

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n°1 : Caractéristiques des extraits obtenus par les différentes techniques d'extraction.

Tableau n°2 : Résultats du criblage phytochimique à partir de la poudre d'écorces de tige.

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

Tableau n°4 : Composition du milieu utilisé dans les tests hémolitiques.

Tableau n°5 : Normes utilisées pour la lecture des résultats d'antibiogramme.

Tableau n°6 : Influence de la voie d'administration sur la toxicité de l'extrait.

Tableau n°7 : Résultats de la détermination de la DL50.

Tableau n°8 : Totaux cumulatifs des souris mortes et des souris survivantes.

Tableau n°9 : Lésions histopathologiques au niveau des organes cibles après administration de l'extrait à la dose de 628 mg/kg de souris.

Tableau n°10 : Résultat des tests hémolitiques.

Tableau n°11 : Effets de l'extrait brut sur les têtards de grenouille.

Tableau n°12 : Effets de l'extrait sur les têtards de grenouille.

Tableau n°13 : Effets de l'extrait brut sur les alevins de carpes.

Tableau n°14 : Effets de l'extrait sur les alevins de carpes.

Tableau n°15 : Pourcentage de la germination de graines en présence d'extrait brut à 1mg/ml.

Tableau n°16 : Taux d'inhibition et de stimulation de la croissance des hypocotyles et épicotyles de petit pois et de riz au douzième jour de l'expérience.

Tableau n°17 : Caractéristiques des germes-tests utilisés.

Tableau n°18 : Sensibilité des germes-tests vis-à-vis de l'extrait brut et de l'extrait.

Tableau n°19 : Résultats de la détermination de la CMI sur l'extrait brut.

Tableau n°20 : Résultats de la détermination de la CMI sur l'extrait.

LISTE DES FIGURES

Figure n°1 : *Uapaca thouarsii* ; a) plante entière; b) rameau de tige ; c) écorce de tige.

Figure n°2 : Répartition géographique de la plante.

Figure n°3 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'extraction et de la purification des principes toxiques.

Figure n°4 : Chromatogramme récapitulatif montrant l'évolution de l'homogénéité des différents extraits obtenus lors de l'extraction et de purification.

Figure n°5 : Courbes des totaux cumulatifs des souris mortes et des souris survivantes en fonction des doses utilisées.

Figure n°6 : Lésions histologiques au niveau du **cerveau** dues à l'administration par voie i.p. de l'extrait E2 à la dose de 628,8 mg/kg (Grossissement X 400).

1 : parenchyme cérébral; 2 : capillaire normal ; 3 : capillaire dilaté.

Figure n°7 : Lésions histologiques au niveau du **foie** dues à l'administration par voie i.p. de l'extrait E2 à la dose de 628,8 mg/kg (Grossissement X 400).

1 : veine centro-lobulaire ; 2 : hépatocyte ; 3 : capillaire sinusöide normal ; 4 : capillaire sinusöide dilaté ; 5 : nappe hémorragique.

Figure n°8 : Lésions histologiques au niveau du **poumon** dues à l'administration de l'extrait par voie i.p. de l'extrait E2 à la dose de 628,8 mg/kg de poids (Grossissement X 400).

1 : alvéole ; 2 : tissu inter-alvéolaire ; 3 : capillaire normal ; 4 : capillaire dilaté ; 5 : cellule enflammée.

Figure n°9 : Lésions histologiques au niveau de l'**intestin** dues à l'administration par voie i.p. de l'extrait E2 à la dose de 628,8 mg/kg de poids (Grossissement X 400).

1 : muqueuse ; 2 : séreuse ; 3 : capillaire normal ; 4 : vaisseau congestif.

Figure n°10 : Photo de la plaque montrant les résultats des tests hémolytiques sur hématies de mouton de EB et de E2 à différentes concentrations.

Figure11 : Schéma récapitulatif de la germination des graines en présence de différentes concentrations en extrait brut.

Figure n°12 : Evolution de l'épicotyle de riz en fonction de la concentration en extrait brut.

Figure n°13 : Evolution de l'hypocotyle de riz en fonction de la concentration en extrait brut.

Figure n°14 : Evolution de l'épicotyle de petit pois en fonction de la concentration en extrait brut.

Figure n°15 : Evolution de l'hypocotyle de petit pois en fonction de la concentration en extrait.

Figure n°16 : Effets de l'extrait à la dose de 28 µg sur la levée de la dormance apicale des jeunes plantules de petit pois.

Figure n°17 : Résultats de la détermination de la CMI de l'extrait brut vis- à vis de *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Listeria ivanovii* par la méthode des disques.

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
REMERCIEMENTS.....	
LISTES DES ABREVIATIONS.....	viii
GLOSSAIRE.....	ix
INTRODUCTION GENERALE.....	1
Première partie : ETUDE CHIMIQUE.....	
1.INTRODUCTION.....	4
2 MATERIELS ET METHODES.....	4
2.1.MATERIELS.....	4
2.1.1. MATERIEL VEGETAL.....	4
2.1.1.1. Description du genre <i>Uapaca</i>	4
2.1.1.2. Description de <i>Uapaca thouarii</i>	5
2.1.1.3. Répartition géographique.....	5
2.1.1.4. Préparation du matériel végétal.....	8
2.1.2. PRODUITS CHIMIQUES.....	8
2.2. METHODES.....	8
2.2.1. METHODES D'EXTRACTION.....	8
2.2.1.1. Extraction aqueuse à froid.....	8
2.2.1.2. Extraction hydroalcoolique.....	8
2.2.1.3. Extraction aqueuse à chaud et à reflux.....	9
2.2.2. METHODES DE PURIFICATION.....	9
2.2.2.1. Dialyse.....	9
2.2.2.1.1. Principe.....	9
2.2.2.1.2. Mode opératoire.....	9
2.2.2.1.2.1. Préparation de la membrane.....	9
2.2.2.1.2.2. Technique de la dialyse.....	9
2.2.2.2. Fractionnement par le n-butanol.....	10
2.2.2.2.1. Principe.....	10
2.2.2.2.2. Mode opératoire.....	10
2.2.2.3. Traitement par la chaleur.....	10
2.2.2.3.1. Principe.....	10

	<u>Pages</u>
2.2.2.3.2. Mode opératoire.....	10
2.2.2.4. Traitement à l'éthanol 30%.....	10
2.2.2.4.1. Principe.....	10
2.2.2.4.2. Mode opératoire.....	11
2.2.2.5. Traitement à l'acétate neutre de plomb.....	11
2.2.2.5.1. Principe.....	11
2.2.2.5.2. Mode opératoire.....	11
2.2.2.6. Traitement par le charbon actif.....	11
2.2.2.6.1. Principe.....	11
2.2.2.6.2. Mode opératoire.....	11
2.2.3. METHODES ANALYTIQUES.....	12
2.2.3.1. Méthode de séparation par chromatographie sur couche mince.....	12
2.2.3.1.1. Principe.....	12
2.2.3.1.2. Mode opératoire.....	12
2.2.3.1.2.1. Préparation de l'extrait.....	12
2.2.3.1.2.2. Dépôt de l'échantillon.....	12
2.2.3.1.2.3. Développement.....	12
2.2.3.1.2.4. Révélation du chromatogramme.....	12
2.2.3.2. Méthodes de détection des familles chimiques.....	13
2.2.3.2.1. Préparation des extraits à analyser.....	13
2.2.3.2.1.1. Extrait aqueux.....	13
2.2.3.2.1.2. Extrait hydroalcoolique.....	13
2.2.3.2.1.3. Extrait acide.....	13
2.2.3.2.1.4. Extrait chloroformique.....	13
2.2.3.2.2. Détection des alcaloïdes.....	14
2.2.3.2.3. Détection des flavonoïdes.....	14
2.2.3.2.4. Détection des leucoanthocyanes.....	14
2.2.3.2.5. Détection des tanins et polyphénols.....	14
2.2.3.2.5.1. Test au chlorure ferrique.....	14
2.2.3.2.5.2. Test à la gélatine salée.....	14
2.2.3.2.5.3. Test à la gélatine à 1%.....	14
2.2.3.2.6. Détection des anthraquinones.....	15
	<u>Pages</u>

2.2.3.2.7. Détection des saponines.....	15
2.2.3.2.7.1. Indice de mousse.....	15
2.2.3.2.7.2. Test hémolytique sur hématies de mouton.....	15
2.2.3.2.8. Détection des desoxy-oses.....	15
2.2.3.2.9. Détection des stéroïdes et des triterpènes.....	15
2.2.3.2.10. Détection des iridoïdes.....	16
2.2.4. METHODE DE CONCENTRATION.....	16
3. RESULTATS.....	16
3.1. ISOLEMENT DES PRINCIPES TOXIQUES.....	16
3.1.1.EXTRACTIONS.....	16
3.1.1.1. Extraction aqueuse à froid.....	16
3.1.1.2. Extraction hydroalcoolique.....	17
3.1.1.3. Extraction aqueuse à chaud et à reflux.....	17
3.1.2. PURIFICATION.....	17
3.1.2.1.Dialyse.....	18
3.1.2.2. Traitement par le n-butanol.....	18
3.1.2.3. Traitement par la chaleur.....	18
3.1.2.4. Traitement à l'éthanol 30%.....	18
3.1.2.5. Traitement par l'acétate neutre de plomb.....	19
3.1.2.6. Traitement par le charbon actif.....	19
3.2. ANALYSE DES EXTRAITS PAR CCM.....	20
3.3. RENDEMENT EN PRINCIPES TOXIQUES.....	20
3.4.CARACTERISATION CHIMIQUE.....	21
3.4.1.Propriétés physico-chimiques.....	21
3.4.2.Nature chimique.....	21
4.DISCUSION ET CONCLUSION.....	23
 Deuxième partie : ETUDE TOXICOLOGIQUE	
1. INTRODUCTION.....	24
2. MATERIELS ET METHODES.....	24
2.1. MATERIELS.....	24
2.1.1. LES ANIMAUX D'EXPÉRIMENTATION.....	24
2.1.1.1. Les souris.....	24

2.1.1.2. Les têtards.....	25
2.1.1.3. Les larves de moustique.....	25
2.1.1.4. Les alevins de carpes.....	25
2.1.2. LES PLANTES D'EXPERIMENTATION.....	25
2.1.3. LES MICROORGANISMES UTILISES.....	26
2.1.4. LES MILIEUX DE CULTURE DES MICROORGANISMES.....	26
2.1.4.1. Milieux d'isolement et de purification des germes-tests.....	26
2.1.4.2. Milieux d'identification des bactéries.....	26
2.1.4.2.1. Milieu de SIMMON : citrate de sodium.....	26
2.1.4.2.2. Milieu mannitol-mobilité.....	26
2.1.4.2.3. Milieu HAJNA-KLIGLER : lactose-glucose-H ₂ S.....	27
2.1.4.2.4. Milieu lysine-fer.....	27
2.1.4.2.5. Milieu urée-indole.....	27
2.1.4.3. Milieu de MUELLER-HINTON.....	27
2.1.4.4. Disques d'antibiogramme.....	27
2.2. METHODES.....	27
2.2.1. METHODES D'ETUDE DES EFFETS DES PRINCIPES TOXIQUES	
SUR LES ANIMAUX A SANG CHAUD.....	27
2.2.1.1. Tests sur souris.....	27
2.2.1.1.1. Influence des voies d'administration.....	27
2.2.1.1.1.1. Voie intrapéritonéale.....	28
2.2.1.1.1.2. Gavage.....	28
2.2.1.1.2. Estimation de la toxicité sur souris.....	28
2.2.1.1.3. Détermination de la DL50 24h.....	28
2.2.1.1.4. Examen histopathologique.....	29
2.2.1.1.4.1. Prélèvement et fixation des organes.....	29
2.2.1.1.4.2. Inclusion.....	29
2.2.1.1.4.3. Microtomie et étalement des coupes.....	29
2.2.1.1.4.4. Coloration et observation microscopique des coupes.....	30
2.2.1.2. Tests hémolytiques sur des hématies de mouton.....	30
2.2.1.2.1. Principe.....	30
2.2.1.2.2. Mode opératoire.....	30
	<u>Pages</u>
2.2.1.2.2.1. Préparation des globules rouges.....	30

2.2.1.2.2.2. Test hémolytique.....	30
2.2.2. MÉTHODES D'ÉTUDE DES EFFETS DES PRINCIPES TOXIQUES	
SUR LES ANIMAUX À SANG FROID.....	31
2.2.2.1. Tests sur les têtards de grenouille.....	31
2.2.2.1.1. Mode opératoire.....	31
2.2.2.1.2. Détermination de la CL50.....	32
2.2.2.2. Tests sur les alevins de carpe.....	32
2.2.2.3. Tests sur les larves de moustique.....	32
2.2.3. METHODES D'ETUDE DES EFFETS DES PRINCIPES TOXIQUES	
SUR LES VEGETAUX.....	33
2.2.3.1. Etude des effets sur le pouvoir germinatif des graines.....	33
2.2.3.2. Etude de la croissance des plantules de deux graines.....	33
2.2.3.3. Méthode d'étude sur la levée de la dominance apicale.....	34
2.2.3.3.1. Principe.....	34
2.2.3.3.2. Mode opératoire.....	34
2.2.4. METHODES D'ETUDE DES EFFETS DES PRINCIPES TOXIQUES	
SUR LES MICROORGANISMES.....	34
2.2.4.1. Isolement et purification.....	34
2.2.4.2. Identification et caractérisation des souches pures.....	35
2.2.4.2.1. Méthode de coloration GRAM ou test GRAM.....	35
2.2.4.2.2. Culture sur galerie d'identification.....	36
2.2.4.2.2.1. Culture sur milieu SIMMONS.....	36
2.2.4.2.2.2. Culture sur milieu mannitol-mobilité	36
2.2.4.2.2.3. Culture sur milieu HAJINA-KLIGLER : glucose-lactose-H ₂ S.....	36
2.2.4.2.2.4. Culture sur milieu lysine-fer.....	36
2.2.4.2.2.5. Culture sur milieu urée-indole.....	36
2.2.4.3. Etude du spectre d'activité anti-microbienne.....	37
2.2.4.3.1. Méthode en milieu liquide.....	37
2.2.4.3.1.1. Principe.....	37
2.2.4.3.1.2. Mode opératoire.....	37
2.2.4.3.2. Méthode en milieu solide.....	37
	<u>Pages</u>
2.2.4.3.2.1. Principe.....	38
2.2.4.3.2.2. Mode opératoire.....	38

2.2.4.3.2.2.1. Inoculation du milieu.....	38
2.2.4.3.2.2.2. Dépôt d'extrait.....	38
2.2.4.3.2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice en milieu solide.....	38
3. RESULTATS.....	39
3.1. EFFETS DES PRINCIPES TOXIQUES SUR LES ANIMAUX	39
3.1.1. EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG CHAUD.....	39
3.1.1.1. Effets sur les souris.....	39
3.1.1.1.1. Effets sur les différentes voies d'administration.....	39
3.1.1.1.2. Description des symptômes.....	39
3.1.1.1.3. Evaluation de la DL50.....	40
3.1.1.1.4. Examen histopathologique des coupes d'organes.....	41
3.1.1.2. Effets sur les hématies de mouton.....	46
3.1.2. EFFETS DES PRINCIPES TOXIQUES SUR LES ANIMAUX A SANG FROID.....	47
3.1.2.1. Effets sur les têtards de grenouille.....	47
3.1.2.1.1. Effets de l'extrait brut.....	47
3.1.2.1.2. Effets de l'extrait.....	47
3.1.2.2. Effets sur les alevins de carpes.....	48
3.1.2.2.1. Effets de l'Extrait brut.....	48
3.1.2.2.2. Effets de l'extrait.....	49
3.1.2.3. Effets sur les larves de moustique.....	50
3.2. EFFETS DES PRINCIPES TOXIQUES SUR LES VEGETAUX.....	50
3.2.1. EFFETS SUR LE POUVOIR GERMINATIF DES GRAINES.....	50
3.2.2. EFFETS SUR LA CROISSANCE DE JEUNES PLANTULES DE DEUX GRAINES.....	51
3.2.3. EFFETS SUR LA LEVEE DE LA DORMANCE APICALE.....	55
3.3. EFFETS SUR LES MICROORGANISMES.....	55
3.3.1. Isolement et caractérisation des germes-tests.....	55
3.3.2. Effets sur la croissance des microorganismes.....	57
3.3.2.1. Méthode en milieu liquide.....	57
3.3.2.2. Méthode en milieu solide.....	57
3.3.2.2.1. Sensibilité des germes-tests.....	57
3.3.2.2.2. Détermination de la CMI.....	58

Pages

4.DISCUSSION ET CONCLUSION.....	60
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	63
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	68
ANNEXES	

LISTE DES ABREVIATIONS

B/A/E : Butanol / Acide acétique / Eau

°C : Degré Celsius

CCM : Chromatographie sur couche mince

CL50 : Concentration létale à 50%

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNRE : Centre National de Recherche sur l'Environnement

Da : Dalton

DL50 : Dose létale à 50%

EB : extrait brut

ED : eau distillée

FOFIFA : Foibem-Pirenena amin'ny Fikarohana ampiharina amin'ny Fampandrosoana ny
eny Ambanivohitra

IP : intrapéritonéale

IPM : Institut Pasteur de Madagascar

min : minute

p/p : poids par poids

p/v : poids par volume

µg : microgramme

µl : microlitre

UV : lumière ultraviolette

v/v : volume par volume

GLOSSAIRE

Antibiotique : substance capable d'empêcher le développement des microorganismes

Bactéricide : substance qui tue les bactéries

Bactériostatique : substance qui arrête la prolifération des bactéries sans les tuer

Congestion vasculaire : dilatation des vaisseaux sanguins

Enophtalmie : enfoncement dans la paupière du globe oculaire

Hémolyse : destruction des hématies

Hormone : substance agissant à distance du site de synthèse dans l'organisme

Inoculum : bactérie à ensemercer

Molluscicide : substance qui tue les mollusques

Nappe hémorragique : augmentation de la perméabilité cellulaire et diffusion ou rupture
des globules rouges

Piloérection : hérissément des poils

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Un poison est défini comme étant une substance capable de perturber et même de supprimer les fonctions vitales d'un organisme auquel il a été administré volontairement ou accidentellement. Une toxine est un poison naturel d'origine animale, végétale ou microbienne.

Malgré les préjudices causés par les organismes toxiques, l'homme a toujours su tirer profit de leur utilisation. A titre d'illustration, on peut citer :

- les plantes ichtyotoxiques telles que *Derris* sp (PAPILLIONACEAE), *Euphorbia laro* (EUPHORBIACEAE) *Barringtonia butonica* (LECYTHIDACEAE), utilisées pour pêcher ;
- les plantes à curare comme *Chondrodendron tomentosum* (MENISPERMACEAE), avec lesquelles, les Indiens d'Amérique confectionnent des flèches empoisonnées.
- Les plantes utilisées comme poisons d'épreuve, cas de *Cerbera venenifera* (APOCYNACEAE) et *Cryptostegia madagascariensis* (ASCLEPIADACEAE), plantes malgaches destinées à rendre la justice.
- Les venins de certaines espèces animales employés pour soigner différentes maladies. Ainsi par exemple, le venin de crotale est utilisé contre l'épilepsie, celui de crapaud contre les maladies de cœur, et celui d'abeille pour guérir les rhumatismes, douleurs musculaires et articulaires.
- Les plantes et animaux toxiques utilisés à des fins homicides et abortives.

Avec les progrès des sciences, notamment ceux de la biologie, la chimie, la physiologie, la biochimie, la toxicologie ou science des toxines a pris un grand essor. De nombreuses molécules toxiques ont été isolées de différents organismes animaux, végétaux, et microbiens et la structure de plusieurs poisons naturels a été mise en évidence. La connaissance du mécanisme d'action de ces toxines a permis de comprendre des phénomènes biologiques importants tels le transport membranaire et a apporté des renseignements capitaux sur la biosynthèse des protéines et différentes voies métaboliques des organismes vivants. A titre d'exemples, on peut citer quelques toxines qui ont été ainsi utilisées :

- l'abrine de *Abrus precatorius*, la ricine de *Ricinus communis* (CUATRECASAS, 1977) ont servi d'outils pour l'élucidation de la biosynthèse des protéines ;

- la roténone issue de *Derris* sp une PAPILIONACEE et l'antimycine A une toxine d'origine fongique contribuent à la compréhension de la structure et du fonctionnement de la chaîne respiratoire (BRUNETON, 1987) ;

- la toxine tétanique d'origine bactérienne a contribué à l'élucidation du fonctionnement du système nerveux central (BIZZINI, 1977) ;

Les végétaux constituent une source importante de toxines et outre les possibilités d'exploitation évoquées ci-dessus, l'utilisation des toxines végétales comme médicaments est assez courante. Ainsi,

- la quinine de *Quinquina* est utilisée pour lutter contre le paludisme ;

- la digitaline, un hétéroside isolé de *Digitalis purpurea*, famille des SCROFULARIACEES, est utilisé comme tonique cardiaque ;

- la morphine, un alcaloïde de la plante *Papaver somniferum*, est utilisée comme analgésique.

A Madagascar, de nombreuses plantes malgaches sont réputées toxiques ou possèdent des vertus thérapeutiques et sont utilisées dans la médecine traditionnelle (BOITEAU, 1977 et 1979 ; DEBRAY et coll., 1971 ; HECKEL, 1903 ; PERNET et coll., 1979).

