

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----|
| COMMUNICATION | I |
| TABLE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES | II |
| GLOSSAIRE | III |
| LISTE DES TABLEAUX | IV |
| LISTE DES FIGURES | V |
| INTRODUCTION GENERALE | 1 |
| SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE | |
| GENERALITES SUR LA PLANTE <i>Mystroxylon aethiopicum</i> Loes | 3 |
| 1. Systématique | 3 |
| 2. Description de la famille des CELASTRACEES | 3 |
| 3. Description et distribution géographique de <i>Mystroxylon aethiopicum</i> | 3 |
| 4. Utilisations traditionnelles | 7 |
| 5. Travaux antérieurs | 7 |
| ETUDE CHIMIQUE DES EXTRAITS | 8 |
| I. INTRODUCTION | 8 |
| II. MATERIELS ET METHODES | 8 |
| II.1. MATERIELS | 8 |
| II.1.1. Matériel végétal | 8 |
| II.1.1.1. Collecte et identification | 8 |
| II.1.1.2. Préparation du matériel végétal | 8 |
| II.1.2. Les produits chimiques | 8 |
| II.2. METHODES | 9 |
| II.2.1. METHODES ANALYTIQUES | 9 |
| II.2.1.1. Criblage phytochimique | 9 |
| II.2.1.1.1. <i>Principe</i> | 9 |
| II.2.1.1.2. <i>Mode opératoire</i> | 9 |
| II.2.1.1.2.1. Préparations des extraits à tester | 9 |
| II.2.1.1.2.2. Détection des familles chimiques | 10 |
| II.2.1.2. Chromatographie sur couche mince | 11 |
| II.2.1.2.1. <i>Principe</i> | 11 |
| II.2.1.2.2. <i>Mode opératoire</i> | 11 |

Table des matières

| | |
|--|----|
| II.2.2. METHODES D'EXTRACTION | 12 |
| II.2.2.1. Extraction par macération | 12 |
| II.2.2.1.1. <i>Principe</i> | 12 |
| II.2.2.1.2. <i>Mode opératoire</i> | 12 |
| II.2.2.2. Extraction par partage liquide-liquide | 13 |
| II.2.2.2.1. <i>Principe</i> | 13 |
| II.2.2.2.2. <i>Mode opératoire</i> | 13 |
| II.2.3.METHODE DE FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS | 14 |
| II.2.3.2.1. <i>Principe</i> | 14 |
| II.2.3.2.2. <i>Mode opératoire</i> | 14 |
| III. RESULTATS | 16 |
| III.1.METHODES ANALYTIQUES | 16 |
| III.1.1. Criblage phytochimique | 16 |
| III.1.2. Chromatographie sur couche mince | 17 |
| III.2. METHODES D'EXTRACTION | 18 |
| III.2.1. Extraction par macération | 18 |
| III.2.2. Extraction par partage liquide-liquide | 19 |
| III.3.METHODE DE FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS | 20 |
| ETUDE BIOLOGIQUE DES EXTRAITS | 24 |
| I. INTRODUCTION | 24 |
| II. MATERIELS ET METHODES | 24 |
| II.1. MATERIELS | 24 |
| II.1.1. Matériels utilisés pour l'étude des activités antimicrobiennes | 24 |
| II.1.1.1. Les germes utilisés et les milieux de culture | 24 |
| II.1.1.1.1. Les germes utilisés | 24 |
| II.1.1.1.2. Les milieux de culture | 24 |
| II.1.1.2. Les disques pour les tests d'antibiogramme | 25 |
| II.1.2. Matériels utilisés pour l'étude des activités antioxydantes | 25 |
| II.2. METHODES | 25 |
| II.2.1. Méthodes d'étude des activités antimicrobiennes | 25 |
| II.2.1.1. Stérilisation | 25 |
| II.2.1.2. Effets des extraits de <i>M. aethiopicum</i> sur la croissance bactérienne | 26 |
| II.2.1.2.1. Isolement et purification des souches | 26 |
| II.2.1.2.1.1. Isolement | 26 |

Table des matières

| | |
|---|----|
| II.2.1.2.1.1.1. <i>Principe</i> | 26 |
| II.2.1.2.1.1.2. <i>Mode opératoire</i> | 26 |
| II.2.1.2.2. Purification | 26 |
| II.2.1.2.3. Classification des germes par la coloration GRAM | 27 |
| II.2.1.2.3.1. <i>Principe</i> | 27 |
| II.2.1.2.3. 2. <i>Mode opératoire</i> | 27 |
| II.2.1.2.4. Conservation des souches par congélation | 27 |
| II.2.1.2.4.1. <i>Principe</i> | 27 |
| II.2.1.2.4.2. <i>Mode opératoire</i> | 28 |
| II.2.1.2.5. Repiquage des souches microbiennes | 28 |
| II.2.1.2.6. Préparation de l'inoculum | 28 |
| II.2.1.2.6.1. <i>Principe</i> | 28 |
| II.2.1.2.6.2. <i>Mode opératoire</i> | 28 |
| II.2.1.2.7. La méthode de diffusion en milieu solide | 28 |
| II.2.1.2.7.1. <i>Principe</i> | 28 |
| II.2.1.2.7.2. <i>Mode opératoire</i> | 29 |
| II.2.1.2.8. Méthode «Bioautography» | 30 |
| II.2.1.2.8.1. <i>Principe</i> | 30 |
| II.2.1.2.8.2. <i>Mode opératoire</i> | 30 |
| II.2.1.2.8.2.1. Préparation de la plaque CCM | 30 |
| II.2.1.2.8.2.2. Préparation de la culture bactérienne | 30 |
| II.2.1.2.9. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice | 30 |
| II.2.1.2.9.1. <i>Principe</i> | 31 |
| II.2.1.2.9.2. <i>Mode opératoire</i> | 31 |
| II.2.1.2.10. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide | 31 |
| II.2.1.2.10.1. <i>Principe</i> | 31 |
| II.2.1.2.10.2. <i>Mode opératoire</i> | 32 |
| II.2.2. Méthodes d'étude des activités antioxydantes | 32 |
| II.2.2.1. Criblage de l'activité antioxydante | 32 |
| II.2.2.1.1. <i>Principe</i> | 32 |
| II.2.2.1.2. <i>Mode opératoire</i> | 32 |
| II.2.2.2. Quantification du pouvoir antioxydant | 32 |
| II.2.2.2.1. <i>Principe</i> | 32 |
| II.2.2.2.2. <i>Mode opératoire</i> | 33 |

Table des matières

| | |
|--|----|
| III. RESULTATS | 34 |
| III.1. Evaluation de l'activité antibactérienne par diffusion sur gélose | 34 |
| III.2. Localisation de l'activité antibactérienne | 36 |
| III.3. Détermination de la CMI et de la CMB | 38 |
| III.4. Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>M. aethiopicum</i> | 39 |
| III.4.1. Criblage de l'activité antioxydante | 39 |
| III.4.2. Quantification du pouvoir antioxydant | 41 |
| III.5. Localisation de la bande active de la sous-fraction F15 | 42 |
| CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSIONS | 44 |
| PERSPECTIVES | 46 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 47 |
| ANNEXES | |
| RESUME | |

Communication

COMMUNICATION

Ce travail de mémoire a fait l'objet d'une communication internationale intitulée:
Etudes chimique et biologique des principes actifs du *Mystroxydon aethiopicum*
(CELASTRACEAE) plante médicinale de Madagascar. Journées Qualireg à l'Hôtel Colbert,
Antananarivo. Novembre 2014.



Abréviations....

TABLE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

AcOEt : Acétate d'éthyle

ATCC: «American Type Culture Collection»

CNARP : Centre National d'Application des Recherches Pharmaceutiques

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CCM : Chromatographie sur couche mince

DPPH: 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DCM : Dichlorométhane

DL₅₀ : Dose létale 50%

Hex : Hexane

LABASM : Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales

MTT : Méthyl Tetrazolium Chloride

MeOH : Méthanol

n-But: n-Butanol

qsq: Quantité Suffisante Pour

R_f : Référence frontale

UV: Lumière ultraviolette

GLOSSAIRE

Antibiotique : substance qui tue les bactéries ou inhibe leur croissance.

Antibactérien : en pharmacie, remède capable d'éliminer ou d'inhiber les bactéries.

Antioxydants : molécules qui protègent les protéines, les acides gras, etc, en fixant les radicaux libres et qui diminuent ou empêchent l'oxydation d'autres substances chimiques.

Athérosclérose : maladie qui se caractérise par le dépôt d'une plaque de lipides (athérome) sur la paroi des artères, entraînant par la suite sa lésion (sclérose), à l'origine de bon nombre de maladies cardiovasculaires.

Bactéricide : se dit d'une substance qui tue les bactéries.

Bactériostatique : se dit d'un produit qui arrête le développement des bactéries sans les tuer.

Cancer : maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormalement importante au sein d'un tissu normal de l'organisme menaçant la survie de cette dernière. Ces cellules proviennent toutes d'un même clone, une cellule initiatrice du cancer qui a une propriété de se diviser indéfiniment.

Charnu : bien en chair.

Coriace : dont on peut difficilement vaincre la résistance, tenace.

Diurétique : qui fait uriner.

Radicaux libres : atomes ou groupe d'atomes ayant un ou plusieurs électrons non appariés, les rendant extrêmement réactifs.

Xhosa : ethnies d'Afrique du Sud parlant le xhosa et se désignant sous le nom d'amaXhosa.

Liste des tableaux

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Préparation des extraits à tester..... | 9 |
| Tableau 2 : Détection des familles chimiques..... | 10 |
| Tableau 3 : Systèmes de solvants utilisés lors des méthodes chromatographiques..... | 12 |
| Tableau 4 : Caractéristiques de la colonne chromatographique..... | 15 |
| Tableau 5: Résultats du criblage phytochimique..... | 16 |
| Tableau 6 : Couleurs et Rf des bandes des 3 fractions méthanoliques..... | 18 |
| Tableau 7 : Caractéristiques et pourcentages des extraits issus de l'extraction par macération..... | 18 |
| Tableau 8 : Caractéristiques et rendements des fractions issues du partage liquide- liquide..... | 19 |
| Tableau 9: Caractéristiques des fractions obtenues par fractionnement sur colonne ouverte..... | 22 |
| Tableau 10 : Caractéristiques des germes utilisés..... | 24 |
| Tableau 11 : Normes utilisées pour la lecture des résultats par la méthode des disques: le diamètre du disque est 6 mm..... | 29 |
| Tableau 12 : Activité antibactérienne des extraits bruts de <i>M. aethiopicum</i> à une concentration de 1mg/disque..... | 35 |
| Tableau 13 : Résultats de la CMI et de la CMB des sous- fractions F15 et F18..... | 38 |
| Tableau 14 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en équivalent α -tocophérol..... | 41 |

Liste des figures

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 : <i>Mystroxydon aethiopicum</i> a) la plante b) feuilles et fleurs c) fruit | 4 |
| Figure 2 : Carte de distribution géographique de <i>Mystroxydon aethiopicum</i> | 6 |
| Figure 3 : Résumé schématique de la méthode de macérations | 13 |
| Figure 4 : Schéma récapitulatif de l'extraction par partage liquide-liquide | 14 |
| Figure 5 : Chromatogramme des différents extraits issus de l'extraction par macérations après pulvérisation à la vanilline sulfurique..... | 17 |
| Figure 6 : Chromatogramme des différentes fractions méthanoliques issues du partage liquide-liquide après pulvérisation à la vanilline sulfurique | 17 |
| Figure 7 : Schéma récapitulatif des procédés d'extraction | 19 |
| Figure 8 : Chromatogramme de l'extrait méthanolique | 20 |
| Figure 9 : Chromatogrammes des 18 fractions issues de la chromatographie sur colonne ouverte de la fraction acétate d'éthyle | 21 |
| Figure 10 : Schéma récapitulatif du procédé de purification par chromatographie sur colonne | 23 |
| Figure 11 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH | 33 |
| Figure 12 : Spectre d'activité des extraits testés..... | 34 |
| Figure 13 : Exemple des résultats montrant l'inhibition de la croissance bactérienne par la méthode « Bioautography »..... | 37 |
| Figure 14 : Profils chromatographiques montrant l'activité antioxydante des extraits et des sous-fractions de <i>M. aethiopicum</i> observée après pulvérisation des plaques CCM par DPPH | 40 |
| Figure 15 : Courbe standard de l' α -tocophérol | 42 |
| Figure 16 : Chromatogrammes comparatifs de la Rf de sous-fraction F15..... | 43 |

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies infectieuses constituent un danger majeur pour la santé humaine. Plusieurs espèces bactériennes pathogènes sont à l'origine de nombreuses maladies infectieuses le plus souvent mortelles (**Jules et al., 2011**). Les entérobactéries constituent la principale cause des diarrhées infectieuses qui restent encore une cause importante de morbidité et de mortalité infantiles dans les pays du tiers monde. Les principaux germes responsables des gastro-entérites sont : *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Campylobacter* (**Joëlle, 2012**). Les infections bactériennes et fongiques ont été gérées avec succès en utilisant les plantes médicinales (**Hema et al., 2009**).

A part ces problèmes, le stress oxydatif dû aux radicaux libres est également une préoccupation mondiale, car il est à l'origine de nombreuses pathologies humaines comme l'athérosclérose, le cancer et le vieillissement cellulaire (**Blot et al., 1993**).

Les antioxydants sont beaucoup étudiés dans le but de prévenir certaines maladies qui sont dues aux effets des radicaux libres. Une grande partie des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antioxydantes et antimicrobiennes à savoir les vitamines, les caroténoïdes et les polyphénols pour soulager et traiter ces différentes maladies.

A Madagascar, avec ses 14000 espèces végétales, son taux d'endémisme élevé de 80%, l'île bénéficie d'une richesse naturelle à tous les niveaux taxonomiques (famille, genre, espèce) (**Rabesa, 1986**). Depuis longtemps, plusieurs d'entre elles sont utilisées par la population malagasy dans la médecine traditionnelle. Beaucoup d'entre elles n'ont pas encore fait l'objet d'étude.

Depuis sa création en 1976, l'objectif principal du Centre Nationale d'Application des Recherches Pharmaceutiques (CNARP), est la valorisation de la biodiversité végétale malgache. A part la production des médicaments à base de l'extrait brut de plante, le CNARP entreprend l'isolement et l'identification des molécules biologiquement actives par des tests bioguidés *in-vitro* et *in-vivo* au sein du laboratoire. Plusieurs plantes y ont déjà fait l'objet de recherches (<http://cnarp.recherches.gov.mg/?les-medicaments-specialites-du>) afin de produire des médicaments comme:

- EUGENIAL extrait de *Eugenia caryophyllus* (MYRTACEAE) utilisée dans les traitements symptomatiques bucco pharyngés, aphte, gingivites, stomatites et aussi pour l'hygiène buccale quotidienne.
- FANAFEROL médicament issu d'Extrait de la plante *Ilexmitis* L (AQUIFOLIACEAE) utilisé comme cicatrisant de plaie non surinfectée telle que les brûlures, plaie traumatique, escarre, ulcère cutané.

INTRODUCTION GENERALE

- HUILE NIAUOLEE 2 médicament à base d'huile essentielle de Niaouli (*Melaleucaquinquenervia*, MYRTACEAE) préconisé dans le traitement des infections aiguës et chroniques du rhinopharynx, rhinorrhée, rhinite inflammatoire.
- HEVOKINA solution à inhaler à base d'huile essentielle d'*Eucalyptus* (MYRTACEAE) pour traiter les infections bronchiques bénignes, toux enrrouement, grippe, irritation de la gorge.

Pour notre part, nous avons travaillé sur la plante *Mystroxydon aethiopicum* (CELASTRACEES) connue sous les noms vernaculaires Ditiala, Montso, Fanazava. Une plante appartenant au plantothèque du CNARP. Elle a été choisie pour diverses raisons:

- D'après les études bibliographiques, la plante est connue comme antioxydante; antibactérienne et antidiarrhéique ;
- A notre connaissance, aucune étude chimique et microbiologique concernant les principes actifs contenus dans les racines n'a été entreprise ;
- C'est une plante très répandue dans les pays africains y compris Madagascar et très abondante dans la région Nord comme Antsiranana et dans la partie Est de la Grande île.

Notre travail a pour but d'étudier les propriétés chimiques et biologiques des extraits de racine obtenus afin d'apporter des preuves scientifiques de l'utilisation traditionnelle de la plante.

Deux parties précédées par une «**Synthèse bibliographique**» composeront notre travail:

- la première partie intitulée «**Etude chimique**» qui comporte l'extraction, la purification et la caractérisation physico-chimique des extraits;
- la seconde partie, «**Etude biologique**», concerne les résultats des tests biologiques des extraits.

«**Les matériels et méthodes**» sont mentionnés dans chaque partie et une «**introduction générale**» précède les deux parties. Enfin, «**une conclusion générale et des perspectives**» terminent notre travail.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

GENERALITES SUR LA PLANTE *Mystroxylon aethiopicum* Loès

1. Systématique

D'après **Perrier de la Bâthie (1942)**, la plante est classée comme suit :

| | |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| Règne : | VEGETAL |
| Embranchement : | PLANTAE |
| Classe : | EQUISETOPSIDA |
| Sous-Classe : | MAGNOLIIDAE |
| Ordre : | CELASTRALES |
| Famille : | CELASTRACEES |
| Genre : | <i>Mystroxylon</i> |
| Espèce : | <i>Mystroxylon aethiopicum</i> Loes |
| Noms vernaculaires : | Ditjala, Fanazava, Montso |

2. Description de la famille des CELASTRACEES

La famille des **Célastracées** est une famille de plantes dicotylédones. Selon **Watson et al (1992)**, elle comprend 850 espèces réparties entre 74 et 87 genres. Ce sont des arbres, des arbustes ou des lianes, des régions tempérées à tropicales. Les fruits caractéristiques de cette famille sont tous colorés. Les feuilles sont souvent coriaces et les fleurs sont petites, de quatre à cinq sépales. Les étamines augmentent à partir d'un disque de nectar généralement visible. Les Célastracées sont principalement une famille de régions tropicales et subtropicales. L'importance économique des Célastracées en Amérique du Nord est liée à son utilisation dans l'horticulture.

