

Liste des Sigles et Abréviations

CH ₃ COOH	: Acide acétique
HCl	: Acide chlorhydrique
HCN	: Acide cyanhydrique
H ₂ SO ₄	: Acide sulfurique
NH ₄ OH	: Ammoniaque
(CH ₃ CO) ₂ CO	: Anhydride acétique
C ₆ H ₆	: Benzène
BB	: Broad Band Decoupling
¹³ C	: Carbone 13
Na ₂ CO ₃	: Carbonate de sodium
CHCl ₃	: Chloroforme
CDCl ₃	: Chloroforme deutérié
FeCl ₃	: Chlorure ferrique (III)
NaCl	: Chlorure de sodium
HgCl ₂	: Chlorure mercurique
CCM	: Chromatographie sur couche mince
al.	: Collaborateur
J	: Constante de couplage
°	: Degré
°C	: Degré Celsius
δ	: Déplacement chimique
DMSO	: Dimethylsulfoxyde
DMD ₆ SO ₂	: Dimethylsulfoxyde deutérié
DPPH	: 2,2-diphénylpicrylhydrazyle

DRX	: Diffraction par Rayon X
H ₂ O	: Eau
D ₂ O	: Eau deutériée
EtOH	: Ethanol
EtOH- H ₂ O	: Ethanol- eau
FID	: Free Induction Decay
g	: Gramme
Hz	: Hertz
h	: Heure
C ₆ H ₁₄	: Hexane
KOH	: Hydroxyde de potassium
I ₂	: Iode
KI	: Iodure de potassium
l	: Litre
λ	: Longueur d'onde
m	: Masse
Mg	: Magnésium
ml	: Millilitre
mg	: Milligramme
min	: Minute
'	: Minute
MeOH	: Méthanol
CD ₃ OD	: Méthanol deutérié
N°	: Numéro
%	: Pourcentage
¹ H	: Proton
ppm	: Parties par million

r	: Rendement
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
RMN 1D	: Résonance Magnétique Nucléaire à une dimension
RMN ^1H	: RMN de proton
RMN ^{13}C	: RMN de carbone 13
s	: Seconde
Na_2SO_4	: Sulfate de sodium
TMS	: Tétraméthylsilane
v	: Volume
V/V	: Volume à volume
UV	: Ultra-violet
A	: Ampère
V	: Volt
W	: Watt
CS 1657	: Code du produit A pour l'expérience X-Ray

Liste des figures

- Figure 1 : *Monanthotaxis pilosa* Baillon
- Figure 2 : Flavonoïdes isolés du *Popowia cauliflora*
- Figure 3 : Les diverses classes de flavonoïdes
- Figure 4 : 2,2-diphénylpicrylhydrazyle (DPPH radical)
- Figure 5 : Test antioxydant sur les extraits : E₁, E₂, E₃, E₄ et E₅ de *Monantotaxis pilosa* Baillon
- Figure 6 : CCM des fractions 211 à 247
- Figure 7 : CCM des produits purs isolés à partir de l'extrait au dichlorométhane E₃
- Figure 8 : Test antioxydant sur les produits purs isolés à partir de l'extrait au dichlorométhane E₃
- Figure 9 : Spectre RMN ¹H du produit A
- Figure 10 : Spectre RMN ¹H agrandi du produit A (zone 6,4 – 8,2ppm)
- Figure 11 : Spectre RMN ¹³C du produit A
- Figure 12 : Spectre DEPT 135° du produit A
- Figure 13 : Squelette de base d'une flavone
- Figure 14 : Spectre RMN ¹H théorique du produit A
- Figure 15 : Spectre RMN ¹³C théorique du produit A
- Figure 16 : Structure du produit A
- Figure 17 : 5,6-dihydroxy-7-méthoxy-2-phényl chromèn-4-one

Figure 17 : Structure du produit A avec les atomes numérotés selon l'expérience

DRX

Figure 18 : 5,6-dihydroxy-7-méthoxy-2-phényl chromèn-4-one

Figure 19 : Structure en 3D de Negletein

Liste des tableaux

- Tableau I : Travaux chimiques antérieurs sur le genre *Popowia*
- Tableau II : Travaux biologiques antérieurs sur *Popowia*
- Tableau IV : Réactifs des alcaloïdes pour la solution chlorhydrique
- Tableau VI : Les tests pour les flavonoïdes et leucoanthocyanes
- Tableau VII : Tests des stéroïdes et des triterpénoïdes
- Tableau VIII : Les tests utilisés pour le Criblage des tanins et des polyphénols
- Tableau IX : Barème d'appréciation semi-qualitative de criblage phytochimique
- Tableau X : Résultats du criblage des alcaloïdes
- Tableau XI : Résultats du criblage des anthraquinones
- Tableau XII : Résultats du criblage des flavonoïdes et leucoanthocyanes
- Tableau XIII : Résultats du criblage des stéroïdes et des triterpénoïdes
- Tableau XIV : Résultats du criblage des saponines
- Tableau XV : Résultats du criblage des tanins et des polyphénols
- Tableau XVI : Résultats du criblage polysaccharides et des sucres réducteurs
- Tableau XVII : Récapitulation des résultats du criblage phytochimique des feuilles
de *Monanthotaxis pilosa* Baillon
- Tableau XVIII : Résultats de l'extraction
- Tableau XIX : Résultats du test antibactérien
- Tableau XX : Résultats du test antioxydant sur les extraits des feuilles de
Monanthotaxis pilosa Baillon
- Tableau XXI : Résultats du fractionnement de l'extrait au dichlorométhane E₃
- Tableau XXII : Caractéristiques des produits purs isolés à partir de l'extrait au

dichlorométhane E₃

Tableau XXIII : Exploitation du spectre RMN ¹H du produit A

Tableau XXIV : Données spectrales en RMN ¹³C du produit A

Tableau XXV : Comparaison des déplacements chimiques du produit A et

celui du spectre théorique

Tableau XXVI : Crystal data and structure refinement for cs1657.

Tableau XXVII : Bond lengths [Å] and angles [°] for cs1657.

Tableau XXVIII : Hydrogen bonds for cs1657 [Å and °].

Rapport GRATUIT .com

Liste des schémas

- Schéma 1 : Biosynthèse des flavonoïdes illustrant les voies de l'acétyle CoA et de la phénylalanine
- Schéma 2 : Méthode générale d'extraction par partage avec des solvants organiques
- Schéma 3 : Protocole d'extraction des feuilles de *Monanthotaxis pilosa* Ballion
- Schéma 4 : Action du DPPH sur le phénol
- Schéma 4 : Action du DPPH sur le Negletein

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

PREMIÈRE PARTIE : GÉNÉRALITÉS

I- Généralités.....	2
I-1 Botaniques de la famille des Annonaceae.....	2
I-2 Botaniques du genre <i>Monanthotaxis</i>	2
I-3 Espèce <i>Monanthotaxis pilosa</i> Baillon.....	3
I-3-1 Classification systématique de <i>Monanthotaxis pilosa</i> Baillon.....	3
I-3-2 Description botanique.....	3
I-3-3 Distribution géographique.....	6
I-3-4 Ethnobotanique et utilisations.....	6
II- Travaux antérieurs sur le genre <i>Popowia</i>	6
II-1 Travaux chimiques entrepris.....	6
II-2 Travaux biologiques antérieurs.....	9
III- Généralités sur les flavonoïdes.....	10
III-1 Classification.....	10
III-2 Biosynthèses des flavonoïdes.....	12
III-3 Activités biologiques des flavonoïdes.....	14
IV- Généralités sur les tests biologiques.....	15
IV-1 Généralités sur les antioxydants.....	15

IV-2	Généralités sur les tests antibactériens.....	17
IV-2-1	Structure des bactéries.....	18
IV-2-2	Milieu de culture.....	18
IV-2-3	Paramètres de croissance.....	19
V-	Détermination structurale.....	20
V-1	Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	20
V-2	Analyse X-Ray.....	21

DEUXIÈME PARTIE : MATÉRIELS ET MÉTHODES

I-	Matériels.....	22
I-1	Matériel végétal.....	22
I-2	Matériels techniques.....	22
II-	Méthodes.....	25
II-1	Ciblage phytochimique.....	25
II-1-1	Préparation de solution hydroalcoolique.....	25
II-1-2	Ciblage proprement dit.....	25
II-1-2-1	Ciblage des alcaloïdes.....	25
II-1-2-2	Ciblage des anthraquinones (test de Börnstrager)....	26
II-1-2-3	Ciblage des flavonoïdes et leucoanthocyanes.....	26
II-1-2-4	Ciblage des stéroïdes et des triterpénoïdes.....	27
II-1-2-5	Ciblage des saponines.....	27
II-1-2-6	Ciblage des tanins et des polyphénols.....	28
II-1-2-7	Ciblage des polysaccharides et des sucres réducteurs.....	28
II-2	Méthodes d'extraction.....	29
II-2-1	Extraction par partage avec un solvant organique.....	29

II-2-2	Extraction par partage (BLIGH et DYER modifiée).....	31
II-3	Tests biologiques.....	33
II-3-1	Test antioxydant.....	33
II-3-2	Test antibactérien.....	35
II-3-2-1	L'antibiogramme.....	35
II-3-2-2	Principe.....	35
II-3-2-3	Les instruments de stérilisation.....	35
II-3-2-4	Technique.....	36
II-3-2-5	Germes testés.....	36
II-4	Méthodes de fractionnement et isolement.....	37
II-4-1	Principe général de la méthode chromatographique.....	37
II-4-2	Chromatographie sur couche mince (CCM).....	37
II-4-3	Chromatographie liquide sur colonne.....	38

TROISIÈME PARTIE : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

I-	Criblage phytochimique.....	40
I-1	Criblage des alcaloïdes.....	40
I-2	Criblage des anthraquinones.....	41
I-3	Criblage des flavonoïdes et leucoanthocyanes.....	41
I-4	Criblage des stéroïdes et des trerpénoïdes.....	41
I-5	Criblage des saponines.....	42
I-6	Criblage des tanins et des polyphénols.....	42
I-7	Criblage des polysaccharides et des sucres réducteurs.....	42
II-	Résultats de l'extraction.....	44
III-	Résultats des tests biologiques.....	44
III-1	Test antimicrobien.....	44
III-2	Test antioxydant des fractions E ₁ , E ₂ , E ₃ , E ₄ et E ₅	45

IV-	Résultats du fractionnement de l'extrait au dichlorométhane E ₃	47
V-	Résultats et discussions des spectres du produit A.....	52
V-1	Exploitation des spectres RMN ¹ H du produit A.....	52
V-2	Exploitation de spectre RMN ¹³ C du produit A.....	55
V-3	Exploitation de spectre DEPT 135°du produit A.....	56
CONCLUSION.....		71
RÉFÉRENCES.....		73
ANNEXES		

Introduction

Madagascar regorge de ressources naturelles à valeur inestimable en flore et en faune. La flore de Madagascar englobe 490 genres autochtones d'arbres et de grands buissons dont 161 sont endémiques de Madagascar et des îles géologiquement récentes de l'archipel des Comores. Les genres endémiques sont représentés par 940 espèces et les autres non endémiques par 3280 espèces sur lesquelles 95% sont endémiques. Ainsi sur les 4220 espèces d'arbres et des grands arbustes malgaches, 96% sont endémiques, soit un niveau extraordinairement élevé d'endémisme spécifique. [1]

Vu la richesse en diversité et en endémicité de la flore malgache, Madagascar compte des plantes à vertus thérapeutiques.

L'utilisation des plantes en thérapie (phytothérapie) est très ancienne et connaît actuellement un regain d'intérêt auprès du public. [2]

Monanthotaxis pilosa Baillon fait partie des arbres endémiques de Madagascar et ses feuilles sont utilisés comme phytomédicament par les tradipraticiens.

Il s'avère aussi tout à fait logique d'effectuer des études chimiques et biologiques pour identifier les principes actifs de cette plante.

Les études chimiques et biologiques de cette plante ont été réalisées au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et Chimie Organique Biologique (LCSN/COB) de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo, dirigé par le Professeur Emérite Amélie RAHARISOLOLALAO.

Dans le cadre de l'initiation à la recherche, l'extraction, l'identification des constituants de la plante, l'isolement d'un composé, l'activité biologique et la détermination structurale d'une molécule feront l'objet de notre travail.

Le présent mémoire comporte trois parties :

- ❖ La première partie est consacrée aux généralités sur la botanique de *Monanthotaxis pilosa* Baillon, les flavonoïdes, les tests biologiques et la méthode de détermination de structure d'un produit pur ;
- ❖ La deuxième partie présente les matériels et méthodes ;
- ❖ La troisième partie expose les résultats de nos travaux personnels ;

Outre l'introduction et la conclusion l'ouvrage comprend des références et quelques annexes.

PREMIÈRE PARTIE :
GÉNÉRALITÉS

I- Généralités

I-1 Botanique de la famille des Annonaceae

La famille des Annonaceae, également appelée famille de corossol appartient à l'ordre des Magnoliales à la sous-classe des Magnoliideae, de la classe des Dicotyledones. Sur la base de la morphologie et de l'habitat, c'est une famille très homogène présentant un grand nombre de caractéristiques primitives et archaïques et conduisant à considérer ce groupe comme des fossiles vivants au sens Darwinien. [3,4]

La famille des Annonaceae est composée d'environ 2300 à 2500 espèces et plus de 130 genres. C'est la famille la plus nombreuse dans l'ordre des Magnoliales. Elle est subdivisée en deux sous-familles Monodorideae et Annonorideae où appartient le genre *Monanthotaxis*. La sous-famille des Annonorideae la plus importante est composée d'environ 2000 espèces. Elle est caractérisée par des carpelles libres et arrangés en spirale. [5]

Les Annonaceae sont des plantes ne comprenant que des arbres, arbustes ou rarement lianes des régions pantropicales où elles se développent le plus souvent à basse altitude. La famille est concentrée dans les régions tropicales et peu d'espèces sont trouvées dans les régions tempérées. [4]

Environ 900 espèces sont Néotropicales, 450 sont Afrotropicales, et les autres espèces Indomalayannes. [6]

Certaines sont cultivées pour la nutrition (fruits) et d'autres utilisées dans les pharmacopées traditionnelles.

I-2 Botanique du genre *Monanthotaxis*

Le genre *Monanthotaxis* ou *Popowia* qui a fait l'objet de notre étude, contient environ 55 espèces des régions tropicales de l'Ancien Continent. 18 espèces toutes endémiques sont rencontrées à Madagascar : *Popowia malacophylla*, *Popowia pilosa*, *Popowia sororia*, *Popowia ambrensis*, *Popowia coursii*, *Popowia heterantha*, *Popowia podocarpa*, *Popowia madagascariensis*, *Popowia capuronii*, *Popowia humbertii*, *Popowia branchytricha*, *Popowia maritima*, *Popowia boivini*, *Popowia valida*, *Popowia iamicratha*, *Popowia glaucocarpa*, *Popowia gerrardii*, *Popowia caesia*, *Popowia greveana*. [7]

I-3 Espèce *Monanthotaxis pilosa* Baillon

I-3-1 Classification systématique de *Monanthotaxis pilosa* Baillon

[8]

Règne	: Plantae
Division	: Magnoliophyta
Classe	: Magnoliopsida
Sous-classe	: Dilleniidae
Ordre	: Magnoliales
Famille	: Annonaceae
Sous-famille	: Annonorideae
Genre	: <i>Monanthotaxis</i> ou <i>Popowia</i>
Espèce	: <i>Monanthotaxis pilosa</i> Baillon

Noms vernaculaires : Fotsiavadika, Fanote, Tanoty.

I-3-2 Description botanique [7]

Liane à feuilles persistantes, rameaux grisâtres, glabres, jeunes rameaux grêles, à poils ferrugineux hirsutes. Feuilles à pétiole très court, de 1-2 mm de long, à pubescence ferrugineuse, limbe ovale-allongé, papyracé, légèrement acuminé au sommet, arrondi-subcordé à la base, à poils plus ou moins denses à la face inférieure, épars à la face supérieure, de 4,5-8cm de long, 1,5-2 cm de large; nervure médiane légèrement marquée et déprimée à la face supérieure, saillante à la face inférieure, pubescente; nervures latérales en relief dessous, 10-12 paires. Fleurs axillaires ou supra-axillaires, solitaires ou géminées, jaune pâle; pédicelles grêles, à poils roux hirsutes, de 8-10mm de long; calice brièvement cupuliforme, à 3 lobes sub-arondis de 1,5 mm de long et de large; à pubescence épars; pétales externes, valvaires, ovales-aigus, à pubescence très courte et dense, 3,5 mm de long, 2,5 mm de large charnus ; pétales internes, subspatulés , à même pubescence que les externes, de 3,5 mm de long environ et 1 mm de large, charnus, valvaires, alternant avec les pétales du verticille externe; étamines, rarement, en un seul verticille, enserrant étroitement les carpelles, inégalement pyriformes, le connectif oblique au

dessus des loges ; carpelles; ovaire oblong, ovules, superposés à maturité. Fruit à méricarpes subsessiles; ovoïde, apiculé, densément pubescent, à poils ferrugineux hirsutes, mono ou bisperme, les deux segments ovoïdes séparés par un étranglement, de 8mm de long, 3,5-5 mm de large ; pédoncule à pubescence hirsute ferrugineuse, de 8-10 mm de long.



Figure 1 : *Monanthotaxis pilosa* Baillon [9]

I-3-3 Distribution géographique

On rencontre l'espèce *Monanthotaxis pilosa* Baillon dans la forêt pluviale de Nord-Ouest de Madagascar, à Joffre ville où débute le Parc national de la forêt d'Ambre et qui se termine à Ambilobe. Joffre ville est située à la Montagne d'Ambre à environ 800 m du niveau de la mer, à 20 km au Sud de Diego-Suarez. On y vient à partir d'Antananarivo par avion vers Diego-Suarez, puis en voiture tout terrain sur 30 km environ.

I-3-4 Ethnobotanique et utilisations

En médecine traditionnelle et d'après les enquêtes ethnobotaniques menées auprès de différents tradipraticiens de la Région Nord de Madagascar, cette plante est utilisée pour guérir plus d'une maladie.

La décoction des tiges feuillées est utilisée pour la fièvre avec symptômes grippaux et signes neurologiques, puis pour la maladie liée au problème du foie "Ambo".

II- Travaux antérieurs sur le genre *Popowia*

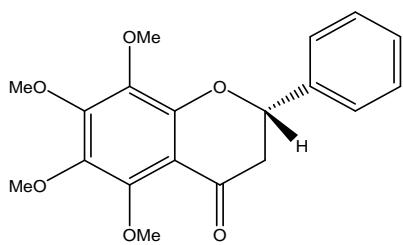
II-1 Travaux chimiques entrepris

Les produits isolés sur le genre *Popowia* sont représentés dans le tableau I et la figure 2.

