

LISTE DES ABREVIATIONS

α_D^t	: Pouvoir rotatoire
d_{20}^{20}	: Densité relative à 20°C
ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
AcOEt	: Acétate d'éthyle
Bi(NO ₃) ₂	: Nitrate de bismuth
CCM	: Chromatographie sur Couche Mince
CH ₂ Cl ₂	: Dichlorométhane
CMB	: Concentration Minimale Bactéricide
CMI	: Concentration Minimale inhibitrice
CPG	: Chromatographie en Phase Gazeuse
CPG/SM	: Couplage Chromatographie en Phase Gazeuse et Spectrométrie de Masse
DPPH	: 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
EDTA	: Ethylène Diamine TetraAcétique
EtOH	: Ethanol
FeCl ₃	: Chlorure ferrique
FID	: Flame Ionisation Detector
H ₂ SO ₄	: Acide sulfurique
HCl	: Acide chlorhydrique
HE	: Huile essentielle
HgCl ₂	: Chlorure de mercure (II)
IC ₅₀	: Concentration inhibitrice à 50%
IE	: Impact électronique
IK	: Indice de Kovats
IPM	: Institut Pasteur de Madagascar
KI	: Iodure de potassium
m/z	: Rapport de la masse à la charge
NH ₄ OH	: Ammoniaque
NaHCO ₃	: Hydrogénocarbonate de sodium
Rf	: Référence frontale
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
RMN ¹³ C	: RMN du carbone 13
RMN ¹ H	: RMN du proton
SM	: Spectrométrie de Masse
SM/IE	: Spectrométrie de masse par impact électronique
TEAC	: Trolox Equivalent Antioxydant Capacity

TMS	: Tetraméthylesilane
Tr	: Temps de rétention
$\delta(\text{ppm})$: Déplacement chimique (partie par million)
\varnothing	: Diamètre intérieur
TOF	: Time Of Flight



SOMMAIRE

1-Liste des abréviations.....	i
2-Table des matières.....	iii
3-Liste des figures.....	vi
4-Liste des schémas.....	vii
5-Liste des tableaux.....	viii
6-Liste des annexes.....	ix

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
PARTIE I : TRAVAUX ANTERIEURS SUR LA PLANTE.....	3
I.1.Données botaniques.....	4
I.1.1.Classification phylogénétique.....	4
I.1.2.La famille LAURACEAE.....	4
I.1.3.Le genre <i>Beilschmiedia</i>	4
I.1.4.Description de l'espèce <i>mirophylla</i>	4
I.2.Travaux antérieurs sur le genre <i>Beilschmiedia</i>	7
PARTIE II : GENERALITES SUR LSTEROIDES ET TERPENOIDES, LE PALUDISME, LES ANTIOXYDANTS ET LA MICROBIOLOGIE.....	10
II.1.Les stéroïdes.....	11
II.2.Les terpénoïdes.....	11
II.3.Le paludisme.....	12
II.3.1. Description.....	12
II.3.2. Les antipaludéens.....	13
II.4. Activités antioxydantes.....	14
II.4.1. Définitions et propriétés.....	14
II.4.2. Radicaux libres.....	14
II.5. Activité antibactérienne.....	15
PARTIE III : TRAVAUX PERSONNELS.....	16
Chapitre 1 : Criblages phytochimiques.....	17
III.1. Criblage phytochimique.....	18
III.1.1. Matériels et méthodes.....	18
III.1.2. Résultats et discussions.....	18
Chapitre 2 : Etudes de l'huile essentielle.....	22
III.2. Etude de l'huile essentielle des feuilles de <i>Beilschmiedia microphylla</i>	23
III.2.1.Obtention et cinétique d'extraction de l'Huile Essentielle.....	23
III.2.2 Analyse de l'Huile Essentielle.....	23
III.2.3. Résultats et discussion.....	26
III.2.3.1. Etude cinétique de l'HE.....	26
III.2.3.2. Analyse par CPG.....	29
III.2.3.3. Analyse par CPG-SM.....	29
III.2.3.4. Interprétation des spectres de masse des quatre composés majoritaires.....	36
β-caryophyllène.....	36
Limonène.....	38

β-myrcène	40
(E)-β-ocimène	42
Chapitre 3 : Etudes de l'extrait des feuilles.....	44
III.3. Etude de l'extrait des feuilles de <i>Beilschmiedia microphylla</i> (HE2847F ₁₁₂).....	45
III.3.1. Isolement et analyse structurale du produit HE2847F ₁₁₂ -II.....	45
III.3.1.1. Obtention de l'extrait étudié HE2847F ₁₁₂ -II.....	45
III.3.1.2. Analyse structurale de HE2847F ₁₁₂	47
Spectre RMN ¹ H.....	47
Spectre RMN ¹³ C (Broad Band Decoupling).....	47
Procédure de l'analyse spectrale.....	47
III.3.2. Résultats et discussions.....	48
III.3.2.1. Résultats de l'obtention de HE2847F ₁₁₂ -II.....	48
III.3.2.2. Analyse structurale.....	52
Identification des spectres.....	52
Interprétation des spectres.....	52
Identification du solvant.....	52
Elucidation structurale de HE2847F ₁₁₂ -II.....	52
Chapitre 4 : Travaux biologiques.....	60
III.4. Etudes biologiques	61
III.4.1. Matériels	61
III.4.1.1. Les germes utilisés.....	61
III.4.1.2. Milieux de cultures.....	61
III.4.1.3. Extraits à tester.....	62
III.4.2. Méthodes.....	62
III.4.2.1. Tests antiplasmodiaux.....	62
III.4.2.1.1. Culture des parasites.....	62
III.4.2.1.2. Evaluation de l'activité antiplasmodiale.....	62
III.4.2.2. Tests antioxydants.....	63
III.4.2.2.1. Evaluation préliminaire par la méthode bioautography.....	63
Principe de la méthode bioautography.....	63
Mode opératoire	63
III.4.2.2.2. Evaluation de l'activité antioxydant par la méthode de DPPH	
Principe de la méthode de DPPH.....	63
Mode opératoire.....	64
III.4.2.2.3. Evaluation de l'activité antioxydant par la méthode d'ORAC.....	64
La méthode d'ORAC.....	64
Mode opératoire.....	65
III.4.2.3. Evaluation des activités antimicrobiennes.....	66
III.4.2.3.1. L'antibiogramme.....	66
III.4.2.3.2. Méthode de disque.....	66
III.4.2.4. La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB).....	67
III.4.2.4.1. Détermination de la CMI et de la CMB.....	67
III.4.2.4.2. Evaluation des activités anti-moisissures.....	68
III.4.3. Résultats de l'étude Biologique et Microbiologique.....	69
III.4.3.1. Résultats des analyses antiplasmodiales de <i>Beilschmiedia microphylla</i>	69
III.4.3.2. Evaluation des activités antioxydantes de <i>Beilschmiedia microphylla</i>	71
III.4.3.2.1. Evaluation préliminaire (test par CCM).....	71
III.4.3.2.2. Activité antioxydante par la méthode de DPPH.....	72
III.4.3.2.3. Activité antioxydant par la méthode d'ORAC.....	73