Depuis plusieurs années, le Laboratoire de Biochimie Fondamentale et Appliquée de l'Université d'Antananarivo, a orienté ses travaux vers les plantes toxiques de Madagascar au sein de son unité de recherche en Toxicologie. Les objectifs consistent en la caractérisation chimique et biologique des principes toxiques isolés de plantes endémiques malgaches. Plusieurs toxines ont déjà été étudiées. A titre d'illustration, on peut citer principalement la cnestine de *Cnestis glabra* et *Cnestis pollyphylla*, de la famille des CONNARACEES (JEANNODA, 1986) ; la bolaffinine de *Boletus affinis*, un champignon de la famille des BOLETACEAE (RAZANAMPARANY, 1987) ; la monguine de *Croton mongue*, une EUPHORBIACEE (RALISON, 1987) ; les toxines isolées de *Tachiadenus longiflorus* une GENTIANACEE (RAKOTO-RANOROMALALA, 1989) ; l'albodorine isolée de *Albizia*

odorata, une FABACEE (RAJEMIARIMOELISOA, 2000) et les principes toxiques du genre Albizia arenicola, une autre FABACEE (RANDRIANARIVO, 1996).

Concernant la famille des EUPHORBIACEES, plusieurs de ses membres sont réputés toxiques. Des travaux ont été effectués sur le plan chimique et toxicologique sur des Euphorbiacées endémiques à Madagascar ou sur des espèces étrangères. Ainsi,

- des protéines ont été isolées de Croton tiglium (KLOOS et coll., 1987) et leurs propriétés ont été étudiées. Les études ont montré que les graines ont une activité molluscicide (sur Biomphalaria glabrata), de même qu'une activité très toxique pour la souris, avec une DL50 de 1,6 mg/kg.

- Euphorbia laro est rapportée comme plante ichtyotoxique (DEBRAY et coll., 1979). Une étude approfondie est actuellement en cours pour ce genre.

- Une glycoprotéine, la monguine, isolée de Croton mongue a déjà fait l'objet d'une étude chimique et biologique approfondie (RALISON, 1987). Ainsi ce glycoprotéine agirait sur la souris en provoquant une intoxication au niveau du système nerveux.

- Une protéine isolée de Aleurites fordii (RAJAONARIVONY, 1983) provoque des manifestations dues aux atteintes du système respiratoire et cardio - vasculaire.

- L'étude réalisée sur Euphorbia orthoclada (RANDRIA, 1996) montre que la plante contient des composés terpénoïdes, des flavonoïdes, et qu'elle est douée d'une activité diurétique importante.

Malgré ces études déjà effectuées sur les Euphorbiacées, beaucoup d'autres espèces malgaches restent encore à explorer.

Pour notre part, nous nous sommes intéressé à Uapaca thouarii, une Euphorbiacée malgache connue sous le nom de «voapaka». Le choix du matériel a été dicté par les raisons suivantes :

- à l'instar des Euphorbiacées citées ci-dessus, cette plante endémique de Madagascar pourrait renfermer des principes toxiques ;

- Uapaca thouarsii possède des vertus médicinales, car elle est utilisée pour soigner les coliques abdominaux (Ministère de l'agriculture, 1996). Cette plante aurait donc une propriété anti-microbienne ;

- d'après les enquêtes menées auprès des villageois, l'écorce de tige de cette plante serait utilisée sous forme de décoction comme fortifiant.

Les travaux comprennent deux grandes parties :

- d'une part, l'étude chimique en vue de purifier et de caractériser les principes toxiques sur le plan physico-chimique ;
- et d'autre part, l'étude toxicologique comportant des tests réalisés sur des représentants des règnes animal, végétal, et microbien.

**PREMIERE PARTIE
ETUDE CHIMIQUE
DES
PRINCIPES TOXIQUES**

1 - INTRODUCTION

Quelques Euphorbiacées malgaches ou étrangères ont déjà fait l'objet d'études chimiques approfondies. Des principes actifs de structure variée (protéines, peptides, terpènes, flavonoïdes) (RALISON, 1987 ; RAJAONARIVONY, 1983 ; STIRPE et coll., 1976 ; TESSIER et coll., 1975) ont pu ainsi être identifiées.

Mais à notre connaissance, aucune étude chimique n'a encore été rapportée dans la littérature concernant le genre Uapaca thouarsii. Aussi, nous nous sommes proposé de réaliser une étude chimique en utilisant l'écorce de tige comme matériel d'étude. Cet organe a été choisi en raison de son utilisation dans la thérapeutique traditionnelle.

Ainsi, après avoir vérifié la toxicité sur souris, nous avons cherché à :

- mettre au point un procédé d'extraction et de purification de principes toxiques ;*
- déterminer leur propriétés physico-chimiques ;*
- identifier leur nature chimique.*

Nous trouverons alors en premier lieu la description des matériels et méthodes utilisés lors de cette étude, et en deuxième lieu les résultats obtenus suivis de la discussion et de la conclusion.

2 – MATERIELS ET METHODES

2.1 MATERIELS

2.1.1. MATERIEL VEGETAL

2.1.1.1 Description du genre Uapaca (LEANDRI, 1958 ; BOITEAU, 1979)

Le genre Uapaca appartient à la famille des Euphorbiacées regroupant des arbres et des arbustes soit isolés et souvent à grandes racines adventives, soit groupés en peuplement et dépourvus de racines adventives. Les feuilles sont alternes rapprochées au sommet, le

limbe est entier, coriace, glabre, ordinairement atténué en pétiole court ou assez long, les nervures sont pennées. La floraison est brève, les fleurs mâles sont groupées en boule serrée et portées par une longue tigelle.

2.1.1.2. Description de *Uapaca thouarsii*

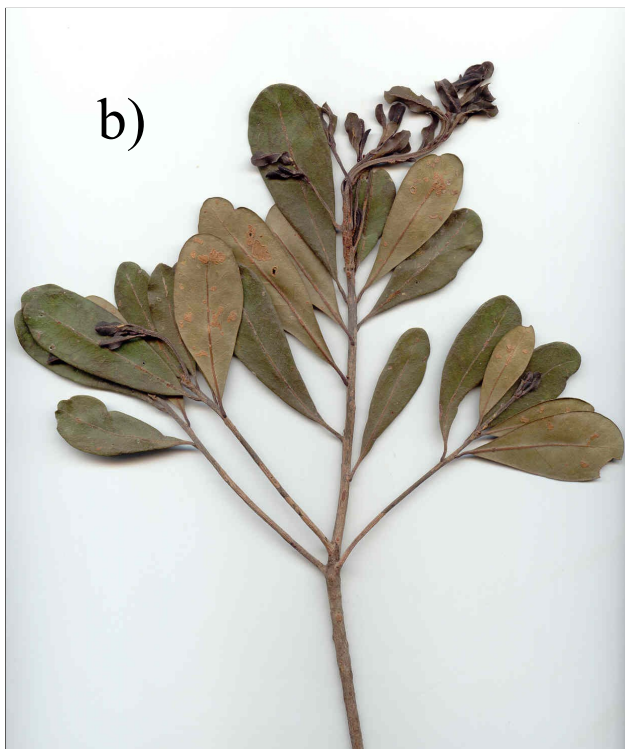
C'est un arbre de 10 à 20 m de hauteur, présentant des racines adventives partant de la base du tronc. Les ramilles peu charnues portent des feuilles rapprochées vers le sommet. Les pétioles de 2 à 4 cm sont renflées et à peu près glabres. Le limbe mesure 6 à 8 cm de longueur et peut atteindre 14 cm ; il comporte 5 à 7 nervures secondaires de chaque côté. Les fruits sont verruqueux subglobuleux atteignant 3 cm de diamètre et à style assez court.

La classification systématique de cette plante est la suivante :

Règne..... : VEGETAL
Embranchement..... : SPERMATOPHYTES
Sous embranchement..... : ANGIOSPERMES
Classe..... : DICOTYLEDONES
Ordre..... : EUPHORBIALES
Famille..... : EUPHORBIACEAE
Sous-famille..... : PHYLLANTHOIDEAE
Genre..... : Uapaca
Espèce..... : thouarsii
Nom vernaculaire..... : Voapaka

2.1.1.3. Répartition géographique

Cette plante est commune en forêt près du littoral jusqu'à 500 m d'altitude, dans des zones à climat tempéré et humide surtout du côté du versant oriental de Madagascar (BAILLON, 1858).



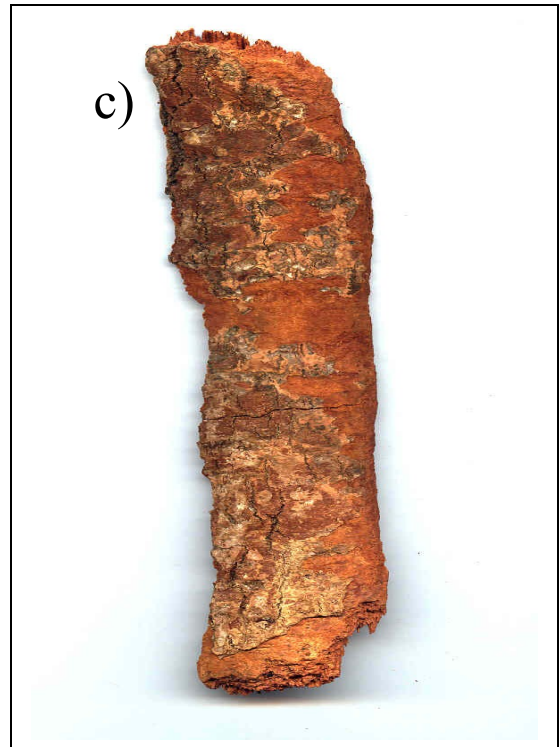


Figure n°1 : Uapaca thouarsii, a) Plante entière ; b) Rameau de tige ; c) écorce de tige.

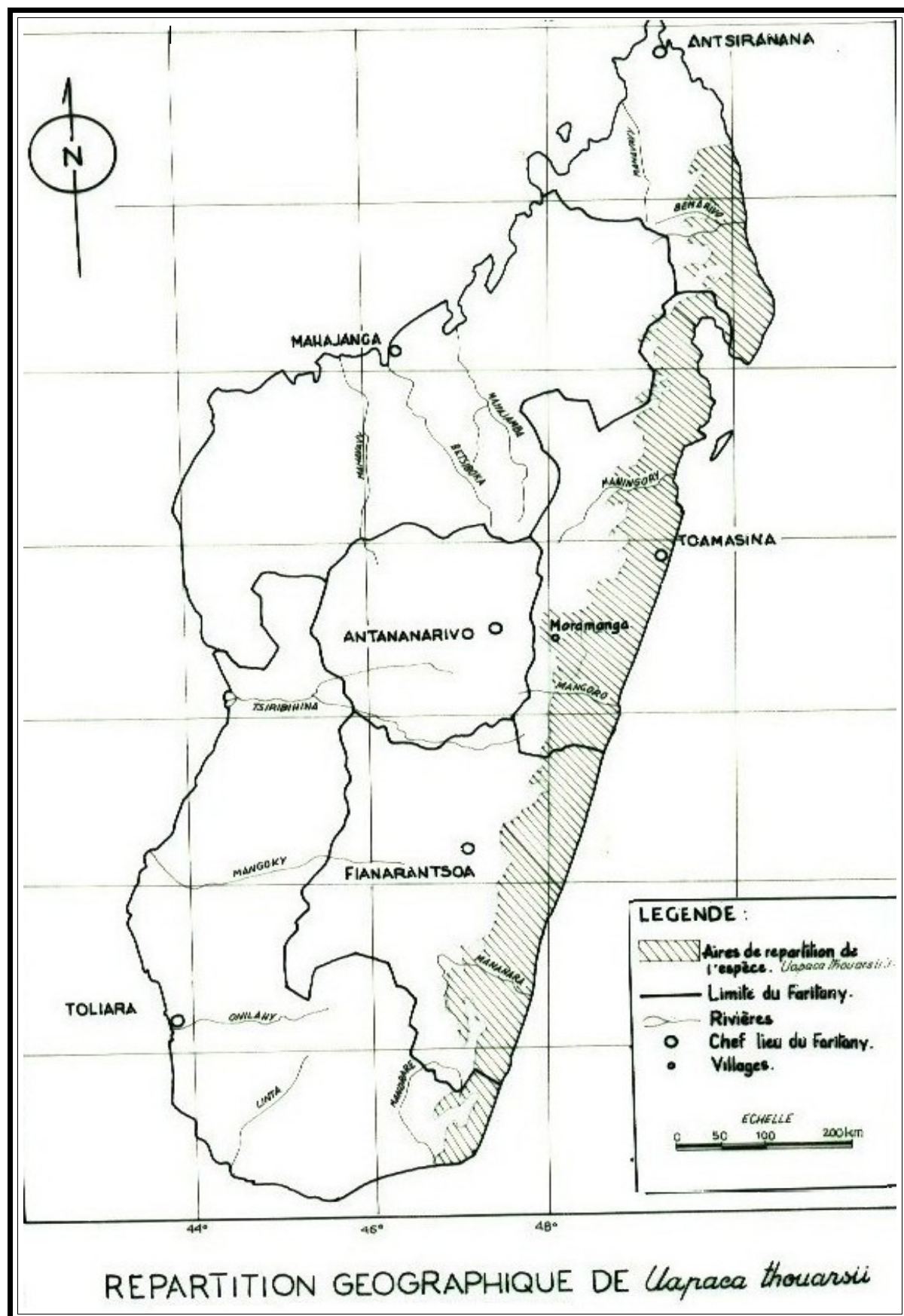


Figure n°2 : Répartition géographique de la plante.

2.1.1.4. Préparation du matériel végétal

Les écorces de tige fraîches de Uapaca thouarsii, récoltées dans la région de Mandraka en mars 2002, sont lavées et séchées au soleil pendant une semaine puis réduites en poudre au moyen d'un microbroyeur CULATTI. La poudre ainsi obtenue, conservée à la température ambiante, constitue le matériel d'étude.

2.1.2. PRODUITS CHIMIQUES

Tous les produits chimiques, de qualité pour analyse, sont de marque MERCK ou PROLABO. Pour la chromatographie sur couche mince, des plaques de gel de silice de marque MERCK 60F254, étalées sur support plastique de dimensions 20 x 20 cm sont utilisées. L'épaisseur de la couche est de 0,2 mm.

2.2. METHODES

2.2.1. MÉTHODES D'EXTRACTION

2.2.1.1. Extraction aqueuse à froid

La poudre d'écorce est mélangée à l'eau distillée dans le rapport 1/30 (p/v), (c'est-à-dire 30 ml d'eau distillée pour 1 g de poudre). Le mélange est agité pendant 3 h à la température ambiante et sous agitation magnétique. La suspension est ensuite laissée macérer pendant deux nuits, à + 4°C. Les deux macérations sont intercalées d'une nouvelle agitation de 3 h. Le macérat obtenu est filtré sur quatre épaisseurs de gaze, et le filtrat est par la suite centrifugé à 16000xg pendant 10 min à l'aide d'une centrifugeuse BECKMAN (J2-21, rotor JA20). Cette dernière sera utilisée pour toutes les opérations de centrifugation à 16000xg ultérieures. Le surnageant est récupéré et concentré (voir méthode de concentration § 2.2.4. p.16). Une dernière centrifugation permet d'éliminer le précipité formé au cours de l'opération de concentration.

2.2.1.2. Extraction hydroalcoolique

La poudre est délayée dans un mélange hydroalcoolique 75% (v/v) dans le rapport 1/8 (p/v). Le tout est agité pendant 3 h à la température ambiante. La suspension est ensuite laissée macérer une nuit à + 4°C puis filtrée sur quatre épaisseurs de gaze après une agitation de 30 min. Le filtrat est centrifugé à 16000xg pendant 10 min. Le surnageant obtenu est concentré sous pression réduite puis débarrassé du précipité apparu pendant la concentration par centrifugation dans les mêmes conditions que précédemment.

2.2.1.3. Extraction aqueuse à chaud et à reflux

Le matériel de départ est mélangé à l'eau distillée dans le rapport 1/10 (p/v). L'ensemble est chauffé à reflux pendant 2 h à 60°C sous agitation magnétique. La suspension est ensuite refroidie puis laissée macérer une nuit à + 4°C. Le macérat est filtré sur quatre épaisseurs de gaze et centrifugé à 16000xg pendant 10 min; le surnageant ainsi obtenu est concentré.

2.2.2. MÉTHODES DE PURIFICATION

2.2.2.1. Dialyse (AUDIGIER, 1992; KAMOUN, 1991 ; MAHUZIER, 1990)

2.2.2.1.1. Principe

La dialyse est une technique basée sur l'aptitude de certaines substances à franchir les pores calibrés d'une membrane à perméabilité sélective, appelée membrane ou boudin à dialyse. Les substances de poids moléculaire supérieur au diamètre des pores sont retenues à l'intérieur du boudin, tandis que celles de faible poids moléculaire diffusent librement à l'extérieur si elles n'interfèrent pas avec la membrane.

2.2.2.1.2. Mode opératoire

2.2.2.1.2.1. Préparation de la membrane

La membrane à dialyse utilisée se présente comme un cylindre plat de 3,3 cm de largeur. Elle est perméable aux substances de poids moléculaire inférieur à 15000 Da. Cette

membrane est bouillie trois fois à l'eau distillée pour enlever la couche protectrice de glycérine puis elle est conservée dans l'eau distillée à + 4°C. Elle est rincée à l'eau distillée avant son utilisation.

2.2.2.1.2.2. Technique de dialyse

Un volume déterminé d'extrait à traiter est introduit à l'intérieur du boudin noué à une extrémité. Les bulles d'air contenues dans le boudin sont éliminées avant de nouer l'autre bout en laissant suffisamment d'espace pour les échanges d'eau. Le boudin est alors immergé dans le liquide de contre-dialyse. Le tout est soumis à une légère agitation magnétique pour éviter la formation de gradient de concentration autour du boudin et laissé à la température ambiante pendant 24h. Le liquide de contre-dialyse est changé fréquemment pour accélérer la diffusion des substances.

A la fin de la dialyse, la solution à l'intérieur de la membrane (l'adialysat) ainsi que celle à l'extérieur (le dialysat) sont concentrées par évaporation. Elles sont centrifugées à 3000xg pendant 10 min pour éliminer le précipité éventuellement formé.

2.2.2.2. Fractionnement par le n-butanol

2.2.2.2.1. Principe

C'est une technique de séparation liquide-liquide basée sur la solubilité relative des substances entre deux solvants non miscibles.

2.2.2.2.2. Mode opératoire

L'extrait à traiter, dilué au demi, est mélangé volume à volume avec du n-butanol dans une ampoule à décanter. Le mélange est agité énergiquement puis laissé décanter jusqu'à la séparation nette de trois phases. La phase butanolique (supérieure) et la phase aqueuse (inférieure) sont recueillies séparément, l'interface est éliminée.

La phase aqueuse subit alors 2 autres extractions au n-butanol. A la fin du traitement, les fractions organiques sont rassemblées et filtrées sur du papier filtre. Le butanol des fractions organiques ainsi que les traces de butanol de la phase aqueuse sont évaporés. Le volume de chaque fraction est ramené au volume de départ par évaporation.

2.2.2.3. Traitement par la chaleur

2.2.2.3.1. Principe

C'est une technique de fractionnement basée sur la coagulation de certaines macromolécules tels les protéines et les polysaccharides sous l'effet de la chaleur.

2.2.2.3.2. Mode opératoire

L'extrait à traiter est chauffé dans un bain marie à 96°C pendant 15 min. Le précipité apparu est éliminé par centrifugation à 3000xg pendant 5 min à l'aide de la centrifugeuse BREMSE T52, qui sera utilisée pour toutes les opérations de centrifugation à 3000xg.

2.2.2.4 Traitement par l'éthanol 30%

2.2.2.4.1. Principe

Cette technique repose sur la précipitation de certains composés en solution aqueuse, sous l'effet de la diminution de la polarité du milieu par addition d'un solvant organique miscible tel que l'éthanol.

2.2.2.4.2. Mode opératoire

Trois volumes d'éthanol absolu sont mélangés sous agitation magnétique à 7 volumes d'extrait (saturation finale 30%). Le précipité apparu est éliminé par centrifugation, l'alcool est évaporé et l'extrait est concentré.

2.2.2.5. Traitement par l'acétate neutre de plomb (ANP)

2.2.2.5.1. Principe

L'acétate neutre de plomb, un sel de métal lourd, permet la précipitation sous forme de sels insolubles de certains composés tels les protéines, les polysaccharides et les acides nucléiques.

2.2.2.5.2. Mode opératoire

Un volume déterminé d'ANP à 20% est ajouté goutte à goutte sous agitation magnétique à l'extrait. Le précipité formé est écarté par une centrifugation à 3000xg pendant 5 min.

L'excès de plomb est précipité par une solution de phosphate disodique à 10% puis éliminé par une autre centrifugation. Le surnageant est concentré.

2.2.2.6. Traitement par le charbon actif

2.2.2.6.1. Principe

Le charbon actif est un support chromatographique qui adsorbe des nombreuses substances en particulier les composés aromatiques à structure cyclique. Ce traitement est couramment utilisé pour décolorer les extraits.

2.2.2.6.2. Mode opératoire

Selon la méthode mise au point par JEANNODA (1986), un entonnoir de verre dont le fond a été bouché avec de la laine de verre est adapté à une fiole à vide. Le charbon actif est tassé dans l'entonnoir puis humidifié avec de l'eau distillée. L'extrait déposé sur le charbon est élué par de l'eau distillée par une légère aspiration à l'aide d'une pompe à vide. L'opération est suivie de trois rinçages à l'eau distillée. L'extrait recueilli dans la fiole à vide est filtré sur papier filtre pour éliminer les fines particules de charbon avant de le concentrer par évaporation.

