

# TABLE DES MATIERES

	Pages
Dédicaces	
Remerciements	
Table des matières.....	i
Abréviations et acronymes.....	vii
Glossaire.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des tableaux.....	x
INTRODUCTION GENERALE.....	1
<b>GENERALITES SUR LES IGNAMES</b>	
1. Généralités sur <i>Dioscorea esculenta</i> .....	5
2. Description botanique.....	5
2.1. Description du genre <i>Dioscorea</i> .....	5
2.2. Description de <i>Dioscorea esculenta</i> .....	6
3. Utilisations des ignames.....	6
3.1. Utilisations alimentaires des ignames.....	6
3.2. Utilisations thérapeutiques des ignames.....	6
3.3. Utilisations des ignames toxiques.....	7
4. Etudes approfondies sur les alcaloïdes de <i>Dioscorea</i> .....	9
4.1. Etude chimique.....	9
4.2. Etude biologique.....	10
<b>ETUDE CHIMIQUE</b>	
1. INTRODUCTION.....	11
2. MATERIELS ET METHODES.....	11
2.1. MATERIELS.....	11
2.1.1. MATERIEL VEGETAL.....	11
2.1.1.1. Classification.....	11
2.1.1.2. Répartition géographique.....	12
2.1.1.3. Date et lieu de récolte.....	12
2.1.2. PRODUITS CHIMIQUES.....	12
2.2. METHODES.....	12

	Pages
2.2.1. PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL.....	12
2.2.2. METHODE D'EXTRACTION.....	12
2.2.2.1. Méthodes d'extraction à froid.....	15
2.2.2.1.1. Extraction en milieu alcalin.....	15
2.2.2.1.1.1. Principe.....	15
2.2.2.1.1.2. Mode opératoire .....	15
2.2.2.1.2. Extraction en milieu acide.....	15
2.2.2.1.2.1. Principe.....	15
2.2.2.1.2.2. Mode opératoire.....	16
2.2.2.2. Méthodes d'extraction à chaud.....	16
2.2.2.2.1. Extraction méthanolique à reflux.....	16
2.2.2.2.1.1. Principe.....	16
2.2.2.2.1.2. Mode opératoire.....	16
2.2.2.2.2. Extraction méthanolique au soxhlet.....	17
2.2.2.2.2.1. Principe.....	17
2.2.2.2.2.2. Mode opératoire .....	17
2.2.3. METHODES DE PURIFICATION.....	17
2.2.3.1. Traitement par le mélange acétone/diéthyléther.....	17
2.2.3.1.1. Principe.....	17
2.2.3.1.2. Mode opératoire.....	17
2.2.3.2. Fractionnement par le chloroforme.....	18
2.2.3.2.1. Principe.....	18
2.2.3.2.2. Mode opératoire.....	18
2.2.3.2.2.1. Alcalinisation.....	18
2.2.3.2.2.2. Décantation.....	18
2.2.3.3. Traitement par l'acétate d'éthyle.....	19
2.2.3.3.1. Principe.....	19
2.2.3.3.2. Mode opératoire.....	19
2.2.4. METHODE DE CONCENTRATION.....	19
2.2.5. METHODE DE DETERMINATION DE LA TENEUR EN MATIERE SECHE.....	20
2.2.6. METHODE DE CALCUL DE RENDEMENT.....	20
2.2.7. METHODES ANALYTIQUES.....	21

	Pages
2.2.7.1. Réactions de détection des alcaloïdes.....	21
2.2.7.1.1. Test préliminaire.....	21
2.2.7.1.2. Test de confirmation.....	21
2.2.7.1.3. Test de détection des alcaloïdes dans les extraits.....	22
2.2.7.2. Chromatographie sur couche mince.....	22
2.2.7.2.1. Principe.....	22
2.2.7.2.2. Mode opératoire.....	22
2.2.7.2.2.1. Préparation de la plaque.....	22
2.2.7.2.2.2. Dépôt des échantillons.....	22
2.2.7.2.2.3. Développement du chromatogramme.....	23
2.2.7.2.2.4. Révélation du chromatogramme.....	23
3. RESULTATS.....	23
3.1. TENEUR EN MATIERE SECHE.....	23
3.2. PREPARATION DE L'EXTRAIT BRUT.....	24
3.3. PURIFICATION.....	25
3.3.1. PRECIPITATION PAR LE MELANGE ACETONE/DIETHYLETHER.....	25
3.3.2. FRACTIONNEMENT PAR LE CHLOROFORME.....	25
3.3.3. TRAITEMENT PAR L'ACETATE D'ETHYLE.....	27
3.4. RENDEMENT.....	27
3.5. ETUDE DE L'HOMOGENEITE DES DIFFERENTS EXTRAITS.....	29
3.6. NATURE CHIMIQUE ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES.....	30
4. DISCUSSION ET CONCLUSION.....	30
<b>ETUDE BIOLOGIQUE</b>	
1. INTRODUCTION.....	32
2. MATERIELS ET METHODES.....	32
2.1. MATERIELS.....	32
2.1.1. LES ANIMAUX D'EXPERIMENTATION.....	32
2.1.1.1. Les souris.....	32
2.1.1.2. Le sang de mouton.....	32
2.1.1.3. Les larves de moustique.....	33
2.1.1.4. Les têtards de grenouille.....	33
2.1.1.5. Les poissons.....	33
2.1.2. LES PLANTES D'EXPERIMENTATION.....	33

	Pages
2.1.3. LES MICRO-ORGANISMES UTILISES.....	34
2.1.4. LES MILIEUX DE CULTURE.....	34
2.1.4. 1. Les milieux d'enrichissement.....	34
2.1.4.1.1. Le bouillon nutritif .....	34
2.1.4.1.2. La gélose nutritive.....	34
2.1.4.2. Les milieux d'isolement et de purification des germes.....	34
2.1.4.2.1. Le milieu Salmonella-Shigella (SS).....	34
2.1.4.2.2. Le milieu Hektoen.....	34
2.1.4.2.3. Le milieu « Brillant Green Agar » (BGA) ou vert brillant.....	34
2.1.4.2.4. Le milieu « Eosine Methylene Blue » (EMB).....	35
2.1.4.2.5. La gélose au sang.....	35
2.1.4.3. Les milieux de détermination des caractères biochimiques des bactéries.....	35
2.1.4.3.1. Le milieu citrate de SIMMONS.....	35
2.1.4.3.2. Le milieu HAJNA-KLIGLER : lactose-glucose-H <sub>2</sub> S.....	36
2.1.4.3.3. Le milieu mannitol-mobilité.....	36
2.1.4.3.4. Le milieu urée-indole.....	36
2.1.4.3.5. La lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et l'arginine dihydrolase (ADH).....	36
2.1.4.3.6. Les disques.....	36
2.1.4.3.6.1. Les disques à ortho-nitro-phényl β D-galactopyranoside (ONPG)...	36
2.1.4.3.6.2. Les disques pour le test de l'oxydase.....	36
2.1.4.4. Le milieu d'étude d'activité antibactérienne.....	36
2.2. METHODES.....	37
2.2.1. METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG CHAUD.....	37
2.2.1.1. Tests sur souris.....	37
2.2.1.1.1. Estimation de la toxicité.....	37
2.2.1.1.2. Examen histopathologique.....	37
2.2.1.1.2.2. Prélèvement et fixation des organes.....	37
2.2.1.1.2.1. Inclusion.....	37
2.2.1.1.2.2. Microtomie, circulation et étalement des coupes.....	38
2.2.1.1.2.3. Coloration et observation des coupes.....	38
2.2.1.2. Tests sur les hématies demouton.....	38

	Pages
2.2.1.2.1. Principe.....	38
2.2.1.2.2. Mode opératoire.....	39
2.2.1.2.2.1. Prélèvement et préparation des hématies.....	39
2.2.1.2.2.2. Test hémolytique.....	39
2.2.2. METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG FROID.....	40
2.2.2.1. Mode opératoire.....	40
2.2.2.2. Détermination de la CL50 (24h).....	40
2.2.3. METHODE D'ETUDE DES EFFETS SUR LES VEGETAUX.....	41
2.2.3.1. Etude des effets sur le pouvoir germinatif des graines.....	41
2.2.3.2. Etude de la croissance de jeunes plantules.....	41
2.2.3.3. Etude de la croissance des bourgeons axillaires.....	42
2.2.4. METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES MICRO-ORGANISMES.....	42
2.2.4.1. Préparation des souches.....	42
2.2.4.1.1. Prélèvement des germes.....	42
2.2.4.1.2. Observation à l'état frais.....	43
2.2.4.1.3. Enrichissement des germes.....	43
2.2.4.1.4. Isolement et purification.....	43
2.2.4.1.5. Réactivation des souches.....	43
2.2.4.2. Identification et caractérisation des souches.....	44
2.2.4.2.1. Méthode de coloration de GRAM.....	44
2.2.4.2.2. Détermination des caractères biochimiques.....	44
2.2.4.2.2.1. Culture sur le milieu citrate de SIMMONS.....	44
2.2.4.2.2.2. Culture sur le milieu HAJNA-KLIGLER : lactose-glucose - H <sub>2</sub> S.....	44
2.2.4.2.2.3. Culture sur le mannitol-mobilité.....	45
2.2.4.2.2.4. Culture sur le milieu urée-indole.....	45
2.2.4.2.2.5. Culture sur milieux LDC, ODC et ADH.....	45
2.2.4.2.2.6. Test à l'ONPG.....	45
2.2.4.2.2.7. Test de l'oxydase.....	46
2.2.4.3. Méthodes de détermination des effets sur les bactéries.....	47

	Pages
2.2.4.3.1. Méthodes en milieu liquide.....	47
2.2.4.3.1.1. Principe.....	47
2.2.4.3.1.2. Mode opératoire.....	47
2.2.4.3.2. Méthode en milieu solide.....	48
2.2.4.3.2.1. Principe.....	48
2.2.4.3.2.2. Mode opératoire.....	48
2.2.4.3.2.2.1. Préparation de l'inoculum et ensemencement.....	48
2.2.4.3.2.2.2. Dépôt d'extrait.....	48
3. RESULTATS.....	49
3.1. EFFETS SUR LES ANIMAUX.....	49
3.1.1. EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG CHAUD.....	49
3.1.1.1 Effets sur les souris.....	49
3.1.1.1.1. Influence des différentes voies d'administration.....	49
3.1.1.1.2. Description des symptômes.....	50
3.1.1.1.3. Examen histopathologique.....	50
3.1.1.2. Effets sur les hématies de mouton.....	50
3.1.2. EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG FROID.....	57
3.1.2.1. Effets sur les larves de moustique.....	57
3.1.2.2. Effets sur les têtards de grenouille.....	58
3.1.2.3. Effets sur les poissons.....	58
3.2. EFFETS DE L'EXTRAIT SUR LES VEGETAUX .....	59
3.2.1. EFFETS SUR LE POUVOIR GERMINATIF DES GRAINES.....	59
3.2.2. EFFETS SUR LA CROISSANCE DE JEUNES PLANTULES.....	60
3.2.3. EFFETS SUR LA CROISSANCE DES BOURGEONS AXILLAIRES.....	64
3.3. EFFETS SUR LES MICRO-ORGANISMES.....	65
3.3.1. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES GERMES.....	65
3.3.2. SPECTRE D'ACTIVITE MICROBIENNE.....	66
3.3.2.1. Activité en milieu liquide.....	66
3.3.2.2. Activité en milieu solide.....	66
4. DISCUSSION ET CONCLUSION.....	68
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	70
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	71
ANNEXES.....	79

**ADH** : Arginine Dihydrolase

**BAE** : n-Butanol / Acide acétique / Eau distillée

**CCM** : Chromatographie sur Couche Mince

**CHU-JRA** : Centre Hospitalier Universitaire Joseph Ravoahangy Andrianavalona

**CL50** : Concentration Létale 50%

**DDT** : Trichloro 1-1-1-bis (p-chlorophényl) 2-2-éthane

**EB** : Extrait Brut

**FOFIFA** : Foibem-pirenena momba ny Fikarohana ampiharina ho amin'ny Fampandrosoana  
ny eny Ambanivohitra

**IMVAVET** : Institut Malgache des Vaccins Vétérinaires

**ip** : intra péritonéale

**IPM** : Institut Pasteur de Madagascar

**LDC** : Lysine Décarboxylase

**LABASM** : Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales

**MPE** : Maison de Petit Elevage

**min** : minute

**N** : Normal

**nm** : nanomètre

**ODC** : Ornithine Décarboxylase

**ONPG** : Ortho-Nitro-Phényl  $\beta$  D-Galactopyranoside

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PBS** : Phosphate Buffered Saline

**p/p** : poids par poids

**p/p/p/** : poids par poids par poids

**p/v** : poids par volume

**qsp** : quantité suffisante pour

**UV** : Ultra-violet

**v/v** : volume par volume

# GLOSSAIRE

<b>Analgésie</b>	: diminution de la sensation douloureuse ne s'accompagnant pas de perte de conscience
<b>Anesthésie</b>	: diminution de la sensation douloureuse avec ou sans perte de conscience
<b>Antibiotique</b>	: substance capable d'empêcher le développement des micro-organismes
<b>Ataxie</b>	: incoordination des mouvements volontaires
<b>Barrière hémato-encéphalique</b>	: obstacle formé par les jonctions serrées de l'endothélium vasculaire et l'espace extracellulaire cérébral étroit
<b>Cardiotonique</b>	: substance qui augmente l'efficacité de la contraction cardiaque
<b>Hémolyse</b>	: destruction des globules rouges
<b>Hyperpnée</b>	: accélération de la fréquence respiratoire
<b>Hypoactivité motrice</b>	: réduction de la fréquence des mouvements
<b>Hypotension</b>	: diminution de la tension sanguine
<b>Mydriase</b>	: dilatation de la pupille
<b>Piloérection</b>	: érection des poils
<b>Récepteur</b>	: protéine périphérique membranaire recevant un signal
<b>Résistance périphérique</b>	: pression appliquée par les vaisseaux sanguins à l'extérieur du cœur
<b>Vasoconstriction</b>	: réduction du calibre des vaisseaux sanguins

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : <i>Dioscorea esculenta</i> :1) feuilles 2) tubercules.....	13
<b>Figure 2</b> : Répartition géographique de <i>Dioscorea esculenta</i> .....	14
<b>Figure 3</b> : Schéma récapitulatif de l'extraction et des différentes étapes de la purification des alcaloïdes à partir de la poudre de tubercules secs.....	28
<b>Figure 4</b> : Chromatographie sur couche mince des extraits a) plaque non pulvérisée b) plaque pulvérisée 1) extrait brut 2) extrait brut 3) extrait E1 4) extrait E2.....	29
<b>Figure 5</b> : Lésions histologiques au niveau de l'estomac dues à l'administration par voie ip de l'extrait à la dose de 840mg/kg de poids a) estomac non traité b) estomac traité.....	51
<b>Figure 6</b> : Lésions histologiques au niveau du foie dues à l'administration par voie ip de l'extrait à la dose de 840mg/kg de poids c) foie non traité d) foie traité.....	52
<b>Figure 7</b> : Lésions histologiques au niveau de l'intestin dues à l'administration par voie ip de l'extrait à la dose de 840mg/kg de poids e) intestin non traité f) intestin traité.....	53
<b>Figure 8</b> : Lésions histologiques au niveau des reins dues à l'administration par voie ip de l'extrait à la dose de 840mg/kg de poids g) rein non traité h) rein traité.....	54
<b>Figure 9</b> : Lésions histologiques au niveau des poumons dues à l'administration par voie ip de l'extrait à la dose de 840mg/kg de poids i) poumon non traité j) poumon traité.....	55
<b>Figure 10</b> : Résultats des tests hémolytiques sur le sang de mouton.....	56
<b>Figure 11</b> : Etapes de l'expérience sur la croissance de jeunes plantules.....	60
<b>Figure 12</b> : Evolution de la longueur de l'épicotyle (A) et de l'hypocotyle (B) de petit pois en présence des différentes concentrations de l'extrait.....	61
<b>Figure 13</b> : Evolution de la longueur de l'épicotyle (C) et de l'hypocotyle (D) de maïs en présence des différentes concentrations de l'extrait.....	62
<b>Figure 14</b> : Effets de l'extrait (28µg) sur la croissance des bourgeons axillaires en comparaison avec ceux de la gibbérelline (28µg), de l'auxine (28µg) et de l'eau de pluie EP (témoin).....	64

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Indications thérapeutiques de quelques espèces de <i>Dioscorea</i> .....	7
<b>Tableau 2</b> : Quelques principes actifs de <i>Dioscorea</i> et leurs propriétés pharmacologiques....	8
<b>Tableau 3</b> : Quelques utilisations des ignames toxiques.....	8
<b>Tableau 4</b> : Norme utilisée pour exprimer les résultats des tests des alcaloïdes.....	21
<b>Tableau 5</b> : Résultats des différents types d'extraction.....	24
<b>Tableau 6</b> : Caractéristiques des extraits obtenus par traitement par le chloroforme en fonction du type d'extrait brut.....	26
<b>Tableau 7</b> : Graines utilisées pour les expériences sur les végétaux.....	33
<b>Tableau 8</b> : Composition des milieux utilisés pour le test hémolytique.....	35
<b>Tableau 9</b> : Milieux spécifiques servant à isoler les différents germes.....	40
<b>Tableau 10</b> : Tableau récapitulatif des différents tests d'identification.....	46
<b>Tableau 11</b> : Liste des antibiotiques utilisés et leurs germes-cibles.....	48
<b>Tableau 12</b> : Normes utilisées dans l'expression des résultats.....	49
<b>Tableau 13</b> : Influence des voies d'administration.....	49
<b>Tableau 14</b> : Principales lésions histologiques provoquées par la dose de 840 mg/kg d'extrait administré par voie ip.....	50
<b>Tableau 15</b> : Résultats des tests hémolytiques des extraits E1 et E2.....	56
<b>Tableau 16</b> : Résultats des tests sur les larves de moustique.....	57
<b>Tableau 17</b> : Résultats des tests sur les têtards de grenouille.....	58
<b>Tableau 18</b> : Résultats des tests sur les poissons.....	58
<b>Tableau 19</b> : Effet de l'extrait à 1mg/kg sur le pouvoir germinatif de graines.....	59
<b>Tableau 20</b> : Taux d'inhibition de la croissance de l'épicotyle et de l'hypocotyle de petit pois et de maïs au 14 <sup>ème</sup> jour de l'expérience.....	63
<b>Tableau 21</b> : Résultats de l'identification et de la caractérisation des souches.....	65
<b>Tableau 22</b> : Composition des milieux utilisés pour le test d'activité antimicrobienne et résultats.....	66
<b>Tableau 23</b> : Résultats du test d'activité antimicrobienne en milieu solide.....	67
<b>Tableau 24</b> : Liste des antibiotiques utilisés avec leurs quantités respectives et leurs germes-cibles.....	67

A decorative red border shaped like a scroll, with a vertical strip on the left side and a small circular element at the top right corner.

**INTRODUCTION  
GENERALE**



Les toxines sont des substances d'origine naturelle capables de troubler ou d'interrompre les fonctions vitales d'un organisme auquel elles ont été administrées volontairement ou accidentellement. Ces toxines peuvent provenir d'animaux, de végétaux ou d'organismes microbiens (RICHARD et coll., 1997). L'intoxication pourrait être due à la morsure ou à la piqûre d'animaux, ou encore à la consommation d'aliments ou d'organismes toxiques (CALNEK, 1997).

La connaissance et l'exploitation des toxines remontent à des temps très anciens. L'homme, bien que conscient des dangers que représentent les substances toxiques, a toujours su tirer profit des propriétés des organismes toxiques. En effet, il les utilise pour la pêche, la chasse, la lutte contre les animaux nuisibles, pour rendre la justice, pour se soigner ou pour empoisonner son prochain.

Avec le développement de nombreuses disciplines scientifiques : la physique, la chimie, la physiologie, la pharmacologie, la médecine et la biochimie, la toxicologie, qui est la science des poisons, a connu un grand essor. La recherche sur les toxines a abouti à l'isolement de plusieurs molécules actives de nature chimique variée (alcaloïde, acide aminé, protéine, stéroïde, ...) et possédant différentes propriétés biologiques (neurotoxique, cardiotonique, antibiotique, ichtyotoxique,...). Les toxines ainsi obtenues peuvent être utilisées comme outils dans la compréhension de processus biologiques ou dans la thérapeutique de certaines maladies. Ainsi, pour les toxines d'origine animale on peut citer (HABERMEHL, 1981) :

- la phosphodiesterase découverte dans le venin de serpent *Naja naja* ou Cobra (Elapidae) qui a été utilisée pour élucider la biosynthèse des acides nucléiques ;
- la toxine du venin de scorpion, un peptide de 61 acides aminés provoquant une douleur sévère qui aide à la connaissance des analgésiques ;

Les toxines peuvent aussi provenir de végétaux. A titre d'illustration, on peut citer :

- la colchicine, un alcaloïde des graines et des bulbes de *Colchicum autumnale* (crocus d'automne), un antiméiotique (cytostatique) qui est utilisé comme anticancéreux (LESNE, 1982) ;
- la digitoxine de *Digitalis purpurea* (Scrophulariaceae), un stéroïde qui accroît la contractilité du muscle cardiaque et augmente l'efficacité cardiaque (MOORE et STAUB, 1975) ;
- l'abrine de *Abrus precatorius* (Papilionaceae) et la ricine de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) (CUATRECASAS, 1977) qui sont des protéines provoquant l'inhibition de

la biosynthèse des protéines et dont le mécanisme d'action a permis de comprendre la régulation de cette biosynthèse.

Les végétaux constituent donc une source importante de toxines. C'est pour cela que le laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales a orienté ses travaux vers l'isolement et la caractérisation de principes toxiques de plantes. Beaucoup de toxines ont été isolées dans ce laboratoire. A titre d'illustration, on peut citer :

- la cnestine, un acide aminé trouvé dans *Cnestis glabra*, *Cnestis polyphylla* (JEANNODA, 1986) et *Rourea orientalis* (RAKOTO-RANOROMALALA, 1984) de la famille de Connaraceae qui est une substance convulsivante ;
- l'eupholarine, un ichtyotoxique isolé de *Euphorbia laro* de la famille de Euphorbiaceae (RAHERINIAINA, 2004) ;
- l'arénicoline, un saponoside toxique isolé de *Albizia arenicola* (Mimosoïdeae-Fabaceae) qui a des propriétés bactéricides (RANDRIANARIVO, 2003).

De nombreuses plantes ont également donné lieu à des travaux approfondis :

- *Rourea orientalis*.....: Connaraceae (RAKOTO-RANOROMALALA, 1984)
- *Cnestis glabra*, *Cnestis polyphylla*.....: Connaraceae (JEANNODA, 1986)
- *Croton mongue*.....: Euphorbiaceae (RALISON, 1987)
- *Boletus affinis* Peck..... : Boletaceae (RAZANAMPARANY, 1987)
- *Tachadenus longiflorus*..... : Gentianaceae (RAKOTO-RANOROMALALA, 1989)
- *Albizia arenicola*..... : Mimosoïdeae-Fabaceae (RANDRIANARIVO, 1996)
- *Pentatropis madagascariensis*..... : Asclepiadaceae (HARINJATOVO, 2001)
- *Henonia scoparia*..... : Amaranthaceae (RAMAHAFALY, 2004)
- *Albizia tulearensis*..... : Mimosoïdeae-Fabaceae (RAONIHARISOA, 2003)
- *Ocotea madagascariensis*..... : Lauraceae (RANDRIAMAHAVALISOA, 2003)
- *Uapaca thouarsii*..... : Euphorbiaceae (RANDRIANANDRASANA, 2004)
- *Physena madagascariensis*..... : Physenaceae (ANDRIANJAKANIRINA, 2004).

De nombreux principes toxiques sont des alcaloïdes c'est-à-dire des bases azotées à activités complexes (FOUILLOUZE, 1951). Des études approfondies ont permis de connaître leurs propriétés toxicologiques. Ainsi, par exemple :

- la nicotine de *Nicotiana sp* (Solanaceae) qui provoque des tremblements, des convulsions et des paralysies respiratoires (BRUNETON, 1987),
- la pyrrolizidine de *Crotalaria sp* (Leguminosae) et de *Senecio jacobea* (Compositae), et la crotaline de *Crotalaria sp* (Leguminosae) qui provoquent des nécroses hépatiques (RICHARD et coll., 1997).