III.4.3.3. Evaluation des activités antimicrobiennes.....	73
III.4.3.3.1. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits HE2847F et HE2847F ₂	73
III.4.3.3.2. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et Concentration Minimale Bactéricide (CMB) des extraits HE2847F et HE2847F ₂ sur les bactéries.....	76
CMI des extraits HE2847F et HE2847F ₂ sur les bactéries (concentration des extraits entre 3,42 à 3500µg/ml).....	76
Détermination des CMB des extraits HE2847F et HE2847F ₂	76
III.4.3.4.Evaluations de l'activité antifongique des extraits HE2847F et HE2847F ₂	77
III.4.3.4.1. Effets des extraits sur les levures.....	77
III.4.3.4.2. Effets de l'extrait brut sur la croissance des champignons filamenteux.....	77
CONCLUSION GENERALE.....	79
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE	
REFERENCE WEBOGRAPHIQUE	
ANNEXE	
RESUME ET MOTS CLEFS (abstract and key words)	

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Photographie rameau fructifère de <i>Beilschmiedia microphylla</i>	6
Figure 2 : Structures des dérivés de flavonoïdes methoxylés.....	8
Figure 3 : Structures des dérivés d'acide Beilschmiedique.....	8
Figure 4 : Structures des dérivés d'acide endiandrique.....	9
Figure 5 : Structure d'un squelette de perhydrocyclopentano-phénanthrène.....	11
Figure 6 : Structure de l'isoprène.....	11
Figure 7 : Classification des terpènes.....	12
Figure 8 : zones d'endémie du paludisme dans le monde	13
Figure 9 : Essencier de type CLEVENGER	23
Figure 10 : Cinétique d'extraction de l'HE de <i>Beilschmiedia microphylla</i> (période pluvieuse et période sèche).....	27
Figure 11 : Chromatogramme issu du CPG/SM de l'HE de <i>Beilschmiedia microphylla</i>	30
Figure 12 : Chromatogramme A de l'HE pure analysée sur CPG OV101	34
Figure 13 : Chromatogramme B du mélange HE pure et mélange de d'alcane (C ₆ -C ₂₀) coinjécté sur CPG OV101.....	35
Figure 14 : Spectre de fragmentation du β-caryophyllène en SM/IE.....	36
Figure 15 : Spectre de fragmentation du limonène en SM/IE.....	38
Figure 16 : Spectre de fragmentation du β-myrcène en SM/IE.....	40
Figure 17 : Spectre de fragmentation de l'E-β-ocimène en SM/IE.....	42
Figure 18 : Profil chromatographique sur CCM de l'extrait hexanique.....	48
Figure 19 : Plaque CCM des produits HE2847F ₁₁₂ -I et HE2847F ₁₁₂ -II.....	49
Figure 20 : Profil chromatographique des composées HE2847F ₁₁₂ -I et HE2847F ₁₁₂ -II dans l'éluant CH ₂ Cl ₂	51
Figure 21 : Spectre (S1), RMN ¹ H du composé HE2847F ₁₁₂ -II.....	53
Figure 22 : Spectre (S2), RMN ¹³ C du composé HE2847F ₁₁₂ -II.....	55
Figure 23 : Structure du STIGMASTEROL.....	57
Figure 24 : Déplacements chimiques des protons du stigmastérol.....	59
Figure 25 : Déplacements chimiques des carbones du stigmastérol.....	59
Figure 26 : Méthode de diffusion de disque (antibiogramme).....	66
Figure 27 : Activité antioxydante de <i>Beilschmiedia microphylla</i> par la méthode bioautography.....	71

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1 : Cycle de vie de <i>Plasmodium</i>	14
Schéma 2 : Diagramme fonctionnel d'un système de couplage CPG/SM.....	25
Schéma 3 : Hypothèse de fragmentation du β -caryophyllène.....	37
Schéma 4 : Hypothèse de fragmentation du limonène en SM/IE.....	39
Schéma 5 : Hypothèse de fragmentation du β -myrcène par SM/IE.....	41
Schéma 6 : Hypothèse de fragmentation du (E)- β -ocimène en SM/IE.....	43
Schéma 7 : Protocole d'obtention du produit HE2847F ₁₁₂ -II.....	46
Schéma 8 : Résultats pour chaque étape d'obtention du produit HE2847F ₁₁₂ -II.....	50
Schéma 9 : Réaction de l'antioxydant avec le DPPH \cdot	64
Schéma 10 : Résultats des tests antiplasmodiaux.....	70

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les conditions utilisées pour la macération à froid.....	18
Tableau 2 : Méthodes de criblage phytochimique.....	19
Tableau 3 : Bilan des familles chimiques présentes dans <i>Beilschmiedia microphylla</i>	21
Tableau 4 : Evolution du volume d'huile essentielle cumulée en fonction du temps pour les deux périodes de récolte.....	26
Tableau 5 : Résultat de l'extraction effectuée pendant la période pluvieuse.....	28
Tableau 6 : Caractéristiques physiques de l'HE.....	28
Tableau 7 : Indices de Kovats des 04 composés majoritaires de l'HE.....	29
Tableau 8 : Organisation dans la présentation des résultats.....	29
Tableau 9 : Constituants identifiés dans l'HE de <i>Beilschmiedia microphylla</i>	31
Tableau 10 : Matériels pour l'étude de l'extrait.....	45
Tableau 11 : Les étapes réalisées pour l'obtention de HE2847F ₁₁₂ -II.....	48
Tableau 12 : Résultats de l'analyse en CCM [Hex/AcOEt (90/10)] de la fraction HE2847F ₁ ...	49
Tableau 13 : Identification des spectres.....	52
Tableau 14 : Informations tirées du spectre RMN ¹ H (S1).....	54
Tableau 15 : Comparaison des déplacements chimiques des ¹ H de HE2847F ₁₁₂ -II avec du stigmastérol.....	57
Tableau 16 : Comparaison des valeurs des déplacements chimiques en RMN ¹³ C du produit HE2847F ₁₁₂ -II avec ceux du stigmastérol.....	57
Tableau 17 : Liste des germes utilisés.....	61
Tableau 18 : Normes utilisées pour la lecture des résultats par la méthode des disques selon l'IPM : le diamètre du disque est 6 mm.....	67
Tableau 19 : Activités antioxydantes mesurées par la méthode de DPPH.....	72
Tableau 20 : Activités antioxydantes mesurées par la méthode d'ORAC.....	73
Tableau 21 : Recherche de l'activité antibactérienne des extraits HE2847F et HE2847F ₂	75
Tableau 22 : Concentration Minimale Inhibitrice des extraits HE2847F et HE2847F ₂ sur la croissance des bactéries.....	76
Tableau 23 : Concentration Minimale Bactéricide des extraits HE2847F et HE2847F ₂ sur la croissance des bactéries.....	77
Tableau 24 : Effets des extraits HE2847F, HE2847F ₂ sur les levures.....	77
Tableau 25 : Effets de l'extrait HE2847F sur la croissance des champignons filamenteux.....	78

