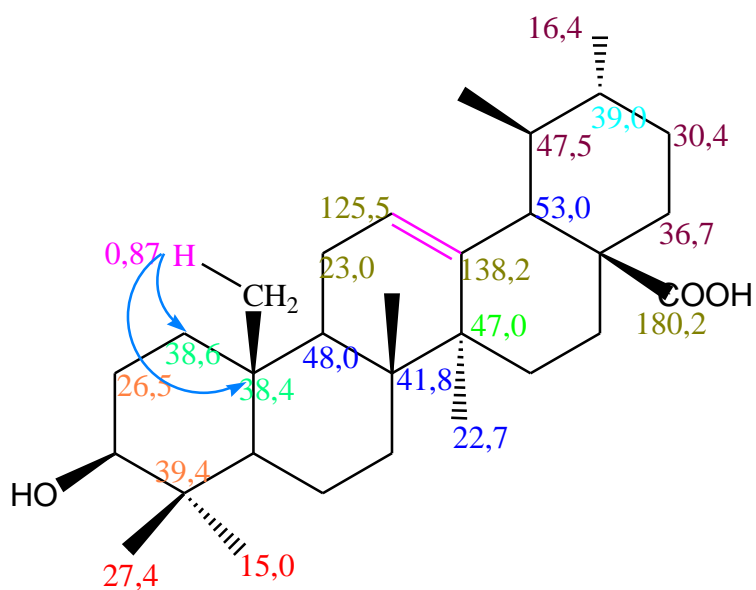
Le proton localisé à $\delta=0,80$ ppm (H-24) est corrélé avec les carbones sortant à 78,3ppm (C-3), 55,3 ppm (C-5) et 26,5 ppm (C-2) respectivement



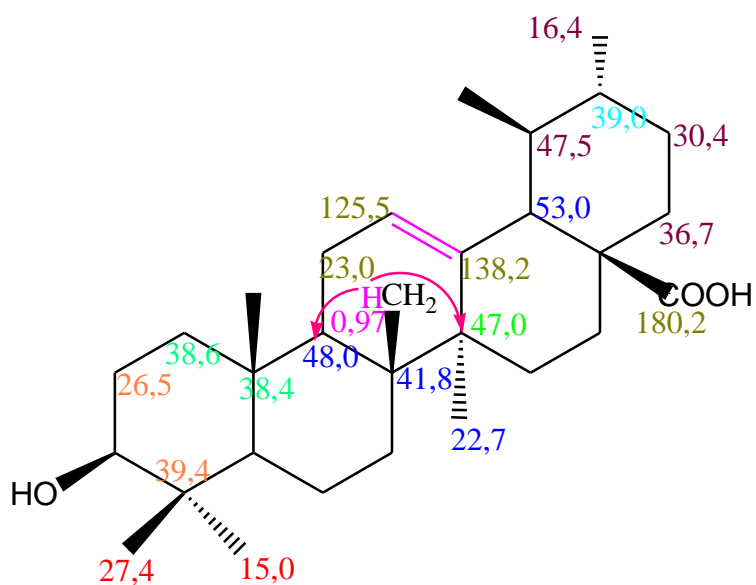
Le proton sortant à $\delta=0,90$ ppm (H-30) a montré des taches de corrélations avec les carbones à 53,0 ppm (C-18) et 39,0 ppm (C-20)



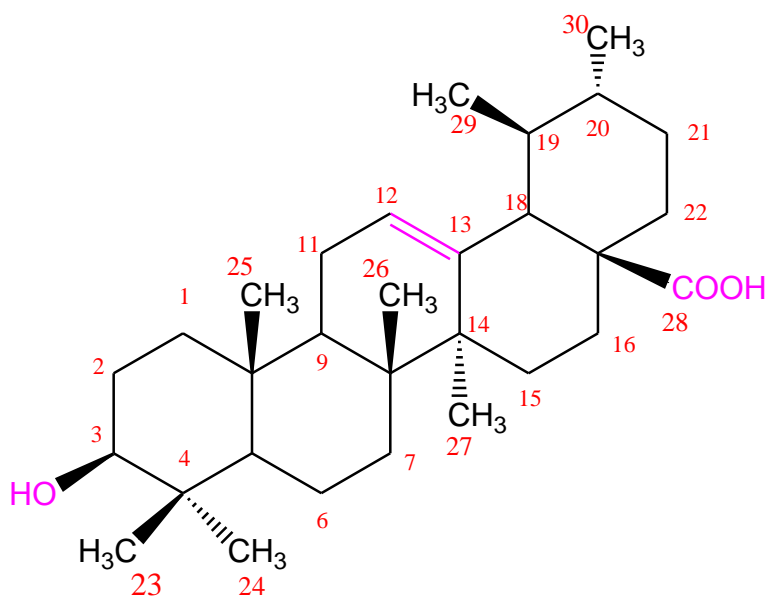
Pour le proton localisé à 1,87 ppm (H-25), il est corrélé avec les carbones à 38,6 ppm (C-1), 38,4 ppm (C-10) et 26,5 ppm (C-2).



Enfin, le proton situé à 0,90 ppm (H-26) a donné des taches de corrélation avec les carbones sortant à 47,0 ppm (C-9) et 48,0 ppm (C-14).