D'autres alcaloïdes présentent des propriétés pharmacologiques intéressantes :

- la vincristine, la vinblastine, la vindésine et la vinorelbine sont des alcaloïdes de la pervenche entrant dans la composition des médicaments anticancéreux ;
- la colchicine extraite de *Colchicum autumnale* (Liliaceae) (EIGSTI et coll., 1995) est utilisée comme anti-inflammatoire spécifique de la goutte (LESNE, 1982 ; MOUTCHEN, 1979) et constitue un antimétabolite (COHEN et coll., 1979) ;
- la morphine extraite de *Papaver somniferum* (Papaveraceae) est utilisée comme analgésique (LADURON, 1978) ;
- l'atropine isolée de *Atropa belladonna* (Solanaceae) est un cardiotonique ;
- la cocaïne de *Erythroxylum coca* Lam (cocaier) (Erythroxylaceae) est utilisée comme anesthésique local (BRUNETON, 1987).

Dans le cadre d'un projet financé par le FADES ou Fonds d'Appui pour le Développement de l'Enseignement Supérieur, le laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales travaille sur les plantes de genre *Dioscorea* ou ignames. Les activités de ce projet consistent entre autres en l'étude des valeurs nutritionnelles ainsi que des propriétés médicinales et toxicologiques des ignames. En effet, à Madagascar, les ignames sont encore mal connues et peu exploitées. Elles sont surtout consommées pendant la période de soudure. Or, outre l'utilisation alimentaire des ignames, ces dernières possèdent aussi des vertus pharmacologiques (GRINDLEY et coll., 2002) (voir généralités sur les ignames).

Pour notre part, nous avons choisi de travailler sur les tubercules de *Dioscorea esculenta* (Dioscoreaceae) pour les différentes raisons suivantes :

- cette plante introduite à Madagascar n'a pas encore fait l'objet d'études approfondies autres que botaniques ;
- sa toxicité n'a pas été rapportée dans la littérature, et ses tubercules sont comestibles et très appréciés sur la Côte Est de Madagascar ;
- d'après les tests préliminaires réalisés dans le laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales, elle contient deux principales familles chimiques : les alcaloïdes et les saponosides.

Nos travaux portent sur l'étude des alcaloïdes. Ils comprennent :

- la mise en évidence de la présence d'alcaloïdes dans les tubercules de *Dioscorea esculenta*,
- la purification des alcaloïdes,
- l'étude des propriétés physico-chimiques et toxicologiques de l'extrait purifié.

Les travaux sont présentés en trois parties : la première partie est consacrée aux généralités sur les ignames, la deuxième partie montre l'étude chimique du principe actif et la troisième partie présente l'étude des propriétés biologiques.

A red double-line border that resembles a scroll, with small circular details at the corners and ends, framing the text.

# **GENERALITES SUR LES IGNAME**



Les ignames sont encore mal connues et peu exploitées à Madagascar. Pourtant dans de nombreuses régions du monde, notamment en Afrique, en Asie et en Amérique, à part l'utilisation alimentaire, les ignames présentent de nombreuses autres utilisations : toxicologique, thérapeutique et chimique.

## **1. Généralités sur *Dioscorea esculenta* (Lour) (BURKILL, 1950)**

*Dioscorea esculenta* L. appartient à la famille des DIOSCOREACEAE (44<sup>ème</sup> famille) et comprend 600 espèces environ qui se trouvent dans des régions tropicales, subtropicales et (quelques-unes) tempérées.

*Dioscorea esculenta* L. est une espèce introduite à Madagascar. Cultivée jadis par les indigènes des Comores et de la côte orientale de Madagascar, culture maintenant délaissée, cette plante n'existe plus dans ces îles qu'à l'état de pieds sporadiques et rares aux alentours de quelques villages indigènes ; son introduction est bien moins ancienne que celle de *Dioscorea alata* mais néanmoins plus ancienne que celle du manioc, de la patate douce et du maïs. Cette espèce a été citée en 1802 par CHAPPELER. A l'Est de Madagascar, elle se trouve autour des villages entre Vatomandry et Mananjary ; elle vit aussi aux Comores et à Mayotte. Très répandue et très cultivée depuis l'antiquité, de l'Inde aux îles situées à l'Est de la Nouvelle Guinée, *Dioscorea esculenta* L. a été introduite ensuite en Malaisie Occidentale, puis au cours du XVI<sup>ème</sup> siècle sur les Côtes de l'Atlantique par les Portugais. Elle est aujourd'hui plus ou moins cultivée dans presque toutes les régions tropicales ou subtropicales ; mais plus rarement (jamais de façon extensive) en Afrique et en Amérique.

Le nom vernaculaire « MAVONDRO » (tankarana, betsimisaraka, taifasy et tanosy) qui signifie rassemblement en groupe est celui des *Dioscorea* qui ont tendance à former des peuplements, dont *Dioscorea esculenta* (Lour) Burkill.

## **2. Description botanique**

### **2.1. Description du genre *Dioscorea* (BURKILL, 1950)**

Le genre *Dioscorea* est représenté à Madagascar par 33 espèces dont 27 endémiques et 6 introduites, anciennement cultivées, mais actuellement plus ou moins naturalisées.

La plupart des tubercules de *Dioscorea* sont protégés par des racines singulières, à épines qui disparaissent chez certaines races cultivées. Les feuilles sont alternes et entières. Les fleurs

mâles sont solitaires, sessiles ou presque sessiles, en épis ascendants et assez rigides. Les fleurs femelles sont en épis récurvés. Les graines sont entourées d'une aile circulaire.

## **2.2. Description de *Dioscorea esculenta*** (BURKILL, 1950)

La corne est proche de la surface du sol, émettant selon les espèces 5 à 40 tubercules qui sont recouverts par des racines et des radicelles transformées en aiguillons, formant ainsi un appareil de défense et de protection. La tige est épineuse à la base et porte plus haut des aiguillons espacés. Les feuilles adultes sont alternes. Le limbe peut être aussi large que long (10x10cm) ou plus large que long (10x17cm), largement en forme de cœur à la base et longuement (1cm environ) acuminé au sommet. Il possède 9 à 15 nervures dont les externes sont bifurquées dans les auricules. Les fleurs sont isolées, subsessiles ou très courtement pédicellées, espacées de 2 à 6mm. La plante femelle fleurit souvent et fructifie rarement. Les graines sont entourées d'une aile circulaire.

## **3. Utilisations des ignames**

### **3.1. Utilisations alimentaires des ignames**

Les ignames tiennent une place importante dans l'alimentation dans certaines régions de Madagascar surtout en milieu rural. Elles sont utilisées comme aliment de substitution pendant la période de soudure. En effet, *Dioscorea sansibarensis* est utilisé dans l'alimentation humaine pendant la période de soudure dans la région de Port-Bergé, province de Mahajanga (RAZAFIMAHEFA, 1994); les tubercules de *Dioscorea fandra*, une espèce endémique de Madagascar sont consommés crus, grillés ou cuits pendant la période de soudure à Toliara (RATSILEFITRA, 1999).

En milieu urbain, les ignames servent traditionnellement d'aliment de complément. Les tubercules sont soit consommés à l'état frais comme *Dioscorea sosa*, *Dioscorea bemandry* et *Dioscorea fandra*, soit consommés en morceaux ou en tranches après une simple cuisson (RANDRIAMAMPIANINA, 2003).

### **3.2. Utilisations thérapeutiques des ignames**

Différentes espèces de *Dioscorea* sont traditionnellement utilisées à des fins thérapeutiques. Le *tableau 1* présente quelques indications thérapeutiques des différentes espèces de *Dioscorea*.

De nombreux principes actifs ont été par la suite isolés et identifiés. Le *tableau 2* présente quelques-unes de leurs propriétés pharmacologiques.

***Tableau 1*** : Indications thérapeutiques de quelques espèces de *Dioscorea* (AKE ASSI, 1998)

<b>Indications</b>	<b>Espèces</b>	<b>Mode d'emploi</b>
Piqûre d'insectes et morsure de serpent	<i>Dioscorea alata</i> (Côte d'Ivoire) <i>Dioscorea cayenensis</i> Lam.(Antilles) <i>Dioscorea multiflora</i> (Côte d'Ivoire)	Pâte de feuilles fraîches (application locale) Décocté de feuilles fraîches (application locale) Poudre de tubercules mélangée avec du piment (application locale)
Douleurs	<i>Dioscorea dumetorum</i> (Afrique Orientale) <i>Dioscorea smilacifolia</i> (Gabon) <i>Dioscorea cayenensis</i> Lam.(Antilles) <i>Dioscorea alata</i> (Afrique Centrale)	Tubercules (application locale) Fragment de tige macéré dans l'eau (sous forme de lavement pour la douleur pelvienne) Tubercules bouillis et réduits en purée (application locale) Feuilles fraîches (application locale)
Impuissance sexuelle	<i>Dioscorea bulbifera</i> (Guinée)	Bourgeons végétatifs (à ingérer)
Parasitose : -mycose cutanée -schistosomiase	<i>Dioscorea bulbifera</i> (Sénégal) <i>Dioscorea dumetorum</i> (Tanzanie)	Pommade de bulbilles mélangée avec de l'huile de palme (application locale) Tubercules (à ingérer)
Rhumatisme	<i>Dioscorea bulbifera</i> (Sénégal)	Pommade de bulbilles mélangée avec de l'huile de palme (application locale)
Epilepsie	<i>Dioscorea sansibarensis</i> (Tanzanie) <i>Dioscorea smilacifolia</i> (Côte d'Ivoire)	Décocté de racine (à ingérer) Extrait de 3 feuilles en friction sur les tempes du malade
Hémorroïde	<i>Dioscorea alata</i> (Côte d'Ivoire)	Pâte de feuilles et de racines (application locale)
Abcès	<i>Dioscorea bulbifera</i> (Madagascar)	Pâte de bulbilles (application locale)
Ulcère	<i>Dioscorea alata</i> (Inde) <i>Dioscorea ovinala</i> (Madagascar) <i>Dioscorea alata</i> (Madagascar)	Poudre de tubercules (à ingérer) Tubercules crus (à ingérer avant le repas)
Vermifuge	<i>Dioscorea seriflora</i> (Madagascar)	Tubercules cuits (à ingérer)
Brûlures	<i>Dioscorea alata</i> (Madagascar)	Pâte de tubercules (application locale)

### **3.3. Utilisations des ignames toxiques**

Certaines ignames sont des sources importantes de poisons exploités dans la vie courante. Le *tableau 3* montre les utilisations de principes toxiques des différentes espèces d'ignames.

**Tableau 2** : Quelques principes actifs de *Dioscorea* et leurs propriétés pharmacologiques (NEUWINGER, 1996)

Principe actif	Source	Propriété
Alcaloïdes : dioscorine, dihydrodioscorine et dioscorétine	Tubercules ( <i>Dioscorea sansibarensis</i> ) Bulbilles ( <i>Dioscorea bulbifera</i> ) Racines de tubercule et tubercules ( <i>Dioscorea dumetorum</i> )	Antimicrobienne contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> ; et anticancéreuse Hypoglycémiante
Polysaccharide	Bulbilles ( <i>Dioscorea bulbifera</i> )	Hypoglycémiante
Sapogénine et saponine : Diosgénine	Tubercules ( <i>Dioscorea esculenta</i> , <i>Dioscorea alata</i> ) Bulbilles ( <i>Dioscorea bulbifera</i> ) Racines de tubercule et tubercules ( <i>Dioscorea dumetorum</i> )	Antimicrobienne contre <i>Aspergillus niger</i> et <i>Streptomyces sp.</i> Hypoglycémiante Fabrication d'hormones synthétiques utilisées comme anti-inflammatoires, contraceptives

**Tableau 3** : Quelques utilisations des ignames toxiques (NEUWINGER, 1996)

Utilisations	Espèces	Parties utilisées
Poison de flèche	<i>Dioscorea dumetorum</i> (Afrique de l'Est) <i>Dioscorea bulbifera</i> (Afrique de l'Ouest et Centrale) <i>Dioscorea sansibarensis</i> (Kenya)	Racine de tubercule (à enduire) Décocté de bulbilles et de tubercules (à enduire) Racine de tubercule et bulbilles (à enduire)
Ingrédient pour les poisons de chasse	<i>Dioscorea quartiniiana</i> (Kenya) <i>Dioscorea sansibarensis</i> (Kenya) <i>Dioscorea smilacifolia</i> (Cameroun)	Racine de tubercule et tubercules (broyat mélangé avec d'autres poisons)
Poison de pêche	<i>Dioscorea bulbifera</i> (Afrique de l'Ouest et Centrale) <i>Dioscorea sansibarensis</i> (Afrique de l'Ouest et Centrale)	Tubercules (broyat dans l'étang ou rivière)
Appât pour tuer les bêtes et les oiseaux	<i>Dioscorea bulbifera</i> (Afrique de l'Ouest) <i>Dioscorea dumetorum</i> (Nigéria) <i>Dioscorea sansibarensis</i> (Kenya)	Racine de tubercule (donnée à manger) Racine de tubercule (donnée à manger) Poudre de tubercule et de bulbille mélangée avec celle du manioc (donnée à manger)
Homicide	<i>Dioscorea bulbifera</i> (Egypte) <i>Dioscorea dumetorum</i> (Côte d'Ivoire et Congo) <i>Dioscorea sansibarensis</i> (Tanzanie)	Tubercules et bulbilles (donnés à manger) Racine de tubercule et jus de tubercule (donnés à ingérer) Jus de tubercules et de bulbille (donnés à boire)
Poison d'épreuve	<i>Dioscorea sansibarensis</i> (Madagascar)	Tubercules (donnés à ingérer)

Au point de vue clinique, les toxines peuvent être des alcaloïdes, des saponines, des tanins, des glucosides...

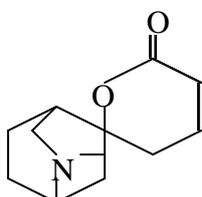
#### 4. Études approfondies sur les alcaloïdes de *Dioscorea* (COURSEY, 1967 ; NEUWINGER, 1996)

La plupart des espèces de *Dioscorea* africaines contiennent des alcaloïdes. Les alcaloïdes se trouvent en grande quantité dans les espèces : *Dioscorea dregeana*, *Dioscorea dumetorum* et *Dioscorea hispida*. Par contre, ils se présentent en petite quantité dans d'autres espèces telles que *Dioscorea histuda*, *Dioscorea aculeata* et *Dioscorea alata*.

##### 4.1. Etude chimique

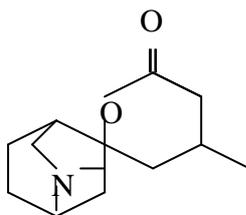
La méthode d'extraction hydroalcolique est utilisée pour extraire les alcaloïdes totaux de tubercules de *Dioscorea*. Les tubercules entiers pesant 500g sont laissés macérer dans 1litre d'éthanol à 40% à la température de la salle (27°C) pendant 3 jours. Pour *Dioscorea dumetorum* le rendement en alcaloïdes totaux est évalué à 6,2%.

Les alcaloïdes extraits de tubercules de *Dioscorea*, dont notamment *Dioscorea hispida* et *Dioscorea dumetorum*, sont essentiellement de la dioscorine, de formule chimique  $C_{13}H_{19}O_2N$  (Asie) de structure chimique



**Dioscorine**

La dioscorine est obtenue à l'état de cristaux de couleur jaune. Elle est soluble dans l'eau, l'alcool et le chloroforme. Un autre type d'alcaloïde qui n'a pas été obtenu à l'état cristaux a été découvert dans les tubercules de *Dioscorea dumetorum*. Il s'agit de la dihydrodioscorine de formule chimique  $C_{13}H_{21}O_2N$ . Elle est obtenue par hydrogénation de la dioscorine :



**Dihydrodioscorine**

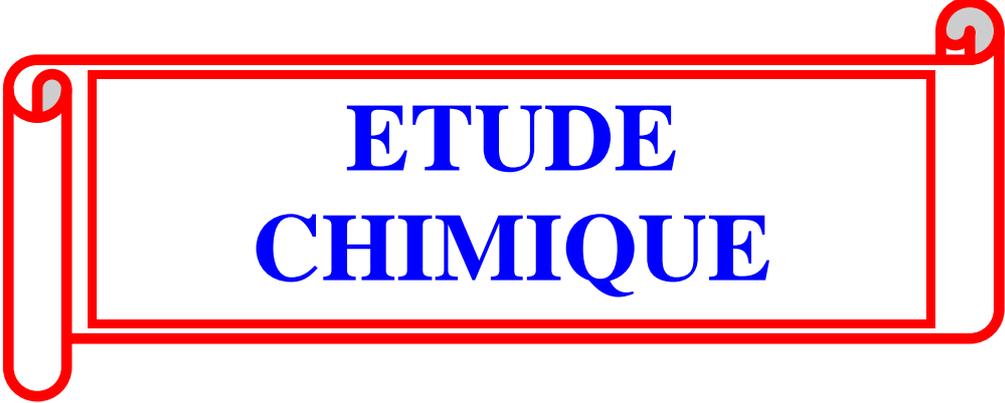
D'autre part, les tubercules de certaines *Dioscorea*, comme ceux de *Dioscorea dumetorum*, contiennent 4 types d'alcaloïdes : la dioscorine, la dihydrodioscorine et 2 autres produits d'hydrolyse de la dioscorine. Ces 2 derniers sont encore mal connus.

#### **4.2. Etude biologique**

La dioscorine et la dihydrodioscorine administrées par voie intrapéritonéale à la dose de 150 à 200mg/kg provoquent des convulsions chez le rat et la souris. Au début, les convulsions sont cloniques puis elles deviennent toniques ; la mort survient après un spasme. A ces mêmes doses, ces alcaloïdes administrés par voie intraveineuse peuvent aussi affecter la respiration chez le rat et la souris.

A la dose de 2mg/kg de souris, ils n'ont pas d'effet sur le cœur isolé de rat mais réduisent la réponse cardiaque à l'action de l'acétylcholine. L'abaissement de la pression sanguine provoqué par l'acétylcholine est réduit par l'action de ces alcaloïdes, tandis que l'augmentation de la pression sanguine induite par l'adrénaline est potentialisée. Ils provoquent aussi la mydriase, stimulent la contraction du muscle lisse intestinal du chat et du singe à la dose de 200mg/kg.

La toxicité de la dihydrodioscorine est plus faible que celle de la dioscorine. Chez la souris, la DL50 (24h) de la dioscorine extraite de la racine de tubercules de *Dioscorea dumetorum*, administrée par voie intrapéritonéale, est de 60mg/kg de souris. Elle est de 100mg/kg pour la dihydrodioscorine. Les DL100 pour les 2 alcaloïdes par voie intrapéritonéale sont respectivement 110mg/kg et 160mg/kg pour la souris.

A decorative red border that resembles a scroll, with rounded corners and a slight shadow effect, framing the central text.

**ETUDE  
CHIMIQUE**



## 1. INTRODUCTION

D'après la littérature, à part l'étude botanique, les travaux concernant les propriétés chimiques de *Dioscorea esculenta* sont encore rares. Nous avons alors réalisé une étude chimique en utilisant le tubercule comme matériel d'étude.

Ainsi nous avons essayé :

- d'extraire et de purifier les principes actifs de nature alcaloïdique,
- de déterminer les propriétés physico-chimiques de ces principes actifs.

## 2. MATERIELS ET METHODES

### 2.1. MATERIELS

#### 2.1.1. MATERIEL VEGETAL

##### 2.1.1.1. Classification

La classification systématique de cette plante (MABBERLEY, 1987) est la suivante :

Règne..... : VEGETAL  
 Embranchement..... : TRACHEIDOPHYTES  
 Super division..... : SPERMATOPHYTES  
 Division.....: ANGIOSPERMES  
 Classe..... : MONOCOTYLEDONES  
 Ordre..... : LILIALES  
 Famille.....: DIOSCOREACEAE  
 Genre.....: *Dioscorea*  
 Espèce.....: *esculenta*  
 Nom vernaculaire.....: Mavondro

La *figure 1* montre la plante et les tubercules.

### **2.1.1.2. Répartition géographique**

A Madagascar, *Dioscorea esculenta* est certainement d'introduction très ancienne. Cette igname s'est largement naturalisée sur la côte Est de Madagascar. On la trouve autour des villages, entre Vatamandry et Mananjary (voir *figure 2*).

### **2.1.1.3. Date et lieu de récolte**

La plante a été récoltée à l'état sauvage dans la région de Vatamandry, au mois d'Août 2004.

## **2.1.2. PRODUITS CHIMIQUES**

Les produits chimiques utilisés sont de qualité pour analyse. Ils sont essentiellement de marque PROLABO ou MERCK. Pour la chromatographie sur couche mince, des plaques de gel de silice de marque MERCK, de type 60F254 (épaisseur de la couche : 0,2mm) de dimensions, 20x20cm sont utilisées.

## **2.2. METHODES**

### **2.2.1. PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL**

Les tubercules frais sont pesés et débités en tranches fines qui sont étalées sur un plateau. Le tout est séché au soleil pendant 1 à 2 jours.

Le matériel végétal sec obtenu est pesé puis réduit en poudre par une série de broyages à l'aide d'un microbroyeur CULATTI, suivis de tamisages. La poudre fine homogène ainsi obtenue constitue le matériel végétal de départ. Elle est conservée dans une boîte en plastique à la température ambiante.

### **2.2.2. METHODES D'EXTRACTION**

Les alcaloïdes sont solubles dans les solvants organiques peu polaires (chloroforme, éther, acétone, alcools) et peu solubles dans l'eau (BRUNETON, 1918). Leur extraction peut alors être faite :

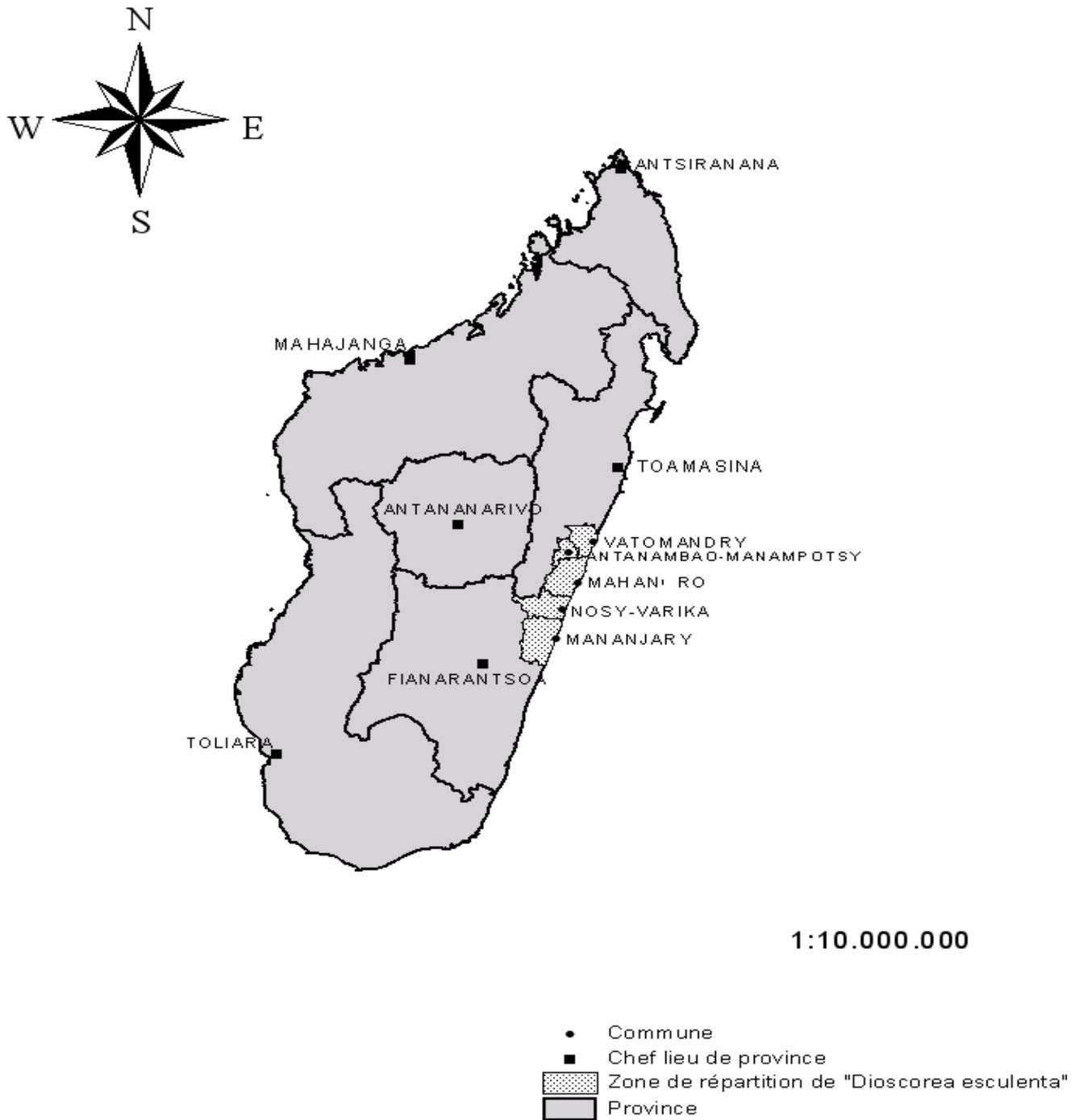


1)



2)

**Figure 1** : *Dioscorea esculenta* :1) feuilles 2) tubercules



**Figure 2** : Répartition géographique de *Dioscorea esculenta* (BURKILL, 1950)

- soit en traitant la poudre par un solvant organique après avoir déplacé les molécules de bases de leurs combinaisons salines par un alcali assez fort (ammoniaque) ;
- soit en utilisant une solution d'acide 2N ou du méthanol comme solvant d'extraction d'alcaloïdes sous forme de sels solubles.