Tableau I : Travaux chimiques antérieurs sur le genre *Popowia*

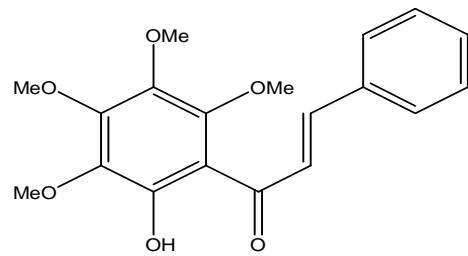
Familles chimiques	Produits isolés	Espèces
Flavonoïdes	Kanakugin (1); kanakugiol (2); baicalein trimethyl ether (3); 5-hydroxy-6,7-diméthoxyflavone (4); 5,7,8-triméthoxyflavanone (5); 2'-hydroxy-3',4',6'-triméthoxychalcone (6); 2',3',4',6'-tetraméthoxychalcone (7); 2',4-dihydroxy-3',4',6'-triméthoxychalcone (8).	<i>Popowia caulinflora</i> [10]
Alcaloïdes	O-méthyldauricine; popisidine.	<i>Popowia odoardi</i> [11]
	Bipowine ; Bipowinone ; (+)-hydroxy-4 wilsonirine ; (-)-asimilobine ; (-)-nornuciférine ; (-)-wilsonirine ; (+)-thaliporphine ; (+)-norcorydine ; (+)-corydine ; (-)-norushinsunine ; liriodénine ; pancoridine ; argentinine ; isopycnarrhine ; coclaurine ; armépavine ; N-méthylpseudolaudanine ; stépharanine.	<i>Popowia pisocarpa</i> [12, 13]
Terpenoïdes	(E)-4-phenylbut-3-en-2-ol ; (E)-4-phenylbut-3-en-2-yl acetate ;	<i>Popowia capea</i> [14]

(1) ;... ;(8) formule des produits isolés



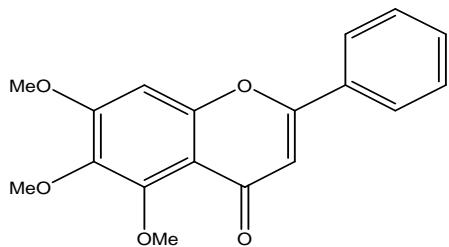
(1)

Kanakugin



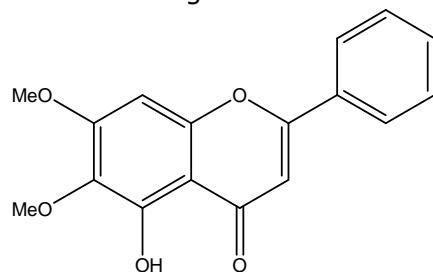
(2)

Kanakugiol



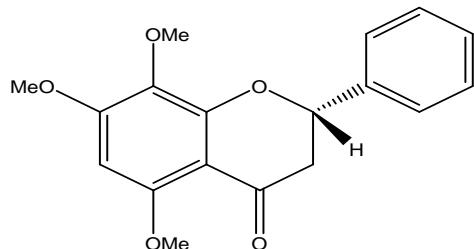
(3)

baicalein trimethyl ether



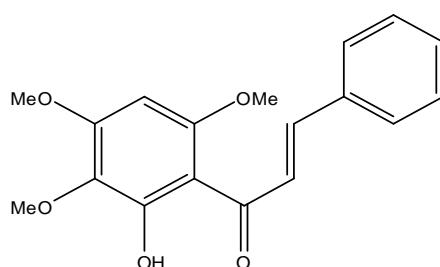
(4)

(5-hydroxy-6,7 dimethoxyflavanone)



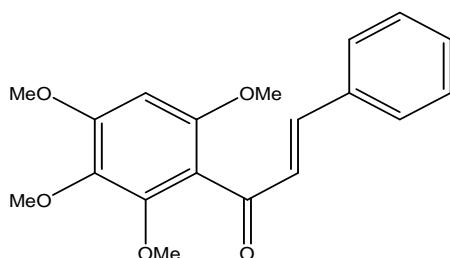
(5)

(5,7,8-trimethoxyflavanone)



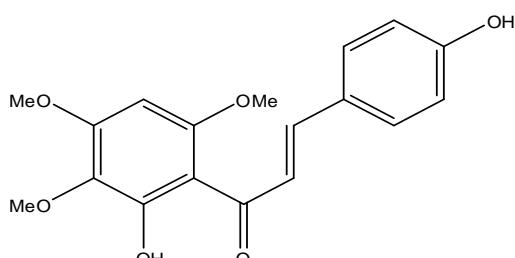
(6)

2'-hydroxy-3',4',6'-trimethoxychalcone



(7)

2',3',4',6'-tetramethoxychalcone



(8)

2',4-dihydroxy-3',4',6'-trimethoxychalcone

Figure 2 : Flavonoïdes isolés de *Popowia cauliflora*.

II-2. Travaux biologiques antérieurs

Les travaux biologiques réalisés sur le genre *Popowia* sont résumés dans le tableau II

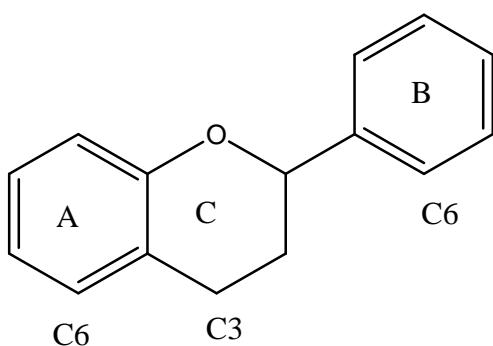
Tableau II : Travaux biologiques antérieurs sur *Popowia odoardi*

Espèces	Parties utilisées	Activités
<i>Popowia odoardi</i> [11]	Ecories	Effets contre l'anxiété, l'anti-dépression (agonistes ou antagonistes)

III - Généralités sur les flavonoïdes

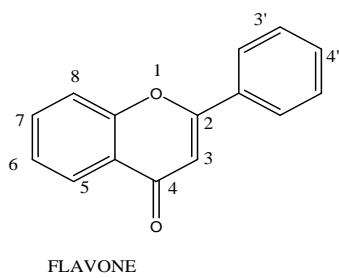
Le terme "flavonoïde" est générique pour des composés basés sur un squelette à 15 carbones qui, à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles A et B connectés par un pont à trois carbones communément désigné par C6-C3-C6. Le pont à 3C peut être cyclique ou acyclique.

Beaucoup d'entre eux constituent les pigments responsables de la coloration de nombreuses fleurs et de certains fruits. À l'état naturel, ils peuvent être sous forme libres ou liés avec des sucres (glucosides ou hétérosides). [15]

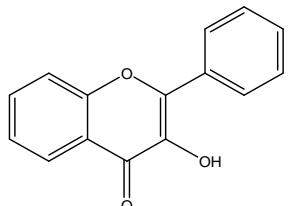


III-1 Classification

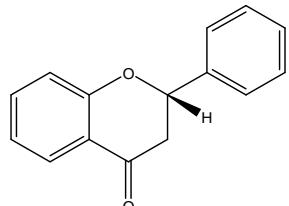
Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent entre elles par la cyclisation et le degré d'insaturation et l'oxydation du cycle C tandis que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent par la substitution des cycles A et B. Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes présentées sur la figure 3, nous citons les principales : anthocyanes, flavanols, flavones, flavanones, isoflavones et proanthocyanidols [16].



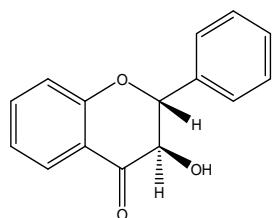
FLAVONE



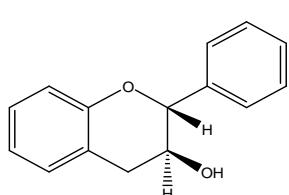
FLAVONOL



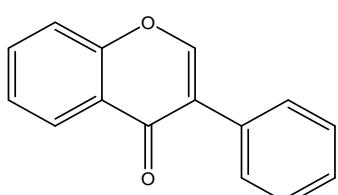
FLAVANONE



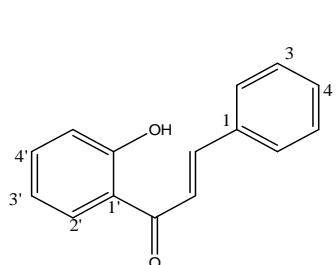
DIHYDROFLAVONOL



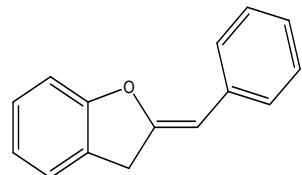
FLAVAN-3-OL



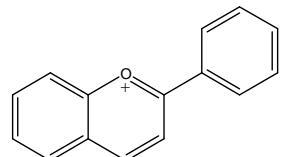
ISOFLAVONE



CHALCONE



AURONE



ANTHOCYANE

Figure 3. Les diverses classes de flavonoïdes [15].

III-2 Biosynthèse des flavonoïdes.

Les flavonoïdes possèdent tous, le même élément structural de base car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune. Le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA) issues du métabolisme du glucose. Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose mais par la voie du shikimate via la phénylalanine qui est convertie en *p*-coumarate puis en *p*-coumaroyl-CoA (schéma 1). Le *p*-coumaroyl-CoA et les 3 malonyls-CoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthétase). Le cycle C se forme par cyclisation de la chalcone, réaction catalysée par la chalconeisomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à une seule flavanone : la naringénine. Ce cycle s'hydrate ensuite pour former les différentes classes de flavonoïdes [17].

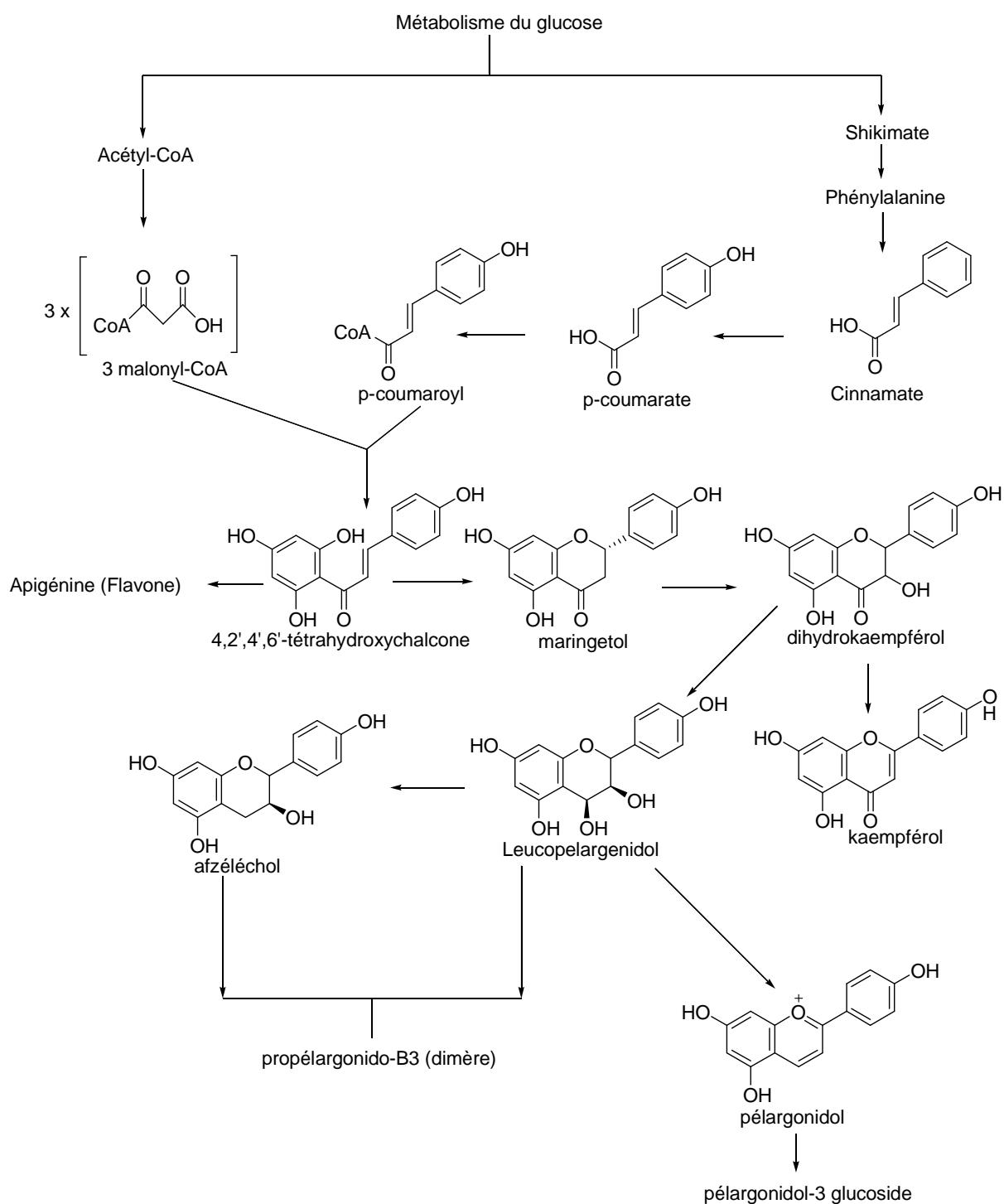


Schéma 1. Biosynthèse des flavonoïdes illustrant les voies de l'acétyl CoA et de la phénylalanine [15, 17].

III-3 Activités biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des antioxydants puissants capables de piéger des radicaux (hydroxy, anion superoxyde) et des radicaux peroxy lipidiques.

Certaines classes possèdent des potentialités oestrogéniques (isoflavones).

Les flavonoïdes sont utilisés pour toute une gamme d'activités pharmacologiques : pour préserver l'intégrité vasculaire, pour leurs propriétés immunomodulatrices, anti-hépatotoxiques, anti-ostéoporotiques, pour leurs actions antimicrobiennes et contre les allergies [18]

Les flavonoïdes sont aussi connus pour leur action sur le tractus gastro-intestinal en tant qu'agents antiulcériens, antispasmodiques, anti-sécrétaires et antidiarrhéiques [19].

En médecine traditionnelle, et partout dans le monde, les tradipraticiens utilisent des plantes médicinales à flavonoïdes pour soigner plusieurs maladies comme la diarrhée, la crise d'asthme, la bronchite chronique [20, 21], les cataplasmes sur les plaies [22, 23, 24].

IV- Généralités sur les tests biologiques

IV-1 Généralités sur les antioxydants

La découverte des antioxydants date du 19^{ème} siècle. Dans le milieu des années 50, R. Gerschman puis D. Hartman ont évoqué la toxicité de l'oxygène et la « free radical theory » pour expliquer le processus du vieillissement [25].

En 1969, les Américains Mc Cord et Fridovich ont isolé à partir de globules rouges humains, un système enzymatique antioxydant, la superoxyde dismutase (SOD) qui démontre pour la première fois que notre organisme produit des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dont il doit se protéger. Cette découverte fut le point de départ d'une intense recherche scientifique dans le monde entier sur le stress oxydant et les antioxydants [26].

Le chimiste Linus Pauling, prix Nobel de Chimie en 1954 et prix Nobel de la paix en 1962 a commencé à s'intéresser aux antioxydants en 1970. Il fut l'un des premiers à accorder à ces molécules d'importantes vertus anti-cancérigènes et anti-vieillissantes [27].

Des nombreux processus naturels qui se déroulent dans les organismes biologiques (comme la respiration) produisent des sous produits chimiques tels que : les radicaux d'oxygène libres O_2^- , le radical hydroxyle OH^- .

Notons que ces radicaux libres sont dus également à la pollution, aux rayons UV ou à de divers agents chimiques.

Une quantité excessive de ces radicaux peut endommager nos cellules et nos aliments.

Un antioxydant est, en quelque sorte, une molécule qui bloque ou inhibe les réactions altérantes en se faisant oxyder à la place des cellules de l'organisme. On peut ainsi en déduire que c'est un réducteur; son pouvoir réducteur est son pouvoir d'un antioxydant.

Du point de vue chimique, un antioxydant n'est qu'un composé réducteur qui peut réagir avec un oxydant pour le neutraliser. Les antioxydants vont ainsi réduire les radicaux libres.

Ces antioxydants sont utilisés pour

- La prévention contre le vieillissement précoce
- Le traitement et la prévention de l'athérosclérose
- Le traitement de certaines maladies et la prévention de leur progression [28], telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, les colites [29], la toux, la maladie d'Alzheimer [30], la cataracte, qui sont fortement corrélés à un excès de radicaux libres
- Le renforcement des défenses immunitaires pour des personnes portant le VIH

Les substances aux propriétés antioxydantes peuvent être naturelles ou de synthèse.

- Antioxydants naturels

Les caroténoïdes tels le lycopène, les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, etc...sont des antioxydants naturels présents dans les colorants des végétaux, mais notre organisme en contient également comme les endogènes qui se composent d'enzymes (SOD, glutathion, peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, albumine).

Les antioxydants d'origine végétale existent aussi les dérivés de la vitamine C, les dérivés de la vitamine E, les terpénoïdes dont les caroténoïdes et les polyphénols comme les flavonols.

Les antioxydants naturels d'origine végétale peuvent être aussi rencontrés dans l'alimentation principalement dans les fruits, et les légumes, thé [31], le vin [32], protègent les molécules organiques de l'oxydation, par exemple les graisses ou l'ADN, et semblent jouer un rôle protecteur contre la cancérogenèse [33], et les plantes à usage médicinal et cosmétique.

- Antioxydants synthétiques

Les antioxydants de synthèse sont utilisés par l'industrie agro-alimentaire pour protéger les aliments contre les réactions d'oxydation causant leur pourriture. Des recherches ont montré que les antioxydants synthétiques employés par l'industrie alimentaire sont également bénéfiques pour l'organisme [34].

Les additifs alimentaires portant les codes européens E300 à E399 sont des antioxydants de synthèse ou des régulateurs d'acidité

- Les additifs E306 à E309 sont des dérivés du tocophérol ou vitamine E
- Les additifs E310 à E312 sont des dérivés de l'acide gallique
 - L'additif E319 est le THBQ ou tertiobutylhydroxyquinone
 - L'additif E320 est le BHA ou butylhydroxyanisole
 - L'additif E321 est le BHT ou butylhydroxytoluène.

IV-2 Généralités sur les tests antibactériens [35]

Les microbes ou microorganismes sont des organismes visibles à l'œil nu ou au microscopique comme le montre le tableau III.

Les bactéries ont la forme d'une sphère ou d'un bâtonnet. Plus rarement, elles peuvent ressembler à une virgule ou à un filament spiralé.

Les bactéries vraies (eubactéries) sont des organismes unicellulaires. Comme elles n'ont pas de noyau délimité par une membrane, les cellules sont dites procaryotes. La plupart des bactéries ont une paroi cellulaire de peptidoglycane ; elles se produisent de façon asexuée par scissiparité.

Tableau III : Les microorganismes et leurs caractéristiques.

Microbes	Ordre approximatif des dimensions	Nature de la cellule
Virus	0,01 - 0,25 µm	acellulaire
Bactéries	0,1 - 10 µm	procaryote unicellulaire
Fungi (mycètes)	2 µm - >1 m	eucaryote unicellulaire ou en colonie
Protozoaire	2 – 1000 µm	eucaryote unicellulaire
Algues	12 µm – plusieurs mètres	eucaryote unicellulaire ou en colonie

IV-2-1 Structure des bactéries [35]

Le cytoplasme d'une bactérie ne contient ni organite ni noyau cellulaire. Le chromosome de la bactérie, constitué d'ADN, est libre dans le cytoplasme. Ce cytoplasme est entouré, comme pour n'importe quelle cellule, d'une membrane plasmique constituée de phospholipides. Autour de cette dernière se trouve toujours une paroi peptidique, plus ou moins épaisse. C'est l'épaisseur de la paroi qui détermine la réaction à la coloration de Gram, qui permet de classer les bactéries en gram + (paroi épaisse) et gram - (paroi fine). Une troisième couche protège encore la cellule bactérienne : la capsule.

IV-2-2 Milieu de culture [36, 37]

Pour mieux faciliter l'isolement et pour la purification des germes bactériennes, les souches doivent être cultivées puis repiquées sur des milieux appropriés. On étudie les bactéries en les cultivant dans des milieux synthétiques ou définis. Ce milieu peut être liquide ou solide, en général l'agar, et droit représenter les paramètres de croissance et tous les éléments nutritifs à la croissance des bactéries qui se divisent en :

- ❖ macroéléments : en grande quantité (en g)
- ❖ microéléments : en petite quantité (en mg)
- ❖ oligoéléments : à l'état des traces (en µg)

On distingue cinq (05) types de milieux de culture de bactérie.