LISTE DES ANNEXES

Annexe I : Phytochimie.....	IX
Annexe II : Préparation des réactifs.....	XII
Annexe III : Composition chimique des milieux de cultures.....	XIV
Annexe IV : Modes de fragmentation en SM.....	XIV
Annexe V : Structures de quelques molécules (réactifs biologiques).....	XVII

Introduction

INTRODUCTION

Madagascar est un des pays reconnu dans le monde par sa richesse en flore. Beaucoup d'espèces végétales sont caractéristiques des divers milieux, allant de la végétation littorale à celle des hauts-plateaux, des zones humides aux régions subarides du Sud.

Ce travail s'intitule analyse de l'huile essentielle, isolement du stigmastérol et étude des activités biologiques de *Beilschmiedia microphylla*, endémique de Madagascar. A notre connaissance, elle n'a pas encore fait l'objet d'une étude chimique approfondie.

Cette plante aromatique est utilisée traditionnellement pour traiter la blennorragie, les enflures et les paralysies musculaires.

La présente étude a pour objectif d'étudier la composition chimique de l'huile essentielle de cette plante, de tenter d'isoler un composé ayant une activité antiplasmodiale à partir de ses extraits en procédant par méthode bioguidée, de rechercher d'autres activités biologiques telles que l'activité antioxydante et l'activité antimicrobienne.

Les travaux de recherches ont été réalisés au Laboratoire de Chimie Organique Spectrométrie de Masse et au Centre National d'Application des Recherches Pharmaceutiques dont l'objectif est d'identifier et étudier des plantes susceptibles d'être utilisées dans les problèmes de santé publique nationale (diarrhée, infection respiratoire et le paludisme...).

Le manuscrit se divise donc en trois grandes parties :

- ➔ la première partie est consacrée à l'étude des travaux antérieurs sur la plante ;
- ➔ la seconde partie concerne les généralités sur les stéroïdes et terpénoïdes, le paludisme, les antioxydants et la microbiologie.
- ➔ la troisième partie montre les travaux personnels entrepris comprenant quatre grandes chapitres indépendants dont le premier concernera les criblages phytochimiques réalisés sur les feuilles et tiges, le second exposera l'étude de l'HE, le troisième traitera l'études effectuées sur l'extrait des feuilles et le dernier rapportera les travaux biologiques réalisés sur la même plante. A noter que chaque chapitre est exposé selon le plan IMRED.

Le présent travail s'achève sur une conclusion générale.

La référence bibliographique et les annexes terminent l'ouvrage.

Partie-I

Travaux antérieurs sur la plante

I. TRAVAUX ANTERIEURS SUR LA PLANTE

I.1. DONNEES BOTANIKES

Cette partie expose quelques informations relevées des données botaniques relatives à la plante, objet de cette étude.

I.1.1. Classification phylogénétique [43]

Règne	:	PLANTAE
Sous-règne	:	TRACHEOBIONTA
Division	:	MAGNOLIOPHYTA
Classe	:	MAGNOLIOPSIDA
Sous-classe	:	MAGNOLIIDAE
Ordre	:	LAURALES
Famille	:	LAURACEAE
Genre	:	<i>Beilschmiedia</i>
Espèce	:	<i>microphylla</i>
Synonyme	:	<i>Apollonias microphylla</i> Kosterm.
Nom vernaculaire	:	Voamahafamaifailela (Betsileo)

I.1.2. La famille LAURACEAE [22], [43]

La famille est composée d'arbres ou arbustes souvent aromatiques, comprend environ 1000 à 1500 espèces. La famille est pantropicale et quelque fois subtropicale.

Elle est représentée dans la flore Malgache par six genres dont : le genre *Beilschmiedia* (synonyme : *Apollonias*), le genre *Ravensara*, le genre *Cryptocarya*, le genre *Potameia*, le genre *Ocotea*, le genre *Cassytha*.

I.1.3. Le genre *Beilschmiedia* [22], [42]

Le genre *Beilschmiedia* comprend plus de 50 espèces réparties dans toutes les régions chaudes du globe : en Asie, en Afrique, à la Nouvelle Zélande, en Amérique du Sud... A Madagascar, ce genre est réparti dans plusieurs régions : *Beilschmiedia cryptocaryoides* (Kosterm), Tamatave (région de l'Est), *Beilschmiedia madagascariensis* (Baill.) Fort Dauphin (région du Sud).

Beilschmiedia microphylla, est endémique de l'Itremo, district d'Ambatofinandrahana (région centrale).

I.1.4. Description de l'espèce *mirophylla* [22], [44]

« Arbrisseau ou arbuste de 4 à 5 m de haut, souvent aromatique, à ramilles presque anguleuses, à feuilles nombreuses, garnies de poils ferrugineux ; bourgeons densément tomenteux-ferrugineux. Feuilles subopposées ou alternes, sans stipule, groupée au sommet des ramilles, coriaces,

étroitement lancéolées ou elliptiques, à base aiguë, à sommet obtus, à bord replié en dessous vers la base ; face supérieure glabre ; face inférieure pruiteuse microscopiquement poilue ; nervure médiane faiblement saillante. Pétiole poilu, 4mm de long, subcanaliculé. Inflorescences en panicules axillaires ou subterminales, poilues. Fleurs globuleuses ; étamines 9, disposées en 3 verticilles, les 6 externes à loge introrses ou introrses-latérales, les 3 internes à loges extrorses ou extrorses-latérales et à glandes minuscules à leur base. Ovaire supère. Fruit rougeâtre ellipsoïdal ou obovoïde-ellipsoïdal, atteignant 25 mm de long sur 15 mm de diamètre ; péricarpe mince charnu ; endocarpe épais de 1 mm ; pédicelle fructifère charnu, verruqueux, obconique, atteignant 3 mm de long, à sommet plan, garni des tépales persistants. »

La page suivante affiche la photographie d'un rameau fructifère de *Beilschmiedia microphylla*.