Ainsi, l'ensemble de toutes ces données avec les informations tirées des spectres de masse ainsi que la comparaison de ces données avec celles des littératures permettent d'identifier le composé LF9-4 comme étant l'acide **3 β -hydroxyurs-12-en-28-oïque** connue sous le nom de **l'Acide Ursolique**.^{[49][52][53][54][55]}



Acide 3β-hydroxyurs-12-en-28-oïque

Figure 34 : Structure du produit LF9-4

III-5- Résultats biologiques

Les extraits de ROL734LF1 passés en test antibactérien et antiplasmodial sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 15 : Liste des extraits de ROL734LF1 testés

Extraits	Test antibactérien	Test antiplasmodial
Extrait brut	testé	testé
ROL734LF1 Hexane	testé	testé
ROL734LF1 Acétate d'éthyle	testé	testé
ROL734LF1 Aqueux	testé	testé
ROL734LF1 Méthanol	testé	testé
LF3	testé	testé
LF7+LF8	testé	testé
LF9	testé	testé
LF12+LF13+LF14	testé	testé
LF15+LF16+LF17	testé	testé
LF20+LF21	testé	testé
LF26	testé	non testé

III-5-1- Evaluation de l'activité antibactérienne

➤ Par méthode bioautography

La méthode « bioautography », a été utilisée afin de localiser les bandes responsables de l'activité antibactérienne dans des extraits provenant de la tige et de la feuille de *Razafimandimbisonia minor*. Les bactéries utilisées pour ce test sont sensibles aux extraits lors

du criblage préliminaire. Il s'agit de : *S. aureus*, *C. perfringens*, *S. flexnerii*, *S. enterica* et *Y. enterocolitica*. A une concentration de 1mg par dépôt l'activité antibactérienne des extraits actifs est présentée dans la figure 35 et est récapitulée dans le tableau 17 :



a) souche : *S. aureus*

Dépôt : Témoin, Extraits
ROL734LF1 Aqueux, Acétate
d'éthyle, hexane
ROL734ST1 Acétate d'éthyle,
hexane



b) souche : *C. perfringens*

Dépôt : Témoin, Extraits
ROL734LF1 Aqueux, Acétate
d'éthyle, hexane
ROL734ST1 Acétate d'éthyle,
hexane



c) souche : *Y. enterocolitica*

Dépôt : Témoin, Extraits
ROL734LF1 Aqueux, Acétate
d'éthyle, hexane
ROL734ST1 Acétate d'éthyle,
hexane

Figure 35 : Exemples des résultats montrant l'inhibition de la souche par méthode Bioautography par les extraits : Zones d'inhibitions (entourées en rouge)

Tableau 16: Effet des extraits bruts de ROL 734 LFI et de ROL 734 STI sur la croissance des bactéries

Souches	GRAM+		GRAM-		
	<i>S. aureus</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>S. enterica</i>	<i>S. flexnerii</i>
Extraits ROL734					
LF1 aqueux	dépôt	dépôt	dépôt	dépôt	dépôt
LF1 acétate d'éthyle	dépôt	-	dépôt	dépôt	dépôt
LF1 hexane	dépôt	-	-	dépôt	-
ST1 acétate d'éthyle	dépôt	dépôt	dépôt	dépôt	dépôt
ST1 hexane	-	-	+++	-	-

- : Aucune bande active

Dépôt : Activité sur le dépôt

+++ : Trainée active

Ce tableau montre que l'activité antimicrobienne pour chaque extrait actif est localisée au niveau des dépôts. L'éluant utilisé n'a pas permis de faire migrer le produit actif.

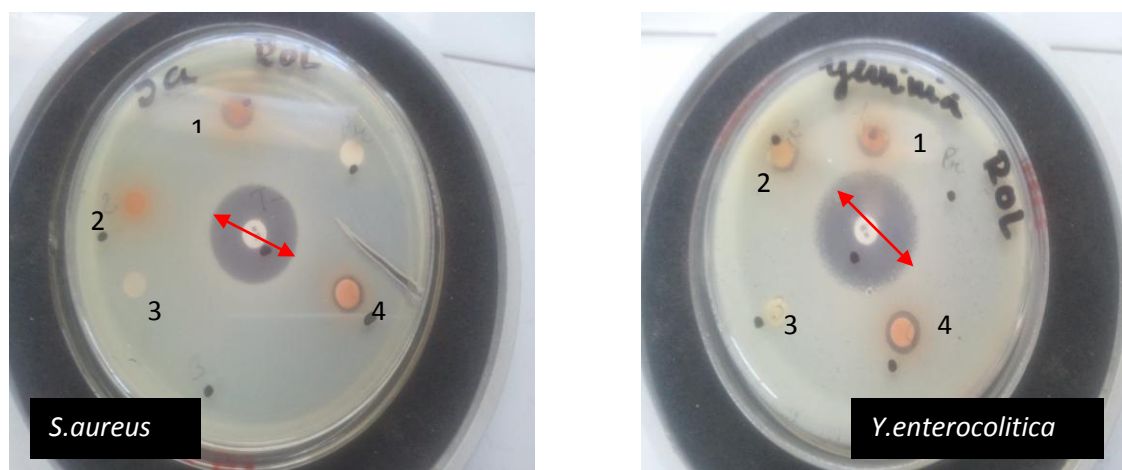
- Toutes les souches testées sont sensibles aux extraits ROL 734 LFI_ aqueux et ROL 734 STI acétate d'éthyle.

- Seule la souche *C. perfringens* est résistante sur ROL 734 LFI_ acétate d'éthyle
- ROL 734 LFI_hexane n'est actif que contre *S. aureus* et *S. enterica*
- Pour ROL 734 STI-hexane, Seule la souche *Y. enterocolitica* est sensible

En tenant compte de tous ces résultats, nous avons choisi pour la suite de l'étude de travailler sur les feuilles de *Razafimandimbisonia minor*(ROL734LF1).