3. Description et distribution géographique de *Mystroxylon aethiopicum*

Mystroxylon aethiopicum est un arbuste de la famille des célastracées (**Perrier de la Bâthie, 1942**), d'une hauteur moyenne de 8-10 m et pouvant atteindre jusqu'à 12m, à feuilles alternes, persistantes et coriaces, aux nervures obliques n'atteignant pas la marge, de petites fleurs qui donnent des drupes blanches puis rouges à maturité, contenant une graine. Ses petites fleurs vertes jaunâtres (**figure 1**) sont portées en grappes à l'aisselle des feuilles suivies par des petits fruits charnus de forme globuleuse de couleur rouge vive à rouge violacé d'environ 20mm de diamètre.

Leur écorce est rugueuse et de couleur noire à brun foncé. On peut le rencontrer dans les brousses et les forêts, mais il se trouve souvent sur des crêtes rocheuses (**Coates Palgrave, 2002 ; Schmidt, 2002**).



Figure 1 : *Mystroxylon aethiopicum* a) la plante ; b) feuilles et fleurs ; c) fruit

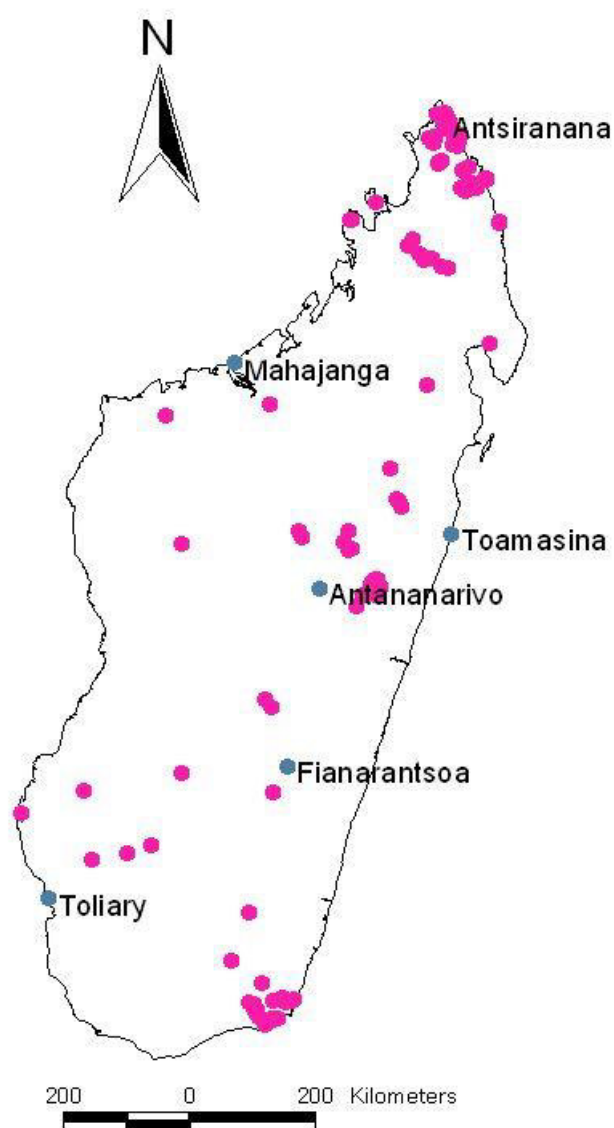
(Source : auteur, 2014)

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

L'espèce *aethiopicum* pousse dans un large éventail de type de végétation, y compris la brousse, les lisières de forêts, les forêts de conifères, les forêts claires.

Elle pousse dans les régions du sud de la province du Cap Occidental et Oriental du continent Africain. *M. aethiopicum* pousse dans les forêts humides de Madagascar (**Figure 2**), elle est très abondante dans la région Nord comme Antsiranana et dans la partie Est de la Grande île comme Toamasina et Fianarantsoa.

Tandis que l'espèce *schlectri* est très répandue à partir de la pointe sud de l'Afrique en passant par la région du nord du continent y compris Madagascar, Comores, Seychelles et l'espèce *burkeanum* se trouvent dans la brousse et les affleurements rocheux secs dans les provinces du Nord de l'Afrique du Sud.



■ Répartition de l'espèce *aethiopicum*

Figure 2: Carte de distribution géographique de *Mystroxydon aethiopicum*

(Source : auteur, 2014)

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

4. Utilisations traditionnelles :

❖ En médecine

Mystroxydon aethiopicum est généralement utilisé comme source locale d'alimentations, de colorants et de bois, mais également il présente de propriétés médicinales connues depuis l'antiquité telles que fortifiantes, antibactériennes, diurétiques (**Debray, 1971**).

L'écorce de cette plante est généralement récoltée à l'état sauvage à des fins médicinales pour son effet bénéfique sur l'estomac. Elle est couramment citée dans diverses préparations médicinales. Dans le sud-ouest de Madagascar le décocté de l'écorce est antidiarrhéique, stimulant, défatigant, diurétique, antiabortif et actif dans les affections pulmonaires (**Boiteau, 1986**). Sur les hauts plateaux, associés à d'autres plantes, elle rentre dans d'innombrables préparations. Emiettée et perfusée l'écorce et les feuilles fraîches sont utilisées au Kenya pour faire un thé. Les racines présentent aussi des effets purgatifs et soulagent les maladies digestives (**Pernet, 1957**).

❖ Autres utilisations

En Afrique du Sud, le bois est utilisé par les Xhosa comme combustible (**Watt et al., 1962**). Au Kenya, la plante est utilisée comme bois de chauffage, émiétée et perfusée, l'écorce est aussi beaucoup utilisée pour faire un thé (**Beentje, 1994**).

5. Travaux antérieurs

Des études récentes réalisées sur les feuilles de la plante *M. aethiopicum* ont révélé que les extraits aqueux issus de cet organe étaient toxiques pour les rats mâles albinos. En l'administrant par voie orale, la DL₅₀ est de 9,708mg/kg de poids corporel (**Ndukui et al., 2013**). D'après les littératures, ces feuilles de *M. aethiopicum* ont montré aussi quelques traces d'alcaloïdes, des leucanthocyanes, des tanins, des saponines et une trace de stérols (**Debray et al., 1971**).

ETUDE CHIMIQUE

Première partie

ETUDE CHIMIQUE DES EXTRAITS

I. INTRODUCTION

A part l'étude systématique de la plante effectuée par **Perrier de la Bâthie (1942)**, aucune étude approfondie n'a été faite jusqu'à présent sur *Mystroxylon aethiopicum* Loès (CELASTRACEES).

Ainsi, dans le cadre de l'étude chimique des extraits de cette plante, nous avons établi un plan de recherche axé sur les points suivants:

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

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. MATERIELS

II.1.1. Matériel végétal

II.1.1.1. Collecte et identification

La plante *Mystroxylon aethiopicum* Loès a été collectée en juillet 2011 dans la zone de la route nationale de Tsaratanana dans la Forêt de Matsabory maiky, Commune et Fokontany Mangindrano, District Bealanana, Région Sofia, Province Mahajanga dont les coordonnées géographiques sont les suivantes: 14°09'09.1" S 48°57'26.4" E 2051m (GPS), par les botanistes du CNARP. L'organe utilisé lors de l'étude est la racine codée TST 015. L'identification botanique et l'authentification ont été effectuées à l'Herbier du CNARP à Tananarive où les spécimens sont déposés sous la référence RLL 1008.

II.1.1.2. Préparation du matériel végétal

La racine de *Mystroxylon aethiopicum* a été séchée à l'ombre et à température ambiante pendant deux semaines puis broyée. La poudre ainsi obtenue a été conservée dans un endroit sec et à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation.

II.1.2. Les produits chimiques

La plupart des produits chimiques utilisés sont de qualité pour analyse et de marque MERCK, PROLABO ou BDH. Le support utilisé pour la chromatographie sur couche mince est le gel de silice 60F254 de marque MERCK. Ce gel est étalé sur des feuilles plastiques, qui peuvent être découpées aux dimensions voulues.

ETUDE CHIMIQUE

II.2. METHODES

II.2.1. Méthodes analytiques

II.2.1.1. Criblage phytochimique (Dalton, 1979 ; Bruneton, 1987 ; Harbone, 1983)

II.2.1.1.1. *Principe*

Le screening phytochimique est effectué sur la poudre végétale et sur l'extrait brut afin de caractériser les types de familles chimiques susceptibles d'être présents dans la plante.

II.2.1.1.2. *Mode opératoire*

La détection des familles chimiques a été réalisée avec les méthodes classiques de criblage qui comprennent quelques tests de caractérisation.

II.2.1.1.2.1. *Préparation des extraits à tester par macération pendant au moins 12h*

Différents extraits préparés selon les méthodes décrites dans le tableau 1 ci-dessous sont utilisés pour les tests de détection des diverses familles de substances.

Tableau 1 : Préparation des extraits à tester

| Extrait aqueux | Extrait chloroformique | Extrait méthanolique | Extrait acide |
|---|--|---|---|
| 2 g de poudre d'organe+10 ml d'eau distillée (chauffage jusqu'à ébullition) | 2 g de poudre d'organe+10ml de chloroforme | 2 g de poudre d'organe+10ml de méthanol | 2 g de poudre d'organe+10 ml d'acide chlorhydrique (HCl) 2N |

II.2.1.1.2.2. *Détection des familles chimiques*

La détection des familles constitue le screening ou criblage phytochimique. C'est une étude basée :

- ❖ soit sur la formation de complexes insolubles : réactions de précipitation ;
- ❖ soit sur la formation de complexes colorés : réactions de coloration.

La coloration observée est due généralement à la formation de liaisons conjuguées ou l'apparition d'une insaturation dans une molécule, sous l'effet d'un réactif approprié.

Les réactions caractéristiques de ces différentes familles chimiques sont données dans le tableau 2 ci-après.

ETUDE CHIMIQUE

Tableau 2 : Détection des familles chimiques

| Familles chimiques | Extraits utilisés | Réactions | Réactifs spécifiques | Observations |
|--------------------------|-----------------------|--------------------|--|--|
| Alcaloïdes | Acide | | MAYER | Précipité ou floculation |
| | | | WAGNER | |
| | | | DRAGENDORFF | Précipité |
| Leucoanthocyanes | Méthanolique | BATE-SMITH | HCl concentré | Coloration rouge violacé après refroidissement |
| Flavonoïdes | Méthanolique | WILLSTÄTER | HCl concentré | coloration pourpre coloration rouge |
| | | | Tournures de Mg | |
| | | | Alcool isoamylique | |
| Tanins et polyphénols | Aqueux | Test à la gélatine | Gélatine | Précipité blanc |
| | | | Gélatine salée | Précipité blanc |
| | | | FeCl ₃ | coloration vert- noir ou noir |
| Stéroïdes et triterpènes | Chloroformique | LIBERMANN-BURCHARD | Anhydride acétique | coloration bleu-vert anneau rouge ou violet |
| | | SALKOWSKI | H ₂ SO ₄ H ₂ SO ₄ concentré | |
| Désoxyoses | Aqueux | KELLER-KILIANI | FeCl ₃ | anneau pourpre |
| | | | Acide acétique glacial | |
| | | | H ₂ SO ₄ concentré | |
| Iridoïdes | | | HCl concentré | coloration bleu |
| Saponines | | Indice de mousse | Eau distillée | mousse persistante de 3 cm de hauteur |

Les compositions de ces réactifs sont données en *annexe 2*.

ETUDE CHIMIQUE

II.2.1.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

II.2.1.2.1. Principe

La chromatographie sur couche mince est une méthode de séparation de mélanges en leurs constituants. Elle est effectuée surtout en vue d'une analyse de la pureté des extraits.

Cette technique repose sur le transfert des constituants de l'extrait à séparer d'une phase stationnaire, un adsorbant maintenu sur une plaque en plastique ou en aluminium, vers une autre phase mobile qui est un solvant ou un mélange de solvants (état liquide).

La phase mobile migre de bas en haut, par capillarité, le long de la phase fixe en entraînant les constituants du mélange. C'est le phénomène d'élution, qui permet la séparation des constituants de l'extrait à analyser.

Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale (R_f) :

$$R_f = \frac{\text{hauteur de la tache}}{\text{hauteur du front du solvant}}$$

II.2.1.2.2. Mode opératoire

La plaque de chromatographie est préparée en déposant à l'aide d'un capillaire les extraits (1mg/ml) à analyser sur une ligne horizontale à 1cm du bord inférieur. Les dépôts sont espacés de 6mm. La plaque est ensuite développée dans une cuve chromatographique saturée d'un système d'éluant approprié. L'éluant migre par capillarité vers le haut de la plaque, et quand il se trouve à environ 1cm du bord supérieur du support, la plaque est retirée de la cuve, puis séchée.

La plaque est observée à la lumière visible, puis sous UV à 254nm et à 366nm. Les constituants absorbant sous UV apparaissent sous forme de taches fluorescentes.

La révélation de la plaque s'effectue par pulvérisation d'un réactif standard; la vanilline sulfurique (Composition et mode de préparation en *annexe 1*) suivie d'un chauffage à 110°C pendant environ 5min. Plusieurs colorations apparaissent en fonction du type de composés.

Les systèmes d'éluant utilisés lors de notre étude sont donnés dans le tableau 3 suivant:

Tableau 3 : Systèmes de solvants utilisés lors des méthodes chromatographiques

| L'extrait testé | Mélange du solvant | Pourcentage |
|---------------------------------|--------------------|-------------|
| Hexane | Hex | 100% |
| CH ₂ Cl ₂ | Hex/DCM | 9 : 1 |
| MeOH | DCM/MeOH | 9: 1 |
| AcOEt | DCM/MeOH/E | 6/15/1 |
| n-butanol | DCM/M/E | 6/15/1 |
| H ₂ O | DCM/MeOH/E | 6/15/1 |

II.2.2. Méthodes d'extraction

II.2.2.1. Extraction par macération

II.2.2.1.1. *Principe*

La poudre végétale a été laissée en contact prolongé et répétée, à la température ambiante, avec le solvant jusqu'à épuisement. Une série d'extractions avec des solvants de polarités croissantes a été effectuée.

La série d'extractions avec des solvants à polarités croissantes a été effectuée pour avoir une séparation des constituants selon leur polarité.

L'hexane, solvant hydrocarbure, permet d'entraîner les produits peu polaires comme les matières grasses.

Le dichlorométhane permet d'extraire les produits moyennement polaires.

Le méthanol permet d'extraire des produits plus polaires et polaires comme les tanins.

Les extraits obtenus sont filtrés et séchés sous vide.

II.2.2.1.2. *Mode opératoire*

Les poudres de la racine de *Myroxylon aethiopicum* Loes (400g) sont macérées successivement pendant 3x24 heures dans l'hexane, le dichlorométhane et le méthanol. Le rendement d'extraction est calculé selon la formule suivante:

$$\text{Rendement d'extraction} = \frac{\text{Masse de l'extrait obtenu (g)}}{\text{Masse de poudre initiale}} * 100$$

La méthode de macération est présentée par le diagramme 1

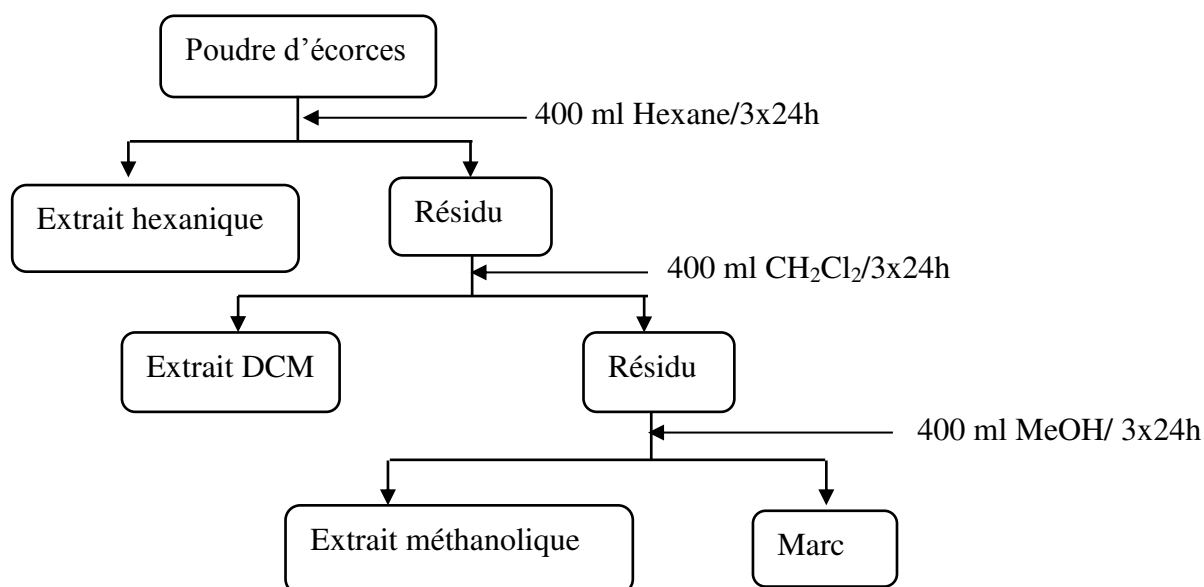


Figure 3 : Résumé schématique de la méthode de macérations

II.2.2.2. Extraction par partage liquide-liquide

II.2.2.2.1. *Principe*

L'extrait méthanolique est fractionné selon la méthode de **Gianni et al. (2001)**, modifié par **Boudiaf (2006)**, en utilisant une série de solvants à polarité croissante. L'extrait est initialement solubilisé dans l'eau distillée avant de subir les partages liquide-liquide selon le mode opératoire décrit ci-après.