2.2.3. MÉTHODES ANALYTIQUES

2.2.3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

(RANDERATH, 1964 ; KAMOUN, 1991)

2.2.3.1.1. Principe

Cette technique est basée sur la séparation des substances en fonction de leur affinité pour l'adsorbant (phase fixe ou support de chromatographie) d'une part, et de leur solubilité dans le système de solvants (phase mobile), d'autre part.

2.2.3.1.2. Mode opératoire

2.2.3.1.2.1. Dépôt de l'échantillon

Les plaques de gel de silice MERCK utilisées (cf. Matériels § 2.1.2. p 8) peuvent être découpées aux dimensions voulues.

Des traits de 0,7 cm espacés de 0,6 cm sont tracés au crayon à 1,5 cm du bord inférieur et à 1,3 cm des bords latéraux de la plaque.

Chaque extrait à analyser est déposé le long d'un trait au moyen d'un capillaire de verre. Chaque dépôt est séché immédiatement à l'aide d'un séchoir à main.

2.2.3.1.2.2. Développement

Le système de solvant qui est le BAE (n-butanol / acide acétique / eau) dans le rapport 60/20/20 (p/p/p), est placé dans une cuve à chromatographie DESAGA dont les parois sont préalablement tapissées de papier filtre pour saturer l'atmosphère intérieure en vapeur de solvants. La plaque préparée précédemment est placée dans la cuve.

La migration ascendante est arrêtée lorsque le front du solvant parvient à 0,5 cm du bord supérieur de la plaque qui est alors retirée de la cuve puis immédiatement séchée avec un séchoir à main.

2.2.3.1.2.3. Révélation du chromatogramme

Deux méthodes de révélation sont utilisées :

a. Visualisation à la lumière ultraviolette (UV)

Les bandes ayant migré peuvent être visualisées sous lumière UV à 254 nm et à 366 nm.

b. Révélation par pulvérisation de réactif

Les plaques sont pulvérisées à l'aide du réactif vanilline /acide sulfurique composé de 0,5 g de vanilline dans 100 ml d'acide sulfurique concentré. Les plaques sont séchées au moyen d'un séchoir à main après pulvérisation.

2.2.3.2. Méthode de détection de familles chimiques (FONG et coll., 1977)

La détection des familles chimiques est réalisée soit à partir de différents extraits de poudre d'écorce dont la préparation est décrite ci-dessous, soit à partir du résidu d'évaporation à sec d'extrait purifié repris dans de l'eau (extrait aqueux), ou dans de l'alcool à 80% (extrait hydroalcoolique), ou dans HCl 5% (extrait acide), ou dans du chloroforme (extrait chloroformique).

2.2.3.2.1. Préparation des extraits

2.2.3.2.1.1. Extrait aqueux

L'extrait aqueux se prépare en mélangeant 1g de poudre d'écorce avec 10 ml d'eau distillée, le tout étant ensuite soumis à une décoction de 15 min à 55°C. Après refroidissement, la solution est macérée une nuit à +4°C et filtrée. Le filtrat constitue l'extrait aqueux.

2.2.3.2.1.2. Extrait hydroalcoolique

Cette solution est obtenue en mélangeant 1g de poudre à 10 ml d'une solution hydralcoolique 80% (80 ml d'éthanol et 20 ml d'eau distillée). Le mélange est macéré une nuit à +4°C puis filtré. Le filtrat constitue l'extrait hydroalcoolique.

2.2.3.2.1.3. Extrait acide

Deux grammes de poudre sont mélangés avec 10 ml d'une solution de HCl 5% (v/v) dans un tube à essai. Cette préparation est macérée une nuit à +4°C et filtrée ; le filtrat obtenu constitue l'extrait acide.

2.2.3.2.1.4. Extrait chloroformique

Un gramme de poudre est mélangé avec 4ml de chloroforme dans un tube à essai. Le tube est hermétiquement fermé et laissé macéré à +4°C. L'extrait chloroformique est obtenu par filtration de la suspension.

2.2.3.2.2. Détection des alcaloïdes

Trois tubes à essai sont préparés. 0,5 ml d'extrait acide est versé dans chacun d'eux. Trois à quatre gouttes de réactif de MAYER, de WAGNER, et de DRAGGENDORFF (voir composition en annexe) y sont ajoutées respectivement.

L'apparition dans les trois tubes de précipité qui se dissout après ajout d'éthanol indique la présence d'alcaloïdes dans l'extrait.

2.2.3.2.3. Détection des flavonoïdes (Test de WILSTATER)

Dans un tube à essai contenant 1ml d'extrait hydroalcoolique, on verse 1ml de HCl 2N et on ajoute 2 tournures de magnésium. Après ajout de 2 ml d'alcool isoamylique, le virage de la coloration de l'extrait au rouge caractérise la présence de flavones, au rouge violacé celles des flavonones, et au pourpre celles des flavonols.

2.2.3.2.4. Détection des leucoanthocyanes (Test de BATE-SMITH)

Un millilitre de HCl concentré est versé le long de la paroi d'un tube à essai contenant 1ml d'extrait hydroalcoolique. La solution est chauffée dans un bain marie à 100°C pendant 30 min. L'apparition d'une coloration rouge violet après refroidissement indique la présence de leucoanthocyanes.

2.2.3.2.5. Détection des tanins et polyphénols (HEMINGWAY, KARCHESY, 1989)

2.2.3.2.5.1. Test au chlorure ferrique (FeCl₃)

Un tube à essai reçoit 1ml d'extrait aqueux et quelques gouttes de chlorure ferrique dans du méthanol. L'apparition d'un précipité indique la présence soit de tanins de type catéchol (couleur verte), soit de tanins de type pyrogallol (couleur bleue).

2.2.3.2.5.2. Test à la gélatine salée

Trois à quatre gouttes de gélatine salée (10 g de NaCl dans 100 ml de gélatine à 1%) sont ajoutées à 1 ml d'extrait aqueux. Un test positif se traduit par la présence d'un précipité blanc.

2.2.3.2.5.3. Test à la gélatine

Un millilitre d'extrait aqueux est mélangé à 1 ml de gélatine à 1%. L'apparition d'une floculation blanche indique un test positif.

Si les 3 tests ci-dessus sont tous positifs, l'extrait à tester contient des tanins. Par contre, si les tests à la gélatine, salée ou non, sont négatifs, mais le test au chlorure ferrique donne une coloration verte, l'extrait contient des polyphénols au lieu des tanins.

2.2.3.2.6. *Détection des anthraquinones (Test de BORNTRÄGER)*

Un millilitre d'extrait aqueux est mélangé à 5 ml de benzène. Le mélange est agité puis laissé décanter. Après décantation, la phase organique (phase supérieure) est recueillie et mélangée à 1 ml d'ammoniaque 25%. Le changement de la coloration en rouge indique la présence d'anthraquinones.

2.2.3.2.7. *Détection des saponines*

Deux méthodes sont utilisées pour détecter les saponines.

2.2.3.2.7.1. Indice de mousse

Un millilitre d'extrait aqueux est placé dans un tube à essai de 1 cm de diamètre. Ce tube est agité énergiquement pendant 30 s ; la formation de mousse de 3 cm de hauteur, persistant pendant 15 min montre la présence de saponines.

2.2.3.2.7.2. Test hémolitique sur hématies de mouton

Ce test permet de confirmer la présence de saponines dans l'extrait. En effet, les saponines lysent les membranes des hématies qui libèrent alors l'hémoglobine. La méthode est décrite dans la partie relative à l'étude toxicologique (§ 2.2.1.2.p.30).

2.2.3.2.8. Détection des désoxy-oses (Test de KELLER - KILIANI)

Dans un tube à essai, 1 ml de solution aqueuse de chlorure ferrique à 10% et 1 ml d'acide acétique glacial sont ajoutés à 1 ml d'extrait aqueux. Deux millilitres d'acide sulfurique concentré sont coulés le long de la paroi du tube incliné à 45°. L'apparition d'un anneau pourpre à l'interface montre la présence de désoxy - oses.

2.2.3.2.9. Détection des stéroïdes et des triterpènes (Test de LIEBERMANN - BURCHARD)

Trois tubes à essai reçoivent chacun 1 ml d'extrait chloroformique.

- *Dans le premier tube, l'apparition d'une coloration verte après ajout de 4 à 5 gouttes d'anhydride acétique indique la présence de stéroïdes.*
- *Dans le second tube, la formation d'un anneau rouge après ajout de 4 à 5 gouttes d'acide sulfurique concentré, suivi d'une légère agitation dénote la présence de triterpènes.*
- *Dans le troisième tube, la présence de stérols insaturés est mise en évidence par la formation d'un anneau rouge après addition d'acide sulfurique concentré.*

2.2.3.2.10. Détection des iridoïdes

Un millilitre de HCl concentré est ajouté à 1 ml d'extrait aqueux. L'apparition d'une coloration bleue après 30 min d'ébullition montre la présence d'iridoïdes.

2.2.4. MÉTHODE DE CONCENTRATION

Toutes les opérations de concentration et d'évaporation de solvant sont effectuées au moyen d'un évaporateur rotatif de marque HEIDOLPH à 50°C. La pression est réduite à l'aide d'une pompe à vide.

3 - RESULTATS

Des expériences préliminaires ont montré que les principes toxiques sont thermostables. Par conséquent,

- toutes les manipulations sont effectuées à la température ambiante,*
- toutes les opérations de concentration et d'évaporation de solvant se déroulent à 50°C à l'évaporateur rotatif.*

3.1. ISOLEMENT DES PRINCIPES TOXIQUES

3.1.1. EXTRACTION

Plusieurs méthodes ont été testées pour extraire les principes toxiques de la poudre d'écorce (voir § 2.2.1 p 8 de Matériels et méthodes). La toxicité de chaque extrait brut obtenu est testée sur souris.

3.1.1.1. Extraction aqueuse à froid

En partant de 40 g de poudre mis en suspension dans 1200 ml d'eau distillée, 10 ml d'extrait brut sont obtenus, selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.1.1. (p 8. Matériels et méthodes).

Cet extrait brut de couleur noire est de consistance sirupeuse. Il a un goût amer happant la langue, son pH est égal à 6,25. Il est toxique sur souris.

3.1.1.2. Extraction hydroalcoolique

En appliquant la méthode décrite au § 2.2.1.2. (p 8), 10 ml d'extrait brut sont obtenus à partir de 40 g de poudre après réduction de volume et centrifugation. Après la dernière centrifugation, l'extrait brut obtenu est limpide, non visqueux, de couleur rouge pâle. Il a un goût fade et son pH est égal à 6. Cet extrait est toxique sur souris.

3.1.1.3. Extraction aqueuse à chaud et à reflux

Dix grammes de poudres sont mélangés à 100 ml d'eau distillée. Le mélange est chauffé à reflux pendant deux heures sous agitation magnétique et l'extraction se poursuit suivant la méthode décrite au § 2.2.1.3. (p 9). L'extrait obtenu après centrifugation, de volume 10 ml est concentré 4 fois. L'extrait final est visqueux, de couleur noir foncé et a un goût amer. Il s'avère également toxique sur souris.

Les résultats des trois types d'extraction sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau n°1 Caractéristiques des extraits obtenus par les différentes techniques d'extraction.

Type d'extraction	Aqueuse à froid	Hydroalcoolique à froid	A chaud à reflux
Consistance	visqueuse	non visqueuse	visqueuse
Couleur	noire	rouge pâle	noire
pH	6,25	6	6,2
Goût	amer	fade	amer
Toxicité (temps de survie)	15 à 18h	23h	20h

La comparaison des différents extraits bruts obtenus montre que l'extrait brut aqueux à froid est le plus toxique. Aussi avons - nous adopté la méthode d'extraction aqueuse à froid qui est en outre plus économique, pour la suite des opérations.

3.1.2. PURIFICATION

Plusieurs méthodes de purification ont été testées en vue d'établir un procédé de purification adéquat pour les principes toxiques. Les méthodes peu performantes n'ont pas été retenues mais ont permis par contre de caractériser les principes toxiques sur le plan physico-chimique. Il faut remarquer que la purification est bioguidée par des tests de toxicité sur souris (voir méthode § 2.2.1.1. p 27), et l'homogénéité des extraits obtenus après chaque étape est appréciée par CCM (Cf.§ 2.2.3.1. p 12).

3.1.2.1. Dialyse

Dix millilitres d'extrait brut sont dialysés contre de l'eau distillée pendant 24h selon la méthode décrite au § 2.2.2.1 (p 9). Le dialysat et l'adialysat obtenus sont évaporés.

Après centrifugation, le volume des 2 solutions est ajusté à 10 ml. L'adialysat s'avère toxique sur souris. Cet extrait limpide de couleur marron foncé et présentant un goût amer est dénommé E1.

3.1.2.2. Traitement par le n-butanol

Deux millilitres d'extrait brut sont traités par le n-butanol selon la méthode décrite au § 2.2.2.2. (p.10). Trois traitements successifs suivis chacun d'une nuit de décantation ont été effectués. La phase aqueuse est toxique sur souris. Cette méthode s'est avérée performante sur l'extrait brut, aussi l'avons-nous retenue dans le protocole de purification mais en l'appliquant à E1.

Dix millilitres d'extrait E1 sont alors traités de la même manière que précédemment. La phase aqueuse, toxique sur souris, limpide, de couleur rouge sang, et de volume égal à 10 ml, est dénommée extrait E2.

3.1.2.3. Traitement par la chaleur

L'extrait brut (2 ml) et l'extrait E2 (2 ml) sont chauffés à 96°C selon la technique décrite au § 2.2.2.3 (p 10). Les surnageant obtenus présentent une activité toxique sur souris, seulement aucun précipité ne s'est formé au cours du traitement. D'autre part, l'analyse des

extraits par CCM montre qu'aucun contaminant n'est éliminé. Cette technique peu performante n'a donc pas été retenue dans le protocole.

3.1.2.4. Traitement par l'éthanol à 30%

Trois millilitres d'extrait brut sont traités par 7 ml d'éthanol absolu sous agitation magnétique (voir méthode § 2.2.2.4. p 10). Aucun précipité n'apparaît. Bien que le surnageant soit toxique sur souris, nous n'avons pas introduit cette technique dans le procédé de purification, car d'après la CCM, elle ne permet pas d'écarter des contaminants.

3.1.2.5. Traitement par l'acétate neutre de plomb

Deux millilitres d'extrait brut sont traités par 2 ml d'ANP selon la méthode décrite au § 2.2.2.5 (p 11). Le précipité abondant apparu est éliminé par 5 min de centrifugation. L'excès de plomb est précipité par addition de 8 ml de solution de phosphate disodique à 10%. L'extrait obtenu, concentré, est incolore, mais il n'a aucune activité sur souris. Par conséquent, ce traitement n'a pas été retenu dans la méthode de purification.

3.1.2.6. Traitement par le charbon actif

Deux millilitres d'extrait brut sont filtrés sur charbon actif selon la méthode décrite au § 2.2.2.6. (p 11). Le filtrat obtenu est limpide et incolore. Ramené au volume de départ et testé, il ne présente aucune activité toxique sur souris. Cette méthode n'a donc pas été retenue.

Ainsi, sur les six méthodes de purification testées, deux méthodes seulement ont été sélectionnées pour le protocole de purification. Ce sont : la dialyse suivie du fractionnement par le n-butanol.

L'extraction et les différentes étapes de la purification sont résumées sur la figure n°3 :

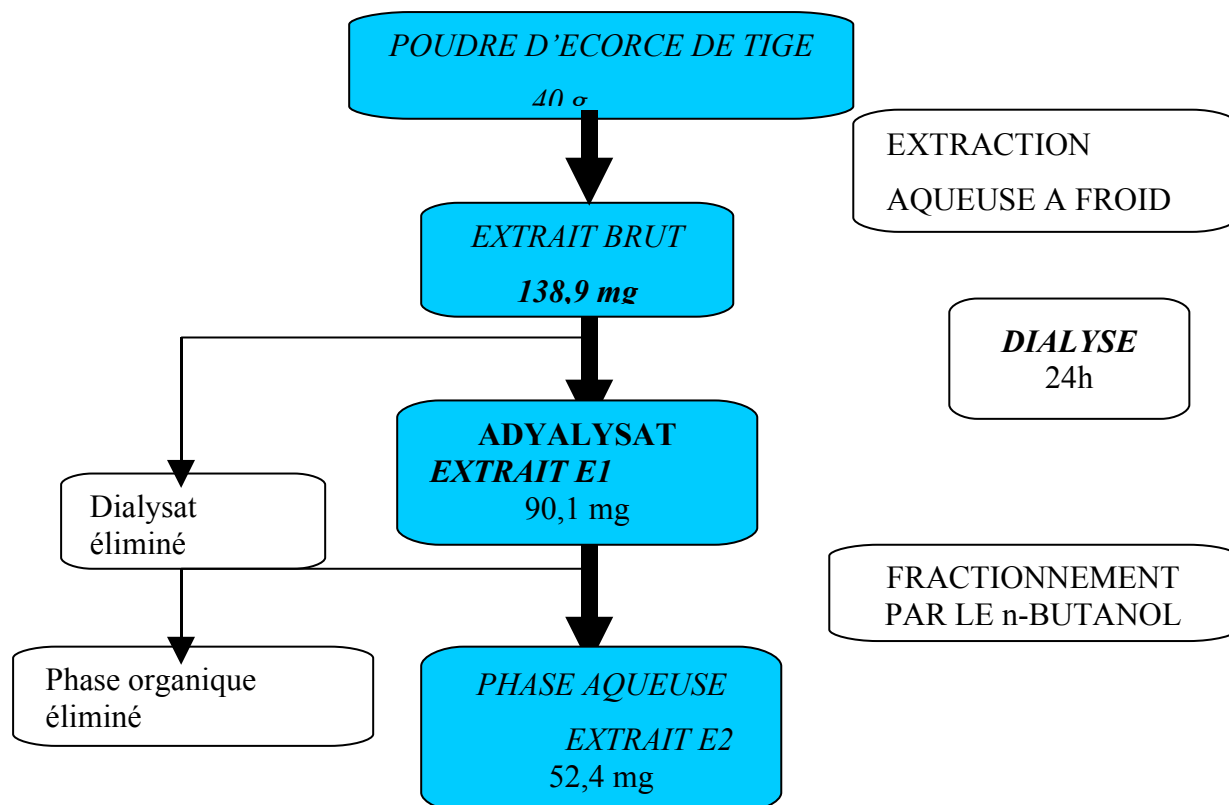


Figure n°3 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'extraction et de la purification des principes toxiques.

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

3.2. ANALYSE DES EXTRAITS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

L'évolution de l'homogénéité des différents extraits a été appréciée par chromatographie sur couche mince utilisant le B/A/E 60/20/20 comme système de solvants.

L'extrait brut montre 10 bandes majeures visibles sous U.V. à 366 nm. La dialyse permet d'éliminer 5 bandes majeures, et après le fractionnement par le n-butanol de l'extrait E₁, il ne reste que 3 bandes majeures. Le nombre de bandes contaminantes éliminées est donc égal à 7. La pulvérisation à la vanilline révèle les mêmes bandes (figure n°4).

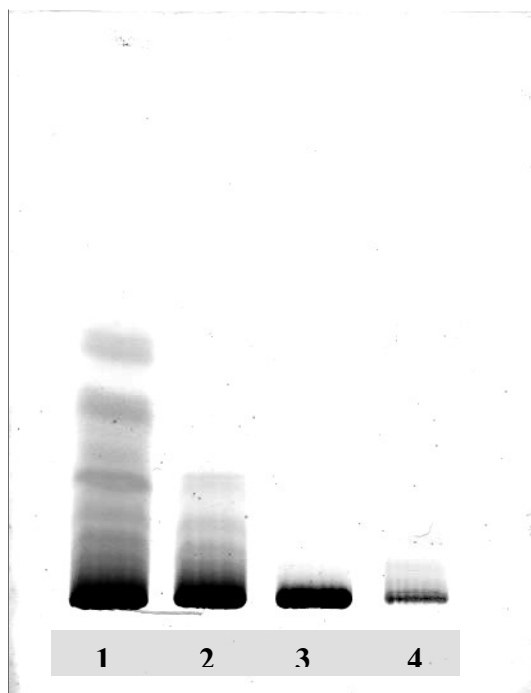


Figure n°4 : Chromatogramme récapitulatif montrant l'évolution de l'homogénéité des différents extraits obtenus lors de l'extraction et de la purification.

1 : EB ; 2 : Extrait E1 ; 3 : Extrait E2 ; 4 : Phase organique.

3.3.RENDEMENT EN PRINCIPES TOXIQUES

A partir de 40 g de poudre d'écorce de tiges, le résidu d'évaporation à sec de l'extrait brut pèse 139,8 mg, ce qui correspond à un rendement d'extraction de 0,34%.

Le résidu d'évaporation à sec de l'extrait E2 pèse 52,4 mg, ce qui donne un rendement en principes toxiques de 0,13%, par rapport à la poudre de départ.

3.4. CARACTERISATION CHIMIQUE

3.4.1. Propriétés physico-chimiques

Les techniques d'extraction et de purification utilisées, y compris celles qui ne font pas partie du protocole définitif d'isolement des principes toxiques, ont permis d'obtenir des informations sur leurs propriétés physico-chimiques. Ainsi ,

- ils sont solubles dans l'eau distillée et dans certains solvants organiques polaires tel que l'éthanol,

- ils sont insolubles dans les solvants apolaires comme le n-butanol,
- ils sont précipitables par l'acétate neutre de plomb,
- ils sont thermostables ; les opérations de congélation et de décongélation répétées ne les affectent pas,
- ils sont fortement adsorbés sur le charbon actif,
- ils ne traversent pas la membrane à dialyse,
- ils ont un goût amer.