➤ Par méthode d'antibiogramme

L'activité antimicrobienne des extraits méthanolique (ROL734LF1 MeOH), acétate d'éthyle (ROL734LF1 AcOEt), hexanique (ROL734LF1 Hex) et aqueux (ROL734LF1 H₂O) a été évaluée sur huit souches dont trois GRAM + (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*) et cinq GRAM - (*Shigella flexnerii*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*). A une concentration de 1mg/disque, l'activité antibactérienne des extraits actifs est présentée dans la figure 36 et est récapitulée dans le tableau 18 :



↔ : Zone circulaire ou halo d'inhibition

T : Témoin

1, 2, 3, 4 : Extraits MeOH, AcOEt, Hexane et Aqueux

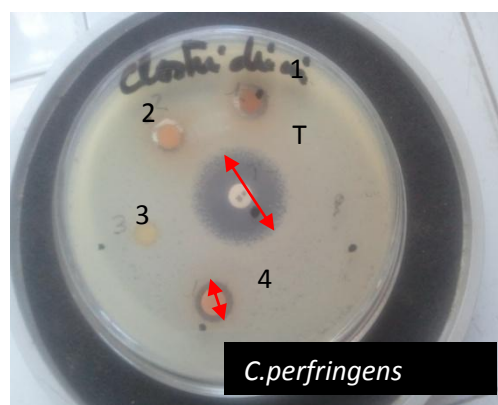


Figure 36 : Activité des 4 extraits de ROL734LF1

Tableau 17 : Effet des extraits sur la croissance des bactéries

Diamètre du halo d'inhibition (mm)								
Souches Extraits ROL734LF1	GRAM+			GRAM-				
	<i>S. aureus</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. flexnerii</i>	<i>S. enterica</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>P. mirabilis</i>
MeOH (1)	09±0	10±0	10±0	-	11±0	10±0	10±0	11±0
AcOEt (2)	-	09±0	10±0	-	10±0	10±0	10±0	10±0
Hexane (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
Aqueux (4)	08±0	10±0	10±0	-	10±0	10±0	10±0	10±0
Néomycine (30µg/disque)	24	21	23	21	22	23	25	25

D'après ces résultats, en se référent aux normes de **Ponce *et al*** (2003) sur la mesure des zones d'inhibition on a constaté que :

- ❖ L'extrait hexanique est inactif sur toutes les souches testées
- ❖ Seule la souche *Escherichia coli* a été résistante à l'extrait méthanolique et à l'extrait aqueux.
- ❖ Les quatre souches bactériennes GRAM- (*Salmonella enterica*, *Shigella flexnerii*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus mirabilis*) et les deux souches bactériennes GRAM+ (*Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*) sont sensibles aux extraits acétate d'éthyle, aqueux et méthanolique avec des diamètres d'inhibitions comprise entre 09 à 10mm.

Les extraits sont moins actifs par rapport à l'antibiotique de référence dont le diamètre d'halo d'inhibition varie de 21 à 25 mm.

III-5-2-Evaluation de l'activité antiplasmodiale

Le test antiplasmodial a été effectué sur des dix extraits obtenus à partir de l'extrait brut méthanolique et les résultats sont montrés dans la figure 37.

Cette figure montre que les quatre extraits testés ont un effet sur le parasite mais l'activité est plus intéressante sur l'extrait acétate d'éthyle ayant une concentration d'inhibition de $CI_{50}=21,2 \mu\text{g/ml}$. L'extrait aqueux présente une diminution de valeur de CI_{50} par rapport à l'extrait méthanolique de départ. Cet extrait a une activité modérée vis-à-vis de *Plasmodium falciparum* FCM29

Le fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle permet de diminuer les valeurs de concentration inhibitrice de ses sous fractions qui sont de $CI_{50}=9,48 \mu\text{g/ml}$ à $CI_{50}=19,23 \mu\text{g/ml}$.