- Milieu de culture standard permet la croissance de la plupart des microorganismes (bouillon, gélose au soja)
- Milieu enrichi est composé de milieu de base plus des aliments spéciaux (gélose au sang pour les hétérotrophes)
- Milieu sélectif favorise la croissance de microorganismes particuliers
- Milieu différentiel (d'isolement, d'identification) permet de distinguer différents groupes de bactéries et même d'identifier des microorganismes sur base de leur caractéristiques biologiques
- Milieu de conservation est un endroit là où l'on conserve les germes à utiliser.

IV-2-3 Paramètres de croissance [36,37]

Les bactéries se multiplient par division binaire. Leur accroissement s'effectue selon une progression géométrique (2^0 , 2^1 , 2^2 , 2^n) et il dépend de plusieurs facteurs :

- Le taux d'oxygène
- Le pH
- La nature des éléments nutritifs
- La température
- L'activité de l'eau
- Le potentiel d'oxydoréduction

V- Détermination structurale

La détermination de structure est basée sur les interprétations des spectres de RMN¹H, ¹³C, monodimensionnelle et par l'analyse X-ray, pour notre cas.

V-1 Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

i. Définition

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique d'analyse chimique et structurale, non destructive, très utilisée en physique (étude de matériaux), en chimie ou en biochimie (structure de molécules) et pour l'imagerie médicale. C'est une technique spectroscopique applicable aux particules ou ensemble de particules qui ont un spin nucléaire non nul [38].

ii. Principe

Tous les noyaux atomiques possédant une charge en rotation identifiée sous le nom de spin nucléaire, sont assimilables à de petits aimants et de ce fait, peuvent présenter un moment magnétique nucléaire. Sous l'action d'un champ magnétique externe uniforme, le moment magnétique nucléaire peut prendre différentes orientations.

A ces différentes orientations correspondent différents niveaux d'énergie. Dans le cas de proton¹H et de ¹³C de spin ½, il y a 2 orientations et par conséquent deux niveaux d'énergie :

- L'une de basse énergie : le moment magnétique est parallèle et de même sens que le champ extérieur
- L'autre d'énergie plus élevée : ils sont de sens contraires.

La différence d'énergie ΔE qui existe entre ces deux états d'énergie est proportionnelle au champ extérieur. La transition du niveau d'énergie la plus basse au niveau d'énergie plus élevée peut avoir lieu par absorption d'une radiation de fréquence v telle que $\Delta E = hv$. Lorsque la transition a lieu, on dit qu'il y a résonance du noyau [38].

iii. Spectres RMN 1D (monodimensionnels) [39]

Le spectre RMN 1D donne la position et l'intensité des pics de résonance pour le spin de type A (spin nucléaire différent de zéro), ainsi que les couplages à courte distance.

- **Spectre de RMN ^1H**

Le spectre RMN ^1H présente des courbes d'intégration dont les hauteurs sont proportionnelles aux nombres de protons sur chaque site protonique.

Le déplacement chimique varie de 0 à 15ppm.

Les pics se présentent sous forme de multiplets (singulet, doublet,...) selon la loi de multiplicité ($n+1$) ; n étant le nombre de voisins immédiats.

- **Spectre de RMN ^{13}C**

Le spectre RMN ^{13}C Broad Band Decoupling (BB) donne autant de pics que de carbones dans la molécule en général, les pics sont sous forme de singulets très fins jusqu'à être confondus à des traits. Le déplacement chimique est compris entre 0 et 250ppm.

- **Spectre DEPT 135°**

Le spectre DEPT 135° est un spectre RMN ^{13}C Broad Band Decoupling montrant d'une part, des pics positifs pour les pics des groupements méthines (-CH-), méthyles (CH_3 -) et d'autre part, ceux des groupements méthylènes (-CH₂-) par des pics négatifs.

V-2 Analyse X-ray [40, 41, 42, 43, 44]

L'analyse X-ray pour des études en diffraction est une technique récente et très peu répandue et donne des observations sur l'emplacement spatial des atomes à partir des longueurs de liaisons et des angles de liaisons.

DEUXIÈME PARTIE :
MATÉRIELS ET
MÉTHODES

I- Matériaux

I-1 Matériel végétal

L'échantillon botanique de *Monanthotaxis pilosa* Baillon qui a fait l'objet de notre étude, a été récolté le mois de Décembre 2009 à Joffre Ville, puis identifié au Parc National Botanique et Zoologique de Tsimbazaza (PNBZT) à Antananarivo.

Les échantillons ont été cueillis avec leurs rameaux, les feuilles sont ensuite arrachées manuellement et les tiges coupées avec un sécateur. Les feuilles et les tiges sont mises dans des sacs différents avec leurs caractéristiques respectives, les coordonnées géographiques, leur masse et la date de récolte.

Les feuilles bien propres, sans moisissure ont été séchées à l'air libre, à l'abri de la lumière et broyées.

I-2 Matériels techniques

- Pour la pesée

Nous avons utilisé deux balances :

- Pour les poudres : une balance analytique AOU (portée maximale : 5 kg, précision : 40g).
- Pour les extraits : une balance de précision METTLER H80 de portée maximale de 160 g et de précision de 0,1mg

- Pour le broyage

Les feuilles sèches sont réduites en poudre à l'aide d'un Moulinex de type A980 et de capacité 180W.

- Pour l'extraction

Les extractions ont été effectuées : "macération" dans des bocaux de 5 l pendant 4 jours.

- Pour l'évaporation

Toutes les opérations d'évaporation ont été effectuées sous pression réduite avec un Rotavapor de marque BÜCHI de type KRvr 65/45 (de capacité 220 V, 0,33 A et 50 Hz) associé à un bain-marie de température variant de 30 à 110°C.

- Pour l'analyse chromatographique

- Les plaques chromatographiques prêtes à l'emploi utilisées sont constituées de gel de silice 60F₂₅₄ Merck sur support en aluminium ou en plastique : Art₅₇₇₄ Merck.
- La cuve chromatographique rectangulaire 22cm x 9 cm avec un couvercle en verre étanche sert pour le développement des plaques.
- La lampe UV servant à détecter les produits est du modèle UVGL-25 minéral light®, avec une lampe multibande $\lambda_1=254$ nm et $\lambda_2=356$ nm et de fréquence 250/60 Hz ; 230V.
- Toutes les plaques CCM ont été révélées par pulvérisation au moyen d'une solution de H₂SO₄ à 50% suivie de chauffage à 110°C (étuve) pendant 1 Omin.

- Pour la séparation et l'isolation

Nous avons utilisé des colonnes en verre de longueur 100cm et de diamètre 1,5cm.

- Pour le séchage

Une étuve de marque MEMMERT de 20 à 220°C, de 220 volts et de 2000 watts est disponible.

- La verrerie courante de laboratoire comprend :

- Eprouvettes graduées
- Ballons rodés
- Erlenmeyers à vide
- Entonnoirs
- Béchers
- Tubes à essais
- Tubes capillaires
- Cristallisoirs
- Fioles à vide
- Pipettes graduées
- Pipettes en plastique
- Ampoule à décanter

- Autres matériels utilisés sont :

- Papier filtre
- Coton hydrophile
- Charbon actif

II- Méthodes

II-1 Criblage phytochimique

On entend par criblage phytochimique la mise en évidence de la présence des familles chimiques dans un extrait de plante par utilisation des réactifs caractéristiques conduisant à des changements de coloration ou à la formation de précipité. Il consiste à faire la préparation de l'extrait et à réaliser des différents tests.

II-1-1 Préparation de solution hydroalcoolique

400g de poudre de feuilles sont extraits avec l'EtOH à 85% (EtOH-H₂O : 85/15 ; v/v) par macération dans un bocal pendant 4 jours. Le mélange est ensuite filtré sur büchner. Nous avons obtenu une solution hydroalcoolique nommée H_{A1} de volume égal à V = 500ml

II-1-2 Criblage proprement dit

II-1-2-1 Criblage des alcaloïdes

2,5g de poudre de matière végétale sèche sont macérés avec 25ml de HCl 12% pendant 15mn. Après filtration, la solution acide obtenue est répartie en volume égaux dans quatre tubes à essais ; le tube n°1 sert de témoin. Les réactifs utilisés sont consignés dans le tableau IV, ils servent à précipiter les alcaloïdes et leurs préparations sont données en annexes 1.

Tableau IV : Réactifs des alcaloïdes pour la solution chlorhydrique

N°tube	Réactifs utilisés
2	Wagner (I ₂ /KI)
3	Valser-Mayer (HgCl ₂)
4	Dragendorff (Bi(NO ₃) ₃ /KI)

Si cette macération chlorhydrique donne un résultat positif, on procède au test préliminaire. Pour notre cas, cette première expérience a été négative.

II-1-2-2 Criblage des anthraquinones (test de Börnstrager)

Une volume de la solution hydroalcoolique équivalent à 4g de poudre de matière végétale est versé dans un cristallisoir puis évaporé à siccité au bain-marie. Le résidu obtenu est dissous dans 15ml d'eau distillée. Après filtration, la solution obtenue est extraite avec du benzène. La phase organique est mélangée à 2,5ml de NH₄OH dans une ampoule à décanter afin d'extraire l'anthraquinone. L'observation de coloration rouge dans la phase inférieure montre la présence des anthraquinones.

II-1-2-3 Criblage des flavonoïdes et leucoanthocyanes

Une volume de la solution hydroalcoolique équivalent à 3g de poudre de matière végétale est versé dans un cristallisoir puis évaporé à siccité au bain-marie. Le résidu obtenu est lavé avec l'éther de pétrole pour éliminer les pigments. Le résidu dépigmenté obtenu est dissous dans l'éthanol 80%. Après filtration, le filtrat obtenu est reparti en volumes égaux dans cinq tubes à essais ; le tube n°1 sert de témoin. Les tests utilisés ainsi que les résultats attendus sont consignés dans le tableau VI.

Tableau VI : les tests pour les flavonoïdes et leucoanthocyanes

N°tube	Test de :	Résultats attendus
2	Wilstater (HCl concentré, quelques tournures de magnésium, repos 10min)	Jaune orangé : présence de flavones rose à rouge : flavonols rouge violacé : flavanones et flavonols
3	Wilstater modifié (HCl concentré, quelques tournures de magnésium. Après dissolution, ajout de 1ml d'eau et 1ml d'alcool isoamylique, repos 10min)	Phase supérieure rouge : flavones Phase supérieure pourpre : flavonols
4	Bate Smith (HCl concentré, chauffage pendant 30mn au bain-marie)	rouge violacée : présence de leucoanthocyanes (3,4-dihydroxyflavane)
5	Bate Smith (HCl concentré à froid)	rouge : anthocyanes

II-1-2-4 Criblage des stéroïdes et des triterpénoïdes

Une volume de la solution hydroalcoolique équivalent à 5g de poudre de matière végétale sèche est versé dans un cristallisoir puis évaporé à siccité au bain-marie. Le résidu obtenu est lavé avec l'éther de pétrole jusqu'à l'élimination des pigments comme la chlorophylle. Les résidus dépigmentés obtenu sont dissous dans 10ml de CHCl₃ la phase organique obtenue est ensuite déshydratée avec de Na₂SO₄ anhydre. Le filtrat est réparti en volumes égaux dans cinq tubes à essais ; le tube n°1 sert de témoin. Les tests utilisés ainsi que les résultats attendus sont consignés dans le tableau VII.

Tableau VII : tests des stéroïdes et des triterpénoïdes

N°tube	Test de :	Résultats attendus
2	Salkowski (H ₂ SO ₄ concentré)	rouge : stérols insaturés
3	Liebermann-Burchard (H ₂ SO ₄ concentré, (CH ₃ CO) ₂ O concentré)	Pourpre : triterpènes Bleu-vert ou violet : stéroïdes
4	Baljet-Kedde (quelques gouttes d'acide picrique)	orange : stéroïdes lactoniques

II-1-2-5 Criblage des saponines

Test de mousse

50mg de poudre de feuilles sèches sont versés dans 5ml d'eau distillée dans un tube à essais puis agité vigoureusement pendant 30s. Le tube est laissé reposer verticalement. Si la hauteur de mousse reste supérieure à 3cm, la matière végétale contient des saponines à condition que cette hauteur varie très peu à chaque 30mn.

II-1-2-6 Criblage des tanins et des polyphénols

Une volume de la solution hydroalcoolique équivalent à 3g de poudre de plante est versé dans un cristallisoir puis évaporé à siccité au bain-marie. Le résidu obtenu est dissous dans 15ml d'eau distillée chaude puis additionné de quatre gouttes d'une solution de NaCl 10%. Après filtration, la solution obtenue est répartie dans cinq tubes à essais ; le tube n°1 sert de témo in. Les tests utilisés ainsi que les résultats attendus sont consignés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : les tests utilisés pour le Criblage des tanins et des polyphénols

N°tube	Réactifs	Résultats attendus
2	Quatre gouttes de gélatine 1%	Apparition de précipité
3	Quatre gouttes de gélatine salée (gélatine 1% et NaCl 10%)	Apparition de précipité
4	Quatre gouttes de FeCl_3 10% dans le MeOH	Coloration bleu noir : présence de tanins hydrolysables de type pyrogallique Coloration verdâtre : présence de tanins catéchiques

II-1-2-7 Criblage des polysaccharides et des sucres réducteurs

5g de poudre de matière végétale sèche sont décoctés et la solution obtenue est filtrée. Un volume v du filtrat est additionné de trois volumes d'alcool éthylique. L'apparition de précipitation indique la présence de polysaccharides.

A 5ml de filtrat sont ajoutés 10ml mélange de liqueur de Fehling A et B (v/v), le mélange est chauffé autour de sa température d'ébullition. Après refroidissement de la solution, l'apparition d'un précipité rouge brique traduit la présence de sucres réducteurs.

II-2 Méthodes d'extraction

La méthode d'extraction consiste à obtenir la plus grande quantité possible d'une substance à extraire. Il n'existe que très peu de méthodes générales d'extraction de substances naturelles. Chaque équipe de chercheurs utilise la technique qui lui convient pour aboutir aux principes actifs. Mais le choix de solvant doit respecter les conditions suivantes :

- Le solvant doit être pur et inerte vis-à-vis du composé à extraire.
- Il doit être volatil et non toxique pour faciliter l'évaporation de la solution obtenue.
- Son action est totale.

II-2-1 Extraction par partage avec un solvant organique

La "similitude polarité" entre le solvant d'extraction et les composés existant dans une plante joue un rôle important dans l'extraction. En effet, le solvant tend à en extraire les composés ayant une polarité voisine à la sienne. Par exemple, les solvants apolaires comme l'éther de pétrole extrait les produits apolaires tels que les acides gras, les pigments ; les moyennement polaires comme le CH_2Cl_2 extrait les alcaloïdes et les solvants polaires comme le méthanol pour les produits polaires tels que les flavonoïdes, les sucres et les hétérosides. [45]

L'extraction par partage [méthode de BLIGH et DYER] se fait de façon discontinue à l'aide d'une ampoule à décanter. Elle est consignée dans le Schéma 2.

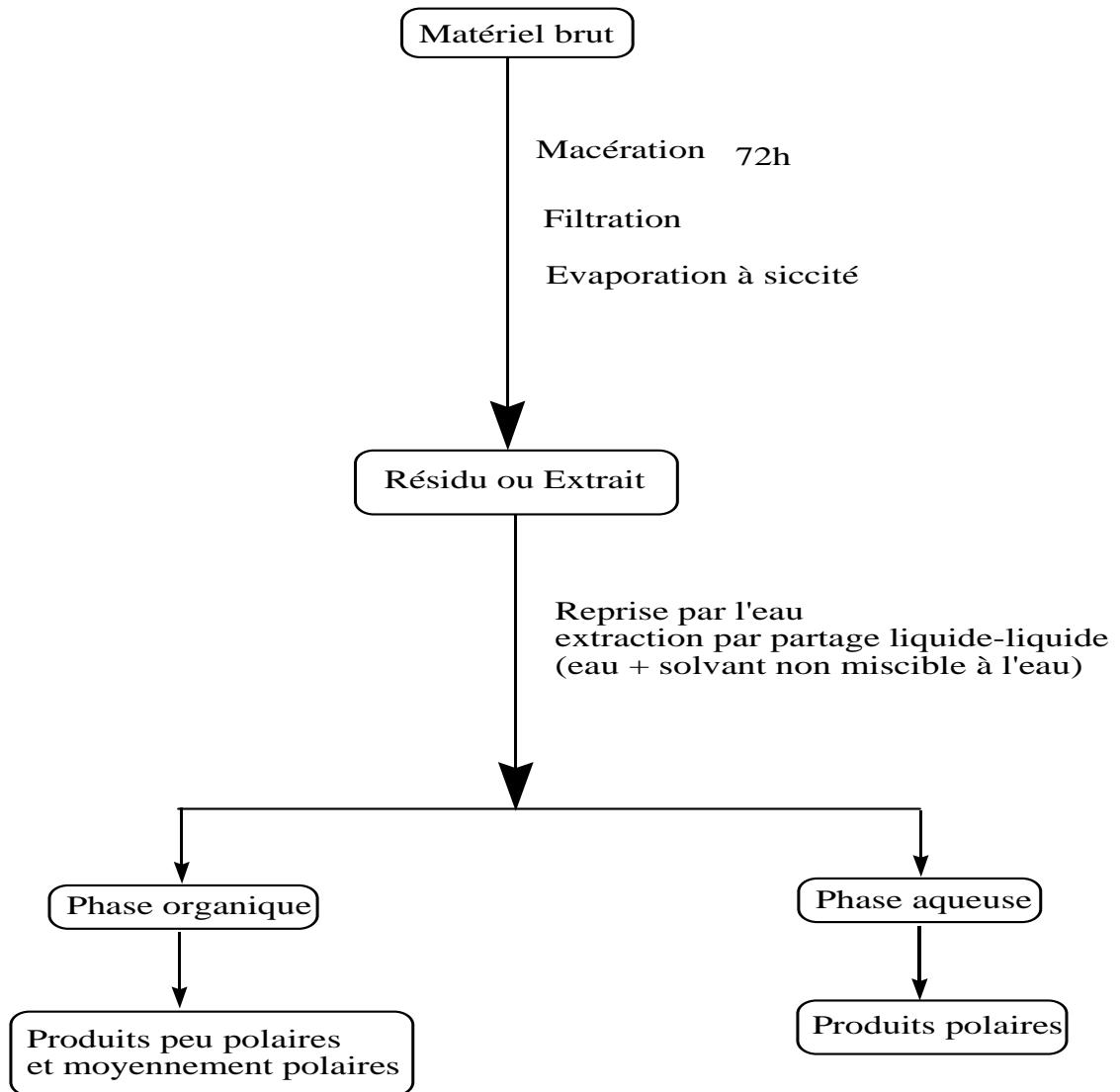


Schéma 2: Méthode générale d'extraction par partage avec des solvants organiques

II-2-2 Extraction par partage (BLIGH et DYER modifiée)

Une masse égale à $400,0 \pm 0,1$ g des feuilles de *Monanthotaxis pilosa* a été laissée macérer dans $700,0 \pm 0,1$ mL de mélange binaire EtOH/H₂O (80/20) pendant 4 jours.

La solution hydroalcoolique a été filtrée sur un entonnoir Büchner, puis évaporée sous pression réduite. Après l'avoir pesé, le rendement r est calculé à partir de la relation suivant :

$$r(\%) = \frac{\text{masse d'extract brut hydroalcoolique}}{\text{masse de poudre de plante sèche}} \times 100$$

L'extrait hydroalcoolique obtenu appelé **E₁** a été répris par de l'eau chaude, la solution aqueuse refroidie obtenue a été extraite par extraction liquide-liquide successivement à l'hexane puis au dichlorométhane, à l'acétate d'éthyle, au n-butanol. La fraction hexanique ainsi obtenue est appelée **E₂**, pour le dichlorométhane **E₃**, ensuite pour l'acétate d'éthyle **E₄** et enfin pour n-butanol **E₅** selon le protocole du schéma 3.