Compte tenu de ces possibilités, 4 méthodes d'extractions ont été utilisées dont 2 à froid et 2 autres à chaud.

### **2.2.2.1. Méthodes d'extraction à froid**

#### **2.2.2.1.1. Extraction en milieu alcalin**

##### **2.2.2.1.1.1. Principe**

En présence d'un alcali fort, l'alcaloïde sous forme base se détache par substitution nucléophile de ses combinaisons salines. La base est alors extraite dans le chloroforme.

##### **2.2.2.1.1.2 Mode opératoire**

Dans une fiole conique, 10g de poudre végétale sont humectés avec de l'ammoniaque 12N. Après 30min de contact, 100ml de chloroforme sont ajoutés dans un rapport 1/10 (p/v), c'est-à-dire 1g de poudre pour 10ml d'ammoniaque. Le mélange est laissé macérer pendant une nuit à +4°C. Il est ensuite filtré sur 4 épaisseurs de gaze. Le filtrat est recueilli et le marc jeté. La solution obtenue est centrifugée à 16000xg pendant 15min à +5°C à l'aide d'une centrifugeuse BECKMAN (rotor JA20). Le surnageant est recueilli et concentré jusqu'à un rapport 1/1 (p/v)(voir méthode de concentration § 2.2.4. p.19).

#### **2.2.2.1.2. Extraction en milieu acide**

##### **2.2.2.1.2.1. Principe**

Les alcaloïdes se comportant comme des bases faibles, l'addition d'un acide fort (acide chlorhydrique) aboutit à la formation de sels d'alcaloïdes solubles dans l'eau.

#### **2.2.2.1.2.2. Mode opératoire**

La poudre végétale (10g) placée dans une fiole conique, est mise en suspension dans 100ml d'acide chlorhydrique 0,24N. Le mélange est ensuite agité à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 3h à la température ambiante puis laissé macérer pendant une nuit à +4°C. Il est ensuite filtré sur 4 épaisseurs de gaze, puis centrifugé à 16000xg pendant 15min à +5°C. Le surnageant est récupéré, puis après addition d'eau distillée, l'acide chlorhydrique est évaporé sous pression réduite.

L'évaporation se poursuit jusqu'à l'élimination totale de l'acide qui se traduit par la disparition de l'odeur piquante et du goût aigre. D'autre part, le pH de l'extrait est vérifié à l'aide d'un papier pH et éventuellement ramené à environ 7 par poursuite de l'évaporation. La solution aqueuse obtenue est centrifugée dans les mêmes conditions que précédemment, pour éliminer le précipité formé pendant l'évaporation. Son volume est ajusté jusqu'à un rapport 1/1 (p/v).

#### **2.2.2.2. Méthodes d'extraction à chaud**

##### **2.2.2.2.1. Extraction méthanolique à reflux**

###### **2.2.2.2.1.1. Principe**

Les alcaloïdes sont solubles dans le méthanol. La chaleur détruit la membrane squelettique et cytoplasmique des cellules végétales, ce qui permet le contact du méthanol avec les alcaloïdes. L'extraction se fait à volume constant, le méthanol évaporé sous l'effet du chauffage se condense au contact d'un réfrigérant et retombe dans l'extrait.

###### **2.2.2.2.1.2. Mode opératoire**

La poudre végétale est mise en suspension dans du méthanol dans le rapport 1/10 (p/v). Le mélange obtenu est chauffé à reflux pendant 1h à 60°C, puis laissé macérer pendant une nuit à +4°C. Il est ensuite filtré, puis centrifugé à 16000xg pendant 15min à +5°C, et le culot est éliminé.

Le méthanol dans le surnageant est évaporé et l'extrait est repris dans de l'eau distillée. La solution aqueuse obtenue est de nouveau centrifugée dans les mêmes conditions que précédemment.

#### **2.2.2.2.2. Extraction méthanolique au soxhlet**

##### **2.2.2.2.2.1. Principe**

Le principe de l'extraction au soxhlet est basé sur l'épuisement du matériel végétal sous forme de poudre par le solvant d'extraction qui est le méthanol. L'extraction se déroule à la température d'ébullition du méthanol (environ 60°C).

##### **2.2.2.2.2.2. Mode opératoire**

La poudre végétale (30g) est mise dans une cartouche cylindrique en papier filtre. Cette dernière est placée dans un soxhlet vertical de 60ml qui est relié à un erlenmeyer contenant des billes de verre. L'erlenmeyer lui-même est placé sur une plaque chauffante. Le soxhlet est rempli de méthanol et un réfrigérant est placé à son sommet.

L'extraction dure 24h à 60°C. L'extrait méthanolique obtenu est filtré et après évaporation du méthanol, l'extrait est repris dans l'eau dans le rapport 1/1 (v/v).

### **2.2.3. METHODES DE PURIFICATION**

#### **2.2.3.1. Traitement par le mélange acétone/diéthyléther**

##### **2.2.3.1.1. Principe**

L'addition d'un mélange volume à volume d'acétone et d'éther diéthylique (ou diéthyléther) à une solution méthanolique de saponosides provoque la précipitation de ceux-ci suite à une diminution de leur solubilité (MAHUZIER et HAMON, 1990).

##### **2.2.3.1.2. Mode opératoire**

L'extrait à traiter est évaporé à sec. Le résidu obtenu est pesé sur une balance de précision SARTORIUS et repris dans du méthanol de volume égal à 4 fois son poids. La solution méthanolique obtenue est filtrée. Le mélange acétone/diéthyléther de volume égal à 5 fois le

poids du résidu sec, est préparé dans un bécher plongé dans un bain de glace. La solution méthanolique est ensuite ajoutée goutte à goutte sous agitation magnétique au mélange acétone/diéthyléther.

L'opération est répétée avec le même volume d'acétone/diéthyléther jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de précipité. Le surnageant est recueilli par aspiration. Les solvants organiques sont éliminés par évaporation et l'extrait est repris dans l'eau distillée dans le rapport 1/1 (v/v).

#### 2.2.3.2. Fractionnement par le chloroforme (MAHUZIER et HAMON, 1990)

##### 2.2.3.2.1. Principe

Cette technique est basée sur la partition des substances dans 2 solvants non miscibles (eau et chloroforme).

##### 2.2.3.2.2. Mode opératoire

###### 2.2.3.2.2.1. Alcalinisation

L'extrait aqueux à traiter est d'abord alcalinisé avec de l'ammoniaque 12N (pH final compris entre 8 et 9). Le pH est vérifié au pH-mètre (DIGITAL-PH-METTER 646).

###### 2.2.3.2.2.2. Décantation

La solution alcalinisée est mélangée volume à volume avec du chloroforme dans le rapport 1/1 (v/v), dans une ampoule à décanter. Après agitation, le tout est laissé décanter jusqu'à la séparation nette en 2 phases : la phase aqueuse supérieure et la phase chloroformique inférieure. La phase chloroformique est recueillie. La phase aqueuse est épuisée 3 fois par le même volume de chloroforme jusqu'à ce qu'elle donne un test de MAYER négatif. Les phases chloroformiques sont rassemblées. Le chloroforme est évaporé et l'extrait est repris dans de l'eau distillée.

### **2.2.3.3. Traitement par l'acétate d'éthyle**

#### **2.2.3.3.1. Principe**

Ce traitement utilise aussi le partage des solutés vis-à-vis de 2 solvants non miscibles (eau et acétate d'éthyle).

#### **2.2.3.3.2. Mode opératoire**

L'extrait aqueux est mélangé avec le même volume d'acétate d'éthyle dans une ampoule à décanter. Le mélange est agité fortement puis laissé au repos jusqu'à sa séparation en 2 phases. La phase organique supérieure est recueillie par aspiration et la phase aqueuse inférieure est traitée 3 fois par le même volume d'acétate d'éthyle.

Les phases organiques sont rassemblées et l'acétate d'éthyle est évaporé sous vide. L'extrait obtenu est repris dans de l'eau distillée et son volume est ramené à celui de l'extrait de départ (volume initial). La phase aqueuse est aussi évaporée pour éliminer le solvant organique résiduel. Elle est concentrée jusqu'au volume initial.

Les alcaloïdes sont recherchés dans les 2 extraits obtenus (phase aqueuse et phase organique) à l'aide des tests de MAYER, WAGNER et DRAGENDORFF (voir §. 2.2.7.1.3.p.22).

### **2.2.4. METHODE DE CONCENTRATION**

Toutes les opérations de concentration d'extraits et d'évaporation de solvants sont effectuées au moyen d'un évaporateur rotatif (ROTAVAPOR R110) à la température 50°C, la pression étant réduite à l'aide d'une pompe à vide ALCATEL.

Après réduction de volume, les extraits concentrés sont centrifugés à +5°C à l'aide d'une centrifugeuse BECKMAN ROTOR JA20, à la vitesse 16000xg pendant 15min pour éliminer le précipité éventuel formé lors de l'évaporation.

### 2.2.5. METHODE DE DETERMINATION DE LA TENEUR EN MATIERE SECHE

La matière sèche est obtenue par séchage des tubercules frais au soleil. La teneur en matière sèche est exprimée en pourcentage par rapport au poids de tubercule frais. Elle est donnée par la relation :

$$T_s = \frac{P_s \times 100}{P_f}$$

Où  $T_s$  : teneur en matière sèche, en %

$P_s$  : poids de tubercule sec, en g

$P_f$  : poids de tubercule frais, en g.

### 2.2.6. METHODE DE CALCUL DE RENDEMENT

Le rendement en toxines à chaque étape d'extraction et de purification est exprimé en pourcentage par rapport au poids du matériel végétal de départ. Le rendement de purification est évalué en pourcentage par rapport au poids du résidu d'évaporation à sec de l'extrait brut.

Pour déterminer ces différents rendements, l'extrait est évaporé à sec, puis le résidu est pesé sur une balance de précision SARTORIUS. Le rendement est alors calculé d'après la relation suivante :

$$R = \frac{(P_t - P_v) \times 100}{P_p}$$

Où  $R$  : rendement, en %

$P_t$  : poids total du ballon avec le résidu d'évaporation à sec, en g

$P_v$  : poids du ballon vide, en g

$P_p$  : poids de la poudre de départ, ou poids du résidu d'évaporation à sec de l'extrait, en g.

## 2.2.7. METHODES ANALYTIQUES

### 2.2.7.1. Réactions de détection des alcaloïdes (DELORT-LAVAL, 1981)

Plusieurs types de tests sont utilisés :

- les tests effectués avant l'extraction pour mettre en évidence la présence d'alcaloïdes dans le matériel végétal (test préliminaire et test de confirmation) ;
- les tests qui servent à guider la purification des alcaloïdes (tests de détection des alcaloïdes).

#### 2.2.7.1.1. Test préliminaire

La poudre végétale (5g) est mise à macérer dans 50ml d'acide chlorhydrique 0,24 N pendant 30min. L'extrait acide obtenu est ensuite filtré sur du coton cardé et réparti dans 4 tubes à essai dont le premier sert de témoin. Cinq gouttes de chacun des réactifs de MAYER, WAGNER et DRAGENDORFF sont ajoutées respectivement dans les 3 tubes précédents.

L'apparition d'un trouble, d'une floculation ou d'un précipité indique la présence d'alcaloïdes. Les résultats sont exprimés selon la norme suivante :

**Tableau 4** : Norme utilisée pour exprimer les résultats des tests des alcaloïdes

OBSERVATIONS	RESULTAT
Léger trouble ou trouble opaque	+
Floculation	++
Floculation abondante ou précipité	+++

#### 2.2.7.1.2. Test de confirmation

L'extrait acide ci-dessus est évaporé à sec. Le résidu sec obtenu est humecté par l'ammoniaque 12N pendant 30min. Le mélange ainsi alcalinisé est repris dans du chloroforme. La solution chloroformique obtenue est alors additionnée d'eau distillée puis évaporée à sec. Le nouveau résidu sec est repris dans l'acide chlorhydrique 2N. La solution acide est ensuite répartie dans 4 tubes à essai dont l'un sert de témoin. Les 3 tubes sont soumis aux 3 tests des

alcaloïdes (tests de MAYER, WAGNER et DRAGENDORFF). L'apparition d'un trouble, d'une floculation ou d'un précipité solubles dans l'éthanol à 80% confirme la présence d'alcaloïdes.

#### 2.2.7.1.3. Tests de détection des alcaloïdes dans les extraits

2ml d'extrait aqueux à tester sont acidifiés par 2 à 3 gouttes d'acide chlorhydrique 2N. L'extrait est divisé dans 4 tubes dont l'un sert de témoin. Les 3 autres tubes sont additionnés respectivement des réactifs de MAYER, WAGNER et DRAGENDORFF pour les tests des alcaloïdes. Les résultats sont appréciés selon la norme donnée dans le *tableau 4*.

### **2.2.7.2. Chromatographie sur couche mince** (RANDERATH, 1964 ; KAMOUN,1991)

#### **2.2.7.2.1. Principe**

C'est une technique de microanalyse basée sur les phénomènes d'adsorption et de partage des substances à séparer entre une phase stationnaire hydrophile (l'adsorbant) et une phase mobile organique (le système de solvants).

#### **2.2.7.2.2. Mode opératoire**

##### **2.2.7.2.2.1. Préparation de la plaque**

La plaque chromatographique (voir caractéristiques § 3.5.p.29) peut être découpée aux dimensions voulues : 10cm pour la hauteur et selon le nombre d'échantillons à analyser pour la largeur.

##### **2.2.7.2.2.2. Dépôt des échantillons**

Les extraits à analyser sont déposés à l'aide d'un capillaire, en tirets fins horizontaux de 7mm de longueur espacés de 6mm. Ces tirets sont situés à 15mm du bord inférieur et à 13mm de chaque bord latéral de la plaque. Chaque dépôt est suivi d'un séchage au séchoir à main.

#### **2.2.7.2.2.3. Développement du chromatogramme**

Le chromatogramme est mis à développer dans une cuve à chromatographie DESAGA contenant le système de solvants B/A/E (n-butanol/acide acétique/eau distillée) dans le rapport 60/20/20 (p/p/p). Les parois intérieures de la cuve ont été préalablement tapissées de papier filtre pour saturer l'atmosphère intérieure en vapeur de solvants.

Il s'agit d'une chromatographie ascendante. La plaque est retirée de la cuve quand le front du solvant parvient à 5mm du bord supérieur du support, puis elle est séchée avec un séchoir à main.

#### **2.2.7.2.2.4. Révélation du chromatogramme**

Pour visualiser la séparation des molécules sur le gel, la plaque est :

- observée sous lumière UV à 2 longueurs d'onde différentes : 254nm et 366nm. Les substances apparaissent sous forme de bandes fluorescentes ;
- pulvérisée avec le réactif modifié de DRAGENDORFF (voir composition en *annexe I*). Les bandes sont colorées en rose.

### **3. RESULTATS**

#### **3.1. TENEUR EN MATIERE SECHE**

Un tubercule frais pesant 1kg, traité selon la méthode décrite en 2.2.1.p.12, donne après 2 jours de séchage 352,15g de poudre sèche.

En appliquant la méthode de calcul donnée au paragraphe 2.2.5.p.20, la teneur en matière sèche du tubercule est de 35,21%. Plus de la moitié du tubercule frais est donc constituée par de l'eau.

### 3.2. PREPARATION DE L'EXTRAIT BRUT (EB)

Quatre techniques ont été essayées pour extraire le maximum d'alcaloïdes à partir de la poudre de tubercules secs. Pour chaque type d'extraction, 10g de poudre sont utilisés.

Les résultats sont présentés dans le *tableau 5*.

D'après ces résultats, les tests de MAYER, WAGNER et DRAGENDORFF sont positifs pour les 4 types d'extrait brut. Il faut noter qu'il n'apparaît pas de véritable précipité mais seulement un trouble opaque et une floculation.

Etant donné que les alcaloïdes sont extraits avec beaucoup d'autres substances, le rendement en alcaloïdes n'a été évalué qu'après purification de ces derniers.

***Tableau 5 : Résultats des différents types d'extraction***

TYPE D'EXTRACTION		CARACTERISTIQUES DE L'EXTRAIT BRUT			TESTS ALCALOÏDES		
		GOUT	ASPECT	COULEUR	M	W	D
<b>A FROID</b>	En milieu alcalin	Fade	Limpide mousseux	Jaune verdâtre	+	+	+
	En milieu acide	Fade	Limpide mousseux	Jaune verdâtre	+	+	+
<b>A CHAUD</b>	Méthanolique à reflux	Légèrement amer	Limpide mousseux	Jaune rougeâtre	++	++	++
	Méthanolique au soxhlet	Légèrement amer	Limpide mousseux	Jaune verdâtre	++	++	++

M : Mayer

+ : Présence d'un trouble,

W : Wagner

++ : Présence d'une floculation

D : Dragendorff

### **3.3. PURIFICATION**

Plusieurs méthodes de purification ont été testées pour séparer les alcaloïdes de leurs contaminants. La purification est guidée par les 3 tests de détection des alcaloïdes et l'homogénéité des extraits est appréciée par CCM.

#### **3.3.1. PRECIPITATION PAR LE MELANGE ACETONE/DIETHYLETHER**

30ml de chacun des 4 extraits bruts obtenus précédemment sont évaporés à sec. Le résidu sec pesant 2g est repris dans 8ml de méthanol (rapport 1/4 : p/v). L'extrait méthanolique ainsi préparé est précipité par 10ml de mélange acétone/diéthyléther (ce volume est égal à 5 fois les poids du résidu sec ; voir méthode § 2.2.3.1. p.17).

La solution méthanolique doit être traitée 3 fois par le même volume de solvant pour qu'il n'y ait plus de précipité. L'extrait aqueux obtenu après élimination des solvants organiques, réagit positivement avec les 3 tests des alcaloïdes.

L'application de cette méthode facilite la séparation en 2 phases lors du traitement ultérieur par le chloroforme (la phase intermédiaire entre les 2 phases est réduite), mais elle n'améliore pas le rendement de la purification. Aussi, pour économiser du solvant, nous n'avons pas retenu cette technique dans le procédé de purification.

#### **3.3.2. FRACTIONNEMENT PAR LE CHLOROFORME**

Chacun des 4 extraits bruts (30ml de volume) obtenus précédemment (voir § 3.2. p.24) est alcalinisé par de l'ammoniaque 12N pour avoir un pH de 8 à 9, puis traité 3 fois par le chloroforme selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.3.2 p.18. Les phases chloroformiques sont rassemblées et après évaporation du solvant, elles constituent les extraits purifiés. Les caractéristiques de ces derniers sont présentées dans le *tableau 6* suivant :

**Tableau 6 : Caractéristiques des extraits obtenus par traitement par le chloroforme en fonction du type d'extrait brut**

TYPE D'EXTRAIT BRUT		CARACTERISTIQUES DES EXTRAITS			TEST			RENDEMENT (%)
		GOUT	ASPECT	COULEUR	M	W	D	
<b>A FROID</b>	Alcalin	amer	limpide	jaune paille	++	++	++	0,014
	Acide	amer	limpide	jaune paille	++	++	++	0,016
<b>A CHAUD</b>	Méthanolique à reflux	amer	limpide	jaune paille	+++	+++	+++	0,105
	Méthanolique au soxhlet	amer	limpide	jaune paille	+++	+++	+++	0,175

M : Mayer

W : Wagner

D : Dragendorff

++ : Présence d'une floculation

+++ : Présence de précipité

Compte tenu de ces résultats, nous avons choisi pour la suite de notre travail la méthode d'extraction méthanolique au soxhlet pour les raisons suivantes :

- elle permet d'obtenir le rendement le plus élevé après traitement de l'extrait brut correspondant par le chloroforme,
- elle exige moins de solvant par rapport à l'extraction méthanolique à chaud et à reflux.

Ainsi, l'extrait obtenu par traitement de l'extrait brut méthanolique par le chloroforme constitue l'extrait purifié E1, de couleur jaune paille, d'aspect limpide et de goût amer. Il comporte 2 bandes révélables sous UV à 254nm : une bande supérieure jaune et une bande inférieure violette.

### 3.3.3. TRAITEMENT PAR L'ACETATE D'ETHYLE

L'extrait E1 (30ml) est traité par l'acétate d'éthyle suivant la méthode décrite au paragraphe 2.2.3.3 p.19. Les 3 tests des alcaloïdes sont positifs pour la phase organique et négatifs pour la phase aqueuse.

La phase organique reprise dans l'eau distillée après évaporation de l'acétate d'éthyle, constitue alors l'extrait E2 de couleur jaune paille, d'aspect limpide, de goût amer. Il présente une seule bande aussi bien par révélation sous UV à 254nm et à 366nm qu'après pulvérisation avec le réactif de DRAGENDORFF modifié.

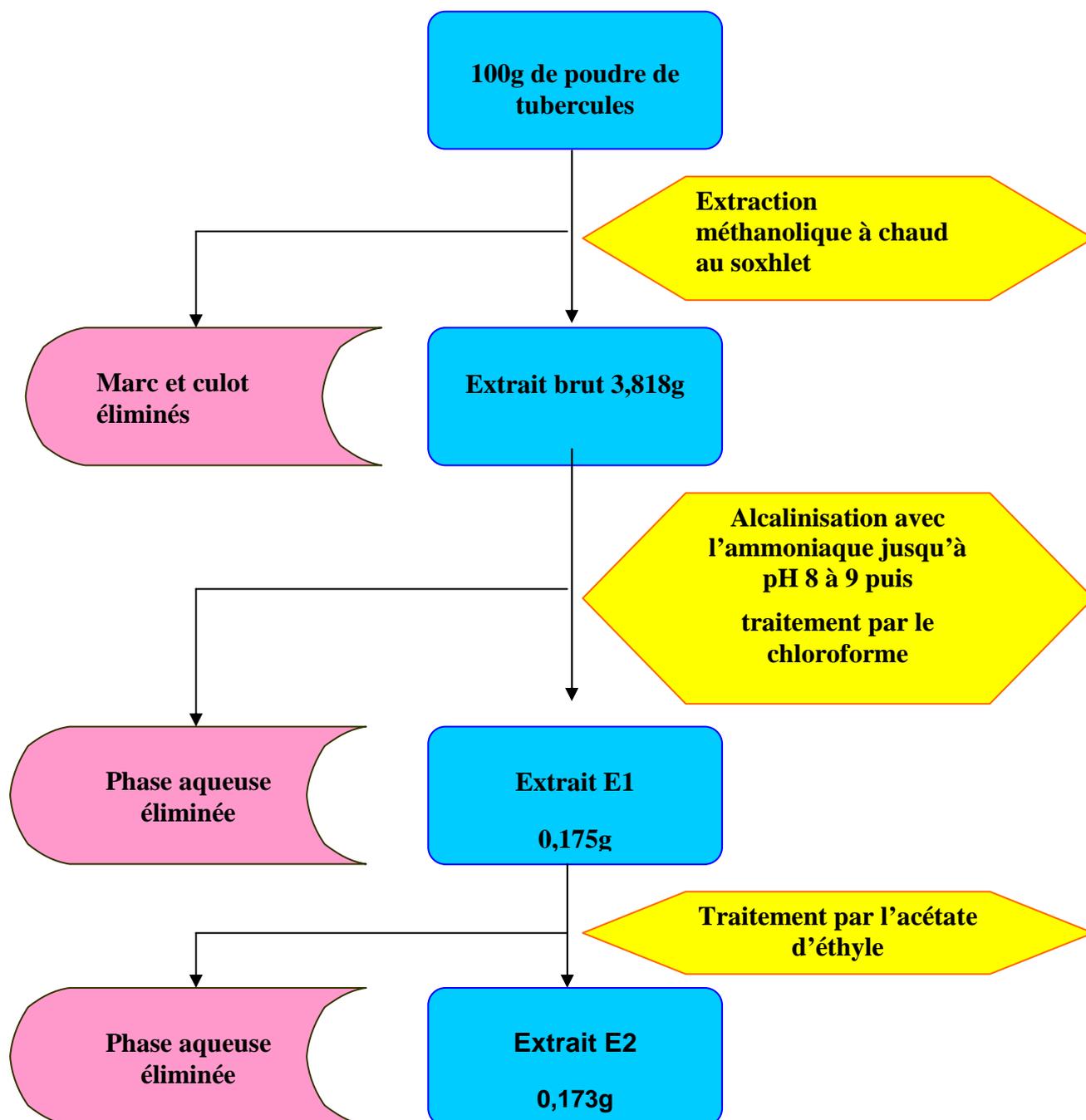
Cette technique a été maintenue car elle permet de séparer en CCM les 2 bandes révélatrices sous UV (254nm) de l'extrait E1 précédent.