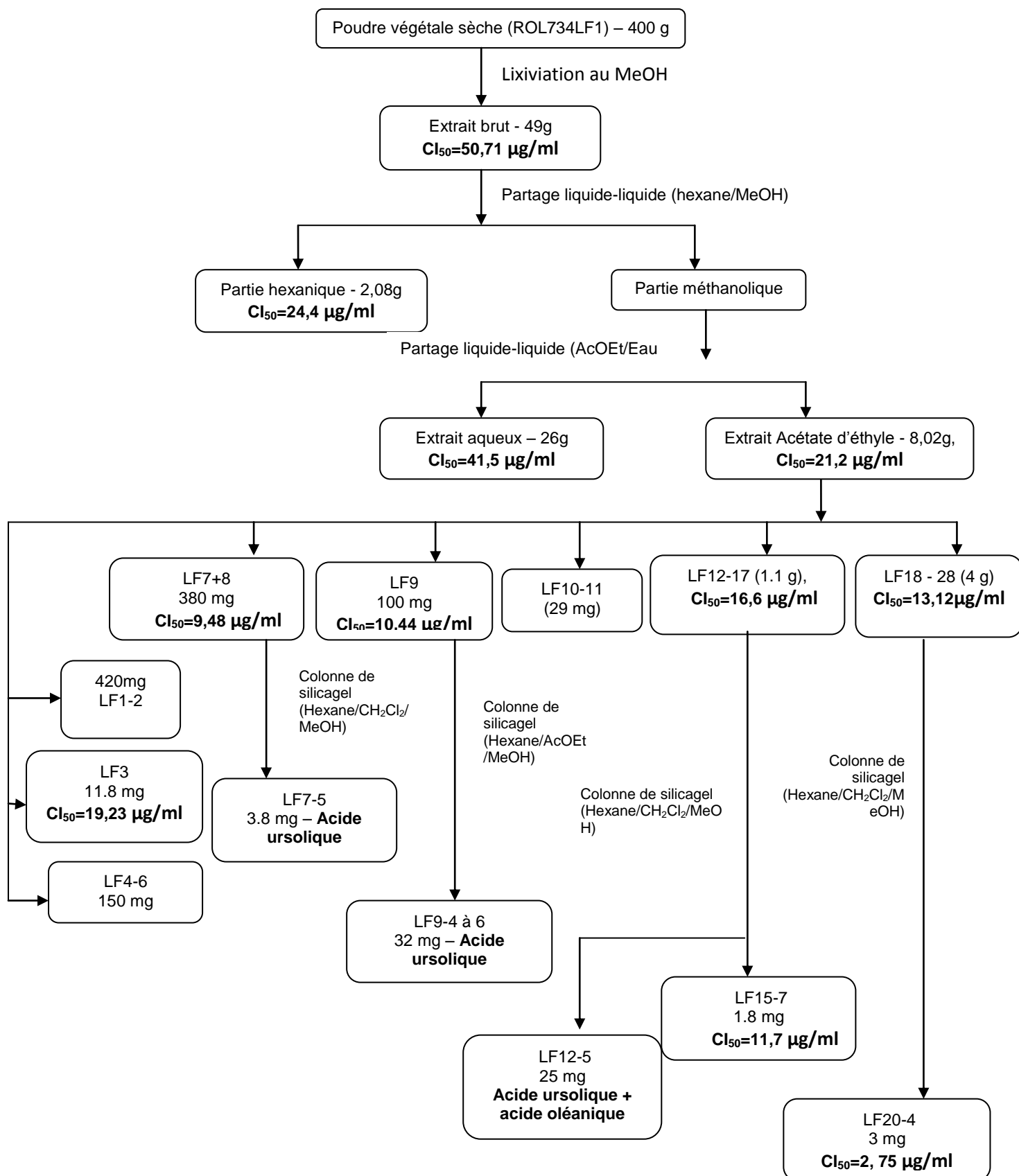


Figure 37 : Résultats des tests antiplasmodiaux sur les extraits

Ces résultats nous permettent de constater que les substances actives se trouvent principalement dans les fractions LF15-7, LF7+8 et LF9 qui ont respectivement une valeur de concentration d'inhibition de $CI_{50}=2,75\mu\text{g/ml}$, $CI_{50}=9,48\mu\text{g/ml}$ et de $CI_{50}=10,44\mu\text{g/ml}$.

III-5-3-Conclusion partielle sur les résultats et discussions

Plusieurs espèces de la famille végétale Rubiaceae sont utilisées dans différentes médecines traditionnelles. Des nombreuses équipes de recherche ont démontré que parmi les molécules isolées de ces espèces, l'acide ursolique, une molécule fréquemment rencontrée chez les Rubiaceae présente des activités diverses comme anti-inflammatoire [56], antibactérien [57], antiulcéreux [58], antidiabétique [59], antiplasmodial [60], hepatoprotecteur [61] et anticancéreuse [62].

Les tests effectués sur l'extrait brut méthanolique de départ ont montré une activité modérée vis-à-vis des bactéries et le parasite *P. falciparum* avec une valeur de diamètre du halo d'inhibition comprise entre 09 à 11 mm et une concentration inhibitrice de $CI_{50}= 50,71\mu\text{g/ml}$ respectivement. Le fractionnement de cet extrait par partage liquide-liquide a permis de diminuer cette valeur mais la plus intéressante est la fraction AcOEt. Cette dernière a été fractionnée de nouveau et ses fractions les plus actives notées LF7+8, LF9, LF15-7 ont respectivement des valeurs de concentration d'inhibition de $CI_{50}=9,48\mu\text{g/ml}$, $CI_{50}=10,44\mu\text{g/ml}$, $CI_{50}=2,75\mu\text{g/ml}$. Ce sont dans les deux premières fractions que nous avons pu isolé les produits notés LF7-5, LF9-4, LF9-5 et LF9-6 identifiés comme étant l'acide ursolique.

CONCLUSION GENERALE

Dans ce travail d'initiation à la recherche, les objectifs consistent à isoler et d'identifier les constituants chimiques des feuilles de *Razafimandimbisonia minor* (Rubiaceae) et à évaluer les activités biologiques des extraits et produits isolés en utilisant des techniques classiques en phytochimie telles qu'extraction par solvant, chromatographie et analyses spectrales et quelques techniques d'études biologiques telles que antibiogramme, bioautography et méthode de fluorescence avec SYBR Green I.

Cette plante est endémique de Madagascar et ses feuilles sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour traiter les maux néphrologiques.

Le criblage phytochimique des feuilles de cette plante a permis de mettre en évidence la richesse en iridoïdes, terpénoïdes, polyphénols et tanins.

L'extraction par partage liquide-liquide avec des solvants de polarité croissante de l'extrait brut méthanolique a permis d'obtenir la fraction hexanique, fraction acétate d'éthyle et fraction aqueuse.

Ces trois fractions ont été soumises à des tests antibactériens et antiplasmodial, la plus active est la fraction acétate d'éthyle avec une valeur de $CI_{50}=21,2\mu\text{g/ml}$ sur *Plasmodium falciparum* FCM29 et un diamètre du halo d'inhibition compris entre 09 à 10 mm.

Ainsi, l'approfondissement de l'étude est focalisé sur la fraction acétate d'éthyle. Le premier fractionnement a conduit à vingt huit fractions notées LF1 à LF28, qui a été soumis à des tests sur des bactéries et sur *P. falciparum* FCM29.

Les fractions actives ont été purifiées en procédant par diverses chromatographies sur colonnes successives, ce qui a conduit à l'obtention de onze produits monotaches en CCM, notés LF7-5, LF9-1, LF9-4, LF9-5, LF9-6, LF12-5, LF15-2, LF15-7, LF18-4, LF20-2 et LF20-12.

