

LISTE DES ABREVIATIONS

| | | |
|--------------------------------|---|--|
| % | : | Pourcentage |
| % I | : | Pourcentage d’Inhibition |
| ° | : | Degré |
| ≤ | : | Inférieur ou égale |
| ¹³ C | : | Carbone treize |
| 1D | : | Monodimensionnelle |
| 2D | : | Bidimensionnelle |
| 1H | : | Proton |
| AcOet | : | Acétate d’éthyle |
| APT | : | Attached Proton Test |
| CC | : | Chromatographie sur Colonne |
| CCM | : | Chromatographie sur Couche Mince |
| CNARP | : | Centre Nationale d’Application des Recherches Pharmaceutique |
| Cq | : | Carbone quaternaire |
| cm | : | Centimètre |
| <i>D</i> | : | <i>Diodella</i> |
| DCM | : | Dichlorométhane |
| ESM | : | Ecart type moyenne standard |
| EtOH | : | Ethanol |
| FeCl ₃ | : | Chlorure de fer |
| g | : | Gramme |
| H | : | Helicobacter |
| H ₂ O | : | Eau distillée |
| H ₂ SO ₄ | : | Acide sulfurique |
| HCl | : | Acide chlorhydrique |
| Hex | : | Hexane |
| h | : | Heure |
| IMVAVET | : | Institut Malgache de Vaccin VÉTérinaire |
| IU | : | Index d’ulcère ou Indice d’ulcère |
| MeOH | : | Méthanol |
| MeOD | : | Méthanol Deuterié |
| MO | : | Moyenne |
| m | : | Masse |

| | | |
|------------|---|--------------------------------|
| m_i | : | Masse initiale |
| m_n | : | Minute |
| m_o | : | Masse obtenue |
| mg | : | Milligramme |
| ml | : | Millilitre |
| N | : | Normalité |
| n° | : | Numéro |
| NaCl | : | Chlorure de sodium |
| Na_2SO_4 | : | Sulfate de Sodium |
| Nbre | : | Nombre |
| NH_4OH | : | Ammoniaque |
| nm | : | Nanomètre |
| P | : | Probabilité |
| PUD | : | Peptic Ulcer Disease |
| ppm | : | Partie par million |
| r | : | Rendement |
| R_f | : | Rapport frontal |
| RMN | : | Résonance Magnétique Nucléaire |
| Si | : | Silice |
| SM | : | Spectrométrie de Masse |
| T | : | Temps |
| UV | : | Ultraviolet |
| V | : | Volume |
| V_{EtOH} | : | Volume d'alcool |
| V_o | : | Volume de la solution obtenue |
| δ | : | Déplacement chimique |
| λ | : | Longueur d'onde |

LISTE DES DIAGRAMMES

| | |
|--|----|
| Diagramme 1 : Extraction liquide-liquide par polarité de solvant décroissant | 24 |
| Diagramme 2 : Résultats de l'extraction liquide-liquide | 35 |
| Diagramme 3 : Résultat du fractionnement de l'extrait n°3..... | 38 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 : <i>Diodella sarmentosa</i> . A: branche. B: stipule. C: fleur. D: corolle encastrée. E: style. F: fruit. G: graines, visage | 9 |
| Figure 2 : Limonène (citron, pin, menthe) | 10 |
| Figure 3 : Menthol (menthe) | 10 |
| Figure 4 : Camphre..... | 10 |
| Figure 5 : Labdane..... | 11 |
| Figure 6 : Principaux classes des triterpènes..... | 12 |
| Figure 7 : Stéroïdes | 13 |
| Figure 8 : <i>Diodella sarmentosa</i> de Ranomafana Fianarantsoa | 19 |
| Figure 9 : Chromatographie sur couche mince | 25 |
| Figure 10 : Chromatographie sur colonne..... | 27 |
| Figure 11 : Profil chromatographique des extraits hexanique et acétate d'éthyle | 36 |
| Figure 12 : CCM de l'extrait acétate d'éthyle. | 36 |
| Figure 13 : Produit MC2.3.1 | 38 |
| Figure 14 : Chromatographie sur couche mince du produit MC2.3.1..... | 39 |
| Figure 15 : Spectre RMN ¹ H du produit MC.2.3.1 | 40 |
| Figure 16 : Spectre RMN 1H avec les sept (7) méthyles identifiés. | 41 |
| Figure 17 : Squelette de base des triterpènes : squelette A: tetracyclique et squelette B: pentacyclique..... | 42 |
| Figure 18 : Structures correspondantes au spectre RMN ¹ H du produit MC2.3.1 | 43 |
| Figure 19 : Spectre RMN ¹³ C APT J modulé..... | 43 |
| Figure 20 : Spectre RMN APT modulé avec les valeurs de déplacements chimiques des méthyles. | 45 |
| Figure 21 : Quelques structures obtenues des deux spectres. | 45 |
| Figure 22 : Structures correspondant à chaque littérature P1, P2, P3 | 47 |
| Figure 23 : Produit MC2.3.1 : Dammar-24-èn-3,14β-diol..... | 48 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau I : Etude chimique de <i>Diodia teres</i> | 5 |
| Tableau II : Etude biologique du genre <i>Diodia</i> | 7 |
| Tableau III : Résumé de l'extraction liquide-solide : les macérations..... | 23 |
| Tableau IV : Résultats attendus des méthodes d'analyse des spectres RMN | 28 |
| Tableau V : Réactifs pour la préparation de l'agent ulcérogène..... | 28 |
| Tableau VI : Criblage phytochimique..... | 33 |
| Tableau VII : Résultat de l'extraction solide-liquide..... | 34 |
| Tableau VIII : Résultat de l'extraction liquide-liquide..... | 35 |
| Tableau IX : Résultat de la chromatographie sur couche mince de l'extrait acétate d'éthyle | 37 |
| Tableau X : Résultat du fractionnement..... | 37 |
| Tableau XI : Résumé de l'interprétation du spectre RMN-1H | 41 |
| Tableau XII : Valeurs de déplacements chimiques présents dans le spectre RMN ¹³ C APT (J mod) | 44 |
| Tableau XIII : Comparaison des déplacements chimiques du produit MC3.2.1 et celui des littératures..... | 46 |
| Tableau XIV : Résultat du test préliminaire sur les rats: | 48 |
| Tableau XV : Résultat du test préliminaire pour les souris..... | 49 |
| Tableau XVI : Résultats de l'activité gastro-protectrice de l'extrait de <i>D sarmentosa</i> | 49 |
| Tableau XVII : Résultat du test curatif des ulcérations gastriques | 50 |

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|----|
| INTRODUCTION..... | 1 |
| Partie I : | 3 |
| Généralités..... | 3 |
| I. Généralités sur la plante | 4 |
| I.1. Famille RUBIACEAE | 4 |
| I.2. Genre <i>Diodia</i> | 4 |
| I.2.1. Etude antérieure du genre <i>Diodia</i> actuellement connu sous le nom de <i>Diodella</i> : genre <i>Diodella</i> | 4 |
| I.2.2. Étude chimique sur l'espèce <i>D.teres</i> | 4 |
| I.2.3. Etudes biologiques : | 6 |
| I.3. Taxonomie | 8 |
| I.4. Ethnobotanique de la plante..... | 9 |
| II. Généralités sur les terpènes | 9 |
| II.1. Les monoterpènes | 10 |
| II.2. Les sesquiterpènes | 10 |
| II.3. Les diterpènes | 10 |
| II.4. Les triterpènes | 11 |
| Les stéroïdes..... | 13 |
| II.5. Les tetraterpènes | 14 |
| III. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) | 14 |
| III.1. Définition | 14 |
| III.2. Spectres RMN 1D (monodimensionnels) | 14 |
| III.3. Spectres RMN 2D (bidimensionnels) | 15 |
| IV. Activité biologique | 16 |
| Partie II : Matériels et méthodes | 18 |
| I. Matériel végétal..... | 19 |
| II. Criblage phytochimique | 19 |

| | | |
|--|--|----|
| II.1. | Criblage des alcaloïdes | 19 |
| II.2. | Criblage des flavonoïdes et Leucoanthocyanes | 20 |
| II.3. | Criblage des tanins et polyphénols | 20 |
| II.4. | Criblage des stéroïdes et terpenoïdes | 21 |
| II.5. | Criblage des saponines..... | 22 |
| II.6. | Criblage des polysaccharides | 22 |
| III. | Extractions | 22 |
| III.1. | L'extraction solide-liquide | 22 |
| III.2. | L'extraction liquide-liquide..... | 23 |
| IV. | Fractionnement - Isolement - purification | 24 |
| IV.1. | La chromatographie sur couche mince..... | 24 |
| IV.2. | La chromatographie sur colonne | 26 |
| VI. | Test biologique : <i>in vivo</i> | 28 |
| VI.1. | Matériel animal | 28 |
| VI.2. | Préparation de l'agent ulcérogène | 28 |
| VI.3. | Protocole expérimental..... | 29 |
| VI.3.1. | Test préliminaire | 29 |
| VI.3.2. | Etude de l'activité gastro-protectrice de l'extrait de <i>D sarmentosa</i> | 30 |
| VI.3.3. | Etude de l'activité curative des ulcérations gastriques par l'extrait de <i>D sarmentosa</i> | 31 |
| VII. | Evaluation de l'index d'ulcération | 31 |
| Partie III : Résultats et Discussions..... | | 32 |
| I. | Résultat des criblages phytochimiques | 33 |
| II. | Résultats des extractions : extraction solide-liquide et extraction liquide-liquide..... | 34 |
| II.1. | Résultat de l'extraction solide-liquide | 34 |
| II.2. | Résultat de l'extraction liquide-liquide..... | 34 |
| II.2.1. | Résultat de la CCM de la fraction acétate d'éthyle | 36 |
| II.2.2. | Résultat du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle | 37 |

| | |
|--|------|
| II.2.3. Résultats de la deuxième colonne : extrait n°3 noté E ₃ | 38 |
| III. Résultat des analyses spectrales | 39 |
| III.1. Analyse du spectre RMN ¹ H monodimensionnel de MC2.3.1 | 40 |
| III.2. Analyse du spectre RMN ¹³ C monodimensionnelles | 43 |
| IV. Résultat du test anti ulcéreux | 48 |
| IV.1. Résultats des essais préliminaires | 48 |
| IV.2. Résultat de l'activité gastro-protectrice de l'extrait de <i>D sarmentosa</i> | 49 |
| IV.3. Etude de l'activité curative des ulcérations gastriques par l'extrait de <i>D sarmentosa</i> | 50 |
| Conclusion et perspective | 51 |
| Bibliographie | VIII |
| Annexe I : | XII |
| V. Préparations de réactif de criblage Phytochimique | XII |
| VI. Préparation de la vanilline sulfurique | XIII |
| Annexe II : | XIV |
| VII. Matériels utilisés lors du test biologiques : | XIV |
| VIII. Préparation de l'agent ulcérogène | XIV |

INTRODUCTION

Depuis des milliers d'années, les hommes ont besoin des plantes dans les domaines médicinales et alimentaires.

L'utilisation des plantes se fait sur la base traditionnelle, qui se transmet de génération en génération. Des progrès ont lieu en chimie, en pharmacologie et dans tant d'autre domaine pour valoriser les produits naturels tels que les plantes.

Madagascar possède une flore originale par sa diversité et son endémicité [1] [2]. Cette richesse naturelle est en cour de disparition faute de l'insouciance et de l'ignorance de la population.

Madagascar possède un riche héritage de connaissances thérapeutiques traditionnelles. Les plantes médicinales et la médecine traditionnelle intéressent plus de 60% de la population Malgache [3]. Il est donc indispensable d'exploiter ces plantes médicinales afin de les étudier et de donner une base scientifique pour leur utilisation.

La plante biosynthétise des métabolites secondaires qui sont des molécules spécifiques, sans action pour sa croissance et sa reproduction.

Dans le cadre de la valorisation des ressources naturelles, notre intérêt s'est porté sur une plante, *Diodella sarmentosa* (RUBIACEAE), utilisée traditionnellement pour ses propriétés variées. Cette plante a comme vertu thérapeutique anti-ulcère, cicatrisant, anti-malaria et antifongique ; c'est une plante naturalisée.

Les buts de cette étude sont d'isoler et d'identifier des molécules de cette plante et de tester la plante biologiquement par la suite. Nos travaux de recherches ont été réalisés au Laboratoire de Produit Naturel et Biotechnologie (LPNB) et au Laboratoire de Chimie Organique et Spectrométrie de Masse sous la responsabilité du Docteur RALAMBOMANANA Dimby

Pour mieux suivre le contenu de ce travail, nous avons adopté le plan IMRED :

- La première partie est consacrée à l'étude botanique de *Diodella sarmentosa* et aux généralités sur les terpènes, ainsi que sur la méthode spectroscopique: résonance magnétique nucléaire (RMN).

- La seconde partie regroupe les matériels et les différentes méthodes utilisés au cours de cette étude.

- La troisième partie rapporte les résultats et discussions de nos travaux de recherche personnels notamment :

- Le criblage phytochimique ;
- L'isolement et la détermination de structure du produit ;
- Les tests biologiques.

Des références bibliographiques et des annexes terminent le manuscrit.

Partie I : Généralités

I. Généralités sur la plante

I.1. Famille RUBIACEAE

La famille RUBIACEAE est une des familles la plus abondante et qui sont très riches en espèces. Elle est extrêmement vaste, c'est une famille cosmopolite dont la plupart des espèces sont tropicales. Les arbres ou les arbrisseaux sont nombreux en régions tropicales alors que les herbacées sont plus représentées dans les zones tempérées.

La plupart du genre de cette famille présente des impacts économiques tels : *Coffea* dont certaines espèces fournissent le café, divers espèces du genre *Cinchona* fournissent de la quinine qui est utilisée comme traitement contre le malaria et *Psychotria* utilisé pour leurs propriétés vomitives [W1].

I.2. Genre *Diodia*

I.2.1. Etude antérieure du genre *Diodia* actuellement connu sous le nom de *Diodella* : genre *Diodella*

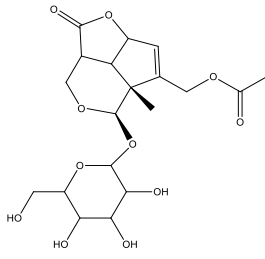
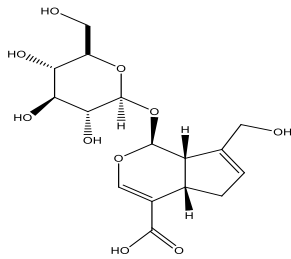
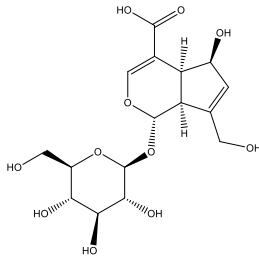
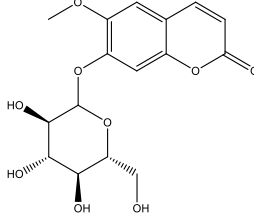
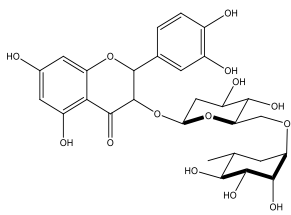
[4] [5] [6] [7] [8]

D'après une étude bibliographique, nous avons vérifié l'existence d'études chimiques et pharmacologiques sur ce genre. Les plantes du genre *Diodia* sont utilisées dans les médecines folkloriques et traditionnelles comme agents antirhumatismales, anti diarrhéiques, anti venin, laxatifs et émétiques, ainsi que dans le traitement des ulcères gastriques, de l'urticaire, des maux d'oreille, des douleurs abdominales et de la gastrite. Les études pharmacologiques de l'espèce *D. scandens* et *D. sarmentosa* ont révélé des activités anti-inflammatoires, antiulcéreuse, analgésiques et anti venin. Une étude chimique unique a été trouvée pour le genre *D. teres*, qui a indiqué la présence des iridoides glycosylés asperuloside, de l'acide désacétylasperulosidique et de l'acide geniposidique; Du scopolin de coumarine et des flavonoïdes: de la rutine, du canferol-3-O-rutinoside, de la quercitrine, de l'astragaline, de l'isoquercitrine et de la quercétine.

I.2.2. Étude chimique sur l'espèce *D.teres*

La seule étude chimique faite a été sur cette espèce *D.teres*, dont les résultats sont présentés sur le tableau I :

Tableau I : Etude chimique de *Diodia teres*

| | | Molécules/ familles chimique identifiés | | structures | Références |
|-------------------------|-------------------------|--|---------------------------------------|---|------------|
| <i>Diodia teres</i> | Extrait méthanolique | Trois iridoïdes glycosylés | asperuloside |  | [8] |
| | | | acide geniposidique |  | |
| | | | acide désacétylasperu losidique |  | |
| | | Une coumarine | scopolin |  | |
| | | Six flavonoïdes | rutine |  | |

| | | Molécules/ familles chimique identifiés | structures | Références |
|-------------------------|-------------------------|--|--------------------------------|------------|
| <i>Diodia teres</i> | Extrait méthanolique | Six flavonoïdes | kaempferol-3-O- rutinoside, | [8] |
| | | | isoquercitrin | |
| | | | quercitrin | |
| | | | astragaline | |
| | | | quercetin | |

I.2.3. Etudes biologiques :

D'après les recherches bibliographiques, on a constaté que trois espèces appartenant au genre *Diodia* ont fait l'objet d'étude pharmacologique y compris *Diodia sarmentosa*. Le tableau II illustre les activités biologiques trouvées sur ces quelques espèces du genre *Diodia*.