3.4.2. Nature chimique

Le criblage a été réalisé dans un premier temps sur des extraits de poudre d'écorce, préparés selon la méthode décrite au § 2.2.3.2. (p.13). Les résultats sont consignés dans le tableau n°2 :

Tableau n°2 : Résultats du criblage phytochimique à partir de la poudre d'écorces de tige.

<i>Famille chimique</i>	<i>Test</i>	<i>Observations</i>	<i>Résultat</i>
<i>Alcaloïdes</i>	<i>MAYER</i>	<i>Absence de précipité</i>	-
	<i>WAGNER</i>	<i>Absence de précipité</i>	-
	<i>DRAGGENDORFF</i>	<i>Absence de précipité</i>	-
<i>Flavonoïdes</i>	<i>WILSTATER</i>	<i>Absence de coloration</i>	-
<i>Leucoanthocyanes</i>	<i>BATE-SMITH</i>	<i>Coloration rouge</i>	+
<i>Tanins et polyphénols</i>	<i>Gélatine</i>	<i>Absence de précipité</i>	-
	<i>Gélatine salée</i>	<i>Absence de précipité</i>	-
	<i>Chlorure ferrique</i>	<i>Pas de coloration</i>	-
<i>Stérols insaturés</i>	<i>SALKOWSKI</i>	<i>Présence d'anneau</i>	+
<i>Triterpènes</i>	<i>LIEBERMAN- BURCHARD</i>	<i>Présence d'anneau rouge</i>	+
<i>Stéroïdes</i>		<i>Pas de coloration verte</i>	-
<i>Désoxy-oses</i>	<i>KELLER- KILLIANI</i>	<i>Pas d'anneau rouge à l'interface</i>	-
<i>Iridöïdes</i>		<i>Absence de coloration bleue</i>	-
<i>Saponines</i>	<i>Indice de mousse</i>	<i>Hauteur de mousse : 1cm</i>	±

+ : test positif, - : test négatif, ± : faiblement positif

D'après ces résultats, les extraits de poudre réagissent positivement aux tests des leucoanthocyanes, des stérols insaturés, des triterpènes et faiblement à l'indice de mousse.

Ces tests positifs ont été répétés sur le résidu d'évaporation à sec de l'extrait E₂, (voir méthode § 2.2.3.2. p 13). Les mêmes résultats ont été obtenus.

4 - DISCUSSION ET CONCLUSION

L'étude chimique réalisée sur Uapaca thouarsii a permis de mettre en évidence une activité toxique dans l'écorce de tige. Une méthode d'extraction aqueuse à froid des principes toxiques a été mise au point. Un extrait brut sirupeux de couleur noire a été obtenu avec un rendement d'extraction de 0,34%. Cet extrait brut au goût amer, est plus toxique sur souris que les extraits bruts obtenus par les autres méthodes d'extraction testées.

Un procédé simple, comprenant une dialyse et un fractionnement par le n-butanol a permis d'obtenir à partir de l'extrait brut un extrait partiellement purifié avec un rendement en principes toxiques de 0,13%. Les autres méthodes de purification, bien que moins performantes, ont apporté des renseignements importants sur les propriétés physico-chimiques des principes toxiques. Ainsi, ceux-ci ont une affinité pour les solvants polaires comme l'eau et l'éthanol. Ils sont précipitables par l'acétate neutre de plomb, ce qui suppose la présence de groupements acides ou un poids moléculaire élevé. Ils sont adsorbés par le charbon actif, ce qui suggère la présence de noyau aromatique dans leur structure. D'autre part, ils sont thermostables car les opérations de congélation et de décongélation répétées ainsi que le traitement à haute température, ne les affectent pas. Les principes toxiques ne franchissent pas la membrane de dialyse, de seuil de 15 000 Da, à moins qu'ils n'interfèrent avec celle-ci.

Les principes actifs pourraient être des leucoanthocyanes, des stérols insaturés ou des triterpènes.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DES PROPRIETES TOXICOLOGIQUES DES EXTRAITS

1 - INTRODUCTION

Aucune étude de toxicité n'a encore été rapportée dans la littérature concernant Uapaca thouarsii. Pourtant la plante est utilisée dans la thérapeutique traditionnelle sous forme de décoction de tige pour soigner les coliques abdominales (Ministère de l'Agriculture..., 1987) ou encore comme fortifiant.

L'étude chimique réalisée sur Uapaca thouarsii nous a permis d'extraire et de purifier partiellement, à partir des écorces de tige, des principes actifs toxiques sur souris.

Dans la présente étude toxicologique, nous avons d'une part approfondi les effets des principes toxiques sur souris et d'autre part, prospecté leur action sur d'autres représentants du règne animal. Nous avons par la suite, étudié leurs effets sur les végétaux et les microorganismes.

Pour les expériences sur les animaux à sang froid, nous avons pu comparer les effets de l'extrait purifié E2 à ceux de l'extrait brut. Chez les végétaux, à l'exception de l'expérience sur la levée de dormance apicale, les travaux ont été effectués avec l'extrait brut.

Pour des raisons de commodité, l'extrait purifié E2 sera appelé « extrait ».

2 - MATERIELS ET METHODES

2.1. MATERIELS

2.1.1. LES ANIMAUX D'EXPÉRIMENTATION

2.1.1.1. Les souris

Les souris blanches Mus musculus utilisées pour les différents tests proviennent de l'animalerie du Laboratoire de Biochimie Fondamentale et Appliquée de la Faculté des Sciences d'Antananarivo. Elles sont issues de la souche « TANA-SWISS » stabilisée depuis plusieurs années à l'Institut Pasteur de Madagascar.

2.1.1.2. Les têtards

Les têtards de grenouille Ptychadena mascareniensis au stade dit « sans patte » proviennent des plans d'eau du campus de l'Université d'Antananarivo. Ils sont capturés le jour des tests.

2.1.1.3. Les larves de moustique

Les larves du moustique Culex quinquefasciatus au 3^e stade de développement ont été récoltées aux environs du campus de l'Université d'Antananarivo.

2.1.1.4. Les alevins de carpe

Les alevins de carpe Cyprius carpio, âgés de 4 semaines et pesant en moyenne 1,2g, proviennent d'un centre d'élevage agréé, situé à Maharidaza. Ces alevins sont stabilisés une semaine dans l'aquarium du laboratoire avant d'être utilisés.

2.1.2. LES PLANTES D'EXPÉRIMENTATION

Les graines utilisées lors des tests de toxicité sur les végétaux sont présentés dans le tableau ci-dessous.

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

<i>Famille</i>	<i>Nom scientifique</i>	<i>Nom vernaculaire</i>
<i>FABACEAE</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Haricot</i>
	<i>Pisum sativum</i>	<i>Petit pois</i>
	<i>Vigna indicata</i>	<i>Dolique</i>
<i>ASTERACEAE</i>	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Laitue</i>
<i>BRASSICACEAE</i>	<i>Brassica sp.</i>	<i>Tissam white</i>
<i>LILIACEAE</i>	<i>Allium cepa</i>	<i>Oignon</i>
<i>LILIACEAE</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Basilic</i>
<i>SOLANACEAE</i>	<i>Solanum nigrum</i>	<i>Morelle noire</i>
	<i>Lycopersicum esculentum</i>	<i>Tomate</i>
<i>CUCURBITACEAE</i>	<i>Cucurbita pepo</i>	<i>Courgette</i>
<i>APIACEAE</i>	<i>Daucus carotta</i>	<i>Carotte</i>
<i>GRAMINEES</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Riz</i>
	<i>Zea mays</i>	<i>Maïs</i>

Ces graines proviennent de la collection du centre de production du FOFIFA à Ambatobe.

2.1.3. LES MICROORGANISMES UTILISÉS

Les microorganismes utilisés comme germes - tests proviennent de la collection du Laboratoire de Microbiologie de l'environnement (L.M.E.) du Centre National de Recherche Environnementale (C.N.R.E.) à Tsimbazaza. Ils ont été isolés et identifiés par nos soins (voir § 2.2.4. p.34).

2.1.4. LES MILIEUX DE CULTURE DES MICROORGANISMES

Les milieux de culture peuvent être solides ou liquides. Leurs compositions sont indiquées en annexe III.

2.1.4.1. Milieux d'isolement et de purification des germes-tests

Les milieux de culture utilisés pour l'isolement et la purification des germes sont de deux types :

- le bouillon nutritif : c'est un milieu liquide qui permet la croissance des microorganismes n'ayant pas d'exigence particulière.
- La gélose ordinaire ou Plate Count Agar (P.C.A.) : c'est un milieu solide utilisé pour l'isolement des colonies microbiennes ainsi que leur numération.

2.1.4.2. Milieux d'identification des bactéries (LEFEVRE, 1997)

2.1.4.2.1 Milieu de SIMMONS : citrate de sodium

Le milieu de SIMMONS est un milieu solide permettant l'identification des bactéries utilisant le citrate comme seule source de carbone et d'énergie.

2.1.4.2.2 Milieu mannitol - mobilité

C'est un milieu semi-mou qui permet la mise en évidence de la fermentation du mannitol et la réduction des nitrates en nitrites par les bactéries. Il permet également d'étudier leur mobilité.

2.1.4.2.3. Milieu HAJNA-KLIGLER : lactose – glucose - H₂S

C'est un milieu solide utilisé pour la mise en évidence de l'utilisation du glucose et du lactose par les microorganismes. Il permet aussi de détecter la production de H₂S.

2.1.4.2.4. Milieu lysine - fer

C'est un milieu solide enrichi en lysine. Il permet la mise en évidence de la production par les bactéries de la lysine décarboxylase (LDC) et de la lysine désaminase (LDA), ainsi que la formation de sulfure d'hydrogène (H₂S).

2.1.4.2.5. Milieu urée - indole

C'est un milieu liquide utilisé pour la recherche de l'uréase, et la tryptophane désaminase (TDA). La production d'indole peut être aussi déterminée.

2.1.4.3. Milieu de MUELLER - HINTON (gélose de tonicité normale)

Ce milieu solide est utilisé pour l'étude de la sensibilité des microorganismes aux antibiotiques.

2.1.4.4. Disques d'antibiogramme

Des disques de 6 mm de diamètre sont employés. Ils sont stérilisés à l'autoclave à 120°C avant usage.

2.2. METHODES

2.2.1. MÉTHODES D'ÉTUDE DES EFFETS DES PRINCIPES TOXIQUES SUR LES ANIMAUX A SANG CHAUD

2.2.1.1. Tests sur souris

2.2.1.1.1. Influence des voies d'administration (DUMAS, 1953 ; TALBOT, 1989)

La vitesse de pénétration des principes toxiques chez un organisme animal et leurs effets varient en fonction des voies d'administration. Différentes voies d'administration telles la voie intrapéritonéale (IP), et la voie orale (per os) sont testées. Pour chaque voie, un volume de 0,3 ml est injecté à une souris de 25 g, les animaux sont observés pendant 24 h.

2.2.1.1.1.1. Voie intra péritonéale (IP)

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

2.2.1.1.1.2. Voie orale (gavage)

Pour cette voie, l'aiguille à gaver est introduite à travers la bouche de l'animal jusqu'à l'estomac. L'extrait est alors injecté lentement.

2.2.1.1.2. Estimation de la toxicité sur souris

La toxicité des différents extraits est estimée par administration par voie intrapéritonéale d'un volume de 0,3 ml d'extrait à tester à un lot de deux souris de 25 g chacune. Une souris injectée d'eau distillée sert de témoin négatif.

2.2.1.1.3. Détermination de la DL₅₀ (24h) (REED et MUENCH, 1938)

La DL₅₀ (24h) est la dose qui tue 50% des animaux soumis au test pendant 24h. Elle est déterminée selon deux méthodes :

a-La méthode de REED et MUENCH (1938)

X doses en progression géométrique de raison déterminée sont injectées par voie intrapéritonéale chacune à un lot de 5 souris mâles ou femelles à raison de 0,3 ml par animal de 25 ± 2 g (X lots au total). Le nombre des animaux morts est compté. La DL₅₀ (24h) est donnée par la formule suivante :

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

Où

B : dose immédiatement inférieure à la DL₅₀,

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

M : mortalité provoquée par la dose immédiatement supérieure à la DL₅₀,

R : raison de la progression géométrique.

b- La méthode graphique (REED et MUENCH, 1938)

Elle utilise les courbes de totaux cumulatifs des animaux morts et des animaux survivants en fonction des doses utilisées. La DL₅₀ est la dose correspondant à l'intersection de ces deux courbes.

2.2.1.1.4. Examen histopathologique (BOYD, 1966 ; GANTER, JOLLES, 1969 ; LUSSIER, 1989 ; VERNE, 1960)

Cette étude a pour objectif d'observer microscopiquement les lésions occasionnées par les principes toxiques sur les différents organes des souris soumises au test de toxicité, et cela par comparaison avec les organes d'une souris normale.

Un lot de 4 souris est injecté d'une dose létale de substances toxiques. Deux d'entre elles sont sacrifiées peu de temps avant leur décès par élongation cervicale. Les principaux organes comme le cœur, l'estomac, les reins, les poumons, l'intestin, le foie, le cerveau sont prélevés. Une souris témoin recevant du sérum physiologique est traitée de la même manière.

2.2.1.1.4.1. Prélèvement et fixation des organes

Le but de cette manipulation est de maintenir les organes dans l'état où ils étaient avant leur prélèvement. Les organes prélevés sont immédiatement plongés dans un liquide fixateur qui est le liquide de BOUIN (voir composition en annexe II) pendant 48h.

2.2.1.1.4.2. Inclusion

Chaque organe est découpé en coupes minces de 5 mm d'épaisseur à l'aide d'un bistouri. Les coupes tissulaires sont déshydratées à l'alcool et imprégnés de toluène pour faciliter la fixation de la paraffine. Elles sont incorporées dans des moules contenant de la paraffine liquide à 56°C. Ces moules sont placés à +4°C pour solidifier leur contenu.

2.2.1.1.4.3. Microtomie et étalement des coupes

Des coupes minces de 5 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome rotatif LEKA. Les coupes sont placées dans des cassettes TISSUE-TEK et mises à circuler dans un circulateur automatique CITADEL 2000 pour enlever la couche de paraffine. La circulation comprend une étape d'imprégnation par le toluène, un solvant qui dissout la paraffine, suivie d'une déshydratation à l'alcool qui va permettre l'élimination du toluène et faciliter l'hydratation des tissus. Ces opérations sont répétées jusqu'à élimination totale de la paraffine.

2.2.1.1.4.4. Coloration et observation microscopique des coupes

La coloration s'effectue en milieu aqueux. Une hydratation est nécessaire après l'élimination de la paraffine par le toluène. Le tissu incolore obtenu est coloré :

- à l'hématoxyline, un colorant basique qui colore les noyaux en bleu ou noir ;

- à l'éosine, un colorant acide qui teinte le cytoplasme en rose. Les tissus conjonctifs sont fixés par le safran ;

Pour les protéger, les coupes sont recouvertes d'une goutte de résine synthétique qui polymérise à l'air. Les coupes colorées sont observées au microscope optique LABORUX au grossissement x 400 et sont photographiées.

2.2.1.2. Test hémolytique sur des hématies de mouton

2.2.1.2.1. Principe (BRUNETON, 1987)

Les saponosides se fixent au niveau de la membrane des globules rouges et augmentent la perméabilité cellulaire. Cela entraîne la libération de l'hémoglobine, voire l'éclatement des cellules. Cet effet est exploité pour mettre en évidence la présence de saponines dans un extrait à tester.

2.2.1.2.2. Mode opératoire

2.2.1.2.2.1. Préparation des globules rouges

Le sang de mouton est lavé volume à volume avec une solution de PBS (Phosphate buffered saline, composition : voir annexe). La suspension est ensuite centrifugée pendant 5 min au moyen d'une centrifugeuse de paillasse. Le surnageant est éliminé tandis que le culot est repris dans le même volume de PBS, et centrifugé. Le lavage est effectué trois fois. Le culot final est repris dans du PBS pour avoir une suspension d'hématies à 2% (volume de sang par rapport au volume total).

2.2.1.2.2.2. Test hémolytique

Une plaque de microtitration en U ou en V est utilisée pour le test.

Un témoin positif où on observe la lyse totale des hématies est préparé : dans la première cupule de la 1^{ère} rangée, 50 µl d'eau distillée sont déposés.

Un témoin négatif pour lequel les hématies sont intactes est également prévu : dans la 2^e cupule de la 1^{ère} rangée, 50 µl de PBS sont déposés.

La concentration de l'extrait utilisé est ramenée à 2 mg/ml par dilution au PBS. A l'aide d'une micropipette, 50 µl de cet extrait sont mis dans la 3^e et la 4^e cupule de la première rangée de la plaque ; puis l'extrait de la 4^e cupule est dilué en cascade avec 50 µl de PBS (coefficient de dilution : 1/2) le long de la rangée.

Toutes les cupules reçoivent en plus 50 µl de suspension d'hématies à 2%. La plaque ainsi préparée est incubée pendant 1h à 37°C, puis laissée une nuit à +4°C avant la lecture des résultats. L'expérience, réalisée sur 2 rangées de cupules, est résumée dans le tableau n°4.

Tableau n°4 : Composition du milieu utilisé dans les tests hémolytiques.

Concentration en extrait (µg/ml)	$T^{(+)}$	$T^{(-)}$	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	3,9	1,9	0,9
Suspension d'hématies à 2% (µl)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Extrait (µl)			50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Eau distillée(µl)	50											
PBS(µl)		50										

$T^{(+)}$: eau distillée,

$T^{(-)}$: solution de PBS

L'hémolyse se traduit par la formation, au fond de la cupule, d'une plage de lyse résultant de la libération de l'hémoglobine ; et l'absence d'hémolyse se reconnaît par la sédimentation des hématies sous forme de point rouge au fond de la cupule.

2.2.2. METHODES D'ETUDE DES EFFETS DES PRINCIPES TOXIQUES SUR LES ANIMAUX A SANG FROID

2.2.2.1 Tests sur les têtards de grenouille

2.2.2.1.1.Mode opératoire

L'expérience consiste à observer les effets de l'introduction de principes toxiques dans le milieu de vie des têtards de grenouille « sans patte ».

Des lots de x animaux sont mis en présence de différentes concentrations en toxines (volume final 200 ml), en progression géométrique de raison déterminée. Les solutions sont préparées par dilution en cascade de l'extrait à tester. L'expérience dure 24h.

2.2.2.1.2. Détermination de la CL50 (24h)

La CL50 (24h) est la concentration qui tue 50% de la population testée pendant 24h.

Des dilutions de l'extrait à tester sont réalisées de manière à ce que le premier terme de la progression soit la concentration la plus élevée donnant 0% de mortalité et le dernier terme la concentration la plus faible donnant 100% de mortalité.

La détermination de la CL50 est faite par la méthode graphique de régression linéaire de la relation suivante :

$$\% \text{ de décès} = f(\log C)$$

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

L'équation de la droite de régression linéaire est donnée par la formule suivante :

$$Y = A + B \log X$$

Y : le pourcentage de mortalité

A : une constante

B : coefficient de régression linéaire

X : concentration en $\mu\text{g/ml}$

2.2.2.2. Tests sur les alevins de carpe

Les tests sur les alevins de carpe âgés de 4 semaines, sont réalisés de la même manière que pour les têtards de grenouilles (§ 2.2.2.1. p 31).

2.2.2.3. Tests sur les larves de moustique

L'extrait à tester est introduit dans un récipient contenant 200 ml d'eau de source. Un lot de 10 larves au 3^e stade y est introduit. L'expérience dure 24h à la température ambiante.

Les larves sont considérées comme mortes quand elles restent immobiles, et moribondes quand elles ont du mal à se déplacer après une légère secousse sur le récipient qui les contient.

2.2.3. MÉTHODES D'ÉTUDE DES EFFETS DES PRINCIPES TOXIQUES SUR LES VÉGÉTAUX

2.2.3.1. Etude des effets sur le pouvoir germinatif des graines

Cette étude a été réalisée sur les graines de quelques représentants des Monocotylédones et des Dicotylédones, dont la liste est donnée au § 2.1.2. (p.25). La sensibilité des graines est appréciée en les mettant à germer en présence d'une concentration donnée de l'extrait à tester et par comparaison à des graines non traitées (témoin).

Mode opératoire

Un lot de 10 graines par espèce est mis à germer sur du coton hydrophile imbibé de l'extrait à étudier à la concentration de 1 mg/ml. Un arrosage avec l'extrait est effectué tous les 2 jours pour éviter le dessèchement des graines. Un lot témoin mis à germer sur du coton hydrophile imbibé d'eau de robinet et arrosé avec de l'eau de robinet, est réalisé pour chaque type de graine. L'expérience dure 48h à l'obscurité et à 30°C.

2.2.3.2. Etude de la croissance des jeunes plantules de deux graines

Cette étude est réalisée sur les graines d'un représentant des Monocotylédones (*Oryza sativa* ; Graminées) et un représentant des Dicotylédones (*Pisum sativum* ; Fabacées) (Cf. résultats au § 3.2.1. p 50). L'évolution du développement des épicotyles et hypocotyles des jeunes plantules est suivie en présence de plusieurs concentrations de l'extrait à tester.

Mode opératoire

Toutes les graines utilisées sont préalablement désinfectées par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1%, pendant 10 min. Pour chaque espèce étudiée, deux lots de dix graines sont trempés 24h dans l'extrait à tester et 8 lots dont 1 lot témoin dans l'eau de robinet. Après le trempage, :

- un des lots trempés dans l'extrait est mis à germer sur du coton hydrophile imbibé d'extrait et arrosé régulièrement avec le même extrait; l'autre lot est mis à germer sur du coton imbibé d'eau de robinet et arrosé avec l'eau de robinet.