Ces produits isolés ont été analysés en spectroscopie de RMN, jusqu'à présent, les produits référencés LF7-5, LF9-5, LF9-6 et LF9-4 ont été identifiés comme étant le 3 β -hydroxyurs-12-en-28-oïque connu sous le nom trivial l'acide ursolique, un triterpénoïde courant dans la famille végétale Rubiaceae. Cette molécule est très utilisée dans le domaine pharmaceutique en tant qu'anti-inflammatoire, antibactérien, antifongique, antipaludique et anticancéreuse. Ainsi ce présent travail nous a permis de nous familiariser non seulement dans le domaine chimique mais aussi dans le domaine biologique. A part cela, cette recherche a fourni les premières informations chimiques et biologiques sur la plante *Razafimandimbisonia minor*.

Les confirmations structurales des autres produits isolés sont en cours. Et en perspective, nous envisageons d'étudier d'autres parties de cette plante.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ET WEBOGRAPHIQUES

- 1] **Judd, W., Campbell, S., Kellogg, A. & Stevens, E., 1999.** Plant Systematics- A Phylogenetic, Approach. Inc. Publishers, Sunderland, 465 p.
- 2] **APG III. 2009.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105–121.
- 3] **Davis, A. & Bridson, D. Goodman, S Jonathan P. & Benstead, J, 2003.** The Rubiaceae,—Introduction. *In* The Natural History of Madagascar. University of Chicago Press, Chicago: 431-434.
- 4] **Robbrecht, E., 1988.** Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions. Contributions to a new subfamilial classification. *Opera Botanica Belgica* 1:1 271.
- 5] **Bremer, B., Jansen, B., Oxelman M., Backlund, Lantz, H. & Kim, K., 1999.** More Characters or more Taxa for a Robust Phylogeny — case study from the coffee family (Rubiaceae). *Systematic Biology* 48 (3): 413-435.
- 6] **Mabberley, J., 2000.** The Plant Book, a portable dictionary of the Vascular Plants, second edition. Cambridge University Press, Cambridge, 857p.
- 7] **Andreasen, K. & Bremer, B., 2000.** Combined Phylogenetic Analysis in the Rubiace—Ixoroideae: morphology, nuclear and Chloroplast DNA Data. *American Journal of Botany* 87 (11) 2000, p. 1731-1748
- 8] **Robbrecht, E., 1993.** Advances in Rubiaceae Macrosystematics. *Opera Bot. Belg.* 6:1 195.
- 9] **Schatz G.E.(2001).** *Flore générique des Arbres de Madagascar*. Royal Botanic Gardens & Missouri Botanical Garden, Kew, 516 p.
- 10] **Schmitt JP, 1971.** Contribution à l'Inventaire des Plantes Médicinales de Madagascar. ORSTOM, Paris. 124 pages
- 11] **Boiteau P., Pasich B., Rakoto Ratsimamanga A., les triterpenoides en physiologie vegetale et animale, 1964,4, 734, 775.**
- 12] **Morrison G. H., Freiser H., 1957,** Solvent extraction in analytical chemistry, p 157.46.
- 13] **Charlot G., Méthodes physiques et physico-chimiques, Masson, 100, 101.**

- 14] **Mahuzier G., Hamon M.**, Abrégé de Chimie Analytique: *Méthode de séparation*, **1990**, tome 2, Masson, Paris, Milan, Barcelone, Mexico, 73, 105
- 15] **Berthiller A.**, *La chromatographie et ses applications*, **1973**, Dunod, 160 - 172.
- 16] **Randerath K.**, *La chromatographie sur couche mince*, **1964**, édition Gauthier –Villier, Paris.
- 17] **Wagner, S. B. Plant**, **1996**, Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas. Von, 2.ed. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York
- 18] **F. Rouessac, A. Rouessac, G. Ourisson** dans Analyse Chimique : Méthodes et Techniques Instrumentales Modernes, **1998**, Ed. Dunod.
- 19] **R. M. Silverstein, G.C.Bassler, T.C.Morill**, **1991**, Spectrometric identification of organic compounds, 5th edition, John Wiley INC.
- 20] **Baldwin M. A., Mc Lafferty, Woog F.**, *Mass Spectrum*, **1973**, 7p.
- 21] **Organisation mondiale de la sante (2011)**, *Rapport sur le paludisme dans le monde*, Genève, OMS
- 22] **Gardner, M.J. et al. (2002)**, « Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum », *Nature* 419 (6906), p. 498–511.
- 23] **Gillies, M. T. et B. De Meillon (1968)**, *The anophelinae of Africa south of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region)*, South African Institute for Medical Research, Publication, no. 54, 2e ed., p. 343.
- 24] **Archambaud M.**, **2009**, *Méthodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques in vitro*, Laboratoire Bactériologie-Hygiène, CHU Rangueil Toulouse
- 25] **Shittu O. B., Alofe F. V., Ogundaini A. O. And Tiwalade T. A. (2006)**, Bioautographic evaluation of antibacterial metabolite production by Wild Mushrooms, *Afr.J. Biomed.Res.*, 9, 57 62
- 26] **Udobi C. E., Onaolapo A. J. And Abdulsalaam I. A (2010)**, Bioautographic determination of the antisatphylococcal components of the stem bark of Parkia biglobosa (JACQ) BENTH (MIMOSACEAE) , *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 2(8), 108-112.
- 27] **Guerin-Fauble V. et Carrer G.** L'antibiogramme : principe, méthodologie, intérêt et limites, Journées nationales GTV-INRA.1999 ; 5-12