Tableau II : Etude biologique du genre *Diodia*

| | Propriétés | Parties utilisés | Extrait | Références |
|--------------------------|---|----------------------------|---|------------|
| <i>Diodia teres</i> | Antidiabétique | - | - | [9] |
| <i>Diodia sarmentosa</i> | antifongique | Partie aérienne | héxanique, chloroformique, acétate d'éthyle, méthanolique, aqueux | [10] |
| | Antifongique et antibactérienne | Partie aérienne | héxanique | [11] |
| | Antiulcéreuse | plante toute entière | - | [7] |
| <i>Diodia scandens</i> | Maladie d'anthraxose du niébé | feuilles | aqueux | [12] |
| | Astringents, antifongique, anti- inflammatoire, anti- venin, antidote, anti-œdème, anti-rhumatique anti-abortifacient drugs, | Feuilles et tiges | - | [13] |
| | Analgésique, anti- ulcère, anti-œdème | Partie aérienne | éther de pétrole | [14] |
| | Antimicrobienne: anti bactérienne | Plante entière | éthanolique | [15] [16] |

Description et répartition géographique du *Diodella sarmentosa sw*

Diodella sarmentosa sw appartient au genre *Diodella* qui contient 11 espèces et fait partie de la famille des Rubiacées (Rubiaceae) [17].

Elle est un adventice de zone de forestière à port rampant et ramifié. Sa tige grêle est quadrangulaire-ailée et seuls les angles sont pubescents. Le limbe oblong-lancéolé (30 à 60 mm x 10 à 25 mm) est scabre dessus et pubescent dessous. La collerette stipulaire, haute de 7 à 10 mm, est surmontée de nombreuses dents effilées mesurant de 5 à 7 mm [18]. De telle plantes vivaces peuvent atteindre une hauteur de 3 à 4 mètres.

Diodella sarmentosa présente des feuilles simples et opposées qui sont elliptiques avec un bord entier et des fleurs en forme d'entonnoir de couleur blanche. Les fleurs s'organisent seules. *D. sarmentosa* peut être confondue avec *Spermacoce latifolia*, mais cette dernière à une tige pubescente alors que seuls les angles de la tige de *D. sarmentosa* le sont.

Diodella sarmentosa sw pousse dans les régions tempérées et tropicales de l'Amérique du Nord et de l'Afrique. Elle est spécifiquement répartie dans les quatre provinces de Madagascar : Antsiranana, Toamasina, Fianarantsoa, Toliara [W2].

Position systématique

Diodella sarmentosa sw est connue sous le nom vernaculaire de « lelamenarana »

I.3. Taxonomie [W3]

Règne : Plantae

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Gentianales

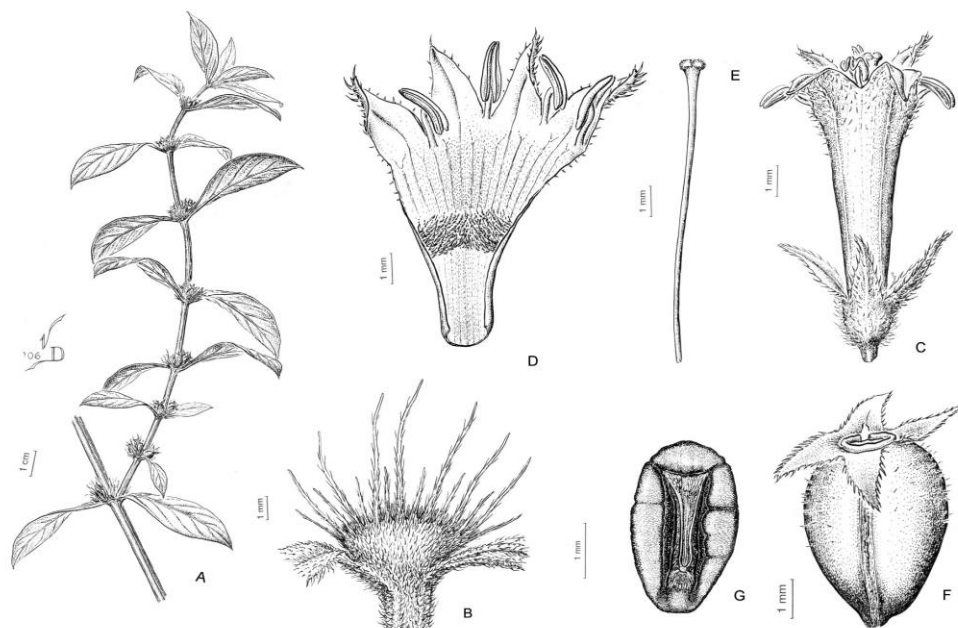
Famille : RUBIACEAE

Sous famille : Rubioideae

Tribu : Spermacoceae

Genre : *Diodella small*

Espèce : *Diodella sarmentosa (sw)*



[19]

Figure 1 : *Diodellea sarmentosa*. A: branche. B: stipule. C: fleur. D: corolle encastrée. E: style. F: fruit. G: graines, visage

I.4. Ethnobotanique de la plante

D'après le tradipraticien Malgache, les feuilles de la plante sont utilisées par sa propriété cicatrisante. Elles sont frottées afin d'obtenir son jus/latex pour les mettre comme pansement sur la plaie. Et selon la bibliographie, la plante *D.sarmentosa* mélangé avec du sel et poivre sont utilisés contre la dysenterie [20]. Elle est aussi connue en Afrique pour traiter la malaria chez les enfants [21]. En Bénin et en Gabon, la partie aérienne et les feuilles de *D.sarmentosa* sont utilisées sous forme de thé pour l'infertilité, la menstruation et la grossesse [22].

II. Généralités sur les terpènes

Les terpenoïdes constituent une classe de substances naturelles extrêmement abondante. Plus de 22 000 composés ont été répertoriés [23]. Chaque classe de terpènes est issue du couplage « tête-à-queue » d'unités isopréniques. Le nombre d'unités isopréniques engagées dans la formation d'un composé permet un classement commode de ces substances naturelles. On distingue ainsi les hémiterpènes (C5), les monoterpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20), les sesterterpènes (C25), les triterpènes (C30), les tetraterpènes (C40) et les polyterpènes (C5n).

Les terpenoïdes forment une classe importante de métabolites secondaires qui proviennent du même précurseur biosynthétique, l'acide mévalonique. La première étape de leur biosynthèse

commence toujours par condensation de deux dérivés phosphorylés de l'acide mévalonique, l'isopentényl pyrophosphate et le diméthylallyl pyrophosphate [24]. On trouve les terpènes et leurs dérivés dans tous les organes végétaux comme les fleurs, les écorces, les feuilles, les graines et les fruits. Ils ont des propriétés antioxydants [25].

II.1. Les monoterpènes

Les monoterpènes sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90%) [26]. Ils comportent deux unités isoprène : $2(C_5H_8)$, selon le mode de couplage « tête-queue ». Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales.

Exemples de quelques monoterpènes [27]

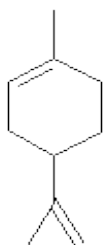


Figure 2 : Limonène
(citron, pin, menthe)

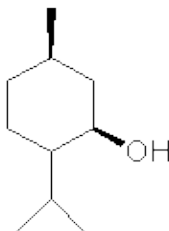


Figure 3 : Menthol
(menthe)

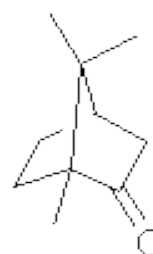


Figure 4 : Camphre

II.2. Les sesquiterpènes

Ce sont des dérivés d'hydrocarbures en $C_{15}H_{22}$ (assemblage de trois unités isoprènes). Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes qui se divisent en plusieurs catégories structurales, acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques, polycycliques. Ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature [27].

II.3. Les diterpènes

Composés terpéniques à 20 carbones. On retrouve parmi les dérivés de diterpènes la queue phytol des chlorophylles a et b et les résidus terpéniques du tocophérol (vitamine E) et de la phylloquinone (vitamine K1).

Les diterpènes représentent une large famille d'isoprénoïdes. Ils sont largement répandus et peuvent être trouvés dans les météorites, les huiles, les sédiments, ainsi que dans le milieu vivant terrestre et marin, végétal (principalement présents dans les plantes supérieures dans les résines,

ainsi que dans les champignons) et animal. Leur structure est assez variable, ils peuvent être cycliques ou non [28]. Ces molécules, qu'on retrouve aussi sous le nom de phytanes, sont composées de quatre unités d'isoprène (2-méthylbutane, C_5H_8) ce qui leur donne une formule générale $C_{20}H_{32}$. Dans la nature, ils sont souvent sous forme d'alcools ou de leurs dérivés glycosylés, d'éthers, d'aldéhydes, de cétones, d'acides carboxyliques ou d'esters. Il existe environ 2700 diterpènes dans la nature dont la majorité est sous forme cycliques. Parmi les diterpènes cycliques, le rétinol et le rétinol, deux formes de la vitamine A sont les plus connues dans cette famille [29].

Exemple de diterpènes:

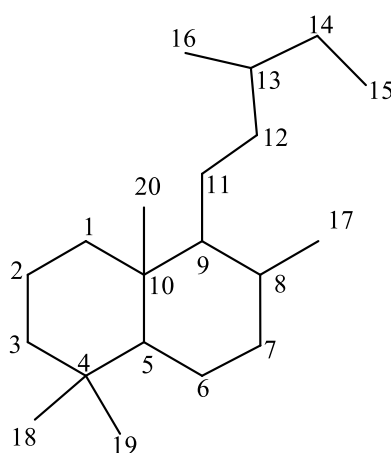


Figure 5 : Labdane

II.4. Les triterpènes [30]

Les triterpènes sont des composés en C_{30} issus de la cyclisation de l'époxysqualène ou du squalène. On distingue en fonction du nombre de cycles les monoterpènes pentacycliques, des monoterpènes stéroïdiens (tétracycliques). Les stéroïdes peuvent être considérés comme des triterpènes tétracycliques ayant perdu au moins trois méthyles, bien que les composés stéroïdiens soient largement représentés dans le monde animal, de nombreux phytostérols sont spécifiques des végétaux. Ce sont des métabolites secondaires dont l'intérêt thérapeutique et l'emploi industriel est majeur. On peut en particulier noter l'intérêt des hétérosides cardiotoniques ou des sapogénines spirostaniques qui constituent les squelettes de base des contraceptifs, des anabolisants et des anti-inflammatoires. Mais il faut aussi souligner les problèmes liés aux saponosides, autres triterpènes, qui peuvent diminuer la valeur nutritive des fourrages ou expliquer la toxicité de certaines plantes. Selon la nature du noyau des triterpènes, ces métabolites

sont regroupés en triterpènes tétracycliques (Dammaranes, Cucurbitanes, Lanostanes) et pentacycliques (Lupanes, Ursanes, Oléananes et Friedelanes) (figure 6)

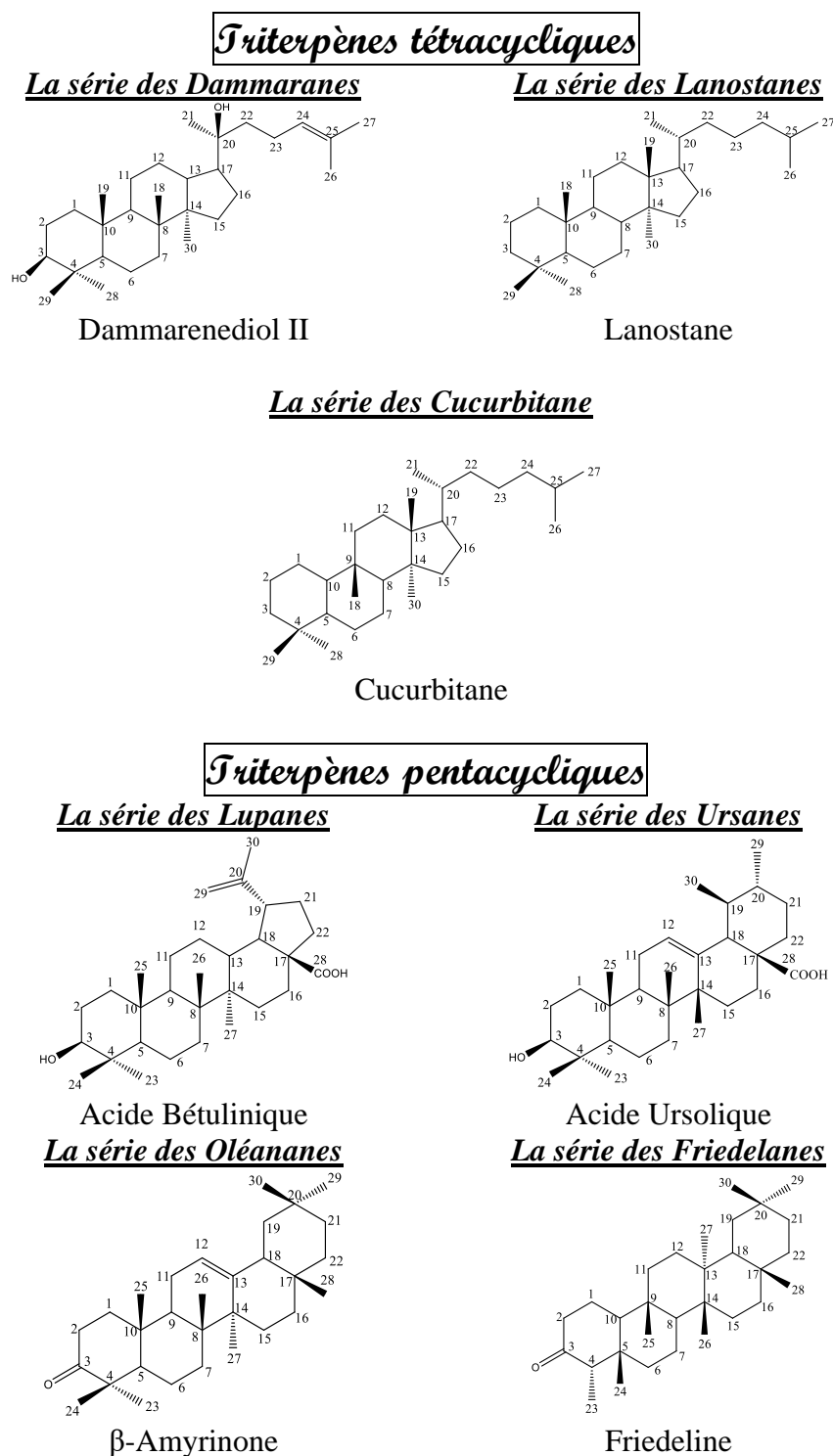


Figure 6 : Principaux classes des triterpènes.

Les stéroïdes [31]

Les stéroïdes, abondant dans les végétaux et les animaux, appartenant à la grande famille des terpenoïdes, c'est-à-dire des hydrocarbures provenant de la polymérisation tête à queue d'une unité isoprénique C₅, constituent un groupe de lipides dérivant de triterpénoïdes (lipides à 30 atomes de carbones), majoritairement le squalène. Ils se caractérisent par un *noyau cyclopentanophénanthrénique* (stérane) hydrophobe partiellement ou totalement hydrogéné.

Ainsi donc, les stéroïdes sont des molécules tétracycliques dont la structure de base est formée par le noyau perhydrocyclopentanophénanthrène ou communément appelé stérol. Mais en générale, ce squelette perhydrocyclopentano-phénanthrène possède une chaîne latérale de 8 atomes de carbones fixés en C17 [31], d'après la figure

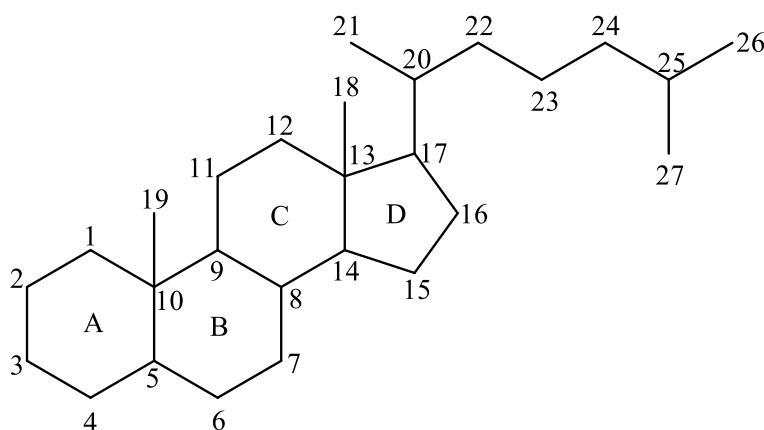


Figure 7 : Stéroïdes

Habituellement, les carbones C₁₀, C₁₃ sont liés à un groupe méthyle –CH₃ et le carbone C₁₇ à un groupe alkyle. Selon l'**I.U.P.A.C.**, les stéroïdes ont un squelette cyclopentanophénanthrénique ou dérivant de celui-ci.

Classifications

On distingue 5 sous classes de stéroïdes :

- La sous-classe des stérols et dérivés : cholestérol, phytostérol et stérides
- Les stéroïdes: œstrogènes, testostérone, androgènes, progestérone... (Hormones stéroïdiennes)
- Les sécostéroïdes : vitamine D
- Les acides biliaires
- Les stéroïdes conjugués.

II.5. Les tetraterpènes

Cette famille de terpènes à 40 carbones, compte en particulier les caroténoïdes dont un pigment photosynthétique majeur (le bêta-carotène) mais également des pigments aux propriétés anti-oxydantes comme le lycopène de la tomate [32].

III. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

III.1. Définition

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique d'analyse chimique et structurale, non destructive. C'est une technique spectroscopique applicable aux particules ou ensemble de particules qui ont un spin nucléaire non nul [W4].

La spectroscopie est d'abord l'étude d'interaction entre la matière et le rayonnement électromagnétique. Ainsi, la spectroscopie RMN est une méthode non destructive permettant d'identifier la structure d'une molécule organique, résultant de l'interaction entre les noyaux atomiques et un champ magnétique extérieur. La spectroscopie RMN n'est applicable qu'aux noyaux atomiques ayant un nombre de spin I non nul et une distribution de charge sphérique uniforme comme le noyau proton ^1H et le noyau isotope carbone 13 (^{13}C) [33] [34].

III.2. Spectres RMN 1D (monodimensionnels)

- Spectre de RMN ^1H

Le spectre RMN proton ^1H 1D classique est un spectre ayant l'allure des pics groupés (multiplet) et singulets. La position des signaux donnée à l'abscisse est mesurée en δppm situé entre 0 à 15ppm. Ainsi une valeur particulière de δppm correspond à une structure particulière. L'ordonnée est donnée en fréquence muni de courbe d'intégration. La hauteur des courbes d'intégrations sont proportionnelles au nombre de proton par site protonique. Les informations tirées des spectres RMN 1D classiques sont donc les enchaînements des sites protoniques et la distribution du nombre de proton.