II.2.2.2.2. *Mode opératoire*

L'extrait méthanolique (5g) a été dissout dans 150ml d'eau distillée jusqu'à dissolution totale puis cette solution va subir successivement un partage liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle et le n-butanol.

L'acétate d'éthyle est par la suite évaporé et l'extrait sec résultant est considéré comme étant la fraction de l'acétate (E31). La phase aqueuse inférieure est soumise à un fractionnement par le n-butanol pour donner l'extrait butanolique (E32). Le raffinat final qui en résulte représente la fraction aqueuse (E33) résiduelle qui est également évaporée à sec.

Le mode opératoire est résumé sur la **figure 4**.

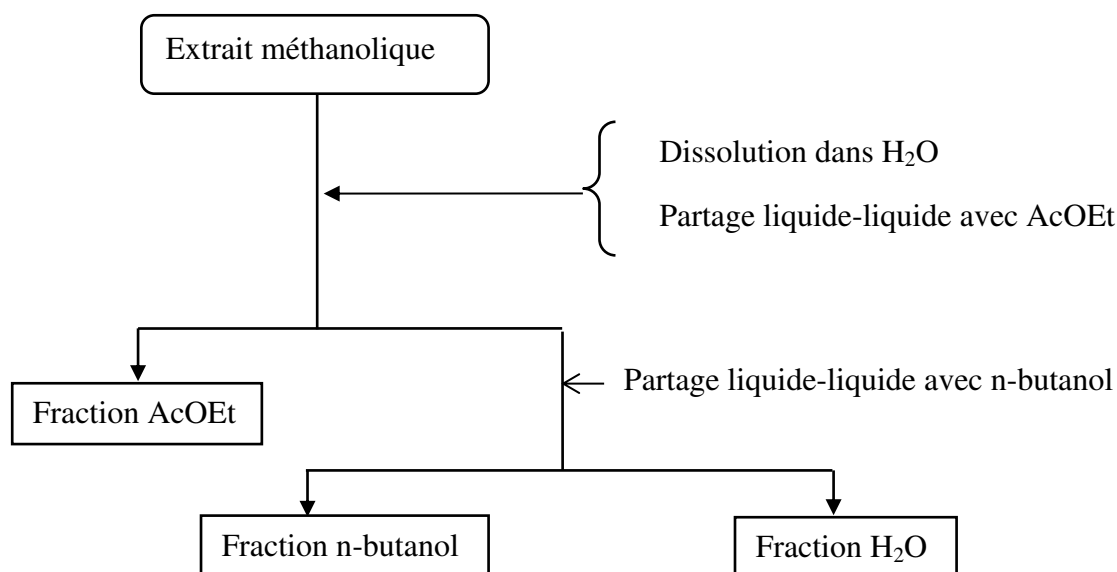


Figure 4 : Schéma récapitulatif de l'extraction par partage liquide-liquide

II.2.3. Méthode de fractionnement des extraits par chromatographie sur colonne ouverte

II.2.3.1. Principe

Cette méthode permet de séparer les constituants d'un mélange de substances, en fonction de leur polarité c'est-à-dire par leur groupement fonctionnels.

La colonne en verre est remplie de gel de silice 60 (70-200 μ m ou 35-70 μ m, SDS) 30 à 50 fois supérieur à la quantité de l'échantillon déposée. L'extrait à fractionner est adsorbé sur une quantité de silice correspondant à environ 2 à 4 fois sa masse et est déposé sous forme solide. Les choix des conditions d'élution, le suivi de la séparation et des rassemblements finaux des fractions ont été basés sur les analyses de la CCM

II.2.3.2.2. Mode opératoire

➤ Préparation de la colonne: remplissage par voie humide

Le remplissage de la colonne par l'adsorbant a été fait par voie humide. 30g de silice a été mise en suspension dans le dichlorométhane et agitée jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène. Puis, le tout est versé dans la colonne.

➤ Dépôt de l'échantillon

L'extrait à chromatographier (600mg de fraction acétate d'éthyle) a été dissous en solution dans un petit volume de méthanol puis adsorbé sur une quantité d'environ 2g de silice. Le mélange a été ensuite évaporé à sec afin d'avoir un dépôt solide. La fraction, sous forme de poudre, est versée soigneusement au sommet de la colonne contenant 30g de silice en suspension dans le dichlorométhane. Une fois la colonne stabilisée, du sable a été ajouté.

ETUDE CHIMIQUE

➤ Elution

L'éluant a été introduit manuellement par écoulement continu à l'aide d'un entonnoir placé au-dessus de la colonne. Dans notre cas, nous avons utilisé une élution avec un système de solvant CH₂Cl₂/MeOH en mode d'élution par gradient de méthanol (100/0 à 92/8).

➤ Recueil des fractions

Les fractions ont été recueillies avec des tubes à essais par fraction de 20ml et analysées par chromatographie sur couche mince. Celles qui présentent des constituants chimiques semblables sont ensuite rassemblées et testées biologiquement par la suite.

Tableau 4 : Caractéristiques de la colonne chromatographique

| | |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| Diamètre de la colonne | 2,5cm |
| Hauteur de la colonne | 17cm |
| Volume mort | 80ml |
| Poids du gel de silice | 30 g |
| Type de Gel de silice | 60 0,05-0,2 mm), (70-270 mesh ASTM) |

Le rendement des fractions issues de la chromatographie sur colonne est calculé selon le rapport entre le poids de la fraction sèche obtenue et celui du produit déposé.

$$Rendement = \frac{\text{Poids de la fraction sèche obtenu (g)}}{\text{Poids du produit déposé (g)}} \times 100$$

RESULTATS

| |
|-----------------------|
| III. RESULTATS |
|-----------------------|

III.1. METHODES ANALYTIQUES**III.1.1. Criblage phytochimique**

Un criblage phytochimique (v. **méthode au § II.2.1.1, p.9**) a été réalisé sur la poudre de la racine de *Mystroxyton aethiopicum*, afin de déterminer les familles chimiques présentes dans la racine. Les résultats sont récapitulés dans le tableau 5 ci-dessous afin de cerner la nature des principes.

Tableau 5: Résultats du criblage phytochimique

| FAMILLES CHIMIQUES | TESTS | RESULTATS |
|--------------------|---------------------|-----------|
| Alcaloïdes | Mayer | - |
| | Wagner | - |
| | Dragendorff | - |
| Flavonoïdes | Willstätter | + |
| Leucoanthocyanes | Bate-Smith | + |
| Tanins | Gélatine 1% | + |
| | Gélatine salée | + |
| Polyphénols | Chlorure ferrique | + |
| Stéroïdes | Salkowski | + |
| Triterpènes | Liebermann-burchard | + |
| Quinones | Borntrager | - |
| Désoxyoses | Keller-Kiliani | + |
| Iridoïdes | | - |
| Saponines | Indice de mousse | + |

+ : Résultat positif

- : Résultat négatif

ETUDE CHIMIQUE

Le résultat présenté dans ce tableau montre que la racine de *M. aethiopicum* contient des flavonoïdes, leucoanthocyanes, tanins, polyphénols, stéroïdes, triterpènes, désoxyoses et saponines. Aucune trace d'alcaloïde n'a été détectée dans la poudre de la racine.

III.1.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

L'évolution de l'homogénéité des extraits au cours des étapes d'extraction a été appréciée par chromatographie sur couche mince (v. §II.2.1.2, p. 11). Les profils chromatographiques des extraits révélés par le réactif à la vanilline sulfurique, sont présentés sur les **figure 5** et **figure 6** ci-dessous.

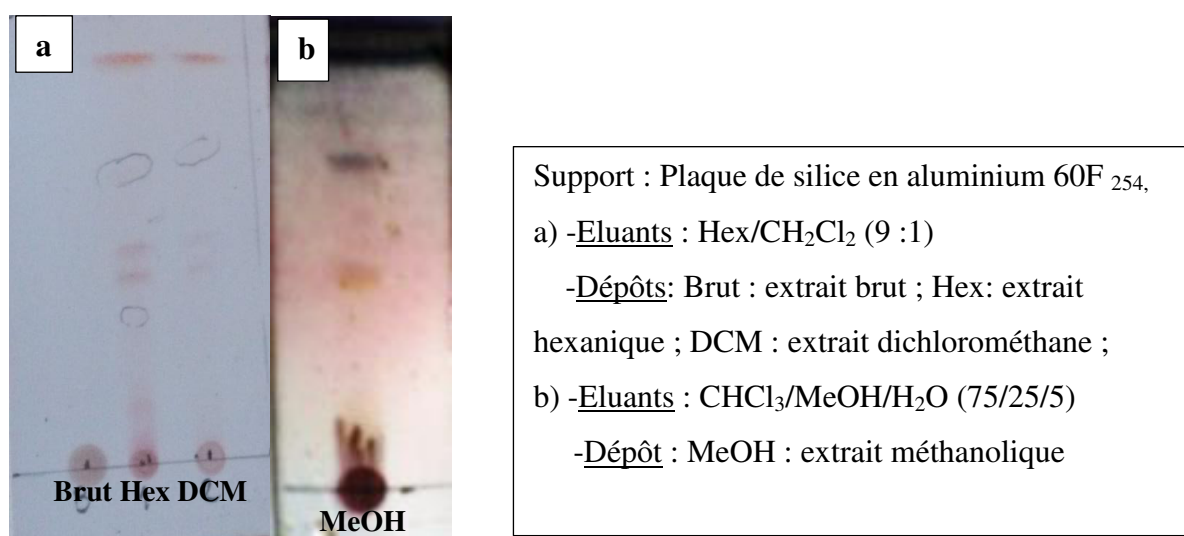


Figure 5: Chromatogramme des différents extraits issus de l'extraction par macérations après pulvérisation à la vanilline sulfurique

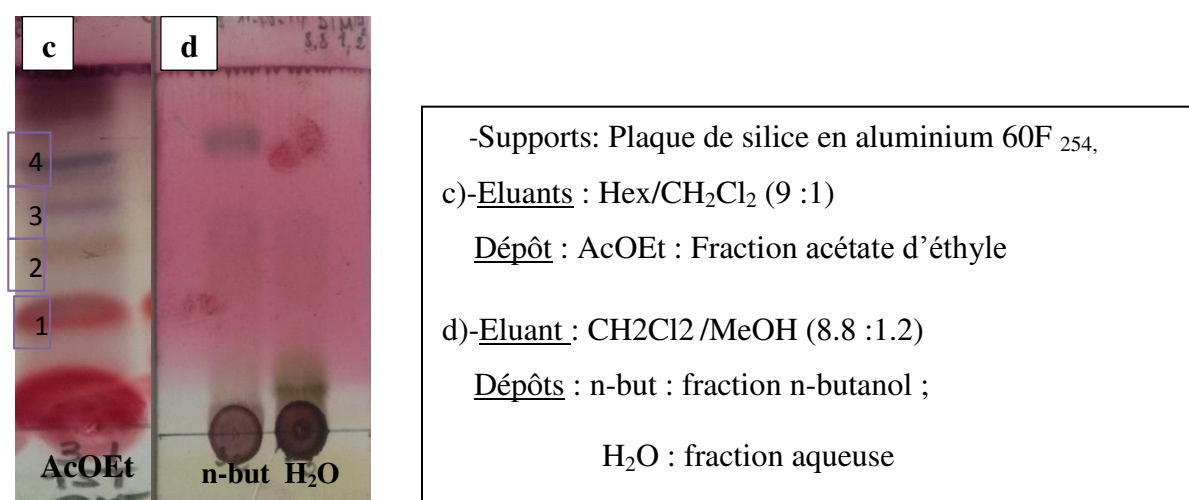


Figure 6: Chromatogramme des différentes fractions méthanoliques issues du partage liquide-liquide après pulvérisation à la vanilline sulfurique.

Tableau 6 : Couleurs et Rf des bandes des 3 fractions méthanoliques

| Fractions | Couleurs des bandes | Rf des bandes |
|------------------|---------------------|---------------|
| AcOEt | rose | 0,31 |
| | jaune | 0,47 |
| | violette | 0,60 |
| | bleue | 0,72 |
| n-butanol | jaune | 0,47 |
| | violette | 0,60 |
| | bleue | 0,72 |
| H ₂ O | jaune | 0,47 |
| | violette | 0,60 |

Ces chromatogrammes montrent que l'acétate d'éthyle a permis d'extraire le plus de composés. En comparant les bandes de la fraction acétate d'éthyle avec les autres fractions, on constate que le fractionnement par l'acétate d'éthyle a permis d'éliminer des contaminants.

III.2. METHODE D'EXTRACTION

III.2.1. Extraction par macération

Les extraits de la racine de *Mystroxydon aethiopicum* ont été préparés à partir de 400g de poudre.

La méthode d'extraction par épuisement à l'aide des solvants de polarité croissante (hexane, dichlorométhane et méthanol) utilisée, est indiquée au § II.2.2.1, p.12. Les extraits obtenus après macération aux solvants de polarités croissantes sont concentrés sous pression réduite et les rendements sont calculés.

Le protocole d'extraction est résumé dans la **figure 3**.

Les caractéristiques des différents extraits obtenus sont résumées dans le tableau n°7 ci-dessous.

Tableau 7 : Caractéristiques et pourcentages des extraits issus de l'extraction par macération

| Extrait | Aspect | Couleur | Rendement |
|------------------------------|----------|--------------|-----------|
| E1 (extrait hexanique) | résineux | Jaune claire | 2,49% |
| E2 (extrait dichloromethane) | visqueux | Jaune foncée | 1,71% |
| E3 (extrait méthanolique) | poudreux | Rouge sang | 3,23% |

III.2.2. Extraction par partage liquide-liquide

L'extrait méthanolique E3 seul ayant montré une activité antimicrobienne, (v. aussi § III.1, p.34, a été fractionné par l'acétate d'éthyle et le n-butanol selon la méthode décrite au § II.2.2.2, p.13. Les caractéristiques des différentes fractions obtenues sont présentées dans le tableau 8 suivant.

Tableau 8: Caractéristiques et rendements des fractions issues du partage liquide-liquide

| Fractions | Aspect | Couleur | Rendement |
|------------------------|----------|------------|-----------|
| 3.1 (acétate d'éthyle) | solide | Rouge sang | 0,10% |
| 3.2 (n-butanol) | solide | Rouge sang | 0,56% |
| 3.3 (aqueuse) | visqueux | Rouge | 0,25% |

Les procédés de l'extraction et les résultats sont récapitulés sur la **figure 7**.

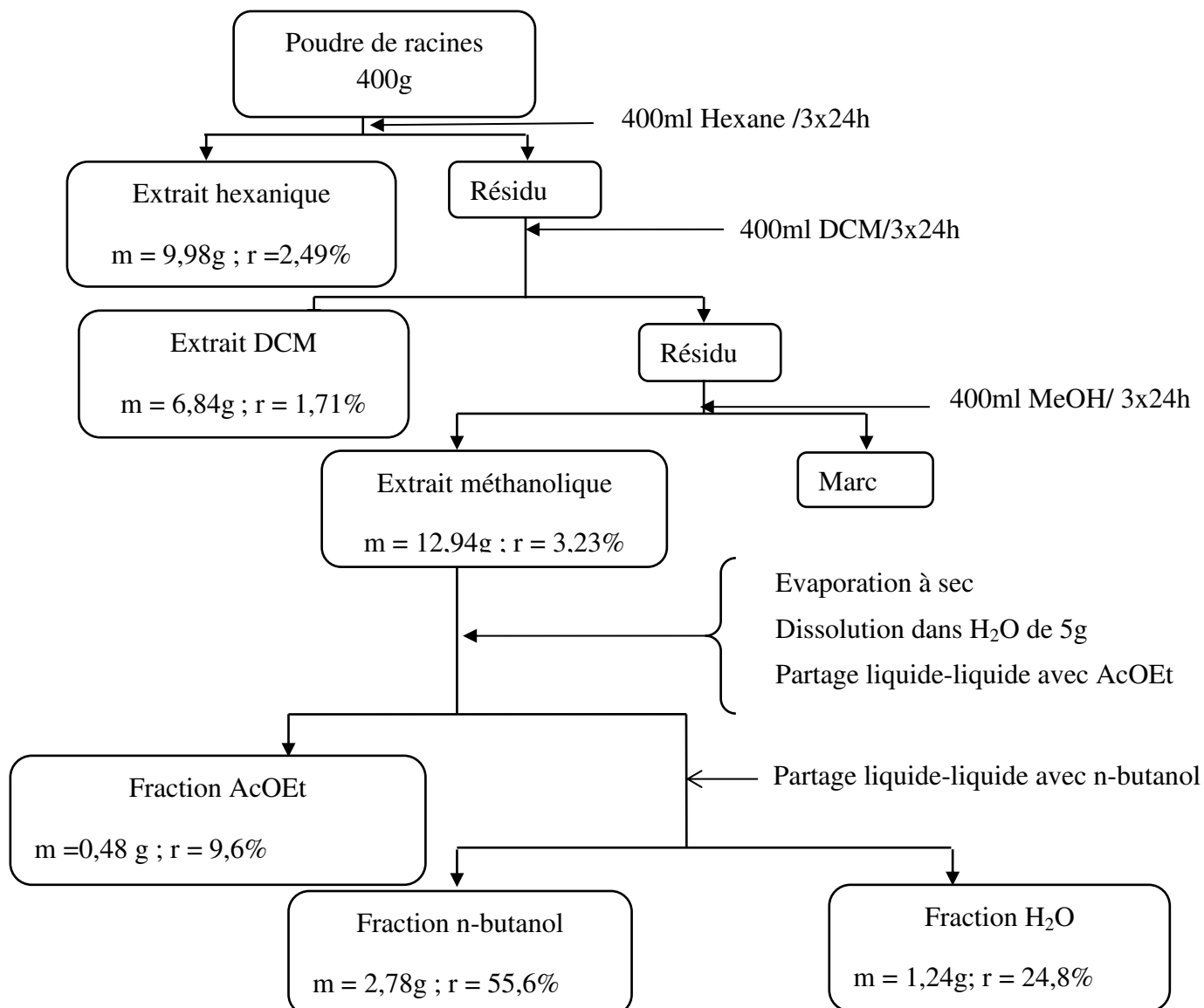


Figure 7 : Schéma récapitulatif des procédés d'extraction

ETUDE CHIMIQUE

Les résultats obtenus lors de l'étape de l'extraction montrent que parmi les différents extraits obtenus, l'extrait méthanolique présente le rendement le plus élevé (3,23%) par rapport au poids de poudre utilisé, suivi par l'extrait hexanique (2,49%), l'extrait dichlorométhane (1,71%).