En résumé, à partir de l'extrait brut méthanolique obtenu par extraction au soxhlet, le protocole de purification définitif, destiné à purifier spécifiquement les alcaloïdes, comporte 2 étapes qui sont : le fractionnement par le chloroforme et le traitement par l'acétate d'éthyle.

### 3.4. RENDEMENT

Le poids du résidu d'évaporation à sec de l'extrait brut obtenu à partir de 100g de poudre est de 3,818g, correspondant à un rendement d'extraction de 3,818%. On obtient ensuite un résidu sec d'extrait E1 pesant 0,175g, d'où un rendement en toxines de 0,175% et un résidu sec d'extrait E2 pesant 0,173g, donnant un rendement en toxines de 0,173%, par rapport à la poudre de départ. Les rendements de purification (par rapport à l'extrait brut), déterminés selon la méthode donnée au paragraphe 2.2.6.p.20, sont respectivement de 4,58% et 40,53% pour l'extrait E1 et l'extrait E2.

L'extraction et les différentes étapes de purification avec les poids des résidus d'évaporation à sec des extraits de chaque étape, sont résumées sur la *figure 3*.



*Figure 3 : Schéma récapitulatif de l'extraction et des différentes étapes de purification des alcaloïdes à partir de la poudre de tubercules secs. Les chiffres représentent le poids des résidus d'évaporation à sec des extraits*

### 3.5. ETUDE DE L'HOMOGENEITE DES DIFFERENTS EXTRAITS

L'évolution de l'homogénéité des extraits au cours de la purification est appréciée par chromatographie sur couche mince (voir figure 4).

L'extrait brut montre 10 bandes majeures révélables sous lumière UV à 254nm et une seule bande révélable à 366nm. L'extrait E1 ne présente plus que 2 bandes révélables sous UV à 254nm. Le fractionnement par le chloroforme a donc permis d'éliminer 8 bandes majeures. Le traitement par l'acétate d'éthyle a par la suite permis d'éliminer le contaminant de l'extrait E1 car l'extrait E2 obtenu ne contient plus qu'une seule bande jaune sous lumière UV à 254nm.

Seuls les alcaloïdes sont révélés par pulvérisation de la plaque au réactif de DRAGENDORFF. Ainsi, le chromatogramme des 2 extraits E1 et E2 contenant les alcaloïdes purifiés montre après révélation à l'aide de ce réactif une seule bande. Le chromatogramme récapitulatif est montré par la *figure 4*.



**Figure 4 : Chromatographie sur couche mince des extraits : a) plaque non pulvérisée  
b) plaque pulvérisée 1) extrait brut 2) extrait brut 3) extrait E1 4) extrait E2**

### **3.6. NATURE CHIMIQUE ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES**

Toutes les techniques d'extraction et de purification, y compris celles qui n'ont pas été adoptées, ainsi que les tests chimiques ont permis d'obtenir des informations sur la nature chimique et les propriétés physico-chimiques des principes actifs isolés.

Ainsi, d'après nos résultats :

- les principes actifs sont peu soluble dans l'eau : la solution aqueuse d'alcaloïde est trouble à forte concentration (au-dessus de 70mg/ml) ;
- ils sont solubles dans l'eau acidulée (HCl à 2%) et très solubles dans les solvants organiques tels que le méthanol, l'éthanol, le mélange acétone/diéthyléther, le chloroforme et l'acétate d'éthyle ;
- ils sont thermostables : les opérations de congélation et de décongélation répétées ainsi que le chauffage ne l'affectent pas ;
- ils ont une couleur jaune paille ;
- ils ont un goût amer.

## **4. DISCUSSION ET CONCLUSION**

Cette étude chimique a été orientée vers l'isolement des alcaloïdes. Une extraction méthanolique à chaud au soxhlet a donné les meilleurs résultats avec un rendement en extrait brut de 3,818%. Le procédé de purification comporte 2 étapes basées sur la différence de solubilité : un traitement par le chloroforme et un fractionnement par l'acétate d'éthyle. L'extrait obtenu à la première étape de purification aurait pu être soumis à un nouveau traitement par le chloroforme selon la technique classiquement utilisée par les chimistes, mais comme ce solvant est très volatil, il est difficile à manipuler. Aussi, l'acétate d'éthyle a été choisi à sa place.

L'extrait purifié E2 contient un seul alcaloïde représenté par une seule bande révélable au réactif de DRAGENDORFF.

Le rendement final en toxines est de 0,173%. Ce rendement est faible s'il est comparé par exemple à celui de *Anacampta diticha* (APOCYNACEAE) dont les rendements en alcaloïdes sont de : 0,62% à partir de l'écorce de racine, 0,47% pour les feuilles, et 0,43% pour l'écorce de tronc (MIET et coll., 1980) ; et à celui des graines de *Albizia arenicola* (MIMOSOIDAE-FABACEAE) qui est de 0,64% (RANDRIANARIVO, 2003).

L'extrait purifié ne comporte en CCM qu'une seule bande révélabale par le réactif modifié de DRAGENDORFF. L'utilisation d'autres systèmes de solvants ou de techniques plus performantes comme la chromatographie en phase gazeuse permettrait de savoir si cette bande unique contient une ou plusieurs substances. Des études spectrales permettraient de savoir si le ou les alcaloïdes de *Dioscorea esculenta* est la dioscorine ou l'un de ses dérivés (BRUNETON, 1987) ou encore une nouvelle substance.

Le principe est peu soluble dans l'eau. Par contre, il est soluble dans l'acide dilué à 2% et dans beaucoup de solvants organiques tels que : le chloroforme, l'acétate d'éthyle, le mélange acétone/diéthyléther, le méthanol, l'éthanol. Il est thermostable ; les opérations de congélation et le traitement à haute température ne l'affectent pas.

L'étude chimique réalisée sur le tubercule de *Dioscorea esculenta* nous a permis d'extraire et de purifier une substance alcaloïdique active sur laquelle l'étude des propriétés toxicologiques sera effectuée.



A decorative red border that resembles a scroll, with rounded ends and a slight shadow effect, framing the central text.

**ETUDE  
BIOLOGIQUE**

## 1. INTRODUCTION

Dans l'étude chimique précédente, nous avons pu obtenir une préparation contenant un ou plusieurs alcaloïdes à partir des tubercules de *Dioscorea esculenta*.

Nous avons alors réalisé l'étude des propriétés toxicologiques de l'extrait purifié. Pour cela, nous avons testé la toxicité du principe sur des Mammifères comme les souris, et sur les hématies de mouton et aussi sur d'autres représentants du règne animal tels que les larves de moustique, les têtards de grenouille et les poissons. Nous avons également étudié ses effets sur des végétaux notamment sur la germination de graines, la croissance de jeunes plantules et la croissance des bourgeons axillaires et enfin nous avons recherché les effets du principe sur la croissance de micro-organismes.

Pour les différentes expériences, nous n'avons pas utilisé l'extrait brut parce qu'il contient encore beaucoup d'autres substances non alcaloïdiques pouvant être actives. Nous avons uniquement testé l'extrait alcaloïdique E2 (ou extrait) sauf pour le test hémolytique où nous avons utilisé les deux extraits purifiés E1 et E2.

## 2. MATERIELS ET METHODES

### 2.1. MATERIELS

#### 2.1.1. LES ANIMAUX D'EXPERIMENTATION

##### 2.1.1.1. Les souris

Pour les différents tests, des souris blanches *Mus musculus* de race Swiss sont utilisées. Elles proviennent de l'animalerie du laboratoire de Biochimie Fondamentale et Appliquée de la Faculté des Sciences d'Antananarivo.

##### 2.1.1.2. Le sang de mouton

Le sang utilisé a été prélevé sur un mouton sain élevé à l'Institut Malgache des Vaccins Vétérinaires ou IMVAVET, Antananarivo.

### **2.1.1.3. Les larves de moustique**

Les larves de moustique *Culex quinquefasciatus* sont au 3<sup>ème</sup> stade de développement. Elles proviennent des plans d'eau des environs du Campus universitaire d'Antananarivo. Elles sont capturées le jour des tests.

### **2.1.1.4. Les têtards de grenouille**

Les têtards de grenouille *Ptychadena mascareniensis* au stade « sans patte » sont capturés le jour des tests dans les plans d'eau des environs du Campus universitaire d'Antananarivo.

### **2.1.1.5. Les poissons**

Les petits poissons *Gambusia holbrooki* ou « pirina » utilisés sont capturés le jour des tests dans les rizières des environs de l'Université d'Antananarivo.

## 2.1.2. LES PLANTES D'EXPERIMENTATION

Des graines de plusieurs espèces de Monocotylédones et de Dicotylédones sont utilisées pour les tests sur les végétaux. Elles proviennent de la collection du centre de production du FOFIFA Ambatobe, Antananarivo. Ces graines sont présentées dans le *tableau 7*.

**Tableau 7** : Graines utilisées pour les expériences sur les végétaux

	FAMILLE	ESPECE	NOM VERNACULAIRE
<b>DICOTYLEDONES</b>	APIACEAE	<i>Daucus carota</i>	Carotte
		<i>Petroselinum crispum</i>	Persil chinois
	BRASSICACEAE	<i>Brassica sp</i>	Tissam-white
	COMPOSITAE	<i>Lactuca sativa</i>	Laitue
	CUCURBITACEAE	<i>Cucumis sativus</i>	Concombre
		<i>Cucurbita pepo</i>	Courgette
	FABACEAE	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Haricot
		<i>Pisum sativum</i>	Petit pois
SOLANACEAE	<i>Solanum nigrum</i>	Morelle noire	
<b>MONOCOTYLEDONES</b>	LILIACEAE	<i>Allium cepa</i>	Oignon
	POACEAE	<i>Oryza sativa</i>	Riz
		<i>Zea mays</i>	Maïs

### **2.1.3. LES MICRO-ORGANISMES UTILISES**

Les souches utilisées ont été soit prélevées, puis isolées et identifiées au laboratoire de Microbiologie de la Maison du Petit Elevage (MPE), soit isolées à partir de cultures disponibles au même laboratoire.

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

Les milieux de culture peuvent être solides ou liquides. Leur composition est indiquée en *annexe V*. Ils peuvent être classés en 4 types.

#### **2.1.4.1. Les milieux d'enrichissement**

Les milieux d'enrichissement permettent la multiplication de divers micro-organismes nouvellement prélevés. Deux milieux d'enrichissement sont utilisés.

##### **2.1.4.1.1. Le bouillon nutritif**

C'est un milieu liquide permettant la croissance de la plupart des micro-organismes.

##### **2.1.4.1.2. La gélose nutritive**

Ce milieu solide permet la poussée des micro-organismes ne présentant pas d'exigence particulière.

#### **2.1.4.2. Les milieux d'isolement et de purification des germes**

##### **2.1.4.2.1. Le milieu Salmonella-Shigella (SS)**

C'est un milieu solide sélectif utilisé pour la culture des Salmonelles et des Shigelles.

##### **2.1.4.2.2. Le milieu Hektoen**

C'est un milieu solide utilisé pour l'isolement des Entérobactéries.

##### **2.1.4.2.3. Le milieu « brillant green agar » (BGA) ou vert brillant**

Le vert brillant est un milieu solide utilisé pour l'isolement des Salmonelles autres que *Salmonella typhi*.

#### 2.1.4.2.4. Le milieu « eosine methylene blue » (EMB)

Ce milieu solide permet l'isolement de bactéries du genre *Pseudomonas* et *Klebsiella*.

#### 2.1.4.2.5. La gélose au sang

C'est un milieu solide constitué de gélose de base enrichie de sang, adapté à la culture des *Staphylococcus* et *Streptococcus*.

Ces milieux spécifiques pour l'isolement et la purification des germes sont donnés dans le *tableau 8*.

*Tableau 8 : Milieux spécifiques servant à isoler les différents germes*

(DIFCO MANUAL, 1984)

Milieux spécifiques	Germes à isoler
SALMONELLA-SHIGELLA (SS)	<i>Salmonella</i> sauf <i>S.typhi</i> <i>Shigella</i>
HEKTOEN	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter</i>
BRILLANT GREEN AGAR (BGA)	<i>Salmonella typhi</i>
EOSINE METHYLENE BLUE (EMB)	<i>Klebsiella</i> <i>Pseudomonas</i>
GELOSE AU SANG (GS)	<i>Proteus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Pasteurella</i>

#### 2.1.4.3. Les milieux de détermination des caractères biochimiques des bactéries

(LEFEVRE, 1997)

##### 2.1.4.3.1. Le milieu citrate de SIMMONS

C'est un milieu solide permettant d'identifier les bactéries utilisant le citrate de sodium comme seule source de carbone et d'énergie.

#### **2.1.4.3.2. Le milieu HAJNA-KLIGLER : lactose-glucose-H<sub>2</sub>S**

C'est un milieu solide complexe. Il permet la mise en évidence de l'utilisation du lactose, du glucose par les bactéries et la production de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S).

#### **2.1.4.3.3. Le milieu mannitol-mobilité**

Ce milieu faiblement gélosé sert à la mise en évidence de la fermentation du mannitol, de la réduction des nitrates en nitrites et l'observation de la mobilité des bactéries.

#### **2.1.4.3.4. Le milieu urée-indole**

C'est un milieu liquide utilisé pour la recherche de l'uréase et la tryptophane désaminase (TDA) dans les micro-organismes ainsi que la production d'indole.

#### **2.1.4.3.5. La lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et l'arginine dihydrolase (ADH)**

Ce sont des milieux liquides destinés à la recherche des décarboxylases et dihydrolases bactériennes.

#### **2.1.4.3.6. Les disques**

##### ***2.1.4.3.6.1. Les disques à ortho-nitro-phényl β D-galactopyranoside (ONPG)***

Ce sont des disques de 5mm de diamètre imprégnés d'ONPG permettant la recherche de β-galactosidase bactérienne.

##### ***2.1.4.3.6.2. Les disques pour le test de l'oxydase***

Ce sont des disques de 5mm de diamètre marqués « ox ». Ils sont imprégnés d'oxalate de diméthylparaphénylène diamine et sont utilisés pour la recherche de l'oxydase bactérienne.

#### **2.1.4.4. Le milieu d'étude d'activité antibactérienne**

Les tests d'activité antibactérienne sont réalisés sur le milieu solide de Mueller-Hinton.

## **2.2. METHODES**

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

### **2.2.1.1. Tests sur souris**

#### **2.2.1.1.1. Estimation de la toxicité**

Deux voies d'administration ont été utilisées pour tester les extraits : la voie orale et la voie intra péritonéale (ip). Pour chaque voie, un volume de 0,3ml d'extrait à tester est injecté à une souris de 25g. Deux lots de deux souris sont utilisés pour chaque test, le 1<sup>er</sup> lot recevant du sérum physiologique sert de témoin tandis que l'extrait à tester est administré au deuxième lot. L'expérience dure 24h.

#### **2.2.1.1.2. Examen histopathologique (VERNE, 1960 ; BOYD, 1966 ; GANTER et JOLLES, 1969 ; LUSSIER, 1989)**

L'examen histopathologique permet d'observer microscopiquement le changement de la structure tissulaire ou l'apparition des lésions dans différents organes d'une souris ayant reçu l'extrait toxique, par comparaison avec les organes d'une souris non traitée. Il comporte les étapes suivantes : le prélèvement, la fixation des organes, l'inclusion, la microtomie, la circulation, l'étalement, la coloration et l'observation des coupes.

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

Deux souris sont injectées par voie ip d'une dose d'extrait à étudier provoquant de symptômes d'intoxication. Après l'apparition de tous les symptômes, elles sont sacrifiées par élongation cervicale. Les organes tels que le cœur, le foie, le poumon, les reins, l'estomac, le cerveau et l'intestin sont prélevés juste après avoir sacrifié la souris. Une souris recevant du sérum physiologique par voie ip, est traitée de la même manière ; ses organes servent de témoin.

Les organes prélevés sont plongés dans le liquide de BOUIN pendant 48h, pour conserver les tissus dans l'état le plus proche possible de l'état normal.

La composition de liquide de BOUIN est donnée en *annexe II*.

##### **2.2.1.1.2.2. Inclusion**

Chaque organe est découpé en minces fragments de 5mm d'épaisseur. Les fragments

subissent une déshydratation par l'alcool, opération pendant laquelle l'eau tissulaire est remplacée par l'alcool. Ils sont ensuite imprégnés de toluène pour permettre la fixation de la paraffine. La préparation est alors plongée dans la paraffine liquide à 56°C coulée dans un moule en métal. Le moule est ensuite porté à +4°C pour solidifier son contenu. Ainsi, les fragments sont inclus dans la paraffine solide.

#### **2.2.1.1.2.3. Microtomie, circulation et étalement des coupes**

Des coupes minces de 5µm d'épaisseur sont obtenues par l'utilisation d'un microtome rotatif LEKA. Ils sont ensuite introduits dans un circulateur automatique (CITADEL 2000) pour éliminer la paraffine.

La circulation comprend :

- l'imprégnation par le toluène pour dissoudre la paraffine,
- le traitement par l'alcool pour éliminer le toluène,
- la réhydratation des tissus par lavage à l'eau.

Les coupes ainsi traitées sont étalées sur une lame.

#### **2.2.1.1.2.4. Coloration et observation des coupes**

La coloration des tissus réhydratés se fait à l'aide de divers colorants :

- l'hématoxyline, colorant basique, qui teinte le noyau en bleu ou noir,
- l'éosine, colorant acide, qui colore le cytoplasme en rose ou rouge,
- le safran qui se fixe sur les tissus conjonctifs.

Les coupes sont ensuite recouvertes de lamelles portant une goutte de résine synthétique. L'observation des coupes se fait au microscope optique, au grossissement x 400.

### **2.2.1.2. Test sur les hématies de mouton**

#### **2.2.1.2.1. Principe (POLNOVSKI et coll., 1963)**

Lorsque le sang est traité par divers réactifs hémolytiques, ou simplement dilué dans l'eau distillée en quantité suffisante, les globules rouges sont lysés et leur hémoglobine est libérée. C'est le laquage ou hémolyse.

#### **2.2.1.2.2. Mode opératoire**

#### **2.2.1.2.2.1. Prélèvement et préparation des hématies**

Les hématies utilisées proviennent du sang veineux d'un mouton, prélevé à partir de la veine jugulaire de celui-ci selon la technique suivante : sous l'effet de la compression la veine gonfle ; une aiguille reliée à un flacon contenant des billes de verre est alors enfoncée le long de la veine. Le sang qui tombe dans le flacon est agité légèrement pour empêcher la formation de caillots de fibrine. Du sang défibriné est ainsi obtenu.

Le sang (50ml) est lavé 3 fois avec un même volume de tampon phosphate buffered saline (PBS). Le mélange est centrifugé à chaque lavage et le surnageant est éliminé. Le culot final est repris dans du PBS pour avoir une suspension d'hématies à 2% (v/v : volume du sang par rapport au volume total de la suspension).

#### **2.2.1.2.2.2. Test hémolytique**

Le test hémolytique est réalisé dans une plaque de microtitration à fond en U ou en V. A partir d'une solution d'extrait à étudier à 1mg/ml, des dilutions en cascade sont effectuées (coefficient de dilution 1/2) de manière à obtenir différentes concentrations. 50µl de chaque solution ainsi obtenue sont versés dans les cupules de la microplaque. 50µl de suspension d'hématies à 2% sont ajoutés dans chaque cupule de la plaque.

Deux témoins sont préparés :

- un témoin positif constitué de 50µl d'eau distillée et 50µl d'hématies
- un témoin négatif constitué de 50µl de PBS et 50µl d'hématies.

La plaque est recouverte et portée dans l'étuve à 37°C pendant 1h puis laissée à +4°C pendant une nuit avant la lecture.

La composition des milieux utilisés pour le test hémolytique est montrée dans le *tableau 9*.

**Tableau 9** : Composition des milieux utilisés pour le test hémolytique

<b>Concentration en extrait à étudier (µg/ml)</b>	T+	T-	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,95	1,97
<b>Suspension d'hématies à 2% (µl)</b>	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
<b>Extrait (µl)</b>	-	-	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
<b>Eau distillée (µl)</b>	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>PBS</b>	-	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

T+ : Témoin positif

T- : Témoin négatif

L'hémolyse se traduit par l'apparition d'une plage de lyse rouge dans la cupule. En cas d'absence d'hémolyse, les hématies intactes se déposent en un point rouge au fond de la cupule. L'apparition de ces deux phénomènes dans une même cupule indique une hémolyse partielle.

## **2.2.2. METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG**

### **FROID**

Les tests se font sur des larves de moustique, des têtards de grenouille et des poissons (voir § 2.1.1.p.32).

#### **2.2.2.1. Mode opératoire**

Les animaux de même taille sont répartis en 6 lots de 7 individus. Chaque lot est placé dans 200ml d'eau de pluie. Différentes concentrations décroissantes de l'extrait à tester sont préparées à partir d'une solution mère par dilution en cascade, avec un coefficient de dilution déterminé. Chaque lot est soumis à une concentration déterminée en extrait à tester. Un 7<sup>ème</sup> lot placé dans 200ml d'eau de pluie sert de témoin. La lecture des résultats se fait après 24h au bout desquelles les individus morts dans chaque lot sont comptés.

#### **2.2.2.2. Détermination de la CL50 (24h)**

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

La détermination de la CL50 utilise la méthode graphique de régression linéaire de la relation suivante :

$$\% \text{ de décès} = f(\log C)$$

Où C est la concentration du milieu en  $\mu\text{g/ml}$

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

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

Où Y : pourcentage de la mortalité (%)

A : constante

B : coefficient de régression linéaire

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

### **2.2.3. METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES VEGETAUX**

#### **2.2.3.1. Etude des effets sur le pouvoir germinatif de graines**

L'expérience est réalisée sur des graines de différentes plantes Monocotylédones et Dicotylédones (voir liste § 2.1.2.p.33). Elle consiste à les faire germer en présence d'une concentration connue d'extrait à étudier. Les résultats sont appréciés par comparaison avec des graines mises à germer dans l'eau de pluie.

Pour chaque espèce, un lot de 10 graines est mis à germer dans une boîte de Pétri contenant du coton imbibé de 20ml d'extrait à tester à la concentration unique de 1mg/ml. Les graines sont arrosées tous les 2 jours avec le même extrait. Un lot témoin est mis à germer dans l'eau de pluie.

L'expérience dure 7 jours à la température ambiante et à l'obscurité.

#### **2.2.3.2. Étude de la croissance de jeunes plantules**

Cette étude est réalisée sur les graines d'un représentant des Monocotylédones et d'un représentant des Dicotylédones.

Les graines de chaque espèce sont réparties en 7 lots de 10 graines.

Deux lots sont trempés dans l'extrait à tester de concentration déterminée à la température ambiante et à l'obscurité pendant 2 jours. Ensuite, l'un des lots est mis en germer et arrosé en présence du même extrait, tandis que le 2<sup>ème</sup> lot, après lavage, est mis à germer et arrosé en présence d'eau de pluie.

Les 5 autres lots sont trempés dans l'eau de pluie à la température ambiante et à l'obscurité pendant 2 jours, puis répartis comme suit : un lot témoin est mis à germer dans l'eau de pluie, les autres sont mis à germer et arrosés en présence de différentes concentrations d'extrait à étudier.

Pour tous les lots, l'arrosage se fait tous les 2 jours. La longueur des épicotyles et des hypocotyles est mesurée tous les 2 jours pendant 2 semaines.