- Spectre de RMN ^{13}C

Le spectre RMN ^{13}C donne autant de pics que de carbones dans la molécule en général. Le déplacement chimique est compris entre 0 et 250 ppm. Le spectre RMN ^{13}C 1D Broad Band Decoupling est un spectre n'ayant que des pics singulets. Le nombre de pic correspond au nombre de carbone dans la molécule en l'absence de superposition. Le déplacement chimique δppm est compris entre 0 à 250ppm. Les valeurs particulières de δppm peuvent mener à des structures particulières.

- Spectre APT (Attached Proton Test)

Le spectre APT est un spectre RMN ^{13}C montrant d'une part des pics positifs pour les pics des groupements méthines ($-\text{CH}-$), méthyles (CH_3-) et d'autre part, ceux des groupements méthylènes ($-\text{CH}_2-$) par des pics négatifs. Mais généralement, dans le cas d'un spectre J modulé APT, les carbones quaternaires et secondaires sont dans la même phase que le pic du solvant et l'autre phase comporte les carbones primaires et tertiaires.

- Spectre DEPT 135°

DEPT (Distorsionless Enhancement by Polarising Transfert) sont des variantes des spectres RMN ^{13}C 1D. Le spectre DEPT donne plus d'information sur le type de carbone. Ainsi le DEPT 90° ne montre que des pics correspondant au carbones tertiaire CH. Ces spectres ne présentent que des pics positifs, avec des pics manquants comparés au Broad Band Decoupling. Le DEPT 135° présentent les pics correspondants au carbones primaires $-\text{CH}_3$ et tertiaires CH dans un même coté. Les carbones secondaires $-\text{CH}_2-$ sont représentés par les pics à l'inverse. Les Carbones quaternaires sont absents.

III.3. Spectres RMN 2D (bidimensionnels)

On distingue deux types de spectres 2D : homonucléaire et hétéronucléaire. Les corrélations entre les noyaux concernés se traduisent par des taches sur les spectres. Les spectres RMN 2D sont des spectres montrant les corrélations entre les déplacements chimiques des différents spins couplés entre eux. Ainsi l'allure des spectres sont des taches non des pics. L'abscisse et l'ordonné sont exprimés en δppm .

La corrélation homonucléaire

- COSY (COrrrelation SpectroscopY)

C'est un spectre de corrélation $^1\text{H}-^1\text{H}$. En abscisses et en ordonnées sont portés les δ (ppm) des ^1H . Le spectre a la forme d'un carré. Les taches le long de la diagonale correspondent à celles du spectre ^1H -1D et celles en dehors de la diagonale sont les taches de corrélations. Les couplages détectables sur la carte symétrique ne s'étendent qu'à travers deux liaisons (protons géminés) et trois liaisons (protons vicinaux). Par conséquent, les sites protonés voisins sont facilement repérés.

- NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

Ces spectres ^1H -2D ressemblant fortement aux COSY permettent d'obtenir des informations sur des ^1H proches dans l'espace, couplés ou non à travers des liaisons. Il s'agit de couplage dipolaire. Ainsi les spectres NOESY sont utilisés pour établir la structure tridimensionnelle d'une molécule, donc sa configuration et sa conformation. Un spectre NOESY s'exploite comme un COSY.

La corrélation hétéronucléaire

Ce type de corrélation exploite l'existence du couplage scalaire hétéronucléaire permettant un transfert d'aimantation du noyau le plus sensible ^1H vers le noyau le moins sensible du carbone 13.

- HMOC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) et HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)

Il donne la corrélation entre le(s) proton(s) et le carbone qui le(s) porte(nt). Les tâches indiquent donc la connexion entre C et H. Elles permettent de déduire le nombre de carbones protonés et d'attribuer les protons correspondant à chaque carbone. Ainsi, les protons géminés non équivalents sont mis en évidence très facilement (Deux protons pour une seule valeur de carbone).

- HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

Il permet l'observation des corrélations proton-carbone à longue distance. Le nombre de liaisons, qui sépare un proton présentant une corrélation avec un carbone, varie avec l'ensemble des paramètres favorisant la transmission du couplage : géométrie de la molécule, électronégativité des substituants. Dans le cas de systèmes insaturés, des corrélations entre ^1H et ^{13}C distants de 4 à 5 liaisons peuvent être mises en évidence. Des corrélations de type IJ ^1H - ^{13}C peuvent apparaître sur le spectre sous forme des tâches symétriques par rapport au δ du ^1H .

IV. Activité biologique

Généralité sur l'ulcère peptique

L'ulcère peptique désigne un ensemble d'affections ulcéreuses de la partie supérieure du tube digestif touchant essentiellement l'estomac et la partie initiale de duodénum (bulbe), et dans lequel la participation de l'acide et de la pepsine dans leur pathogénie est fondamentale [35]. Cette maladie est l'un des troubles gastro-intestinaux les plus courants [36].

Plusieurs facteurs sont impliqués dans la pathogenèse de l'ulcère gastrique, y compris: la sécrétion accrue d'acide-pepsine, la neutralisation de bicarbonate altérée, la sécrétion de mucus altérée et les lésions précipitantes sur la couche muqueuse [37] [38] et l'infection par de l'*Helicobacter pylori*. La moitié de la population mondiale est touchée par cette infection.

H. pylori est présent dans toutes les régions du globe avec une prévalence plus élevée dans les pays en voie de développement comme Madagascar où la séroprévalence est de 82% chez l'adulte [39]. Il s'agit d'un problème de santé publique dans ces pays en voie de développement. A Madagascar, le diagnostic et le traitement de l'infection à *H. pylori* ne sont pas une pratique courante en raison du manque de moyens et d'informations [40].

La maladie de l'ulcère peptique (PUD) se caractérise par une sensation de gâchis ou de brûlure dans l'abdomen, entre le sternum et le nombril. En raison de la position de la douleur, il est communément appelé «brûlures d'estomac». D'autres symptômes comprennent la nausée, les vomissements, la perte de poids, l'anorexie. Un saignement de l'ulcère pourrait se produire, qui passe souvent inaperçu car la perte de sang est lente et peut ne pas être évidente dans les selles. Ces patients peuvent subir une fatigue et une faiblesse. Cependant, dans les cas où le saignement pourrait être lourd, le sang apparaît dans les vomissures ou les selles [41].

Partie II : Matériels et méthodes

I. Matériel végétal

La collecte de la plante *Diodella sarmentosa* a été faite dans les environs du parc Ranomafana à Fianarantsoa vers 10 h du matin le 25 avril 2016. Un herbier a été identifié au sein du Département Flore du Parc Botanique et Zoologique de Tsimbazaza.



Figure 8 : *Diodella sarmentosa* de Ranomafana Fianarantsoa

Les parties aériennes de la plante ont été séchées pendant quelques mois à l'abri du soleil et de l'humidité.

II. Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique a été fait pour la détection des principales familles de composés chimiques en faisant usage de tests chimiques classiques [42]. On a pu déterminer les compositions chimiques de la plante par une étude basée sur des tests de solubilités, des réactions de colorations et de précipitations [43].

II.1. Criblage des alcaloïdes

Pour le criblage des alcaloïdes, l'analyse est effectuée en trois étapes : la macération chlorhydrique, le test préliminaire et le test de confirmation. Ce dernier n'est effectué que si les deux premiers sont positifs.

Macération chlorhydrique

Environ 5g de poudre de feuille sont macérés dans 30 ml d'HCl à 12% pendant 15min. Le mélange est filtré sur coton et le filtrat obtenu est divisé dans 4 tubes à essais. Le premier tube sert de témoin. Dans les trois autres sont ajoutés les réactifs de Wagner, de Mayer et de Dragendorff. Pour chaque tube, si un précipité apparaît, le test serait positif.

Test préliminaire

Une solution hydroalcoolique équivalente à 25 g a été évaporée dans un cristalliseur au bain-marie. 10 ml de solution de HCl 2N y sont ajoutées et le mélange est agité avec une baguette de verre tout en chauffant dans un bain marie bouillant pendant 3 à 5 min. La solution acide est refroidie à température ambiante, puis additionnée de 0,5 g de NaCl.

Après agitation, le mélange est filtré sur papier et le précipité est lavé avec un volume suffisant d'acide. Le filtrat obtenu est divisé dans 4 tubes à essai et on procède comme pour la macération chlorhydrique.

II.2. Criblage des flavonoïdes et Leucoanthocyanes

Pour le criblage des flavonoïdes et Leucoanthocyanes, une solution hydroalcoolique équivalente à 3 g a été évaporée dans un cristalliseur au bain-marie. Cet extrait est dépigmenté à l'hexane, puis le résidu est dissous dans de l'éthanol. La solution alcoolique est répartie dans 5 tubes à essai.

Le premier tube sert de témoin. Dans le deuxième tube on a ajouté 0,5 ml de HCl concentré et quelques graines de tournure de magnésium. Ce test est appelé : test de Wilstater. Après 10 min, la variation de la couleur dans le tube est observée : une coloration rouge indique la présence de flavones ; une coloration variant de rouge à pourpre signifie la présence de flavonols ; si la coloration est rouge violacée, cela signifie la présence de flavanones et flavonols.

Dans le troisième tube, 0,5 ml de HCl concentré et quelques graines de tournure de magnésium sont également ajoutés. Après dissolution du magnésium, 1 ml d'eau et 1 ml d'alcool isoamylique sont ajoutés au mélange. Une séparation de phases est observée et après 10 min, si la coloration de la phase supérieure est rouge, des flavones sont présents dans l'extrait; si elle est pourpre, il y a présence de flavonols. C'est le test de Wilstater modifié.

Dans le quatrième tube, il est ajouté 1 ml de HCl concentré. Le mélange est chauffé au bain marie pendant 30 min, puis laissé refroidi. Un virage de la coloration au rouge violacée indique la présence de Leucoanthocyanes. Il s'agit du test de Bath Smith.

Au dernier tube, 0,5 ml de HCl concentré est versé à froid. L'apparition d'une coloration rouge signifie la présence d'anthocyanes.

II.3. Criblage des tanins et polyphénols

Pour procéder au criblage des tanins et polyphénols, une solution hydroalcoolique équivalente à 5 g a été évaporée dans un cristalliseur au bain-marie. Un volume de 15 ml d'eau

distillée y est versé, puis le mélange est chauffé tout en agitant. Au mélange refroidi est additionné 4 gouttes de NaCl à 10%. Ce mélange est ensuite filtré sur papier. Le filtrat est divisé dans 4 tubes à essais. Le premier tube sert de témoin. Dans le second tube est additionné 5 gouttes de gélatine à 1%.

L'apparition d'un précipité indique la présence de polyphénols. Pour détecter la présence de tanins, dans le troisième tube est additionné 5 gouttes de gélatine salée. La formation de précipité indique que le test est positif. Dans le dernier tube est ajouté 5 gouttes de FeCl_3 à 10 % dans du méthanol. Une coloration en bleu-vert indique la présence de tanins condensés (catéchiques ou flavanols-3 condensés et Leucoanthocyanes ou flavanediols-3,4) ; une coloration noir bleuâtre indique la présence de tanins hydrolysables (galliques ou ellagiques) ; s'il n'y a aucun changement de couleur, cela signifie une absence de tanins dans l'extrait. Il est à noter qu'une réaction négative à la gélatine salée accompagnée d'une coloration verte ou bleu-noire avec FeCl_3 signifie la présence d'autres types de composés phénoliques.

II.4. Criblage des stéroïdes et terpenoïdes

Pour détecter les stéroïdes et les terpenoïdes une solution hydroalcoolique équivalente à 5 g a été évaporée dans un cristalliseur au bain-marie, puis, l'extrait est dépigmenté à l'hexane. Après l'ajout de 10 ml de chloroforme, le mélange est agité pendant 5 à 10 minutes. Après un repos de quelques minutes, il est séché avec du Na_2SO_4 anhydre et enfin il est filtré sur papier. Le filtrat ainsi obtenu est divisé dans 5 tubes à essai dont le premier sert de témoin.

Dans le deuxième tube est réalisé le test de Liebermann Burchard : y sont ajoutées 4 gouttes d'anhydride acétique puis 4 gouttes d'acide sulfurique concentré. Un virage de couleur en pourpre signifie la présence de triterpenoïdes tandis qu'une coloration en violet ou bleu-vert indique la présence de stéroïdes.

Le tube n°3 est incliné de 45° , puis de 1 ml d'acide sulfurique concentré y est versé goutte à goutte. Si l'anneau de séparation formé est de couleur rouge, cela indique une présence de stérols insaturés. C'est le test de Salkowski.

Un test de Badjet Kedde est réalisé dans le quatrième tube en y ajoutant quelques grains d'acide picrique. Des stérols lactoniques sont présents dans l'extrait s'il y a un virage de la coloration en rouge.

Finalement, dans le dernier tube sont versées quelques gouttes de FeCl_3 à 10% dans l'eau puis quelques gouttes d'acide acétique glacial. Le tube est ensuite incliné à 45° pour

l'observation. Si l'anneau de séparation formé est de couleur rouge pourpre, cela signifie la présence de desoxy-2-sucrose.

II.5. Criblage des saponines

La détection des saponines se fait par le test de mousse. Pour cela, 1 g de poudre de feuille est mis en suspension dans 10 ml d'eau distillée dans un tube à essai. Le mélange est agité vigoureusement pendant quelques minutes, puis placé verticalement pendant 30 min. Une hauteur de la mousse supérieure ou égale à 3 cm indique un test positif.

II.6. Criblage des polysaccharides

La mise en évidence des polysaccharides se fait par un test de précipité. Une décoction est préparée à partir de 5 g de poudre de feuille portée à ébullition dans de l'eau. Ensuite, la décoction refroidie est filtrée sur papier, 1 ml du filtrat est placé dans un tube à essai et ajouté de 3 ml d'éthanol. La formation d'un précipité indique la présence de polysaccharides.

III. Extractions

On distingue 2 types d'extractions : l'extraction liquide-liquide et l'extraction solide-liquide.

III.1. L'extraction solide-liquide

C'est l'opération fondamentale qui a pour but d'extraire, de séparer, de dissoudre soit par immersion soit par percolation d'un liquide, un ou plusieurs composants (liquide ou solide) mélangés à un solide.

La macération est un procédé d'extraction solide-liquide, elle consiste à laisser reposer à peu près une semaine (≤ 168 h), à froid, une substance dans un solvant afin d'extraire les constituants solubles.

Dans notre cas, les parties aériennes de la plante ont été broyées à l'aide d'un mortier et puis, elles ont été macérées dans un grand flacon 300 g de la poudre de *D.sarmentosa* 3 fois successivement avec des temps de macération différents, $T_1 = 120$, $T_2 = 168$, $T_3 = 114$ heures. Chacune de ces solutions furent filtrées avec de la soie et du coton. Après cette opération, les solutions obtenues ont été évaporées à l'aide d'un évaporateur rotatif d'où l'obtention de 26.6g d'extrait hydroalcoolique. On a alors calculé le rendement de l'extraction selon la formule suivante :

$$r = \frac{\text{masse obtenue } (m_o)}{\text{masse initiale } (m_i)}$$

Le tableau III nous résume ces macérations.

Tableau III : Résumé de l'extraction liquide-solide : les macérations

| Macérations | Temps de macérations (h) |
|-------------|--------------------------|
| 1 | T1 |
| 2 | T2 |
| 3 | T3 |

L'extrait qu'on a obtenu passera après à l'extraction liquide-liquide.

III.2. L'extraction liquide-liquide

Le principe de l'extraction liquide/liquide joue sur la différence de solubilité des composés présents dans les différentes phases.

23.6g d'extrait hydroalcoolique a été repris avec 400 ml d'eau distillée à 40°C et versés dans une ampoule à décanté. Il a été ensuite épuisé quatre fois avec de l'hexane jusqu'à obtention de solution claire et trois fois après avec l'acétate d'éthyle. Chaque solution obtenue a été récupérée dans des erlenmeyer de 1 litre, puis évaporée à l'évaporateur rotatif (dans des ballons de 1 litre) à une température d'évaporation de 40°C pour les deux solutions : hexanique et d'acétate d'éthyle et 70 °C pour la solution aqueuse. Chaque extrait était pesé et mis dans des cristallisoirs, les rendements de l'extraction ont été ensuite calculés. Le diagramme 1 montre, l'étape de cette extraction liquide-liquide.