Les résultats du partage liquide-liquide de l'extrait méthanolique sont les suivants : fraction n-butanol (55,6%), fraction aqueuse (24,8%) et fraction acétate d'éthyle (9,6%). Une perte de 10% a été enregistrée lors du partage liquide-liquide

III.3. METHODE DE FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE OUVERTE

Toutes les étapes de purification ont été guidées par des tests biologiques sur des germes pathogènes et d'homogénéité par CCM.

Des techniques reposant essentiellement sur les différences de la solubilité ou de poids moléculaires ont été testées pour purifier le ou les principes actifs à partir des extraits méthanoliques. L'extrait méthanolique de *M. aethiopicum* a été partagé par une extraction liquide-liquide (Acétate d'éthyle /eau ; n-butanol/eau) afin de simplifier la composition chimique de l'extrait. Les trois extraits (acétate d'éthyle, n-butanol et aqueux) ont été testés.

La fraction acétate d'éthyle s'est avérée la plus active. Le chromatogramme, présenté sur la **figure 8** de cet extrait donne peu de bandes majeures.

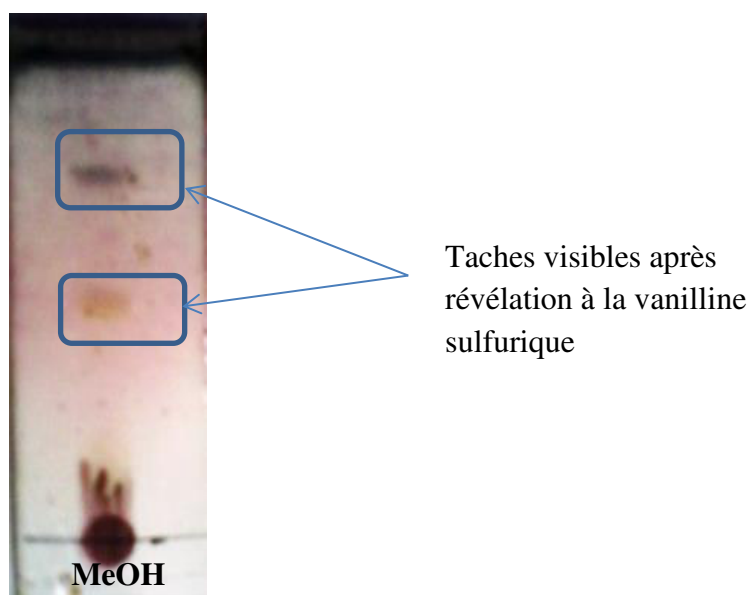


Figure 8 : Chromatogramme de l'extrait méthanolique

ETUDE CHIMIQUE

Cet extrait est ensuite fractionné par chromatographie sur colonne ouverte (§ II.2.3, *p.14*) en utilisant des solvants d'extraction à gradient croissant allant de dichlorométhane 100% à dichlorométhane /méthanol 8% (voir schéma récapitulatif **figure 10**). D'après les chromatogrammes des sous-fractions obtenues sur colonne de la fraction AcOEt, 4 produits sont supposés isolés dont les sous-fractions F7, F8, F11 et F17. Les sous-fractions F5 et F16 présentent des profils intéressants à purifier. Les profils chromatographiques ainsi que les caractéristiques des 18 sous-fractions sont récapitulés sur les **figures 9** et dans le tableau 9 ci-dessous.

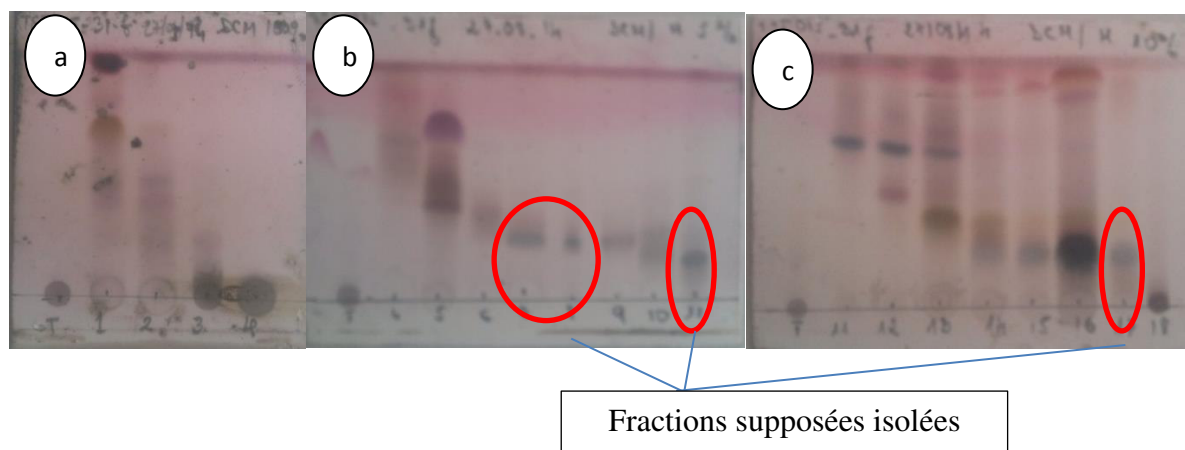


Figure 9 : Chromatogrammes des 18 sous-fractions issues de la chromatographie sur colonne ouverte de la fraction acétate d'éthyle

- a) Support : Plaque de silice en aluminium 60F₂₅₄,
Eluant : CH₂Cl₂ 100%
Dépôts : sous-fractions F1 à F4 et témoin
- b) Support : Plaque de silice en aluminium 60F₂₅₄,
Eluant : CH₂Cl₂ / MeOH (95 :5)
Dépôts : sous-fractions F4 à F11 et témoin
- c) Support : Plaque de silice en aluminium 60F₂₅₄
Eluant : CH₂Cl₂ / MeOH (90 :10)
Dépôts : sous-fractions F11 à F18 et témoin

ETUDE CHIMIQUE

Tableau 9: Caractéristiques des fractions obtenues par fractionnement sur colonne ouverte

| Fractions | Aspect | Couleur | Masses (mg) |
|-----------|---------|------------|-------------|
| 1 | huileux | incolore | 29,4 |
| 2 | huileux | incolore | 9,5 |
| 3 | solide | jaune | 1,4 |
| 4 | huileux | jaune | 1,9 |
| 5 | solide | jaune | 0,9 |
| 6 | solide | blanc | 4,7 |
| 7 | solide | blanc | 1,2 |
| 8 | solide | blanc | 4,3 |
| 9 | solide | blanc | 5,4 |
| 10 | solide | blanc | 5,1 |
| 11 | solide | blanc | 8,1 |
| 12 | solide | blanc | 22,2 |
| 13 | solide | jaune | 9,3 |
| 14 | huileux | jaune | 8,3 |
| 15 | solide | jaune | 5,4 |
| 16 | huileux | jaune | 20,1 |
| 17 | huileux | rouge | 16,2 |
| 18 | solide | rouge sang | 114,2 |

Grâce aux profils chromatographiques obtenus après fractionnement de la fraction acétate d'éthyle, nous avons pu réaliser des regroupements. Quatre d'entre elles sont plus ou moins isolées (sous-fractions F7, F8, F11, F17) avec des R_f respectifs 0,25 ; 0,23 ; 0,17 ; 0,19 et d'autres présentant des profils intéressants possibles à isoler.

Les fractions ont été évaporées à sec. Le résumé de la purification est donné par le diagramme ci-après.

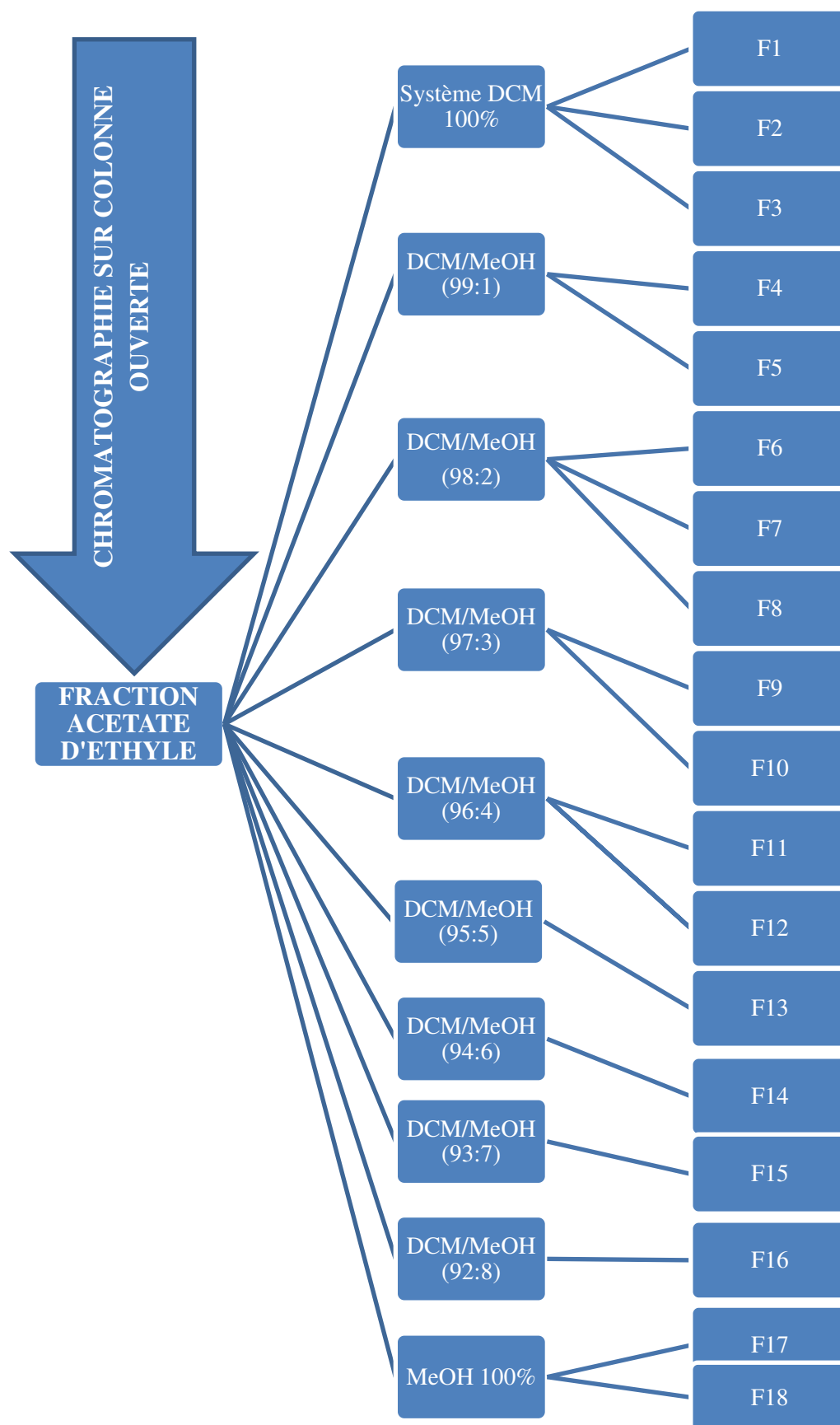


Figure 10: Schéma récapitulatif du procédé de purification par chromatographie sur colonne

ETUDE BIOLOGIQUE

Deuxième partie

ETUDE BIOLOGIQUE DES EXTRAITS

I. INTRODUCTION

Le but de cette partie se rapporte sur la vérification scientifique de quelques utilisations traditionnelles (traitement des diarrhées et des maladies infectieuses, utilisation comme fortifiantes) de racine de *M. aethiopicum* codée TST 015.

Pour sa réalisation, nous avons :

- recherché l'activité antibactérienne des extraits et des fractions isolées de racine de la plante sur certaines bactéries puis déterminé la CMI et la CMB des fractions très actives ;
- prospecté l'activité antioxydante des extraits bruts de la plante.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. MATERIELS

II.1.1. MATERIELS UTILISES POUR L'ETUDE DES ACTIVITES ANTIMICROBIENNES

II.1.1.1. Les germes utilisés et les milieux de culture

II.1.1.1.1. Les germes utilisés

Tableau 10 : Caractéristiques des germes utilisés

| SOUCHES | REFERENCES | TYPES | FORMES |
|--------------------------------|-------------|--------|--------------|
| <i>Clostridium perfringens</i> | ATCC13124TM | Gram + | bacille |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | ATCC19114TM | Gram + | coccobacille |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC11632 | Gram + | coque |
| <i>Proteus mirabilis</i> | ATCC35659 | Gram - | bacille |
| <i>Shigella flexneri</i> | ATCC12022 | Gram- | bacille |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC10145 | Gram- | bacille |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | ATCC23715 | Gram- | bacille |
| <i>Salmonella enterica</i> | ATCC13076 | Gram- | bacille |
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC 8739 | Gram- | bacille |
| <i>Candida albicans</i> | ATCC10231 | Levure | |

II.1.1.1.2. Les milieux de culture

Les milieux de cultures utilisés sont tous pour analyses et de marques FLUKA ANALYTICAL et DIFCO.

ETUDE BIOLOGIQUE

La gélose de Sabouraud: constitue un milieu classique pour la culture, l'isolement et l'identification des levures et des moisissures saprophytes ou pathogènes.

La gélose Mueller-Hinton est une gélose riche, non sélective. Elle est utilisée pour la réalisation de l'antibiogramme standard.

Eau peptonée est un milieu liquide qui permet la culture des germes ne présentant pas d'exigences particulières.

Eau physiologique: est une solution contenant 9 g de chlorure de sodium par 1000 ml d'eau distillée. C'est une solution isotonique, qui permet de préserver le volume cellulaire.

Les compositions de ces milieux sont en *annexe 3*.

II.1.1.2. Les disques pour les tests d'antibiogramme

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

II.1.2. MATERIELS UTILISES POUR L'ETUDE DES ACTIVITES ANTIOXYDANTES

Lors de l'étude des activités antioxydantes nous avons utilisé les matériels suivants :

- **Plaques pour chromatographie sur couche mince**

(Si gel 60 de marque **MERCK**) pour le criblage des activités antioxydantes des extraits analysés.

- **Spectrophotomètre**

Nous avons utilisé un spectrophotomètre de marque DMS 100S pour la quantification du pouvoir antioxydant des extraits avec $\lambda = 517\text{nm}$

- **DPPH ou 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle** :

Le DPPH est un radical libre à piéger pour les 02 méthodes.

II.2. METHODES

II.2.1. METHODES D'ETUDE DES ACTIVITES ANTIMICROBIENNES

II.2.1.1. Stérilisation

Afin d'éviter toute contamination en microbiologie, tous les matériels utilisés doivent être stériles:

- l'anse d'ensemencement est flambée avant et après chaque utilisation,
- les verreries sont stérilisées à l'étuve ;
- les manipulations se déroulent en milieu stérile, soit dans un rayon de 15cm de la flamme d'un bec Bunsen soit sous une hotte à flux laminaire.

ETUDE BIOLOGIQUE

- les mains du manipulateur sont nettoyées avec l'alcool 70°C avant et après chaque test et on évite de parler pendant les manipulations afin d'éviter toute contamination.
- Après la lecture des résultats, tous les matériaux souillés sont décontaminés à l'autoclave à 121°C, à 2 bars pendant 90mn avant d'être lavé.
- Les extraits utilisés sont filtrés par un filtre millipore (STERILUM) de diamètre des pores 0,22µm.

II.2.1.2. Effets des extraits de *M. aethiopicum* sur la croissance bactérienne

L'étude des effets des extraits sur les microorganismes est entreprise selon des techniques de mesure de sensibilité aux antibiotiques. Il s'agit de :

- La méthode de diffusion en milieu solide ou la méthode des disques ;
- La méthode de microdilution pour la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) ;
- La méthode « **Bioautography** ».

Avant d'entreprendre ce test, un isolement, une purification et une caractérisation des germes ont été effectués.

II.2.1.2.1. Isolement et purification des souches

II.2.1.2.1.1. Isolement

II.2.1.2.1.1.1. Principe

Cette technique consiste à séparer les différentes colonies présentes dans un prélèvement afin d'obtenir des colonies pures indispensables à toute manipulation bactériologique.

II.2.1.2.1.1.2. Mode opératoire

Chaque souche à isoler est relancée dans du bouillon nutritif à 37°C pendant 24h. Après incubation, la croissance des souches dans la culture se traduit par la turbidité du milieu. Pour avoir des colonies isolées, chaque souche préalablement relancée est ensemencée dans des boîtes de Petri contenant de la gélose nutritive, selon la technique d'épuisement. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h.

II.2.1.2.2. Purification

Après incubation, la pureté des souches isolées est vérifiée par la méthode de la coloration GRAM. L'isolement est répété jusqu'à l'obtention d'une souche pure. Les souches pures sont ensuite conservées (mode de conservation au § II.2.1.2.4, p.27).

ETUDE BIOLOGIQUE

II.2.1.2.3. Classification des germes par la coloration GRAM (Lambin, 1976 ; Larpent, 1997 ; Marchal, 1992)

II.2.1.2.3.1. Principe :

La coloration de GRAM (composition en *annexe 4*) permet de distinguer les bactéries Gram négatives des bactéries Gram positives suivant leur coloration. La technique repose sur la différence de perméabilité des parois bactériennes au passage de certains solvants.