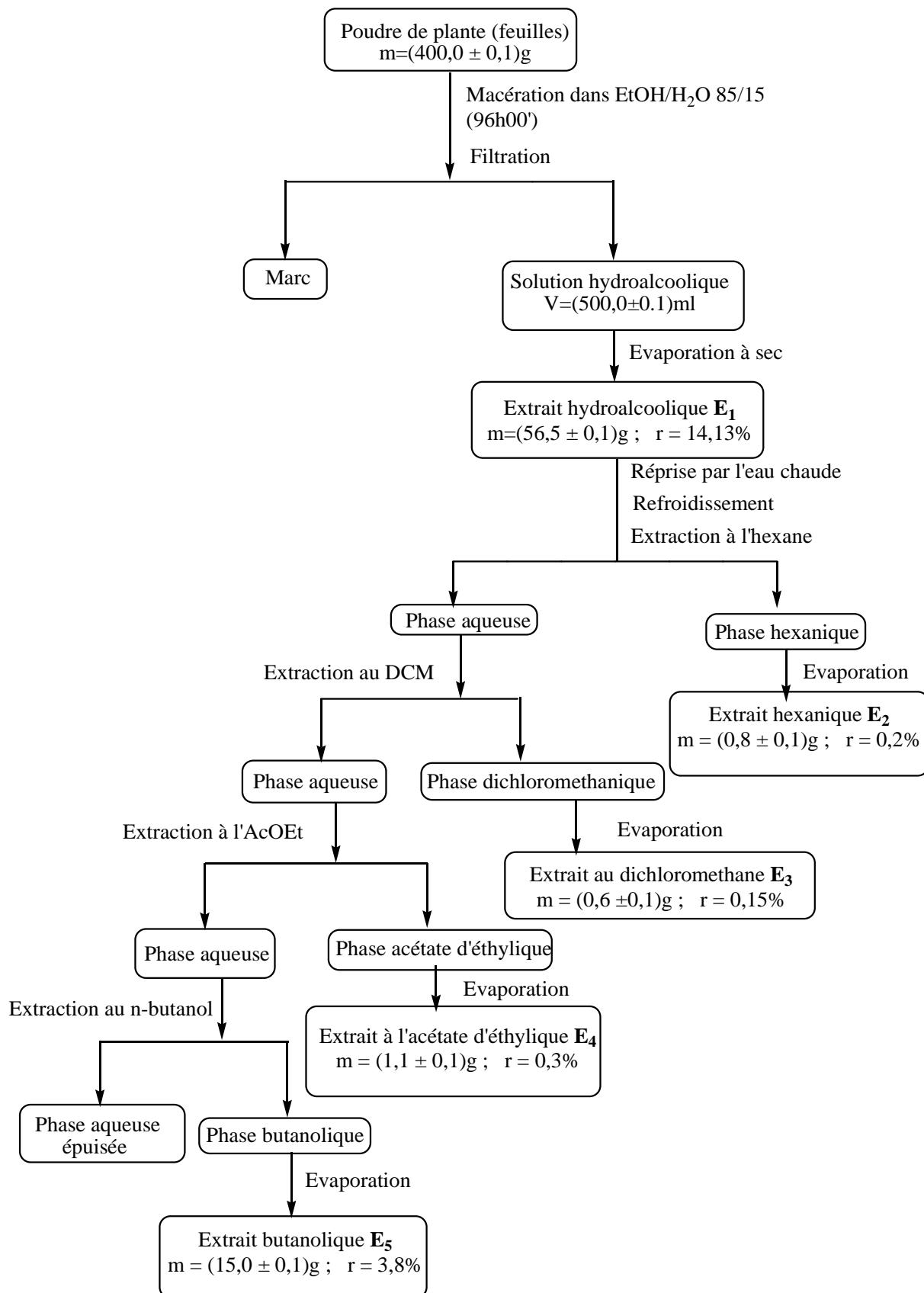


Schéma 3 : Protocole d'extraction des feuilles de *Monanthotaxis pilosa* Baillon

II-3 Tests biologiques

Un test antibactérien de l'extrait hydroalcoolique E₁ a été effectué.

Un test antioxydant a également été réalisé sur les extraits hexanique E₂, au dichlorométhane E₃, à l'acétate d'éthyle E₄ et butanolique E₅.

II-3-1 Test antioxydant

L'activité antioxydante des extraits est évaluée sur des plaques de silice développées puis révélées par le 2,2-diphénylpicrylhydrazyle ou DPPH (figure 4). Ce réactif est un radical libre stable qui, réduit par des capteurs de radicaux, passe du pourpre au jaune, révélant ainsi les composés avec une activité antioxydante.

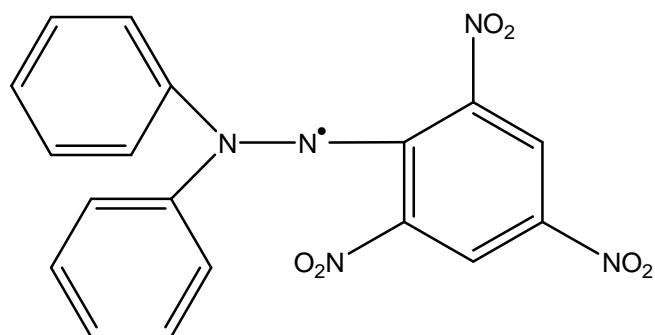


Figure 4 : 2,2-diphénylpicrylhydrazyle (DPPH radical)

100 µg d'échantillons E₁, E₂, E₃, E₄, E₅ ou 5 µg de produit pur ont été déposés sur des plaques Silica gel 60 F₂₅₄ sur feuille d'aluminium (Merck), et celles-ci ont été développées dans le système d'éluant approprié : C₆H₆/AcOEt/MeOH (60/20/20). Les plaques ont ensuite été révélées par une solution méthanolique de DDPH à 2 mg/ml.

Du point de vue de la réaction chimique, la présence de l'électron célibataire porté par l'azote sur le DDPH provoque une réaction radicalaire avec les composés phénoliques et donne des radicaux phénates selon le schéma 4. C'est la réaction qui a lieu durant le test antioxydant, et la formation du radical phénate est montrée par des taches fluorescentes observables à l'œil nu.

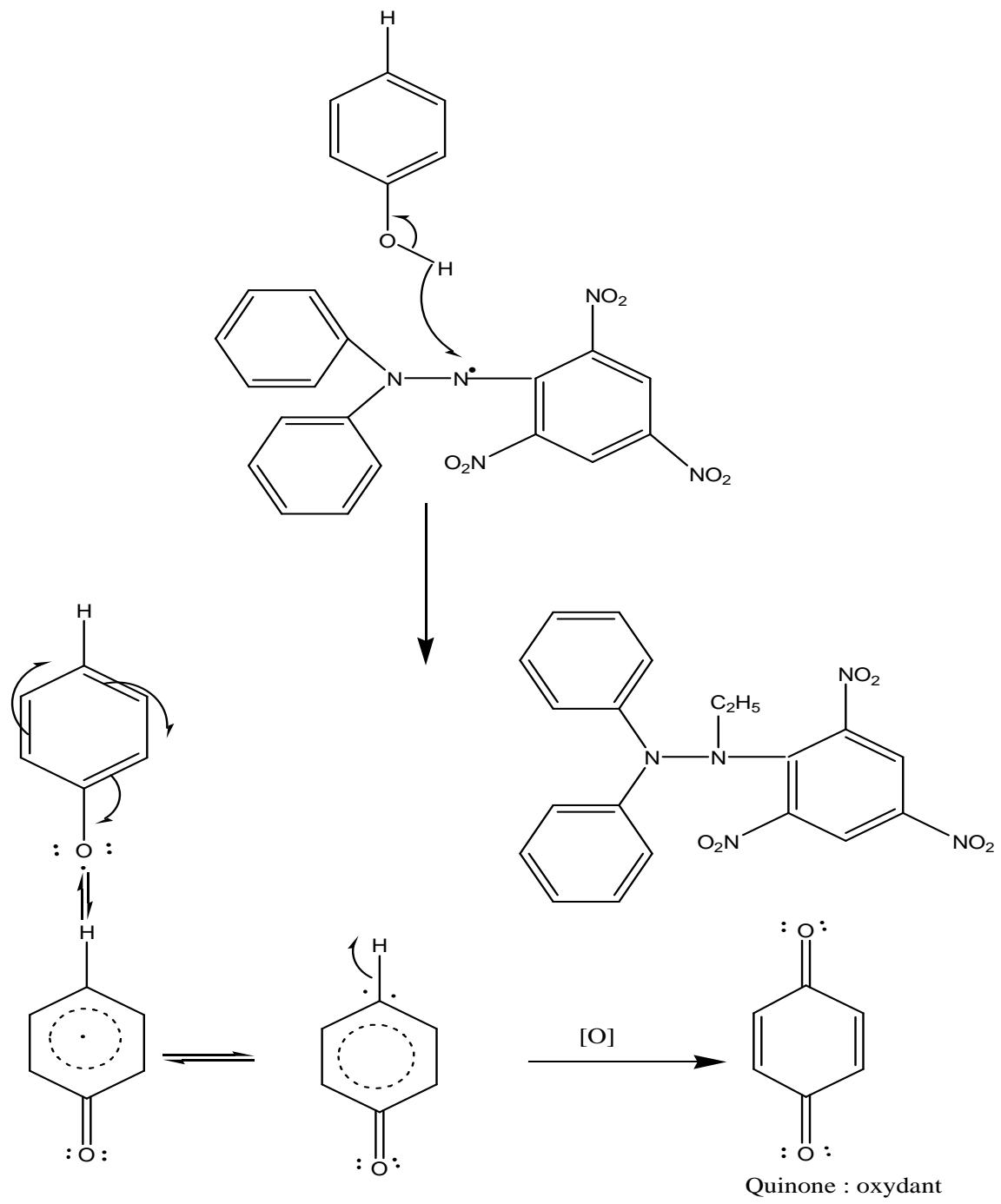


Schéma 4 : Action du DPPH sur le phénol

II-3-2 Test antibactérien [46]

La méthode utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait hydroalcoolique est la méthode d'antibiogramme par méthode de diffusion.

II-3-2-1 L'antibiogramme

L'antibiogramme est un test qui permet de vérifier la sensibilité aux antibiotiques.

II-3-2-2 Principe

Pour réaliser l'antibiogramme par la méthode des disques ou diffusion, la culture bactérienne pure est ensemencée à la surface d'une gélose spécialement étudiée, la gélose de Muëller-Hinton, éventuellement additionnée de sang.

Des disques pré-imprégnés d'une dose connue d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose.

L'antibiotique diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration.

La détermination du diamètre de la zone d'inhibition permet une estimation de la concentration minimale inhibitrice.

Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne en sont déduits.

II-3-2-3 les instruments de stérilisation

- Les milieux de culture ont été stérilisés à l'autoclave à 121 °C pendant 20 mn, alors que la verrerie est stérilisée à 180 °C durant 30 mn.
- Autoclave, boîte à reflux laminaire, bec Bunsen.

Afin d'éviter toute contamination, les manipulations microbiologiques ont été effectuées autour de la flamme d'un bec Bunsen et sous hotte à reflux laminaire, zones aseptiques de travail.

II-3-2-4 Technique

Elle consiste à déposer des disques de papier filtre imprégnés de l'extrait à tester à la surface du milieu gélosé préalablementensemencé avec une culture pure de la surface de la souche à étudier. Cette technique est surtout employée pour les bactéries à culture rapide (18 à 24).

A partir d'une souche pure, 106 bactéries par millilitre ont étéensemencées sur le milieu Muëller-Hinton.

Puis des disques de papier buvard de 6mm de diamètre pré-imprégnés par 50µl du produit testé ont été déposés à la surface du milieu gélosé.

Le tout a été incubé pendant 24 heures à 37 °C dans une étuve. Après incubation, le diamètre de la zone d'inhibition provoquée par chaque disque imprégné a été mesuré.

Les abaques de lecture se présentent sous forme de bandes présentant deux données qui délimitent les zones sensibles, intermédiaires et résistantes.

Un report du diamètre mesuré sur la boite permet de conclure rapidement qu'une souche bactérienne est plus active par rapport à une autre.

II-3-2-5 Germes testés

Des bactéries de cocci à Gram positif, du genre *Staphylococcus* de la famille Micrococcaceae ont été choisies, à savoir :

- ❖ *Le Staphylococcus aureus* : SA
- ❖ *Le Streptococcus faecalis* : SF

Elles sont responsables des diarrhées infantiles. Les diarrhées prélevées et conservées au Laboratoire d'Analyse Biomédicale du Centre Hospitalier Universitaire de Fianarantsoa ont été testées (C.H.U).

II-4 Méthodes de fractionnement et isolement

Les principes actifs et les divers constituants des différents extraits ont été obtenus par les techniques chromatographiques.

II-4-1 Principe général de la méthode chromatographique [47, 48]

La méthode chromatographique est une des méthodes les plus appropriées pour la séparation, l'isolement, la purification des molécules ou des ions organiques ou minéraux.

Elle dépend de deux phases : l'une stationnaire ou fixe et l'autre mobile. Le composé est soumis à l'action de phase stationnaire pouvant être un solide finement divisé ou liquide déposé sur un support solide et de la phase mobile sous forme de filtrat pouvant être un gaz ou un liquide entraînant son déplacement sélectif du composé.

L'avantage de cette méthode est la possibilité d'étudier une très faible quantité d'échantillon, de l'ordre du nanogramme et de diminuer considérablement le temps d'analyse par combinaison avec d'autres méthodes d'analyse telles que la spectroscopie UV, IR, SM en étudiant successivement chaque fraction.

Dans notre cas, nous avons adopté la chromatographie sur couche mince et la chromatographie sur colonne à basse pression.

Il y a deux types de chromatographie : la chromatographie d'adsorption et la chromatographie de partage (partition).

II-4-2 Chromatographie sur couche mince (CCM) [49, 50]

C'est une chromatographie d'adsorption solide-liquide. L'éluant ou solvant de développement est constitué soit par un solvant unique, soit par un mélange de solvants, il progresse par capillarité le long d'un adsorbant solide, finement divisé, fixé au préalable sur une matière plastique, ou une plaque de verre ou une feuille d'aluminium.

Les composants du mélange sont élués à des vitesses différentes selon leur adsorption derrière le front du solvant. En général, les composants de faible polarité sont entraînés plus vite que les constituants polaires.

Les substances ne sortent pas de la phase stationnaire et se présentent sous forme de tache. La localisation de ces constituants se fait soit observation à l'œil nu

(tache colorée), soit au rayonnement ultraviolet (UV) généralement aux longueurs d'ondes 254 nm et 365 nm (tache fluorescente), soit par révélation à l'aide de réactifs appropriés (tache différente des deux premières catégories).

Le comportement d'un constituant dans un système chromatographique déterminé est repéré par le rapport frontal défini comme suit :

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

dx : distance parcourue jusqu'au centre de la tache du constituant considéré depuis la ligne de dépôts.

ds : distance parcourue par l'éluant depuis la ligne de dépôts jusqu'au front du solvant.

La chromatographie sur couche mince permet de séparer les substances suivant la polarité des constituants par leurs groupements fonctionnels ou par leurs structures.

La CCM est la méthode la plus utilisée pour les raisons suivantes :

- simplicité du matériel utilisé
- rapidité pour la détermination plus ou moins approximative du nombre des constituants d'un mélange
- détermination de la pureté d'une substance
- identification d'une substance inconnue par comparaison de R_f avec celle de composés connus
- recherche des solvants d'élution utilisés pour la séparation en chromatographie sur colonne : chromatographie liquide à basse pression

II-4-3 Chromatographie liquide sur colonne [51, 52]

L'éluant s'écoule en continu dans la colonne remplie d'adsorbant solide finement divisé. Ceci entraîne l'adsorption et la désorption des molécules d'un mélange déposé à la surface supérieure de l'adsorbant. Les molécules sont éluées par gravité vers la partie inférieure de la colonne à des vitesses différentes selon leur solubilité dans l'éluant et leur affinité pour l'adsorbant. Plus l'affinité du soluté pour l'adsorbant est faible, plus l'élution est rapide et inversement. Il existe deux modes de développement de la colonne :

- Analyse par gradient d'élution, si on fait varier le système d'éluant

- Analyse par élution isocratique dans le cas d'un seul système de solvant

On remplit la colonne d'adsorbant le plus souvent l'alumine ou la silice. L'échantillon préparé sous forme de poudre est déposé en haut de la colonne et la séparation des composants résulte de l'écoulement continu de l'éluant, traversant la colonne par gravité.

Pour le fractionnement nous avons utilisé la méthode qui préconise l'élution par gradient d'élution. Les éluants utilisés sont les suivants : hexane en gradient avec l'AcOEt pour lequel on augmente au fur et à mesure de l'avancement de séparation la proportion du solvant de polarité plus élevée, pour notre par l'AcOEt.

Fractionnement de l'extrait au dichlorométhane E₃

- Préparation du dépôt solide

L'extrait brut E₃, de masse 2 g, a été dissous avec un volume minimal d'hexane. La solution a été additionnée de silice. Après évaporation au bain-marie sous agitation, le résidu obtenu a été rendu en poudre. Cette pâte pulvérisée sera déposée au sommet d'une colonne.

- Préparation de la colonne

Un coton hydrophile a été introduit au fond de la colonne en verre pour l'obturer puis mouillé avec un petit volume d'hexane. La silice a été mise en suspension dans l'hexane puis le mélange a été agité. Ensuite, on la verse dans la colonne tout en laissant ouvert le robinet. La hauteur de silice doit être 30cm et on ferme le robinet lorsque l'hexane se trouve au ras de la surface.

- Déroulement de la colonne

La pâte de silice pulvérisée a été introduite tout doucement au sommet de la colonne préalablement montée. L'éluat a été recueilli par fractions de 15 ml. Les fractions sont suivies par CCM après concentration afin d'avoir leur profil chromatographique. Les fractions de même aspect en CCM ont été rassemblées, puis évaporées à siccité. Les différents éluats séchés ont été pesés et stockés au réfrigérateur.

TROISIÈME PARTIE :
RÉSULTATS ET
DISCUSSIONS

I- Criblage phytochimique

Nous avons recueilli 500ml de la solution hydroalcoolique équivalent à 400g de poudre de feuilles sèches. La solution hydroalcoolique a été soumise aux différents tests analytiques utilisés pour le criblage phytochimique. Le barème adopté pour l'appréciation semi-qualitative des résultats a été rappelé dans le tableau IX.

Tableau IX : barème d'appréciation semi-qualitative de criblage phytochimique

Signe	Précipitation	Coloration	Indice de mousse (hauteur après 30mn)
-	Négative	Sans changement	0 à 2cm
+	Précipitation faible	Coloration faible	2 à 4cm
++	Précipitation abondante	Coloration moyenne	4 à 5cm
+++	Précipitation forte et floculation immédiate	Coloration intense	> à 5cm

I-1 Criblage des alcaloïdes

Les résultats du criblage des alcaloïdes ont été consignés dans le tableau X.

Tableau X : Résultats du criblage des alcaloïdes

Test	Réactifs	Appréciation
Solution hydroalcoolique	Wagner	-
	Mayer	-
	Dragendorff	-

D'après ce résultat, nous pouvons conclure que l'échantillon ne contient pas d'alcaloïdes.

I-2 Criblage des anthraquinones

Les résultats du criblage des anthraquinones ont été présentés dans le tableau XI.

Tableau XI : Résultats du criblage des anthraquinones

Test de Börnstrager	
Solution hydroalcoolique	Coloration rouge violacée (+++)

La coloration rouge violacée nous montre la présence des anthraquinones dans la plante.

I-3 Criblage des flavonoïdes et leucoanthocyanes

Les résultats du criblage des flavonoïdes particulièrement leucoanthocyanes ont été figurés dans le tableau XII.