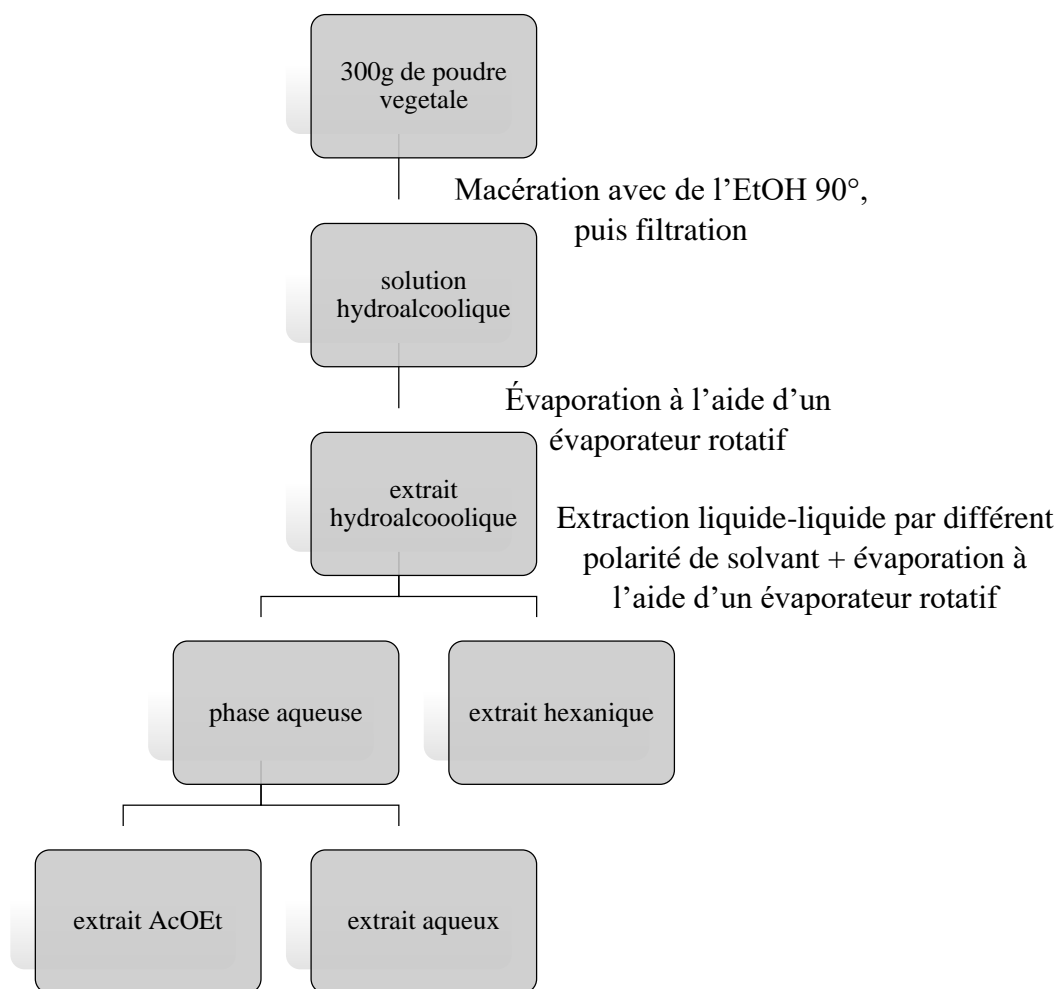


Diagramme 1 : Extraction liquide-liquide par polarité de solvant décroissant

IV. Fractionnement - Isolement - purification

La chromatographie était cruciale et indispensable, c'est une technique analytique qui permet de séparer les constituants d'un mélange homogène liquide ou gazeux. Deux techniques ont été utilisées :

IV.1. La chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant.

L'hexane / acétate d'éthyle a été le solvant d'élution utilisé entraînant en premier les composantes apolaires et vient après les moyennement polaires et les polaires. Chaque composant sera déterminé par sa référence frontale [44], notée R_f , dans un système chromatographique déterminé.

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par la substance}}{\text{distance parcourue par le solvant}}$$

Dépôt de l'échantillon

Avant le dépôt de l'échantillon, la plaque chromatographique a été préparée.

A 1cm de l'extrémité inférieure de cette plaque, on a tracé avec du crayon la ligne de dépôt et on a fait de même pour l'extrémité supérieure correspondant au front du solvant.

L'échantillon a été dissous dans un solvant moyennement polaire (le DCM). A l'aide d'un tube capillaire, on a déposé l'échantillon sur la ligne de dépôt de la plaque CCM. Le diamètre de la tâche n'a pas dépassé 3 mm, puis on l'a laissé sécher.

Développement du chromatogramme

La plaque CCM est ensuite placée dans la cuve chromatographique en position verticale et la cuve est fermée. Lorsque le solvant atteint le front, la plaque a été retirée de la cuve.



Figure 9 : Chromatographie sur couche mince

Puis, la plaque est séchée avec un séchoir ou à l'air libre.

Révélation

Pour les révéler, on a utilisé les rayonnements UV de longueurs d'onde $\lambda = 254 \text{ nm}$ et $\lambda = 365 \text{ nm}$ à l'aide d'une lampe UV, les taches invisibles au rayonnement UV doivent être révélées par d'autres révélateurs.

L'observation de la plaque aux rayonnements UV à des différentes longueurs d'onde ainsi que la pulvérisation de celle-ci à l'aide du révélateur tel que la solution d'acide sulfurique à 50% fait apparaître des taches différentes correspondant aux divers constituants [45].

IV.2. La chromatographie sur colonne

Après avoir obtenus différents extraits, on a choisi l'extrait acétate d'éthyle pour être fractionné. Son CCM nous a permis de connaître les solvants d'élution à utiliser pour la chromatographie sur colonne qui est l'Hex /AcOet (72/28).

Préparation de la colonne

Remplissage de la colonne

On emploie une colonne de verre, de dimensions choisies en fonction de la quantité du produit à analyser, bouchée à sa partie inférieure par du verre fritté ou du coton. L'adsorbant est introduit dans la colonne selon deux procédés :

Soit sous forme de poudre (phase stationnaire) tassée en tapotant la colonne. C'est le mode de « **remplissage par voie sèche** ». Le solvant (phase mobile) est versé progressivement afin qu'il puisse pénétrer de façon homogène dans les espaces interstitiels.

Soit sous forme de bouillie dans le solvant approprié. Le mélange est agité afin qu'il soit homogène et exempt de bulles d'air. Cette méthode est dite « **remplissage humide** ».

Dans notre cas, le fractionnement a été réalisé à l'aide d'une colonne en verre de diamètre interne 2.3 cm, hauteur $h = 34.1$ cm, masse de la silice = 110 g et le remplissage de la colonne a été fait par voie humide avec de l'hexane. Le mélange est versé progressivement dans la colonne au fur et à mesure que la silice se dépose. A chaque intervalle, le robinet de la colonne est ouvert pour tasser la silice.

Dépôt

1,2 g de l'extrait a été solubilisé avec de l'acétate. Quelques grammes de poudre de silice ont été versés dans la solution puis l'ensemble a été évaporé à l'air libre jusqu'à ce qu'on obtienne une poudre bien sèche. Celle-ci a été ensuite déposée dans la colonne à l'aide d'un entonnoir après avoir introduit quelques quantités de sable fin.

Élution

L'élution s'est faite par gradient de polarité de système de solvant hexane/acétate. La polarité du mélange de solvants a été augmentée progressivement de façon à accélérer le

déplacement des composés. Les molécules sont entraînées vers le bas à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité. L'éluat a été recueilli par fractions de 6 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. Les différents éluât séchés ont été pesés et stockés.

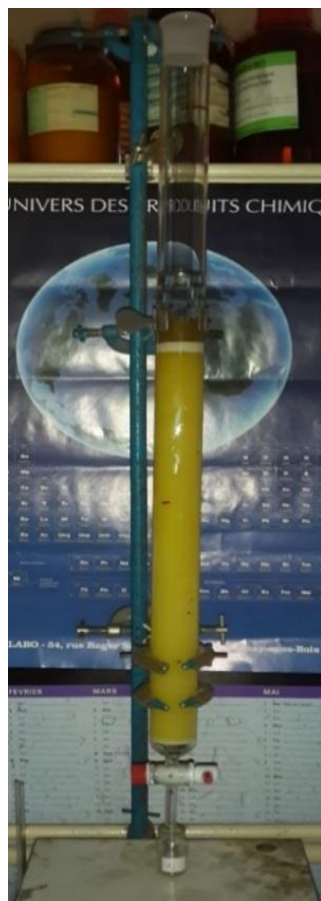


Figure 10 : Chromatographie sur colonne

V. Détermination structurale

La détermination structurale est basée sur les interprétations des spectres du produit pur obtenu. Il existe plusieurs méthodes pour déterminer la structure des molécules organique, parmi elles : la spectrométrie de masse (SM), la spectroscopie Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) 1D et 2D, la spectroscopie ultraviolet, la spectroscopie infrarouge... Dans notre cas, la méthode spectrale choisie est la spectroscopie Résonance Magnétique Nucléaire qui présente des informations telles représentées sur le tableau IV [46] :

Tableau IV : Résultats attendus des méthodes d'analyse des spectres RMN

| spectres | | Informations obtenues |
|------------------------------|---------------------|---|
| Spectres monodimensionnelles | RMN ^1H | <ul style="list-style-type: none"> déplacement chimique ^1H constante de couplage nombre de protons dans un signal multiplicité (nombre de voisins) |
| | RMN ^{13}C | <ul style="list-style-type: none"> déplacement chimique ^{13}C type de carbone |
| Spectres bidimensionnelles | HMQC | Corrélations entre protons et carbone porteur |
| | HMBC | Corrélations entre protons et carbone séparés de 1, 2, 3 ou plusieurs liaisons |

VI. Test biologique : *in vivo*

Afin de vérifier si cette plante naturalisée a la même vertu thérapeutique que celle utilisée au Nigéria, on a décidé de faire le test sur des rats / souris selon les méthodes de Aklikoukou, LWO FF et selon la méthode reportée par Astudillo *et coll.*, 2002.

VI.1. Matériel animal

Notre étude a été faite sur les rats mâles blancs fournies par le Centre Nationale d'Application des Recherches Pharmaceutique (CNARP) et souris fournies par l'Institut Malgache de Vaccins Vétérinaires (IMVAVET). Les poids des souris étaient compris entre 20g et 30g et ceux des rats : 150g à 300g. Dans chaque étude, les animaux ont été soumis à une diète hydrique de 24 heures avant le test. Avant chaque administration, nous avons pesé et marqué les souris/ rats des différents lots. Les matériels utilisés sont reportés en Annexe

VI.2. Préparation de l'agent ulcérogène

Pour déclencher l'ulcère chez les rats et les souris, nous avons préparé l'agent ulcérogène à administrer à chez animaux. Le tableau V résume la préparation avec ses composantes.

Tableau V : Réactifs pour la préparation de l'agent ulcérogène

| | rats | Souris |
|------------|--|---|
| ulcérogène | Éthanol (60ml soit 60%) + Acide chlorhydrique (1,7ml soit 1,7%) + Eau (38,3ml soit 38,3%). | Acide chlorhydrique (HCl) 0,3M dans l'éthanol à 60% |

Le mélange ainsi constitué est homogénéisé à l'aide d'un agitateur magnétique. Les matériels utilisés sont reprise dans l'annexe II.

VI.3. Protocole expérimental

VI.3.1. Test préliminaire

Le principe consiste à étudier dans un premier temps le pouvoir ulcérogène du mélange éthanol-HCl-eau et par la suite à rechercher si l'extrait de *D sarmentosa* peut prévenir et/ou guérir l'ulcère gastrique. L'essai préliminaire a permis de déterminer le degré d'ulcération présent sur les estomacs.

Constitution des lots et préparation des animaux

Trois lots de trois rats/ souris chacun ont été constitués. Les animaux sont gardés dans des cages à fonds grillagés, ils sont soumis à une diète hydrique de 24 heures avant chaque administration du produit ulcérogène.

Administration de la solution ulcérogène

La solution ulcérogène a été administrée *per os*¹ à l'aide d'une sonde Œsophagienne à la dose quotidienne de 8ml/kg comme préconisée par Aklikoukou [47].

Rats : les animaux des lots I, II, III ont été sacrifiés respectivement le 1er, le 2^{ème} et le 3^{ème} jour d'administration du produit ulcérogène pour les cotations des ulcérations gastriques et savoir ainsi le délai adéquat pour avoir une bonne ulcération.

Souris : on administre l'agent ulcérogène au temps To, puis, une heure après on sacrifie l'animal pour constater le degré d'ulcération.

Prélèvement des estomacs et cotations des ulcérations

Les estomacs ont été prélevés, ouverts suivant la grande courbure, lavés et rincés avec de l'eau saline puis tirés dans la solution formale et laissé reposer pendant 30 min. A l'aide d'une loupe, nous avons examiné la muqueuse gastrique pour voir les ulcérations.

Selon LWOFF, seuls sont considérés comme ulcérations les points et les sillons hémorragiques. Chaque estomac est coté de 0 à 3 selon le nombre d'ulcérations [48]:

0 = pas d'ulcérations

1 = une à 2 ulcérations,

2 = 3 à 4 ulcérations

3 = plus de 4 ulcérations

¹ *Per os* : administration par voie orale

L'index d'ulcération est calculé selon la formule suivante:

$$IU = \frac{\text{Somme des cotations} \times \% \text{ d'estomacs présentant des ulcères}}{\text{Nombre d'animaux}}$$

On considère qu'il y a 100% d'ulcérations lorsque la somme des cotations est égale à 9 (pour un lot de trois rats / souris, on a au totale 9 cotas), c'est à dire lorsque l'index d'un estomac est égal à 3. Ainsi pour un index d'ulcération IU, on peut calculer le pourcentage d'ulcération P.U. qui est égale à :

$$PU = \frac{IU * 100}{3}$$

Les tests qui suivent se feront seulement sur des souris.

VI.3.2. Etude de l'activité gastro-protectrice de l'extrait de *D sarmentosa*

Le principe consiste à gaver les animaux avec la solution ulcérogène après avoir administré l'extrait de la plante, puis à évaluer le degré de protection de la muqueuse gastrique.

Constitution des lots et préparation des animaux

Trois lots de trois souris chacun ont été constitués dont un lot témoin et deux lots traités avec deux doses de l'extrait *D sarmentosa* différentes :

- 150 mg/Kg
- 300 mg/Kg

Ces animaux ont été mis à jeun pendant 24 heures avec accès libre à l'eau.

Administration de l'extrait de *D sarmentosa* et de la solution ulcérogène

Au temps T0 = 0 nous avons traité les animaux en administrant par voie orale l'extrait hydroalcoolique préalablement préparés. L'eau distillée a été administrée au lot témoins.

Soixante minutes (mn) après l'administration des produits, Il a été administré par voie orale l'agent ulcérogène (HCl 0,3M dans l'éthanol à 60%) à la dose de 0,2 ml pour chaque souris [49]. Soixante minutes (60 mn) après l'agent ulcérogène, les souris ont été sacrifiées selon la méthode reportée par (Astudillo et coll., 2002).

L'estomac de chaque souris a été prélevé, ouvert selon la grande courbure à l'aide d'un ciseau, Chaque estomac a été lavé avec la solution saline, puis fixé dans la solution formaline à 5% pendant 30 mn. Après ce temps, chaque estomac a été bien étalé sur une tablette pour mieux observer les ulcères formés à l'œil nu et à l'aide d'une loupe.

Les lésions ulcéreuses apparaissent dans la muqueuse gastrique allongées en lignes noir rouge, parallèle le long de l'axe de l'estomac. On calcule l'indice de lésion (Index d'ulcération) pour chaque estomac.

VI.3.3. Etude de l'activité curative des ulcérations gastriques par l'extrait de *D sarmentosa*

Constitution des lots et préparation des animaux

Deux lots de trois souris ont été constitué dont : un lot témoin et un lot traité avec l'extrait *D sarmentosa* avec la dose la plus efficace suite au test gastro-protectrice. Les souris sont soumises à une diète hydrique de 24 heures avant l'administration de l'agent ulcérogène.

Administration de la solution ulcérogène et de l'extrait de *D sarmentosa*

On administre l'agent ulcérogène une heure avant l'administration de l'extrait puis une heure après administration de l'extrait hydroalcoolique de la plante, les animaux sont sacrifiés. L'estomac de chaque souris a été prélevé, ouvert selon la grande courbure à l'aide d'un ciseau, Chaque estomac a été lavé avec la solution saline, puis fixé dans la solution formaline à 5% pendant 30 mn. Après ce temps, chaque estomac a été bien étalé sur une tablette pour mieux observer les ulcères formés à l'œil nu.

VII. Evaluation de l'index d'ulcération

Les résultats des deux tests sont exprimés en moyenne (M) \pm l'écart type moyenne standard (EMS). L'analyse statistique a été effectuée. Le niveau de significativité a été évalué selon le test *t* – Student avec $P < 0,05$. Le pourcentage d'inhibition de l'ulcère pour chaque groupe traité a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{IU Témoin} - \text{IU Traité}}{\text{IU Témoin}} * 100$$

Partie III : Résultats et Discussions

I. Résultat des criblages phytochimiques

Les 500 ml de solution hydroalcoolique ont été utilisés pour les criblages phytochimiques. Ces résultats sont groupés dans le tableau VI.

Tableau VI : Criblage phytochimique

| Famille chimique | Tests | | Résultats | Interprétations |
|--------------------------------|--|-------------|-----------|--|
| Alcaloïdes | Macération chlorhydrique | Wagner | - | Absence des Alcaloïdes |
| | | Mayer | - | |
| | | Dragendorff | - | |
| Flavonoïdes et Leucoanthocyane | Wilstater | | - | Présence de Leucoanthocyane |
| | Wilstater modifié | | - | |
| | BateSmith à chaud | | - | |
| | BateSmith à froid | | + | |
| Tanins et Polyphénols | Gélatine à 1% | | - | Absence des polyphénols |
| | Gélatine salée | | + | Présence de tanins |
| | Test avec FeCl ₃ | | ++ | Présence de tanins condensés |
| Quinones | NH ₄ OH | | - | Absence de quinones |
| Triterpènes et stéroïdes | Liebermann-Burchard | | +++ | Présence de stéroïdes Présence de triterpènes |
| | Salkowski | | + | Présence de stérols insaturés |
| | Kedde | | - | Absence de stéroïdes lactoniques |
| | Test de Keller-Killiani (desoxy-2-sucre) | | ++ | Présence de desoxy-2-sucre |
| Saponines | Indice de mousse | | - | Absence de saponine |
| Polysaccharides | EtOH | | - | Absence de polysaccharide |

Le criblage phytochimique effectué sur l'extrait hydroalcoolique de ses poudres a permis de mettre en évidence la présence de leucoanthocyanes, tanins, triterpènes, stéroïdes, stérol insaturé et l'absence des alcaloïdes, flavonoïdes, polysaccharides, saponines, quinones, stéroïdes lactoniques et polyphénols.

II. Résultats des extractions : extraction solide-liquide et extraction liquide-liquide

II.1. Résultat de l'extraction solide-liquide

Après les macérations, le volume de la solution hydroalcoolique obtenue a été 4720 ml. Cette solution est ensuite évaporée. La masse de l'extrait sec hydroalcoolique a été 26,6 g, ce qui donne un rendement de $r = 8,67 \%$. Le tableau VII nous montre les résultats de ces macérations.