Des bactéries préalablement colorées en violet par le cristal violet qui se lie à la paroi, sont décolorées par un solvant, dans la majorité des cas c'est de l'alcool. Selon la composition de leur paroi, les bactéries se subdivisent en bactéries **GRAM⁺** et en bactéries **GRAM⁻**.

II.2.1.2.3. 2. Mode opératoire

-Préparation et fixation des souches bactériennes

La souche à étudier est mise en suspension dans 3 gouttes d'eau distillée. Un prélèvement de la suspension ainsi obtenue est étalé sur une lame en verre. Le frottis obtenu est séché à l'air à proximité de la flamme d'un bec bunsen, puis, fixé à l'alcool absolu par trois passages sur la même flamme ; la lame est ensuite colorée successivement :

- * par la solution de violet de gentiane phéniquée pendant 60s ;
- * par la solution iodo-iodurée (Lugol) pendant 60s ;
- *par la solution d'alcool acétone pendant 3 ou 4s.

Après lavage rapide à l'eau du robinet, la lame est recolorée, en faisant agir pendant 60 s, la solution de fuschine de Ziehl. Elle est de nouveau rincée à l'eau distillée, puis séchée entre deux feuilles de papier filtre.

-Pour terminer, la préparation est recouverte par 3 gouttes d'huile d'immersion. La lame est ensuite observée sous microscope optique LEITZ au fort grossissement (G x 100). Les bactéries **GRAM⁺** apparaissent violettes et celles des **GRAM⁻** sont colorées en roses.

-Notons que la coloration de GRAM doit être effectuée sur des cultures jeunes de 24-48h (Richard et Kiredjian, 1995).

II.2.1.2.4. Conservation des souches par congélation (Denis et al., 1944)

Les souches sont conservées par congélation.

II.2.1.2.4.1. Principe

La conservation sert à maintenir la disponibilité et la viabilité des souches microbiennes ainsi que d'entretenir la collection pour le contrôle de qualité. La durée de cette conservation peut varier de quelques jours à plusieurs années.

ETUDE BIOLOGIQUE

II.2.1.2.4.2. Mode opératoire

Pour chaque souche à conserver, 5 à 6 colonies de cultures de 24h ont été prélevées. Elles ont été mises dans des cryotubes contenant du bouillon nutritif (milieu pauvre) à 25% de glycérol stérile. Les cryotubes sont incubés pendant 24h à 37°C puis conservés à -80°C jusqu'à leurs utilisations.

II.2.1.2.5. Repiquage des souches microbiennes (Moroh et al ; 2008)

Les souches conservées sont repiquées par stries sur milieu solide puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées.

Les colonies isolées ont été utilisées pour la préparation de l'inoculum pour toutes les manipulations.

II.2.1.2.6. Préparation de l'inoculum (Moroh et al; 2008)

II.2.1.2.6.1. Principe

L'inoculum est fait à partir des colonies jeunes de 24 heures. Un inoculum provenant d'une culture bactérienne d'une nuit atteindra plus rapidement la phase exponentielle de croissance qu'un inoculum provenant d'une culture congelée.

II.2.1.2.6.2. Mode Opératoire

- 2 à 4 colonies isolées de chaque souche microbienne ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine. Par la suite, elles sont homogénéisées dans 4ml d'eau physiologique stérile afin d'obtenir une suspension dont l'opacité correspond à la densité 0,5 de l'échelle de MacFarland équivalent à $1,5.10^8$ bactéries/ml.
- 1ml de cette suspension a été prélevé puis introduit dans un tube contenant 9ml d'eau peptonée afin d'obtenir un inoculum susceptible de donner une nappe de colonies équivalente à $1,5.10^7$ bactéries/ml. L'inoculum formé constitue la suspension bactérienne utilisée pour la suite de notre étude.

II.2.1.2.7. La méthode de diffusion en milieu solide ou la méthode des disques ou antibiogramme

II.2.1.2.7.1. Principe

Le test consiste à déposer des disques imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries.

L'antibiotique diffuse au sein de la gélose en créant une zone circulaire appelée halo d'inhibition ou auréole d'inhibition. Dans cette zone, les concentrations d'antibiotique diminuent du centre vers la périphérie. Le diamètre de la zone d'inhibition varie en fonction du degré de sensibilité de la bactérie à l'antibiotique (Duval et Soussy, 1991 ; Ferron, 1994).

ETUDE BIOLOGIQUE

II.2.1.2.7.2. Mode opératoire

Le test se déroule en 3 étapes successives :

1^{ère} étape :

La colonie jeune de 24h de chaque souche bactérienne étudiée est mise en suspension dans de l'eau physiologique pour former un inoculum, selon la méthode décrite au

§ II.2.1.2.6, p.28.

2^{ème} étape :

- Une quantité d'inoculum égale à 2ml a été réparti dans des boîtes de Petri contenant le milieu solide (MH pour les bactéries et Sabouraud pour la levure) selon la technique d'inondation. L'excès est ensuite aspiré avec une pipette stérile. Chaque boîte est séchée sous la hotte pendant 15 à 20min. Les antibiotiques de références ainsi que les disques stériles d'antibiogramme imprégnés de 10µl d'extrait à tester de concentration bien déterminée sont déposés à la surface du milieu à l'aide d'une pince fine stérile. kétoconazole est l'antifongique de référence. Pour les bactéries, tétracycline et gentamycine sont utilisés comme antibiotiques de références.
- Les tests pour chaque souche ont été effectués en triple et la moyenne sera prise comme le résultat final.
- Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 48h pour la levure.

3^{ème} étape

Le diamètre de l'halo d'inhibition est mesuré avec une règle graduée. La substance a une activité sur le germe quand un halo d'inhibition apparaît autour du disque.

Les résultats sont évalués en se référant aux normes définies dans le tableau 11.

Tableau 11 : Normes utilisées pour la lecture des résultats par la méthode des disques: le diamètre du disque est 6 mm.

| Diamètre du halo d'inhibition | Sensibilité des germes | Résultats |
|-------------------------------|------------------------|-----------|
| $x < 7 \text{ mm}$ | Insensible | — |
| $7\text{mm} < x < 8\text{mm}$ | Assez sensible | + |
| $8\text{mm} < x < 9\text{mm}$ | Sensible | ++ |
| $x > 9\text{mm}$ | Très sensible | +++ |

X : diamètre du halo d'inhibition

ETUDE BIOLOGIQUE

II.2.1.2.8. Méthode « Bioautography »

II.2.1.2.8.1. Principe

C'est une technique d'analyse qui permet à la fois de séparer par chromatogramme les composants organiques d'un extrait et d'étudier leurs effets biologiques. Elle facilite l'isolement et l'identification des différents constituants actifs d'un extrait brut testé (Oyi, 2001).

Une ou plusieurs bandes actives parmi les constituants d'un extrait testé ont été localisées sur le chromatogramme (Botz et al. 2001).

II.2.1.2.8.2. Mode opératoire

Le protocole utilisé a été inspiré de celui décrit par Teixeira et al. en 2007.

II.2.1.2.8.2.1. Préparation de la plaque CCM

- Une concentration égale à 1mg/dépôt de 10µl d'extrait à étudier a été déposée sur une plaque chromatographique de silice gel 60 F₂₅₄ de dimension égale à 5 x 7cm.
- la plaque a été développée dans une cuve contenant le système de solvant approprié aux extraits testés.
- Une fois séchée sous la hotte, la plaque a été déposée dans une boîte de Pétri.

II.2.1.2.8.2.2. Préparation de la culture bactérienne

- L'inoculum a été préparé selon la méthode décrite par Moroh et al (2008) au § II.2.1.2.6, p.28.
- 1ml de l'inoculum à $1,5 \cdot 10^8$ bactéries/ml a été ajouté dans 19ml de milieu de culture (MH agar ou Sabouraud) gardé à 45°C, pour avoir un milieu pré-ensemencé. Le tout est ensuite coulé dans la boîte de Petri contenant la plaque CCM.
- Un séchage de la boîte de Petri sous la hotte pendant 20min a été effectué avant son incubation sous une atmosphère humide pendant 24h à 37°C.

L'extrait est actif contre le germe test si après incubation, il y a apparition d'une auréole d'inhibition exprimée par une zone claire soit sur le dépôt et/ou au niveau des tâches de migration de chaque bande active.

Ce résultat est mieux observé après pulvérisation du contenu de la boîte de Petri par le MTT (Méthyl Tetrazolium Chloride) à 10% dont le mode de préparation est en *annexe 6*.

II.2.1.2.9. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice

La détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice s'est fait par méthode de microdilution en milieu liquide.

ETUDE BIOLOGIQUE

II.2.1.2.9.1. *Principe*

Elle consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques selon une progression géométrique de raison 2. L'inoculum bactérien est distribué dans une série de microcupules d'une plaque de microtitration contenant l'antibiotique. Après incubation, la CMI est indiquée par le puits qui contient la plus faible concentration d'antibiotique où aucune croissance n'est visible (**Kil, 2009**).

II.2.1.2.9.2. *Mode opératoire*

La méthode utilisée est celle décrite par **Fawole (2009) et Kuete (2009)**. Les tests sont effectués de la manière suivante :

- Des colonies bactériennes de 24h sont diluées dans un tube contenant le bouillon Mueller Hinton (MHB).
- La suspension bactérienne formée a été standardisée à 0,5 Mac Farland
- La poudre de chaque extrait à tester a été dissoute dans du DMSO 3% pour avoir une concentration égale à 1mg/ml, puis stérilisée par filtration millipore (diamètre du pore : 0,22µm).
- 100µl de chaque extrait testé ont été dilués avec 95µl du MHB puis répartis dans les microplaques à 96 puits; 5µl d'inoculum sont ajoutés dans chaque puits. Ces dilutions ont été réalisées de façon à avoir des concentrations finales des extraits comprises entre 0.24µg /ml et 500µg/ml
- Un témoin négatif et un témoin positif ont été utilisés :
 - ✓ Témoin négatif : 100µl du MHB
 - ✓ Témoin positif: 95µl du MHB additionnés de 5µl d'inoculum

Les plaques sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h.

La CMI a été évaluée par ajout de 20µl de solution de MTT à 10% dans chaque puits, après incubation à 37°C pendant 30min (**Kuete et al., 2008**). Le MTT un indicateur coloré de couleur jaune vire au violet lorsqu'il y a croissance bactérienne.

En effet, la CMI est indiquée par la cupule qui contient la plus faible concentration d'extrait où aucun changement de coloration n'est observé.

II.2.1.2.10. *Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide*

II.2.1.2.10.1. *Principe*

La recherche de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) consiste à repiquer sur milieu solide le contenu de tous les puits qui ne présente pas de trouble visible à l'œil nu lors de la détermination de la CMI.

ETUDE BIOLOGIQUE

II.2.1.2.10.2. Mode opératoire

Le contenu de chaque puits (10µL) utilisé pour la détermination de la CMI qui ne présente pas de croissance visible est repiqué sur milieu Muller Hinton puis incubés à 37°C pendant une nuit.

La CMB correspond à la plus faible concentration de l'extrait où aucune colonie bactérienne ne pousse après incubation.

II.2.2. METHODES D'ETUDE DES ACTIVITES ANTIOXYDANTES

II.2.2.1. Criblage de l'activité antioxydante par la méthode «Bioautography»

III.2.2.1.1. Principe

Le principe est le même que celui décrit au § II.2.1.2.8, p.30.

II.2.2.1.2. Mode opératoire

- La technique de dépôt des extraits sur la plaque CCM est identique à celle qui a été citée au § II.2.1.2.8.2.1, p.30. Seulement, après migration puis séchage à l'air libre, la plaque a été révélée par une solution de DPPH à 25% de méthanol.
- 10 à 30minute (mn) après la pulvérisation, les extraits testés ont un pouvoir antioxydant si des zones claires sont apparues sur la plaque CCM, soit au niveau des dépôts et/ou au niveau des tâches de migration des composants des extraits. Aucune activité n'est observée dans le cas contraire.

II.2.2.2. Quantification du pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH

II.2.2.2.1. Principe

Le DPPH (mode de préparation en *annexe 5*) est un radical libre stable ayant au centre de sa molécule deux atomes d'azote. Il peut être inhibé par transfert d'atome d'hydrogène, par transfert d'électrons (équations) ou par perte séquentielle du proton (**Reyes et al., 2009**).

L'addition du radical DPPH à une solution éthanolique (ou méthanolique) contenant un composé potentiellement antioxydant et pouvant céder un atome d'hydrogène entraîne donc une diminution de la coloration violette caractéristique de la forme oxydée du DPPH (**figure11**) qui peut être facilement suivie par un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 517nm. La rapidité de la perte de couleur est directement proportionnelle à l'activité antioxydante du donneur d'hydrogène (**Grigoras, 2012**).

ETUDE BIOLOGIQUE

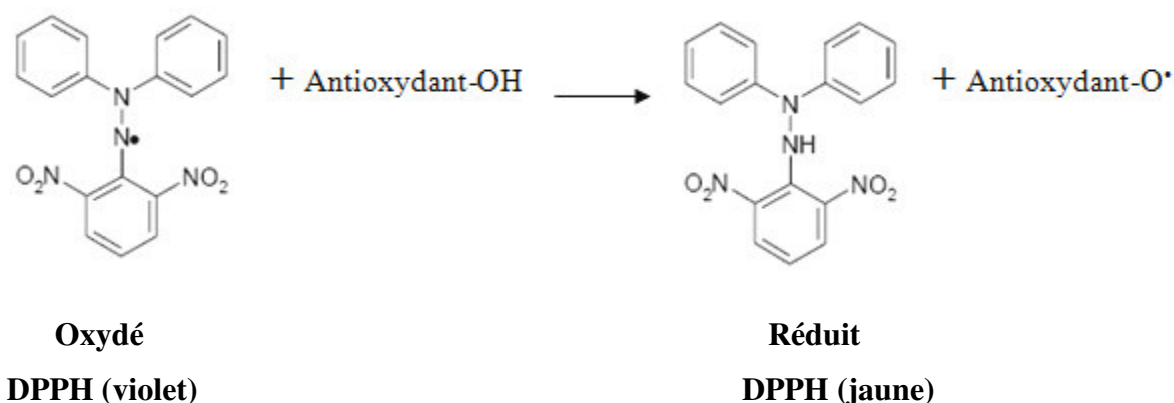


Figure11 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

II.2.2.2.2. Mode opératoire

Cette activité est déterminée selon la méthode d'**Awika et al. (2003)**.

25mg de DPPH sont dissous dans 100ml de méthanol et gardés à -20 °C à l'abri de la lumière avant utilisation.

Dans des tubes secs, 200µl de la solution à tester sont introduits, puis 3800µl de la solution de DPPH à 25% sont ajoutés. Pour chaque concentration, un blanc constitué de 3800µl de DPPH, additionné de 200µl de méthanol est préparé. Après 30min d'incubation à l'obscurité à la température ambiante, une mesure de l'absorbance à 517nm a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre. L'activité antioxydante qui exprime la capacité de piéger le radical libre est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol. Elle est donnée par la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = (\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{test}} / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$$

[Yoo et al, 2008]

Où Abs désigne l'absorbance à la longueur d'onde de 517nm

Les résultats ont été exprimés par la moyenne de 3 mesures ± écart type.

Le pourcentage d'inhibition ainsi calculé a été comparé à une courbe d'étalonnage de l'α- tocophérol entre 150mM à 600mM.

RESULTATS

III. RESULTATS

III.1. Evaluation de l'activité antibactérienne par diffusion sur gélose (antibiogramme)

L'activité antibactérienne de trois extraits (extrait hexanique, extrait dichlorométhanique, extrait méthanolique) et trois fractions méthanoliques (fraction acétate d'éthyle, fraction n-butanol, fraction aqueuse) de la racine de *M. aethiopicum* à une concentration de 1mg/disque a été étudiée sur 03 souches de bactéries Gram-positives (*S.aureus*, *C.perfringens* et *L. monocytogenes*), 05 souches de bactéries Gram- négatives (*Y.enterocolitica*, *P.mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S.flexnerii*, *S.enterica*) et une levure (*C.albicans*) selon la méthode de diffusion sur gélose (Duval, 1990) décrite au § II.2.1.2.7, p.28. Les résultats des tests sont présentés sur la **figure 12** et dans le tableau 12 ci-dessous.