### **2.2.3.3. Etude de la croissance de bourgeons axillaires**

Les effets de l'extrait à tester sur la croissance des bourgeons axillaires sont observés par comparaison avec ceux de la gibbérelline et de l'auxine. Ces 2 dernières sont des hormones végétales qui ont respectivement des effets stimulateurs et inhibiteurs de la croissance des bourgeons axillaires.

L'expérience est réalisée sur des plantules de petit pois obtenues par germination de graines dans l'eau de pluie pendant 7 jours. Les tigelles sont sectionnées au-dessus du 2<sup>ème</sup> bourgeon axillaire. Un volume de 1 µl d'extrait à étudier à 28 µg/µl est mélangé avec un agent fixateur tel que la lanoline. Le mélange est appliqué sur la partie sectionnée des plantules. Les mêmes manipulations sont effectuées avec des solutions de gibbérelline et d'auxine à 28 µg/µl chacune. De l'eau de pluie (1 µl) sert de témoin.

Les plantules sont arrosées régulièrement avec l'eau de pluie et la longueur des bourgeons axillaires est mesurée chaque jour pendant 7 jours.

## **2.2.4. METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES MICRO-ORGANISMES**

### **2.2.4.1. Préparation des souches**

#### **2.2.4.1.1. Prélèvement des germes**

Les micro-organismes sont prélevés soit de l'intérieur d'un organe d'animal : l'intestin par exemple, ou du trou d'une dent cariée à l'aide d'une öse ; soit à partir des cultures disponibles dans le laboratoire de Microbiologie de la MPE.

Le frottis obtenu est monté entre lame et lamelle dans une goutte d'eau pour être observé à l'état frais.

#### **2.2.4.1.2. Observation à l'état frais**

L'observation au microscope optique au grossissement x 400 des micro-organismes vivants permet d'étudier :

- leur morphologie : bâtonnet, coque, virgule, ...
- leur mobilité : mobiles ou immobiles ;
- leur mode de groupement : isolés ou groupés : diploïdes, en grappe, en chaînette,...

#### **2.2.4.1.3. Enrichissement des germes**

Après avoir confirmé la présence des micro-organismes dans le prélèvement par observation à l'état frais, un frottis est ensemencé dans un bouillon nutritif ou mis en culture sur de la gélose nutritive solide pour permettre la multiplication des cellules microbiennes. La préparation est incubée à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24h.

#### **2.2.4.1.4. Isolement et purification**

La purification consiste à cultiver plusieurs fois successives sur un milieu spécifique, les germes prélevés à partir de la culture enrichie précédente, jusqu'à l'obtention de souches pures.

Les souches pures sont caractérisées par :

- des colonies homogènes, uniformes et identiques du point de vue de la forme, la transparence, l'aspect de la surface, la consistance, la couleur,...
- des cellules uniformes et identiques du point de vue de la taille, la forme, la mobilité, le mode de groupement,...
- des micro-organismes à caractères biochimiques identiques.

#### **2.2.4.1.5. Réactivation des souches**

Certains milieux spécifiques de bactéries déterminées contiennent des inhibiteurs de la croissance d'autres micro-organismes. Les bactéries qui poussent sur ces milieux sont aussi exposées à ces inhibiteurs. Après l'obtention de souches pures sur ces milieux, il est par conséquent nécessaire de recultiver les bactéries sur de la gélose nutritive pour rétablir le métabolisme bactérien.

### **2.2.4.2. Identification et caractérisation des souches**

(SINGLETON, 1994 ; MAURY, 1987)

#### **2.2.4.2.1. Méthode de coloration de GRAM**

Cette méthode permet la classification des bactéries en deux groupes : les bactéries GRAM positif dont la paroi est très riche en muco-complexes et pauvre en lipides ; et les bactéries GRAM négatif dont la paroi est pauvre en muco-complexes mais riche en lipides.

Un frottis de souche pure est étalé en couche mince sur une lame à l'aide d'une öse. Il est fixé sur la lame par 3 passages successifs au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen. Le frottis est réhydraté, recouvert d'une solution de violet de gentiane phéniqué pendant 1min, puis rincé à l'eau. Il est ensuite recouvert de lugol puis rincé à l'eau. La lame est décolorée par l'alcool 95° puis rincée avec l'eau.

Le frottis ainsi traité est ensuite recoloré avec de la fuschine phéniquée de ZIEHL pendant 30s et lavé à l'eau. La lame est séchée à l'air libre et la préparation est recouverte d'huile d'immersion (huile de cèdre) pour augmenter la visibilité des cellules au microscope.

Les bactéries GRAM positif gardent la coloration violette après l'action de l'alcool tandis que les bactéries GRAM négatif sont décolorées par l'alcool et teintées en rose plus ou moins vif par la fuschine.

#### **2.2.4.2.2. Détermination des caractères biochimiques (BARTOLI et coll., 1972)**

Les bactéries peuvent être identifiées grâce à leurs caractères biochimiques. La détermination consiste à ensemencer les souches sur des milieux d'identification spécifiques et à observer le changement de coloration de ces milieux. L'incubation a lieu à 37°C pendant 18 à 24h.

##### **2.2.4.2.2.1. Culture sur milieu citrate de SIMMONS**

L'ensemencement de la souche à étudier se fait par piqûre du milieu du fond vers la surface. Les bactéries utilisant le citrate sont dites citrate positif (test positif). Dans ce cas, la coloration vire du jaune au bleu.

##### **2.2.3.2.2.2. Culture sur milieu HAJNA-KLIGLER : lactose-glucose-H<sub>2</sub>S**

Le milieu est à base de lactose et de glucose. L'ensemencement se fait du fond vers la surface par un mouvement de stries. La fermentation du glucose est observée au fond du tube,

celle du lactose à la surface du milieu. La coloration rouge indique que le test est négatif ; quand elle devient jaune, le test est positif.

La formation de sulfure d'hydrogène se traduit par l'apparition d'une coloration noire dans le milieu.

#### **2.2.4.2.2.3. Culture sur milieu mannitol-mobilité**

Ce milieu semi-mou est ensemencé par piqûre centrale. L'utilisation du mannitol se traduit par le virage de la coloration du rouge au jaune. La mobilité des bactéries est reconnaissable par l'apparition de poussées de bactéries en dehors de la ligne d'ensemencement, sous forme d'une turbidité.

#### **2.2.4.2.2.4. Culture sur milieu urée-indole**

Une öse de cellules bactériennes est mise en suspension dans 0,5ml d'eau physiologique, et la suspension est mélangée directement avec le milieu urée-indole. Le virage de la coloration du jaune au rouge violacé témoigne de la présence de l'uréase bactérienne. Lorsque la coloration reste jaune, le test est négatif.

La présence d'indole dans le milieu est révélée par l'apparition d'un anneau rouge en surface, après addition de 3 gouttes de réactif de KOVACS

#### **2.2.4.2.2.5. Culture sur milieux LDC, ODC et ADH**

La culture dans ces milieux est pratiquée en anaérobiose. Elle consiste à remplir les 3 tubes contenant respectivement les milieux LDC, ODC et ADH (milieux liquides prêts à l'emploi) par la suspension microbienne. Les tubes sont fermés à fond après l'ensemencement.

Dans chaque tube, l'apparition d'une coloration rouge violacée indique que le test est positif (présence de décarboxylase dans les milieux LDC et ODC et présence de dihydrolase dans le milieu ADH).

#### **2.2.4.2.2.6. Test à l'ONPG**

Un disque imprégné d'ONPG est plongé dans 0,5ml de suspension bactérienne. La présence de la  $\beta$ -galactosidase bactérienne se traduit par l'apparition d'une coloration jaune.

### 2.2.4.2.2.7. Test de l'oxydase

Un frottis prélevé avec une öse est placé sur un disque imprégné d'oxalate de diméthylparaphénylène diamine et préalablement imbibé d'eau distillée. Le test est positif lorsque la coloration du disque devient violette.

Les modalités de lecture des résultats des différents tests d'identification sont résumées dans le *tableau 10*.

**Tableau 10** : Tableau récapitulatif des différents tests d'identification

(LIVRET TECHNIQUE, 1996)

MILIEU	SUBSTRAT ou REACTIFS	REACTIONS ou ENZYMES	COLORATION	
			Test négatif	Test positif
<b>Citrate de Simmons</b>	<b>Citrate de sodium</b>	Utilisation de sodium	Jaune	Bleu
<b>Lactose</b>	Lactose	Fermentation/oxydation	Rouge	Jaune
<b>Glucose</b>	Glucose	Fermentation/oxydation	Rouge	Jaune
<b>H<sub>2</sub>S</b>	<b>Thiosulfate de sodium</b>	Production de H <sub>2</sub> S	Incolore	Noir
<b>Mannitol</b>	Mannitol	Fermentation/oxydation	Rouge	Jaune
<b>Mobilité</b>		Mobilité	Immobile	Mobile
<b>Urée</b>	Urée	Uréase	Jaune	Rouge violacé
<b>Indole</b>	Tryptophane	Production d'indole	Jaune	Rouge
<b>ONPG</b>	Ortho-nitro-phényl β D-galactopyranoside	β -glycosidase	Incolore	Jaune
<b>LDC</b>	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Rouge violacé
<b>ODC</b>	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge violacé
<b>ADH</b>	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge violacé
<b>Oxydase</b>	Oxalate de diméthylparaphénylamine diamine	Cytochrome oxydase	Incolore	Violet

### **2.2.4.3. Méthodes de détermination des effets sur les bactéries**

(CHABBERT et TERRIAL, 1963)

La sensibilité des micro-organismes vis-à-vis d'un agent anti-microbien peut être déterminée soit en milieu liquide soit en milieu solide.

#### **2.2.4.3.1. Méthode en milieu liquide**

##### **2.2.4.3.1.1. Principe**

En milieu liquide, l'inhibition de la croissance bactérienne par un agent anti-microbien se traduit par l'absence de turbidité dans le milieu.

##### **2.2.4.3.1.2. Mode opératoire**

La culture de la souche à étudier est relancée dans le milieu liquide de Mueller-Hinton.

Différentes concentrations de l'extrait à tester sont préparées par dilutions successives d'une solution mère de concentration déterminée. La dilution se fait au demi avec de l'eau physiologique. Les solutions ainsi préparées sont ajoutées à 2ml de milieu de Mueller-Hinton préalablement préparés dans des tubes à hémolyse. Une öse de bactéries estensemencée dans chaque tube. Le volume final dans chaque tube est toujours 2,4ml.

Deux témoins sont constitués :

- ♣ un témoin positif contenant seulement 2ml de milieu, montrant l'absence de croissance bactérienne,
- ♣ un témoin négatif contenant 2ml de milieuensemencé avec une öse de germes, montrant la croissance bactérienne.

Le volume dans les tubes témoins est ajusté à 2,4ml avec l'eau physiologique. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 18 à 24h.

La lecture des résultats se fait à l'œil nu, la turbidité dans le milieu indique la croissance des bactéries alors que sa limpidité témoigne de l'inhibition de cette croissance.

### 2.2.4.3.2. Méthode en milieu solide

#### 2.2.4.3.2.1. Principe

Lorsqu'un antibiotique est déposé en un point d'une surface uniformémentensemencée avec des germes, une zone d'inhibition de la croissance microbienne ou halo d'inhibition est observée autour de l'antibiotique en cas de sensibilité. Le diamètre de cette zone est fonction directe du degré de sensibilité du microbe étudié.

#### 2.2.4.3.2.2. Mode opératoire

##### 2.2.4.3.2.2.1. *Préparation de l'inoculum et ensemencement*

Une suspension microbienne est préparée en mélangeant une öse de bactéries avec 1ml de sérum physiologique. La surface du milieu gélosé de Müeller-Hinton préalablement coulé dans une boîte de Pétri est uniformément inondée avec la suspension ainsi obtenue. L'excès de suspension est aspiré et jeté.

##### 2.2.4.3.2.2.2. *Dépôt d'extrait*

Un disque d'antibiogramme vierge est imbibé de 20µl d'extrait à tester de concentration connue. Le disque ainsi traité est placé à la surface de la gélose préalablementensemencée ci-dessus. Dans chaque boîte, 4 disques sont déposés sur le milieu : 2 disques imprégnés de l'extrait à tester et 2 autres imprégnés d'antibiotiques de référence de quantité connue. La liste des antibiotiques utilisés et leurs germes-cibles est donnée dans le *tableau 11*.

**Tableau 11** : Liste des antibiotiques utilisés et leurs germes-cibles

Nom des antibiotiques	Amoxicilline	Ampicilline	Colistine	Erythromycine
<b>Germes-cibles</b>	<i>Pasteurella</i> <i>Salmonella</i> <i>Shigella</i>	<i>Klebsiella</i> <i>Proteus</i> <i>Pseudomonas</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Staphylococcus</i>

La boîte est incubée à 37°C pendant 18 à 24h. La lecture des résultats consiste à mesurer le diamètre du halo d'inhibition selon les normes préconisées par l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) suivantes :

**Tableau 12** : Normes utilisées dans l'expression des résultats des tests en milieu solide

Diamètre du halo (x)	Sensibilité des germes	Expression de résultats
$x < 7\text{mm}$	Insensible	-
$7\text{mm} \leq x \leq 8\text{mm}$	Assez sensible	+
$8\text{mm} < x \leq 9\text{mm}$	Sensible	++
$x > 9\text{mm}$	Très sensible	+++

### 3. RESULTATS

#### 3.1. EFFETS SUR LES ANIMAUX

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

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

###### 3.1.1.1.1. Influence des différentes voies d'administration

Les effets des principes actifs administrés à un animal peuvent être influencés par la voie d'administration (DUMAS, 1953 ; TALBOT, 1989).

Deux voies d'administration ont été essayées pour tester les effets de l'extrait purifié E2 ou extrait : voie orale et voie intrapéritonéale (méthode décrite au § 2.2.1.1.p.37). Les résultats montrent qu'à la même dose 840mg/kg (dose à laquelle les souris développent les mieux les symptômes par voie ip) administrée à 2 lots de 2 souris, les effets varient selon la voie d'administration (*tableau 13*).

**Tableau 13** : Influence des voies d'administration

Voie d'administration	Observation
Intrapéritonéale	Apparition de symptômes
Orale	Absence de symptômes

L'administration de l'extrait à 840mg/kg par voie orale ne suscite aucun symptôme chez la souris, tandis que celle par voie intrapéritonéale provoque l'apparition de symptômes qui sont décrits dans le paragraphe suivant.

### 3.1.1.1.2. Description des symptômes

Les symptômes développés par l'administration par voie ip de l'extrait E2 à la dose de 840mg/kg sont les suivants : 4min après l'injection, la souris présente une hypoactivité motrice. Les yeux sont rouges et une exophtalmie est notée. Vers la 6<sup>ème</sup> minute, une légère ataxie accompagnée d'une hyperpnée sont observées. Les poils sont hérissés, les oreilles tirées vers l'avant. Vers la 24<sup>ème</sup> minute, la tête de la souris tremble. Puis la souris se rétablit progressivement et vers la 36<sup>ème</sup> minute, elle est remise.

### 2.1.1.1.3. Examen histopathologique

L'examen histopathologique (voir méthode 2.2.1.1.2.p.37) est pratiqué après l'administration de la dose d'extrait 840mg/kg par voie ip. Les animaux sont sacrifiés 12h après l'injection, temps au bout duquel les symptômes se sont bien développés. L'extrait provoque chez la souris l'atteinte des organes suivants: l'estomac, le foie, l'intestin, les reins et les poumons. Les lésions se traduisent toutes par l'apparition d'une nappe hémorragique mais elles sont plus accentuées au niveau du foie et des reins.

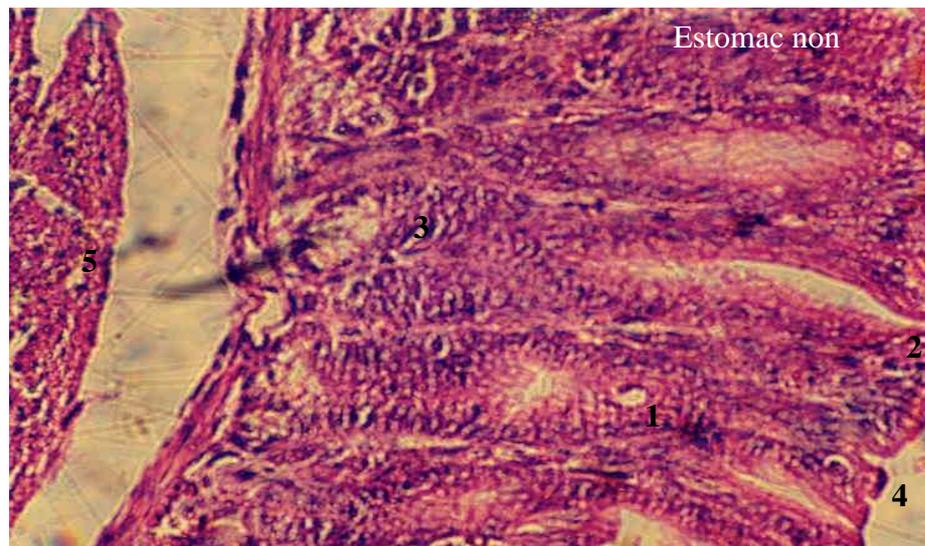
Par contre, aucune lésion n'est observée au niveau du cœur et du cerveau. Les différentes lésions sont montrées sur les *figures 5 à 9* et résumées dans le *tableau 14*.

**Tableau 14** : Les principales lésions histologiques provoquées par la dose de 840mg/kg d'extrait, administrée par voie ip

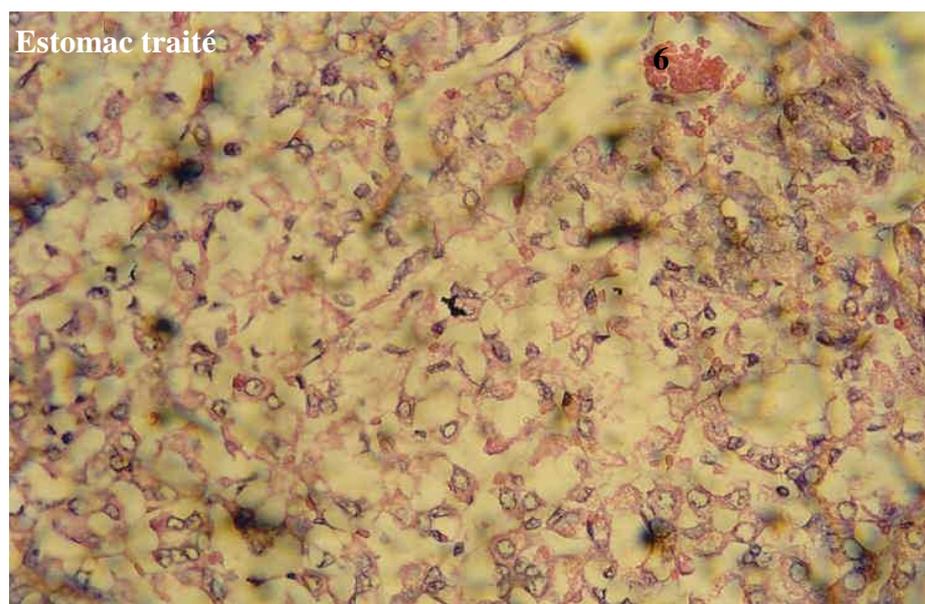
Organes	Lésions de l'organe	Localisation
Estomac	Nappe hémorragique	Séreuse
Foie	Nappe hémorragique	Veine centro-lobulaire
Intestin	Nappe hémorragique	Séreuse
Reins	Nappe hémorragique	Glomérule
Poumons	Nappe hémorragique	Alvéole

### 3.1.1.2. Effets sur les hématies de mouton

Les extraits E1 et E2 ont été simultanément testés, à titre comparatif (voir méthode 2.2.1.2.2.2.p.39). Les résultats obtenus sont présentés dans le *tableau 15* et sur la *figure 10*.

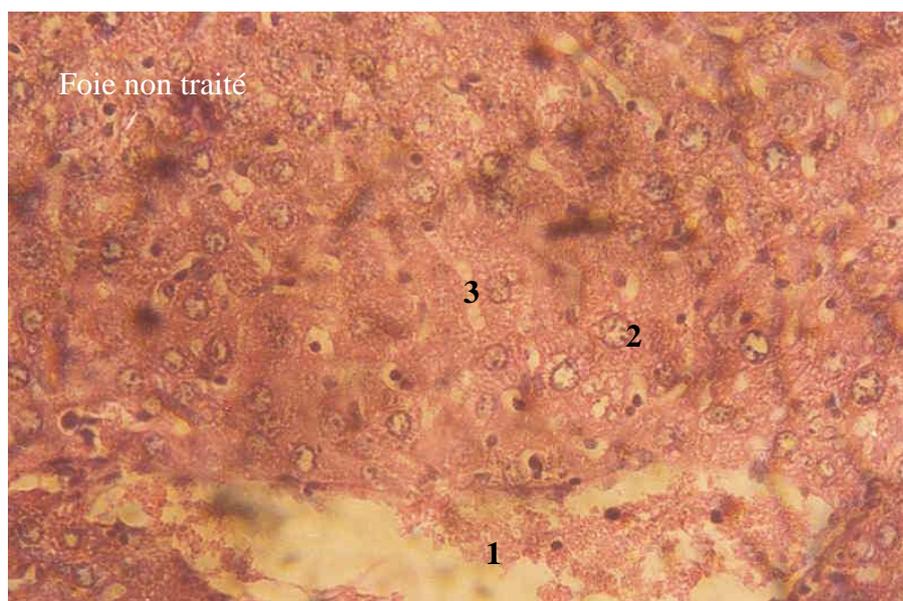


a)

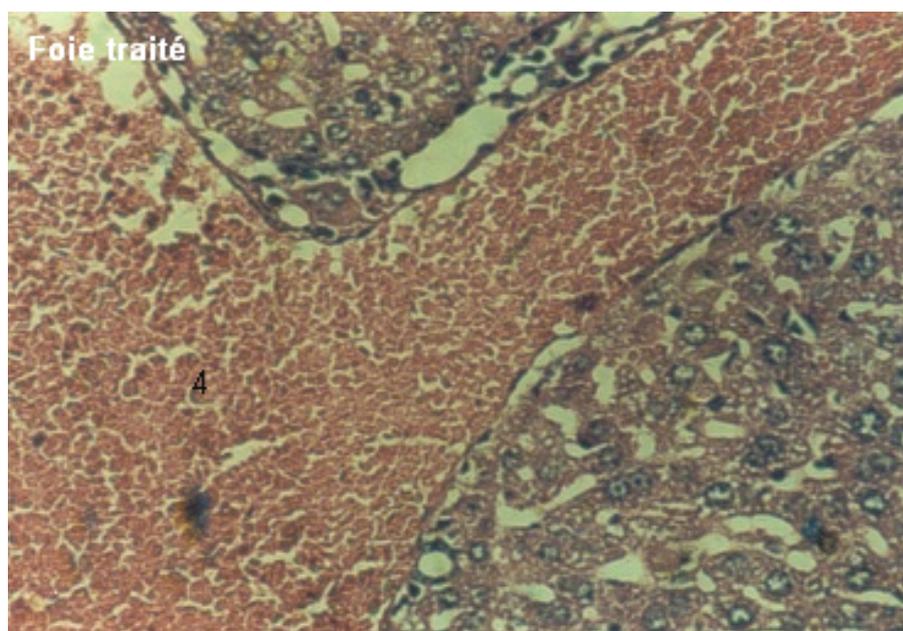


b)

**Figure 5 :** Lésions histologiques au niveau de l'estomac dues à l'administration par voie ip de l'extrait à la dose de 840mg/kg de poids (Grossissement x400)  
 a) estomac non traité b) estomac traité  
 1) muqueuse 2) bordure épithéliale 3) glande 4) cavité gastrique 5) muscle  
 6) nappe hémorragique