Tableau VII : Résultat de l'extraction solide-liquide

| Nombre de macération | m (g) | V _{EtOH} (ml) | T (h) | Vo (ml) | m _o (g) | Rendement (%) |
|----------------------|-------|------------------------|----------|---------|--------------------|--|
| 1 | 300 | 2000 | T1 = 120 | 1320 | 26.6 | $r = \frac{\text{masse obtenue}}{\text{masse initiale}}$ $r = 8.67\%$ |
| 2 | | 2000 | T2 = 168 | 2000 | | |
| 3 | | 2000 | T3 = 114 | 1400 | | |

- m : Masse de la poudre végétale (g)
 V_{EtOH} : Volume de l'alcool (ml)
 T : Temps (h)
 V₀ : Volume de la solution obtenue (ml)
 m₀ : Masse obtenue (g)

II.2. Résultat de l'extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide avec des solvants de polarités croissant sont présentés selon le diagramme 2 :

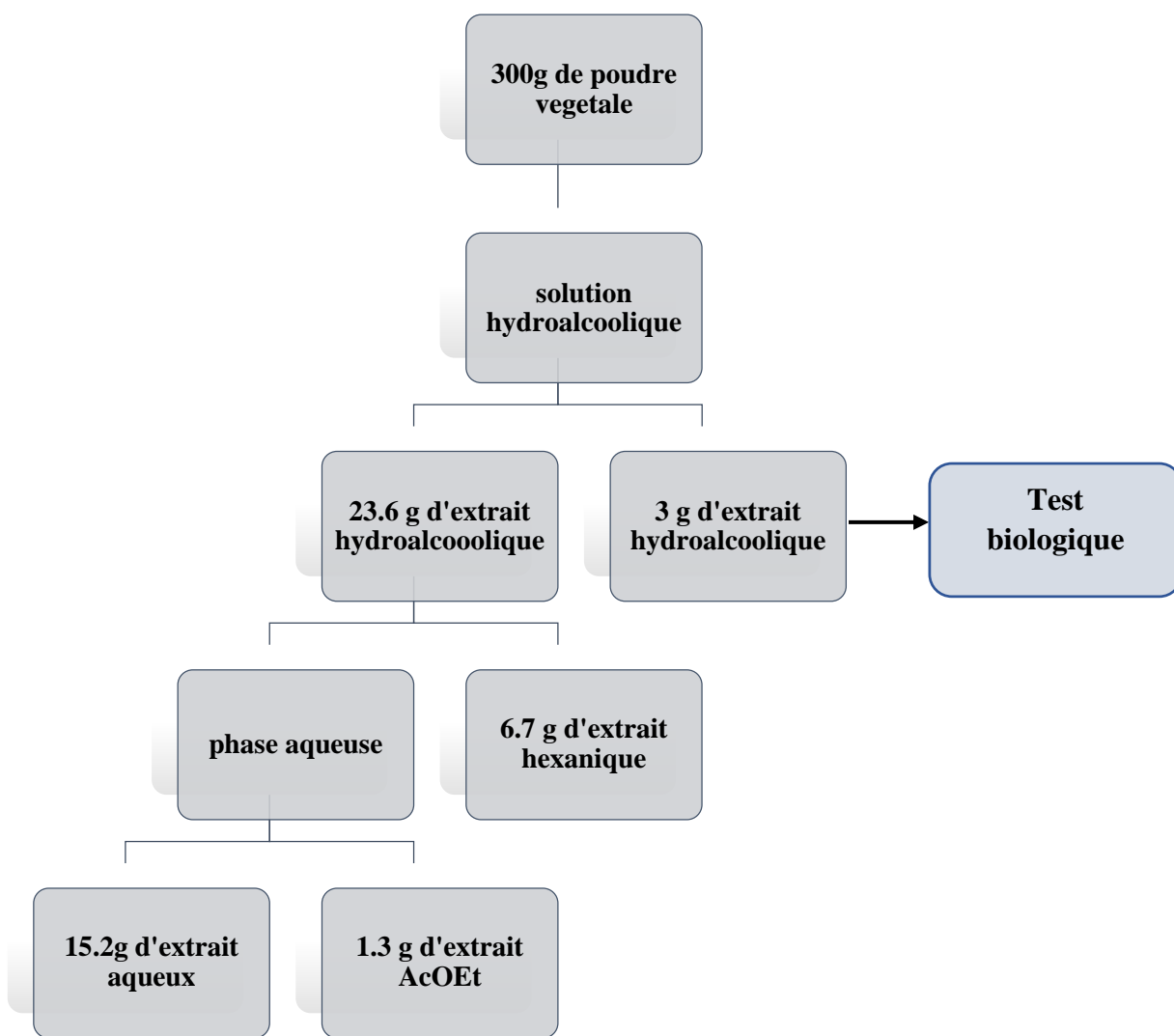


Diagramme 2 : Résultats de l'extraction liquide-liquide

Le tableau VIII nous donne les rendements de cette extraction.

Tableau VIII : Résultat de l'extraction liquide-liquide

| 300g de poudre végétale | | Masse obtenue(g) | Rendement (%) |
|-------------------------------|--------------------------|------------------|---------------|
| | Extrait hexanique | 6.7 | 2.23 |
| | Extrait acétate d'éthyle | 1.3 | 0.43 |
| | Extrait aqueux | 15.6 | 5.2 |

On constate que le rendement de l'extrait hexanique est plus abondant que celui de l'extrait de l'acétate d'éthyle mais l'extrait acétate a une bonne séparation vue son profil chromatographique par rapport au profil de l'extrait hexanique. La figure 11 montre le résultat de ces profils chromatographique après révélation à la vanilline sulfurique.

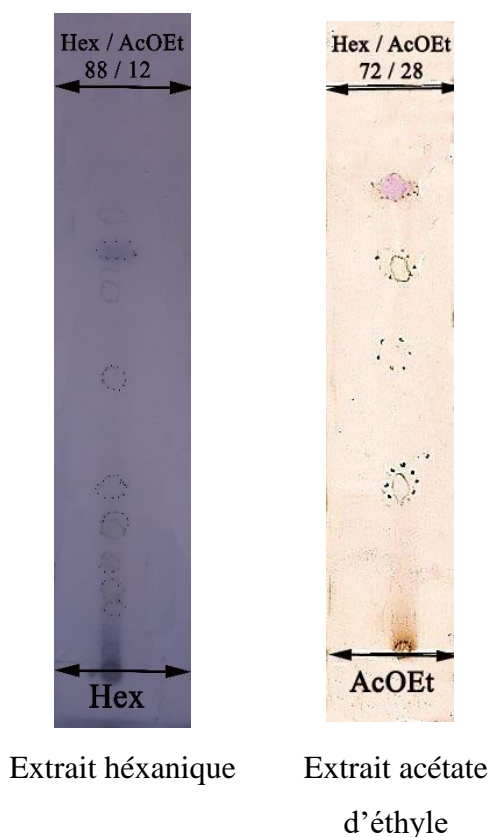
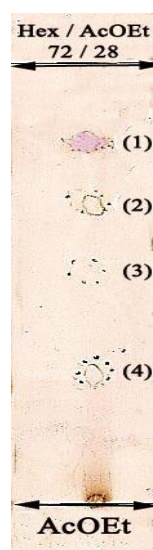


Figure 11 : Profil chromatographique des extraits hexanique et acétate d'éthyle

II.2.1. Résultat de la CCM de la fraction acétate d'éthyle

La chromatographie sur couche mince de l'extrait acétate d'éthyle a permis de connaître le nombre minimal de produit présent et aussi de trouver le système de solvant adéquat pour la séparation. On constate une bonne séparation de l'extrait acétate d'éthyle avec un système d'élution Hexane / Acétate d'éthyle (72 / 28). La figure 12 nous montre le profil chromatographique de cet extrait acétate d'éthyle qui présente au moins quatre taches.



Adsorbant :

- Gel de silice 60 F₂₅₄

Phase mobile :

- Hexane / acétate (72 / 28)

Révéléteur : vanilline sulfurique

Figure 12 : CCM de l'extrait acétate d'éthyle.

On en déduit qu'il y a au moins quatre taches dans l'extrait acétate d'éthyle avec un système d'élution Hex / AcOEt (72/ 28).

Tableau IX : Résultat de la chromatographie sur couche mince de l'extrait acétate d'éthyle

| n° des taches | Rf | Colorations | | | |
|---------------|---------|-------------|------------------|------------------|----------------------|
| | | A l'œil nu | $\lambda=254$ nm | $\lambda=365$ nm | Vanilline sulfurique |
| 1 | 0.83 cm | - | Noir | Rouge | Rose Violacé |
| 2 | 0.67 cm | - | - | Rouge | - |
| 3 | 0.53 cm | - | - | Rouge | - |
| 4 | 0.20 cm | - | Noir | Bleu claire | - |

II.2.2. Résultat du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle

Le fractionnement de 1,2 g de l'extrait acétate d'éthyle a permis d'obtenir 460 fractions. La variation du système d'éluant utilisé pendant l'élution et le regroupement des fractions sont représentés dans le tableau X :

Tableau X : Résultat du fractionnement

| | Fractions regroupées | Éluant | Masse (mg) |
|---|----------------------|--------------------------|-------------|
| Solvant d'élution Hexane / Acétate d'éthyle | | | |
| E ₀ | 0 | (100 / 0), (95 / 5) | 13.9 ± 0.1 |
| E ₁ | 1 à 5 | (90 / 10) | 4.0 ± 0.1 |
| E ₂ | 6 à 75 | (85 / 5), (80 / 20) | 25.6 ± 0.1 |
| E ₃ | 76 à 120 | (75 / 25), (75 / 28) | 147.8 ± 0.1 |
| E ₄ | 121 à 254 | 70 / 30), ... (45 / 55) | 305.5 ± 0.1 |
| E ₅ | 255 à 285 | (40 / 60), (35 / 65) | 95.3 ± 0.1 |
| E ₆ | 286 à 410 | (30/70) | 131.7 ± 0.1 |
| Solvant d'élution Acétate / Méthanol | | | |
| E ₇ | 411 à 430 | (95 / 05), ... (60 / 40) | 20.9 ± 0.1 |
| E ₈ | 431 à 450 | (0 / 100) | 234.8 ± 0.1 |
| E ₉ | 451 à 460 | (0 / 100) | 6.2 ± 0.1 |

II.2.3. Résultats de la deuxième colonne : extrait n°3 noté E₃

L'extrait n°3 noté E₃ a été ensuite fractionné, il nous a permis d'obtenir 11 regroupements présenté comme suit :

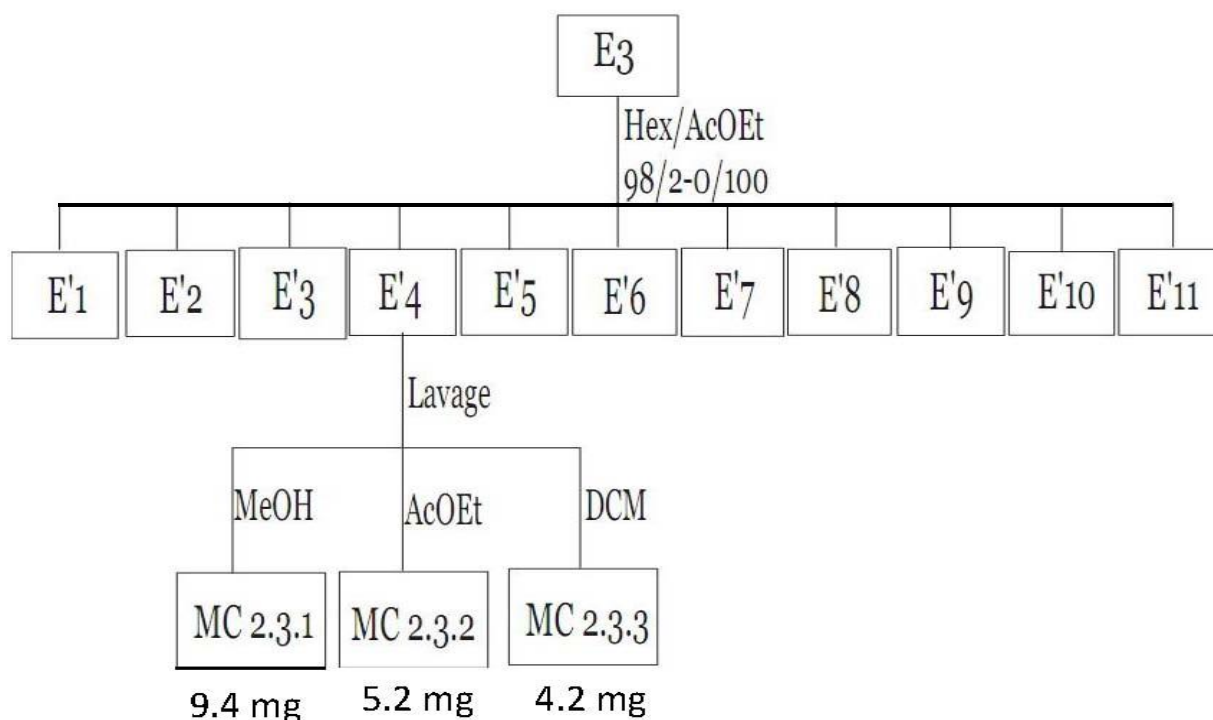


Diagramme 3 : Résultat du fractionnement de l'extrait n°3

Trois produits ont été obtenu après lavage avec du DCM, AcOEt et MeOH. Les produits : MC2.3.1 (9.4 mg), MC2.3.2 (5.2 mg), MC2.3.3 (4.2 mg), dont le produit MC2.3.1 (9.4 mg) soluble dans du MeOH a été analysé par spectroscopie RMN.



Aspect : poudre blanc
Masse = 9.4 mg

Figure 13 : Produit MC2.3.1

La figure 14 montre le profil chromatographique du produit MC2.3.1 révélés aux rayonnements UV, à la vanilline sulfurique et au réactif de Liebermann-Burchard.

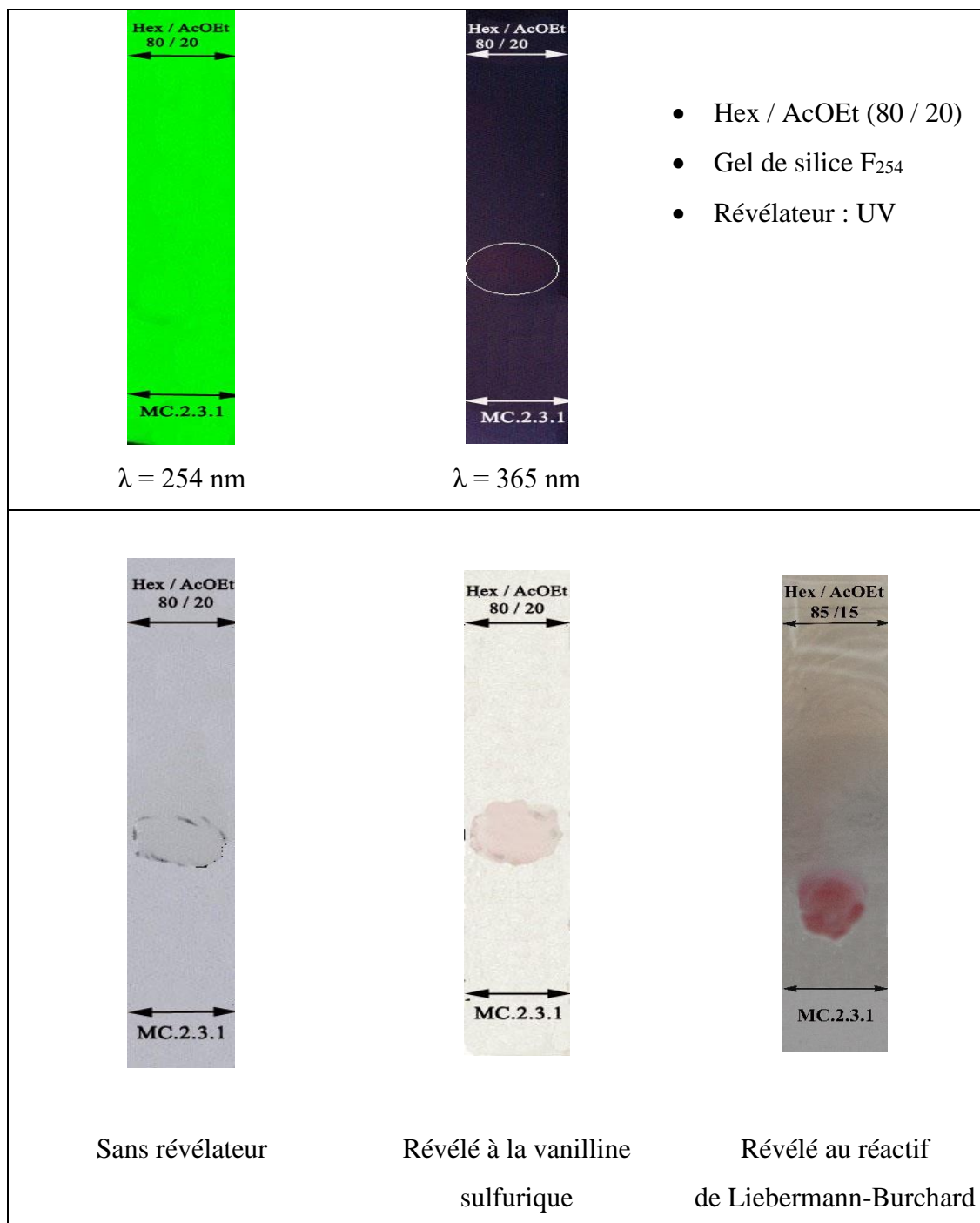
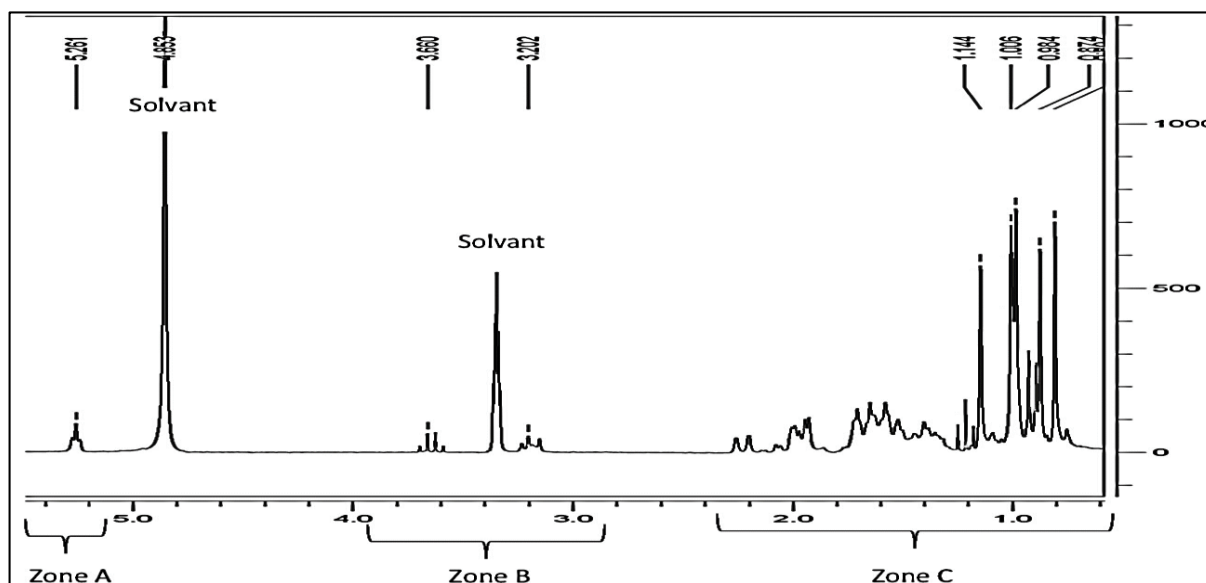


Figure 14 : Chromatographie sur couche mince du produit MC2.3.1

D'après la couleur du produit MC2.3.1 révélé avec le réactif de Liebermann-Burchard suggère qu'il pourra être un triterpène.