- les lots qui ont été trempés dans l'eau de robinet sont mis à germer en présence des différentes concentrations de l'extrait à tester, et arrosés respectivement avec les mêmes solutions. Le lot témoin est mis à germer dans l'eau de robinet et arrosé d'eau de robinet.

La germination a d'abord lieu à 30°C à l'obscurité pendant 48h, puis elle se poursuit à la température ambiante pour le reste de l'expérience qui dure au total 14 jours. La longueur des épicotyles et celle des hypocotyles sont mesurées tous les 2 jours.

2.2.3.3. Méthode d'étude des effets sur la levée de dominance apicale **(HELLER et coll., 1995)**

2.2.3.3.1. Principe

La croissance des bourgeons axillaires sous l'effet des principes toxiques est appréciée par comparaison avec les effets de certaines hormones de croissance telles que la gibbérelline (GA₃), qui a un effet stimulateur sur la croissance du bourgeon axillaire et l'auxine (AIA ou acide 3-indole acétique) qui a un effet inhibiteur. Ces hormones sont utilisées respectivement comme témoins positif et négatif avec une dose identique à celle de l'extrait testé.

2.2.3.3.2. Mode opératoire

Des plantules de petit pois (*Pisum sativum*) âgées de 7 à 8 jours sont utilisées. Elles sont décapitées au-dessus du deuxième bourgeon axillaire. L'extrait à analyser est dilué pour avoir une concentration de 28 mg/ml. Un volume de 1 µl de cet extrait est prélevé avec une microseringue et mélangé dans une boîte de Pétri avec de la lanoline (agent fixateur). Le mélange est déposé sur la partie sectionnée des plantules. L'expérience est aussi réalisée avec la gibbérelline et l'auxine à la dose de 28 µg dans 1 µl. Un lot arrosé avec l'eau distillée sert de témoin.

Les plantules ainsi traitées sont arrosées régulièrement avec de l'eau distillée ; la longueur des bourgeons axillaires est mesurée tous les 2 jours pendant 14 jours.

2.2.4. MÉTHODES D'ÉTUDE DES EFFETS DES PRINCIPES TOXIQUES SUR LES MICROORGANISMES

Les souches ayant servi pour les tests ont d'abord été isolées et caractérisées par nos soins.

2.2.4.1. Isolement et purification

**(LARPENT et coll., 1979 ; FERRON, 1994 ; LE MINOR et coll., 1993 ;
LEFEVRE, 1997 ; SCHAECHTER et coll., 1999)**

Cette manipulation vise à obtenir une souche exempte de toute contamination. Les souches sont purifiées par repiquages successifs sur gélose ordinaire.

La culture de germe conservée sur gélose inclinée est relancée sur du bouillon nutritif stérile, puis incubée à 37°C pendant 24h. La turbidité du milieu indique la croissance du germe.

Une öse de cette suspension estensemencée sur de la gélose ordinaire préalablement coulée dans une boîte de Pétri par la technique d'épuisement. La boîte est également incubée à 37°C pendant 24h. Les souches se présentant en colonies uniformes sont considérées comme pures. L'appréciation microscopique de la pureté de la souche se fait par la coloration GRAM.

2.2.4.2 Identification et caractérisation des souches pures (MARCHAL et coll.,1987 ; SINGLETON, 1994)

2.2.4.2.1. Méthode de coloration GRAM ou TEST - GRAM

La coloration GRAM permet la classification des bactéries en deux grands groupes : les bactéries " GRAM positif " et les bactéries " GRAM négatif. "

Mode opératoire

Une colonie isolée à partir de la culture sur gélose ordinaire est prélevée à l'aide d'une öse et étalée en frottis dans une goutte d'eau distillée déposée sur une lame. L'ensemble est séché par un mouvement de va-et-vient au-dessus de la flamme d'un bec bunsen. Le frottis est par la suite coloré pendant une minute, successivement avec :

- du violet de gentiane phéniqué,
- une solution iodo-ioduré ou lugol,

puis rincé ensuite à l'eau distillée.

La lame est ensuite décolorée avec de l'alcool 95° pendant une minute, puis de nouveau rincée à l'eau distillée pour éliminer l'excès d'alcool.

Le frottis ainsi traité est recoloré avec de la fuschine de ZIEHL pendant 30 s. L'excès de colorant est éliminé par rinçage à l'eau distillée. Après séchage de la lame au-dessus de la flamme d'un bec bunsen, la préparation est recouverte d'une huile d'immersion (huile de cèdre) avant d'être observée au microscope LEITZ (x100).

Les bactéries "GRAM positif" gardent la coloration violette tandis que les "GRAM négatif" perdent cette coloration sous l'effet de l'alcool et sont recolorées en rose par la fuschine.

2.2.4.2.2. Culture sur galerie d'identification

La coloration GRAM est suffisante pour identifier les bactéries de type « GRAM positif ». Ainsi, l'aspect, la forme, la couleur et le mode de regroupement des colonies constituent leurs critères d'identification . Par contre, une culture sur galerie d'identification est nécessaire pour caractériser biochimiquement les souches microbiennes de type « GRAM négatif ». Pour chaque culture, le milieu est coulé stérilement en pente dans des tubes à essai. Après l'ensemencement, l'incubation a lieu à 37°C pendant 24h.

2.2.4.2.2.1. Culture sur milieu de SIMMONS

L'ensemencement de la souche à étudier se fait le long de la pente du milieu du fond vers la surface. Les bactéries sont dites citrate-positives quand il se produit un virage de la coloration bleue au bleu-vert.

2.2.4.2.2.2. Culture sur milieu mannitol - mobilité

Les bactéries sont ensemencées par piqûre centrale sur ce milieu semi-mou. Le virage de la coloration du rouge au jaune traduit la fermentation du mannitol. La mobilité des bactéries est appréciée par la turbidité du milieu.

2.2.4.2.2.3. Culture sur milieu de HAJNA – KLIGLER : lactose – glucose – H₂S

Le milieu utilisé, celui de HAJNA-KLIGLER est à base de glucose et de lactose. Une öse de la suspension de la souche à étudier est ensemencée par un mouvement de stries du fond vers la surface du milieu. L'utilisation de glucose et celle du lactose se traduisent par le changement de la coloration rouge au jaune du culot et de la pente du milieu. La formation de sulfure d'hydrogène (H₂S) est indiquée par l'apparition d'une coloration noire dans le culot.

2.2.4.2.2.4. Culture sur milieu lysine - fer

L'ensemencement s'effectue de la même manière que pour le milieu précédent. La présence de LDC bactérienne est mise en évidence par l'apparition d'une coloration violette du culot, celle de la LDA par une coloration rouge de la pente. Le noircissement du milieu révèle la production bactérienne de sulfure d'hydrogène.

2.2.4.2.2.5. Culture sur milieu urée - indole

La suspension microbienne est mise directement dans le milieu urée-indole. Le virage de la coloration du milieu de l'orangé au rouge met en évidence l'utilisation de l'urée par la bactérie. La présence d'indole est indiquée par l'apparition d'un anneau rouge en surface après l'addition de trois gouttes de réactif de KOVACS dans le milieu ensemencé.

Réactif de KOVACS :

- paradiméthylamino- benzaldehyde5g
- alcool amylique.....75ml
- acide chlorhydrique25ml

La tryptophane désaminase (TDA) est mise en évidence par la formation de précipité blanc après ajout de trois gouttes de réactif hyperchlorure de fer dans le milieu.

2.2.4.3. Etude du spectre d'activité anti-microbienne (COURVALIN et coll., 1985 ; DUVAL et coll., 1990)

La sensibilité des microorganismes vis-à-vis des agents anti-infectieux est déterminée soit en milieu solide par la méthode de diffusion sur gélose, soit en milieu liquide par la méthode de dilution.

2.2.4.3.1. Méthode en milieu liquide

2.2.4.3.1.1. Principe

La croissance des bactéries en milieu liquide est inhibée en présence d'une certaine concentration en agent anti-bactérien. Macroscopiquement, cette inhibition est indiquée par l'absence de turbidité du milieu ensemencé.

2.2.4.3.1.2. Mode opératoire

La culture de la souche microbienne à étudier est relancée dans du bouillon nutritif la veille de la manipulation. Plusieurs dilutions de l'extrait sont réalisées. Dans un tube à essai, 0,8 ml de chaque solution à étudier est mélangé avec 9 ml de bouillon et 0,2 ml de la suspension bactérienne. La suspension est laissée incuber à 37°C pendant 24h.

La lecture se fait à l'œil nu : un milieu trouble indique la croissance des germes tandis qu'un milieu limpide témoigne de l'inhibition de cette croissance.

2.2.4.3.2. Méthode en milieu solide

2.2.4.3.2.1. Principe

Quand un antibiotique est déposé à la surface de la gélose uniformément ensemencée avec la bactérie à étudier, il y diffuse en créant une zone circulaire dans laquelle ses concentrations sont décroissantes du centre vers la périphérie. Un halo d'inhibition se crée après incubation si l'antibiotique est actif sur le germe-test. Le diamètre de la zone d'inhibition varie avec le degré de sensibilité de la bactérie à l'antibiotique (DUVAL et coll., 1990).

2.2.4.3.2.2. Mode opératoire

2.2.4.3.2.2.1. Inoculation du milieu

Une préculture de 24h sur bouillon nutritif de la souche à étudier est réalisée. Le milieu préalablement coulé dans une boîte de Pétri est inondé avec cette préculture puis laissé incuber pendant 15 min à 37°C pour permettre l'imprégnation de la bactérie à la surface de la gélose. L'excès d'inoculum est ensuite aspiré.

2.2.4.3.2.2.2. Dépôt d'extrait

L'extrait à tester (20 µl), de concentration déterminée, est déposé sur des disques d'antibiogramme de 6mm de diamètre. Les disques ainsi traités sont placés à la surface de la gélose de MUELLER - HINTON préalablement ensemencé ci-dessus. La boîte est mise à incuber à 37°C pendant 24h.

Les résultats, lus en mesurant le diamètre des halos d'inhibition, sont exprimés selon les normes ci-dessous :

Tableau n°5 : Normes utilisées pour la lecture des résultats d'antibiogramme.

Diamètre de halo	Résultats	Sensibilité du germe

$x < 7\text{mm}$	-	Insensible
$7\text{mm} \leq x \leq 8\text{mm}$	±	Assez sensible
$8\text{mm} \leq x \leq 9\text{mm}$	+	Sensible
sensible $x > 9\text{mm}$	++	Très sensible

2.2.4.3.2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide

La CMI est la plus faible concentration d'extrait pour laquelle il n'y a pas de croissance visible des germes. D'après les normes ci-dessus, cette valeur correspond à un diamètre de 7mm.

Plusieurs concentrations sont préparées par dilution en cascade de l'extrait à étudier.

Les boîtes sont incubées pendant 24h à 37°C avant la lecture.

3- RESULTATS

3.1. EFFETS DES PRINCIPES TOXIQUES SUR LES ANIMAUX

3.1.1. EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG CHAUD

3.1.1.1. Effets sur les souris

3.1.1.1.1. Effets des différentes voies d'administration

Deux types de voie d'administration ont été testés pour l'extrait E2 (ou extrait) selon la méthode décrite au § 2.2.1.1.1. (p 27). Les réactions des souris varient selon la voie d'administration. Les résultats sont montrés dans le tableau n°6.

Tableau n°6 : Influence de la voie d'administration sur la toxicité de l'extrait.

Voie d'administration	IP	gavage
Résultats	Mort au bout de 15à 18h	Pas d'apparition de symptômes

P :intrapéritonéale ;

3.1.1.1.2. Description des symptômes

L'injection de la dose létale 628,8 mg/kg d'extrait provoque les symptômes cliniques suivants :

Une à deux minutes après l'injection, les souris manifestent des torsions abdominales intermittentes. Après 2 heures, les oreilles sont tirées vers l'avant et une dilatation est observée au niveau des capillaires auriculaires. Vers la sixième heure, une enophtalmie est

notée ; les poils sont hérissés, les souris se blottissent dans un coin de la cage et manifestent une hypoactivité motrice. Des diarrhées intermittentes sont aussi observées. Les souris meurent au bout de 15 à 18 h par une difficulté respiratoire.

A la suite de l'injection de la dose sublétales 252,6 mg/kg, les souris manifestent les mêmes symptômes à l'exception de la difficulté respiratoire. Elles se remettent 48h après l'injection.

3.1.1.1.3. Evaluation de la DL₅₀

La DL₅₀ est évaluée selon la méthode décrite au § 2.2.1.1.3.(p 28). Six doses en progression géométrique de raison 1,2 ont été testées sur 6 lots de 5 souris femelles. La première dose est de 252,6 mg/kg. Les résultats sont montrés dans le tableau suivant :

Tableau n° 7 : Résultats de la détermination de la DL₅₀.

Dose en mg/kg	Nombre de décès													Total des morts	% de mortalité
	12h	13h	14h	15h	16h	17h	18h	19h	20h	21h	22h	23h	24h		
628,8				1				1	1			1	1	5	100
523,92							1		1	1			1	4	80
436,56					1		1						1	3	60
363,84	1						1							2	40
303,24								1					1	2	40
252,6														0	0

Le tableau ci-dessous montre les totaux cumulatifs des souris survivantes et des souris mortes.

Tableau n°8 : Totaux cumulatifs des souris survivantes et des souris mortes.

Dose en mg/kg	Nombre de survivants	Nombre de morts	Totaux cumulatifs de survivants	Totaux cumulatifs des morts
628,8	0	5	0	16
523,92	1	4	1	11
436,56	2	3	3	7
363,84	3	2	6	4
303,24	3	2	9	2
252,6	5	0	14	0

D'après la formule de REED et MUENCH (voir § 2.2.1.1.3. p.28), la DL₅₀ est égale à **398,56 mg/kg** de souris.

D'après la méthode graphique de la figure n°5 , cette valeur est évaluée à **396,12 mg/kg**.

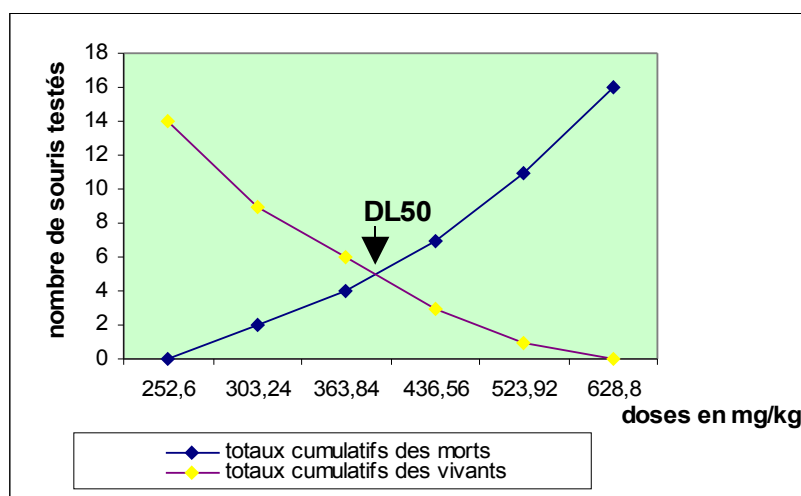


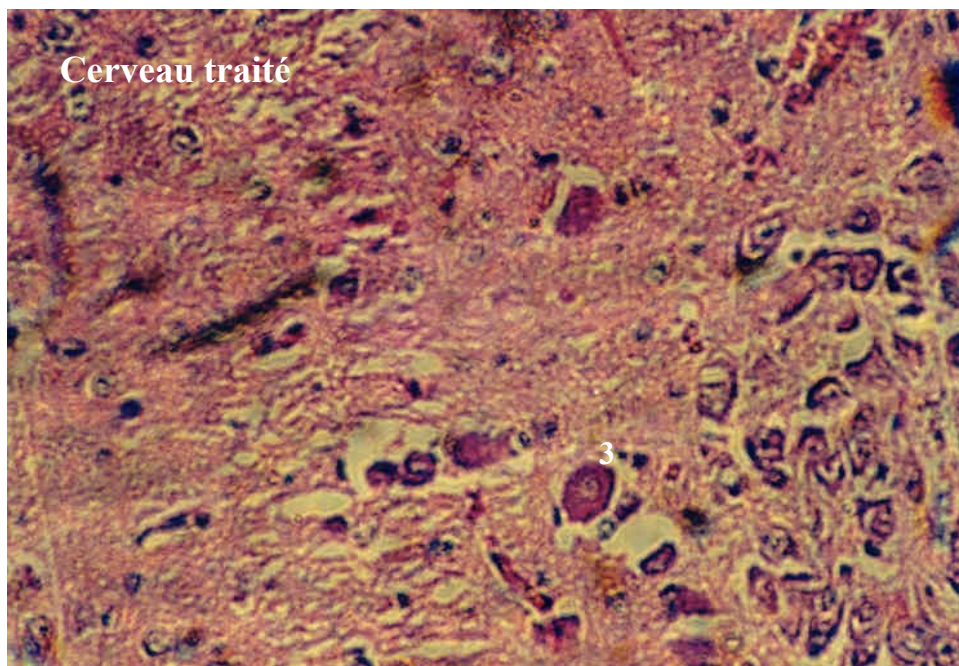
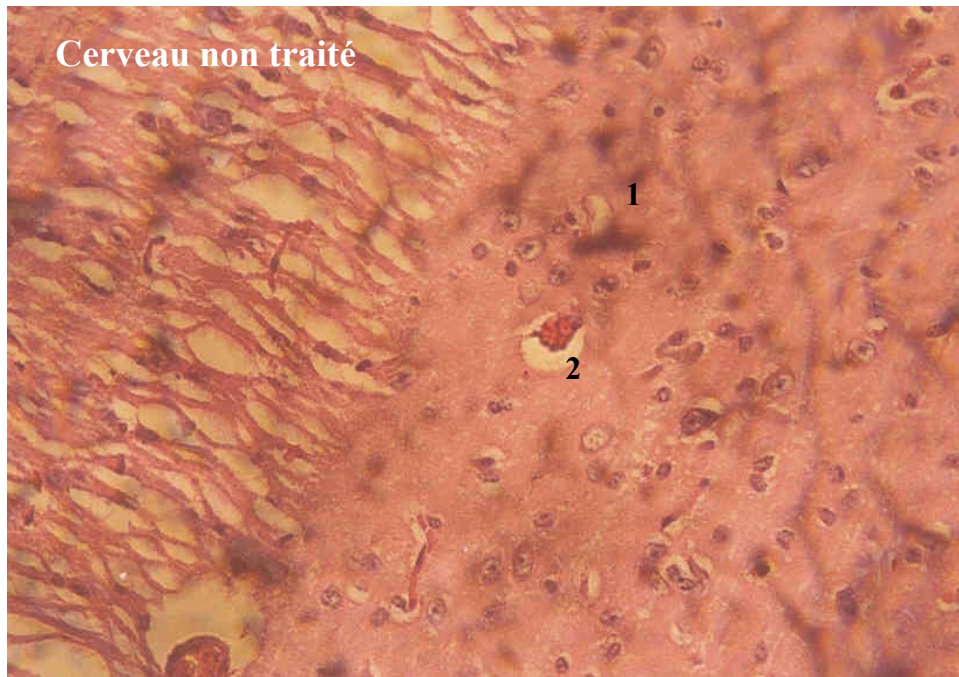
Figure n°5 : Courbes des totaux cumulatifs des souris mortes et des souris survivantes en fonction des doses utilisées.

3.1.1.1.4. Examen histopathologique des coupes d'organes

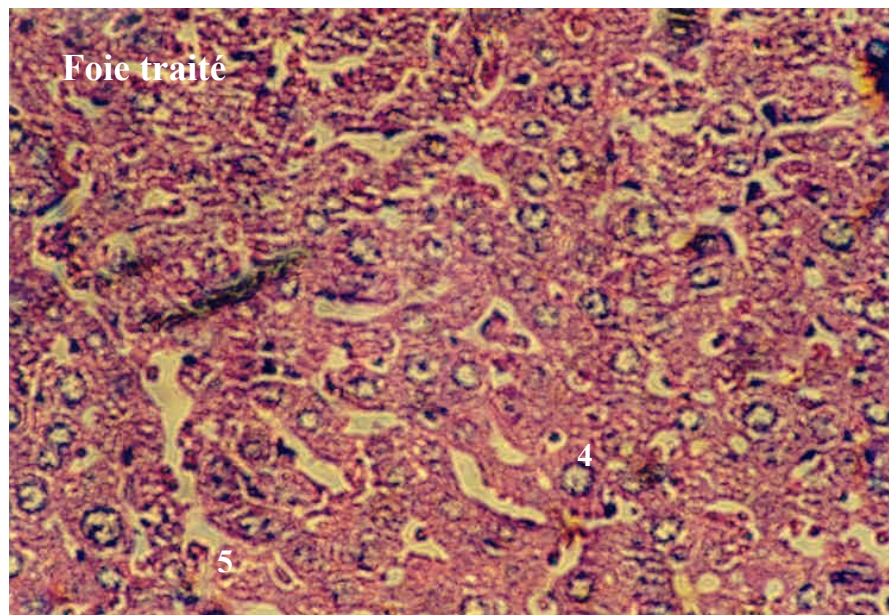
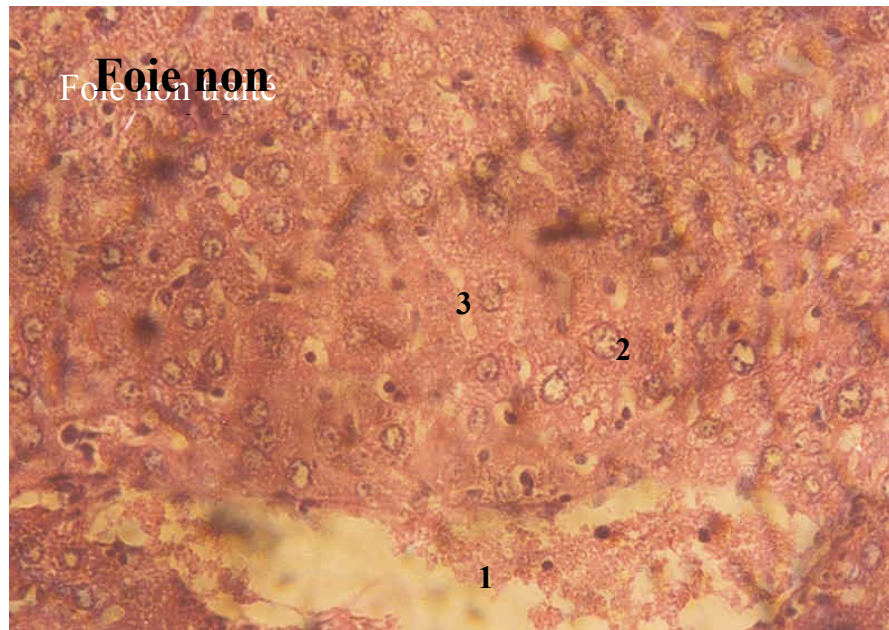
L'injection de l'extrait par voie IP de la dose létale de 628,8 mg/kg provoque l'atteinte de quelques organes tels que le l'intestin, le cerveau, les poumons, et le foie. Des congestions vasculaires pouvant aller jusqu'à des nappes hémorragiques (cas du foie) sont surtout notées. Le tableau n°9 résume ces lésions qui sont montrées sur les figures n°6 à n°9.