A



B

Figure 1: Photographie du rameau fructifère de *Beilschmiedia microphylla*, A plante séchée ; B plante vivante

I.2. TRAVAUX ANTERIEURS SUR DES ESPECES DU GENRE *Beilschmiedia*

Notre étude bibliographique a révélé que cette espèce n'a pas encore fait l'objet d'étude chimique et biologique approfondie. Par contre, des travaux chimiques et biologiques ont été déjà réalisés sur le genre dont:

➔ *Beilschmiedia zenkeri*,

- ses mucilages présentent des propriétés antioxydantes [10], [24].
- quatre nouveaux dérivés de flavonoïdes méthoxylés ont été isolés à partir de l'extrait dichlorométhane de l'écorce de tiges : (2S,4R)-5,6,7-triméthoxyflavan-4-ol, (2S,4R)-4,5,6,7-tetraméthoxyflavane, beilschmiediflavonoïde A, et beilschmiediflavonoïde B [14],[31]. Leurs structures sont présentées dans la **figure 2**.

➔ *Beilschmiedia cryptocaryoides* [16],

collecté à Madagascar. A partir de l'écorce, quatre nouveaux dérivés d'acide Beilschmiedique ont été isolés dont l'acide criptobeilique A, l'acide criptobeilique B, l'acide criptobeilique C, l'acide criptobeilique D (**figure 3**). Parmi ces dérivés, l'acide criptobeilique A(1) a une activité antibactérienne modérée contre *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus* DSM 586, et *Pseudomonas stutzeri* A1501, avec une CMI égale à 10 µM. De plus, il a aussi une activité antiplasmodiale vis à vis de la souche résistante à la chloroquine *Plasmodium falciparum* NF54.

➔ *Beilschmiedia anacardioïdes* [45]

Trois nouveaux dérivés d'acide endiandrique A, B et C (**figure 4**) ont été isolés à partir de l'écorce de tige dont l'acide endiandrique C à forte activité contre *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, et *Streptococcus faecalis* (CMI inférieure à 23 µM).