III. Résultat des analyses spectrales

Les spectres du produit MC2.3.1 ont été analysés par spectroscopie RMN. On a obtenu deux spectres monodimensionnels : le spectre RMN ^1H et le spectre RMN ^{13}C APT J modulé.

III.1. Analyse du spectre RMN ^1H monodimensionnel de MC2.3.1Figure 15 : Spectre RMN ^1H du produit MC2.3.1

Le spectre RMN ^1H monodimensionnel du produit MC2.3.1 est donné sur la figure 15.

Le CD_3OD et H_2O sont les solvants utilisés pour l'enregistrement de ce spectre. Les valeurs de déplacement chimique à $\delta = 4.80$ ppm et $\delta = 3.35$ ppm sont attribuées à ces solvants.

Zone A :

- Un signal à δ ppm = 5.3 caractéristique d'un proton éthylénique est détecté.

Zone B :

- Aux environs des champs faibles résonnent les protons voisins d'un groupe électro-négatif (OH, F, Cl etc...) dont les déplacements chimiques sont en général compris entre 3 et 5 ppm du TMS [50]. Sur notre spectre RMN ^1H , des signaux sont localisés à δ ppm = 3.2 et 3.6, on peut les attribuer aux protons liés à un ou des carbones qui sont liés de près à un hétéroatome ou un carbone portant un hydroxyle.

Zone C :

- Une forêt de pic est observée de 0.6 ppm à 2,3 ppm, les pics intenses supposent des groupements méthyles $-\text{CH}_3$ et méthylènes $-\text{CH}_2-$ d'une chaîne hydrocarbonée aliphatique. Les pics intenses qui sont aux nombres de sept (7), respectivement à 1.14 ppm, 1.00 ppm, 1.00 ppm, 0.98 ppm, 0.92 ppm, 0.89 ppm, 0.80 ppm sont attribués à des groupements méthyles $-\text{CH}_3$.

Tout cela corrobore l'hypothèse que ce produit MC2.3.1 est un triterpène. Il reste à trouver la structure de cette molécule.

A partir des valeurs des courbes d'intégration de chaque signal, on a pu identifier le nombre de protons présent et identifier le nombre de méthyles et les structures correspondant à chaque proton. Ceci est résumé dans le tableau XI et la figure 16.

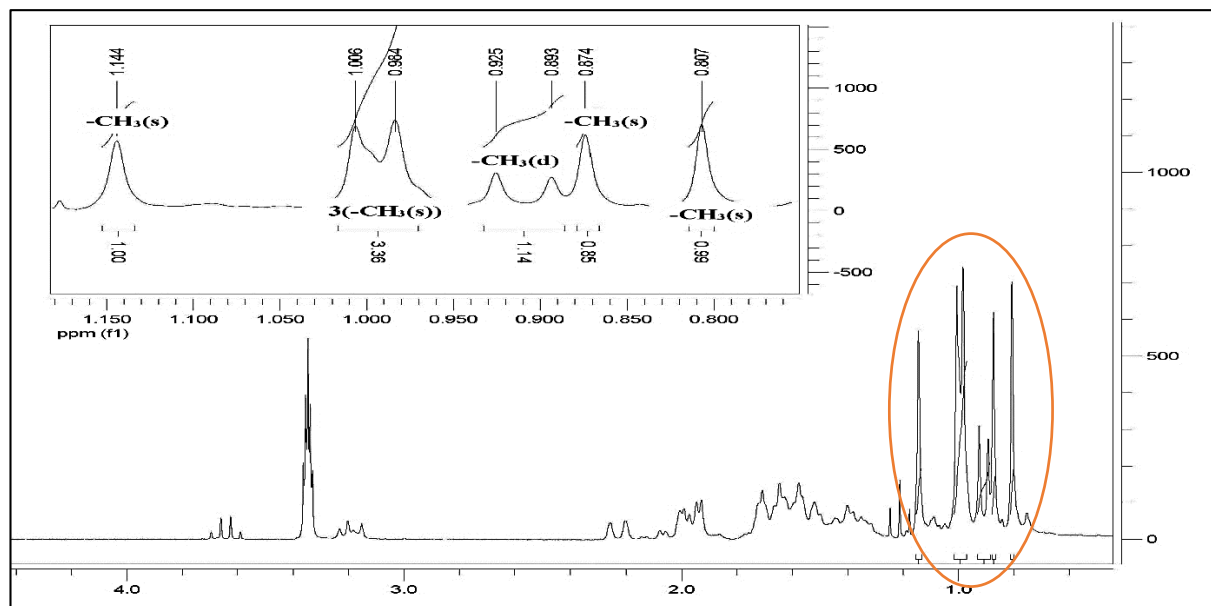
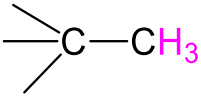
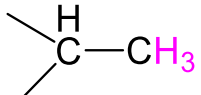
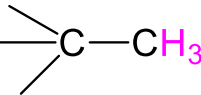


Figure 16 : Spectre RMN ^1H avec les sept (7) méthyles identifiés.

Tableau XI : Résumé de l'interprétation du spectre RMN- ^1H

| Déplacement Chimique des ^1H | Allures des signaux | Nombres de protons | Proposition de structure |
|---------------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------------|
| 5.3 ppm | Triplet (t) | 1 | |
| 3.6 ppm | Quadruplet (q) | 1 | |
| 3.2 ppm | Triplet (t) | 1 | |

| Déplacement Chimique des ^1H | Allures des signaux | Nombres de protons | Proposition de structure |
|---------------------------------------|---------------------|--------------------|--|
| 1.1 4 ppm | Singulet (s) | 3 |  |
| 1.00 ppm | Singulet (s) | 3 | |
| 1.00 ppm | Singulet (s) | 3 | |
| 0.98 ppm | Singulet (s) | 3 | |
| 0.92 ppm | Doublet (d) | 3 |  |
| 0.89 ppm | Singulet (s) | 3 |  |
| 0.80 ppm | Singulet (s) | 3 | |

On a deux squelettes de base pour un triterpène: le pentacyclique et le tetracyclique (figure 17), sur le spectre RMN ^1H , on y trouve la présence d'un site protonique avec un seul proton voisin de trois proton correspondant à un méthyle (H 0.91ppm) cas du squelette A ($^1\text{H}_{20}$ voisin de 3 $^1\text{H}_{21}$ = 0.91 ppm), le squelette de base la plus proche est donc celle du tetracyclique : squelette stéroïde.

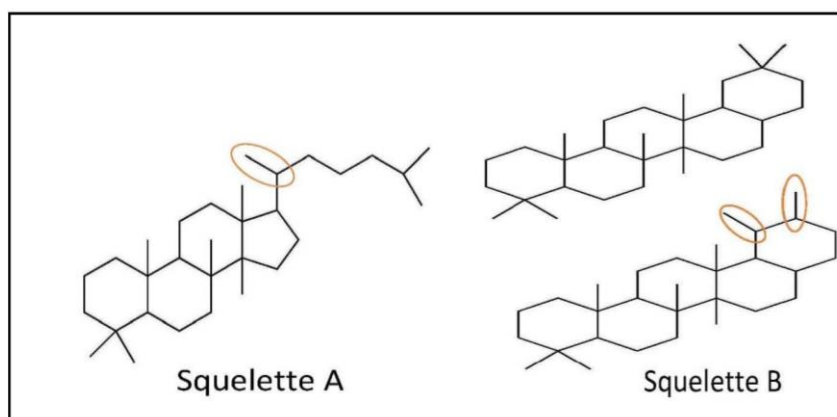


Figure 17 : Squelette de base des triterpènes : squelette A: tetracyclique et squelette B: pentacyclique

En résumé, on a un (1) proton éthylénique, deux (2) -CH- en 3.6 ppm et 3.2 ppm portant chacun un hétéroatome, un squelette de base sterane et sept (7) -CH₃ (figure 18).

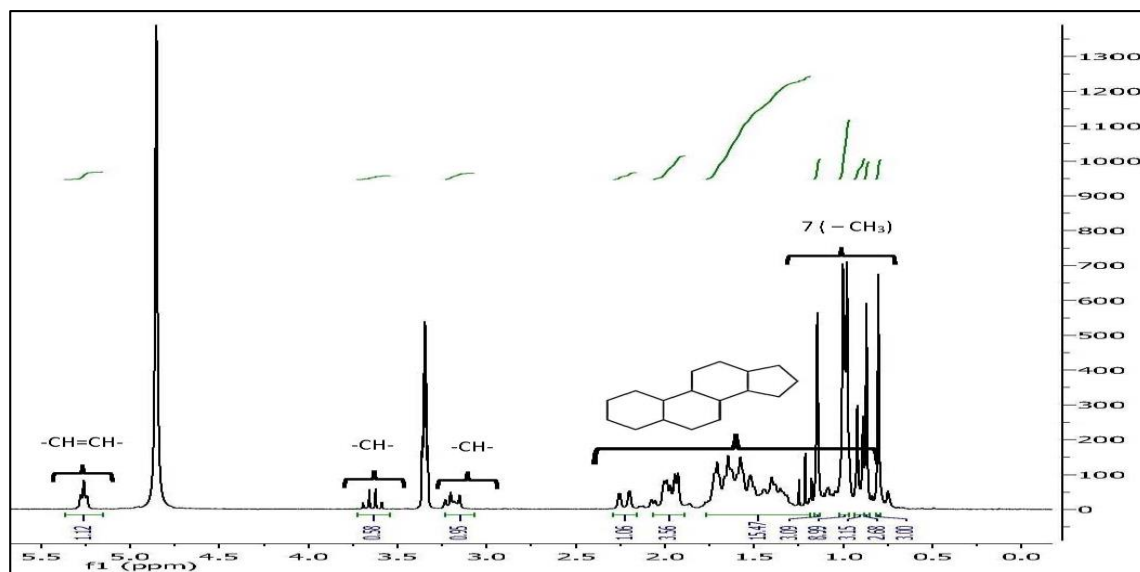


Figure 18 : Structures correspondantes au spectre RMN ¹H du produit MC2.3.1

III.2. Analyse du spectre RMN ¹³C monodimensionnelles

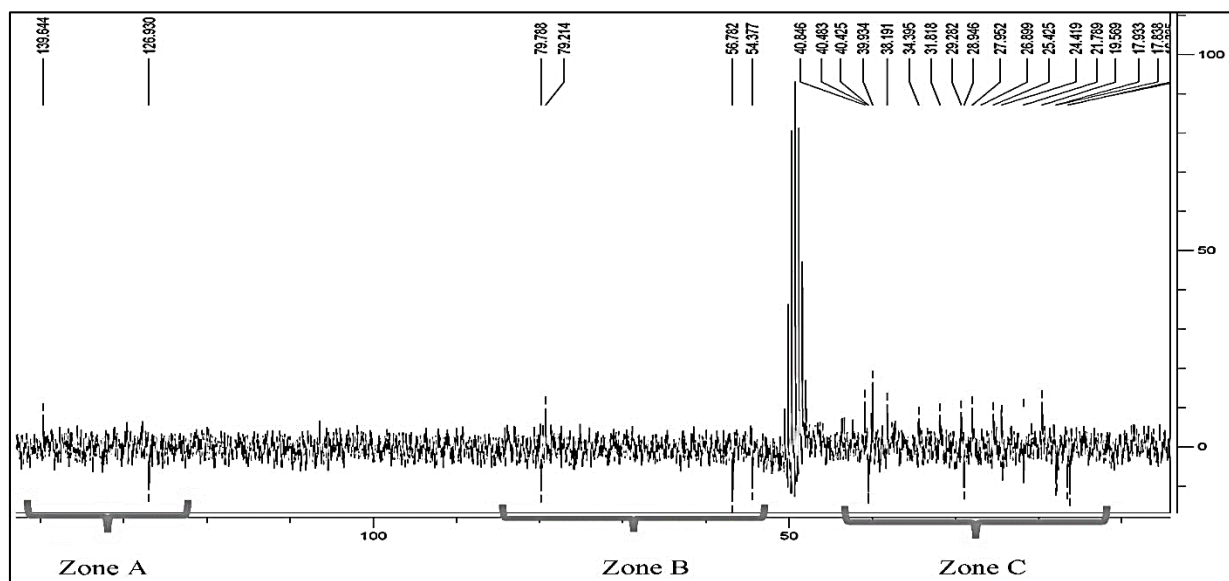


Figure 19 : Spectre RMN ¹³C APT J modulé.

Les intenses signaux à δ ppm = 50 représentent le solvant méthanol deutérié CD₃OD.

L'analyse de spectre de carbone APT J modulé montre 28 atomes de carbone avec chevauchement.

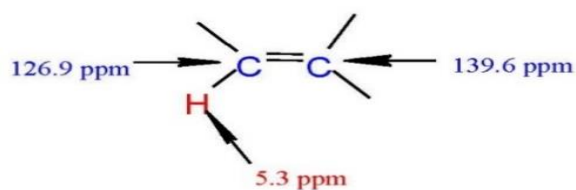
Le tableau XII montre les valeurs de déplacement chimiques correspondant aux CH₃-, -CH- et -CH₂-, Cq.

Tableau XII : Valeurs de déplacements chimiques présents dans le spectre RMN ^{13}C APT (J mod)

| Carbones | | |
|--------------------------------------|-------------------|--------|
| -CH ₂ - et C _q | CH ₃ - | -CH- |
| 139.64 | 28.94 | 126.92 |
| 79.21 | 24.34 | 79.78 |
| 43.61 | 21.78 | 56.78 |
| 43.33 | 17.93 | 54.37 |
| 40.84 | 17.83 | 40.48 |
| 40.08 | 16.54 | 40.42 |
| 39.93 | 16.23 | |
| 38.19 | | |
| 34.39 | | |
| 31.81 | | |
| 29.28 | | |
| 27.95 | | |
| 25.42 | | |
| 24.46 | | |
| 19.56 | | |
| Totale = 28 carbones | | |

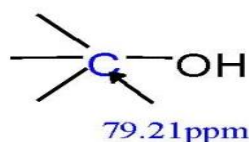
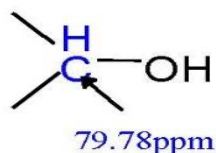
Zone A :

- Les deux signaux à $\delta = 139.64$ ppm et 126.92 ppm confirment la présence d'une entité éthylénique dans la structure. Or, on a un seul proton éthylénique, d'où C (126.92 ppm) est un carbone quaternaire et C (139.64 ppm) un méthyne -CH-.



Zone B :

- $\delta = 79,78$ ppm et 79,21 ppm sont les carbones portant des hydroxyles.



- Les signaux à δ ppm = 56.77 et 54.36 se trouvent en position négative, ils correspondent à deux méthynes.