Tableau n°9 : Lésions histopathologiques au niveau des organes cibles après administration de l'extrait à la dose de 628,8 mg/kg de souris

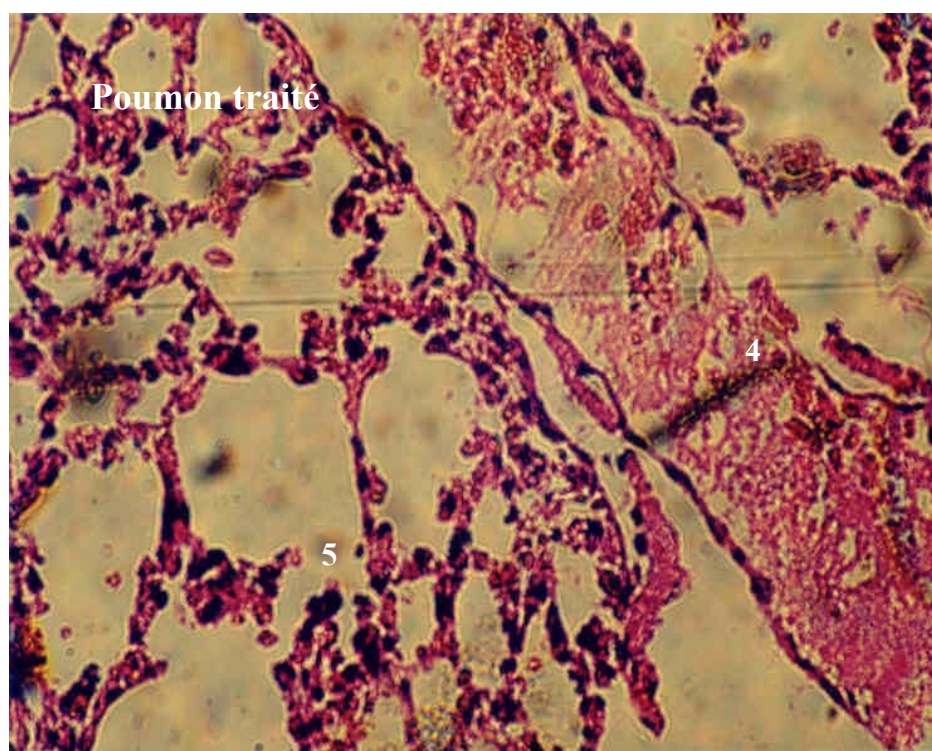
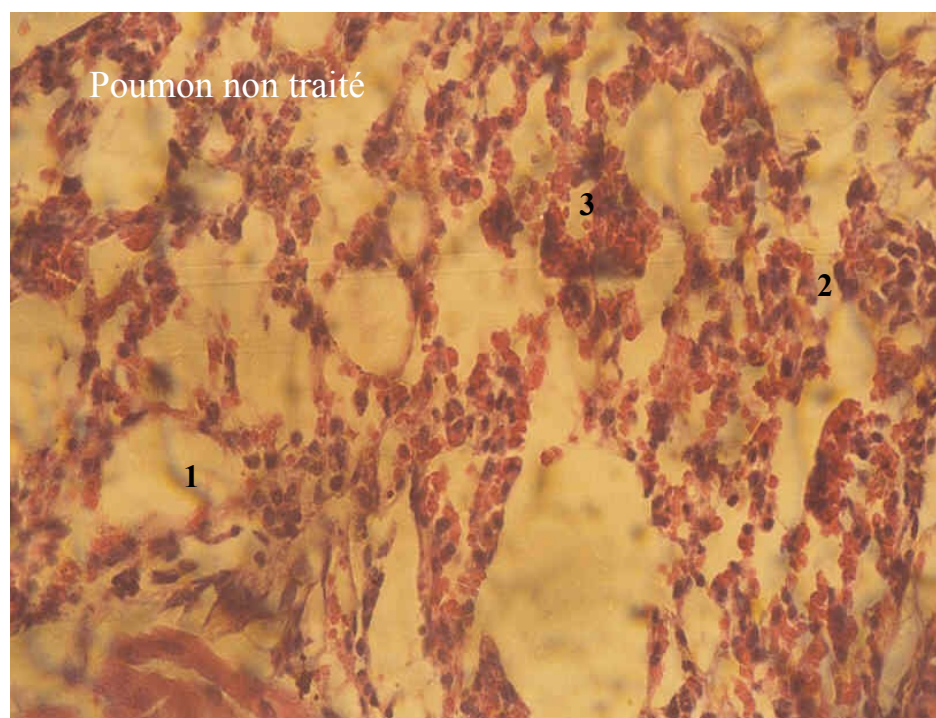
ORGANES	LESIONS HISTOPATHOLOGIQUES
Cerveau	Capillaire dilaté
Poumons	Capillaire alvéolaire dilaté
Foie	Capillaire sinusoiide dilaté Nappe hémorragique
Intestin	vaisseaux congestifs



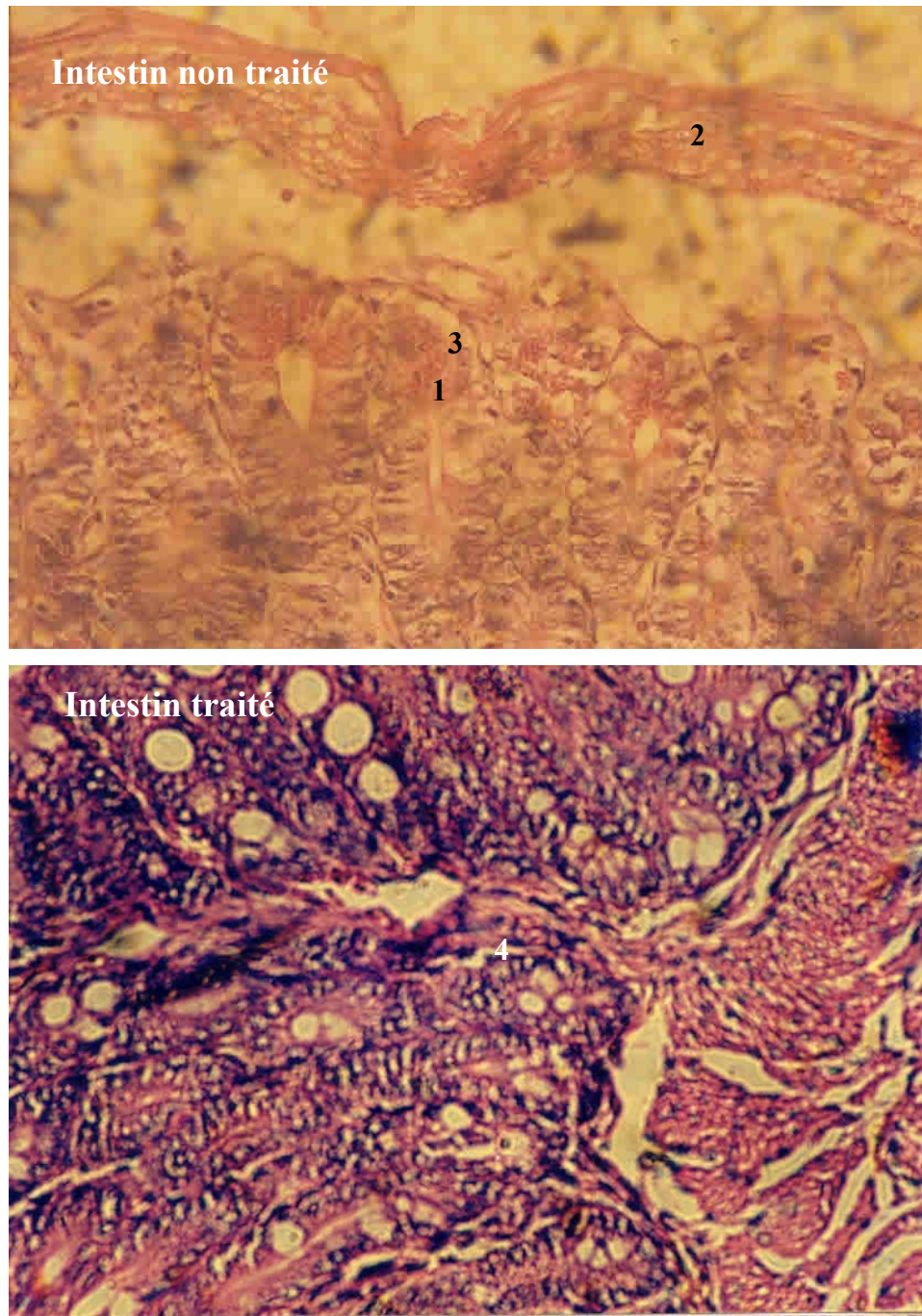
*Figure n°6 : Lésions histologiques au niveau du **cerveau** dues à l'administration par voie i.p. de l'extrait E2 à la dose de 628,8 mg/kg (Grossissement X 400).
1 : parenchyme cérébral; 2 : capillaire normal ; 3 : capillaire dilaté.*



***Figure n°7** : Lésions histologiques au niveau du **foie** dues à l'administration par voie i.p. de l'extrait E2 à la dose de 628,8 mg/kg (Grossissement X 400).
 1 : veine centro-lobulaire ; 2 : hépatocyte ; 3 : capillaire sinusoïde normal ; 4 : capillaire sinusoïde dilaté ; 5 : nappe hémorragique.*



*Figure n°8 : Lésions histologiques au niveau du **poumon** dues à l'administration de l'extrait par voie i.p. de l'extrait E2 à la dose de 628,8 mg/kg de poids (Grossissement X 400).
1 : alvéole ; 2 : tissu inter-alvéolaire ; 3 : capillaire normal ; 4 : capillaire dilaté ; 5 : cellule enflammée.*



***Figure n°9** : Lésions histologiques au niveau de l'**intestin** dues à l'administration par voie i.p. de l'extrait E2 à la dose de 628,8 mg/kg de poids (Grossissement X 400).
1 : muqueuse ; 2 : séreuse ; 3 : capillaire normal ; 4 : vaisseau congestif.*

3.1.1.2. Effets sur les hématies de mouton

L'extrait brut et l'extrait ont été utilisés pour le test hémolytique sur les hématies de mouton selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.1.2. (p 30). D'après les résultats qui sont consignés dans le tableau n°10, l'Extrait Brut et l'extrait provoquent la lyse des hématies de mouton. Ces résultats sont schématisés à la figure n°10.

Tableau n°10 : Résultats des tests hémolytiques.

Concentration en µg/ml	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	3,9	1,9	0,9
Extrait brut	+	+	+	+	+	+	±	±	±	-
Extrait	+	+	+	±	±	-	-	-	-	-
$T^{(-)}$	PBS + sang de mouton									
$T^{(+)}$	Eau distillée + sang de mouton									

+ : Hémolyse totale

± : Hémolyse partielle

- : Absence d'hémolyse

$T^{(-)}$: Témoin négatif

$T^{(+)}$: Témoin positif

Une hémolyse totale est observée à partir de la concentration 15,6 µg/ml pour l'EB et à partir de 125 µg/ml pour l'extrait. Une hémolyse partielle est notée entre 1,9 µg/ml et 0,9 µg/ml pour l'EB et pour 62,5 µg/ml et 31,25 µg/ml pour l'extrait. La figure n°11 montre ces résultats.

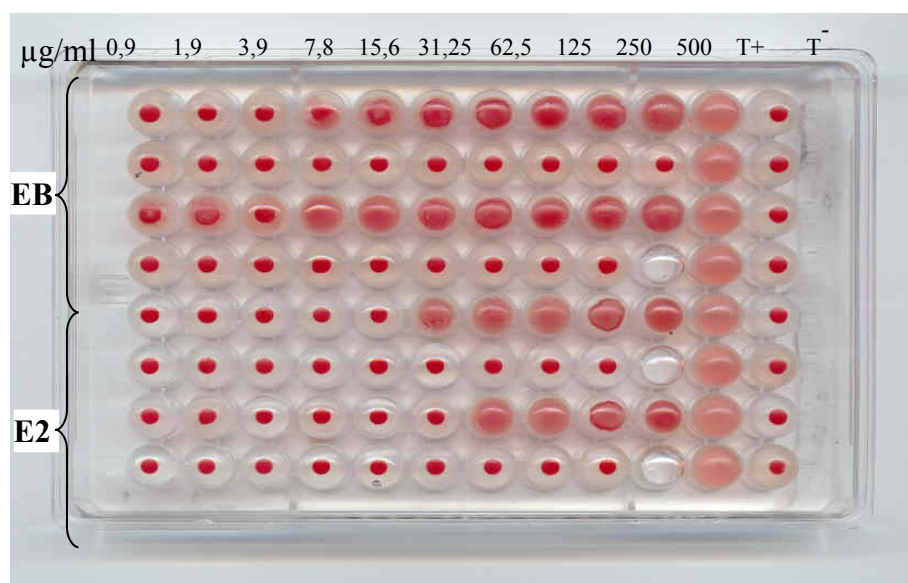


Figure n°10 : Photo de la plaque montrant les résultats des tests hémolytiques sur hématies de mouton de EB et de E2 à différentes concentrations.

3.1.2. EFFETS DES PRINCIPES TOXIQUES SUR LES ANIMAUX A SANG FROID

3.1.2.1. Effets sur les têtards de grenouille

Les têtards de grenouille ont été testés avec l'extrait brut et l'extrait à différentes concentrations, selon la méthode donnée au § 2.2.2.1. (p 31).

3.1.2.1.1. Effets de l'extrait brut

Quatre lots de 10 têtards ont été testés avec 4 concentrations en progression géométrique de l'extrait brut. Le 1^{er} terme de la progression est de 26 µg/ml et la raison est de 1,2.

Les têtards sont sensibles à l'action de l'EB. La concentration minimale qui tue 100% des animaux est de 48 µg/ml. A la concentration de 26 µg/ml, tous les têtards testés survivent après un délai de 24h. Les résultats sont présentés dans le tableau n°11 :

Tableau n°11 : Effets de l'extrait brut sur les têtards de grenouille.

Concentration en EB (C) (µg/ml)	logC	Nombre de têtards utilisés	Nombre de morts	Nombre de survivants	% de décès
48	1,68	10	10	0	100
41	1,60	10	8	2	80
33	1,51	10	1	9	10
27	1,41	10	0	10	0

Selon la méthode de régression linéaire, la droite a l'équation suivante :

$$y = 410,26x + 642,37$$

où x : *logarithme de la concentration en extrait brut*
 y : *% de mortalité*

Avec un coefficient de corrélation de 0,87, log CL50 = 1,35, d'où la valeur de la CL50 est égale à **35 µg/ml**.

3.1.2.1.2. Effets de l'extrait

Sept lots de 10 têtards ont été testés avec 7 concentrations de l'extrait en progression géométrique de raison 1,15. La 1^{ère} concentration est de 17 µg/ml.

Les têtards sont également sensibles à l'extrait. La concentration minimale tuant 100% des animaux testés est évaluée à 40,3 µg/ml et celle pour laquelle la mortalité est de 0% est estimée à 17 µg/ml.

Tableau n°12 : Effets de l'extrait sur les têtards de grenouille.

Concentration en extrait (C) (µg/ml)	logC	Nombre de têtards utilisés	Nombre de survivants	Nombre de morts	% de décès
40,3	1,6	10	0	10	100
35	1,54	10	1	9	90
30,3	1,48	10	3	7	70
26	1,41	10	3	7	70
23	1,36	10	4	6	60
20	1,30	10	9	1	10
17	1,23	10	10	1	0

L'équation de la droite de régression linéaire est :

$$y = 271,39x + 213,39$$

où y : % de décès

x : logarithme de la concentration en extrait

Avec un coefficient de corrélation égal à 0,90, log CL50 = 1,397, d'où la CL50 est évaluée à **25 µg/ml**.

3.1.2.2. Effets sur les alevins de carpe

Les alevins ont été testés selon la méthode décrite au § 2.2.2.1. (p 31).

3.1.2.2.1. Effets de l'extrait brut

Six concentrations (33,2 ; 16,5 ; 8,2 ; 4,1 ; 2 ; 1) exprimées en µg/ml, ont été adoptées pour l'extrait brut (la raison de la progression géométrique est d'environ 2). Un lot de 6 alevins est utilisé pour chaque concentration.

Les alevins de carpe sont sensibles à l'extrait brut. Les résultats sont présentés dans le tableau n°13.

Tableau n°13 : Effets de l'extrait brut sur les alevins de carpe.

Concentration en EB (C) (µg/ml)	logC	Nombre des alevins utilisés	Nombre de survivants	Nombre de morts	% de décès
33,1	1,51	6	0	6	100
16,5	1,21	6	0	6	100
8,2	0,91	6	0	6	100
4,1	0,61	6	0	6	100
2,0	0,30	6	6	0	0
1	0	6	6	0	0

La concentration minimale en extrait brut provoquant une mortalité de 100% est égale à 4,1 µg/ml. Une mortalité de 0% a été observée en-deçà de la concentration 2 µg/ml. Aucun taux intermédiaire n'a été trouvé, les effets de l'extrait brut sur les alevins de carpe répondant à la loi du tout ou rien. Par conséquent, la valeur de la CL50 n'a pas pu être déterminée.

3.1.2.2.Effets de l'extrait

Huit concentrations de l'extrait (4,1 ; 3,41 ; 2,84 ; 2,37 ; 1,97 ; 1,16 ; 1,13 ; 1,11) exprimées en µg/ml, ont été testées (la raison de la progression géométrique est de 1,2). Un lot de 6 alevins a été utilisé pour chaque concentration.

Les résultats obtenus, consignés dans le tableau suivant, montrent que les alevins de carpe sont également sensibles à l'extrait.

Tableau n°14 : Effets de l'extrait sur les alevins de carpe.

Concentration en extrait (C) (µg/ml)	logC	Nombre des alevins utilisés	Nombre de survivants	Nombre de morts	% de décès
4,1	0,61	6	0	6	100
3,41	0,53	6	0	6	100
2,84	0,45	6	0	6	100
2,37	0,37	6	0	6	100
1,97	0,29	6	6	0	0
1,16	0,06	6	6	0	0
1,13	0,05	6	6	0	0
1,11	0,04	6	6	0	0

D'après ces résultats, il n'a pas été possible de déterminer la valeur de la CL50 car les effets de l'extrait sur les alevins de carpe suivent également la loi du tout ou rien.

3.1.2.3.Effets sur les larves de moustique

L'extrait brut (2ml) est introduit dans un récipient contenant 200 ml d'eau de source (concentration finale : 1,389 mg/ml. Un lot de 10 larves au 3^e stade y est introduit. L'expérience dure 24h à la température ambiante (voir méthode au § 2.2.2.3. p 32).

Les résultats ont montré que les larves de culex sont insensibles à l'EB à cette concentration. Pour des concentrations plus élevées, l'expérience n'a pas pu être effectuée parce que la forte coloration de l'extrait rendait le milieu opaque et le comptage des larves difficile.

3.2. EFFETS DES PRINCIPES TOXIQUES SUR LES VÉGÉTAUX

Trois expériences ont été réalisées sur les végétaux: la première consistait à déterminer l'effet de l'extrait brut sur le pouvoir germinatif de quelques graines de Monocotylédones et de Dicotylédones ; la deuxième avait pour objectif d'évaluer la croissance des jeunes plantules d'un représentant de chacune des classes précédentes sous l'action de l'extrait brut et la troisième comportait l'observation de la levée de dormance apicale en présence de l'extrait.

3.2.1. EFFETS SUR LE POUVOIR GERMINATIF DES DIVERSES GRAINES

Les graines dont la liste est présentée à la page 25 (Matériels et méthodes) ont été testées avec l'EB à 1 mg/ml (voir § 2.2.3. p 33), dose qui a été déterminée par des expériences préliminaires. Leur germination a été comparée avec celle des graines témoin arrosées avec l'eau de robinet.