Tableau XII : Résultats du criblage des flavonoïdes et leucoanthocyanes

Test	Wilstater	Wilstater modifié	Bate Smith 1	Bate Smith 2
Solution hydroalcoolique	Coloration franche rouge (++) flavonols	Coloration pourpre (+++) flavonols	Coloration rouge violacé (+++) leucoanthocyanes	Absence de coloration (-)

L'échantillon renferme de flavonols et de leucoanthocyanes

I-4 Criblage des stéroïdes et des triterpénoïdes

Les résultats du criblage des stéroïdes et triterpénoïdes ont été donnés dans le tableau XIII.

Tableau XIII : Résultats du criblage des stéroïdes et des triterpénoïdes

	Test Liebermann Burchard	Test Salkowski	Test Badjet-kedde
Solution hydroalcoolique	Absence de coloration (-)	Absence de coloration (-)	Absence de coloration (-)

D'après les résultats, les feuilles ne renferment ni de stéroïdes ni de triterpénoïdes.

I-5 Criblage des saponines

Les résultats du criblage des saponines ont été rapportés dans le tableau XIV.

Tableau XIV : Résultats du criblage des saponines

	Indice de mousse
Poudre de feuilles sèches	Hauteur de mousse après 30mn = 5,5cm

L'échantillon ne renferme pas de saponines, il se peut que la mousse est due à quelque chose. Donc, l'échantillon ne contient pas de saponines. Les saponines étant des hétérosides de stéroïdes ou de triterpénoides.

I-6 Criblage des tanins et des polyphénols

Les résultats du criblage des tanins et des polyphénols ont été présentés dans le tableau XV.

Tableau XV : Résultats du criblage des tanins et des polyphénols

Réactifs	4 gouttes de gélatine 1%	4 gouttes de gélatine salée	4 gouttes de FeCl_3 dans MeOH
Solution hydroalcoolique	Précipitation (+++) polyphénols	Précipitation (++) tanins	Coloration bleu vert tanins condensés

D'après ce résultat, la présence des polyphénols et des tanins a été détectée dans la plante.

I-7 Criblage des polysaccharides et des sucres réducteurs

Les résultats du criblage des polysaccharides et des sucres réducteurs sont indiqués dans le tableau XVI.

Tableau XVI : Résultats du criblage polysaccharides et des sucres réducteurs

	Test de polysaccharides	Test à la liqueur de Fehling
Décocté	Pas de précipitation (-)	Absence de coloration rouge brique (-)

D'après ces résultats, l'échantillon ne contient ni de polysaccharides ni de sucres réducteurs.

Tous les résultats du criblage phytochimique ont été résumés dans le tableau XVII.

Tableau XVII : récapitulation des résultats du criblage phytochimique des feuilles de *Monanthotaxis pilosa* Baillon

Familles chimiques	Résultats
Alcaloïdes	-
Anthraquinones	+++
Flavonoïdes	+++
Leucoanthocyanes	+++
Stéroïdes	-
Triterpénoïdes	-
Saponines	-
Polyphénols	+++
Tanins	++
Polysaccharides	-
Sucre réducteur	-

II- Résultats de l'extraction

Le résultat de l'extraction hydroalcoolique, hexanique, au dichlorométhane, à l'acétate d'éthyle, butanolique à partir de $400 \pm 0,1$ g de poudre de feuilles sèches de *Monanthotaxis pilosa* Baillon a été consigné dans le tableau XVIII.

Tableau XVIII : Résultats de l'extraction

Extrait	Masse (g)	rendement (%)
Extrait hydroalcoolique (E₁)	$56,5 \pm 0,1$	14,13
Extrait hexadique (E₂)	$0,8 \pm 0,1$	0,2
Extrait au dichlorométhane (E₃)	$0,6 \pm 0,1$	0,1
Extrait à l'acétate d'éthyle (E₄)	$1,1 \pm 0,1$	0,3
Extrait butanolique (E₅)	$15 \pm 0,1$	3,8

III- Résultats des tests biologiques

III-1 Test antimicrobien

Les diamètres des zones d'inhibition de l'extrait hydroalcoolique de *Monantotaxis pilosa* Baillon sur les souches *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus faecalis* au Laboratoire d'Analyses Biomédicales du Centre Hospitalier Universitaire de Fianarantsoa ont été présentés dans le tableau XIX

Tableau XIX : Résultats du test antibactérien

Extrait testé	Souches microbiennes testées	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
Extrait hydroalcoolique	$12,5 \pm 2$ mm	$10,8 \pm 2$ mm

Les résultats montrent que l'extrait hydroalcoolique provoque une zone d'inhibition vis-à-vis des souches bactériennes testées. L'activité antibactérienne de l'extrait hydroalcoolique est un peu élevée sur les *Staphylococcus aureus* de diamètre 12,5 mm que sur les *Streptococcus faecalis* de diamètre 10,8 mm.

III-2 Test antioxydant des fractions E₁, E₂, E₃, E₄ et E₅

Une étude préalable sur CCM a été faite sur les différents extraits pour déterminer le système de solvant adéquat pour la séparation en chromatographie sur colonne (CLBP) et aussi utilisé sur le test antioxydant.

Les résultats ont donné une meilleure séparation avec le système C₆H₁₂/AcOEt/MeOH (6/2/2) en présentant plusieurs taches selon le profil chromatographique. Le chromatogramme a été révélé avec le radical 2,2-diphénylpicrylhydrazyle en solution dans le méthanol. Le résultat a été représenté par la figure 5.



Système d'éluant	: C ₆ H ₁₂ /AcOEt/MEOH : 60/20/20
Phase stationnaire	: gel de silice 60
Révélateur	: DPPH/ MeOH, (2mg/1ml)

(E₁) : Extrait hydroalcoolique

(E₂) : Extrait hexadique

(E₃) : Extrait au dichlorométhane

(E₄) : Extrait à l'acétate d'éthyle

(E₅) : Extrait butanolique

Figure 5 : Test antioxydant sur les extraits : E₁, E₂, E₃, E₄ et E₅ de *Monantotaxis pilosa* Baillon

Après révélation, des taches jaunes sur fond violet apparaissent sur chaque extrait montrant que les différents extraits obtenus à partir des feuilles de *Monanthotaxis pilosa* Baillon ont des activités antioxydantes sur le DPPH. Le résultat a été résumé dans le tableau XX

Tableau XX : Résultats du test antioxydant sur les extraits des feuilles de *Monanthotaxis pilosa* Baillon

Extraits	Résultat
Extrait hydroalcoolique (E₁)	+
Extrait hexanique (E₂)	+
Extrait au dichlorométhane (E₃)	+
Extrait à l'acétate d'éthyle (E₄)	+
Extrait butanolique (E₅)	+

(+) : positif

IV- Résultats du fractionnement de l'extrait au dichlorométhane E₃

La chromatographie sur colonne de silice à basse pression de 2g de l'extrait CH₂Cl₂ (E₃) a été réalisée en utilisant comme solvant d'élution l'hexane en gradient avec l'acétate d'éthyle. L'eluat a été recueilli par fractions de 15ml. Les fractions de même aspect en CCM ont été ensuite rassemblées comme les fractions 211 à 247 selon la figure 6.

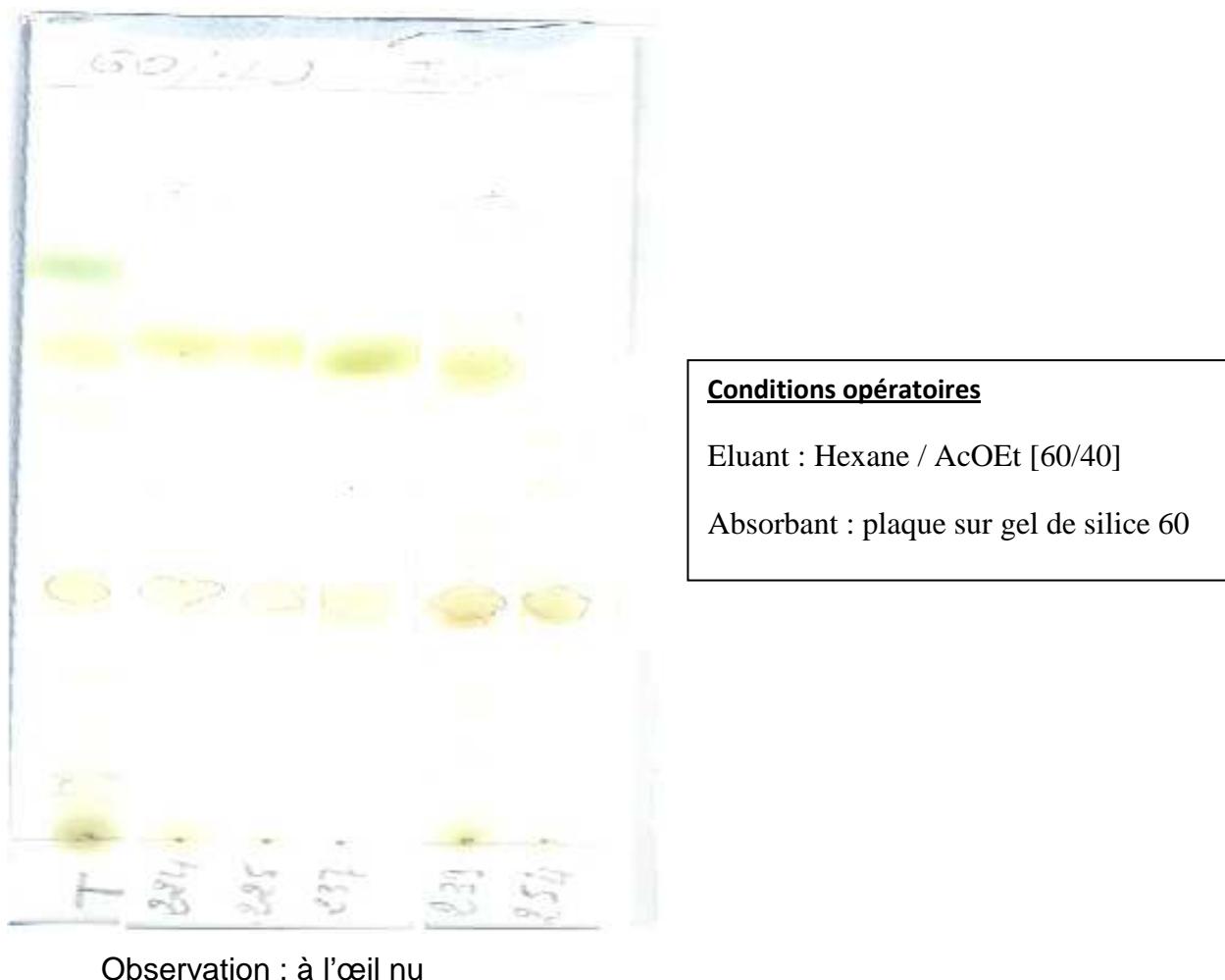


Figure 6 : CCM des fractions 211 à 247

Le résultat de ce fractionnement a été indiqué dans le Tableau XXI.

Tableau XXI : Résultats du fractionnement de l'extrait CH₂Cl₂ (E₃)

Fractions	Eluant	Observation	masse (mg)
1-20	Hexane	mélange	35 ± 0,1
21-81	Hexane / AcOEt [98/2]	21-27 (F ₁)	13 ± 0,1
		mélange	55 ± 0,1
		52-70 (F ₂)	12 ± 0,1
82-188	Hexane / AcOEt [95/5]	71-85 (F ₃)	10 ± 0,1
		mélange	250 ± 0,1
189-204	Hexane / AcOEt [90/10]	mélange	70 ± 0,1
205-247	Hexane / AcOEt [85/15]	mélange	200 ± 0,1
		211-247 (A)	40 ± 0,1
248-274	Hexane / AcOEt [80/20]	248-274 (F ₄)	16 ± 0,1
275-291	Hexane / AcOEt [75/25]	Mélange	90 ± 0,1
292-300	Hexane / AcOEt [70/30]	Mélange	80 ± 0,1

La purification des fractions rassemblées a été réalisée à l'aide d'un solvant adéquat. Ainsi cinq produits purs notés F₁, F₂, F₃, A, F₄ ont été obtenus dont leurs caractéristiques ont été indiquées dans le tableau XXII et par la figure 7.



Système d'éluant : Hexane /AcOEt : 65/35
Phase stationnaire : gel de silice 60
Révélateur : H_2SO_4 à 50%

Figure 7 : CCM des produits purs isolés à partir de l'extrait au dichlorométhane **E₃**

Tableau XXII : caractéristiques des produits purs isolés à partir de l'extrait au dichlorométhane **E₃**

Fraction	Produits purs	Aspect	Masse (mg)	R _f (hexane/AcOEt : 65/35 ; v/v)
21-27	F ₁	Cristaux blancs	10 ± 0,1	0,95
52-70	F ₂	Cristaux orangés	10 ± 0,1	0,9
71-85	F ₃	Fines aiguilles transparentes	7 ± 0,1	0,7
211-247	A	Cristaux dorés	30 ± 0,1	0,2
248-274	F ₄	Cristaux verts	14 ± 0,1	0,13

Le test antioxydant réalisé sur les produits purs isolés a été représenté par la figure 8.



Système d'éluant	: C ₆ H ₁₂ /AcOEt/: 60/40
Phase stationnaire	: gel de silice 60
Révélateur	: DPPH/ MeOH, (2mg/1ml)

Figure 8 : Test antioxydant des produits purs isolés à partir de l'extrait au dichlorométhane **E₃**

D'après ce résultat, les deux produits A et F₄ représentent une activité antioxydante sur DPPH.

La connaissance de structure du produit A actif majoritaire est nécessaire.

Afin de déterminer sa structure, des spectres RMN ¹H, ¹³C et DEPT 135° ont été enregistrés, et ainsi des expériences X-Ray par le Docteur Liva Harinantenaina, Research Scientist, Pharmaceutical Sciences, Departement of Chemistry, Virginia Polytechnic Institute and State University, United States of America. L'expérience « X-Ray » se réalise seulement sur le produit sous forme des cristaux. C'est le cas du produit A qui se présente sous forme des cristaux dorés.

V- Résultats et discussions des spectres du produit A

V-1 Exploitation des spectres RMN ^1H du produit A

Les spectres RMN ^1H (normal et agrandi) du produit A ont été donnés sur les figures 9 et 10.

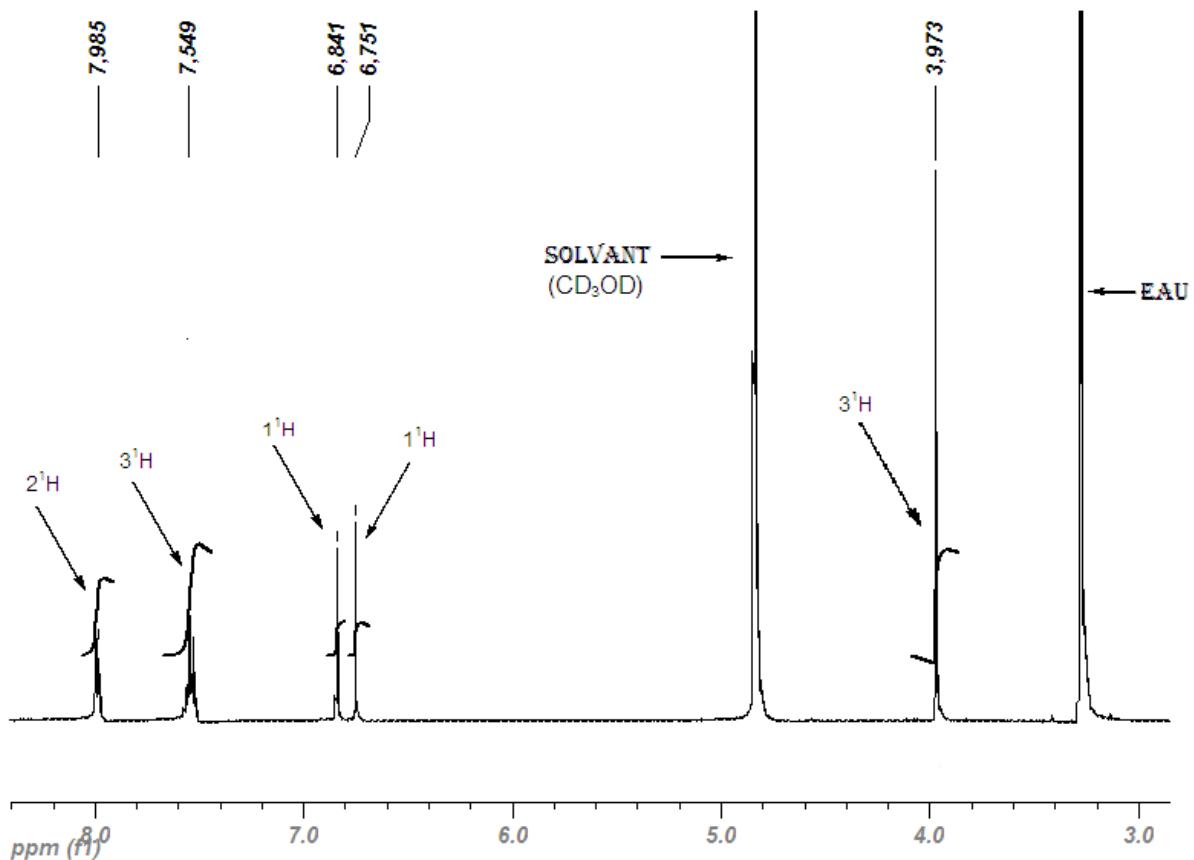


Figure 9 : Spectre RMN ^1H du produit A

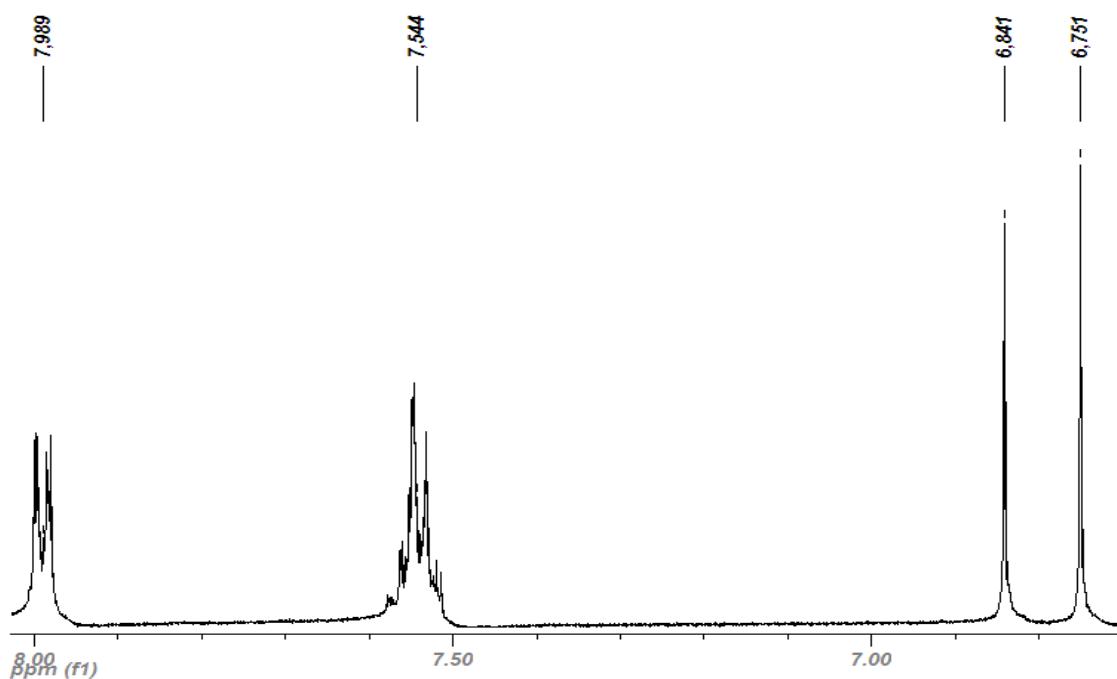


Figure 10 : Spectre RMN ^1H agrandi du produit A (zone 6,4 – 8,2ppm)

L'analyse de ce spectre RMN ^1H avec l'allure des signaux des protons, les hauteurs des paliers, des courbes d'intégration des pics nous a permis de faire les observations suivantes :

- Le solvant utilisé est méthanol deutérié (CD_3OD), son signal se trouve à $\delta = 4,84\text{ppm}$.
- Le pic à $\delta = 3,27\text{ppm}$ est attribuable à l'eau.