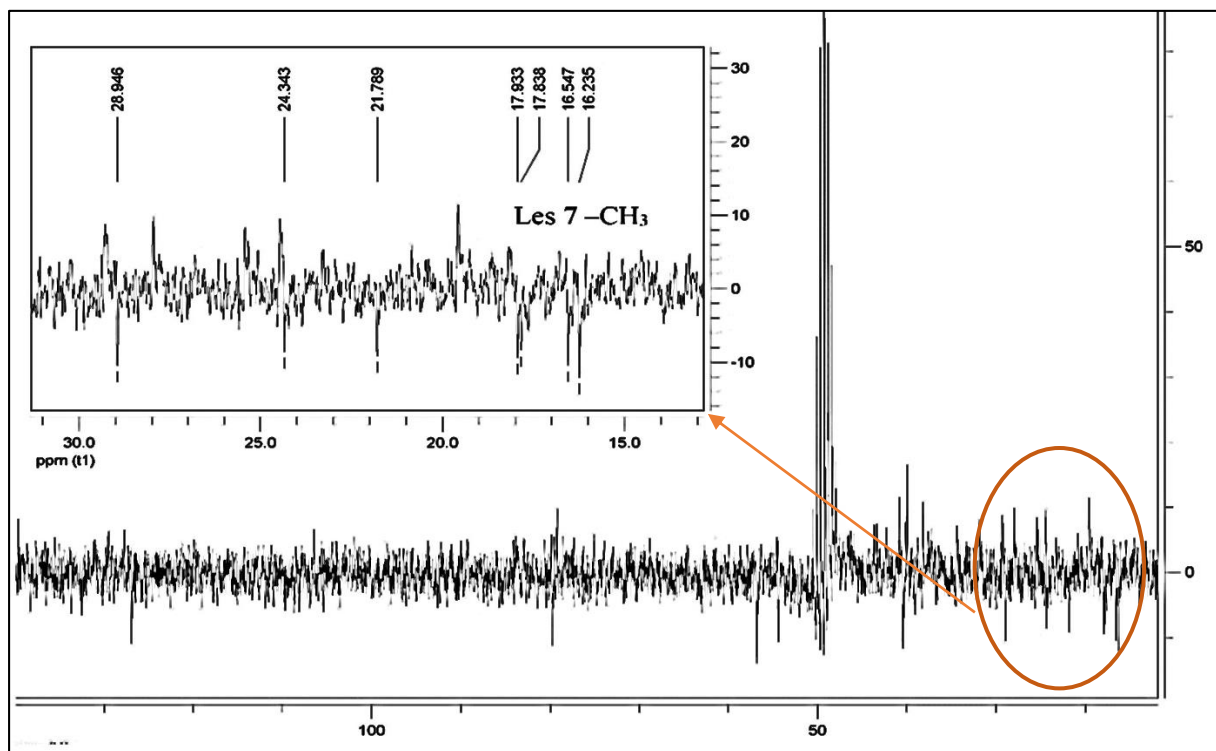


Figure 20 : Spectre RMN APT modulé avec les valeurs de déplacements chimiques des méthyles.

En combinant les informations obtenues du spectre RMN ^1H à ce du spectre ^{13}C , on en déduit les structures suivantes :

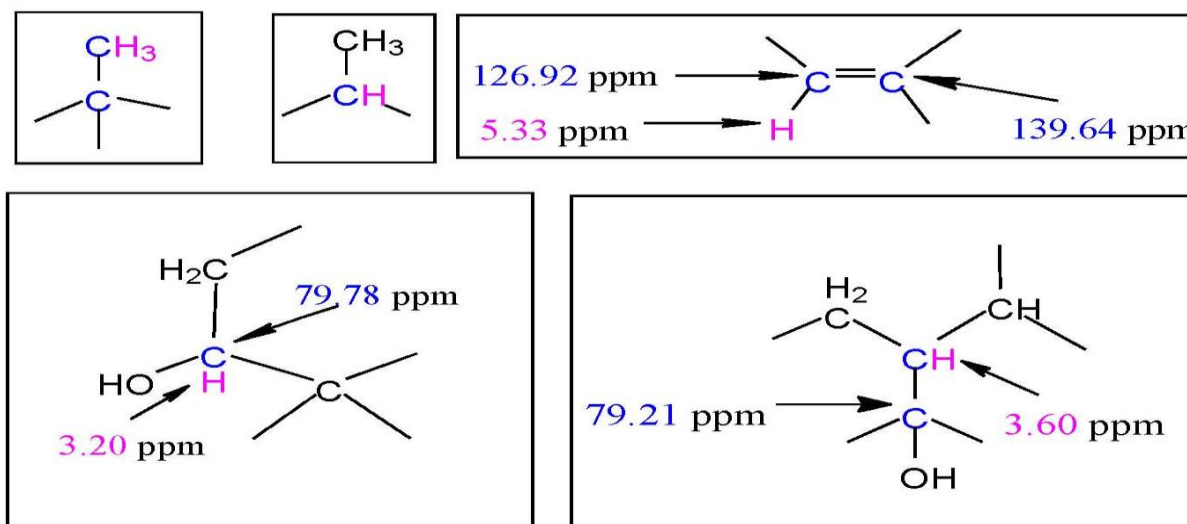


Figure 21 : Quelques structures obtenues des deux spectres.

Tableau XIII : Comparaison des déplacements chimiques du produit MC3.2.1 et celui des littératures.

| Carbones | Littérature P1 [51] | Littérature P2 [52] | Littérature P3 [53] | MC2.3.1 |
|------------|----------------------------------|------------------------|------------------------|-------------|
| C1 | 41.0 | 40.2 | 39 | 40.0 |
| C2 | 25.3 | 27.1 | 27.4 | 29.2 |
| C3 | 81.0 | 91.2 | 78.9 | 79.7 |
| C4 | 74.6 | 41.4 | 39 | 40.8 |
| C5 | 50.5 | 62.3 | 55.9 | 54.3 |
| C6 | 76.1 C β | 68.9 | 18.3 | 19.5 |
| C7 | 45.2 | 46.9 | 35.3 | 34.3 |
| C8 | 76.5 C β | 42.7 | 40.4 | 43.6 |
| C9 | 57.7 | 55.2 | 50.7 | 56.7 |
| C10 | 36.8 | 39.8 | 37.1 | 39.9 |
| C11 | 19.4 | 40.8 | 21.6 | 25.4 |
| C12 | 42.8 | 215.1 | 27.6 | 27.9 |
| C13 | 45.4 | 57.3 | 42.3 | 40.4 |
| C14 | 66,5 | 56.8 | 50.3 | 79.2 |
| C15 | 70.1 α | 32.8 | 31.2 | 43.3 |
| C16 | 41.6 | 25.2 | 24.9 | 24.4 |
| C17 | 56.0 | 44.8 | 49.9 | 56.7 |
| C18 | 15.4 | 17.8 | 15.5 | 17.9 |
| C19 | 18.7 | 17.7 | 16.2 | 17.8 |
| C20 | 36.3 | 75.1 | 75.4 | 40.4 |
| C21 | 19.1 | 26.0 | 25.4 | 21.7 |
| C22 | 33.6 | 42.2 | 40.5 | 38.1 |
| C23 | 31.6 | 24.1 | 22.6 | 31.8 |
| C24 | 78.2 Cα | 126.1 | 124.8 | 126.9 |
| C25 | 34.6 | 132.2 | 131.5 | 139.6 |
| C26 | 17.6 | 25.9 | 25.7 | 24.3 |
| C27 | 19.6 | 17.9 | 17.7 | 16.5 |
| C28 | - | 31.3 | 28.0 | 28.9 |
| C29 | - | 16.9 | 15.4 | 16.2 |
| C30 | - | 17.6 | 16.5 | - |

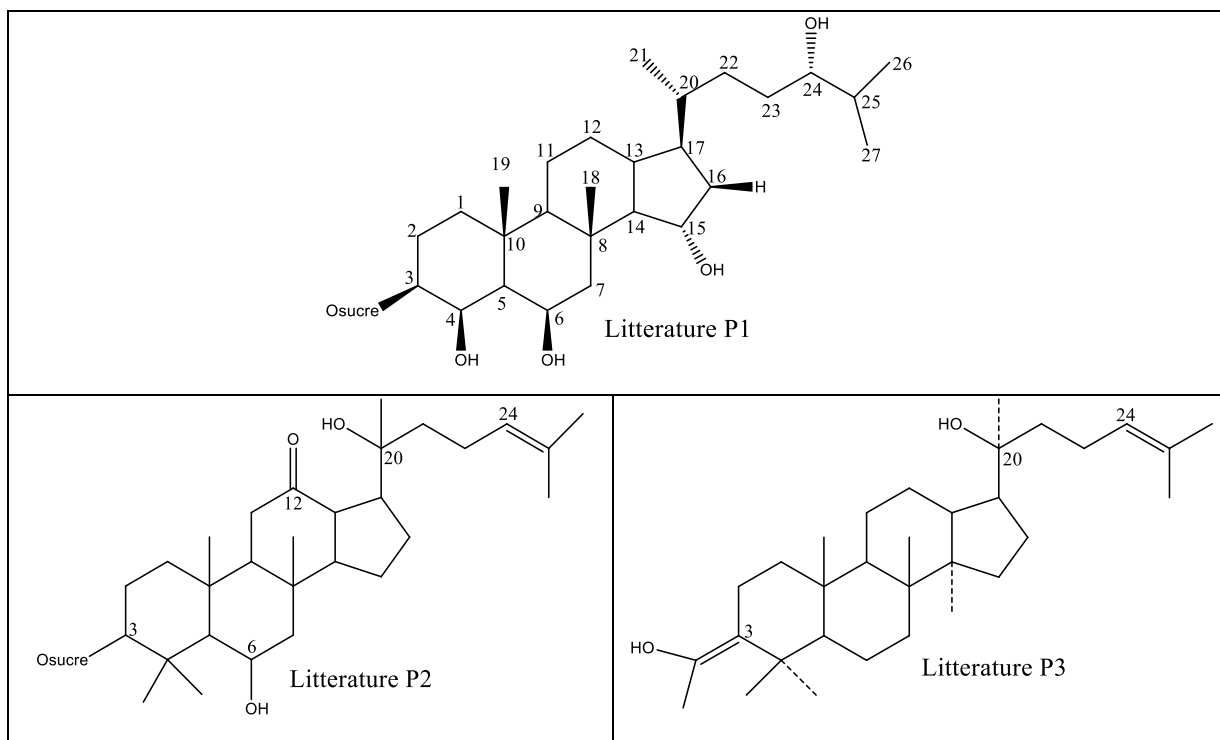


Figure 22 : Structures correspondant à chaque littérature P1, P2, P3

Et en comparant les déplacements chimiques obtenus du spectre RMN ^{13}C aux littératures, on a donné l'hypothèse de structure (figure 23).

Explication pour les positions des hydroxyles portés par C (79.7 ppm) et C (79.2 ppm) ainsi que les causes de ses déblindages.

Le déplacement chimique du carbone porteur de l'hydroxyle est en générale autour de 71 ppm s'il n'y a pas de diméthyle en C₄.

- Le déblindages de ce déplacement chimique aux environs de 78 ppm et/ou plus se constate pour les triterpènes porteur de sucre en C₃ ou simplement lié à un C_q porteur de deux méthyles. Or, d'après les spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C du produit MC.2.3.1, il n'y a pas de protons osidiques ni de carbones correspondant à une structure osidique. la seule structure possible est donc **HO-CH-C(CH₃)₂-**.
- On peut remarquer aussi que la position devant ou derrière le plan (en α ou en β du carbone porteur de -OH) des hydroxyles influence aussi les déplacements chimiques des carbones porteurs. on peut voir cela sur le tableau XIII dans la littérature P1.
- En C₁₄ il devrait y être un méthyle mais ici, notre méthyle est remplacé par de l'hydroxyle.

➡ On peut donc affirmé que C (79.7 ppm) est en position 3 et C (79.2 ppm) porté par le carbone C₁₄.

Tout en considérant les données obtenues des deux spectres RMN et en comparant les valeurs de déplacement chimiques du produit MC 2.3.1 à ceux de la littérature (tableau XIII) , on constate qu'il y a ressemblance de près aux valeurs de déplacement chimique du Dammarènediol, on peut proposer comme hypothèse que c'est un dérivé du Dammarènediol : le Dammar-24-èn-3,14-diol (figure 23) , Le reste se base et se confirme donc par une étude approfondie des spectres RMN 2D et la comparaison à la littérature pour la confirmation de l'emplacement de ses valeurs de δ ppm mais aussi pour savoir la structure exacte.

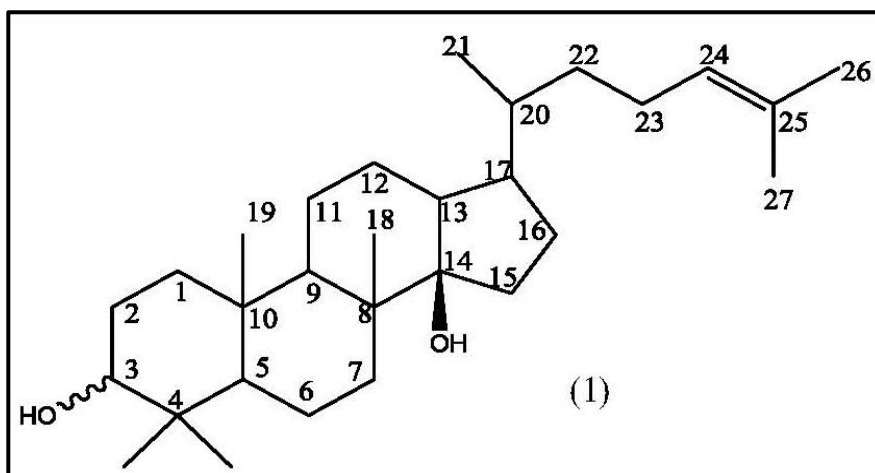


Figure 23 : Produit MC2.3.1 : Dammar-24-èn-3,14 β -diol.

(1) systématiquement appelé : 3,14-dihydroxy- 4, 4, 8, 10-tetraméthyl-17-[1,5-diméthylhex-4-ènyl] cyclopentaphenantrane.

IV. Résultat du test anti ulcéreux

IV.1. Résultats des essais préliminaires

On a constaté plusieurs lésions sur chaque estomac prélevé, suite à ces essais préliminaires, ces résultats sont présentés sur le tableau XIV :

Tableau XIV : Résultat du test préliminaire sur les rats:

| Nb rats | Nb estomac cotés | | | | Moyenne de cotation \pm ESM | IU | PU |
|---------|------------------|---|---|---|-------------------------------|------|---------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | | | |
| 3 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2.66 ± 0.25 | 2.66 | 88.66 % |
| 3 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2.66 ± 0.25 | 2.66 | 88.66 % |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3.00 ± 0.00 | 3.00 | 100 % |

On remarque qu'au bout du troisième jour, on a de très bonne ulcération.

Tableau XV : Résultat du test préliminaire pour les souris

| Nb de souris | Nbre estomac cotés | | | | Moyenne cotation \pm ESM | IU | PU |
|--------------|--------------------|---|---|---|----------------------------|----|------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | | | |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3.00 \pm 0.00 | 3 | 100% |

On constate de très bonne ulcération au bout d'une heure après injection de l'ulcérogène.

IV.2. Résultat de l'activité gastro-protectrice de l'extrait de *D sarmentosa*

L'extrait étant administré aux souris (avec des doses différentes) suivi de l'agent ulcérogène : on remarque qu'après l'administration de l'agent ulcérogène, les animaux ont tout de suite des crampes abdominales. La dose 300 mg / Kg de l'extrait hydroalcoolique de *D.sarmentosa* protège efficacement l'estomac de l'ulcération par rapport au dose 150 mg / Kg. Mais ces doses sont tous deux efficace avec des pourcentages d'Inhibition supérieur à 50 %. Les résultats se présentent sur le tableau XVI.

Tableau XVI : Résultats de l'activité gastro-protectrice de l'extrait de *D sarmentosa*

| Doses utilisées | Nb souris | Nbre estomac cotés | | | | MO de cotations \pm ESM | P | % estomac présentant l'ulcère | IU | PU | % I |
|-----------------|-----------|--------------------|---|---|---|---------------------------|-------|-------------------------------|------|-------|---------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | | | | | | |
| 150 mg/kg | 3 | 0 | 2 | 1 | 0 | 1.330 \pm 0.256 | 0.007 | 44.44 % | 1.33 | 44.33 | 55.66 % |
| 300 mg /kg | 3 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0.660 \pm 0.256 | 0.002 | 33.33 % | 0.53 | 17.76 | 82.33 % |

IV.3. Etude de l'activité curative des ulcérations gastriques par l'extrait de *D sarmentosa*

La plante connue comme étant une plante cicatrisante, confirme son activité à partir de ce test. En effet, *D. sarmentosa* guérissent à 63 % les plaies ulcéreuses de l'estomac avec un pourcentage d'ulcération égal à 37 % et IU = 1.11 comparé au : IU témoin = 3.00, PU témoin = 100 %. Le résultat du test curatif des ulcérations gastriques est présenté sur le tableau XVII.

Tableau XVII : Résultat du test curatif des ulcérations gastriques

| Dose | Nb souris | Nb ulcère cotés | | | | Moyenne cotation ± ESM | P | IU | PU | % I |
|-------------|-----------|-----------------|---|---|---|------------------------------|-------|------|------|-----|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | | | | | |
| 300 mg / kg | 3 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0.666 ± 0.256 | 0.007 | 1.11 | 37 % | 63% |

Les résultats sont exprimés en moyenne de l'indice d'ulcère (IU) ± (DS) déviation standard, significatif avec $P < 0,05$; Très significatif avec $P < 0,01$ et $P < 0,001$ *t*-test de Student (comparé au groupe témoin). La plante a des résultats très significatifs dont : le test gastro-protectrice : à 150 mg / Kg, $P = 0,007$ et $P = 0,002$ pour la dose 300 mg / Kg. La dose 300 mg / Kg étant la plus efficace, c'est la dose qu'on a utilisé pour le test curative, $P = 0,007$. Cette dose de 300mg/kg ont donné un résultat plus significatif protège la muqueuse contre l'ulcération à 82.33% (test gastro-protectrice). Quant au test curatif, elle guérissent l'ulcération à 63 %. En bref, la plante *D.sarmentosa* présente la même vertu que celle utilisé en Nigeria.

Conclusion et perspective

Ce travail est une contribution à l'étude chimique d'une plante médicinale se trouvant à Madagascar, *Diodella sarmentosa* de la famille RUBIACEAE appelé couramment «Lelamenarana» utilisée par la population Malgache pour soigner les plaies, connues aussi sous l'effet thérapeutique de plante antiulcéreuse, anti-malaria dans d'autre pays. Il s'agit de la seconde étude phytochimique des plantes du genre *Diodia*, précisément, la première étude chimique faite sur *D. sarmentosa*.

L'isolement des molécules, l'élucidation de la structure d'un produit isolé et étude de l'activité antiulcéreuse de *Diodella sarmentosa* (RUBIACEAE) sont les principaux objectifs de ce travail.

L'isolement des molécules conduit à l'obtention de trois produits purs et l'élucidation de la structure moléculaire du produit nommé MC2.3.1 avec comme hypothèse de structure le Dammar-24-èn-3,14β-diol.

La détermination des structures des deux autres produits et la confirmation de la structure exacte de MC2.3.1 sont des travaux à faire ultérieurement ainsi que l'isolement de la molécule responsable de l'activité antiulcéreuse.