Les résultats de cette étude de la sensibilité de quelques graines à l'action de l'EB à 1mg/ml sont présentés dans le tableau n°15.

Tableau n° 15: Pourcentage de germination des graines en présence d'EB à 1mg/m.

Famille	Nom scientifique	Nom commun	% de germination
FABACEAE	Phaseolus vulgaris	Haricot	50
	Pisum sativum	Petit pois	100
	<i>Vigna indicata</i>	Dolique	100
ASTERACEAE	<i>Lactuca sativa</i>	Laitue	0
SOLANACEAE	Solanum nigrum	Morelle noire	10
	Lycopersicon esculentum	Tomate	0
CUCURBITACEAE	Cucurbita pepo	Courgette	0
APIACEAE	<i>Daucus carotta</i>	Carotte	50
LAMIACEAE	<i>Ocimum basilicum</i>	Basilic	0
BRASSICACEAE	Brassica sp.	Tissam white	80
LILIACEAE	Allium cepa	oignon	0
GRAMINEES	<i>Oryza sativa</i>	Riz	100
	<i>Zea mays</i>	Maïs	100

Le pouvoir germinatif des graines de petit pois, de dolique, de riz, et de maïs n'est pas affecté par l'EB à 1 mg/ml. Par contre, aucune germination n'est observée ni pour la laitue, ni pour la tomate, ni pour la courgette, ni pour le basilic. Pour les autres graines, la germination est inhibée à un taux variable, allant de 20% (80% de germination) pour l'oignon, à 90% (10% de germination) pour la morelle noire.

3.2.2.EFFETS SUR LA CROISSANCE DES JEUNES PLANTULES DE DEUX GRAINES

Les graines de riz et de petit pois ne sont pas affectées par l'extrait brut à 1 mg/ml. Aussi, des concentrations plus élevées en extrait brut ont été testées pour mieux étudier l'effet de l'extrait brut sur ces graines. La figure n°11 résume l'ensemble des expériences.

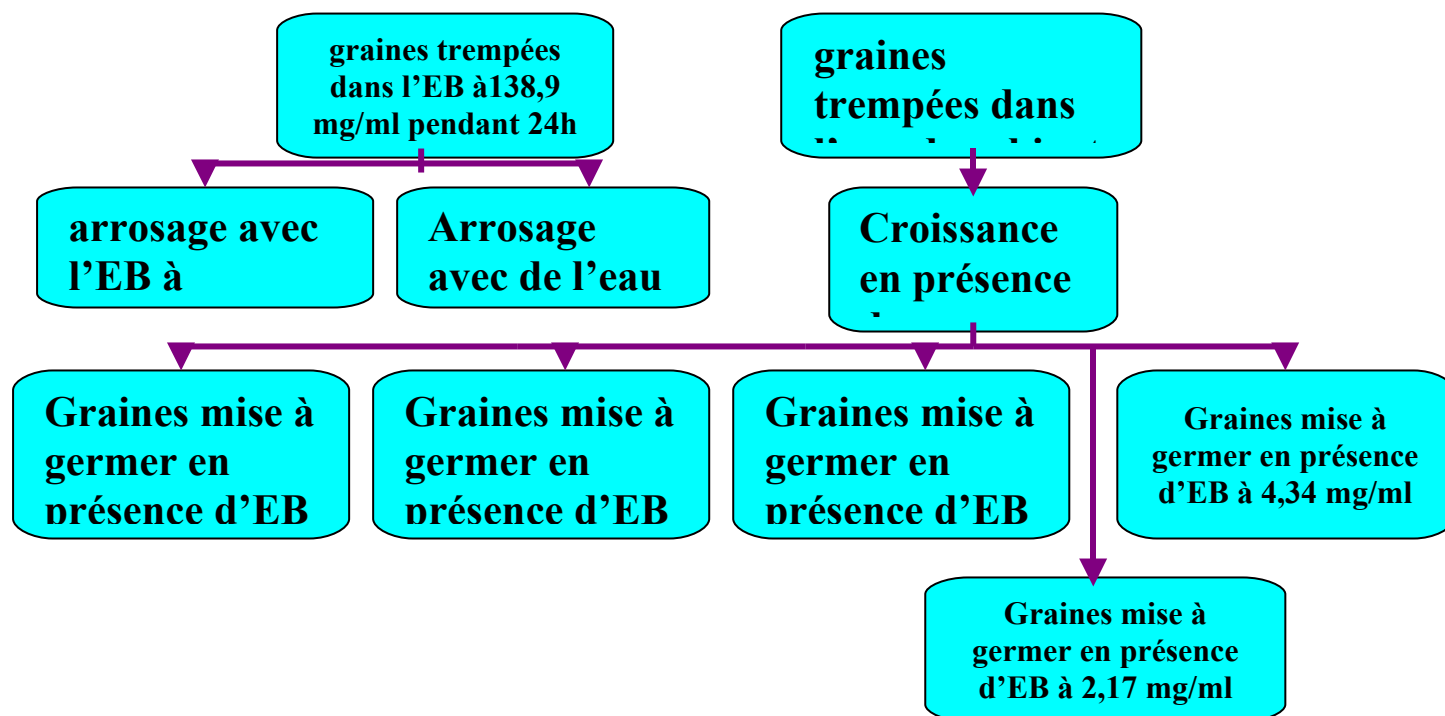


Figure n°11 : Schéma récapitulatif de la germination des graines en présence de différentes concentrations en extrait brut.

Pour les graines de riz et de petit pois trempées dans l'extrait brut à 138,9 mg/ml, aucune des graines des lots mis à germer en présence du même extrait n'a germé. Par contre, les graines de petit pois arrosées avec de l'eau de robinet ont germé à partir du 6^{ème} jour.

En ce qui concerne les graines trempées pendant 24h à l'eau distillée et mises à germer dans différentes concentrations d'extrait brut, les longueurs de l'épicotyle et de l'hypocotyle ont été mesurées et reportées sur les figures n°12 à n°15.

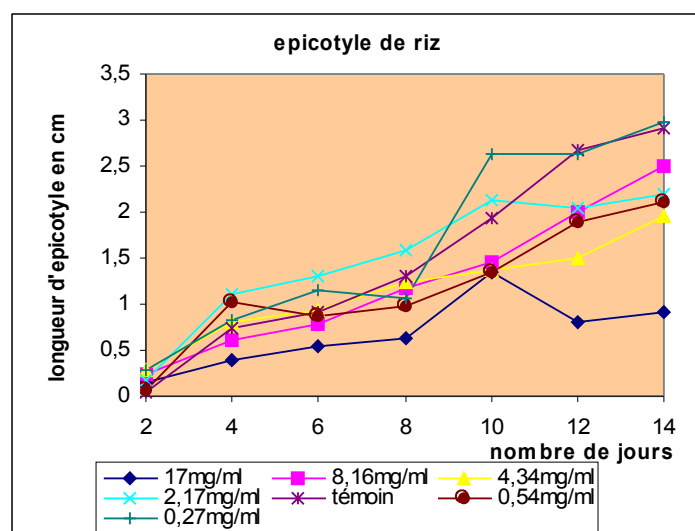


Figure n°12 : Evolution de l'épicotyle de riz en fonction de la concentration en extrait brut.

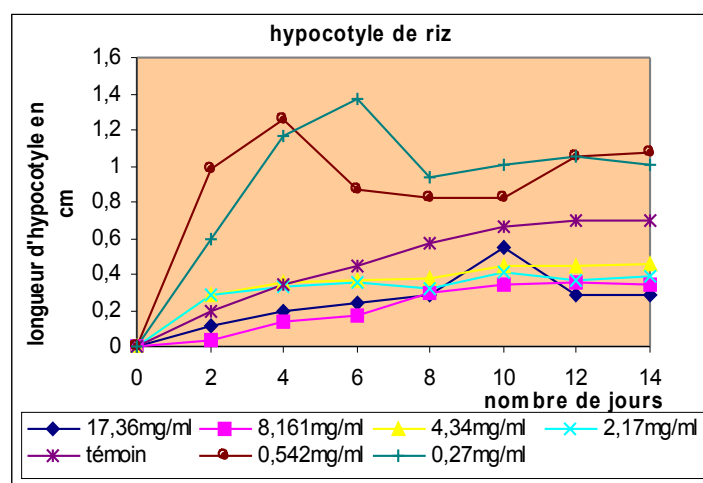


Figure n°13 : Evolution de l'hypocotyle de riz en fonction de la concentration en extrait Brut.

Chez le riz, l'effet de l'extrait brut sur la croissance des jeunes plantules varie selon la concentration en EB.

Pour l'épicotyle, une inhibition est observée pour les concentrations : 17,36 mg/ml ; 8,16 mg/ml et 4,38 mg/ml.. Pour les concentrations inférieures ou égales à 2,17 mg/ml, il n'y a pas d'effet-dose net et l'activité de l'extrait brut se traduit soit par une inhibition soit par une stimulation de la croissance de l'organe.

Pour l'hypocotyle, la croissance est nettement inhibée pour des concentrations supérieures ou égales à 2,17 mg/ml, mais elle est stimulée avec les concentrations : 0,27 mg/ml et 0,54 mg/ml. Les taux d'inhibition et de stimulation de l'hypocotyle et l'épicotyle sont résumés dans le tableau n°16.

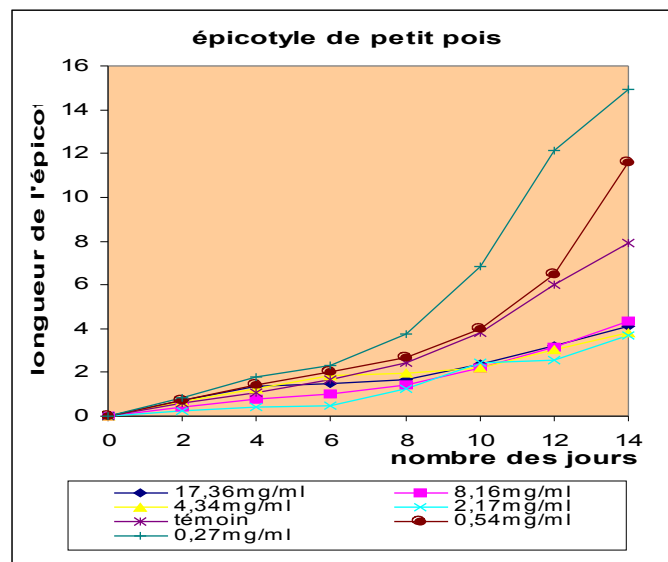


Figure n°14 : Evolution de l'épicotyle de petit pois en fonction de la concentration en extrait brut

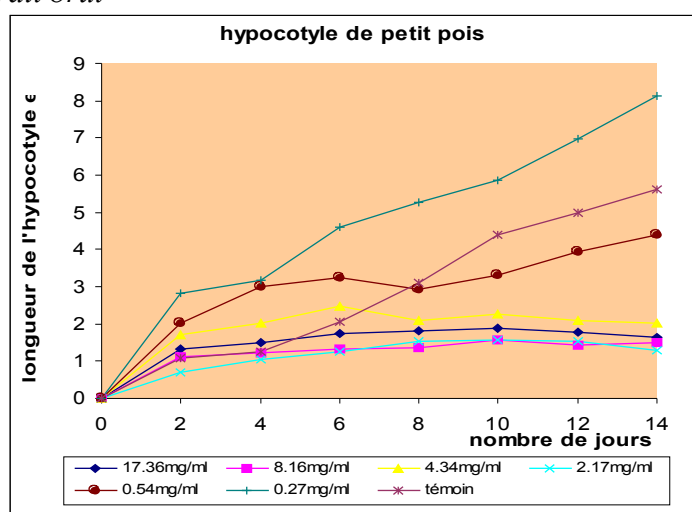


Figure n°15 : Evolution de l'hypocotyle de petit pois en fonction de la concentration en brut extrait.

Chez le petit pois, une inhibition de la croissance a été observée au niveau de l'épicotyle à partir de la concentration 2,17 mg/ml et une stimulation de celle-ci pour les concentrations 0,27 mg/ml et 0,54 mg/ml.

Pour l'hypocotyle, malgré l'absence d'effet-dose, la croissance de cet organe est inhibée à partir du 8^{ème} jour pour les concentrations en EB supérieures ou égales à 0,54 mg/ml.

Seule la concentration 0,27 mg/ml provoque une nette stimulation de la croissance de l'hypocotyle. Les taux d'inhibition et de stimulation des hypocotyles et des épicotyles de petit pois sont également présentés dans le tableau n°16.

Tableau n°16 : Taux d'inhibition et de stimulation de la croissance des hypocotyles et épicotyles de petit pois et de riz au douzième jour de l'expérience.

Dose	% d'inhibition				% de stimulation			
	Petit pois		Riz		Petit pois		Riz	
	E	H	E	H	E	H	E	H
17,36	55,5	66,66	65,78	56,52				
8,16	50	66,66	23,68	43,47				
2,17	55,5	66,66	28,9	34,47				
0,54		16,66	23,68		111			152,17
0,27			0		211,11	144,44		152,17

E :épicotyle ; H : hypocotyle

3.2.3. EFFETS SUR LA LEVEE DE LA DOMINANCE APICALE

Des plantules de petit pois âgées de 7 à 8 jours ont été utilisées pour cette étude. L'utilisation d'une dose d'extrait de 28µg dans un volume de 1µl d'une part, et de la même quantité de gibbérelline et d'auxine dans le même volume donne les résultats suivants :

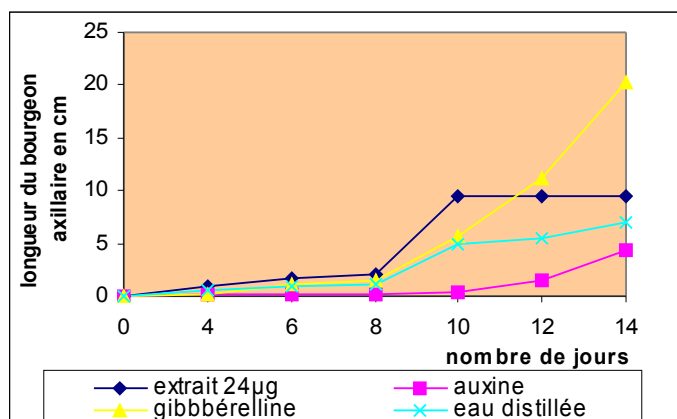


Figure n°16 : Effets de l'extrait à la dose de 28 µg sur la levée de la dormance apicale des plantules de petit pois.

D'après ces résultats, l'extrait a un effet stimulateur se rapprochant de celui de la gibbérelline, sur la croissance du bourgeon axillaire.

3.3. EFFETS SUR LES MICROORGANISMES

3.3.1. ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DES GERMES-TESTS

Les germes isolés et identifiés en utilisant les méthodes décrites au § 2.2.4.1.(p 35) sont présentés dans le tableau 17 avec leurs caractéristiques biochimiques.

Tableau n°17 : Caractéristique des germes-test utilisés.

<i>Nom scientifique</i>		<i>Ma</i>	<i>mo</i>	<i>Nit red</i>	<i>glu</i>	<i>Lac</i>	<i>H₂S</i>	<i>gaZ</i>	<i>LDA</i>	<i>LDC</i>	<i>cit</i>	<i>Ur</i>	<i>i</i>	<i>TDA</i>	<i>Gram</i>
Pasteurella multocida	B	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Serratia marcescens	B	+	-	-					+	+		-	-	-	-
Salmonella typhi	B	+	-	+	+	±	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Shigella sonnei	B	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Alcalescens dispar	B	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Escherichia coli	B	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-
Stahylococcus aureus	C	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
Streptococcus D	C	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Listeria seeligeri	B	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Listeria welshimeri	B	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Listeria ivanovii	B	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Gardnerella vaginalis	B	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	<i>Variable</i>
Rhodococcus	C	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Neisseria gonorrhoeae	C	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>Variable</i>
Candida albicans	CLChampignon	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	

Ma : mannitol; mo: mobilité ; nit red: nitrate réductase ; glu : glucose ; lact : lactose; H₂S : sulfure d'hydrogène ; LDA : lysine désaminase ; LDC : lysine décarboxylase ; cit : citrate réductase ; ur : urée ; i : indole ; TDA : tryptophane désaminase. B : bactéries de forme bacillaire ; C : bactéries de forme coccique.

3.3.2. EFFETS SUR LA CROISSANCE DES MICROORGANISMES

3.3.2.1. Méthode en milieu liquide

L'utilisation de cette méthode n'a pas abouti à de résultats nets car les principes actifs ont précipité au contact du bouillon nutritif. Par conséquent, elle a été remplacée par la méthode de diffusion sur gélose.

3.3.2.2. Méthode en milieu solide

3.3.2.2.1. Sensibilité des germes-tests

Les microorganismes isolés ci-dessus ont servi de germes-tests ; leur sensibilité à l'extrait brut et à l'extrait a été testée selon la méthode décrite au § 2.2.4. (p34). Les résultats des tests sont résumés dans le tableau 18.

Tableau n°18 : Sensibilité des germes-tests vis-à-vis de l'extrait brut et de l'extrait.

Microorganismes	Nature	Diamètre du halo d'inhibition en mm			
		EB	Sensibilité	extrait	Sensibilité
<i>1-Serratia marcescens</i>	Bactérie GRAM -	6	-	6	-
<i>2-Salmonella typhi</i>	Bactérie GRAM -	6	-	6	-
<i>3-Shigella sonnei</i>	Bactérie GRAM -	18	++	9	+
<i>4-Pastereulla multocida</i>	Bactérie GRAM -	6	-	6	-
<i>5-Candida albicans</i>	Champignon	6	-	6	-
<i>6-Alcalescens dispar</i>	Bactérie GRAM -	6	-	6	-
<i>7-Escherichia coli</i>	Bactérie GRAM -	19	++	9	++
<i>8-Staphylococcus aureus</i>	Bactérie GRAM+	6	-	6	-
<i>9-Streptococcus D</i>	Bactérie GRAM+	6	-	6	-
<i>10-Listeria welshimeri</i>	Bactérie GRAM+	8	±	8	±
<i>11-Listeria seeligeri</i>	Bactérie GRAM+	16	++	8	±
<i>12-Listeria ivanovii</i>	Bactérie GRAM+	18	++	10	+
<i>13-Rhodococcus</i>	Bactérie GRAM+	6	-	6	-
<u>14-Gardnerella vaginalis</u>	variable	6	-	6	-
<i>15-Neisseria gonorrhoeae</i>	variable	6	-	6	-

++ : Très sensible ; + : Sensible ; ± : assez sensible ; - : insensible ;

Des germes tels que *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Listeria seeligeri*, et *Listeria ivanovii* sont très sensibles à l'extrait brut. *Listeria webslinneri* est assez sensible et les autres germes testés sont insensibles.

En ce qui concerne l'extrait, les tests ont révélé que *Listeria ivanovii*, *Escherichia coli*, et *Shigella sonnei* sont très sensibles, *Listeria welshimeri* et *Listeria seeligeri* sont assez sensibles, et les autres germes sont insensibles.

3.3.2.2. Détermination de la CMI

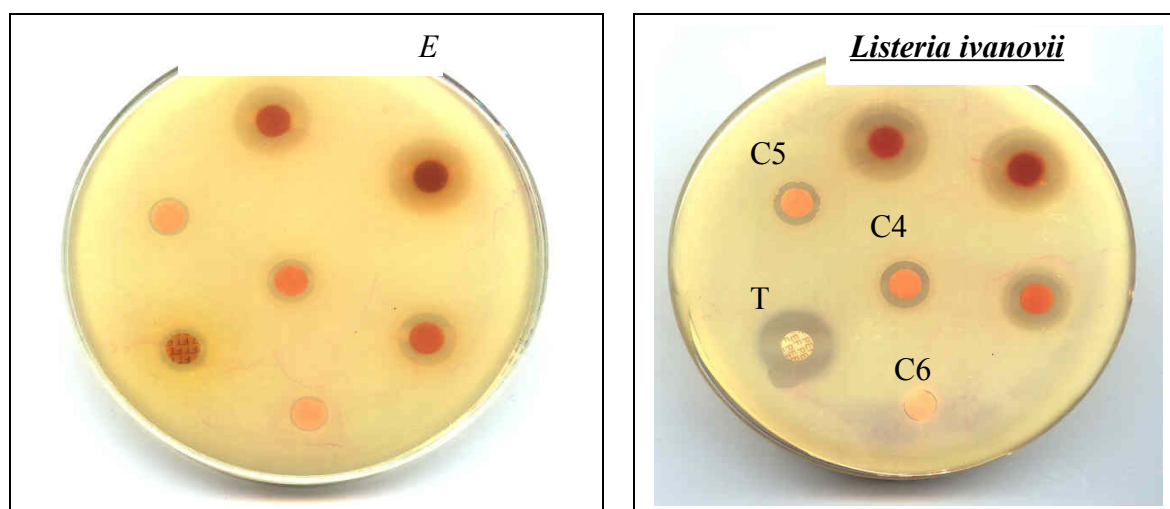
La valeur de la CMI a été déterminée pour les germes qui sont très sensibles aussi bien à l'EB qu'à l'extrait. Ce sont : *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* et *Listeria ivanovii*.

Six concentrations de l'EB (138,9 ; 69,45 ; 34,72 ; 17,36 ; 8,68 ; 4,34), en mg/ml, ont été testées. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

Tableau n°19 : Résultats de la détermination de la CMI sur l'extrait brut.

Germe-test	CMI (mg/ml)
<i>Escherichia coli</i>	8,68
<i>Shigella sonnei</i>	8,68
<i>Listeria ivanovii</i>	8,68

La figure 17 montre ces résultats.