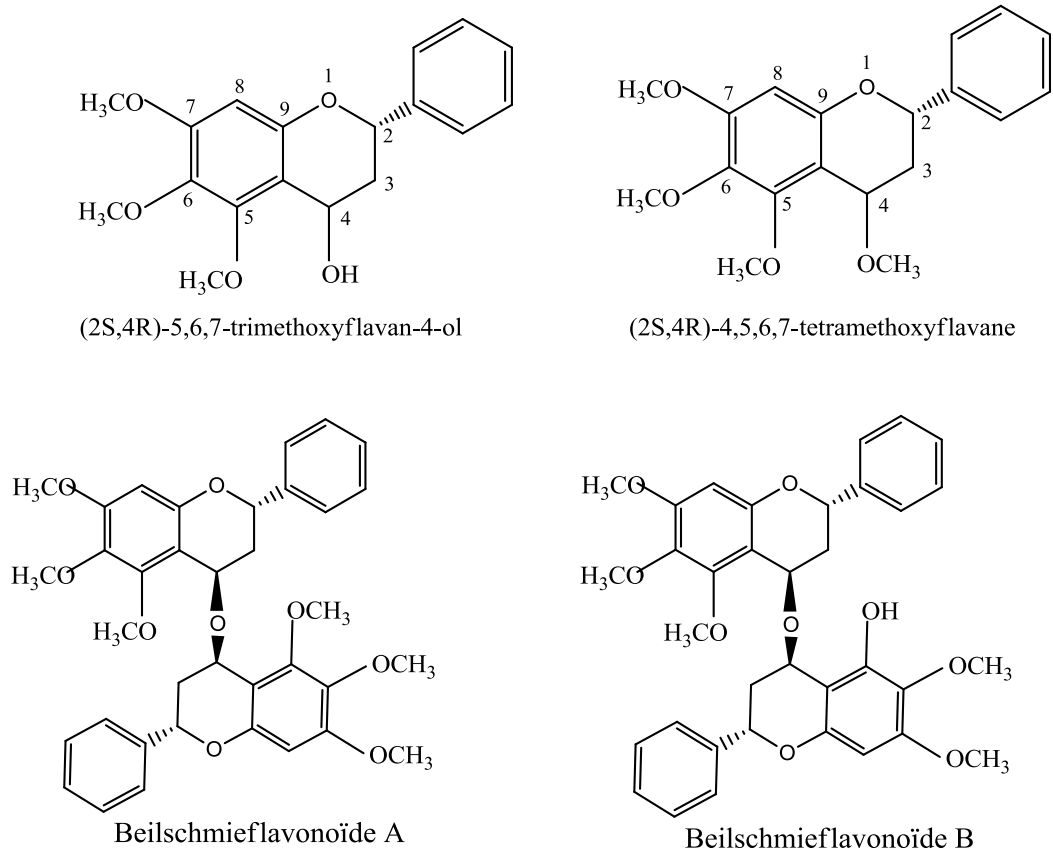


Figure 2: Structure des dérivés de flavonoïdes methoxylés

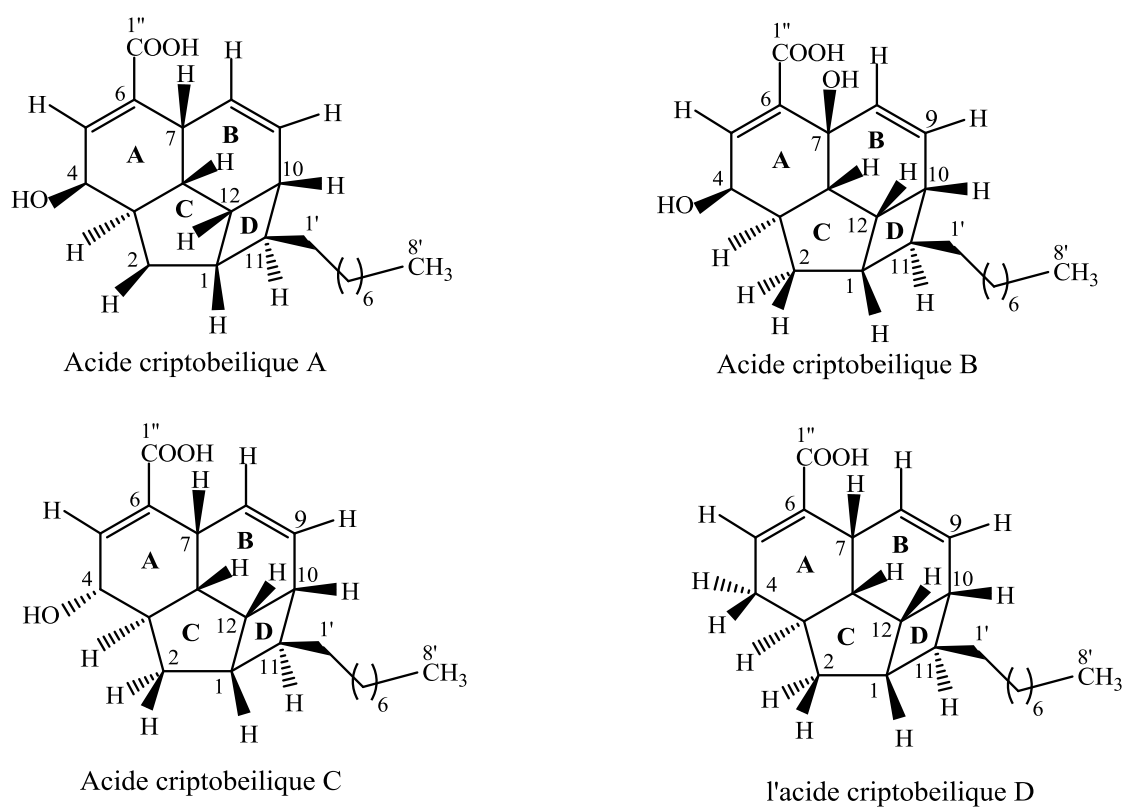
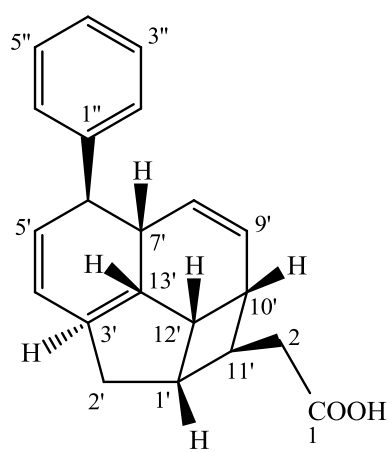
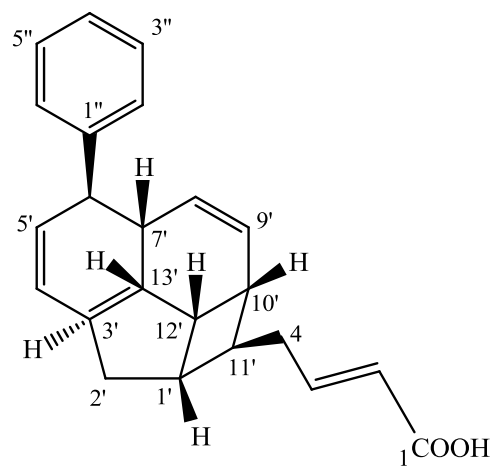


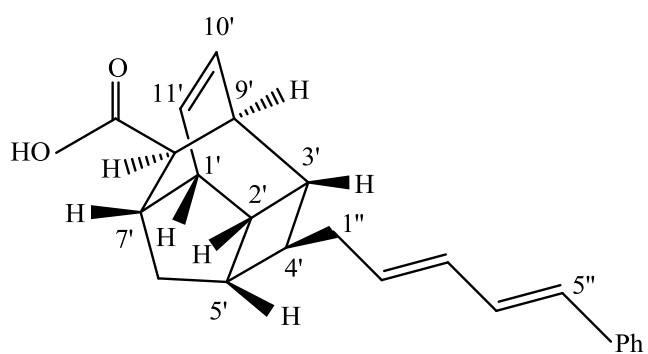
Figure 3 : Structure des dérivés d'acide Beilschmiedique



Acide endiandrique A



Acide endiandrique B



Acide endiandrique C

Figure 4 : Structure des dérivés d'acide endiandrique

Partie-II

**Généralités sur les stéroïdes et terpénoïdes, le paludisme,
les antioxydants et la microbiologie**

II. GENERALITES SUR LES STEROIDES ET TERPENOIDES, LE PALUDISME, LES ANTIOXYDANTS ET LA MICROBIOLOGIE

II.1.LES STEROIDES[33], [38]

Les **stéroïdes** sont des triterpènes tétracycliques qui ont perdu au moins trois radicaux méthyles. Ils ont un squelette " perhydrocyclopentano-phénanthrène ", avec une chaîne latérale fixée en C₁₇ (**figure 5**).

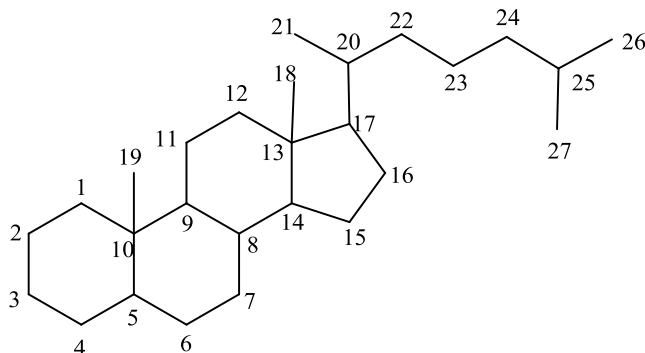


Figure 5 : Structure d'un squelette de perhydrocyclopentano-phénanthrène

II.2.LES TERPENOIDES [33], [38]

Les **terpènes** englobent tous les composés issus de la condensation de la molécule d'isoprène (C₅H₈) ou méthyl-2-buta-1,3-diène (**figure 6**).

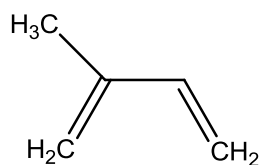


Figure 6 : Structure de l'isoprène

Selon le nombre de ces entités isopréniques, les terpènes sont classés en monoterpènes à 10 carbones, sesquiterpènes à 15 carbones, diterpènes à 20 carbones, triterpènes à 30 carbones etc. La **figure 7** présente la classification de quelques structures terpéniques.

Les monoterpènes et les sesquiterpènes les plus volatils sont les seuls terpènes qui peuvent être rencontrés dans les HE. Ils constituent entre autre les principes odoriférants des végétaux. Les HE peuvent renfermer quelques dizaines à plus d'une centaine de constituants.

Les terpènes peuvent porter des fonctions oxygénées telles que l'aldéhyde (Citronellal), l'alcool (le géraniol), l'éther (1,8-cinéole), l'ester (acétate de linalyle), la cétone (Menthone).