- 28] **Ponce A. G., Fritz r., Delvalle C. and Roura S. I.** (2003), Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic swiss chard, *Lebensm. Wiss. u-Technol.*, 36, 679-684.
- 29] **Tyler N. Bennett, Michelle P., Bojana G., Clement S., Andrew D. Kosar, Eugene D., Roepe P. D., 2004**, Novel, rapid and inexpensive cell-based quantification VI of antimalarial drug efficacy, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, May 2004, Vol 48, N°5, pp1807-1810.
- 30] **OMS.** Stratégie de l’OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002 – 2005. **2002.**
- 31] **Rabesa Z.A.** Notes on Malagasy plants utilized in the traditional pharmacopoeia, First international congress of ethnopharmacology. Strasbourg, **1990.**
- 32] **Schatz, G. E., 2001.** - Flore Générique des Arbres de Madagascar. 503p.
- 33] **Allorge, L., 2008.-** Plantes de Madagascar. Atlas.Ulmer.224p
- 34] **J. Bruneton**, ‘Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales’, Technique et documentation , Lavoisier Eds. 1993.
- 35] **V. Plouvier, J. Favre-Bonvin**, ‘Les iridoïdes et séco-iridoïdes : répartition, structure, propriétés,biosynthèse’, *Phytochemistry* **1971, 10**, 1697-1722
- 36] **Harbone J.B, 1973**, *Phytochemical methods* .Chapman and Hall; London; pp52-79
- 37] **Wallach O. 1887.** Zur Kenntnis der Terpene und ätherischen Oele. Justus Lieb. Ann. Chem., 238, 78-89.
- 38] **A. Lamarti, A. Badoc , G. Deffieux ,J.-P. Carde**, *biogénèse des monoterpènes*, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **1994**, 133, 79 – 99
- 39] **Allen K. G., Banthorpe D. V. & Charlwood B. V. 1977.** Metabolic pools associated with monoterpene biosynthesis in higher plants. *Phytochemistry* 16: 79-83.
- 40] **Konig G. M., Wright A.D. & Sticher O. 1990.** A new polyhalogenated monoterpène from the red alga *Plocamium cartilagineum*. *J .Nat. Prod.*, 53(6), 1615-1618.
- 41] **Herz, W., 1977.** in : V.H.Heywood, J.B.Harbone, B.L.Turner (Eds.), << The biology and chemistry of the compositae >>, Academic Press, london, P.337, Chapter 11.
- 42] **Baranska, M., Schulz, H., Kruger, H., Quilitzsch, R., 2005.** *Anal.Bianal.Chem.* 381, 1241

43] **Bruneton, J., 1993.** « Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales ». 2^e Edition, Université de Paris Sud, France, pp. 389-617.

44] **Donald, J.C., et George S.H., 1968.** « Chimie organique », 2^e Edition, Gautier Villars

45] **Langenheim, J.H., 1990.** Am. Scientist. 78, 16-24.

46] **Ourisson G. et Grabbe, P., 1961.** « Les triterpènes tétracycliques », Paris, Hermann Ed. 194.

47] **Raphel, I., 1966.** Natural products, Deuxième édition, Academic Press, INC. A laboratory guide, pp : 1-21, pp : 169-181.

48] **Rees, H.H., Googwin, T.W., 1974.** Biochem. Soc. Trans., 2, pp. 1027-1066.

49] **Gnoatto Sch, Dassonville-Klimpt A, Da Nascimento S, Galera P, Boumediene K, Gosman G et al.** Evaluation of Ursolic acid isolated from *Ilex paraguariensis* and derivatives of aromatase inhibition. European Journal of Medicinal Chemistry **2008**; 43:1865-1877.

50] **Akwasi Ampofo-Yeboah^{1, 2}, Helet Lambrechts¹, Danie Brink^{1, 3}, Fletcher Hiten⁴ and Evans Afriyie-Gyawu⁵,** Analysis of Oleanolic Acid and Ursolic Acid, Potential Antifertility Agents in Moringa (*Moringa oleifera*) Seed, Journal of Agricultural Science and Technology A 3 (**2013**) 989-999

51] **Doddrell, D.M.; Khong, P.W.; Lewis, K.G.** The stereochemical dependence of ¹³C chemical shifts in olean-12-enes and urs-12-enes as an aid to structural assignment. *Tetrahedron Lett.* **1974**, 15, 2381-2386.

52] **Daiane Martins,¹ Lillian Lucas Carrion,² Daniela Fernandes Ramos,² Kahlil Schwanka Salomé,³ Pedro Eduardo Almeida da Silva,² Andersson Barison,³ And Cecilia Veronica Nunez¹,** Triterpenes and the Antimycobacterial Activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae), Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume **2013**, Article ID 605831, 7 pages

53] **Masataka M, Yukari I, Kinuko I, Junko K:** New isoflavones from Belamcandae rhizome. *J Nat Med* **2007**, 61:329.

54] **Kriwacki W. R., Pitner T. P.** Current aspects of practical Two Dimensional (2D) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy applications to structure elucidation. Pharmaceutical Research. **1989**: Vol 6, n 7:531-554.