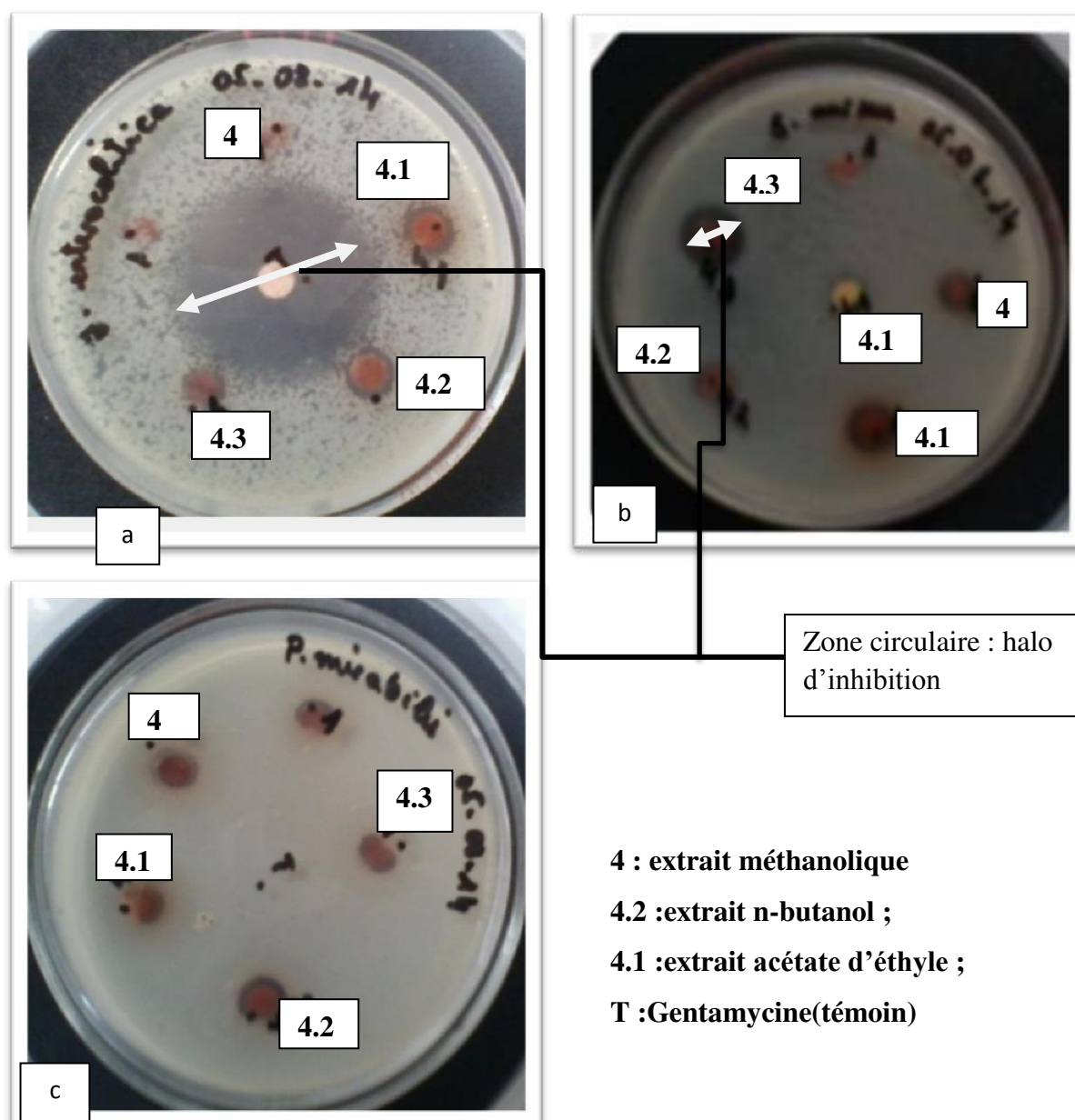


Figure 12 : Spectre d'activité des extraits testés a) *Y. enterocolitica* ; b) *S. aureus* ; c) *P. mirabilis*

ETUDE BIOLOGIQUE

Tableau 12 : Activité antibactérienne des extraits bruts de *M. aethiopicum* à une concentration de 1mg/disque

| Diamètre de l'halo inhibition en mm | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|------------------------|-----------------|----------------------|-------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| | Gram-positif | | | Gram-négatif | | | | | Levure |
| Souches | <i>L.monocytogenes</i> | <i>S.aureus</i> | <i>C.perfringens</i> | <i>Y.enterocolitica</i> | <i>P.mirabilis</i> | <i>P.aeruginosa</i> | <i>S.flexnerii</i> | <i>S.enterica</i> | <i>C.albicans</i> |
| Extraits (1mg/disque) | | | | | | | | | |
| Hex | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DCM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MeOH | 7±0,0 | 7±0,0 | 0 | 0 | 8±0,5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Fractions méthanoliques (1mg/disque) | | | | | | | | | |
| AcOEt | 9±0,0 | 9±0,5 | 0 | 7±0,5 | 7±0,5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| n-butanol | 8±0,0 | 0 | 0 | 0 | 8±0,0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| H2O | 7±0,5 | 11±0,5 | 0 | 7±0,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | NT |
| Antibiotiques de références | | | | | | | | | |
| Gentamycine(10µg/dis) | NT | 35±0,5 | 30±0,5 | 35±0,5 | 35±0,5 | 32±0,2 | 30±0,5 | 32±0,5 | NT |
| Tétracycline (30µg/disc) | 34±0,5 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| Kétoconazole (30µg/disc) | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | 40±0,5 |

- : Non testé 0 : inactif

ETUDE BIOLOGIQUE

D'après la **figure 12** et le tableau 12,

Les extraits hexanique et dichlorométhane, n'ont aucun effet contre les micro-organismes utilisés dans cette étude.

Selon les normes données par l'IPM (v § **II.2.1.2.7.2**; *tableau 11, p.29*),

- parmi les 03 souches de bactéries Gram-positives, 02 souches (*S.aureus* et *L. monocytogenes*) sont assez sensible pour l'extrait méthanolique.
- Pour les 05 souches de bactéries Gram-négatives testées, deux souches sont sensibles (*P. mirabilis* et *Y. enterocolitica*) à cet extrait.
- Aucun extrait n'est actif contre la levure *C. albicans*.

Le test antibactérien des fractions méthanoliques (acétate d'éthyle, n-butanol et aqueuse) sur les souches sensibles (*S.aureus*, *L. monocytogenes*, *P. mirabilis* et *Y. enterocolitica*) montre que:

- des activités contre ces bactéries avec des diamètres d'inhibition variant de 7 à 11mm sont observées. La fraction aqueuse a montré la zone d'inhibition maximum contre *S. aureus* (**11±0,5mm**). Mais cette inhibition est inférieure à l'antibiotique de référence utilisée (Gentamycine) contre ce germe.

D'après ces résultats, la fraction aqueuse semble être la fraction la plus active par rapport aux autres fractions acétate d'éthyle et n-butanol testés, mais vue ses profils chromatographiques, elle comporte beaucoup de contaminants.

Par conséquent, la fraction acétate d'éthyle a été choisie pour la suite du travail parce que ses profils chromatographiques montrent des composés bien séparés et isolables. Elle a des activités antibactériennes presque similaires à celles de fraction aqueuse.

Les résultats indiquent que l'activité antimicrobienne contre les bactéries Gram-positives était plus prononcée que celle observée avec les bactéries Gram-négatives. Les différences peuvent être attribuées au fait que l'enveloppe peptidoglycane des bactéries Gram-positives n'est formée que de très peu de couches de peptidoglycane au contraire des multicouches très épaisses de la plupart des bactéries Gram-positives.

Nous pouvons en déduire que notre extrait a un spectre d'activité étroit car il n'agit que sur quelques bactéries Gram positives testées.

III.2. Localisation de l'activité antibactérienne dans les 18 sous- fractions de fraction Acétate d'éthyle par la méthode « Bioautography »

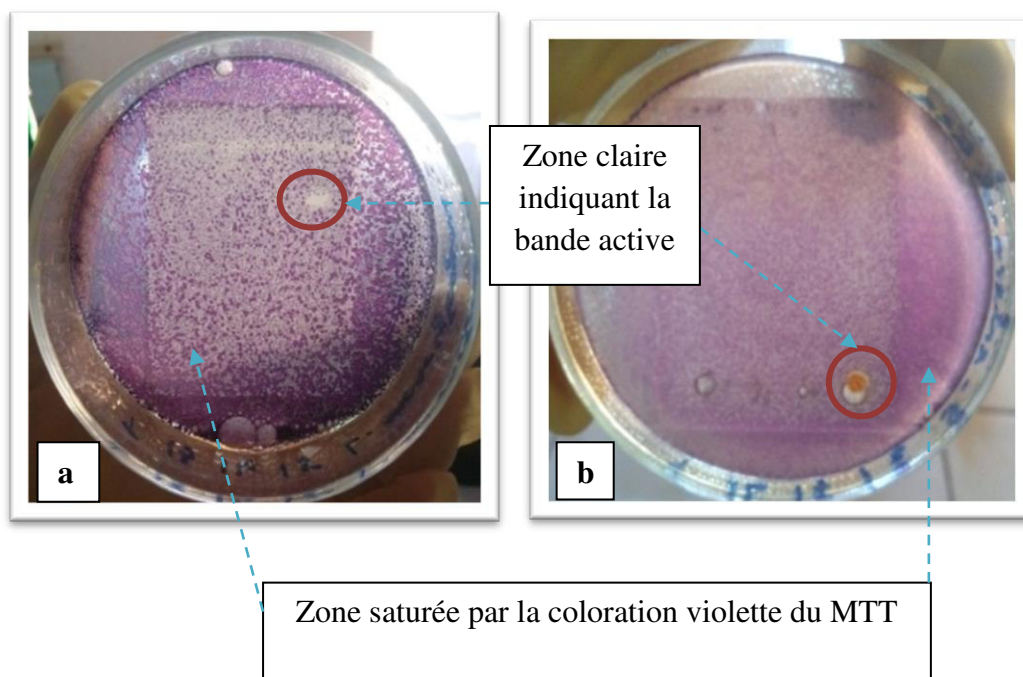
La méthode «Bioautography» directe décrite au § **II.2.1.2.8, p.30** a été utilisée pour localiser l'activité antibactérienne des 18 sous- fractions issues de la fraction acétate d'éthyle.

ETUDE BIOLOGIQUE

Le test a été effectué sur les bactéries sensibles à la fraction lors de l'antibiogramme.

Il s'agit de:

S.aureus, *L.monocytogenes*, *P.mirabilis* et *Y.enterocolitica*. A une concentration de 1mg/dépôt l'activité antibactérienne de chaque sous- fraction est donnée sur la **figure 13**.



a) Souches : *L.monocytogenes*, *P.mirabilis*, *S.aureus* ;

Dépôt : sous- fraction F 15 de la fraction acétate d'éthyle

b) Souches : *Y.enterocolitica*

Dépôt : sous fraction F 18 de la fraction acétate d'éthyle

Figure 13 : Exemple des résultats montrant l'inhibition de la croissance bactérienne par la méthode « Bioautography »

D'après ces figures, la « Bioautography » des 18 sous-fractions vis-à-vis des souches sensibles montre que :

- la pulvérisation par le MTT du contenu de chaque boîte de pétri selon la méthode décrite au § II.2.1.2.8.2.2, p30 révèle l'apparition des zones claires (entourées en rouge) explicitant l'inhibition de la croissance bactérienne par la bande qui compose la sous-fraction correspondante.

ETUDE BIOLOGIQUE

- les composés antibactériens sont localisés dans les sous-fractions F15 et F18 de la fraction acétate d'éthyle. En effet, la sous-fraction F 15 présente une bande active vis-à-vis de 03 souches *L.monocytogenes*, *P.mirabilis* et *S.aureus*. Pour la sous-fraction F18, une auréole d'inhibition contre *Y.enterocolitica* est bien visible sur le dépôt.

III.3. Détermination de la CMI et de la CMB

Pour mieux élucider les activités antibactériennes des sous-fractions F15 et F18 dont les bandes actives sont localisées. Une détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice et de la Concentration Minimale bactéricide à des concentrations comprises entre 0,244µg/ml et 500µg/ml de ces composés sur les souches sensibles : 2 Gram + (*L.monocytogenes*, *S.aureus*) et 1 Gram- (*P.mirabilis*) a été faite en utilisant la méthode décrite aux § II.2.1.2.9. et II.2.1.2.10, p.30, 31. Les résultats sont montrés dans le tableau 13 ci-dessous :

Tableau 6 : Résultats de la CMI et de la CMB des sous-fractions F15 et F18

| CMI /CMB | CMI (µg/ml) | | CMB (µg/ml) | |
|------------------------|-------------|------|-------------|------|
| Sous-fractions | F 15 | F 18 | F 15 | F 18 |
| <i>S.aureus</i> | >500 | 250 | >500 | >500 |
| <i>L.monocytogenes</i> | 250 | 500 | 250 | >500 |
| <i>P.mirabilis</i> | 250 | 500 | 250 | >500 |

D'après ce tableau, les valeurs de la CMI pour F15 et F18 contre *L.monocytogenes* et *P.mirabilis* sont respectivement 250µg/ml et 500µg/ml. Vis-à vis de *S.aureus*, la CMI est supérieure à 500µg/ml pour F15 et égale à 250µg/ml pour F18.

Pour les valeurs de la CMB, elles sont égales aux CMI pour F15 contre les 3 souches testées. Pour F18, elles sont toutes supérieures à 500µg/ml sur les mêmes germes.

En partant de ces résultats, nous pouvons en déduire le mode d'action et la nature de l'activité antibactérienne des sous-fractions F15 et F18 testées. En effet, un produit antibactérien est considéré comme bactéricide quand la valeur de la CMI est très proche ou égale à celle de la CMB et comme bactériostatique quand les deux valeurs sont éloignées (**Bourrée et al, 2002**). En plus, selon **Marmonier (1990)**, lorsque le rapport CMB/CMI d'une substance antimicrobienne est inférieur ou égal à quatre (≤ 4) la substance a un effet bactéricide s'il est supérieur à quatre (> 4), l'effet est bactériostatique.

ETUDE BIOLOGIQUE

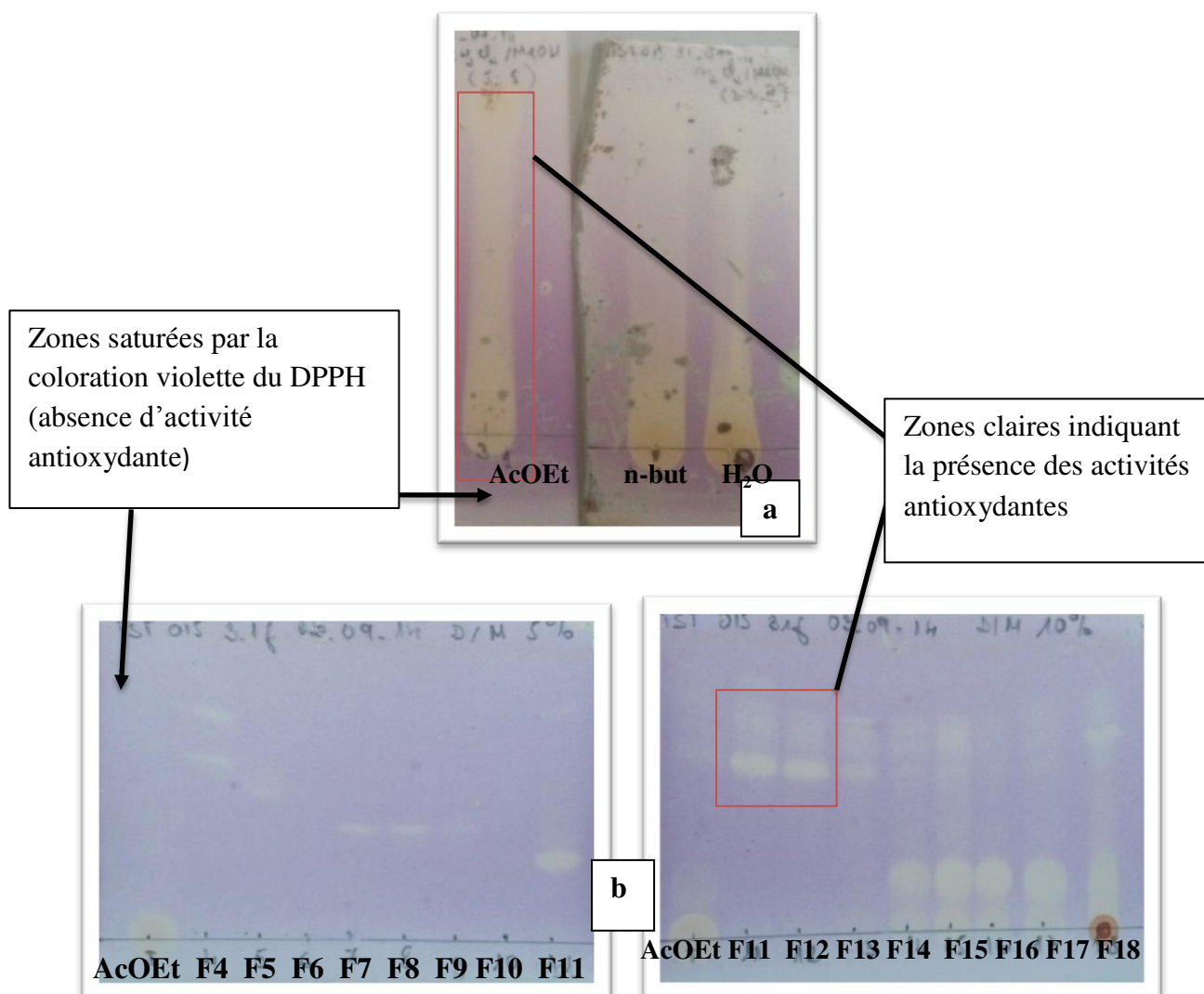
D'après nos résultats, la sous-fraction F15 a un effet bactéricide contre *L.monocytogenes* et *P.mirabilis*. Et quant à la sous-fraction F 18, elle est classée comme bactériostatique sur les 03 germes testés. En effet, selon **Holetz et al (2002)**, F15 a une activité antibactérienne moyenne car sa CMI est comprise entre 100 et 500µg/ml : cas de *L. monocytogenes* et *P.mirabilis* tandis que la sous-fraction F18 a une activité antibactérienne faible car sa CMI est entre 500 et 1000µg/ml.

III.4. Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *M. aethiopicum*

L'activité antioxydante, des fractions méthanoliques (acétate d'éthyle, n-butanol, aqueuse) et les sous fractions (F 4 à F 18) isolées de la fraction acétate d'éthyle, a été évaluée par deux méthodes: criblage de l'activité antioxydante par la méthode « Bioautography » (v. § **II.2.1.2.8, p.29**) et quantification du pouvoir antioxydant par spectrophotométrie UV/visible par la méthode de DPPH (v. § **II.2.2.2, p.32**).

III.4.1. Criblage de l'activité antioxydante par la méthode « Bioautography » (CCM)

Une quantité égale à 1mg/dépôt de chaque fraction méthanolique (fraction acétate d'éthyle, fraction n-butanol, fraction aqueuse) et de chaque sous- fraction de l'acétate d'éthyle a été déposée sur la plaque CCM, suivant la méthode décrite au § **II.2.1.2.8.2.1, p.30**. La révélation de la plaque par la solution méthanolique de DPPH à 25% (25mg de DPPH dans 100ml de méthanol) permet d'obtenir des renseignements supplémentaires sur l'activité antioxydante des différents composants des fractions et des sous-fractions testés. Les résultats sont montrés sur la **figure 14** ci-après.



a) Fractions acétate d'éthyle, n-butanol et aqueuse

b) Activités antioxydantes des sous-fractions de l'acétate d'éthyle

Figure 14: Profils chromatographiques montrant l'activité antioxydante des fractions et des sous-fractions de *M. aethiopicum* observée après pulvérisation des plaques CCM par DPPH.