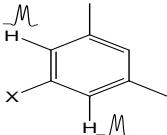
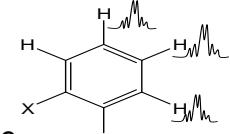
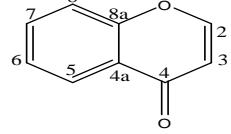
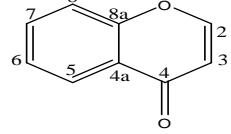
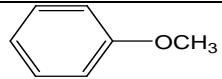
La plupart des déplacements chimiques se situent entre 6,0 et 8,0ppm. Ceci nous a guidé à penser aux protons aromatiques ou éthyléniques.

- En effet, un singulet d'un proton à $\delta = 6,84\text{ppm}$ peut être un proton aromatique. Ce déplacement chimique est inférieur à celui des protons aromatiques normaux signifie qu'il est en ortho d'un groupement OR. Il y a donc effet de blindage car OR est donneur d'électrons.
- Un singulet d'un proton à $\delta = 6,75\text{ppm}$ est attribuable à un proton éthylénique. Ceci montre que ce proton est déblindé. Et que ce déblindage peut être dû à une forte conjugaison.

- Un multiplet de 3 protons à $\delta = 7,54\text{ppm}$ attribuable à 3 protons aromatiques voisins ($J \sim 7,5\text{Hz}, 2,0\text{ Hz}$).
- Un multiplet de 2 protons ($J \sim 6,5\text{Hz}, 1,8\text{Hz}$) à $\delta = 7,98\text{ppm}$ est attribuable également à 2 protons aromatiques en ortho. Mais la valeur de $\delta > 7,55\text{ppm}$ peut être due à une mésométrie.
- Toutefois, nous notons la présence d'un singulet de 3 protons à $\delta = 3,97\text{ppm}$ attribuable à un groupement méthyle voisin d'un oxygène en vertu de l'électronégativité de l'oxygène (3,5).

L'exploitation du spectre RMN ^1H du produit A est résumée dans le tableau XXIII.

Tableau XXIII : Exploitation du spectre RMN ^1H du produit A

δ (ppm)	Allure des signaux	Nombre de ^1H	Structures possibles
7,98	Multiplet (m) $J \sim 6,5\text{Hz}$ $J \sim 1,8\text{Hz}$	2	$7 < \delta \text{ppm} < 8$  $\rightarrow ^1\text{H}$ aromatique
7,54	Multiplet (m) $J \sim 7,5\text{Hz}$ $J \sim 2,0\text{Hz}$	3	$7 < \delta \text{ppm} < 8$  $\rightarrow ^1\text{H}$ aromatique
6,75	Singulet (s)	1	$6,5 < \delta \text{ppm} < 7$  $\rightarrow ^1\text{H}$ aromatique
6,84	Singulet (s)	1	
3,97	Singulet (s)	3	$3,5 < \delta \text{ppm} < 4$ 

Ainsi le produit A contient 7 protons aromatiques et 3 protons d'un groupement méthoxyle.

V-2 Exploitation de spectre RMN ^{13}C du produit A

Le spectre RMN ^{13}C enregistré sur le produit A a été donné sur la figure 11.

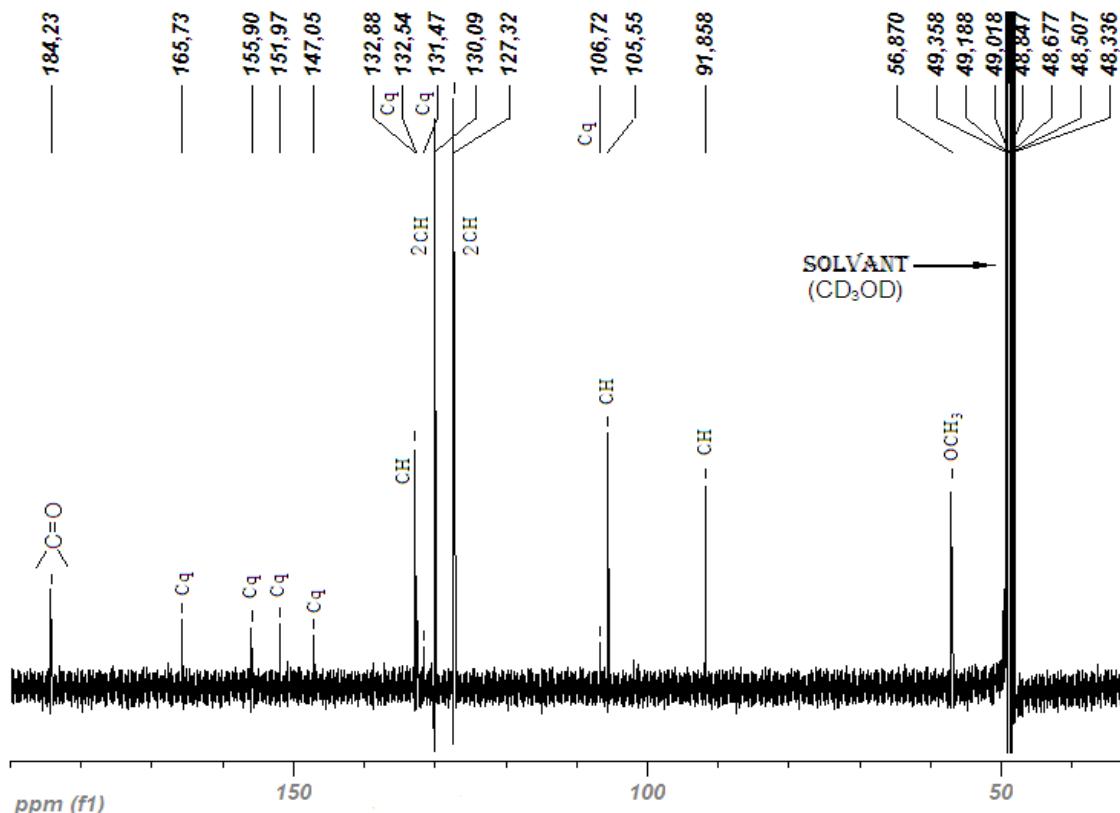


Figure 11 : Spectre RMN ^{13}C du produit A

Le spectre RMN ^{13}C du produit A indique la présence de 16 atomes de carbones si on élimine les pics du solvant. Le solvant CD_3OD qui se présente sous forme de heptuplet aux environs de $\delta = 49\text{ppm}$.

Les déplacements, outre le carbone à $\delta = 56,87\text{ppm}$ attribuable au groupement OCH_3 et le carbone à $\delta = 184,23\text{ppm}$ assigné au groupement $>\text{C}=\text{O}$, se trouvent tous dans la zone des déplacements des carbones aromatiques ou éthyléniques.

V-3 Exploitation de spectre DEPT 135° du produit A

Le spectre DEPT 135° enregistré sur le produit A a été donné sur la figure 12.

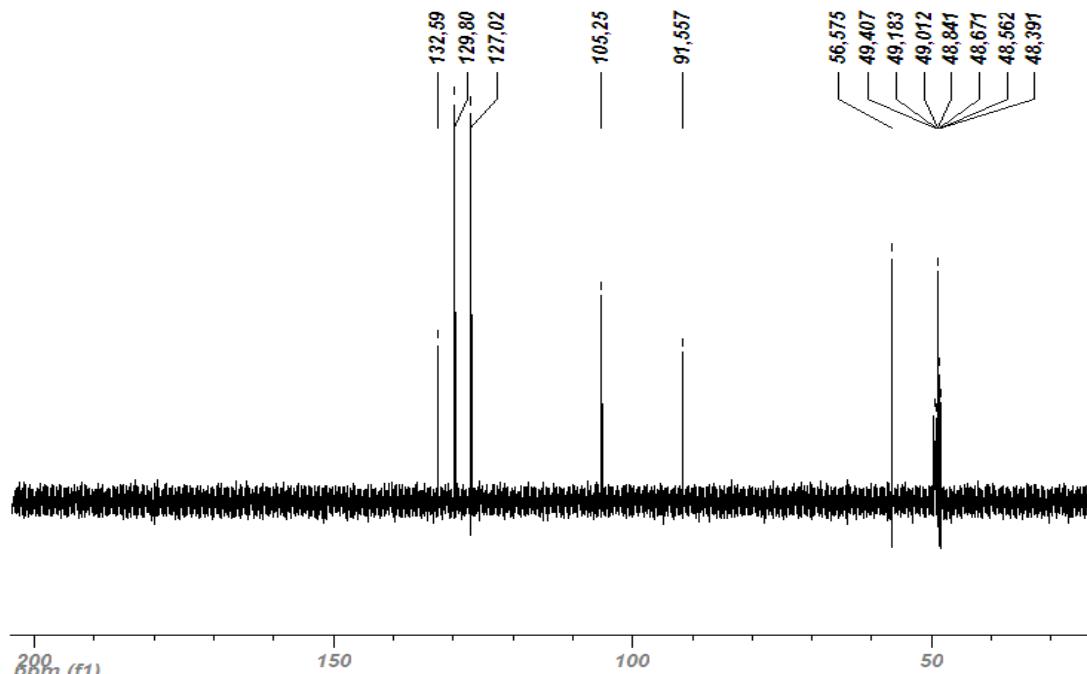


Figure 12 : Spectre DEPT 135° du produit A

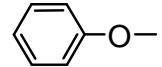
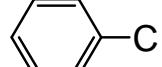
L'analyse concertée des spectres RMN ^{13}C et DEPT 135° enregistrés sur le produit A confirme notre observation. En effet :

- Un groupement méthoxy à $\delta = 56,87\text{ppm}$.
- 7 groupements méthines entre $\delta = 90\text{ppm}$ à $\delta = 135\text{ppm}$ correspondant à - CH- aromatiques. Etant donné leurs intensités respectives, les déplacements chimiques à 127,02ppm et 129,80ppm correspondent à 2 CH.
- L'absence d'un groupement méthylène ($-\text{CH}_2-$) est noté car le spectre DEPT présente aucun pic négatif.

- Les 8 carbones restants non observables dans le spectre DEPT 135° sont des carbones quaternaires :
 - Un carbone à $\delta = 184,23\text{ppm}$ confirme la présence d'une fonction carbonyle.
 - 3 carbones respectivement à $\delta = 155,9\text{ppm}$, $\delta = 151,97\text{ppm}$, $\delta = 132,54\text{ppm}$ sont des carbones quaternaires d'un noyau aromatique liés à un hétéroatome qui est l'oxygène.
 - Et 4 carbones quaternaires d'un noyau aromatique.

Ces données spectrales sont enregistrées dans le tableau XXIV.

Tableau XXIV : Données spectrales en RMN ^{13}C du produit A

Déplacement chimique δ (ppm)	Nombre de carbone	Type de carbone
184,23	1	$>\text{C}=\text{O}$
165,73	1	
155,90	1	
151,97	1	
147,05	1	
132,54	1	
131,47	1	
106,72	1	
132,88	1	
130,09	2	
127,32	2	
105,55	1	
91,85	1	
56,87	1	$\text{H}_3\text{C-O-}$

Le test de Wilstater effectué sur le produit A a donné une coloration jaune orangée. Ainsi le produit A est une flavone de squelette de base donné par la figure 13.

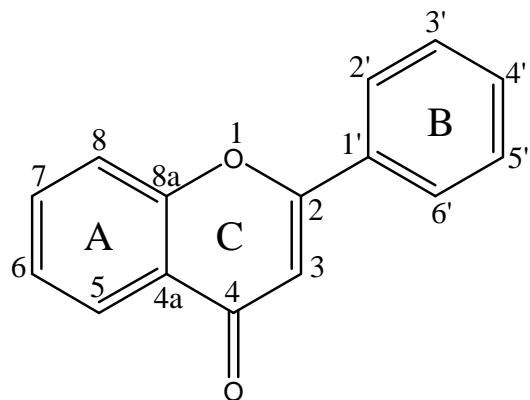
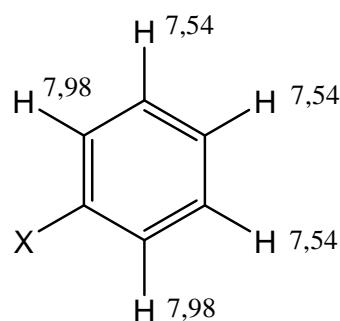


Figure 13 : Squelette de base d'une flavone

Ce squelette contient 15 atomes de carbones tandis que le produit A possède 16 atomes de carbones. Ainsi le carbone supplémentaire du produit A est celui du groupement méthoxy. On voit déjà 5 carbones quaternaires (2, 4, 4a, 8a, 1'). Nous avons aussi 3 carbones quaternaires liés à l'hétéroatome d'oxygène, dont l'un est celui du groupement méthoxy et deux autres pourraient être liés à des groupements hydroxy car les protons du groupement hydroxy est mobile. Ainsi on ne les voit pas sur le spectre. En utilisant toutes les informations obtenues sur le spectre RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT 135° et le squelette de base du produit A, nous avons la séquence suivante :



La seule possibilité de ce noyau doit être celui du B. ainsi, il reste à placer les 2 protons aromatiques ou éthylénique sous forme de singulets, le groupement méthoxy et les 2 groupements hydroxy.

Pour connaitre les positions exactes de ces substituants, nous avons eu recours au logiciel Chem Draw 4.0. Les spectres théoriques correspondant au composé A ont été représentés sur les figures 14 et 15.

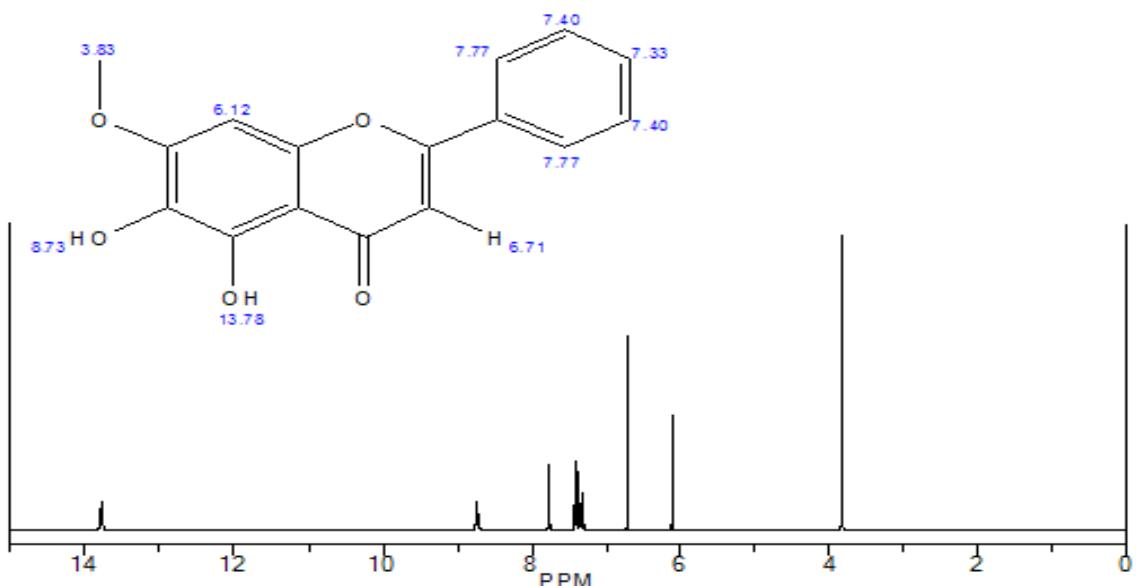


Figure 14 : Spectre RMN ^1H théorique du produit A

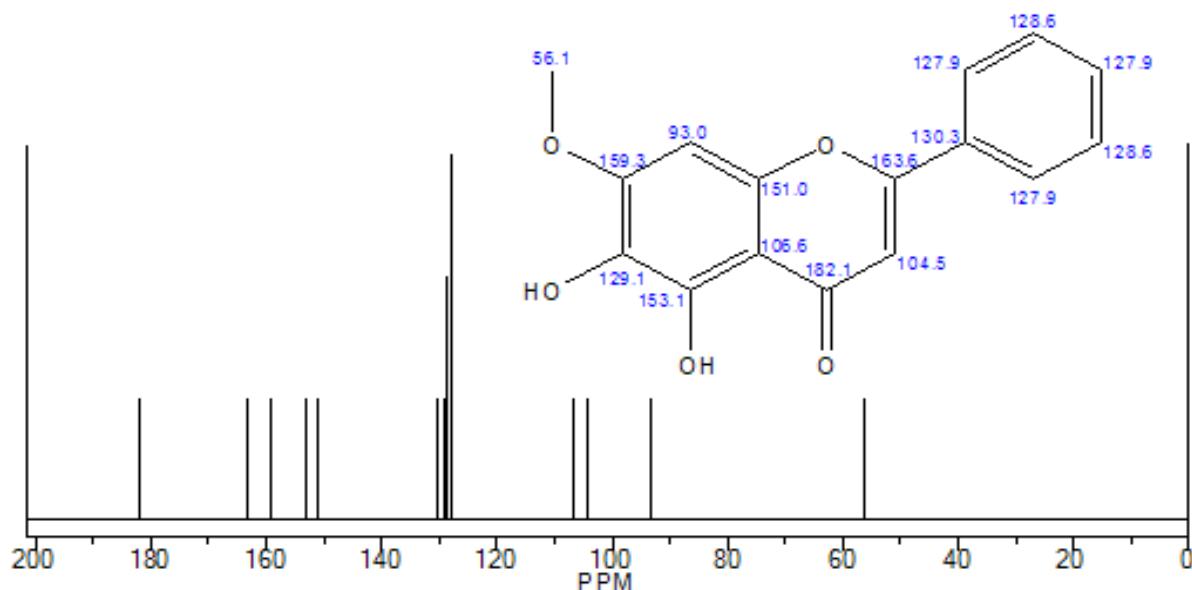


Figure 15 : Spectre RMN ^{13}C théorique du produit A

Nous nous sommes inspirés de ces données théoriques et nous avons avancé l'hypothèse ci après :

- le cycle A est trisubstitué, les effets ortho et para des OH font que le proton en 8 est déblindé à la valeur observée de $\delta = 6,84\text{ppm}$.
 - Le proton à $\delta = 6,75\text{ppm}$ sera donc attribué au proton en position 3 du squelette de base.
 - Les protons à $\delta = 7,54\text{ppm}$ (3H) et $\delta = 7,98\text{ppm}$ (2H) appartiennent au noyau B non substitué. Tout ceci justifie l'allure des pics dans le spectre de proton.
 - La plus grande valeur à $\delta = 7,98\text{ppm}$ correspond à 2 protons (H2' et H6'), très déblindés en conjugaison avec le groupement α,β insaturé du cycle chromène; à $\delta = 7,54\text{ppm}$ 3 protons (H3', H4' et H5') dans les zones des déplacements chimiques des aromatiques.

Nous avons alors recherché dans la littérature [53], il existe un produit analogue.

Le cycle B est non substitué les $\Delta\delta$ observées sont $\pm 0,2$ ppm. Lorsque B est non substitué, le proton en 3 d'une flavone résonne aux environs de 6,5 ppm (CCl_4).

Si le cycle A est trisubstitué en 5, 6, 7, le proton en 8 d'une flavone résonne aux environs de 6,6 ppm (CCl_4) celui de 3 d'une flavone résonne aux environs de 6,4 ppm (CCl_4).