- 55] **Mahato S. B., Nandy A. K.** ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids :Acompilation and some salient features .Phytochemistry.**1994** :vol37 ,n06 :1517-1575.
- 56] **Fan, Y.M., Xu, L.Z., Gao, J., Wang, Y., Tang, X.H., Zhao, X.N., Zhang, Z.X., 2004.** Phytochemical and antiinflammatory studies on *Terminalia catappa*. Fitoterapia 75, 253-260.
- 57] **Collins, M.A., Charles, H.P., 1987.** Antimicrobial activity of carnosol and ursolic acid: two anti-oxidant constituents of *Rosmarinus officinalis*. Food Microbiology 4, 311-315.
- 58] **Gupta, M.B., Nath, R., Gupta, G.P., Bhargava, K.P., 1981.** Antiulcer activity os some plant triterpenoids. Indian Journal of Medical Research 73, 649-652.
- 59] **Basnet, P., Kadota, S., Terashima, S., Shimizu, M., Namba, T., 1993.** Two new 2-arylbenzofuran derivatives from hypoglycémie activity-bearing fractions of *Morus insignis*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo) 41, 1238-1243.
- 60] **Liu, J., 1995.** Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. J Ethnopharmacol. 49: 57-68.
- 61] **Shukla, B., Visen, P.K.S., Patnaik, G.K., Tripathi, R.C., Srimal, R., Dayal, Dobhal, D.C., 1992.** Hepatoprotective activity in the rat of ursolic acid isolated from *Eucalyptus* hybrid. Phytotherapy research 6, 74-79.
- 62] **Kim, S.H., Ahn, B.-Z., Ryu, S.Y., 1998.** Antitumor effects of ursolic acid isolated from *Oldenlandia diffus*. Phytotherapy Research 12, 553-556.
- 63] **Kebarle, P.** A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. J. Mass Spectrum, **2000**, 35, 804-817.
- 64] **Siegfried E. Drewes, Marion M. Horn, Joseph D. and Barry Bredenkamp,** enoliciridolactone and other iridoids from *alberta magna Phyrorhmsrry*, Vol. 47. No. 6, pp. 991-996, **1998**
- 65] **R. Aquino, N. DE Tommasi, M. Tapia, M. R. Lauro, and L. Rastrelli,** “New 3-methoxyflavones, an iridoid lactone and a flavonol from *Duroia hirsuta*,” *Journal of Natural Products*, vol. 62, no. 4, pp. 560–562, **1999**
- 66] **Daiane Martins,¹ Lillian Lucas Carrion,² Daniela Fernandes Ramos,²Kahlil Schwanka Salomé,³ Pedro Eduardo Almeida da Silva,²Andersson Barison,³ and Cecilia Veronica Nunez¹,** Triterpenes and the Antimycobacterial Activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae), Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume **2013**, Article ID 605831, 7 pages

67] **Marcia N. Lopesa, Fabiano C. Mazzaa, Maria Claudia M. Youngb, and Vanderlanda S. Bolzania**, *Complete Assignments of ¹H and ¹³C-NMR Spectra of the 3,4-seco-Triterpene Canaric Acid isolated from Rudgea jasminoides*, *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 10, No. 3, 237-240, **1999**

68] **S. Ueda, Y. Iwahashi** – ‘Production of anti-tumor-promoting iridoid glucosides in *Genipa Americana* and its cell cultures’ - *J. Nat. Prod.* **1991**, 54, 1677-1680

69] **R. Guarnaccia, K. M. Madyastha, E. Tegtmeier, C. J. Coscia** – ‘Geniposidic acid, an iridoid glucoside from *Genipa Americana*’ - *Tetrahedron Letters* **1972**, 50, 5125-5127

70] **O. Kunert, G. Sreekanth, G. S. Babu, B. V. R. A. Rao, M. Radhakishan, B. R. Kumar, R. Saf, A. V. N. A. Rao, W. Schühly** – ‘Cycloartane Triterpenes from *Dikamali*, the Gum Resin of *Gardenia gummifera* and *Gardenia lucida*’ - *Chem. Biodiversity* **2009**, 6, 1185-1191.

71] **Weimin Zhao, Genjin Yang,* Rensheng Xu and Guowei Qint**, three monoterpenes from *mussaenda pubescens*, phytochemistry, vol. 41, no. 6, pp. 1553 1555, **1996**

73] **A. Lopez, J. B. Hudson, and G. H. N. Towers**, “Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 77, no. 2-3, pp. 189-196, **2001**.

74] **Pio Correa, M.** *Dicionário de Plantas Úteis do Brasile das Plantas Exóticas Cultivadas* 1st Ed., Ministério da Agricultura, Brasil, **1931**, p. 363

REFERENCES WEBOGRAPHIQUES

W1] Tropicos.org, Missouri Botanical Garden. 24 Feb 2016,

<http://www.tropicos.org/Name/1100351600>

W2] <http://membres.lycos.fr/ravao>, Module 1: Criblage phytochimique, consulté en 2007

W3] <http://www.tropicos.org/Name/100351600?projectid=17>

W4] <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-459334>

ANNEXES

ANNEXE I

Préparation des réactifs

Réactif de Wagner : Mélanger 2g d'Iodure de potassium, 1,27g d'Iode et 100 ml d'eau distillée puis agiter jusqu'à dissolution complète des produits.

Réactif de Mayer : Dissoudre 1,35g de Chlorure Mercurique (II) dans 94 ml d'eau distillée. Ajouter 5g d'Iodure de potassium et agiter jusqu'à dissolution complète des produits. La solution obtenue est ramenée à 100 ml avec de l'eau distillée.

Réactif de Dragendorff : Dissoudre 1,7 g de nitrate de Bismuth et 20 g d'acide tartrique dans 30 ml d'eau distillée. (Solution A)

Dissoudre 8 g d'Iodure de potassium dans 40 ml d'eau distillée. (Solution B)

Au moment de l'emploi, mélanger 2,5 ml de A, 2,5 ml de B et 10 ml de solution d'acide tartrique à 20 %.

Picrate de Sodium : (5g de carbonate de Sodium + 100 ml d'eau distillée + 0,5 ml d'acide picrique).

Gélatine salée 1% : (gélatine 1% + NaCl 10% 50/50, V/V).

Révélateur Vanilline sulfurique :

Solution A : On mélange 0,5g de vanilline dans 50mL d'éthanol

Solution B : 2mL d'acide perchlorhydrique (HClO_4 , 60%) a été mélangé dans 38mL d'eau au moment de l'emploi, la solution A et la solution B sont mélangées à volumes égaux.

Solution C : (Préparation H_2SO_4 , 30%) : Un volume de 10,26mL H_2SO_4 concentré a été dilué avec 18mL d'eau distillé. Cette quantité a été ajustée par ajout de l'eau jusqu'à obtenir un volume finale égale à 60mL.