Les criblages phytochimiques ont montré la présence des triterpènes, stéroïdes, stérol insaturé, tanins et leucoanthocyanes mais l'absence des alcaloïdes, flavonoïdes, polysaccharides, saponines, quinones, stéroïdes lactoniques et polyphénols.

L'étude de l'activité antiulcéreuse a montré que l'extrait hydroalcoolique est plus efficace à 300 mg/kg pour le test gastro protectrice et moyennement efficace pour le test curatif. Les activités de l'enquête ethnobotanique feront l'objet d'une étude approfondie ultérieure. De plus l'isolement des principes actifs se fera par une extraction bioguidée afin de déterminer la structure de la molécule responsable de chaque activité thérapeutique.

Bibliographie

- [1] SCHATZ, E.G., Flore générique des Arbres de Madagascar, Royal Botanical Gardens, Kew & Missouri Botanical Garden, 2001, 4-7, 118-123.
- [2] BOITEAU, P., ALLORGE, L., Plantes médicinales de Madagascar, Ed 2000.
- [3] Z. R. e. coll., Notes on malagasy plants utilized in the traditionnal pharmacopoeia. in: First International Congress of Ethnopharmacology Strasbourg (France)., 1990.
- [4] P. A. Akah, J. I. Okogun et T. O. Ekpendu, Antioedema and analgesic actions of *Diodia scandens* extract in rats and mice., *Phytother. Res.*, 7: 317-319, 1993.
- [5] P. I. Akubue, R. B. F. Langason et D. N. Akunyili, *Fitoterapia*, 65, 235, 1994.
- [6] N. P. Onuaguluchi G, Pharmacological basis for the use of the antivenene water soluble extract of *Diodia scandens* as a laxative, oxytocic agent and a possible aphrodisiac in traditional medicine practice in eastern : nigeria., *Phytother Res* 13(6): 459-463, 1999.
- [7] P. A. Akah, O. E. Orisakwe, K. S. Gamaniel et A. Shittu, Evaluation of Nigerian traditional medicines: II. Effects of some Nigerian folk remedies on peptic ulcer, *J. Ethnopharmacol.*, 62: 123-127., 1998.
- [8] J. H. Lee, C. H. Ku, N. I. Baek, S. H. Kim, H. W. Park et D. K. Kim, phytochemical constituents from *Diodia teres*, *Arch. Pharm. Res*, 2004.
- [9] C. H, Evaluation of anti-diabetic and nephroprotective activities of *Diodia teres* walt, 2011, Rajiv Gandhi University of Health Sciences, Karnataka, Bangaluru.
- [10] G. P. SHING, Evaluation of the antifungal properties of twelve Medicinal plants and isolation of active compounds from *nepenthes gracilis*, August 2013.
- [11] P. G. V. B. T. C. L. T. ., N. S. H. O. K.S. Khoo, antifungal and antibacterial properties of three medicinal plants from malaysia, *ActaHortic* 1023.15, 2014.
- [12] A. E. O. Gideon Ikechukwu Ogu, In vitro control of Anthracnose disease of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) caused by *Colletotrichum destructivum* O’Gara with *Cyathula prostrata* L. and *Diodia scandens* SW leaf extracts, 2012.
- [13] U. A. B. D. N. A. J. A. Essiett, Pharmacognostic Studies of the Leaves and Stem of *Diodia scandens* Sw in Nigeria, 2 (5):184-198, 2010.
- [14] J. I. O. T. O. E. P. A. Akah, Antioedema and Analgesic Actions of *Diodia*, *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, VOL. 7,317-319, 1993.

- [15] S. E.-E. O. E. F. Ojo, In-Vitro Antibacterial Time-Kill Assay Of *Phyllanthus Amarus* And *Diodia Scandens* Crude Extracts On *Staphylococci* Isolated From Wounds And Burns Patients, August 2013 || PP.09-13.
- [16] E. F. U. A. Ojo S.K.S., Antimicrobial Effect of *Diodia scandens* and *Phyllanthus amarus* on Multi-drug Resistance Pattern of *Staphylococci* from clinical Sources of Surgical Unit of Tertiary Hospital, *American Journal of Drug Discovery and Development* 3 (4): 271-278, 2013.
- [17] E. G. N. B. S. S. Walter Erhardt, *Der große Zander*. Eugen Ulmer KG, Stuttgart, ISBN 978-3-8001-5406-7, 2008.
- [18] L. B. T. C. A. Marnotte Pascal, *determination pratique de 14 rubiacées, adventices d’Afrique de l’Ouest du Centre*. Salamero J., *Agriculture et Développement* (11) : 68-76, 1996.
- [19] N. M. & E. L. Bacigalupo, New combinations in the genus *Diodella* (Rubiaceae, Spermacoceae), *DARWINIANA* 44(1): 98-104., 2006.
- [20] N. M. S. A. O. M. S. E. C. Ago-Iwoye, From ‘Vagabonds’ to Ethnobotanical Relevance: Weeds of the Campus Sites of Olabisi Onabanjo University, *Ethnobotanical Leaflets* 14: 546-58, 2010.
- [21] C. P. A. D. Y. H. A. V. G. D. S. Seindé Espérance Mèdoatinsa, Ethnobotanical study of plants used by the lacustrine population of southern Benin in the treatment of malaria, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 5(6): 430-436, 2016.
- [22] T. v. A. Alexandra M. Towns, Comparing local perspectives on women’s health with statistics on maternal mortality: an ethnobotanical study in Bénin and Gabon, in *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14: 113., 2014.
- [23] C. J. e. H. RA, *Dictionary of Terpenoids*. New York: Chapman and Hall., 1992.
- [24] B. J., *Pharmacognosie, Phytochimie, Plante médicinales*, Lavoisier Technique & Documentation, 3ème éd., Paris, pp. 1120, 2008.
- [25] M. T., *Nouvelles méthodologies d’extraction, de fractionnement et d’identification : application aux molécules bioactives de l’argousier (Hippophaë rhamnoides)*, thèse de Doctorat, Université d’Orléans, 2011.
- [26] N. B. R. L. L.S. Padua, *Plant Resources of South-East Asia*, 12, 1999.
- [27] A. E. HAIB, *Valorisation de terpenes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques*, 2011.
- [28] E. Breitmaier, *Terpenes, Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*, Ed. Wiley-VCH, ISBN-13 978-3-527-31786-8.

- [29] B. Harkati, Valorisation et identification structurale des principes actifs de la plante de la famille asteraceae: scorzonera undulata., 2011.
- [30] M. M.-T. G. P. K. J. S. T. Krief S, Novel antimalarial compounds isolated after the survey of self-medicative behavior of wild chimpanzees in Uganda., *Antimicrob Agents Chemother*, 48:3196-3199., May 2004.
- [31] K. Klyne, La chimie des stéroïdes., 1966., p. p. p13. .
- [32] G. A., Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux, Support de cours sur le métabolisme secondaire, Université de Rennes, 2008/2009.
- [33] M. Emmanuel, La résonnance magnétique nucléaire (Apprentissage à l'interprétation des spectres à une ou deux dimensions des chaines O-glycanique., 2009.
- [34] C. e. R. D. Ducauze, La spectroscopie RMN. chapitre 2, 2005.
- [35] F. B. M. C. J. D. T. T. L. C. J. F. Gimenez, Traitement de l'ulcère gastro-duodéal dans Pharmacie Clinique et Thérapeutique, Edition Masson, Paris, 1065 p, 2000.
- [36] F. GW, Disease of the stomach and duodenum. In: Andreoli ThE, editor. Cecil essentialsof medicine., 5th ed. Edinburgh: W.B. Saunders Company;of medicine. p. 334-343., 2000.
- [37] D. H. Kent-Lloyd KC, .Peripheral regulation of gastric acid secretion, In: Johnson LR editor. Physiology of the gastrointestinal tract. New York: Raven Press. p. 1126-1185., 1994.
- [38] S. S. Glavin GB, Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal, mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. *FASEB J.*;6:825-831., 1992.
- [39] R. M. R. S. e. a. Ramanampamonjy RM, Séroprévalence de l'infection due à Helicobacter pylori dans un échantillon de population malgache, *Bull Soc Pathol Exot* ; 100:57-60., 2007.
- [40] T. R. R. R. R. F. Z. R. R. R. S.H. Razafimahefa, infection à Helicobacter pylori : revue de la littérature et réalités à Madagascar, Helicobacter pylori infection : literature review and realities in Madagascar, *Rev. med. Madag.* ; 2 (2)/ 125 – 131., 2012.
- [41] N. I. o. H. C. Conference, Helicobacter pylori in peptic ulcer disease, NIH consensus development panel on H. pylori in peptic ulcer disease *JAMA* 272: 65-69., 1994.
- [42] Etudes ethnobotanique, pharmacologique et chimique des plantes utilisées dans le traitement des dermatoses "MWANDZA", *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, Vol. 9, pp. 85-93., 1997.
- [43] K. B. Z. G. N. T. D. A.-A. L. N'GUESSAN K., Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire), *Sciences & Nature* Vol. 6 N°1 : 1 - 15, 2009.

- [44] D. MERCK A.E., Révélateur pour la chromatographie en couches minces et sur papier, Imprimerie de E. Merck, Darmstadt Allemagne RFA, 1-21, 1980.
- [45] D. A. MERCK E., "Révélateur pour la chromatographie sur couche mince et sur papier", p 21, 1960.
- [46] R. H. Léa, Contribution à l'étude chimique de *zanthoxylum madagascariense* Baker et de *Zanthoxylum thouvenotii* H. Perr. rutaceae activité antibilharzienne de la décarine, 2006.
- [47] A. AKLIKOKOU, M. GBEASSOR et K. NAP, Action anti-ulcéreuse de quelques plantes médicinales, 8^e colloque sur la pharmacopée et la Médecine traditionnelle africaine 23-28 Mai - Lomé., 1994.
- [48] J. LWOFF, Activité ulcérogène chez le rat, Fiche technique n° 12. Journ.Pharmacologique, 2. (1). - 81-83, 1971.
- [49] L. R. J. e. S.-H. Astudillo, Gastroprotective activity of oleanolic acid derivatives on experimentally induced gastric lesions in rats and mice, Journal of Pharmacy and pharmacology, 54, 583-588., 2002.
- [50] K. L. P. KOUADIO, analyse structurale et conformationnelle par rmn et dichroïsme circulaire d'une hormone stéroïdienne lors de la préparation d'un antigène spécifique pour le dosage radioimmunologique., 1984.
- [51] L. M. R. R. Francesco de Riccardis, Starfish saponins, 52. Chemical constituents from the starfish *echinaster brasiliensis*, Journal of Natural products, Vol. 56, No. 12, pp. 2149-2162, Décembre 1993.
- [52] Z. J. S. G. T. Y. S. X. Z. X. Z. X. a. X. X. Wu Xiaopeng, A New Dammarane-type Triterpene Saponin from the Root of *Aralia elata*, : Rec. Nat. Prod. 8:4, 422-425, 2014.
- [53] R. M. M. S. a. Y. A. Motoo Tori, ¹³C NMR Assignment of Dammarane Triterpenes and Dendropanoxide : Application of 2D Long-Range ¹³C-¹H Correlation Spectra, Magnetic resonance in chemistry Vol. 26, 581-590, 1988.

WEBOGRAPHIE

- [W1] www.biologievegetale.be
- [W2] www.tropicos.org/ Darwiniana 44(1): 100. 2006. (28 Jul 2006)
- [W3] <http://www.tropicos.org>
- [W4] <http://www.world-medical-clinic.com/nmc/biologie/articles.html>, 2010

Annexe I :

V. Préparations de réactif de criblage Phytochimique

1) Réactif de Dragendorff

Solution A

Peser 1.7 g de sous-nitrate de bismuth, 20g d'acide tartrique, les dissoudre dans 30 ml d'eau

Solution B

Peser 16 g d'iodure de potassium et les dissoudre dans 40 ml d'eau

Révélation

Au moment de l'emploi, mélanger 2.5 ml de A et 2.5 ml de B. ajouté 10 g d'acide tartrique dissout dans 50 ml d'eau

2) Réactif de Wagner

Peser 2 g d'iodure de potassium et 1.27 g d'iode

Mélanger ces produits dans un erlenmeyer de 250 ml et ajouter 100 ml d'eau

Agiter jusqu'à dissolution complète

3) Réactif de Meyer

Dissoudre 1.35 g de chlorure mercurique (II) dans 94 ml d'eau. Ajouter 5g d'iodure de potassium. Bien agiter jusqu'à dissolution complète. Ramener à 100 ml le volume total avec de l'eau.

4) Gélatine 1%

Mettre en suspension dans 100 ml d'eau, 1 g de gélatine

5) Chlorure de sodium à 10%

Dissoudre 10g de chlorure de sodium dans 100 ml d'eau

6) Gélatine salée

Mélanger un volume de la solution de la gélatine à un volume égal de la solution de chlorure de sodium à 10%

7) Acide chlorhydrique à 5%

Verser 95 ml d'eau distillée dans une éprouvette et compléter à 100 ml avec de l'acide chlorhydrique

8) Réactif de Kedde

Peser 2 g d'acide 3,5- dinitrobenzoïque et les dissoudre dans 100ml de méthanol

Préparer une solution potasse normale (5.6g de potasse dans 100 ml d'eau)

Pulvérisation

Au moment de l'emploi, mélanger à volume égal la solution d'acide et de potasse

9) Réactif de Keller-Killiani

Dissoudre 10g de chlorure ferrique dans 100ml d'eau

Au moment de l'emploi, mélanger 0.3 ml de la solution précédente de chlorure ferrique dans 50 ml d'acide acétique glacial

En prélève 3 ml du mélange pour le test de Keller- Killiani

10) Chlorure ferrique à 10% dans le méthanol

Dissoudre 1g de chlorure ferrique dans 10 ml de méthanol en agitant et en chauffant au bain-marie jusqu'à dissolution complète

VI. Préparation de la vanilline sulfurique

- **Solution A** : 3ml de H_2SO_4 concentré sont mélangés avec 50ml d'EtOH dans un erlenmeyer.

- **Solution B** : 3g de vanilline sont dissous dans 50ml d'EtOH dans un erlenmeyer.

Les solutions A et B doivent être conservées au réfrigérateur.

- **Révélation** : au moment de l'emploi, la solution A et la solution B sont mélangées à volumes égaux.

Annexe II :

VII. Matériels utilisés lors du test biologiques :

- Balance pèse souris, cages à élevage, marqueur, sondes bucco-œsophagiennes de 1ml, seringue de 5 ml, ciseaux, pince à disséquer, flacons, Becher, éprouvette gradué 10ml, verres de montre, tablette pour étaler les estomacs, loupe et règle graduée.
- Eau saline 9 %, formaline 10%, eau distillé

VIII. Préparation de l'agent ulcérogène

Pour les rats

- Dans un bécher de 100 ml, on mélange 38.3 ml d'eau distillé, 1.7 ml d'acide chlorhydrique prise à l'aide une pipette graduée ,60 ml d'éthanol 90 % prise à l'aide d'un entonnoir de 50 ml. On mélange le tout avec un agitateur magnétique.

Pour les souris

- Dans un bécher de 100 ml, on mélange 40 ml d'acide chlorhydrique (HCl) 0,3M dans l'éthanol à 60% (60 ml H₂O).

Auteur : RASOANIRINA Mampionona Michela

Adresse : laboratoire des Produits Naturelles et Biotechnologie, Mention Chimie, Ampasapito, Domaine Sciences et Technologies, BP 906, Université d'Antananarivo

Email : rmampiononamichela@gmail.com

Titre : Etude Chimique et activité antiulcéreuse de *Diodella sarmentosa* (sw) à Madagascar (RUBIACEAE).

Nombre de diagramme : 3

Nombre de figures : 23

Nombre de pages : 51

Nombre de tableaux : 17

Résumé : Les objectifs de ce travail ont été d'extraire, d'isoler et d'élucider la structure des produits, étude de l'activité anti ulcéreux de *Diodella sarmentosa* (RUBIACEAE). Le criblage phytochimique effectué sur l'extrait hydroalcoolique de ses poudres a permis de mettre en évidence la présence de leucoanthocyanes, tanins, triterpènes, stéroïdes, stérol insaturé et l'absence des alcaloïdes, flavonoïdes, polysaccharides, saponines, quinones, stéroïdes lactoniques et polyphénols. L'extraction par partage de l'extrait hydroalcoolique évaporé repris par l'eau chaude, successivement par l'hexane et l'acétate d'éthyle. Le fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle sur une colonne de silice avec gradient d'élution par hexane-acétate d'éthyle contrôlé sur CCM, a permis d'isoler le produit MC2.3.1 à partir du mélange Hex / AcOEt [80/20, v/v]. L'analyse du produit MC2.3.1 par le technique de spectroscopie RMN (^1H , ^{13}C et APT (J mod)) a permis de donner une hypothèse de sa structure. Il s'agit de Dammar-24-èn-3,14β-diol.

Mots-clés Rubiaceae, *Diodella sarmentosa*, RMN ^1H et ^{13}C APT, activité antiulcéreuse.

Abstract: The aims of this work were to extract, isolate and elucidate the structure of the products and verify the activity antiulcer of *Diodella sarmentosa* (RUBIACEAE). The phytochemical screening has been realized on the hydroalcoholic extract in this plant and has been showed the presence of leucoanthocyanes, tanins, steroids, triterpenoids. Alkaloids, flavonoids, sugars, saponins, quinones, lactonics steroids and polyphenols are absents. An extraction by partition was been realized too from this hydroalcoholic extract successively with hexane and ethyle-acetate. The fractionment realized on ethyle acetate with mix of hexane-ethyle acetate has given a product MC2.3.1. The analysis of this product by NMR (^1H , ^{13}C (APT)) spectroscopy has given the hypothese of structure: Dammar-24-ène-3, 14β-diol.

Key words: Rubiaceae, *Diodella sarmentosa*, NMR ^1H and ^{13}C APT, antiulcer activity.

Encadrant : Dr RALAMBOMANANA Dimby