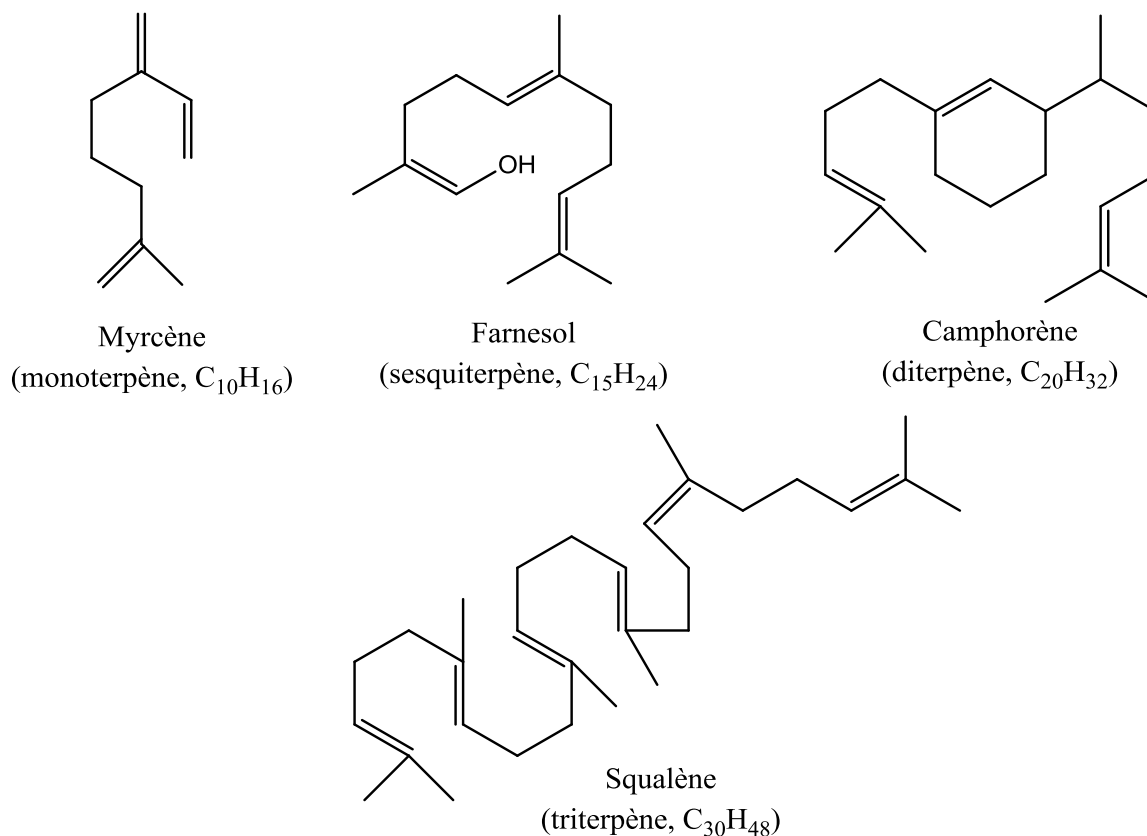


Figure 7 : Classification des terpènes

II.3. LE PALUDISME

II.3.1. Description [5], [25]

Le paludisme (du latin palus, paludis, marais), appelé aussi malaria (de l'italien mal'aria, mauvais air), est une parasitose due à un protozoaire transmis par la piqûre d'un moustique du genre *Anophèles*. Cette maladie surtout importante pour les populations vivant en zone d'endémie (zone intertropicale), l'est aussi pour les voyageurs. Elle est la cause d'environ deux millions de décès chaque année dans le monde.

Les cinq espèces connues responsables de la maladie sont : le *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium knowlesi*. *P. falciparum* est celui qui est le plus largement répandu à travers le monde. Il développe des résistances aux antipaludiques et est le responsable des formes cliniques potentiellement mortelles. La **figure 8** indique les zones d'endémie du *Plasmodium falciparum* dans le monde

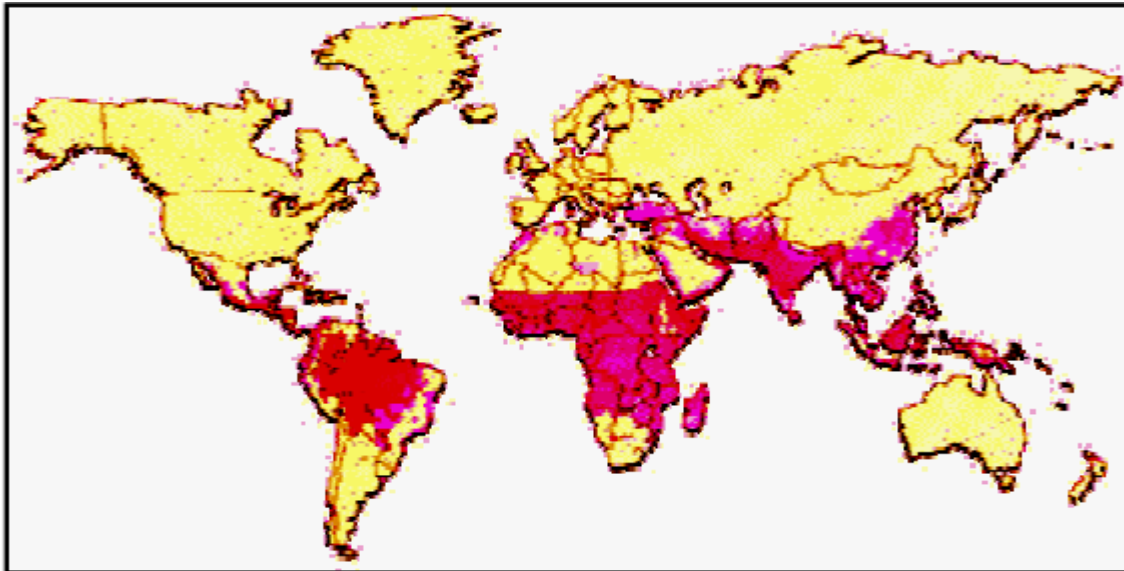


Figure 8 : zones d'endémie du paludisme dans le monde

La phase sanguine du cycle rend possible d'autres modes de contamination : transmission congénitale, transfusionnelle, par greffe d'organe ou transmission accidentelle chez des personnels de santé manipulant du sang contaminé. En pratique, ces transmissions sont exceptionnelles et n'influencent pas l'épidémiologie.

II.3.2. Les antipaludéens [5], [25]

Les antipaludéens peuvent être classés selon la localisation de leur action dans le cycle de vie des plasmodiums, qui passent par les stades successifs suivants : sporozoïte (forme injectée par le moustique), mérozoïte (forme libérée par le foie), schizonte (forme de multiplication dans les globules rouges) et gamétocyte (future cellule reproductrice).

On distingue sur cette base deux grands types d'antipaludéens : les schizontocides, qui agissent sur les schizontes, et les gamétocytocides, actifs sur les gamétocytes. Les premiers permettent de lutter contre les symptômes du paludisme, les seconds de contrer la transmission du parasite. Les molécules qui s'attaquent aux mérozoïtes sont pour l'instant très peu utilisées en raison de leur forte toxicité pour le foie.

Le **schéma 1** montre le cycle de vie du *Plasmodium falciparum*.