En comparant les spectres théoriques et ceux du produit A, nous avons la structure du produit A selon la figure 16.

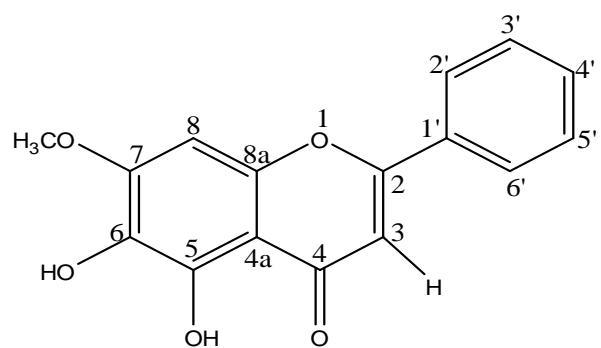


Figure 16 : Structure du produit A.

Le tableau XXV Indique la comparaison des déplacements chimiques (^1H , ^{13}C) du produit A et celui du spectre théorique et celui de la littérature [53].

Tableau XXV : Comparaison des déplacements chimiques du produit A et celui de la littérature

	δ RMN ^1H (ppm)		δ RMN ^{13}C (ppm)	
	Spectres		Spectres	
n°	Produit A (CD ₃ OD, 400MHz)	Littérature [48] (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400MHz)	Produit A (CD ₃ OD, 100MHz)	Littérature [48] (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100MHz)
2	-	-	165,73	163,20
3	6,75	6,63	105,55	104,70
4	-	-	184,23	182,20
4a	-	-	106,72	104,70
5	-	-	151,97	152,60
6	-	-	132,54	130,70
7	-	-	155,90	157,30
8	6,84	6,68	91,85	94,40
8a	-	-	147,05	152,60
1'	-	-	131,47	131,40
2'	7,98	7,70	127,32	126,40
3'	7,54	7,70	130,09	129,10
4'	7,54	7,70	132,88	132,00
5'	7,54	7,70	130,09	129,10
6'	7,98	7,70	127,32	126,00
OCH ₃	3,97	4,04	56,87	60,00

(-) : absence

Ainsi, d'après la littérature le produit s'agit d'une flavone 5,6-dihydroxy-7-méythoxyflavone qui est le « Negletein » isolé dans la plante le *Centaurea clementei* [54, 55, 56, 57] présenté sur la figure 16.

Ces hypothèses ont été confirmées par l'expérience « X-ray » qui s'effectue seulement sur des produits sous forme de cristaux, c'est le cas du produit A. Les données expérimentales ont été enregistrées dans un diffractomètre d'Oxford Diffraction Super Nova, s'ouvrant avec la radiation CuK α et traitées par le programme CrysAlisPro v171.34.40. [58]

La structure a été résolue en utilisant SHELXS-97 [59] et perfectionnée en utilisant SHELXL-97 [60] via OLEX2 [61].

Les résultats obtenus par l'expérience X-ray ainsi que les longueurs de liaisons et les angles de liaisons du produit A ont été consignés dans la figure 17 et les tableaux XXVI, XXVII et XXVIII.

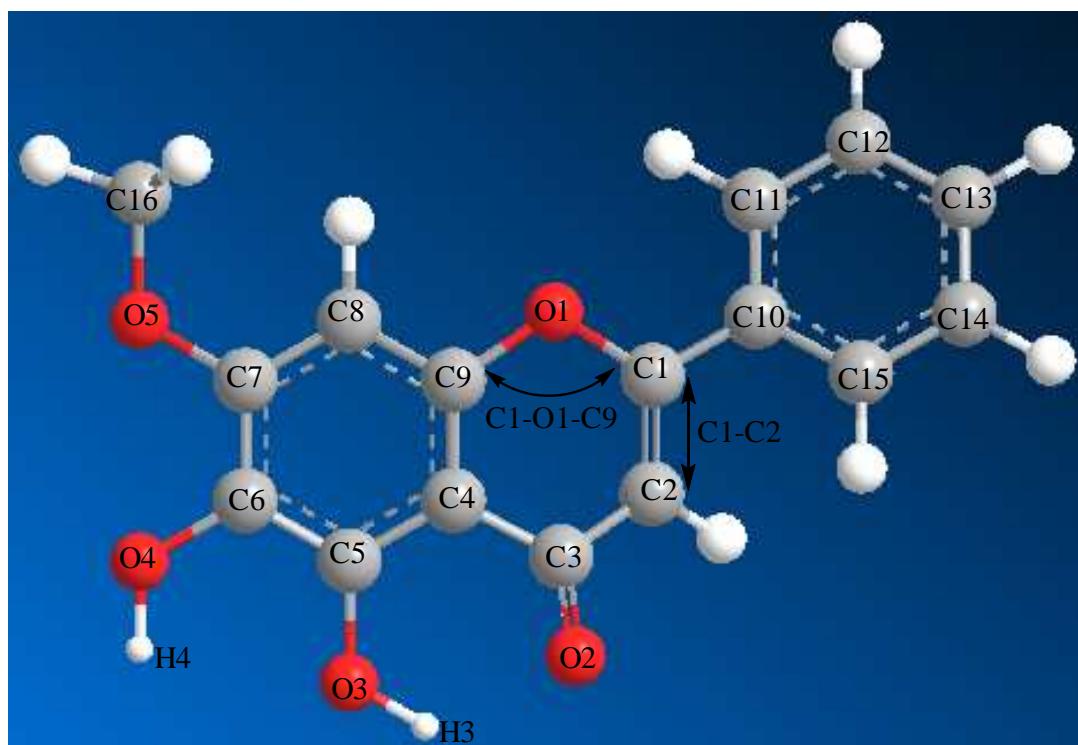


Figure 17 : Structure du produit A avec les atomes numérotés selon l'expérience DRX

Tableau XXVI : Crystal data and structure refinement for cs1657.

Identification code	cs1657
Empirical formula	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
Formula weight	284.26
Temperature	100(2) K
Wavelength	1.54178 Å
Crystal system	Monoclinic
Space group	P 21/c
Unit cell dimensions	a = 9.78861(18) Å β = 90° b = 15.8096(3) Å γ = 91.2922(18)° c = 8.32982(18) Å α = 90°
Volume	1288.74(5) Å ³
Z	4
Density (calculated)	1.465 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.921 mm ⁻¹
F(000)	592
Crystal size	0.159 x 0.128 x 0.025 mm ³
Theta range for data collection	4.52 to 76.56°
Index ranges	-11≤h≤12, -19≤k≤19, -10≤l≤10
Reflections collected	10054
Independent reflections	2684 [R(int) = 0.0240]
Completeness to theta = 76.56°	98.7 %
Absorption correction	Gaussian
Max. and min. transmission	0.977 and 0.878
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	2684 / 0 / 193
Goodness-of-fit on F ²	1.049
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0346, wR2 = 0.0925
R indices (all data)	R1 = 0.0411, wR2 = 0.0978
Largest diff. peak and hole	0.273 and -0.196 e.Å ⁻³

Tableau XXVII : Bond lengths [\AA] and angles [°] for cs1657.

O(1)-C(1)	1.3624(14)	C(1)-C(10)	1.4742(16)	C(8)-C(9)	1.3872(17)
O(1)-C(9)	1.3684(14)	C(2)-C(3)	1.4398(17)	C(10)-C(11)	1.3998(18)
O(2)-C(3)	1.2533(15)	C(3)-C(4)	1.4507(16)	C(10)-C(15)	1.4016(17)
O(3)-C(5)	1.3577(15)	C(4)-C(9)	1.3910(17)	C(11)-C(12)	1.3865(18)
O(4)-C(6)	1.3601(14)	C(4)-C(5)	1.4113(16)	C(12)-C(13)	1.3891(19)
O(5)-C(7)	1.3528(15)	C(5)-C(6)	1.3800(17)	C(13)-C(14)	1.388(2)
O(5)-C(16)	1.4330(16)	C(6)-C(7)	1.4086(18)	C(14)-C(15)	1.3911(18)
C(1)-C(2)	1.3538(18)	C(7)-C(8)	1.3906(17)		
C(1)-O(1)-C(9)	119.93(10)			C(8)-C(9)-C(4)	122.66(11)
C(7)-O(5)-C(16)	117.14(10)			C(11)-C(10)-C(15)	119.08(11)
C(2)-C(1)-O(1)	122.13(11)			C(11)-C(10)-C(1)	120.48(11)
C(2)-C(1)-C(10)	126.94(11)			C(15)-C(10)-C(1)	120.43(11)
O(1)-C(1)-C(10)	110.92(10)			C(12)-C(11)-C(10)	120.25(12)
C(1)-C(2)-C(3)	121.27(11)			C(11)-C(12)-C(13)	120.32(12)
O(2)-C(3)-C(2)	123.35(11)			C(14)-C(13)-C(12)	119.99(12)
O(2)-C(3)-C(4)	121.32(11)			C(13)-C(14)-C(15)	120.11(12)
C(2)-C(3)-C(4)	115.33(11)			C(14)-C(15)-C(10)	120.24(12)
C(9)-C(4)-C(5)	118.09(11)				
C(9)-C(4)-C(3)	120.09(11)				
C(5)-C(4)-C(3)	121.80(11)				
O(3)-C(5)-C(6)	119.22(11)				
O(3)-C(5)-C(4)	119.96(11)				
C(6)-C(5)-C(4)	120.82(11)				
O(4)-C(6)-C(5)	123.51(11)				
O(4)-C(6)-C(7)	117.38(11)				
C(5)-C(6)-C(7)	119.11(11)				
O(5)-C(7)-C(8)	124.69(11)				
O(5)-C(7)-C(6)	113.87(11)				
C(8)-C(7)-C(6)	121.44(11)				
C(9)-C(8)-C(7)	117.87(11)				
O(1)-C(9)-C(8)	116.24(11)				
O(1)-C(9)-C(4)	121.10(11)				

Tableau XXVIII : Hydrogen bonds for cs1657 [Å and °].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(3)-H(3)...O(2)	0.84	1.82	2.5723(12)	147.6
O(4)-H(4)...O(3)#1	0.84	1.98	2.6858(13)	141.1

Symmetry transformation used to generate equivalent atom: #1 -x+1,-y+1,-z+3

Ainsi, nous avons la structure du produit A donnée sur la figure 18.

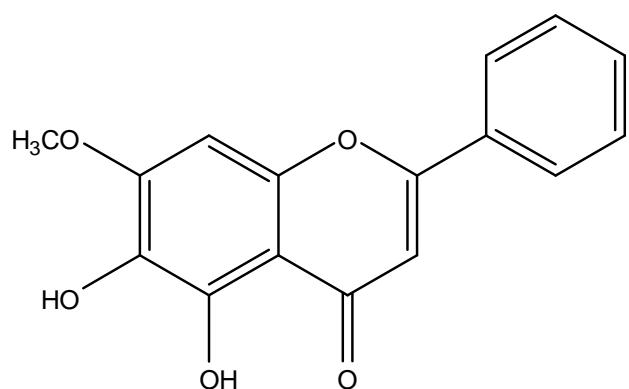


Figure 18 : 5,6-dihydroxy-7-méthoxy-2-phényl chromèn-4-one

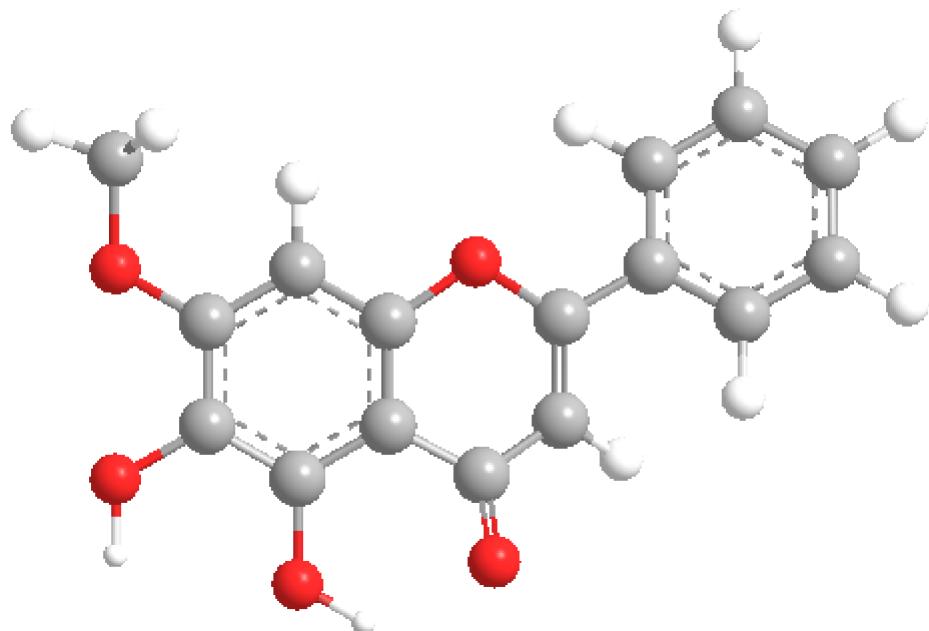


Figure 19 : Structure en 3D de Negletein

Boule blanche : H
Boule brune : C
Boule rouge : O

Les caractéristiques du produit A qui est le Negletein donné par ce travaux sont les suivantes :

- La cristallisation dans l'AcOEt des fractions 211 à 247 éluées par le mélange Hexane/AcOEt (85/15) donne 30mg des cristaux dorés dont le point de fusion est $232^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- RMN ^1H (MeOD, 400MHz) : δ (ppm) 3,97 (3H, s, OCH₃); 6,75 (1H, s, H8); 6,84 (1H, s, H3); 7,54 (3H, m, J~7,5Hz, 2,0 Hz, Ar, H2', H6'); 7,98 (2H, m, J~6,5Hz, 1,8Hz, Ar H3', H4', H5').
- RMN ^{13}C (MeOD, 100MHz) : δ (ppm) 56,87; 91,85; 105,55; 106,72; 127,32 (2); 130,09 (2); 131,47; 132,54; 132,88; 147,05; 151,97; 155,90; 165,73; 184,23.
- X-Ray (Page 67) :
- Antioxydant :

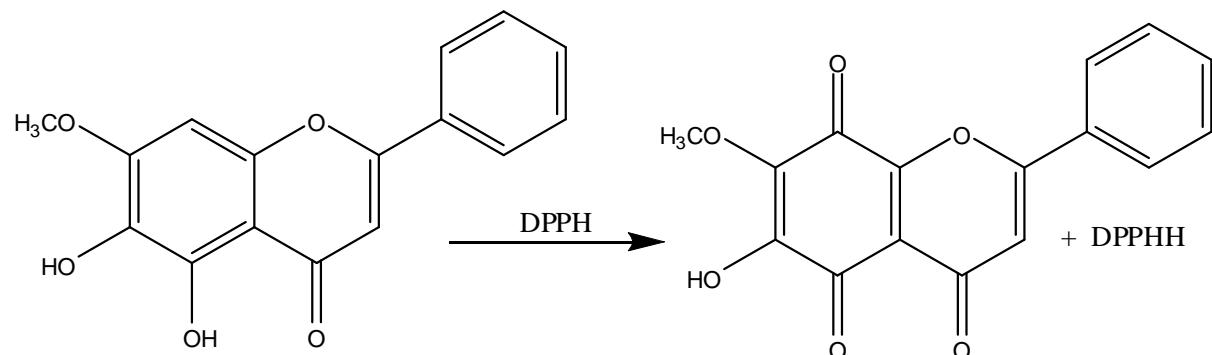


Schéma 4 : Action du DPPH sur le Negletein

CONCLUSION

Ce travail est une contribution à l'étude chimique d'une plante médicinale endémique de Madagascar, *Monanthotaxis pilosa* Baillon de la famille Annonaceae appelé couramment «Fotsiavadika» utilisée par la population Malgache du Nord, en médecine traditionnelle pour guérir de nombreuses maladies telles que la fièvre avec des symptômes grippaux et des signes neurologiques, et la maladie liée au problème du foie "Ambo".

Ce travail apporte la première étude phytochimique des plantes du genre *Monanthotaxis* sur les 18 espèces endémiques qui existent à Madagascar.

Le criblage phytochimique a permis de déceler les différentes familles chimiques contenues dans la plante : forte présence des flavonoïdes, polyphénols, anthraquinones et tanins. Les alcaloïdes, stéroïdes, triterpènes, polysaccharides, saponines et sucres réducteurs sont absents.

L'extrait hydroalcoolique procède une activité antibactérienne vis-à-vis les souches *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus faecalis*.

Les extraits hexanique, acétate d'éthyle, dichlorométhanique et butanolique des feuilles de la plante présentent une activité antioxydante sur le réactif de DPPH.

Le fractionnement de l'extrait au dichlorométhane nous a conduit à l'isolement de cinq produits purs F_2 , A, F_4 observés sous la lumière ultraviolette et F_1 , F_3 , non observable en lumière ultraviolette, alors il nous a fallu une révélation par l'acide sulfurique. Les produits F_1 et F_3 ont donné de taches mauves.

Les produits A et F_4 montrent une activité antioxydante.

La structure du produit A a été déterminé par les différentes techniques de spectroscopie RMN (^1H , ^{13}C et DEPT 135%), test clinique, simulation sur ordinateur, X-Ray expérience. Son point de fusion au banc kofler est de 232°C. Ainsi le composé A est un flavonoïde qui est le Negletein.

Les études antérieures effectuées sur le Negletein ont montré que le produit est antibactérien vis-à-vis les souches *Helicobacter pylori* [62, 63].

L'étude structurale des autres produits isolés sera envisagée ultérieurement.

A notre avis, cette plante a un avenir très prometteur, compte tenu des bons résultats des tests biologiques préliminaires. L'isolement des composés sur les autres extraits et la détermination complète de leurs structures feront l'objet de notre futur investigation.

Références

1. Schatz G.E., 2001,
Flore générique des Arbres de Madagascar,
Royal Botanical Gardens, Kew & Missouri Botanical Garden, pp 4-7; 118-123.
2. Diallo A., 2005,
Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Szygium Guineense* Willd,
Thèse de Doctorat de pharmacie, Bamako, Mali.
3. Kessler P.J.A., 1993,
The Families and Genera of Vascular Plants,
Flowering Plants – Dicotyledons Springer-Verlag.
4. Hutchinson J., 1964,
The genera of flowering plants (Angiospermae),
Dicotyledones, Vol.1, Oxford, Clarendon Press.
5. Bridg H., 2001,
Micropropagation et détermination de la stabilité in vitro d'*Annona cherimola* Moulin. et *Annona muricata* L. (HTML),
Der de Zertifizierter Dokumentenserver Zu Berlin de Humboldt-Universität.
6. Chatrou Dr. L.W., 2005,
Systématique moléculaire d'Annonaceae,
Projets de recherche d'Annonaceae. Herbier Nederland de National.
7. Cavaco A. et Keraudren M., 1958,
Flore de Madagascar et des Comores -78^{ème} famille,
Annonacées pp 72-96.
8. Watson, L., and Dallwitz, M.J., 1992,
The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification and information retrieval,
Version: 29th July 2006.
9. Chapelier L. A., 2005,
Syntype of *pilosa* Baill. [family ANNONACEAE], Muséum National d'Histoire Naturelle (P).