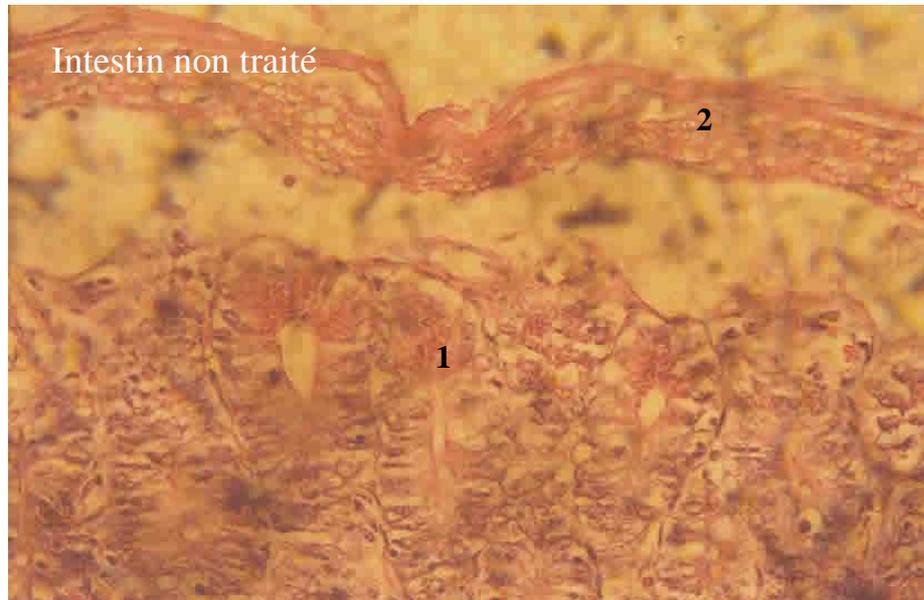


c)

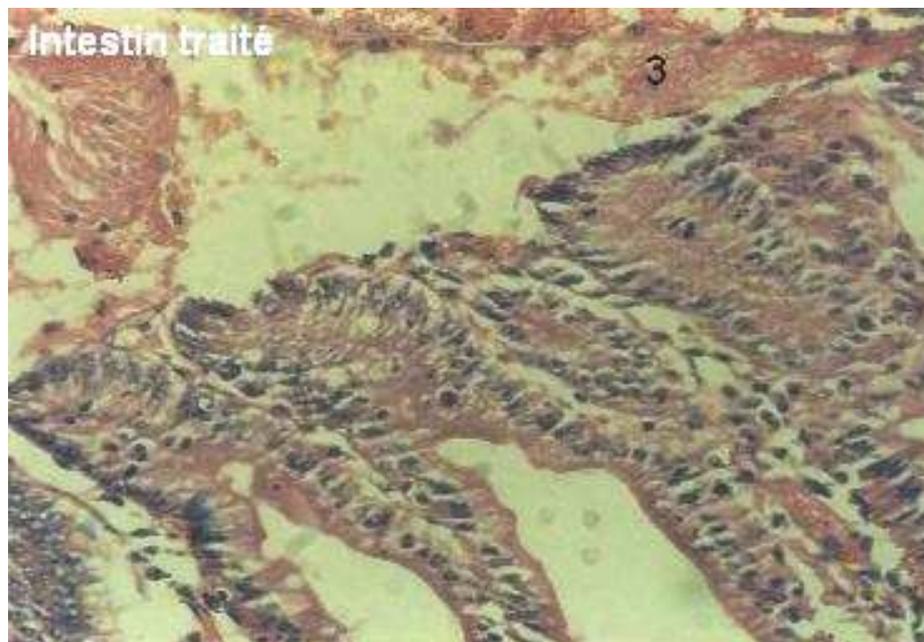


d)

**Figure 6** : Lésions histologiques au niveau du foie dues à l'administration par voie ip de l'extrait à la dose de 840mg/kg de poids (Grossissement x400)  
 c) foie non traité d) foie traité 1) veine centro-lobulaire 2) hépatocyte  
 3) capillaire sinusöide 4) nappe hémorragique

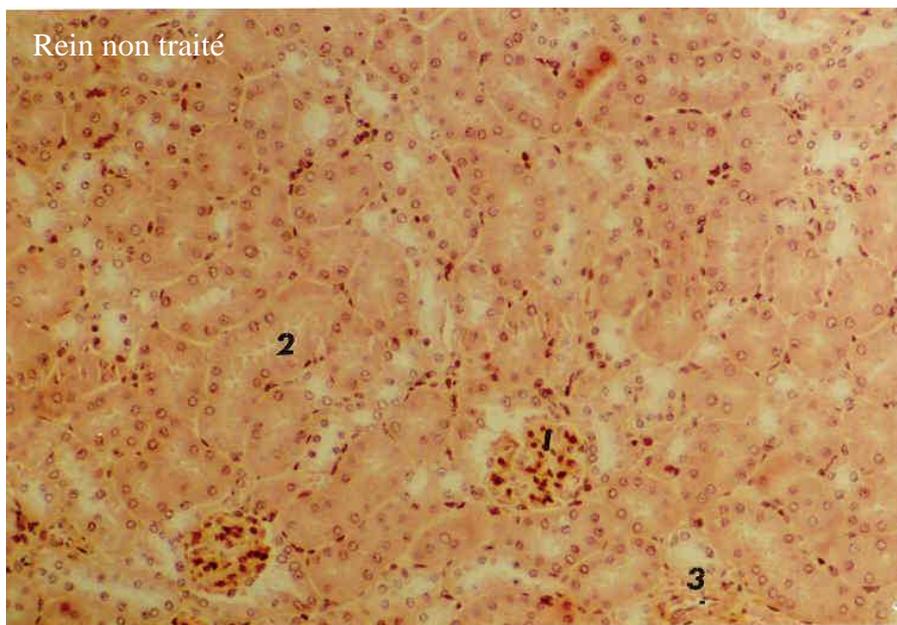


e)

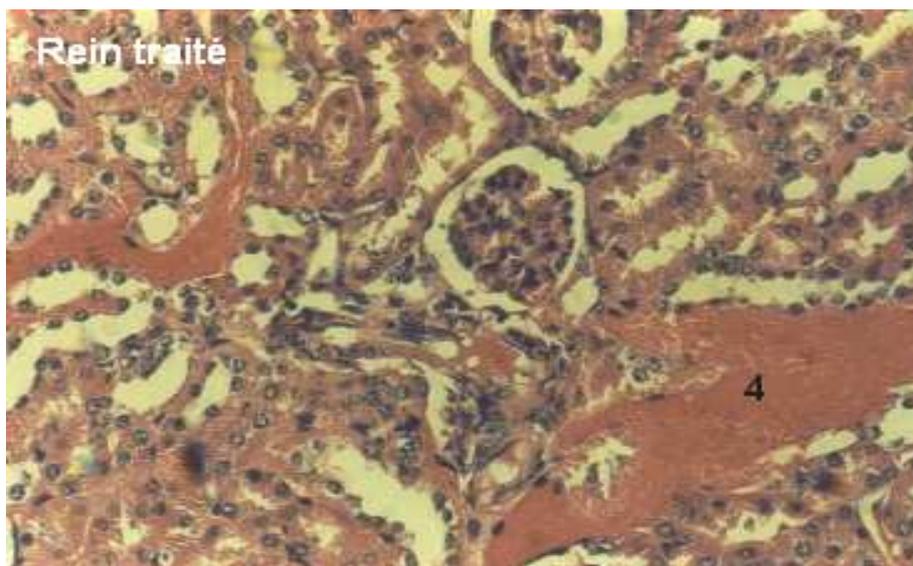


f)

**Figure 7** : Lésions histologiques au niveau de l'intestin dues à l'administration par voie ip de l'extrait à la dose de 840mg/kg de poids (Grossissement x400)  
e) intestin non traité f) intestin traité 1) muqueuse 2) séreuse 3) nappe hémorragique

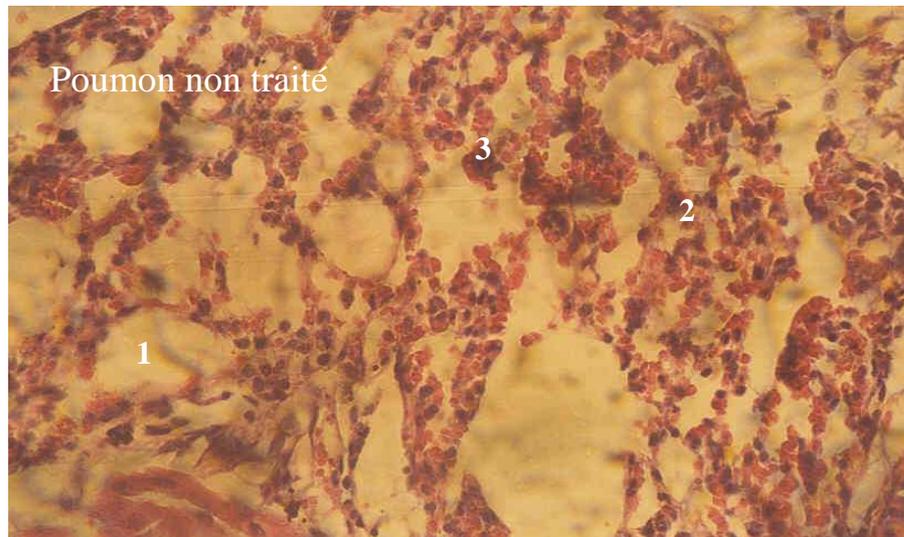


g)

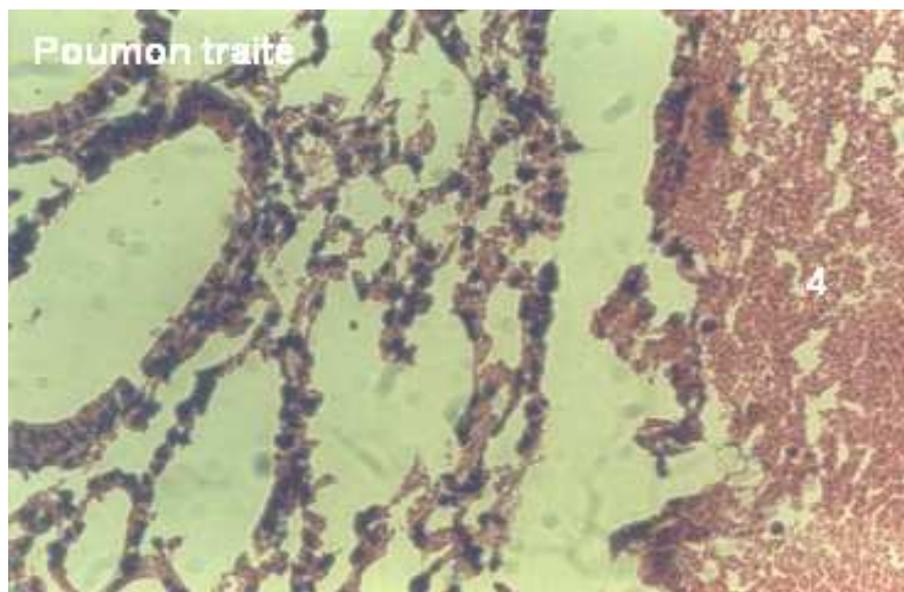


h)

**Figure 8** : Lésions histologiques au niveau des reins dues à l'administration par voie ip de l'extrait à la dose de 840mg/kg de poids (Grossissement x400)  
g) rein non traité h) rein traité 1) glomérule 2) tubule 3) capillaire 4) nappe hémorragique



i)



j)

**Figure 9** : Lésions histologiques au niveau des poumons dues à l'administration par voie ip de l'extrait à la dose de 840mg/kg de poids (Grossissement x400)  
 i) poumon non traité j) poumon traité 1) alvéole 2) tissu inter-alvéolaire  
 3) capillaire 4) nappe hémorragique

**Tableau 15** : Résultats des tests hémolytiques des extraits E1 et E2

Concentration (mg/ml)	T	T	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,007	0,003	0,001
Résultats pour l'extrait E1	+	-	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
Résultats pour l'extrait E2	+	-	+	+	+	+	±	±	±	±	±	-

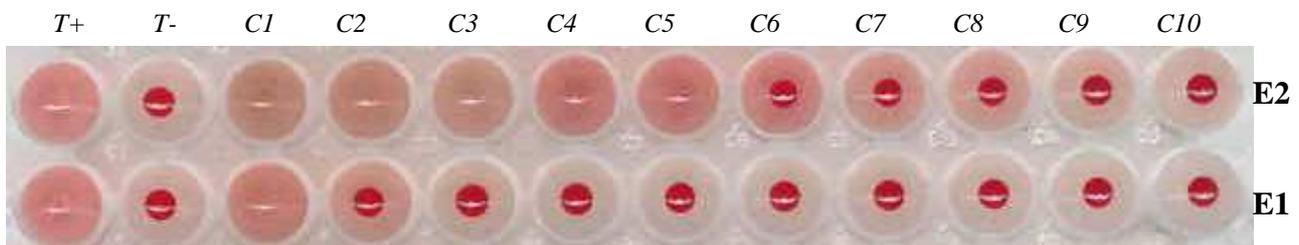
T+: témoin positif (eau distillée)

+ : hémolyse totale

T- : témoin négatif (PBS)

± : hémolyse partielle

- : absence d'hémolyse



**Figure 10** : Résultats des tests hémolytiques sur le sang de mouton pour les extraits E1 et E2 ; Concentrations en mg/ml C1 : 1 ; C2 : 0,5 ; C3 : 0,25 ; C4 : 0,125 ; C5 : 0,062 ; C6 : 0,031 ; C7 : 0,015 ; C8 : 0,007 ; C9 : 0,003 ; C10 : 0,001

Les extraits montrent une activité hémolytique. Cependant, cette activité varie selon les concentrations de chaque extrait testé. Pour l'extrait E1, les résultats suivants sont observés :

- l'hémolyse est totale à des concentrations supérieures ou égales à 1mg/ml ;
- l'hémolyse est partielle à 0,5mg/ml ;
- une absence d'hémolyse est observée à des concentrations inférieures ou égales à 0,25mg/ml.

Pour l'extrait E2, les résultats sont les suivants :

- une hémolyse totale est obtenue à des concentrations supérieures ou égales à 0,062mg/ml ;
- une hémolyse partielle apparaît à des concentrations comprises entre 0,031mg/ml et 0,003mg/ml ;
- une absence d'hémolyse est observée à des concentrations inférieures ou égales à 0,001mg/ml.

Il apparaît ainsi que le pouvoir hémolytique de l'extrait E2 est plus élevé que celui de l'extrait E1.

### 3.1.2. EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG FROID

Les effets de l'extrait E2 ont été testés sur les larves de moustique, les têtards de grenouille et les poissons.

#### 3.1.2.1. Effets sur les larves de moustique

Six lots de 7 larves de moustique ont été soumis à différentes concentrations d'extrait purifié E2. L'extrait initial de concentration de 16µg/ml (100% de mortalité) est dilué en cascade avec un coefficient de dilution de 1/1,1 selon la méthode présentée au § 2.2.2.1.p.40.

Les larves mortes ne bougent pas lorsqu'on les touche avec une aiguille dans la région cervicale. Les larves moribondes sont incapables d'atteindre la surface ou présentent des mouvements désordonnés ou un état de rigidité. Les larves moribondes sont comptées comme mortes. Les résultats obtenus sont exprimés dans le *tableau 16*.

**Tableau 16** : Résultats des tests sur les larves de moustique

Concentration C (µg/ml)	log C	Nombre de larves		% de décès
		Mortes	Survivantes	
16	1,204	7	0	100
14,4	1,158	5	2	71,42
12,96	1,112	4	3	57,14
11,66	1,064	3	4	42,86
10,5	1,021	1	6	14,29
9,45	0,975	0	7	0

D'après ces résultats, l'extrait est toxique pour les larves de moustique. Un effet-dose est observé.

L'équation de la droite de régression linéaire de la relation % de décès=f(log C) est de  $Y = -417,45 + 427,06 \log C$  avec un coefficient de corrélation  $r = 0,99$ . D'après cette équation, la CL50 (24h) est estimée à **12,43µg/ml**.

### 3.1.2.2. Effets sur les têtards de grenouille

Les 6 lots de 7 têtards ont été traités avec différentes concentrations décroissantes d'extrait, allant de 15µg/ml à 8,86µg/ml et préparées selon la méthode décrite en 2.2.2.1 p.40. Le coefficient de dilution est de 1/1,1. Les résultats obtenus sont donnés dans le *tableau 17*.

***Tableau 17*** : Résultats des tests sur les têtards de grenouille

Concentration C (µg/ml)	log C	Nombre de têtards		% de décès
		Morts	Survivants	
15	1,176	7	0	100
13,5	1,13	6	1	85,71
12,15	1,084	5	2	71,42
10,94	1,039	3	4	42,86
9,84	0,992	0	7	0

A partir de la concentration 10,94µg/ml, l'extrait est toxique pour les têtards de grenouille. Un effet-dose est observé. L'équation de la droite de régression linéaire de la relation % de décès=f(log C) est de  $Y = -470,15 + 490,09 \log C$  avec un coefficient de corrélation  $r = 0,97$ . D'après cette équation la CL50 (24h) est évaluée à **11,51µg/ml**.

### 3.1.2.3. Effets sur les poissons

Les 6 lots de 7 poissons ont été soumis à des concentrations décroissantes d'extrait de 20µg/ml à 15,48µg/ml avec un coefficient de dilution 1/1,05 (voir § 2.2.2.1. p.40). Les résultats sont résumés dans le *tableau 18*.

***Tableau 18*** : Résultats des tests sur les poissons

Concentration C (µg/ml)	log C	Nombre de poissons		% de décès
		Morts	Survivants	
20	1,301	7	0	100
19	1,278	6	1	85,42
18,05	1,256	5	2	71,42
17,15	1,234	3	4	42,86
16,29	1,211	1	6	14,29
15,48	1,189	0	7	0

L'extrait E2 montre une toxicité sur les poissons. On note un effet-dose. L'équation de la droite de régression linéaire de la relation % de décès=f(log C) est de  $Y = -1128,53 + 948,65 \log C$  avec un coefficient de corrélation  $r = 0,99$ . D'après cette équation la valeur de la CL50 (24h) est évaluée à **17,47 µg/ml**.

### **3.2. EFFETS DE L'EXTRAIT SUR LES VEGETAUX**

Trois expériences ont été réalisées pour étudier les effets de l'extrait E2 sur les végétaux : étude des effets sur le pouvoir germinatif de graines, sur la croissance des jeunes plantules et sur la croissance des bourgeons axillaires.

#### **3.2.1. EFFETS SUR LE POUVOIR GERMINATIF DE GRAINES**

La méthode utilisée pour déterminer ces effets est présentée au paragraphe 2.2.3.1.p.41. Les effets de l'extrait E2 à 1mg/ml sur le pouvoir germinatif de graines sont présentés dans le *tableau 19*.

**Tableau 19** : Effets de l'extrait à 1mg/ml sur le pouvoir germinatif de graines

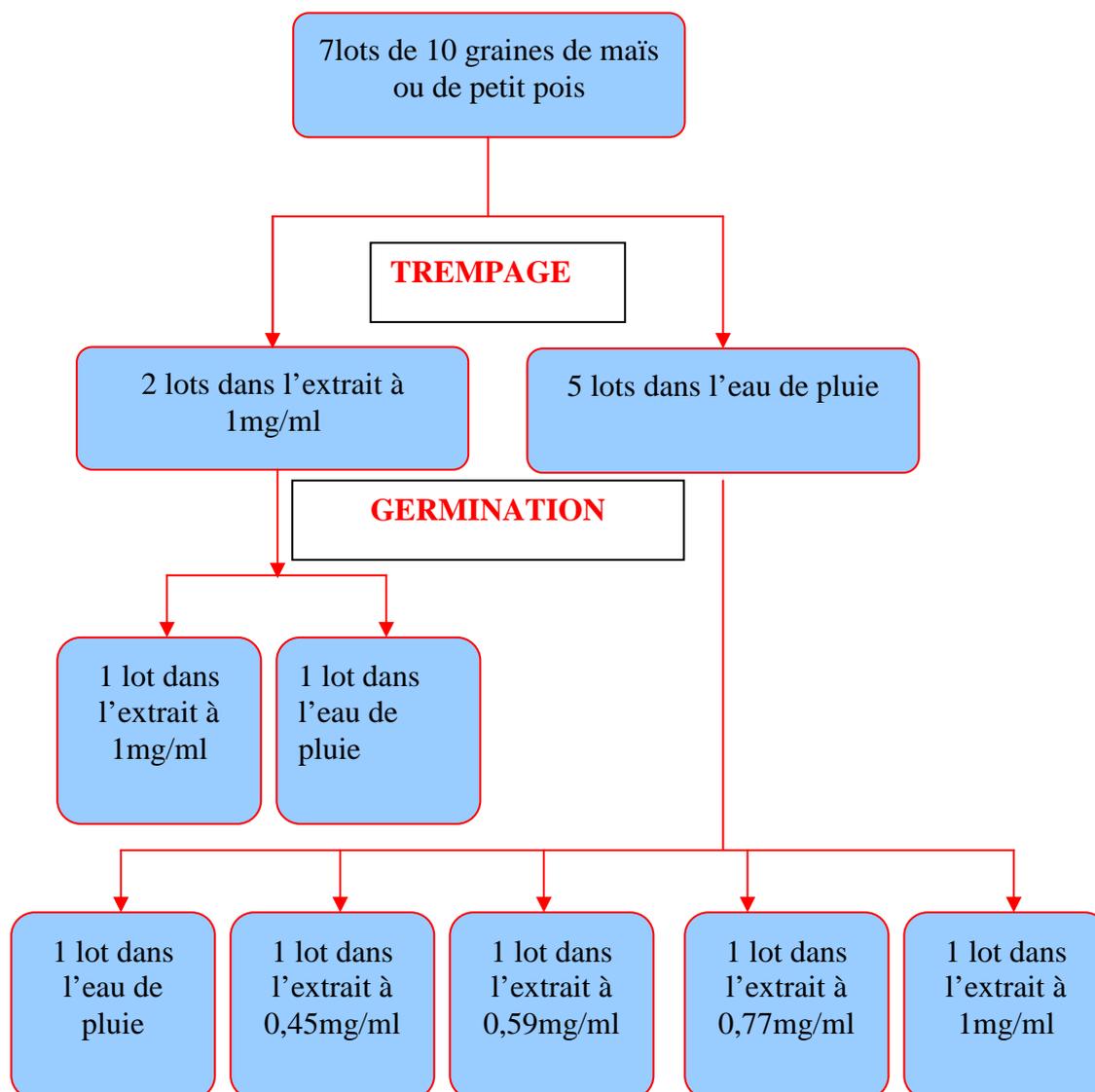
	<b>FAMILLE</b>	<b>ESPECE</b>	<b>NOM VERNACULAIRE</b>	<b>% DE GERMINATION</b>
<b>DICOTYLEDONES</b>	APIACEAE	<i>Daucus carota</i>	Carotte	40
		<i>Petroselinum crispum</i>	Persil chinois	10
	BRASSICACEAE	<i>Brassica sp</i>	Tissam-white	20
	COMPOSITAE	<i>Lactuca sativa</i>	Laitue	50
	CUCURBITACEAE	<i>Cucumis sativus</i>	Concombre	100
		<i>Cucurbita pepo</i>	Courgette	100
	FABACEAE	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Haricot	100
		<i>Pisum sativum</i>	Petit pois	50
SOLANACEAE	<i>Solanum nigrum</i>	Morelle noire	0	
<b>MONOCOTYLEDONES</b>	LILIACEAE	<i>Allium cepa</i>	Oignon	10
	POACEAE	<i>Oryza sativa</i>	Riz	60
		<i>Zea mays</i>	Maïs	60

La germination de graines de morelle noire est complètement inhibée par l'extrait ; par contre, celle du haricot, de la courgette et du concombre n'est pas affectée.

La germination des autres graines est affectée à des taux variables. L'inhibition de cette germination varie de 40% pour les graines de riz et maïs, à 90% pour les graines de persil chinois.