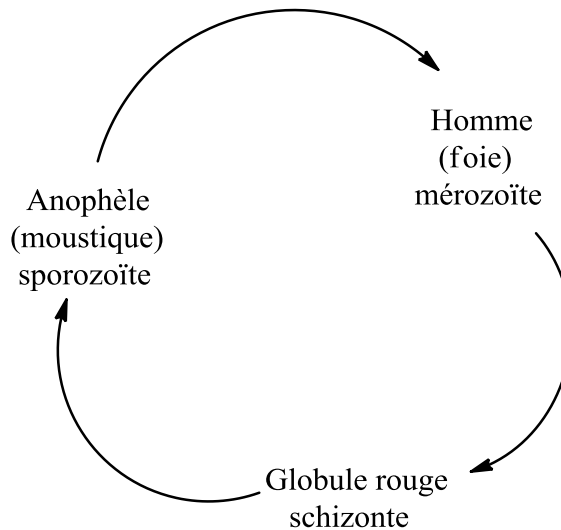


Schéma 1 : Cycle de vie de *Plasmodium*

II.4. ACTIVITES ANTIOXYDANTES

II.4.1. Définitions et propriétés [2], [13]

Les antioxydants sont des agents naturels ou chimiques qui réduisent ou neutralisent l'oxydation.

En d'autres termes, on désigne par antioxydant toute substance qui retarde ou prévient de manière significative l'oxydation du substrat.

Les antioxydants vont ainsi réduire les radicaux libres qui sont dangereux pour l'organisme en raison de leur pouvoir oxydant très élevé.

En plus, les antioxydants sont des agents redox qui réagissent (effet Scavenger) avec les oxydants et soit stoppent, soit ralentissent les processus d'oxydation.

Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\text{OH}\bullet$) et superoxydes ($\text{O}_2\bullet$).

II.4.2. Radicaux libres [20]

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se réappairer, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. Voici quelques exemples des radicaux libres :

Anion superoxyde..... O_2^{\bullet}

Radical hydroxyle..... HO^{\bullet}

Radical peroxy..... ROO^{\bullet}

Monoxyde d'azote..... NO^{\bullet}

II.5. ACTIVITE ANTIBACTERIENNE [3], [4]

C'est un examen permettant de tester la réaction d'une bactérie vis-à-vis d'un antibiotique.

Partie-III

Travaux personnels

Chapitre 1 : Criblages phytochimiques

Chapitre 2 : Etudes de l'huile essentielle

Chapitre 3 : Etudes de l'extrait des feuilles

Chapitre 4 : Travaux biologiques

Chapitre 1 : Criblages phytochimiques

III.1. CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE

III.1.1. Matériels et méthodes

Des feuilles et des tiges de *Beilschmiedia microphylla* ont été collectées à Itremo, District d'Ambatofinandrahana, dans la région de Moron' I Mania, Faritany de FIANARANTSOA à 1341m d'altitude et dont les coordonnées GPS sont 20° 35' 31" Sud 46° 38' 06" Est.

La récolte des feuilles a été effectuée en 3 étapes en mois d'Octobre 2012 (période sèche), Novembre 2012 (période sèche) et en mois d'Avril 2013 (période pluvieuse).

La période de floraison se situe pendant la saison de pluie, entre Décembre et Mars.

La méthode d'analyse classique de FONG *et al.* [33] a été mise à profit pour le criblage phytochimique c'est à dire la détermination des grandes familles chimiques pouvant être présentes dans les feuilles et tiges de *Beilschmiedia microphylla*. (**Tableau 2**)

Les matériels utilisés ont été :

- balance METTLER TYPE AM100, de portée max=100g ;
- balance METTLER TYPE AM 300 de portée max=300g ;
- bain thermostaté MEMMERT à température réglable de 20°C à 110°C ;
- tubes à essai en verre borosilicaté ;
- verreries de laboratoire.

La macération à froid de poudre de matériel en milieu alcoolique a été la technique choisie. Le **tableau 1** résume les conditions utilisées.

Tableau 1 : Les conditions utilisées pour la macération à froid

Matériels	Feuilles	Tiges
Quantité	50 g de poudre	50 g de poudre
Solvant	125 ml d'EtOH	145 ml d'EtOH
Durée de la macération	72h	72h

Une filtration sur Buchner a suivi les opérations, le filtrat ainsi obtenu constitue la solution hydroalcoolique.

L'équivalent en volume a été calculé par rapport à la quantité initiale de la plante.

Les différents tests pour déterminer les familles chimiques susceptibles d'être présentes dans les feuilles et les tiges du matériel végétal sont rassemblés dans le **tableau 2**.

III.1.2. Résultats et discussions

Le tableau 3 rapporte les résultats de l'étude comparative du criblage phytochimique dans les feuilles et tiges.

Tableau 2 : Méthodes de criblage phytochimique

FAMILLE CHIMIQUE	TESTS	REACTIFS	RESULTATS ATTENDUS
	Macération chlorhydrique		
Alcaloïdes	Dragendorff	Bi(NO ₃) ₂ /KI	Précipité orangé/rouge
	Wagner	Hg/KI	Précipité brun
	Mayer	HgCl ₂ /KI	Précipité blanc
	Test préliminaire		
	Dragendorff	Bi(NO ₃) ₂ /KI	Précipité orangé/rouge
	Wagner	Hg/KI	Précipité brun
	Mayer	HgCl ₂ /KI	Précipité blanc
Flavonoïdes et leucoanthocyanes	Wilstater	0,5mL HCl concentré + quelques tournures de Mg	Rouge (flavones), Rouge à pourpre (flavonols), Rouge violacée (flavonols et flavanones)
	Wilstater modifié	0,5mL HCl concentré + quelques tournures de Mg + 1mL de H ₂ O + 1mL alcool isoamilique	Phase supérieure Rouge (flavones), Pourpre (flavonols)
	Bate-Smith	0,5mL de HCl concentré (chauffage 30mn)	Rouge violacé (leucoanthocyanes)
		0,5mL HCl concentré à froid	Rouge (anthocyanes)
Stéroïdes et terpénoïdes	Liebermann-Buschard	-3 à 4 gouttes d'anhydride acétique -3 à 4 gouttes H ₂ SO ₄ concentré	Pourpre (triterpénoïdes)
	Salkowsky	1mL H ₂ SO ₄ concentré Incliné le tube 45°	séparation rouge (stérols insaturés)
	Bradget-Kedde	Quelques grains d'acides picriques	Rouge (stéroïdes lactoniques)
	Keller-Killiani	-Gouttes de FeCl ₃ 10% -Gouttes d'acide acétique glacial (incliné tube 45°)	Anneau de séparation rouge pourpre (desoxy-2-sucre)
Tanins et polyphénols	Test à la gélatine	4 à 5gouttes de gélatine à 1%	Précipité (polyphénols)
	Test à la gélatine salée	4 à 5gouttes de gélatine salée	Précipité (tanins)
	Test à FeCl ₃	4 à 5gouttes de FeCl ₃ dans MeOH	Bleu-vert (tanins condensés)
			Noir-bleuâtre (Tanins hydrolysables)
Saponines	Test a la mousse	10mL d'eau distillée	Hauteur de la mousse supérieure ou égal à 3cm (saponines)
Quinones	Test à l'éther - chloroforme	Ether-chloroforme 3/1 (v/v) ou du benzène + NH ₄ OH	Coloration de la phase alcaline rouge violacée (quinones)
Polysaccharides	Test à l'éthanol	3 volumes d'éthanol EtOH	Précipitation (polysaccharides)
Appréciation des résultats			
Notations	Précipitation	Coloration	Indice de mousse
+	Faible	Faible	2 à 4 cm
++	Abondante	Franche	4 à 5 cm
+++	Forte	Intense	Supérieur à 5cm

Aussi on constate dans les deux parties de la plante la présence de mêmes composés :

- avec une forte abondance de leucoanthocyanes, tanins et tanins condensés ;
- ou avec une abondance faible de polysaccharides, saponines et quinones.