Révélation: Au moment de la révélation, la pulvérisation de la plaque s'est effectuée en deux temps. Pulvérisation par le mélange (solution A + solution B), puis par la solution C suivit de chauffage.

ANNEXE II

Composition chimique des différents milieux de culture

Müeller-Hinton

Extrait de viande : 2,0 g

Peptone tryptique de caséine : 17,5 g

Amidon : 1,5 g

Agar : 15,0 g

pH $7,3 \pm 0,1$ à 25°C

Eau peptonée

Peptone bactériologique : 10 g

Chlorure de sodium : 5 g

Eau distillée : 1000 ml

pH 7,6

B. Préparation des milieux à partir de poudre déshydratée

Préparation du milieu MUELLER HINTON

Suspendre 38g de poudre de Mueller Hinton dans 1000 ml d'eau distillée.

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 min.

Préparation du bouillon MUELLER HINTON

Suspendre 21g de poudre de Bouillon Mueller Hinton dans 1000 ml d'eau distillée. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 min.

Préparation de L'EAU PEPTONEE

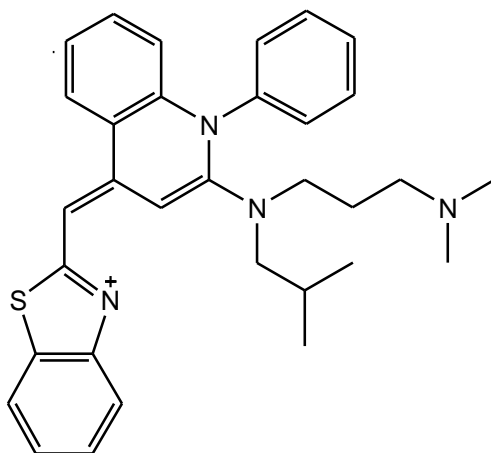
Suspendre 15g de poudre dans 1000 ml d'eau distillée

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 min.

ANNEXE III

Structure du réactif biologique : SYBR Green I

Le **SYBR Green I** ([2-[N-(3-diméthylaminopropyl)-N-propylamino]-4-[2,3-dihydro-3-méthyl- (benzo-1,3-thiazol-2-yl)-méthylidène]-1-phényl-quinolinium]⁺): est un composé organique aromatique de formule chimique $C_{32}H_{37}N_4S$ faisant partie des cyanines asymétriques (fluorophores). Le SYBR green I est une molécule pouvant se fixer sur tous les types d'acides nucléiques doubles brins et devenant alors un très bon fluorophore.



Auteur : RAFANOMEZANTSOA Safidinirina Pascal

Adresse : Laboratoire de Chimie Organique-Spectrométrie de Masse
Ampasampito, Département de Chimie Organique,
Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo BP 906

E.mail : safidyrafanomezantsoa@gmail.com

Contact : 0337158308

Titre : Etudes chimique et biologique de *Razafimandimbisonia minor* (Rubiaceae), endémique de Madagascar

Nombre de pages : 66

Nombre de figures : 37

Nombre de références : 78

Nombre de tableaux : 17

Résumé :

Ce travail de recherche consiste à l'isolement et l'identification des constituants chimiques des feuilles de *Razafimandimbisonia minor* (Rubiaceae), une plante endémique de Madagascar utilisée traditionnellement pour traiter les maux néphrologiques. Le criblage phytochimique de la plante a mis en évidence la présence de tritérpénoïdes, d'iridoïdes, de polyphénols et de tanins. La poudre de feuilles séchées a été soumise à une extraction par macération méthanolique suivie d'un partage liquide-liquide avec des solvants de polarité croissante. (Hexane, Acétate d'éthyle, Eau). Il a été démontré que l'extrait AcOEt possède une activité antibactérienne et antiplasmodial intéressante.

Le fractionnement de cet extrait AcOEt a permis d'isoler onze produits. L'utilisation des méthodes spectrométriques SM, RMN 1D et 2D ont permis d'identifier un produit nommé LF9-4 à l'acide 3 β -hydroxyurs-12-en-28-oïque ou acide ursolique, un triterpénoïde courant dans la famille végétale Rubiaceae. Cette recherche a fourni les premières informations chimiques et biologiques de cette plante. Il est envisagé d'étudier d'autre partie de cette plante et de déterminer les structures des autres produits.

Mots clés : *Razafimandimbisonia minor*, Rubiaceae, Triterpénoïde, Acide ursolique, RMN, SM

Title : Chemical and Biological Studies of *Razafimandimbisonia minor* (Rubiaceae), endemic to Madagascar

Abstract:

This research involves the isolation and identification of chemical components of leaves *Razafimandimbisonia minor* (Rubiaceae), a plant endemic to Madagascar traditionally used to treat nephrological ailments. The phytochemical screening of the plant showed the presence of triterpenoids, the iridoids, polyphenols and tannins. The dried leaves powder was extracted by methanolic maceration followed by liquid-liquid partition with solvents of increasing polarity. (Hexane, ethyl acetate, water) .It has been demonstrated that the AcOEt extract has interesting antibacterial and antiplasmodial activity. Fractionation of this AcOEt extract resulted in isolation of eleven products. The use of spectrometric methods MS ,1D and 2D NMR has identified a product named LF9-4 to 3 β -hydroxyurs-12-en-28-oic acid or ursolic acid, a common triterpenoid in the Rubiaceae family . This research provided the first chemical and biological information from this plant. Study of another part of this plant and structural determination of other products will be planned in subsequent investigation.

Keywords: *Razafimandimbisonia minor*, Rubiaceae, Triterpenoid, Ursolic Acid, NMR, MS

Encadrants:

Docteur Dimby Andrianina RALAMBOMANANA (Faculté des Sciences- Université d'Antananarivo)

Docteur Tiana Sylvia RALAMBONIRINA(CNARP)