C2
C1
C5
C4
C3
T
C6

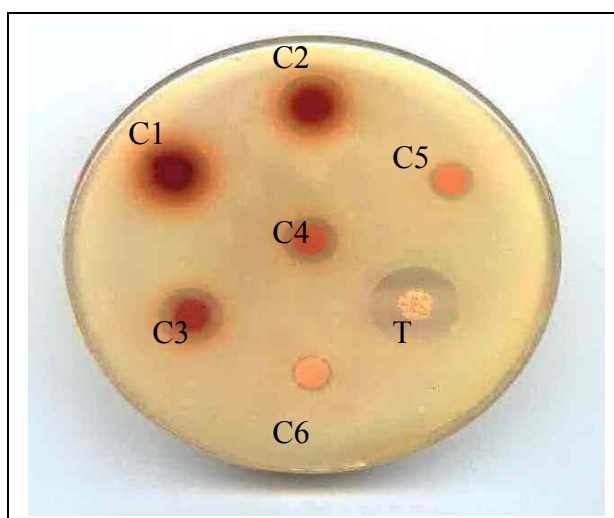


Figure17 : Résultats de la détermination de la CMI de l'extrait brut vis-à-vis de *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Listeria ivanovii* par la méthode des disques.

(**C1** = 138,9 mg/ml; **C2** = 69,45 mg/ml ; **C3** = 34,72 mg/ml ; **C4** = 17,36 mg/ml ; **C5** = 8,68 mg/ml ; **C6** = 4,34 mg/ml ; **T** : 5 µg de pefloxacin).

Pour l'EB, la concentration minimale inhibitrice, c'est-à-dire celle qui a donné un diamètre d'inhibition égale à 7 mm se situe à la concentration de 8,68 mg/ml pour les trois souches testées.

Pour l'extrait, 6 concentrations exprimées en mg/ml (52,4 ; 26,2 ; 13,1 ; 6,55 ; 3,27 ; 1,63) ont été testées. Les résultats sont montrés dans le tableau suivant.

Tableau n°20 : Résultats de la détermination de la CMI sur l'extrait.

Germe-test	CMI (mg/ml)
Eisc herichia coli	13,1
Shig ella sonnei	26,2
<i>Listeria ivanovii</i>	13,1

La CMI est la même, c'est-à-dire 13,1 mg/ml pour *Escherichia coli* et *Listeria ivanovii*, et de 26,2 mg/ml pour *Shigella sonnei*.

4-DISCUSSION ET CONCLUSION

Injectés par voie IP, l'extrait brut et l'extrait sont toxiques sur les souris. Cette voie d'administration permet d'observer des symptômes d'intoxication dont principalement une torsion abdominale, une dilatation au niveau des capillaires auriculaires, une piloérection, une enophtalmie et une difficulté à respirer.

L'administration de l'extrait par voie orale n'a, par contre, provoqué aucun symptôme d'intoxication à la dose utilisée. Ceci pourrait être dû soit à la destruction des principes toxiques par l'acidité du tractus digestif, soit à leur inactivation enzymatique, soit encore à leur non absorption au niveau de la paroi intestinale.

La valeur de la DL50 se situe entre 398,56 mg/kg et 396,12 mg/kg de souris. Une valeur aussi élevée permet de classer les principes toxiques parmi les substances faiblement toxiques car elle est largement supérieure à 25 mg/kg (RAMADE, 1973). Cette faible toxicité rend possible l'utilisation traditionnelle de l'écorce de tige en tisane fortifiante.

L'examen histopathologique des coupes d'organes des souris traitées révèlent des atteintes qui consistent surtout en des congestions vasculaires au niveau de certains organes vitaux tels que les poumons, l'intestin, le cerveau et le foie. Les congestions peuvent évoluer en nappes hémorragiques dans le foie. Ceci pourrait être dû à l'augmentation de la perméabilité des capillaires sanguins à l'hémoglobine ou même à leur éclatement à la suite de la fixation de principes actifs sur les hématies.

Le test sur les hématies de mouton révèle que les principes toxiques lysent les globules rouges à partir de 125 µg/ml pour l'extrait et de 15,6 µg/ml pour l'EB. Or, la présence de saponosides n'a pas été mise en évidence au cours du criblage phytochimique. Des travaux plus approfondis pourraient apporter des explications sur la lyse des globules rouges.

Chez les animaux à sang froid, l'extrait brut tout comme l'extrait agissent sur les têtards de grenouille et les alevins de carpe. Les alevins sont beaucoup plus sensibles que les têtards. De plus, chez les premiers, les effets obéissent à la loi de tout ou de rien. Par contre, un effet-dose a été observé pour les têtards de grenouille et la valeur de la CL50 est de l'ordre de 35 µg/ml pour l'EB et de 25 µg/ml pour l'extrait.

Les larves de moustique sont insensibles à l'extrait brut jusqu'à la concentration de 1,389 mg/ml. Le test n'a pas pu être réalisé au-delà de cette concentration, étant donné que la

visualisation des larves est rendue impossible du fait que l'extrait très concentré colore le milieu.

Chez les végétaux, la sensibilité des graines testées à l'extrait brut à 1 mg/ml est variable. L'inhibition de la germination va de 20 à 100%. Par contre, la germination des graines de maïs, de dolique, de riz et de petit pois n'est pas du tout affectée dans les conditions de l'expérience.

Or, les expériences sur la croissance des jeunes plantules de riz et de petit pois montrent que les effets dépendent de la concentration de l'extrait. En effet, les lots de ces 2 graines qui ont été trempés dans l'extrait brut de concentration 138,9 mg/ml n'ont pas germé. Ceci pourrait être dû soit à l'inactivation des enzymes du métabolisme qui sont à la disposition des graines, soit à l'empêchement de l'accès de l'embryon aux réserves nutritives des graines, soit à la destruction de l'embryon.

D'autre part, la croissance de l'hypocotyle est plus affectée que celle de l'épicotyle, pour les 2 graines. Par ailleurs, on observe une stimulation de la croissance de l'épicotyle et de l'hypocotyle pour des faibles concentrations en EB.

Enfin, les grains de riz sont d'une manière générale, beaucoup plus sensibles que les graines de petit pois.

Les principes toxiques agissent également sur les microorganismes. Les bactéries telles que *Escherichia coli*, *Listeria ivanovii*, *Shigella sonnei* présentent une forte sensibilité à l'extrait brut et à l'extrait. En milieu solide, la valeur de la CMI est de l'ordre de 8,68 mg/ml pour l'extrait brut pour les trois bactéries et respectivement de 26,2 mg/ml pour *Shigella sonnei*, 13,1 mg/ml pour *Escherichia coli* et *Listeria ivanovii* à l'extrait.

A la lumière de ces résultats, une action des principes toxiques contre les microorganismes responsables des maladies diarrhéiques pourrait être avancée. Cela explique l'utilisation traditionnelle de la plante pour soigner « les maux de ventre » (Ministère de l'agriculture, 1996).

Etant donné la faible toxicité de ces principes toxiques (cf. la valeur de la DL50), et leur action vis-à-vis de certaines bactéries pathogènes, leur utilisation en thérapeutique comme des agents bactériostatiques voire même bactéricides pourrait être envisageable.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les travaux réalisés sur *Uapaca thouarsii*, une plante endémique malgache, bien que préliminaires, nous ont permis de :

- mettre en évidence la présence d'une activité toxique dans l'écorce de tige de cette plante ;
- mettre au point un procédé d'extraction et de purification des principes toxiques ;
- noter certaines de leurs propriétés physico-chimiques ;
- apporter les premières informations sur la chimie de *Uapaca thouarsii* ;
- enrichir les connaissances sur les Euphorbiacées malgaches ;
- ***initier l'étude de la toxicité des principes toxiques sur différentes espèces animales, végétales, et microbiennes ;***

Dans l'avenir, nous envisageons :

- d'améliorer les différentes méthodes d'extraction et de purification, en vue d'obtenir des toxines hautement purifiées et d'accroître le rendement en toxines ;
- d'identifier et de déterminer la structure chimique des toxines présentes ;
- de prospector les effets sur d'autres organismes animaux, végétaux et microbiens et d'élucider les mécanismes d'action des toxines ;
- de rechercher l'application des principes toxiques en thérapeutique, en particulier leur utilisation comme antibiotiques.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- ALOUF J.E. Cell membrane and cytolytic toxins. In : The specificity and actions of animal, bacterial, and plant toxins (Receptors and recognition series B, 1). London: Cuatrecasas P., Chapman and Hall, 1977; 221-270.
- 2- ANDRIANTSOA H. Contribution à la purification et à la caractérisation d'un principe antimicrobien de graine d'une légumineuse, *Albizia lebeck*. [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1983.
- 3- AUDIGIER C., DUPONT G., ZONZAIN E. Principes des méthodes d'analyse biochimique, 3^e éd. Paris : Doin éditeur, 1992. ; (T2).
- 4- BAILLON H. Etude générale des Euphorbiacées. 1858. 596p
- 5- BIZZINI B. Tetanus toxin structure as a basis for elucidating its immunological and neuropharmacological activities. In: The specificity and actions of animal, bacterial, and plant toxins (Receptors and recognition series B, 1). London: Cuatrecasas P., Chapman and Hall, 1977 ; 175-218.
- 6- BOITEAU P., ALLORGE-BOITEAU L. Plantes médicinales de Madagascar. Paris : ACCT et édition Karthala, 1993.
- 7- BOITEAU P., BOITEAU M., ALLORGE-BOITEAU L. Index des noms scientifiques avec leurs équivalents malgaches (Extrait du Dictionnaire des noms malgaches des végétaux). Collection Nature : Flore de Madagascar. Grenoble : Alzieu éditeur, 1997 ; 490p.
- 8- BOYD. Fundamentals of immunology. 4^e éd. New York: Wiley and sons, 1966.
- 9- BRUNETON J. Elément de phytochimie et de pharmacognosie. Paris : TEC-DOC Lavoisier, 1987 ; 585p.
- 10- BUGNICOURT M. Dictionnaire de Microbiologie générale. Paris : Ellipse editor marketing S.A., 1995; 991p.
- 11- COURVALIN P., GOLDSTEIN F., PHILLIPON A., SISROT J. L'antibiogramme, 1^e éd. Paris : Masson, 1990 ; 343p.

- 12- CUATRECASAS P. The specificity and action of animal, bacterial and plant toxins. New York : John Wiley and sons, 1977; 345p.
- 13- DEBRAY M., JACQUEMIN H., RAZAFINDRAMBAO R. Contribution à l' inventaire des plantes médicinales de Madagascar. Antananarivo : ORSTOM, 1971.
- 14- DUMAS J. Les animaux de Laboratoire, mode d'inoculation des animaux. Paris : Flammarion, 1953 ; 651-657.
- 15- DUVAL J., SOUSSY C.J. Antibiothérapie, 4^e éd. Paris : Masson, 1991 ; 188p.
- 16- FERRON A. Bactériologie médicale. Paris : C. et R., 1994 ; 422p.
- 17- FONG H.H.J., TIN-WA M., FARNSWORTH N. R. Phytochemical screening. Review. Chicago : University of Illinois, 1977.
- 18- GANTER P., JOLLES G. Histochimie normale et pathologie. Paris : GAUTHIER - VILLARS, 1969 ; 923p. (T2).
- 19- HECKEL E. Les plantes toxiques de Madagascar avec leur nom et leur emplois indigènes. Paris : Challamel, 1903 ; 372p.
- 20- HELLER R., ESNAULT R., LANCE C. Physiologie végétale : développement, 5^e éd. Paris : Masson, 1995 ; 315p.
- 21- HEMINGWAY R. W., KARCHESY J.J. Chemistry and significance of condensed tannins. New York : Plenum Press, 1989 ; 249-264.
- 22 – JAWETZ E., MELNICK J., ADELBERG E. A. Review of Medical Microbiology, 14th éd. California : Lange medical Publication, 1980 ; 593p.
- 23- JEANNODA V.L.R. Etude chimique, biologique et toxicologique du principe convulsivant des Connaracées de Madagascar. [Thèse de Doctorat d'Etat : Sciences]. Strasbourg : Université de Louis Pasteur de Strasbourg, 1986.
- 24- KAMOUN P. Appareils et méthodes en biochimie, 3e éd. Paris : Flammarion, 1991 ; 237p.

- 25- KLOOS H., McCULLOUGH F. S. Plants with Recognized mollucidal activity. In : Plants molluscicides edited by Kenneth E. M. New York : John Wiley and sons, 1987 ;45-109.
- 26- LARPENT J. P., LARPENT M., GOURGAN G. Mémento Technique de microbiologie, 3^e éd. Paris : TEC-DOC Lavoisier, 1997 ; 417p.
- 27- LEANDRI J. Les arbres et grands arbustes de Madagascar : Euphorbiacées. Académie Malgache, Tananarive ; 1958.
- 28- LEFEVRE J. G. Manuel de microbiologie, 1997 ; p153.
- 29- LE -MINOR L., RICHARD C. Méthode de laboratoire pour l'identification des Enterobacteriaceae. Paris : Institut Pasteur, 1993.
- 30- LUSSIER G. Histologie et Histochimie. In : Pierre P., Michel T. Manuel de techniques virologiques. Québec : Université francophone UEREF, 1989 ; 57-60 (chap9).
- 31- MAHUZIER G., HAMON H. Abrégé de chimie analytique : méthode de séparation, 2^e éd. Paris : Masson, 1990 ; 2; 262p.
- 32- MARCHAL N., BOURDON J. L., RICHARD C. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries, 3^e éd. Paris : Doin éditeur, 1987.
- 33- MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DU DÉVELOPPEMENT RURAL, Plan d'action environnemental. Inventaire écologique et forestier national, recueil botanique de 200 espèces forestières. Direction de Eaux et Forêt, Deutsche Forest service, Entreprise d'étude de développement Mamokatra, Foiben-taontsarintanin'i Madagasikara ; 239p, 1996.
- 34- MUELLER J. H., HINTON J. Milieux de culture. Pro. Soc. Exp. Biol. Med., 1941; 48; 330-339.
- 35- OLSNES S., PIHL A. Abrin, ricin and their associated agglutinins. In : The specificity and actions of animal, bacterial, and plant toxins (Receptors and recognition series B, 1). London: Cuatrecasas P., Chapman and Hall,1977; 129-173.
- 36- PERNET R. Les plantes médicinales malgaches (suite de notes analytiques). Mém. Inst. Sc. Madagascar, 1959 ; 2; 217-303.

- 37- PERNET R., MEYER G. Pharmacopée de Madagascar. Inst. Recherche Scient. de Tananarive, 1957 ; 42-67.
- 38- RAJEMIARIMOELISOA C. F. Isolement, caractérisation chimique et biologique du principe actif de *Albizia odorata* (Mimosoidae - Fabaceae). [Thèse de Doctorat de 3^e cycle : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2000.
- 39- RAJAONARIVONY J. I. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes toxiques de *Aleurites fordii* (Euphorbiaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1996.
- 40- RAKOTONDRAZANAKA L. Isolement caractérisation chimique et biologique du principe toxique de *Odosicyos boseri* (Cucurbitaceae). [Thèse de Doctorat : Sciences]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003.
- 41- RAKOTO-RANOROMALALA D.A.D. Purification et étude des propriétés physico-chimiques et biologiques des principes toxiques de *Tachiadenus longiflorus* (Gentianaceae). [Thèse de Doctorat de 3^e cycle : Biochimie-Pharmacodynamie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1989.
- 42- RALISON C. Isolement et étude biochimique, toxicologique et biologique de la monguine, principe toxique de *Croton mongue* une Euphorbiaceae malgache. [Thèse de Doctorat d'Etat : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1987.
- 43- RAMADE E. Ecotoxicologie. Paris : Masson, 1979 ; 228p.
- 44- RAMAMONJISON E. Contribution à l'étude chimique et biologique du principe toxique de graines d'*Albizia species* (Mimosiodae-Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1988.
- 45- RANERATH K. Chromatographie sur couche mince. Paris : GAUTHIER-VILLARS, 1964 ; 296p.
- 46- RANDRIA J. N. Contribution à l'étude pharmacologique et toxicologique de *Euphorbia orthoclada* (Euphorbiaceae). [Mémoire de DEA : Chimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1996.

- 47- RANDRIANARIVO H. R. Purification et caractérisation partielle des principes actifs de *Albizia arenicola* (Mimosiodae-Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1996.
- 48- RAZANAMPARANY L. Purification et étude des propriétés physico-chimiques et biologiques de la bolaffinine, toxine protéique extraite de *Boletus affinis* Peck (Boletaceae) [Thèse de Doctorat d'Etat : Sciences]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1987.
- 49- REED L. J., MUENCH H. A simple method of estimating fifty per cent ends points. Am. J. Hyg., 27, 1938 ; 493p.
- 50- ROBINEAU L., WENIGER B. Recherche scientifique et usage populaire des plantes médicinales dans la caraïbe, 2^e éd. Santo-Domingo : Seminaire TRAMILL 2, 1988.
- 51- SCHAECHTER M., SCHLESSINGER D. Les toxines bactériennes. In : Schaechter, Medoff, Eisenstein. Microbiologie et pathologie infectieuse, 2^e éd. Paris : De boeck Université & Larcier s.a., 1999 ; 163-165.
- 52- SINGLETON P. Bactériologie, 2^e éd. Paris : Masson, 1994 ; 247p.
- 53- STIRPE F., PESSION BRIZZI A., LORENZONI E., STROCCI P., MONTANARO L., SPERTI S. Studies on the proteins from seeds of *Croton tiglium* and *Jatropha curcas*, toxic properties and inhibition of protein synthesis in vitro. Biochem. J. 156 , 1976; 1-6.
- 54- TALBOT P. J. Technique d'injection des animaux. In : Pierre P., Michel T. Manuel de technique virologique. Quebec : Université francophone UEREF, 1989 ; 75 - 60. (chap5).
- 55- TERRAC M. L. Contribution à l'étude des plantes médicinales de Madagascar. Antananarivo : ORSTOM, 1971.
- 56- TESSIER A. M., PARIS R.R., BOUQUET A. Sur quelques Euphorbiacées toxiques africaines. Plantes médicinales et phytothérapie, 1975 ; 238-249.(T10).
- 57- VERNE J. Précis d'histologie, 5^e éd. Paris : Masson et C^{ie} éditeurs, 1960 ; 685p.

ANNEXES

ANNEXES

ANNEXE I

Composition chimique des réactifs :

- Réactif de MAYER

Chlorure de mercure.....1,36g
Iodure de potassium.....5g
Eau distillée.....qsp 100ml

- Réactif de DRAGENDORFF

Il s'agit de d'un mélange de volume à volume de deux solutions A et B.

- Solution A :

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

- Solution B :

- Iodure de potassium10g
- Eau distillée.....40ml

Le mélange est ensuite additionné de 10g d'acide tartrique et d'eau distillée, qsp 100ml.

- Réactif de WAGNER

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

ANNEXE II

Composition du liquide de BOUIN :

- Acide picrique.....75ml
- Formol à 40%.....20ml
- Acide acétique glacial.....5ml

Composition de la solution de PBS

- Chlorure de sodium.....7,650 g
- Phosphate dissodique.....0,724 g
- Phosphate monopotassique.....0,210 g

- Eau distillée.....qsp 11

ANNEXE III

Composition de milieux de culture microbienne :

- Milieux d'isolement et de purification :

Le bouillon nutritif

Composition en g/l :

Peptone bactériologique.....	5
Extrait de viande.....	3
Extrait de levure.....	4
Glucose.....	5
Eau distillée.....	qsp 11

La gélose ordinaire

Composition en g/l

Peptone.....	5
Extrait de viande.....	1
Chlorure de sodium.....	5
Extrait de levure.....	2
Agar.....	15
Eau distillée.....	qsp 11

pH égal à 7,4

- Milieux d'identification et de caractérisation biochimique

-Milieu de SIMMONS

Composition en g/l

Sulfate de magnésium.....	0,2
Phosphate mono ammoniacque.....	1
Phosphate dipotassique.....	1
Citrate de sodium.....	2
Chlorure de sodium.....	5
Bleu de bromothimol.....	0,08
Agar.....	15

Eau distillée.....qsp 11

pH =7,1

- Milieu mannitol-mobilité

Composition en g/l

Hydrolysate trypsique de caséine.....10

Nitrate de potassium.....1

Mannitol.....7,5

Rouge de phénol à 1%.....0,04

Agar3,5

Eau distillée.....qsp 11

pH=7,6

- Milieu HAJNA-KLIGLER

Composition en g/l

Extrait de viande de bœuf.....3

Extrait de levure.....3

Peptone15

Peptone pepsique de viande.....5

Lactose.....10

Glucose.....1

Sulfate ferreux2

Chlorure de sodium.....5

Thiosulfate de sodium.....0,3

Rouge de phénol.....0,024

Eau distillée.....qsp11

pH= 7,5

- Milieu lysine-fer

Composition en g/l

Peptone bactériologique.....5

Extrait de levure.....3

Glucose.....1

L. lysine.....10

Citrate de fer ammoniacal.....0,5

Thiosulfate de sodium.....	0,04
Pourpre de bromothymol	0,02
Gélose.....	15
Eau distillée.....	11

pH = 6,7± 0,2

- Milieu urée-indole

Composition en g/l

L. tryptophane.....	0,3
KH ₂ PO ₄	0,1
K ₂ HPO ₄	0,1
NaCL.....	0,5
Alcool à 90°	1ml
Rouge de phénol à 1%.....	0,25
Eau distillée.....	100ml

- Milieu d'antibiogramme

Composition en g/l

Infusion de 300g de viande de bœuf(déshydraté)	
Hydrolysât acide de caséine.....	17,5
Amidon de maïs.....	1,5
Agar.....	10

pH=7,4