Ces profils chromatographiques montrent la présence de 02 types de zones :

- Des zones blanchâtres sur certains dépôts et/ou sur la ligne de migration des bandes qui expliquent la capacité des principes actifs correspondant à piéger le radical libre DPPH d'où l'effet antioxydant.
- Des zones violettes sur la plaque qui indiquent la présence du radical libre non piégé.

ETUDE BIOLOGIQUE

En effet, les 03 fractions méthanoliques et les sous-fractions F4, F7, F8, F 11, F 12, F13, F14, F15, F16, F17, F18 sont douées d'activité antioxydante. Les sous fractions F5, F6, F9, F10 ne possèdent pas la capacité antioxydante.

III.4.2. Quantification du pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH

Le pouvoir antioxydant des 03 fractions (acétate d'éthyle, n-butanol et aqueux) détecté lors du criblage a été quantifié dans le but de comparer leur capacité antioxydante avec celle d'un antioxydant standard l' α -tocophérol. Les extraits sont testés à une concentration unique égale à 0,5mg/ml. Des concentrations comprises entre 150mM -600mM de l' α -tocophérol sont utilisées pour dresser la courbe standard (**figure 15**). La méthode utilisée est celle décrite au § II.2.2.2, p.32. Les résultats sont récapitulés dans le tableau 14.

Tableau 7 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en équivalent α -tocophérol

| Extraits | Concentrations (mg/ml) | % d'inhibition du DPPH | Equivalent α - tocophérol (mM/mg/l d'extrait) |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|--|
| (3.1) AcOEt | 0,5 | 59,78 | 331,50 |
| (3.2) n-butanol | 0,5 | 99,25 | 550,16 |
| (3.3) H2O | 0,5 | 93,45 | 518,03 |

D'après ce tableau, à une concentration de 0,5mg/ml, les fractions Acétate d'éthyle, n-butanol et aqueuse inhibent le radical libre DPPH de 59,78% à 99,25%.

En amenant chaque pourcentage d'inhibition du DPPH dans l'équation de la courbe de tendance de l' α -tocophérol : $y = 0,180x - 0,327$ avec $R^2 = 0,995$, la capacité de piéger le radical libre DPPH de ces 03 fractions varie en équivalent α -tocophérol de 331,50mM /mg /l d'extrait à 550,16mM /mg /l d'extrait. La fraction n-butanol avec 99,25% d'inhibition correspondant à 550,16 équivalent α -tocophérol mM /mg /l d'extrait présente la meilleure activité antioxydante par rapport aux deux autres fractions.

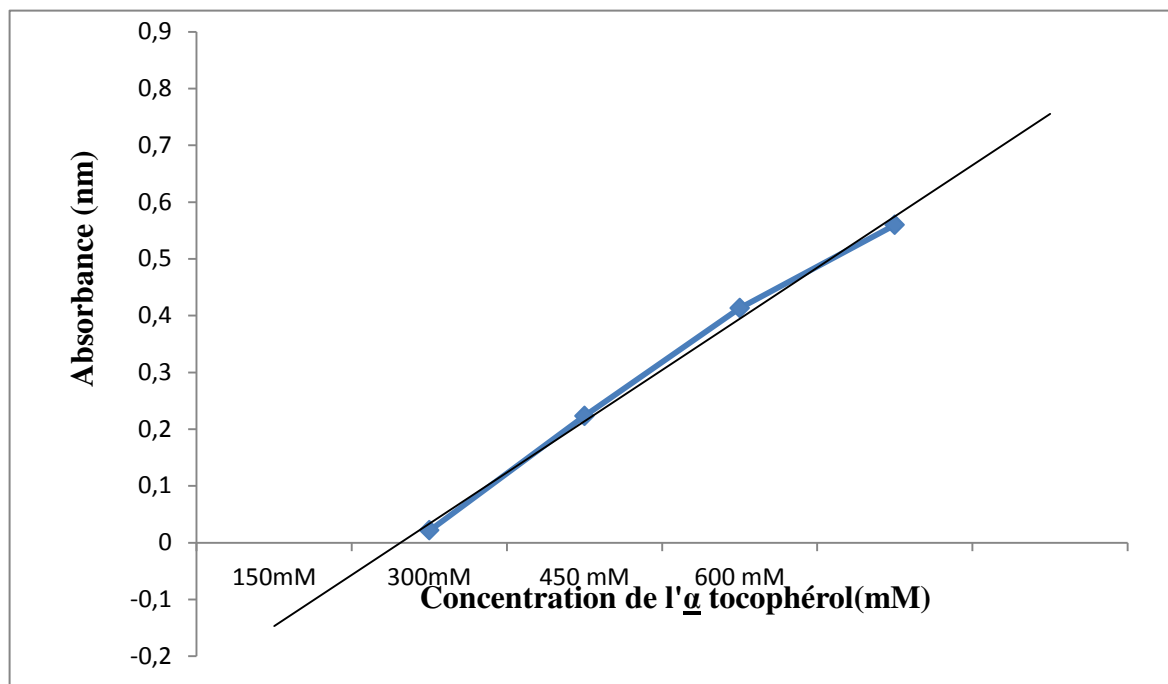
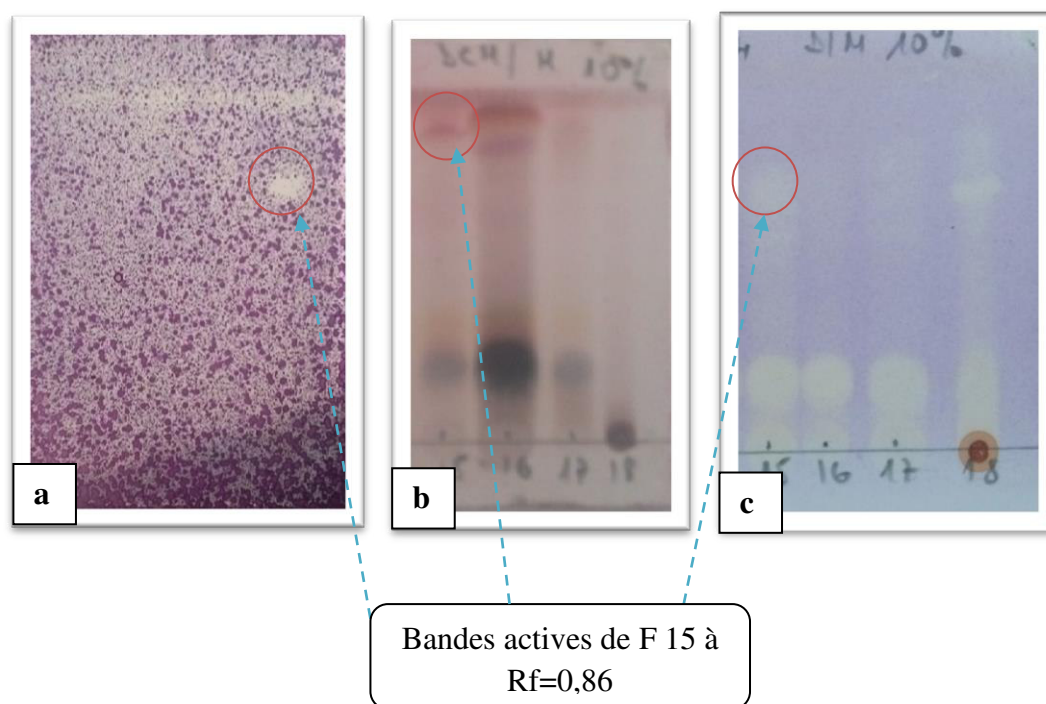


Figure15: Courbe standard de l' α - tocophérol

Nous n'avons pas pu quantifier le pouvoir antioxydant des sous-fractions de l'acétate d'éthyle car elles étaient en quantité insuffisante.

III.5. Localisation de la bande active de la sous-fraction F15

La comparaison des 3 plaques montrant les profils chromatographiques des 18 sous fractions et révélées par la vanilline sulfurique (2%), le DPPH (25%) et la MTT (10%) permet de savoir la Rf de la bande responsable de l'activité antioxydante et antibactérienne. Les résultats sont montrés sur la **figure 16** ci- dessous.



- a) Plaque révélée par MTT (10%)
- b) Plaque révélée par la vanilline sulfurique
- c) Plaque révélée par DPPH (25%)

Figure 16: Chromatogrammes comparatifs de la Rf de sous-fraction F15

D'après ces figures, la bande active responsable de l'activité antibactérienne (a) appartenant à la sous-fraction F15 par comparaison avec la plaque pulvérisée par la vanilline sulfurique (b) à une $R_f = 0,86$. La plaque pulvérisée par le DPPH (c) montre qu'au niveau de cette même R_f , la bande correspondante est aussi douée d'une activité antioxydante.

Nous pouvons en déduire que la bande à $R_f = 0,86$ procure à la racine ses activités antibactériennes et antioxydantes.

CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSIONS

CONCLUSION GENERALE et DISCUSSIONS

Les études chimique et biologique de la racine de *M. aethiopicum* que nous avons réalisées nous apportent beaucoup de renseignements complémentaires sur les études antérieures de la plante déjà décrites dans la littérature.

Selon **Boiteau (1986)** et **Debray (1971)**, la plante a un pouvoir antioxydant, antidiarrhéique et très utilisée traditionnellement pour traiter les maladies infectieuses.

D'après les résultats du criblage phytochimique, la racine de la plante comporte des flavonoïdes, des tanins, des polyphénols, des stéroïdes et des triterpènes. Les propriétés thérapeutiques que possède la plante peuvent être dues à la présence de ces familles chimiques. En effet, les études de **Djemai (2009)** et **King et al. , 1999** ont montré l'utilisation des flavonoïdes et des tanins comme anti-inflammatoires, antioxydant, anticancéreux et cicatrisant, les flavonoïdes connus pour leurs propriétés antibactériennes (**Bruneton, 1993**) et les tanins, réputés pour leur propriétés astringentes et antidiarrhéiques (**Paris, 1965**).

D'autres recherches ont confirmé que certains terpènes possèdent une activité antimicrobienne et jouent un rôle important dans la défense contre les microorganismes (**Bruneton, 1987**).

D'après ces données traditionnelles et chimiques, l'extraction bioguidée des principes actifs par utilisation des solvants à polarité croissante permet d'obtenir 03 extraits (extrait hexanique, extrait de dichlorométhane, extrait méthanolique). Parmi eux, l'extrait méthanolique présente des résultats remarquables vis-à-vis des souches microbiennes responsables des maladies diarrhéiques (*S.aureus*; *L.monocytogenes*; *P.mirabilis* et *Y.enterocolitica*). **Ces résultats justifient l'utilisation empirique de la plante en tant qu'anti diarrhéique.**

Le fractionnement de l'extrait méthanolique permet d'obtenir 03 fractions (fraction acétate d'éthyle, fraction n-butanol et fraction aqueuse).

Les résultats du test antibactérien et les profils chromatographiques de ces 03 fractions suggèrent la nécessité d'une étude plus poussée de la fraction Acétate d'éthyle. La purification bioguidée de cette fraction nous a permis d'isoler 2 sous-fractions actives F15 et F18 responsables de l'activité antibactérienne. La recherche de la CMI et de la CMB de ces 2 sous-fractions révèle l'action bactéricide de F15 sur *L.monocytogenes* et *P.mirabilis* et l'effet bactériostatique de F18 contre *L.monocytogenes*, *P.mirabilis* et *S.aureus*. **F 15 et F18 sont, les deux sous-fractions de *M. aethiopicum*, douées de propriétés antibactériennes.**

La recherche de l'activité antioxydante des 03 fractions (fraction acétate d'éthyle, fraction n-butanol et fraction aqueuse) montre leur potentialité à piéger le radical libre DPPH.

D'après la littérature, cette activité pourrait toujours être attribuée à la présence des composés phénoliques (**Al-Mamary et al., 2001**), de tanins, des flavonoïdes dans l'extrait de la racine. Il existe plusieurs mécanismes d'action de ces composés selon leur structure et le mode d'arrangement des groupements hydroxyles. Les flavonoïdes agiraient en piégeant ces radicaux libres (**Sokol-Letowska et al., 2007**) tandis que les tanins agiraient comme donneurs de protons et accepteurs de radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'auto oxydation (**Peret, 2001**). Dans le cas des composés phénoliques (Φ -OH), le principal mécanisme d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH• qui est transformé en une molécule stable DPPHH (**Sanchez et al 1998; Molyneux, 2004**).

En conclusion, les résultats obtenus tout au long de cette étude, nous ont permis de :

- montrer que la racine de *M. aethiopicum* est active contre *S. aureus* et quelques entérobactéries;
- localiser les bandes actives responsables des activités biologiques de la racine de la plante;
- déterminer certaines propriétés physico-chimiques et la nature chimique des principes actifs.

PERSPECTIVES

Dans l'avenir, nous envisagerons:

- d'isoler les sous-fractions F15 et F18 (des principes actifs dont les bandes responsables de l'activité biologique de la racine de *M. aethiopicum* sont déjà localisées);
- d'améliorer les procédés d'extraction et de purification de manière à obtenir les principes actifs à l'état pur ;
- de poursuivre davantage l'étude de leurs propriétés physico-chimiques, de déterminer leur composition chimique et d'établir sa structure chimique ;
- d'étudier leur mécanisme d'action ;
- d'étudier la toxicité des deux sous-fractions actives de la fraction acétate d'éthyle ;
- d'approfondir les propriétés biologiques déjà mises en évidence tout en prospectant d'autres effets qui permettront de mieux utiliser cette plante.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Awika J. M. , Rooney L. W. , Wu X. , Prior R. L. , Cisneros-Zevallos L.** (2003). Screening method to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *J. Agric. Food Chem.*, **51(23)**, 6657-6662.
2. **Al-Mamary M. , Al-Habori M. , Al Aghbari A. , Al-Obeidi A.** (2001). In vitro effects of dietary sorghum tannins on rabbit digestive enzymes and mineral absorption. *Nutrition Research*, **21**, 1393-1401.
3. **Andriamasinoro S. N.** (2009). Caractérisation chimique et biologique des principes antibactériens de l'écorce de tige de *Dilobeia thouarsii* (PROTEACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 52p.
4. **Boiteau P.** (1986). Médecine traditionnelle et pharmacopée : Précis de matière médicale malgache. Madagascar : Agence de coopération culturelle et technique, 141p
5. **Boiteau P.** (1979). Précis de matières médicales malgaches. Antananarivo : La librairie de Madagascar, 97p.
6. **Boiteau P., Allorge-Boiteau L.** (1993). Plante médicinale de Madagascar. Madagascar: Agence de coopération culturelle et technique, 135 p.
7. **Bruneton J.** (1993). Elément de phytochimie et de pharmacognosie. Paris: Technique et documentation Lavoisier, 210p.
8. **Bruneton J.** (1993). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinale. Paris: Technique et documentation Lavoisier, 893p.
9. **Beentje H. J.** (1994). Kenya trees, shrubs and lianas. National Museums of Kenya, Nairobi, Kenya. 722 pp.
10. **Burkill H. M.** (1985). The useful plants of West Tropical Africa. 2nd Edition. Volume 1, Families A–D. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, United Kingdom. 960 pp.
11. **Bonnet H. , Nevrota** (1955). Travaux pratiques de bactériologie, 4è éd. Paris : Masson et Cie éditeurs, 210p.
12. **Botz L. , Nagy S. , Kocsis B.** (2001). Detection of microbiologically active compounds In SzNyiredy ed., ProcIntSymp Planar Chromatography, Plana Chromatography Lillafured, Hungary, 489-516.
13. **Blot W. , Taylor P. R. , Li JY, Li B. , Dawsey S. , Wang G. Q. , Ershow A. G. , Guo W. , Liu S. F., Yang C. S. , Shen Q.** (1993) «Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease – specific mortality in the general population.», *J. Natl. Cancer Inst.*, **85(18)**:1492-8.