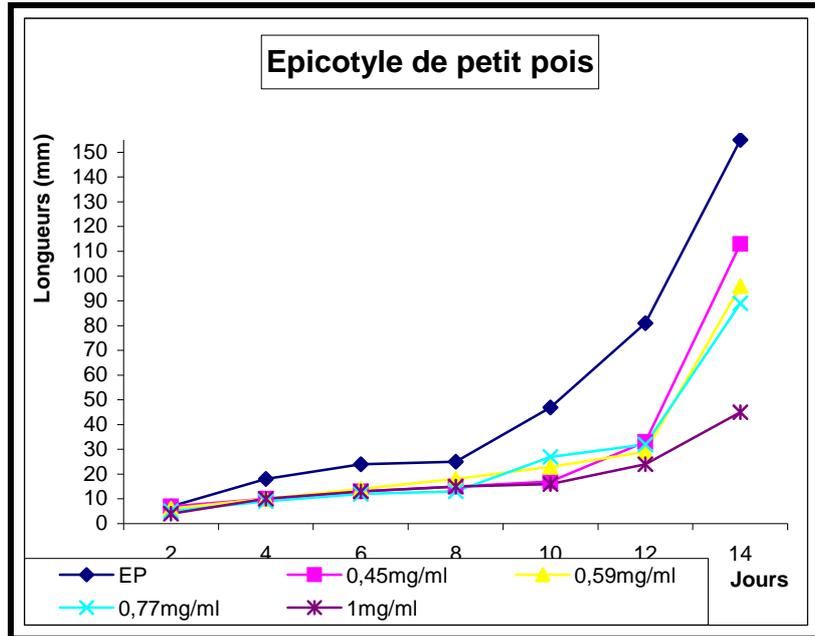
### 3.2.2. EFFETS SUR LA CROISSANCE DE JEUNES PLANTULES

En se basant sur les résultats ci-dessus, 2 espèces sensibles à l'extrait : le maïs (Monocotylédones) et le petit pois (Dicotylédones) ont été choisies pour réaliser les tests sur la croissance de jeunes plantules. Les étapes de l'expérience sont récapitulées sur la *figure 11*. La méthode utilisée est celle décrite au paragraphe 2.2.3.2.p.41.

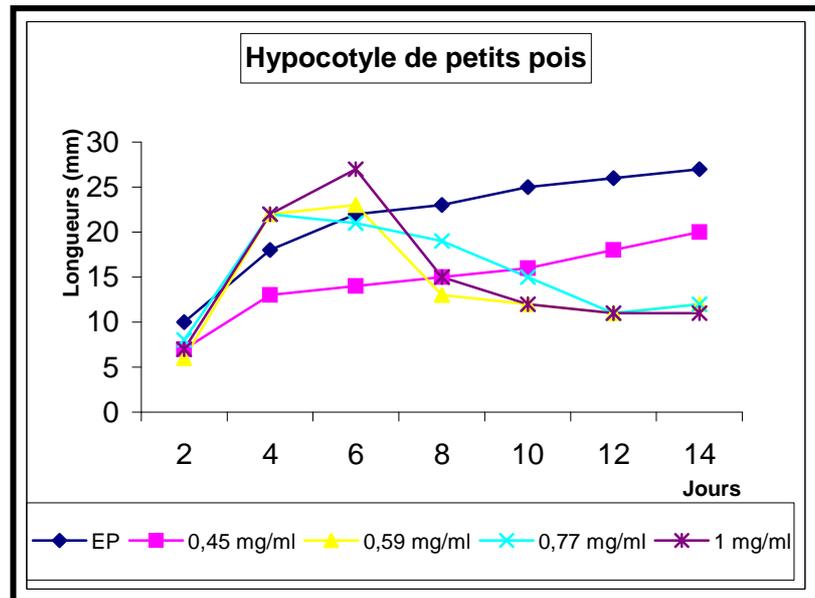


**Figure 11** : Étapes de l'expérience sur la croissance de jeunes plantules

L'évolution de la longueur de l'épicotyle et de l'hypocotyle de petit pois et de maïs pendant 14 jours est montrée sur les *figures 12* et *13*.



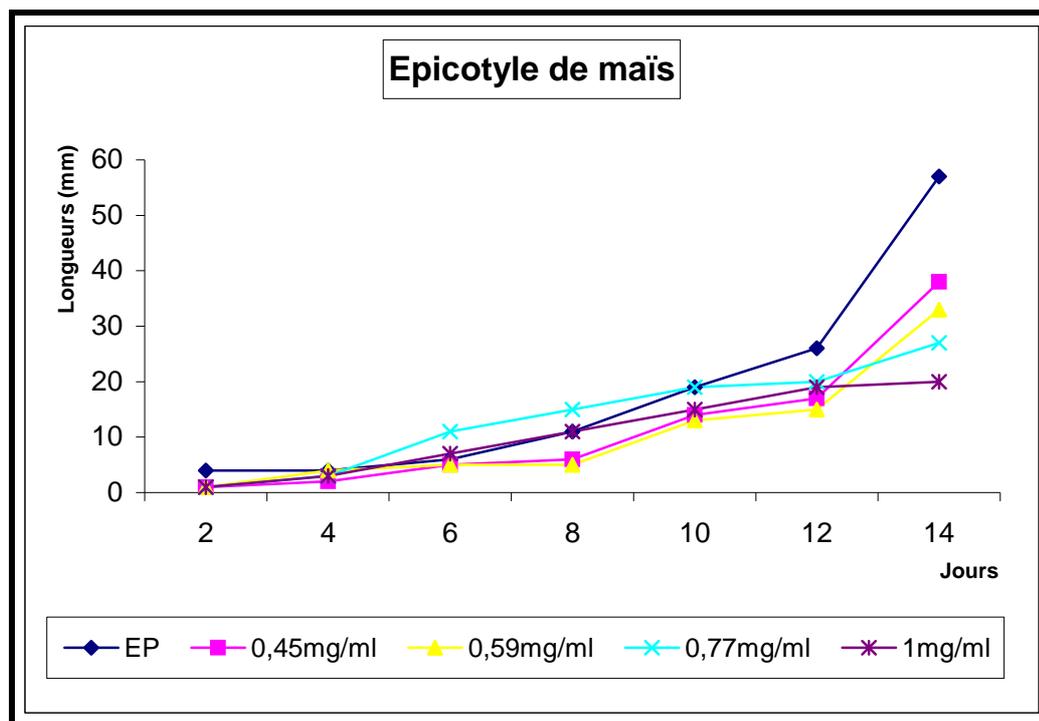
(A)



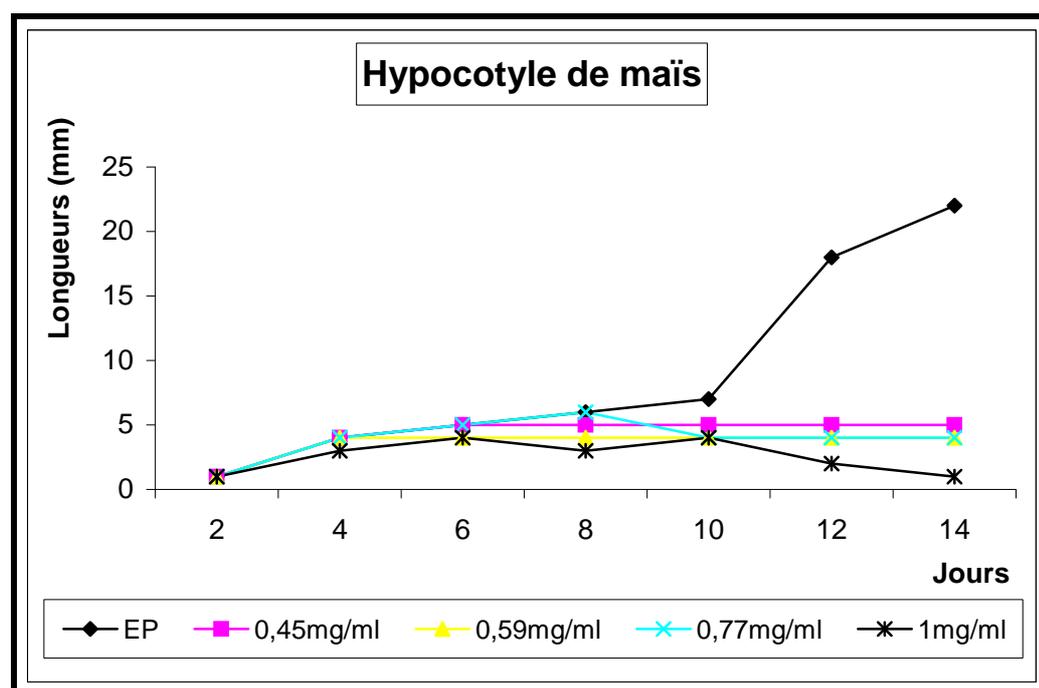
(B)

**Figure 12** : Evolution de la longueur de l'épicotyle (A) et de l'hypocotyle (B) de petit pois en présence des différentes concentrations de l'extrait.

EP : Eau de pluie



(C)



(D)

**Figure 13 :** Evolution de la longueur de l'épicotyle (C) et de l'hypocotyle (D) de maïs en présence de différentes concentrations de l'extrait.

EP : Eau de pluie

L'extrait E2 provoque à des degrés variables une inhibition de la croissance de l'épicotyle et de l'hypocotyle de petit pois et de maïs.

Pour le petit pois, l'inhibition de la croissance de l'épicotyle apparaît dès le 1<sup>er</sup> jour, puis s'accroît au 10<sup>ème</sup> jour. Celle de l'hypocotyle n'apparaît qu'à partir du 8<sup>ème</sup> jour, sauf pour la concentration 0,45mg/ml qui provoque une inhibition dès le 2<sup>ème</sup> jour.

La croissance de l'épicotyle de maïs est peu affectée par l'activité de l'extrait. Pour l'hypocotyle, l'inhibition se manifeste au 10<sup>ème</sup> jour.

Le taux d'inhibition de la croissance de l'épicotyle et de l'hypocotyle des deux plantes au 14<sup>ème</sup> jour, en fonction de la concentration de l'extrait est donné dans le *tableau 20*.

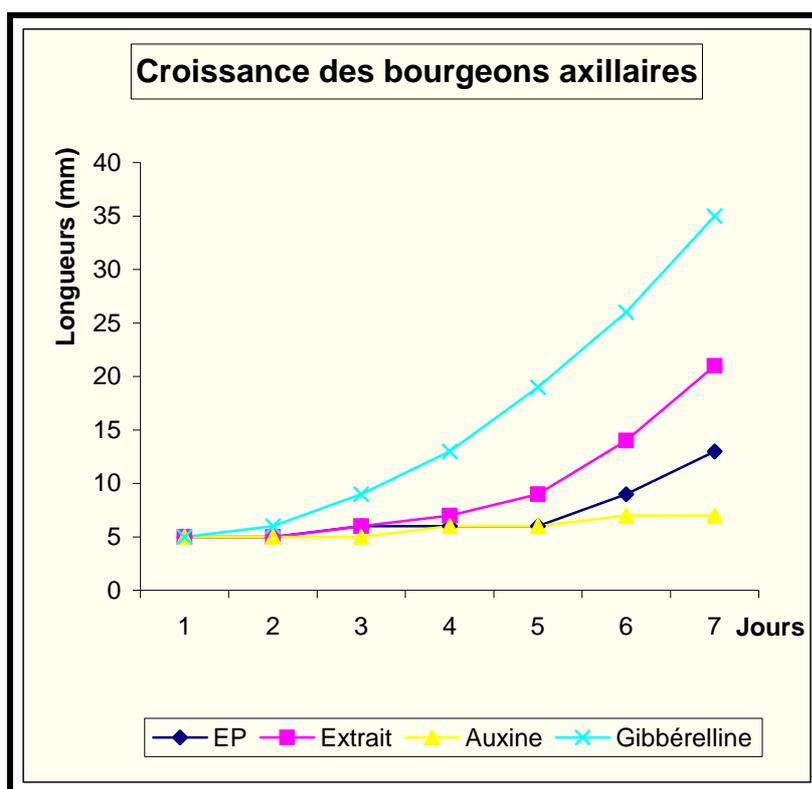
**Tableau 20** : Taux d'inhibition de la croissance de l'épicotyle et de l'hypocotyle de petit pois et de maïs au 14<sup>ème</sup> jour de l'expérience

		Graines trempées dans l'eau de pluie					Graines trempées dans l'extrait	
		<i>Eau de pluie</i>	<i>Extrait à 0,45mg/ml</i>	<i>Extrait à 0,59mg/ml</i>	<i>Extrait à 0,77mg/ml</i>	<i>Extrait à 1mg/ml</i>	<i>Eau de pluie</i>	<i>Extrait à 1mg/ml</i>
<b>Petit pois</b>	Longueur de l'épicotyle (mm)	155	113	96	89	45	76	12
	Taux d'inhibition	<b>0%</b>	<b>27,1%</b>	<b>38,07%</b>	<b>42,58%</b>	<b>70,96%</b>	<b>50,96%</b>	<b>92,25%</b>
	Longueur de l'hypocotyle (mm)	27	20	13	12	11	24	8
	Taux d'inhibition	<b>0%</b>	<b>25,02%</b>	<b>51,85%</b>	<b>55,55%</b>	<b>59,25%</b>	<b>11,11%</b>	<b>70,37%</b>
<b>Maïs</b>	Longueur de l'épicotyle (mm)	57	38	33	27	20	42	13
	Taux d'inhibition	<b>0%</b>	<b>33,33%</b>	<b>42,1%</b>	<b>52,63%</b>	<b>64,91%</b>	<b>26,31%</b>	<b>77,19%</b>
	Longueur de l'hypocotyle (mm)	22	5	4	4	1	14	2
	Taux d'inhibition	<b>0%</b>	<b>77,27%</b>	<b>81,81%</b>	<b>81,81%</b>	<b>95,45%</b>	<b>36,36%</b>	<b>90,9%</b>

Pour le maïs, l'inhibition de la croissance de l'hypocotyle est plus importante que celle de l'épicotyle et celle-ci augmente en fonction de la dose. Pour le petit pois, c'est la croissance de l'épicotyle qui est la plus touchée. Un effet-dose est observé dans ce dernier cas.

### 3.2.3. EFFETS SUR LA CROISSANCE DES BOURGEONS AXILLAIRES

L'expérience est réalisée sur des jeunes plantules de petit pois âgées de 7 jours (voir méthode au § 2.2.3.3.p.42). Les résultats des effets de E2 (28 $\mu$ g) sont étudiés parallèlement aux effets de l'auxine (une hormone inhibitrice de la croissance végétale) et de la gibbérelline (une hormone stimulatrice de la croissance végétale) à la même quantité. L'eau de pluie est utilisée comme témoin. Les effets de l'extrait sur la croissance des bourgeons axillaires en comparaison avec ceux de la gibbérelline, de l'auxine et l'eau de pluie sont donnés sur la *figure 14*.



**Figure 14** : Effet de l'extrait (28 $\mu$ g) sur la croissance des bourgeons axillaires en comparaison avec ceux de la gibbérelline (28 $\mu$ g), l'auxine (28 $\mu$ g) et l'eau de pluie ou EP (témoin)

D'après ces résultats, l'extrait stimule la croissance des bourgeons axillaires. Cependant, cette stimulation est faible par rapport à celle provoquée par la gibbérelline.

### 3.3. EFFETS SUR LES MICRO-ORGANISMES

#### 3.3.1. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES GERMES

Treize souches microbiennes ont été isolées et identifiées à partir de prélèvements ou de cultures disponibles au laboratoire de la MPE (méthode 2.2.4.p.42). La morphologie et les caractères biochimiques des micro-organismes sont indiqués dans le *tableau 21*.

**Tableau 21** : Résultats de l'identification et de la caractérisation des souches

Nom des souches	Forme	Gram	Citrate	Lactose	Glucose	H <sub>2</sub> S	Mannitol	Mobilité	Urée	Indole	ONPG	LDC	ODC	ADH	Oxydase
<i>Escherichia coli</i>	B	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	d	d	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	B	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	d	d	-
<i>Salmonella typhi</i>	B	-	-	d	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella paratyphi</i>	B	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	B	-	-	-	+	-	-	-	-	d	-	-	d	d	-
<i>Proteus mirabilis</i>	B	-	d	-	+	+	d	+	+	d	+	-	+	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	B	-	d	-	+	+	d	+	+	d	-	-	-	-	-
<i>Pasteurella multocida</i>	B	-	-	-	d	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>Pasteurella aerogenes</i>	B	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	C	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-
<i>Streptococcus</i>	C	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	B	-	+	+	+	+	d	+	-	-	+	-	+	+	-

B : bâtonnet

+ : test positif

C : coque

- : test négatif

d : test douteux

### 3.3.2. SPECTRE D'ACTIVITE MICROBIENNE

#### 3.3.2.1. Activité en milieu liquide

Les compositions des milieux utilisés (voir § 2.2.4.3.1.2.p.47) pour le test ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans le *tableau 22*.

***Tableau 22*** : Composition des milieux utilisés pour le test d'activité antimicrobienne et résultats du test

	Témoins		Tests		
	T+	T-	Tube 1	Tube 2	Tube3
<b>Milieu Müller-Hinton (ml)</b>	2	2	2	2	2
<b>Extrait à 38mg/ml (ml)</b>	0	0	0,4	0,2	0,1
<b>Germes (öse)</b>	0	1	1	1	1
<b>Eau physiologique (ml)</b>	0,4	0,4	0	0,2	0,3
<b>Volume final</b>	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
<b>Concentration finale de l'extrait (mg/ml)</b>	0	0	6,33	3,16	1,08
<b>Observation après 18 à 24h</b>	Limpide	Trouble	Trouble	Trouble	Trouble

T+ : témoin positif,

T- : témoin négatif

D'après ces résultats, même pour la plus grande concentration utilisée pour tester l'extrait (6,33mg/ml), la croissance des bactéries n'est pas inhibée. Les germes testés sont donc insensibles à l'extrait à des concentrations inférieures ou égales à 6,33mg/ml.

#### 3.3.2.2. Activité en milieu solide

Les disques utilisés ont reçu 20µl d'extrait à 38mg/ml, c'est-à-dire chaque disque contient 720µg d'extrait. Les résultats sont résumés dans le *tableau 23*. Les antibiotiques utilisés avec leurs quantités respectives sont présentés dans le *tableau 24*.

**Tableau 23** : Résultats du test d'activité antimicrobienne en milieu solide

Souches testées	Diamètre du halo (mm)	Sensibilité
<i>Escherichia coli</i>	7	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	-
<i>Salmonella typhi</i>	5	-
<i>Salmonella paratyphi</i>	5	-
<i>Shigella sonnei</i>	5	-
<i>Proteus mirabilis</i>	5	-
<i>Proteus vulgaris</i>	5	-
<i>Pasteurella multocida</i>	5	-
<i>Pasteurella aerogenes</i>	5	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	+
<i>Streptococcus</i>	6	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	-

+ : assez sensible

- : insensible

**Tableau 24** : Liste des antibiotiques utilisés avec leurs quantités respectives et leurs germes-cibles

Nom des antibiotiques	Quantité sur un disque	Germes-cibles
Amoxicilline	25µg	<i>Pasteurella</i> <i>Salmonella</i> <i>Shigella</i>
Ampicilline	10µg	<i>Klebsiella</i> <i>Proteus</i> <i>Pseudomonas</i>
Colistine	50µg	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter</i>
Erythromycine	15µg	<i>Streptococcus</i> <i>Staphylococcus</i>

Sur les 13 souches testées, seules 4 souches sont assez sensibles à l'effet inhibiteur de l'extrait : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* et *Escherichia coli*. L'extrait n'a aucun effet sur la croissance de *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella sonnei*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella aerogenes* et *Enterobacter cloacae*.

#### 4. DISCUSSION ET CONCLUSION

L'étude toxicologique de l'extrait E2 obtenu à partir de tubercules de *Dioscorea esculenta* montre qu'il a une activité sur des animaux, des végétaux et des micro-organismes.

L'extrait, administré par voie orale à la dose de 840mg/kg, ne provoque aucun symptôme sur la souris. L'alcaloïde administré pourrait soit être détruit par diverses enzymes du tube digestif, soit subir des modifications (méthylation, oxydation, hydrolyse,...) qui le rendraient inactif, soit encore ne pas être absorbé au niveau de l'intestin. Dans tous les cas, l'extrait ne présente pas la toxicité de la dioscorine ou de la dihydrodioscorine dont les DL100 sont respectivement de 110mg/kg et 160mg/kg (COURSEY, 1967 et NEUWINGER, 1996).

Par voie ip, l'extrait ne tue pas la souris à la dose de 840mg/kg, même si elle provoque des symptômes visibles : hypoactivité motrice, exophtalmie, légère ataxie, hyperpnée, piloérection et tremblement. La mydriase et la piloérection pourraient être dues à la stimulation des récepteurs adrénergiques  $\alpha$  (ou récepteurs  $\alpha$ ) au niveau du muscle lisse viscéral (COHEN, 1978). En effet, on sait que ces récepteurs sont stimulés par les alcaloïdes animaux tels que la dopamine, la noradrénaline, l'adrénaline.

D'après l'examen histopathologique, cette même dose provoque des lésions dans différents organes de la souris. Au niveau du foie, des reins, des poumons, de l'estomac et de l'intestin, on observe des nappes hémorragiques qui pourraient être la conséquence de la contraction intense des muscles lisses au niveau des artérioles et des veinules et de l'augmentation de la perméabilité. En effet, la stimulation des récepteurs  $\alpha$  provoque une vasoconstriction, qui implique une contraction des muscles lisses vasculaires. D'autre part, le foie est le plus touché parce qu'il est le premier organe de détoxification.

Le cœur et le cerveau ne présentent aucune lésion. Pour le cœur, ni le muscle strié cardiaque, ni le tissu nodal ne contiennent de récepteurs  $\alpha$ . L'extrait a pu atteindre le cœur mais il n'a pas pu probablement se fixer sur la membrane cellulaire cardiaque, ni la traverser.

Les cellules cervicales par contre contiennent des récepteurs  $\alpha$ , mais les vaisseaux irriguant le cerveau présentent une barrière hémato-encéphalique pouvant filtrer le sang. L'extrait ne franchirait probablement pas cette barrière, ou bien il l'a franchie mais sous une forme inactive.

L'extrait E2 provoque une hémolyse totale à des concentrations supérieures ou égales à 125 $\mu$ g/ml, tandis que l'extrait E1 ne présente une hémolyse totale qu'à des concentrations supérieures ou égales à 1000 $\mu$ g/ml. L'extrait E2 montre donc une activité hémolytique supérieure à celle de l'extrait E1.

Concernant les animaux à sang froid, l'extrait est toxique pour les larves de moustique, les têtards de grenouille et les poissons ; les CL50 pour ces animaux sont estimées respectivement à 12,43 $\mu$ g/ml ; 11,51 $\mu$ g/ml et 17,47 $\mu$ g/ml. L'extrait est plus toxique sur les animaux à sang froid : poissons et têtards de grenouille, que l'extrait toxique de *Dioscorea antaly* dont ces derniers restent insensibles à la concentration de 300 $\mu$ g/ml (RANDRIAMAMONJY, 2005).

L'extrait est beaucoup moins actif sur les larves de moustique par rapport au DDT dont la CL50 est de 0,012 $\mu$ g/ml (OMS, 1970). Néanmoins, l'utilisation de l'extrait comme insecticide est envisageable.

Chez les végétaux, l'extrait affecte le pouvoir germinatif de graines de quelques Monocotylédones et Dicotylédones à des taux variables.

Pour les jeunes plantules de petit pois et de maïs, la croissance de l'hypocotyle est la plus touchée mais celle de l'épicotyle est aussi affectée. Pour le petit pois, la comparaison des effets de l'extrait sur la croissance des bourgeons axillaires avec ceux des hormones stimulatrices (la gibbérelline) et inhibitrices (l'auxine) permet de dire que l'extrait stimule faiblement la croissance des bourgeons axillaires. Cette activité pourrait être exploitée dans le greffage pour améliorer la croissance des greffons.

La plupart des micro-organismes testés sont insensibles à l'extrait à la concentration de 38mg/ml. Seules quelques bactéries : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* et *Escherichia coli* sont assez sensibles. Les principes toxiques ne pourraient pas pénétrer la paroi de certaines bactéries ou l'extrait inhiberait leur croissance mais à une dose plus élevée.

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

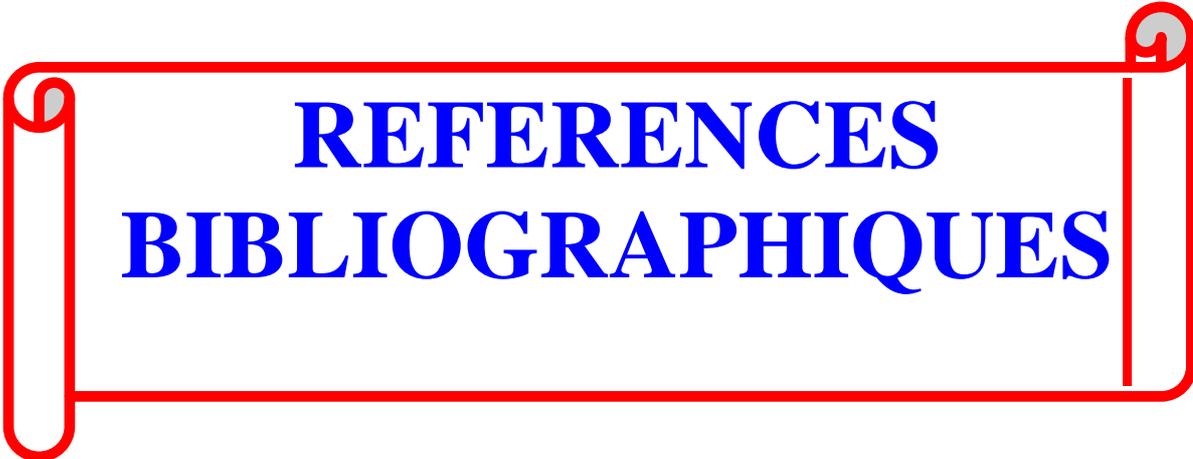
Les résultats que nous avons obtenus bien qu'ils soient encore préliminaires, ont permis :

- de mettre en évidence la présence d'alcaloïdes dans les tubercules de *Dioscorea esculenta* ;
- de proposer une méthode d'extraction et de purification des alcaloïdes ;
- d'avoir les premières informations sur les propriétés physico-chimiques et toxicologiques de ces alcaloïdes ;
- d'apporter des connaissances sur les Dioscoréacées toxiques.