10. Krisana P., Peter G. W., 1978,
Novel flavonoids from the stem of *Popowia cauliflora*,
Phytochemistry, volume 17(8), pp 1363-1367.
11. Lip Y. C., Wei K. S., Mohd R. M., Swee H. G., Zamrie I. 2009,
5-Hydroxytryptamine_{1A} receptor binding activity of
bisbenzyltetrahydroisoquinoline alkaloids from *Popowia odoardi*,
Pharmaceutical Biology, Vol. 47(12), pp 1130-1136.
12. Jossang A., Leboeuf M., Cavé A., Sévenet T., 1986,
Alcaloïdes des Annonacées, 65. Alcaloïdes de *Popowia pisocarpa*, Première
Partie: Nouvelles Bisbenzylisoquinoléines,
J. Nat. Prod., 49 (6), pp 1018–1027
13. Jossang A., Leboeuf M., Cavé A., Sévenet T., 1986,
Alcaloïdes des Annonacées, 66: Alcaloïdes de *Popowia pisocarpa*, Deuxième
Partie: Nouveaux Bisaporphinoïdes,
J. Nat. Prod., 1986, 49 (6), pp 1028–1035
14. Mevy J. P., Bessiere J. M., Pelissier Y., Masotti V., Ruzzier M., Rabier J.,
Viano J., 2004,
Composition of the volatile constituents of the aerial parts of an endemic plant
of Ivory Coast, *Monanthotaxis capea* (E.G. & A. Camus) Verdc,
Flavour and fragrance journal vol. 19(6) p119.
15. Bruneton J., 1993,
Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales,
2^{ème} édition, Techniques & documentation Lavoisier, Paris, Londres New York
pp 264-307.
16. Harborne J. B., 1988,
The flavonoids : Advances in research since 1980,
Chapman & Hall. London.
17. Heller W., Forkmann G., 1993,
Biosynthesis of Flavonoids. In The Flavonoids: Advance in research since
1986.
(Harborne J. B. Éd), Chapman & Hall. London p 499.

18. Sannomiya M., Montoro P., Piacente S., Pizza C., Brito A., Vilegas W., 2005, Application of liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from in fusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu,
Rapid communications in Mass spectrometry 19(16) p 2244.
19. Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A. A., Capasso F., 1999,
Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs,
Life Sciences 65(4), pp 337-353.
20. Yadava, R. N., Saurabh K., 1998,
A new flavone glucoside: 5,7,4'-trihydroxy-6,3'-dimethoxyflavone 5-O- α -L-rhamnopyranoside from the leaves of *Tridax procumbens* Linn.
Natural Products Laboratory, Department of Chemistry, Dr. H. S. Gour University, Sagar, India. Journal of Asian Natural Products Research, 1(2), pp 147-152.
21. Diwan, P. V., Tillo, L. D., Kulkarni, D.R., 1983,
Steroid depressed wound healing and *Tridax procumbens*,
Journal of Physiology and Pharmacology, 27(1), pp 32-36.
22. Ali, M., Ravinder., E., Ramachandram, R., 2001,
A new flavonoid from the aerial parts of *Tridax procumbens*,
Fitoterapia, 72(3), pp 313-315.
23. Akbar E., Malik A. Afza N. Hai A., 2002,
Flavone glucosides and bergenin derivation from *Tridax procumbens*,
Heterocycles, 57(4), pp 733-739.
24. Ravikumar V., Shivashangari K. S., Devaki T., 2005,
Effect of *Tridax procumbens* on liver antioxidant defense system during lipopolysaccharide-induced hepatitis in D-galactosamine sensitized rats,
Molecular and cellular Biochemistry, 269(1), pp 131-136.
25. Gerschman R., 1954,
Oxygen Poisoning and X-irradiation: a mechanism in common,
in science 119, pp 623-626.

26. Mc. CORD J.M., FRIDOVICH I., 1981,
Superoxide dismutase,
Department of College of Medicine. University of South Alabama.
27. Pauling L., 1971,
Vitamin C and the Common Cold,
Research Notebooks, Book 33-p 20.
28. Barbier S., 2001,
Les vitamines antioxydantes cherchent leur place,
Communication du Dr HERCBERG S., Paris.
29. Pincemail J., 1998,
La vitamine E, Antioxydants et prevention des maladies cardiovasculaires,
2^{ème} partie, Medisphere prevention, Liège.
30. Orhan I., 2003,
Alpha-onocerin an acetylcholinesterase inhibitorfrom *Lycopodium clavatum*,
Planta Med.2003 Mar.;69(3), pp 265-7.
31. KIM (D.6O), 2002,
Measuring total phenolic concentration by VCEAC,
J. Agric. Food Chem., 50(13) pp 3713-3717
32. Coulomb P., 1993,
Asthme following occupational exposure to *Lycopodium clavatum* in condom
manufacturers,
Medline Thorax 1993 Jul., 48(7), pp774-775.
33. Waridel P., 2003,
Investigation phytochimique des plantes aquatiques *Potamogeton pectinatus*
L., *P. lucens L.*, *P.perfoliatus L.*, et *P. crispus L.* (Potamogetonaceae),
Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne
34. www.synergiashop.com/a44/anti-oxydants/ (2009).
35. Microsoft Encarta, 2008.
36. Larpent P. J., 1997,
Microbiologie Alimentaire Technique de laboratoire Lavoisier Technique &
Documentation,
Lavoisier, Paris.

37. Ibrahim S. A., 2005,
Etude chimique et Biologique des Feuilles de *Phyllarthron madagascariensis*
(Binoniceae),
Mémoire de DEA de Biochimie, Option «Biochimie Appliquée aux Sciences
Médicales», Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.
38. <http://www.world-medical-clinic.com/nmc/biologie/articles.htm>, 2010.
39. pedagogie.acontpellier.fr:8080/disciplines/scphysiques/academie/ABCDORGA/FAMIL
LE/RMN.html, 2009.
40. Hull A. W., Am. Chem. J., 1919,
A New Method of Chemical Analysis,
Soc. 41, pp1168–1195
41. Cullity B. D., 1956
Elements of X-ray Diffraction,
éd. Addison-Wesley, p 379
42. Jenkins R., Snyder R. L., 1996,
Introduction to X-ray Powder Diffraction,
éd. Wiley Interscience, p335
43. Caussin P., Nusinovici J., Beard D. W., 1988,
Using digitized X-ray powder diffraction scans as input for a new PC-AT
Search/match program,
Adv. X-Ray Anal(31), pp 423–430,
44. Jenkins R., Snyder, R. L., 1996,
Introduction to X-ray Powder Diffraction,
éd. Wiley Interscience, p349-350
45. Morrison G. H., Freiser H., 1957,
Solvent extraction in analytical chemistry,
p 157.
46. Courvalin P., 2006, Antibiogramme
47. Hamon M., Pellerin F., Guernet M., Mahuzier G., 1990,
Chimie analytique, Tome 3, "Méthodes spectrales et analyse organique",
2è Edition, pp 152-189 ; pp 198-228.

48. Waldi D., Schanckerz K., Munter F., 1961,
Chromatographie,
pp 6-61.
49. Mahuzier G., Hamon M., 1990,
Abrégé de Chimie Analytique: Méthode de séparation,
Tome 2, Masson, Paris, Milan, Barcelone, Mexico, p 73, p 105.
50. Berthiller A., 1973,
La chromatographie et ses applications,
Dunod, pp 160-172.
51. Randerath K., 1964,
La chromatographie sur couche mince,
Edition Gauthier-Villier, Paris.
52. Stahl E., Jork H., 1965,
Thin layer chromatography,
pp 186-205, pp 485-502.
53. Ollado G., Macias F .A., Massanet G.M., Liuis R. F.,1985,
flavonoids from centaurea clementei,
Journal of Natura Products Val. 48, No. 5 , pp. 81 9-822,
54. Fischer N.H., Olivier E.J., FischerH.D., 1979,
ProgresJ in the Chemistry of Organic,
Natural Products. Berlin, Springer-Verlag, pp. 130-131, 201,315.
55. Polunin0., Senythies B.E., 1977,
Guia dp campo de las pweS de Espah, Barcelona,
Editorial Omega S.A., p. 393.
56. Godez A.G., Bermejo J., Massanet G.M., Redondo J., 1974,
unpublished results,
in J. Redondo Thesis, Univenidadde la Laguna, Tenerife, Spain.
57. Massanet G.M., Collado I.G., Macias F.A., Bohlman F., Jakupovic J., 1983,
Tetrahedron Ltt., 24, 1641.
58. CrysAlisPro v171.34.40, 2010,
Oxford Diffraction: Wroclaw, Poland.

59. Sheldrick G. M., 2008,
A short history of SHELX,
Acta Cryst., A64, 112-122.
60. Sheldrick G. M., 2008,
A short history of SHELX,
Acta Cryst., A64, 112-122.
61. Dolomanov O.V., Bourhis, L. J., Gildea, R. J., Howard, J. A. K., Puschmann, H., 2009,
J. Appl. Cryst.,
42, 339–341.
62. Takahiko I., Matsumi D., Yoshiki M., Kumiko N., Ayumi O., 2006,
The Anti-*Helicobacter pylori* Flavones in a Brazilian Plant, *Hyptis fasciculata*,
and the Activity of Methoxyflavones
Biol. Pharm. Bull. 29(5) 1039—1041
63. Isobe T., Noda Y., Kubota T., 1985,
Nippon Kagaku Kaishi,
1513-1515.

ANNEXES

Annexes 1

I. Préparation des réactifs

1. Réactif de Dragendorff

Solution A

1.7g de sous nitrate de bismuth 20g d'acide tartrique sont dissous dans 30ml d'eau distillée.

Ou

0,2gde sous nitrate de bismuth sont dissous dans 10ml d'acide acétique concentré et 20ml d'eau distillée.

Solution B

16g d'iodure de potassium sont dissous dans 40ml d'eau distillée.

Révélation

Au moment de l'emploi, 2,5ml de la solution A et 2,5ml de la solution B sont mélangées puis une solution 10% d'acide tartrique y est ajoutée.

2. Réactif de Wagner

2g d'iodure de potassium et 1.27g d'iode sont introduit dans un erlenmeyer de 250ml puis dissoudre avec 100ml d'eau distillée tout en agitant jusqu'à la dissolution complète.

3. Réactif de Mayer

1.35g de chlorure mercurique (II) sont dissous dans 94ml d'eau distillée dans un erlenmeyer de 100ml puis à la solution aqueuse sont ajoutés 5g d'iodure de potassium tout en agitant jusqu'à la dissolution complète. Le volume du mélange est ramené à 100ml avec de l'eau distillée.

4. Solution de gélatine 1%

1g de gélatine est mis en suspension dans 100ml d'eau distillée

5. Solution de chlorure de sodium à 10%

10g de chlorure de sodium sont dissous dans 100ml d'eau distillée.

6. Solution Gélatine salée

On mélange un volume de la solution de la gélatine à un volume égal de la solution de chlorure de sodium à 10%.

7. Solution acide chlorhydrique à 5%

95ml d'eau distillée sont versés dans une éprouvette graduée puis complétés à 100ml avec de l'acide chlorhydrique concentré.

8. Solution méthanolique de chlorure de ferrique (III) à 10%

1g de chlorure de ferrique (III) sont dissous dans 10ml de méthanol tout en agitant et chauffant au bain marie jusqu'à dissolution complète.

9. Réactif de Kedde

Solution A

2g d'acide 3,5-dinitrobenzoïque sont dissous dans 100ml de méthanol.

Solution B

5,6g d'hydroxyde de potassium sont dissous dans 100ml d'eau distillée.

Pulvérisation

Au moment de l'emploi, on mélange à volume égaux la solution d'acide et de potasse.

10. Réactifs de Keller-Killiani

10g de chlorure de ferrique (III) sont dissous dans 100ml d'eau distillée. Au moment de l'emploi, 3ml de la solution aqueuse de chlorure de ferrique (III) sont mélangés à 50ml d'acide acétique glacial.

11. Préparation de la solution de picrate de sodium

5g de carbonate de sodium et 0,5g d'acide picrique sont dissous dans 100ml d'eau distillée.

12. Préparation de la vanilline sulfurique

Solution A

3ml d'acide sulfurique concentré sont mélangés et agités avec 50ml d'éthanol dans un erlenmeyer.

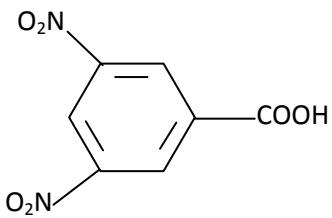
Solution B

3g de vanilline sont dissous dans 50ml d'éthanol dans un erlenmeyer.

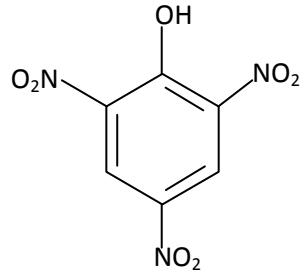
Pulvérisation

Au moment de l'emploi, on mélange à volume égaux les deux solutions et cette solution doit être conservée au réfrigérateur.

II. Formules chimiques



Acide 3,5-dinitrobenzoïque



acide picrique : 2,4,6-trinitrophénol

Annexes 2

Screening phytochimique

1) Préparation des extraits bruts pour le criblage phytochimique

- 1- Placer 50g de plante sèche, broyée dans un ballon de 500mL.
- 2- Additionner 200mL d'éthanol 80%.
- 3- Porter le ballon dans un bain marie bouillant pendant une heure.
- 4- Refroidir le contenu du ballon avec 50mL d'éthanol 80% et réunir les solutions alcooliques.

2) Criblage des alcaloïdes

Macérer 5g de plante sèche et broyée dans 50mL d'acide chlorhydrique 12% pendant 15mn.

Filtrer sur coton.

Répartir le filtrat dans 4 tubes à essais.

Tube n°1 : témoin

Tube n°2 : addition de 5 gouttes de réactif de Wagner

Tube n°3 : addition de 5 gouttes de réactif de Maye r

Tube n°3 : addition de 5 gouttes de réactif de Dragendorff

3) Criblage des flavonoïdes et leucoanthocyanes

Evaporer une solution alcoolique équivalente à 3g de drogue végétale dans un cristallisoir sur bain marie.

Refroidir à température ambiante.

Traiter avec 5ml de cyclohexane. Filtrer. Répéter l'opération jusqu'à élimination des pigments.

Dissoudre le résidu avec 30mL d'éthanol 80% puis filtrer.

Placer 3mL du filtrat respectivement dans 4 tubes à essais.

Tube n°1 : témoin

Tube n°2 : additionner quelques gouttes de NH₄OH et observer la coloration.

- Test de Wilstater

Dans le tube n°3, additionner 0,5mL de HCl concentré, puis 3 ou 4 tournures de magnésium. Observer le changement de coloration après 10mn.

- Test de Bate Smith

Dans le tube n°4, additionner 0,5mL de HCl concentré et porter au bain marie pendant 30mn. Laisser refroidir. Noter la coloration.

4) Criblage des stéroïdes et triterpènes

Evaporer complètement la solution hydroalcoolique équivalente à 10g de drogue dans un cristallisoir, en utilisant un bain marie 60°C. Laisser refroidir.

Additionner 10mL d'éther de pétrole, agiter 5mn et décanter le surnageant. Répéter l'opération jusqu'à élimination des pigments.

Additionner 10mL de chloroforme et agiter pendant 5 à 10mn.

Décanter et sécher la solution avec Na₂SO₄ anhydre. Filtrer et recueillir le filtrat dans un tube à essai propre.

Diviser la solution dans 4 tubes à essais.

Tube n°1 : témoin

Tube n°2 : additionner 1 à 2ml de MeOH + 3gouttes de KOH 1N + quelques grains d'acide

- Test de Baljet, Kedde

Tube n°3 : additionner 1ml de KOH + 3gouttes d'acide 3,5-dinitrobenzoïque

- Test de Liebermann-Burchard

Dans le tube n°4, additionner 3 gouttes d'anhydride acétique.

Agiter légèrement et ajouter une goutte de H₂SO₄ concentré.

Observer le changement de coloration immédiatement et après une heure.

5) Criblage des saponines

Test de mousse

Mettre 1g de drogue dans un tube à essais.

Additionner 10mL d'eau distillée et agiter vigoureusement pendant 30 secondes.

Placer le tube verticalement pendant 30mn.

Si la mousse mesure 30cm après 30mn, la drogue contient des saponines.

6) Criblage des tanins et des polyphénols

Evaporer une solution alcoolique équivalente à 10g de drogue dans un cristallisoir sur bain marie.

Dissoudre l'extrait hydroalcoolique avec 30ml d'eau chaude puis ajouter quelques gouttes de solution NaCl 10%. Filtrer. Répartir le filtrat dans trois 3 tubes à essais.

Tube n°1 : témoin

Tube n°2 : additionner quelques gouttes de gélatine et de NaCl 10%, et observer la précipitation.

Tube n°3 : additionner quelques gouttes de gélatine , de NaCl 10% et FeCl₃ dans MeOH, et observer la coloration.

Auteur	MOHAMED Ibrahim
Adresse	Faculté des Sciences. Département de Chimie. Université Nord Antsiranana,
E-mail	mohamedibrahimallaoui@yahoo.com
Téléphone	0326954557 0343171182
Titre	Contribution à l'étude chimique et biologique des feuilles de <i>Monanthotaxis pilosa</i> Baillon (Annonaceae).

Nombre de pages : 79
 Nombre de figures : 19
 Nombre de schémas : 5
 Nombre de tableaux : 28
 Références : 63
 Nombre d'annexes : 2

Résumé

Le criblage phytochimique effectué sur l'extrait hydroalcoolique de la poudre de feuilles de *Monanthotaxis pilosa* Baillon a permis de mettre en évidence la présence des flavonoïdes, polyphénols, anthraquinones et tanins et l'absence des alcaloïdes, stéroïdes, triterpènes, polysaccharides, saponines et sucres réducteurs.

L'extraction par partage de l'extrait hydroalcoolique évaporé à siccité, repris par l'eau chaude, successivement par l'hexane, le dichlométhane, l'acétate d'éthyle et le n-butanolique puis testé, a montré :

- l'extrait hydroalcoolique est actif sur les souches *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus faecalis*.
- Le test antioxydant des extraits hexanique, dichlométhane, acétate d'éthyle et butanolique a été positif sur le DPPH.

Le fractionnement de l'extrait au dichlorométhane sur une colonne de silice avec gradient d'élution par hexane-acétate d'éthyle contrôlé sur CCM, a permis d'isoler le produit A à partir du mélange hexane / AcOEt [85/15, v/v]

L'analyse du produit A par les différents techniques de spectroscopie RMN (^1H , ^{13}C et DEPT 135°) et DRX a permis de déterminer sa structure. Il s'agit de 5,6-dihydroxy-7-méthoxyflavone. C'est aussi un antioxydant.

Mots-clés Annonaceae, *Monanthotaxis pilosa* Baillon, RMN, DRX, Negletein, antibactérien, antioxydant.

Abstract

The phytochemical screening has been realized on the hydroalcoholic extract of the powder of the leaves of *Monanthotaxis pilosa* Baillon and the presence of flavonoids polyphenols, anthraquinons, tanins is noted. Alkaloids, steroids, triterpenoids, saponins and sugars are absents.

An extraction by partition was also realized from this hydroalcoholic extract successively with hexane, dichloromethane, ethyl-acetate finally butanol, the hydroalcoholic extract is tested on *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*. It showed a positive activity. All extracts presented an antioxidant activity on the DPPH.

The fractionation realized on CH_2Cl_2 with mix of hexane-ethyle acetate has given a product A which is 5,7-dihydroxy-6-méthoxyflavone.

The hydroalcoholic extract is sensitive to the *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis* stumps. The antioxidant test of the hexanic, dichlomethane, ethyl-acetate and butanolic extracts has been positive on the DPPH. The analysis of product A by different techniques of NMR (^1H , ^{13}C and DEPT 135°) spectroscopy and XRD has given the structure of 5,6-dihydroxy-7-methoxyflavone for A. It is too an antioxidant.

Key words: Annonaceae, *Monanthotaxis pilosa* Baillon, NMR, X-ray, Negletein, antibacterial, antioxidant.

Directeur de mémoire : Léa Herilala RASOANAIVO

Maître de Conférences

Laboratoire de Chimie du Substances Naturelles et Chimie Organique Biologique Ankafotsy. Faculté des Sciences.

Département de Chimie Organique. Université d'Antananarivo.

Téléphone : 0324022036

E-mail : learasoa3@yahoo.fr