14. **Coates Palgrave M.** (2002). Keith Coates Palgrave Trees of southern Africa, edn 3. Struik, Cape Town, South Africa, 1221p.
15. **Cuendet M. , Hostettmann K. and Potterat O.** (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, 80, 1144-1152.
16. **Coates Palgrave K.** (1983). Trees of southern Africa. 2nd Edition. Struik Publishers, Cape Town, South Africa. 959 pp.
17. **Debray M. , Jacquemin H. et Razafindrabao R.** (1971). Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar. Antananarivo: ORNSTOM, 145p.
18. **Decary R.** (1946). Plantes et animaux utiles de Madagascar. *Annales du Musée Colonial de Marseille*, 54e année, 6e série, 4e volume, 1er et dernier fascicule. 234 pp., 52p.
19. **Djemai, Z. S.** (2009). Etude de l'activité biologique des extraits de fruit de *Zizyphus lotus* L [Mémoire de Magister] Université -El Hadj Lakhder –Batna, Algérie, 91p.
20. **Duval J. et Soussy C. J.** (1990). Antibiothérapie, 4èéd. Paris : Masson, 188p.
21. **Fawole O. A. , Finnie J. F. , Van S. J.** (2009). Antimicrobial activity and mutagenic effects of twelve traditional medicinal plants used to treat ailments related to the gastrointestinal tract in South Africa. *South Africa Journal of Botany*, **75**, 356-362.
22. **Grace O. M. , Prendergast H. D. V. , Jäger A. K. and vanStaden J.** (2002). Bark medicines in traditional healthcare in KwaZulu-Natal, South Africa: an inventory. *South African Journal of Botany* 69 (3): 301–363.
23. **Gurib-Fakim A. and Brendler T.** (2004). Medicinal and aromatic plants of Indian Ocean Islands: Madagascar, Comoros, Seychelles and Mascarenes. Medpharm, Stuttgart, Germany. 568 pp.
24. **Grigoras C. G. , Destandau E. , Zubrzycki S. , Elfakir C.** (2012). Sweet cherries anthocyanines: An environmental friendly extraction and purification method, *Separation and Purification Technology*, vol 100, p51-58.
25. **Holetz F. B. , Pessini G. L. , Sanches N. R. , Cortez D. A. G. , Nakamura C. V. , Filho B. P. D** (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97**, 1027-1031.
26. **Hema R. , Kumaravel S. and Elanchezhian N.** (2009). *GlobeIJ. Pharmacol.*, 3(1):38-40. Available online at www.pelagiaresearchlibrary.com consulté 18 novembre 2014.
27. **Joëlle Nicolas** (2012). Pédiatrie et santé humanitaire. DU Santé humanitaire CHU Montpellier. 32p.
28. **Jules Assob1 C. N. , Henri Kamga L. F. , Dickson Nsagha S. , Anna Njunda L. , Peter Nde F. , Emmanuel Asongalem 1 A. , Abdel Njouendou J. , Bertrand Sandjon and**

- Veronique Penlap B.** (2011). Antimicrobial and toxicological activities of five medicinal plant species from Cameroon Traditional Medicine in *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11:70.
29. **King A. and Young G.** (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J. Am. Diet. Assoc.* 99, 213 – 218.
 30. **Kokwaro J. O.** (1993). Medicinal plants of East Africa. 2nd Edition. Kenya Literature Bureau, Nairobi, Kenya. 401 pp.
 31. **Kuete V. , Nana F. , Ngameni B. , Mbaveng A. T. , Keumedjio F. , Ngadjui B. T.** (2009). Antimicrobial activity of the crude extract, fractions and compounds from stem bark of *Ficus Ovata* Moraceae). *Journal ethnopharmacologie*, **124** (3) : 556-6.
 32. **Kuete V. , Fozing D. C., Kapche W. F. G. D. , Mbaveng A. T. , Kuiate J. R. , Ngadjui B. T. , Abega Z. B. M.** (2009). Antimicrobial activity of the methanolic extract and Compounds from *morusmes ozygiastem* bark. *Journal ethnopharmacologie*, **124** (3): 551-5.
 33. **Kil H. , Seong S. E. , Ghimire K. B. , Chung M. I. , Kwon S. , Goh J. E. , Heo K. , Kim D.** (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Foodchemistry* **115**, 1234-1239.
 34. **Larpent J-P.** (1997). Microbiologie alimentaire, Technique de laboratoire, 1041p.
 35. **Larpent J-P., Larpent-Gourgaud M..** (1997). Mémento Technique de Microbiologie (3 éd.).Lavoisier: Londres, New York, Paris; 1039 p.
 36. **Latham P.** (2007). Plants visited by bees and other useful plants of Umalila, southern Tanzania .Third edition. P. Latham, DFID, United Kingdom. 216 pp.
 37. **Lambin P. , Rochu D. and Fine J. M.** (1976). A new method for determination of molecular weights of proteins by electrophoresis across a sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gradient gel. *Anal Biochem.*, Vol.74, No. 2, (Aug 1976), pp. 567–575.
 38. **Maundu P. , Berger D. , Saitabau C. , Nasieku J. , Kipelian M. , Mathenge S. , Morimoto Y. and Höft R.** (2001). Ethnobotany of the Loita Maasai. Towards community management of the forest of the Lost Child. Experiences from the Loita Ethnobotany Project. UNESCO People and Plants Working Paper 8, Paris, France. 34 pp.
 39. **Malaisse F** (1997). Se nourrir en forêt claire africaine. Approche écologique et nutritionnelle. *Les presses agronomiques de Gembloux*, Gembloux, Belgium & CTA, Wageningen, Netherlands. 384 pp.
 40. **Mahuzier G. , Hamon M.** (1990). Méthode de séparation, 2eme éd. Paris: Masson, 269p. (Abregé de chimie analytique, T2)

41. **Marmonier A.** (1990). Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques in Bactériologie Médicale, technique usuelles, 3^{ème} édition, Doin, Paris, 227-236p.
42. **Moroh J.-L. A. , Bahi C. , Dje K. , Loukou Y. G. , Guede-Guina F.** (2008). Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) sur la croissance *in-vitro* des souches d'*Escherichia coli*. **Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège**, Vol. 77, pp. 44 – 61.
43. **Molyneux P.** (2004). The use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxydant activity. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, 26(2), 211 – 219.
44. **Ndukui J. G. , Mugisha K. , Owiny D. , Kateregga J. , Patrick V. , Kasolo J. , Waako P.** (2013). Toxicity Profile of Aqueous Leaf Extracts of *Citropsis articulata* and *Mystroxyylon aethiopicum* in Male Albino Rats. **World Journal of Pharmaceutical research**, volume 3, issue 1, p. 1273-1290.
45. **Neuwinger H. D.** (2000). African traditional medicine: a dictionary of plant use and applications. **MedpharmScientific**, Stuttgart, Germany. 589 pp.
46. **Oyi A. R.** (2001). “A Study of antimicrobial and phytochemical properties of the latex of *Jatropha curcas* Linn (Euphorbiaceae)”. Zaria, Nigeria: Ph D diss. Bello University.
47. **Paris R. et Moyse H.** (1965). Précis de matière médicale. Tome 1, édition MASSON et Cie, 450p.
48. **Perrier de la Bâthie, Joseph Marie Henry Alfred** (1942). Notulae Systematicae. Herbarium du Museum de Paris 10(4): 192p.
49. **Peret. C.** (2001). Analyse des tanins inhibiteurs de stilbène oxydase produite par *Btrytiscinerea*. [Thèse de Doctorat]. Université de Neuchatel, Suisse, 173p.
50. **Pernet R. et Meyer G.** (1957). Pharmacopée de Madagascar. Publication de l'Institut de recherche Scientifique de Madagascar, 86p.
51. **Raboanatahiry N. H.** (2008). Etude des activités antimicrobiennes des métabolites secondaires issus des champignons endophytes de *Pothosscandens* (ARACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 57p.
52. **Randerath K.** (1964). Chromatographie sur couche mince. Paris: édition Gautier-Villars, 296p.
53. **Randriamanantena C. H.** (2012). Étude de l'activité anti-âge de l'extrait VPR- F₁ chez la souris, cochons d'inde et lapins. [Mémoire de DEA : PHARMACOLOGIE]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 41p.
54. **Rabesa Z. A.** (1986). Pharmacopée d'Alaotra. CIDST, Imprimerie Tatsinanana, Antananarivo, 288p.

55. **Razafintsalama V. E.** (2006). Etudes chimique et toxicologique des extraits toxiques de feuille de *Pittosporum senacia* (PITTOSPORACEAE) [Mémoire de DEA : Biochimie], Faculté des sciences; Université d'Antananarivo, 68p.
56. **Reddy K. R. N. , Nurdijati S. B. and Salleh B.** (2010). An Overview of Plant-Derived Products on Control of Mycotoxigenic Fungi and Mycotoxins. *Asian Journal of Plant Sciences*, **9**: 126-133.
57. **Richard C. and Kiredjian M.** (1995). Laboratory Methods for the Identification of Strictly Aerobic Gram-negative Bacilli. Paris, France: Institut Pasteur, 1 vol, 332 p.
58. **Sanchez-Moreno C. , Jose Larrauri A. and. Saura-Calixto F.** (1998). A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *J. Sci. Food Agr.*, **76**(2), 270 – 276.
59. **Schmidt E. , Lötter M. and. Mc Cleland W.** (2002). Trees and shrubs of Mpumalanga and Kruger National Park. Jacana Media, Johannesburg, 702p.
60. **Sokol-Letowska A. , Oszmianski J. , Wojdylo A.** (2007). Antioxydant activity of the phenolic compounds of hawthorn pine and skullcap. *Food chemistry*, **103**, 853-859. Hdoi:10.1016/j.foodchem.2006.09.036.
61. **Simon C. and Lamla M.** (1991). Merging pharmacopoeia: understanding the historical origins of incorporative pharmacopoeial processes among the Xhosa healers in southern Africa. *J. Ethnopharmacol.* **23**, 237–242.
62. **Teixera A.F.** (2007). “ Metabólitos secundários de frutos da *Virola molissima* (Poepp. ex A. DC.) Warb.: neolignanas e atividade antifúngica, 85-86, São Paulo.
63. **Van Wyk B. and Van Wyk P.** (1997). Field guide to trees of southern Africa. Cape Town Struik Publishers, 536p.
64. **Watt J.M. , Breyer-Brandwijk M.G.** (1962). The medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa. E. & S. Livingstone Ltd., Edinburg and London, Second edition, 1457 p., (partially from the references VM 18, HV 09, HC 26, HL 22, HS 32)
65. **Watson L. and Dallwitz M.J.** (1992) onwards. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Version: 19th August 2014.
66. **Yoo M. K. , Lee H. C. , Lee H., Moon B.K. , Lee Y. C.** (2008). Relative antioxydant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*, **106**, 929-936.

ANNEXES

ANNEXE 1

Composition du réactif de la vanilline sulfurique

Vanilline..... 0, 5g

Acide sulfurique (H₂SO₄)..... 100ml

Préparation de la vanilline sulfurique (Révélateur polyvalent).

Préparer une solution composée de 1g de vanilline, 2ml d'acide sulfurique et de l'éthanol à 95% q.s.p. 100ml. Après pulvérisation, chauffer la plaque de CCM à 110°C pendant 5 minutes environ. Plusieurs colorations apparaissent en fonction du type de composés.

ANNEXE 2

Composition des réactifs généraux pour les alcaloïdes:

Réactif de MAYER :

Chlorure de mercure..... 1,36g

Iodure de potassium..... 5g

Eau distillée.....qsp 100ml

Réactif de WAGNER :

Iodure de potassium..... 2g

Iode.....1,27g

Eau distillée.....qsp100ml

Réactif de DRAGENDORFF :

Il s'agit d'un mélange (v/v) de deux solutions, A et B :

Solution A :

Nitrate de bismuth.....1,7g

Acide tartrique concentré..... 20g

Eau distillée.....qsp 100ml

Solution B:

Iodure de potassium.....10g

Eau distillée.....qsp 40ml

Le mélange est ensuite additionné de 10g d'acide tartrique et son volume est ramené à 100ml par de l'eau distillée.

ANNEXE 3

A) Compositions chimiques des différents milieux de cultures

EAU PEPTONEE

Peptone bactériologique.....10g
Chlorure de sodium..... 5g
Eau distillée.....qsp 1000ml
pH= 7,6

MUELLER-HINTON :

Formule-type (g/l)

Extrait de viande.....2,0
Peptone trypsique de caséine.....17,5
Amidon.....1,5
Agar.....15,0
pH 7,3 □□0,1 à 25°C

MÜELLER HINTON BROTH (milieu liquide)

Formule-type (g/l)

Boeuf, perfusion déshydraté de 300g.....2
Hydrolysate de caséine.....17,5
Amidon.....1,5
pH= 7,4 à 25°C

B) Préparation des milieux à partir de la poudre déshydratée

• **Préparation du milieu de MUELLER-HINTON :**

- Dissoudre 36g de milieu déshydraté dans de l'eau distillée en agitant continuellement puis ajuster à 1 litre.
- Chauffer le milieu jusqu'à dissolution totale sur une plaque chauffante toujours en remuant avec un agitateur magnétique.
- Autoclaver à 121°C pendant 15minutes.

• **Préparation du milieu NUTRIENT BROTH**

- Dissoudre 13g de milieu déshydraté dans de l'eau distillée en agitant continuellement puis ajuster à 1 litre.
- Chauffer le milieu jusqu'à dissolution totale sur une plaque chauffante toujours en remuant avec un agitateur magnétique.

Annexes

- Autoclaver à 121°C à 2 bars pendant 15 minutes.

ANNEXE 4

Composition des colorants GRAM :

Formule théorique pour un litre :

VIOLET DE GENTIANE :

| | |
|----------------------|-------|
| Cristal violet | 1g |
| Alcool à 95° | 10ml |
| Acide phénique..... | 2g |
| Eau distillée | 100ml |

LUGOL

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

FUSCHINE DE ZIEHL

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

ANNEXE 5

Préparation de la solution du DPPH

Dissoudre 25mg de DPPH en poudre dans 100ml de méthanol. Bien conserver dans un réfrigérateur et mettre à l'abri de la lumière (utilisation d'un papier aluminium) jusqu'à son utilisation.

ANNEXE 6

Préparation de la solution du MTT

Dissoudre 10mg de MTT en poudre dans 100ml d'eau distillée. Bien conserver la solution mère dans un réfrigérateur de -20°C jusqu'à son utilisation.

Abstract

Name: RAMAROTANY

First name: Falimanitra Mihantaso Tsanta

Title of memory: Biological and chemical studies of *Mystroxydon aethiopicum*'s roots (CELASTRACEAE)

ABSTRACT

Antibacterial and antioxidant activities were highlighted in the root extracts of *Mystroxydon aethiopicum*, a non-endemic CELASTRACEAE of Madagascar.

The phytochemical screening of the crude extract shows that the root contains flavonoids, leucoanthocyanes, tannins, steroids, triterpenes, sterols and unsaturated deoxyoses.

Successively macerated root powder and the liquid-liquid partition of methanolic extract by increasing polarity solvents provides 03 respectively extracts (hexane, dichloromethane, methanol) and 03 fractions (ethyl acetate, n butanol, aqueous). Open column chromatography of the ethyl acetate fraction leads to the production of 18 sub-fractions (F1 to F18).

Two active sub-fractions F15 and F18 of the ethyl acetate fraction were located through direct Bioautography method. Evaluation of antibacterial activities of 03 extracts, 03 fractions and 18 sub-fractions revealed the inhibiting effect of the methanol extract, 03 fractions and sub-fractions F15 and F18 on the growth of Gram-positive bacteria (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) and two Gram - bacteria (*Yersinia enterocolitica* *Proteus mirabilis*) for the diameters of the inhibition halo variant of 7 ± 0.5 mm to 11mm.

The determination of the MIC and MBC of F15 and F18 shows the bactericidal activity of subfraction F15 on *P.mirabilis* and *L.monocytogenes* with MIC and MBC equal to 250 g / ml and effect bacteriostatic sub-fraction F18 against these same bacteria with MIC values ranging from 250µg / ml (*S. aureus*) to 500µg / ml (*L.monocytogenes* and *P.mirabilis*) and CMB greater than 500µg / ml.

In vitro testing using the method Bioautography showed that 3 fractions (ethyl acetate, n-butanol and aqueous) and F15 and F18 subfractions exhibit antioxidant activity. By the method of DPPH in a concentration of 0.5mg / ml, the fractions of ethyl acetate, n-butanol and aqueous inhibit free radical DPPH of 59.78% to 99.25%. The fraction n-butanol with 99.25% inhibition corresponds to the α -tocopherol equivalent equal to 550.16 mM / mg / l of extract has the highest antioxidant capacity than the two other previews.

Keywords: Celastraceae, *Mystroxydon aethiopicum*, antibacterial, antioxydant.

Résumé

Nom : RAMAROTANY

Prénoms : Falimanitra Mihantaso Tsanta

Titre du mémoire : Etudes biologique et chimique des principes actifs de la racine de *Mystroxydon aethiopicum* Loès (CELASTRACEAE)

RESUME

Des activités antibactérienne et antioxydante ont été mises en évidence dans les extraits de racine de *Mystroxydon aethiopicum*, une CELASTRACEAE non endémique de Madagascar.

Le criblage phytochimique de l'extrait brut montre que la racine contient des flavonoïdes, des leucoanthocyanes, des tanins, des stéroïdes, des triterpènes, des stérols insaturés et des désoxyoses.

La macération successive de la poudre de racine ainsi que le partage liquide-liquide de l'extrait méthanolique par des solvants à polarité croissante permet d'obtenir respectivement 03 extraits (hexanique, dichlorométhanique, méthanolique) et 03 fractions (acétate d'éthyle, n-butanol, aqueuse). La chromatographie sur colonne ouverte de la fraction acétate d'éthyle conduit à l'obtention de 18 sous-fractions (F1 à F18).

Deux sous-fractions actives F15 et F18 de la fraction acétate d'éthyle ont été localisées grâce à la méthode Bioautography directe. L'évaluation des activités antibactériennes des 03 extraits, des 03 fractions ainsi que des 18 sous-fractions révèle l'effet inhibiteur de l'extrait méthanolique, des 03 fractions et des sous-fractions F15 et F18 sur la croissance des Bactéries gram positives (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) et deux bactéries Gram - (*Yersinia enterocolitica*, *Proteus mirabilis*) à des diamètres de l'halo d'inhibition variant de 7±0,5mm à 11mm.

La détermination de la CMI et de la CMB de F15 et de F18 montre l'activité bactéricide de la sous-fraction F15 sur *P.mirabilis* et sur *L.monocytogenes* avec une CMI et une CMB égale à 250µg/ml et l'effet bactériostatique de la sous-fraction F18 contre ces même germes avec des valeurs de la CMI variant de 250µg/ml (*S.aureus*) à 500µg/ml (*L.monocytogenes* et *P.mirabilis*) et de la CMB supérieure à 500µg/ml.

In vitro, les tests utilisant la méthode Bioautography ont montré que les 3 fractions (acétate d'éthyle, n-butanol et aqueux) et les sous-fractions F15 et F18 présentent une activité antioxydante. Par la méthode de DPPH, à une concentration de 0,5mg/ml, les fractions acétate d'éthyle, n-butanol et aqueuse inhibent le radical libre DPPH de 59,78% à 99,25%. La fraction n-butanol avec 99,25% d'inhibition correspondant à l'équivalent α -tocophérol égal à 550,16mM /mg /l d'extrait présente la capacité antioxydante la plus élevée par rapport aux deux autres extraits.

Mots clés: Celastracées, *Mystroxydon aethiopicum*, antibactérien, antioxydant