Pour approfondir l'étude des propriétés de ces principes actifs, nous envisageons dans l'avenir :

- d'étudier la distribution des principes actifs dans les différentes assises des cellules de tubercules de *Dioscorea esculenta* ;
- d'améliorer le procédé d'extraction et de purification afin d'obtenir les principes actifs à l'état pur avec un bon rendement;
- d'approfondir l'étude de leurs propriétés physico-chimiques et d'élucider leur structure chimique ;
- d'approfondir l'étude de leurs propriétés biologiques et de procéder à la recherche d'autres activités ;
- d'étudier leur mécanisme d'action.





**REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

1. ADOLPHE M. Méthodes biologiques de la pharmacologie. In : COHEN Y., HOSPITAL M., LADURON P., LAMBERT F., RAPIN J. R., COURRIERE P., DANGOUMAU J., ELLENBERGER M., GODFRAIND T. et WERMUTH C. G. Pharmacologie moléculaire. Paris, New York, Barcelone, Milan : Masson, 1978, 4 ; 67-68.
2. AKE ASSI L. Diversification des utilisations des ignames : usage pharmaceutique traditionnel. In : BERTHAUD J., BRICAS N. et MARCHAND J-L. L'igname, plante séculaire et culture d'avenir. Actes du séminaire international Cirad-Inra-Orstom-Coraf, 3-6 juin 1997. Montpellier : 1998 ; 263-268.
3. ALOUF J. E. Cell membrane and cytolytic toxins. In : CUATRECASAS P. The specificity and actions of animal bacterial, and plant toxins (Receptors and recognition series B, 1). London : CHAPMAN and Hall, 1977 ; 221-270.
4. ANDRIANJAKANIRINA L. M. Etudes chimique et toxicologique de graines de *Physena madagascariensis* (PHYSENACEAE) [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2004 ; 75p.
5. AUDIGIER C., DUPON G. et ZONZAIN E. Principes des méthodes d'analyse biochimique, 3<sup>ème</sup> éd. Paris : Doin éditeur, 1992 ; T2, 190p.
6. AVRIL J., DABERNAT H., DENIS F. et MONTEL H. Bactériologie clinique, 2<sup>ème</sup> éd. Paris : Ellipses, 1992 ; 511p.
7. BARTOLI M., CHOUTEAU J., ETTORI D., BONNET D. et PAYENG. Utilisation en pratique journalière d'une nouvelle galerie d'identification des entérobactéries. Lyon : Pharma, 1972, 3 ; 269-275.
8. BIZZINI B. Tetanus toxin structure as a basis for elucidating its immunological and neuropharmacological activities. In : CUATRECASAS P. The specificity and actions of animal, bacterial, and plant toxins (Receptors and recognition series B, 1). London : CHAPMAN and Hall, 1977 ; 175-218.
9. BOITEAU P., BOITEAU M. et 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, 1999 ; 490p.

10. BOST R. Pharmacopée malgache. Mém. Inst. Sci. Madagascar. 1961 ; 2 ; 159-234.
11. BOURDON J. L., PILET C., TOMA B. et MARCHAL N. Techniques bactériologiques. Paris : Doin, 1973 ; 323p.
12. BOYD W. C. Fundamentals of immunology, 4<sup>ème</sup> éd. New York: Wiley and sons, 1966 ; 408p.
13. BRUNETON J. Elément de phytochimie et de pharmacognosie. Paris : TEC-Doc Lavoisier, 1987 ; 585p.
14. BUGNICOURT M. Dictionnaire de Microbiologie générale. Paris : Ellipse editor marketing S.A, 1995 ; 991p.
15. BURKILL I. H. 44<sup>ème</sup> famille : Dioscoraceae. In : HUMBERT H. Flore de Madagascar, famille 37 à 48. France : Firmin-Dipot, 1950 ; 5-7.
16. CHABBERT Y. et TERRIAL G. Sensibilité des microbes aux antibiotiques. In : LOISELEUR J. Techniques de laboratoire. Paris : Masson, 1963, T2 ; 373-378.
17. COHEN Y., HOSPITAL M., LADURON P., LAMBERT F., RAPIN J. R., COURRIERE P., DANGOUMAU J., ELLENBERGER M., GODFRAIND T., WERMUTH C. G. Pharmacologie moléculaire. Paris, New York, Barcelone, Milan : 1978, 4 ; 187p.
18. CORDELL G. A. Introduction to alkaloids, a biogenetic approach. New York : John Wiley, 1981; 441p.
19. COURSEY D. G. Yams. Toxic and Pharmacologically Active Constituents. Longman : 1997 ; 207-223.
20. COURTOIS J. E., PERLES R. Précis de chimie biologique, 2<sup>ème</sup> éd., 2<sup>ème</sup> tirage. Paris : Masson, 1972, T2 ; 711p.
21. COURVALIN P., GOLDSTEIN F., PHILLIPON A. et SISROT J. L'antibiogramme, 1<sup>ère</sup> éd. Paris : Masson, 1990 ; 334p.
22. CUATRECASAS P. The specificity and actions of animal, bacterial, and plant toxins (Receptors and recognition series B, 1). London : CHAPMAN and HALL, 1977 ; 345p.

23. DALTON D. R. The alkaloids the fundamental chemistry, a biogenetic approach. New York : Marcel Dekker, 1979 ; 565p.
24. DELARUE J. et LAUMONIER R. Pathologie spéciale. Paris : Flammarion, 1969 ; T3 ; 818p.
25. DELORT-LAVAL J. Facteurs antinutritionnels. In : DEYMIE B., MULTON J. L. et SIMON D. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires : analyse des constituants alimentaires. Paris : Apria, 1981, 4 ; 365-395.
26. DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE ET DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET ECOLOGIE VEGETALE. Fikarohana momba ny oviala maniry eto Madagasikara (Projet FADES, mai 2005) ; 92p.
27. DIEBOLD J. CAMILLARI J. P., REYNES M. et CALLARD P. Anatomie pathologique générale, 2<sup>ème</sup> éd. Paris : Technique et documentation Lavoisier, 1991 ; 331p.
28. Difco manual. Dehydrated culture media and reagent for microbiology, 10<sup>th</sup> edition. Paris : Difco laboratories, 1984 ; 1154p.
29. DUMAS J. Les animaux de laboratoire, mode d'inoculation des animaux. Paris : Flammarion, 1953 ; 651-657.
30. DUVAL J. et SOUSSY C. J. Antibiothérapie, 4<sup>ème</sup> éd. Paris : Masson, 1991 ; 188p.
31. EIGSTI O. J. et DUSTIN P. Colchicine in agriculture, medecine, biology and chemistry. USA : The lowa state college state press, 1955 ; 470p.
32. FERRON A. Bactériologie médicale. Paris : C. et R., 1994 ; 442p.
33. FOUILLOUZE G. Chimie qualitative et quantitative appliquée, 2<sup>ème</sup> éd. Imprimerie de Trévoux : 1951, T2 ; 197p.

34. GANTER P. et JOLES G. Histochimie normale et pathologique. Paris : Gauthier-Villars, 1969 ; T2 ; 923p.
35. GRINDLEY A., OMORUYI F., ASEMOTA H. and MORRISON A. Carbohydrate digestion and intestinal ATPases in streptozotocin-induced diabetic rats fed extract of Yam (*Dioscorea caynensis*) or dasheen (*Colocassia esculenta*). Nutrition research, 22, 2002 ; 333-341.
36. HABERMHL G. G. Venomous animals and their toxins. Berlin Heideberg New York : Springer-Verlag, 1981; 195p.
37. HARINJATOVO H. Etudes chimique et biologique de feuilles de *Pentatropis madagascariensis* (ASCLEPIADACEAE) [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2001 ; 57p.
38. HOULD R. Techniques d'histopathologie et cytologie. Paris : Edition Maloine, 1994 ; 272p.
39. JEANNODA V. L. R. Etudes chimique, biochimique et toxicologique du principe convulsivant des connaracées de Madagascar [Thèse de doctorat d'Etat : Sciences]. Strasbourg : Université Louis Pasteur de Strasbourg, 1986 ; 273p.
40. JINDRA A. and all. Biochemical aspects of the biosynthesis of opium alkaloids. In : SWAIN T. Phytochemistry (an journal of plant biochemistry). Paris : 1966, 5 ; 47-71.
41. KAMOUN P. Appareil et méthodes en biochimie, 3<sup>ème</sup> éd. Paris : Flammarion, 1991 ; 237p.
42. LADURON P. Récepteurs opiacés et neuroleptiques. In : COHEN Y., HOSPITAL M., LADURON P., LAMBERT F., RAPIN J. R., COURRIERE P., DANGOUMAU J., ELLENBERGER M., GODFRAIND T. et WERMUTH C. G. Pharmacologie moléculaire. Paris, New York, Barcelone, Milan : Masson, 1978, 4 ; 67-68.
43. LE FEVRE J. G. Manuel de microbiologie. 1997 ; 153p.
44. LE MINOR L., RICHARD C. Méthode de laboratoire pour l'identification des Entérobactériacées. Paris : Institut Pasteur, 1993 ; 457p.

45. LE MINOR L. et VERRON M. Bactériologie médicale, 2<sup>ème</sup> éd. Paris : Flammarion, 1989 ; 1107p.
46. LESNE M. Les médicaments du système endocrinien, 2<sup>ème</sup> édition, 2<sup>ème</sup> partie. Université de Louvain : Faculté de Médecine et Ecole de Pharmacie, 1982 ; 491p.
47. Livret technique. Identification et antibiogramme, méthodes manuelles. Biomérieux : 1996 ; 235p.
48. LOISELEUR J. Techniques de laboratoire. Paris : Masson, 1963, T2 ; 665p.
49. MAHUZIER G. et HAMON M. Abrégé de chimie analytique, 2<sup>ème</sup> édition. Paris Milan Barcelone Mexico : MASSON, 1990 ; T2 ; 257p.
50. MARCHALL N., BOURDON J. L. et RICHARD C. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries, 3<sup>ème</sup> éd. Paris : Doin éditeur, 1987 ; 1152p.
51. MAURY M. Milieux et réactifs de laboratoire, 3<sup>ème</sup> éd. Paris : 1987 ; 48-131.
52. McKEE H. S. Nitrogen metabolism in plants. London and Tambridge : Calendor press, Oxford university press : 1962 ; 358-359.
53. MIETC, KUNESH N., POISSON et MORETTE C. Alcaloïdes d'*Anacampta diticha*, Substances naturelles (colloque internationale 29 Août à 3 Septembre 1979). Paris : CNRS-ORSTOM-NOUREA : 1980 ; 238p.
54. MOORE J. A. et STAUB A. Chimie organique moderne. Montréal : Les Editions HRW Ltée, 1975 ; 419p.
55. MOUTSHEN J. Introduction à la toxicologie génétique. Paris, New York, Barcelone, Milan : Masson, 1979 ; 142p.
56. MUELLER J. H. et HINTON J. Milieux de culture. Pro. Soc. Exp. Biol. Méd. 1941, 48 ; 330-339.
57. MUNIER R. Bulletin sociale de chimie biologique. 1953, 35 ; 1225p.
58. NEUWINGER H. D. African ethnobotany, Poison and Drugs. London-Glasgow-Weinheim-New York-Tokyo-Melbourne-Madras : HAPMAN and HALL, 1996 ; 421-435.

59. OMS. Résistance aux insecticides et lutte antivectorielle (série des rapports techniques n° 443, 17<sup>ème</sup> rapport du comité d'experts des insecticides). Genève : OMS : 1970 ; 306p.
60. PAULING L. Chimie générale, 2<sup>ème</sup> éd. Paris : Masson, 1963 ; 727p.
61. POLNOVSKI M., BOULANGER P., MACHEBOEUF M. et ROCHE J. Biochimie médicale, 6<sup>ème</sup> éd. Paris : Masson, 1963 ; 903p.
62. RAHERINIAINA C. E. Etudes chimique et toxicologique du principe ichtyotoxique de *Euphorbia laro* (EUPHORBIACEAE) [Thèse de Doctorat : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, Université de Toliary, 2004 ; 121p.
63. RAKOTO-RANOROMALALA D. Isolement et caractérisation partielle du principe toxique de *Rourea orientalis* (CONNARACEAE) [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1984 ; 44p.
64. RAKOTO-RANOROMALALA D. Purification et étude des propriétés physico-chimiques et biologiques des principes toxiques de *Tachadenus longiflorus* (GENTIANNACEAE) [Thèse de doctorat de 3<sup>ème</sup> cycle : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1989 ; 88p.
65. RALISON C. Isolement et études biochimiques, toxicologiques, et biologiques de la monguine, principe toxique du *Croton mongue* une Euphorbiacée malgache [Thèse de doctorat d'Etat : Sciences]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1987 ; 261p.
66. RAMAHAFALY R. Etudes chimique et biologique d'extraits toxiques de *Henonia scoparia* (AMARANTHACEAE) [Mémoire de DEA : Biochimie] Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2002 ; 60p.
67. RANDEKATH K. Chromatographie sur couche mince, 2<sup>ème</sup> éd. Paris : Gauthier-Villars, 1964 ; 296p.

68. RANDRIAMAHAVALISOA T. F. Etudes chimique et toxicologique des extraits toxiques de feuilles de *Ocotea madagascariensis* (LAURACEAE) [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003 ; 68p.
69. RANDRIAMAMONJY F. Y. Purification et caractérisations chimique et toxicologique partielles des principes toxiques de tubercules de *Dioscorea antaly* (DIOSCOREACEAE) [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2005 ; 71p.
70. RANDRIAMAMPIANINA M. Potentialités nutritionnelles de quatre variétés de *Dioscorea alata* récoltées sur les hauts plateaux et dans la région côtières de Madagascar [Mémoire de DEA : Biochimie] Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003 ; 64p.
71. RANDRIANANDRASANA J. Etudes chimique et toxicologique des extraits toxiques d'écorce de tige de *Uacapa thouarsii* (EUPHORBIACEAE) [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2004 ; 69p.
72. RANDRIANARIVO H. R. Isolement et caractérisation chimique et biologique des principes toxiques de *Albizia arenicola* (MIMOSOIDEAE-FABACEAE) [Thèse de doctorat de 3<sup>ème</sup> cycle : Sciences]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003 ; 159p.
73. RAONIHARISOA P. Etude chimique et toxicologique des extraits de *Albizia tulearensis* (MIMOSOIDEAE-FABACEAE) [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Faculté des sciences, 2003 ; 81p.
74. RAOUL Y., GUERILLOT- VINET et MARNAY C. Milieux généraux d'entretien des souches : milieu solide. In : LOISELEUR J. Techniques de laboratoire. Paris : Masson, 1963, T2 ; 296-297.
75. RATSILEFITRA V. Détermination de la valeur nutritionnelle des tubercules de *Dioscorea fandra* consommés pendant la période de soudure à Toliara [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1999 ; 66p.
76. RAZAFIMAHEFA. Valeur nutritionnelle de *Dioscorea sansibariensis*, plante utilisée dans l'alimentation humaine pendant les périodes de soudure dans la région de Port-Bergé, faritany de Mahajanga. [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1994 ; 84p.

77. 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 ; 216p.
78. RICHARD J. J. and THOMAS P. B. Biotoxins. In : CALNEK B. W., BARNES H. J., BEARD C.W., MC DOUGALD L.R. and SHIF Y. M. Diseases of Poultry, 10<sup>th</sup> Edition. Editorial board for the american association of avian pathologists : USA, 1997 ; 995-997.
79. TAYLOR W. I. and AMERIC J. Clinic pathologic. 1965, 44 ; 471-475.
80. TAYLOR W. I. and SCHELHART D. Application in microbiology. 1969, 18 ; 393-395.
81. VERNE J. Précis d'histologie, 5<sup>ème</sup> éd. Paris : Masson ; 1960 ; 685p.



**ANNEXES**

**Annexe I. COMPOSITION DES REACTIFS DE DETECTION DES  
ALCALOIDES**

**1-Composition des réactifs de révélation : réactif de DRAGENDORFF modifié**

○ **Solution mère**

- Nitrate de bismuth.....17g
- Acide tartrique.....200g
- Iodure de potassium.....160g
- Eau distillée.....1200ml

Avant la pulvérisation, 50ml de solution mère sont dilués dans 500ml d'eau distillée, et le tout est additionné de 100g d'acide tartrique.

**2-Composition des réactifs pour la détection des alcaloïdes**

➤ **Réactif de DRAGENDORFF**

○ **Solution A**

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

○ **Solution B**

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

Les solutions A et B sont mélangées (v/v) puis le mélange est ajouté 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

➤ **Réactif de MAYER**

- Chlorure mercurique.....13,5g
- Iodure de potassium.....60g
- Eau distillée.....qsp 100ml

**Annexe II. COMPOSITION DU LIQUIDE DE BOUIN**

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

**Annexe III. COMPOSITION DU TAMPON PHOSPHATE BUFFERED SALINE (PBS)**

- NaCl.....8,5g
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O.....0,39g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O.....1,34g
- Eau distillée.....qsp 1000ml

Ajuster le pH à 7,2 par :

- une solution concentrée de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (solution basique)
- une solution concentrée de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (solution acide).

**Annexe IV. COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE**

**1- Milieux d'enrichissement**

○ **Gélose nutritive**

- Peptone.....5g
- Extrait de viande.....1g
- Chlorure de sodium.....5g
- Extrait de levure.....2g
- Agar.....15g
- Eau distillée.....1000ml

pH final = 7,4.

○ **Bouillon nutritif**

- Peptone bactériologique.....5g
- Extrait de viande.....3g
- Extrait de levure.....4g
- Glucose.....5g
- Eau distillée.....qsp 1000ml

pH final = 7,4.

○ **Bouillon de Müller-Hinton**

- Infusion de viande de bœuf déshydratée.....6g
- Hydrolysate de caséine.....17,5g
- Amidon.....1,5g

Les ingrédients sont mélangés, puis 25g du mélange sont dissous dans l'eau distillée qsp 1000ml.

○ **Gélose de Müller-Hinton**

- Infusion de viande de bœuf déshydratée.....300g
- Hydrolysate acide de caséine.....17,5g
- Amidon de maïs.....1,5g
- Agar.....10g
- Eau distillée.....qsp 1000ml

pH final = 7,4.

**2- Milieux d'isolement et de purification**

○ **Milieu de Salmonella-Shigella (SS)**

- Peptone.....5g
- Extrait de viande de bœuf.....5g
- Sels biliaires.....4,2g
- Citrate de sodium.....10g
- Thiosulfate de sodium.....8,5g
- Citrate de fer.....2g

- Lactose.....10g
- Rouge neutre.....0,025g
- Vert brillant.....0,0003g
- Agar.....12g
- Eau distillée.....qsp 1000ml

pH final =  $7,3 \pm 0,2$ .

○ **Milieu de HEKTOEN (Hek)**

- Protéose peptone.....12g
- Extrait de levure.....3g
- Chlorure de sodium.....5g
- Sels biliaires.....9g
- Citrate de fer ammoniacal.....1,5g
- Salicine.....2g
- Lactose.....12g
- Saccharose.....12g
- Fuschine acide.....0,1g
- Bleu de bromotymol.....0,065g
- Eau distillée.....qsp 1000ml

pH final =  $7,5 \pm 0,2$ .

○ **Milieu « brillant green agar » (BGA)**

- Proteose peptone.....10g
- Extrait de levure.....3g
- Saccharose.....10g
- Lactose.....10g
- Chlorure de sodium .....5g
- Agar.....20g
- Rouge de phénol.....0,08g
- Eau distillée.....qsp 1000ml ;

pH final =  $6,9 \pm 2$ .

○ **Milieu « eosine methylene blue » (EMB)**

- Peptone .....10g
- Lactose.....10g
- Phosphate dipotassique.....2g
- Agar.....15g
- Eosine.....0,4g
- Bleu de méthylène .....0,065g
- Eau distillée.....qsp 1000ml

pH final = 7,4  $\pm$  0,2

○ **Milieu gélose au sang**

- Peptone.....5g
- Extrait de viande.....1g
- Chlorure de sodium.....5g
- Extrait de levure.....2g
- Agar.....15g
- Eau distillée.....qsp 1000ml
- Sang défibriné pour recouvrir la surface

**3- Milieux de caractérisation et d'identification**

○ **Milieu de SIMMONS**

- Citrate de sodium.....1g
- Chlorure de sodium.....5g
- Sulfate de magnésium.....0,2g
- Phosphate mono ammoniacque.....1g
- Phosphate dipotassique.....1g
- Bleu de bromotymol.....0,08g
- Agar.....15g
- Eau distillée.....qsp 1000ml

○ **Milieu KLIGLER-HAJNA : lactose-glucose-H<sub>2</sub>S**

- Peptone.....15g
- Extrait de viande de bœuf.....3g
- Extrait de levure.....3g
- Peptone pepsique de viande.....5g
- Chlorure de sodium.....5g
- Sulfate ferreux.....0,2g
- Thiosulfate de sodium.....0,3g
- Lactose.....10g
- Glucose.....1g
- Rouge de phénol.....0,024g
- Agar.....11g
- Eau distillée.....qsp 1000ml

Les ingrédients sont mélangés, puis 53,5g du mélange sont dissous dans l'eau distillée qsp 1000ml ; pH final = 7,5.

○ **Milieu mannitol-mobilité-nitrate**

- Hydrolysate tryptique de caséine.....10g
- Nitrate de potassium.....7,5g
- Mannitol.....7,5g
- Rouge de phénol à 1%.....0,04g
- Agar.....3,5g
- Eau distillée.....qsp 1000ml

Les ingrédients sont mélangés, puis 22g du mélange sont dissous dans l'eau distillée qsp 1000ml, pH final = 7,6 ± 0,2.

○ **Milieu urée-indole**

- L-tryptophane.....0,3g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0,1g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0,1g

- NaCl.....0,5g
- Urée.....2g
- Alcool à 95°.....1ml
- Rouge de phénol à 1%.....0,25ml
- Eau distillée.....100ml

○ **Réactif de KOVACS**

- Para-méthylaminobenzaldehyde.....5g
- Alcool isoamylique.....75mg
- Acide chlorhydrique 12,07N.....25ml

○ **Milieux LDC, ODC, ADH**

Soluté	Milieu ODC	Milieu ADH	Milieu LDC
L-ornithine (monochlorhydrate)	5g	-	-
L-arginine (monochlorhydrate)	-	5g	-
L-lysine (monochlorhydrate)	-	-	5g
Extrait de levure	3g	3g	3g
Chlorure de sodium	5g	5g	5g
Glucose	1g	1g	1g
Bromothymol pourpre (1,6g/100ml d'alcool à 95°)	1ml	1ml	1ml
Eau distillée qsp	1000ml	1000ml	1000ml

**Annexe V. COMPOSITION DU REACTIF POUR LA COLORATION GRAM**

**1- Violet de gentiane phéniqué**

Broyer dans un mortier :

- Violet de gentiane.....2g
- Acide phéniqué cristallisé.....2g
- Alcool à 95°.....10ml

Le mortier est rincé avec 100ml d'eau distillée, le mélange est laissé reposer pendant 24h à 37°, puis filtré.

## 2- Lugol

- Iode.....1g
- Iodure de potassium.....2g
- Eau distillée.....200ml

## 3- Fuschine phéniquée de Ziehl

Broyer dans un mortier :

- Fuschine basique.....1g
- Alcool phéniqué cristallisé.....5g
- Alcool à 95°.....10ml

Reprendre avec 10 à 20ml d'eau distillée chaude et laisser reposer 24h, puis compléter à 100ml et filtrer.