Tableau 3: Bilan des familles chimiques présentes dans *Beilschmiedia microphylla*

FAMILLE CHIMIQUE	NOMS DES TESTS	COMPOSE REVELE	FEUILLES (HE2847F)	TIGES (HE2847T)
Alcaloïdes	MACERATION CHLORHYDRIQUE			
	Wagner	Alcaloïdes	++	++
	TEST PRELIMINAIRE			
	Wagner	Alcaloïdes	++	++
Flavonoïdes/leucoanthocyanes	wilstater	Flavones	++	+++
	Wilstater modifié	Flavones	++	+++
	Bate-Smith	Leucoanthocyanes	+++	+++
	Bate-Smith	Anthocyanes	++	++
Stéroïdes et triterpenes	Liebermann-Buschard	Triterpénoides	++	+++
	Salkowski	Stérols insaturés	++	++
	Keller-lilliani	Désoxy-2-sucres	++	+++
Tanins et polyphénols	Test à la gélatine	Polyphénols	++	++
	Test à la gélatine salée	Tanins	+++	+++
	Test à FeCl ₃	Tanins condensés	+++	+++
Polysaccharides	Test à l'éthanol	Polysaccharides	+	+
Saponines	Tests à la mousse	Saponines	+	
Quinones	Test à l'éther-chloroforme	Quinones	+	

Chapitre 2 : Etudes de l'huile essentielle

III.2. ETUDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DES FEUILLES DE *Beilschimidia microphylla*

III.2.1 Obtention et cinétique de l'extraction de l'Huile Essentielle

L'obtention de l'huile essentielle à partir des feuilles fraîches a été réalisée à l'aide d'un essencier de CLEVANGER type huile légère (**figure 9**). La méthode utilisée a été l'hydrodistillation. A cet effet, un échantillon de matériel végétal est introduit dans un ballon de 2l contenant 1l d'eau. Quelques grains de pierre ponce ont été ajoutés. L'ensemble a été porté à ébullition. La première goutte de condensat marque le début de l'opération. On note le volume cumulé d'HE en fonction du temps, ce qui permet d'établir la courbe de la cinétique d'extraction. On arrête la distillation quand le volume cumulé est pratiquement constant. Le rendement est donné suivant la formule :

$$r[\%] = \frac{v}{M} \times 100$$

r : Rendement en HE

v : Volume de l'huile essentielle obtenue [ml]

M : Masse de la matière végétale utilisée [g]

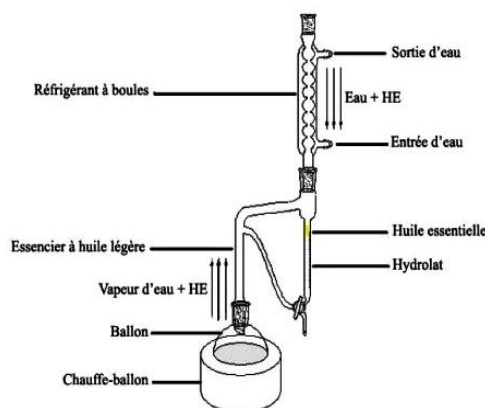


Figure 9 : Essencier de type CLEVANGER

III.2.2 Analyse de l'Huile Essentielle

La CPG et CPG-SM ont été les méthodes utilisées pour l'analyse de l'huile essentielle des feuilles. Les deux techniques permettent de déterminer la composition qualitative et quantitative de l'huile.

Dans le présent travail, l'identité des constituants majoritaires a été fixée en premier lieu par la méthode des Indices de Kovats. Il s'agit d'un indice qui caractérise un composé élué en chromatographie en phase gazeuse. Il est calculé sur la base des temps de rétention obtenus à partir du chromatogramme du HE/paraffines.

En programmation de température, l'indice de Kovats est calculé suivant la formule :

$$IK = 100 \left(n + m \frac{t_x - t_n}{t_{n+m} - t_n} \right)$$

IK	:	Indice de Kovats
T _x	:	Temps de rétention du composé « x »
T _n	:	Temps de rétention de l'alcane à « n » atomes de carbones
T _{n+m}	:	Temps de rétention de l'alcane à « n+m » atomes de carbones
n	:	Nombre de carbone correspondant à l'alcane C _n
m	:	Ecart entre le nombre de carbone séparant l'alcane à « n » atomes de carbone et celui à « n+m » atomes de carbone.

Conditions opératoires :

- ➔ Préparation de l'échantillon, 2µl de l'huile essentielle pure a été dissoute dans 100µl d'hexane. 0,2µl de cette solution a été injectée. On obtient le chromatogramme A de l'HE pure.
- ➔ Préparation du mélange d'alcane de référence, 1µl de chaque alcane est dissout dans 100µl d'hexane.
- ➔ Pour la coinjection, dans une même seringue, on introduit 0,2µl du mélange d'alcane (C₆ à C₂₀) et 0,2µl de la solution d'HE à 2%. Après injection, on obtient le chromatogramme B du mélange HE et d'alcane.

Les IK des quatre composés majoritaires de l'huile essentielle ont été calculés et comparés aux valeurs données par la littérature.

L'appareillage utilisé est un Chromatographe en Phase Gazeuse de type PerkinElmer Clarus 580 dont les conditions d'analyse sont :

Colonne capillaire	: OV 101(30m, 0,32mm, 0,32µm)
Gaz vecteur	: Hélium
Elévation de température	: 2°C/mn
Température de l'injecteur	: 230°C
Mode d'injection	: Split 1/20
Température du détecteur FID	: 250°C

Les hypothèses de structures établies à partir des IK pour des produits majoritaires dans l'huile essentielle, ont été vérifiées par CPG-SM.

Cette technique analytique consiste à réunir la colonne capillaire et le spectromètre de masse. Le **schéma 2** représente le diagramme fonctionnel d'un système couplé CPG/SM.

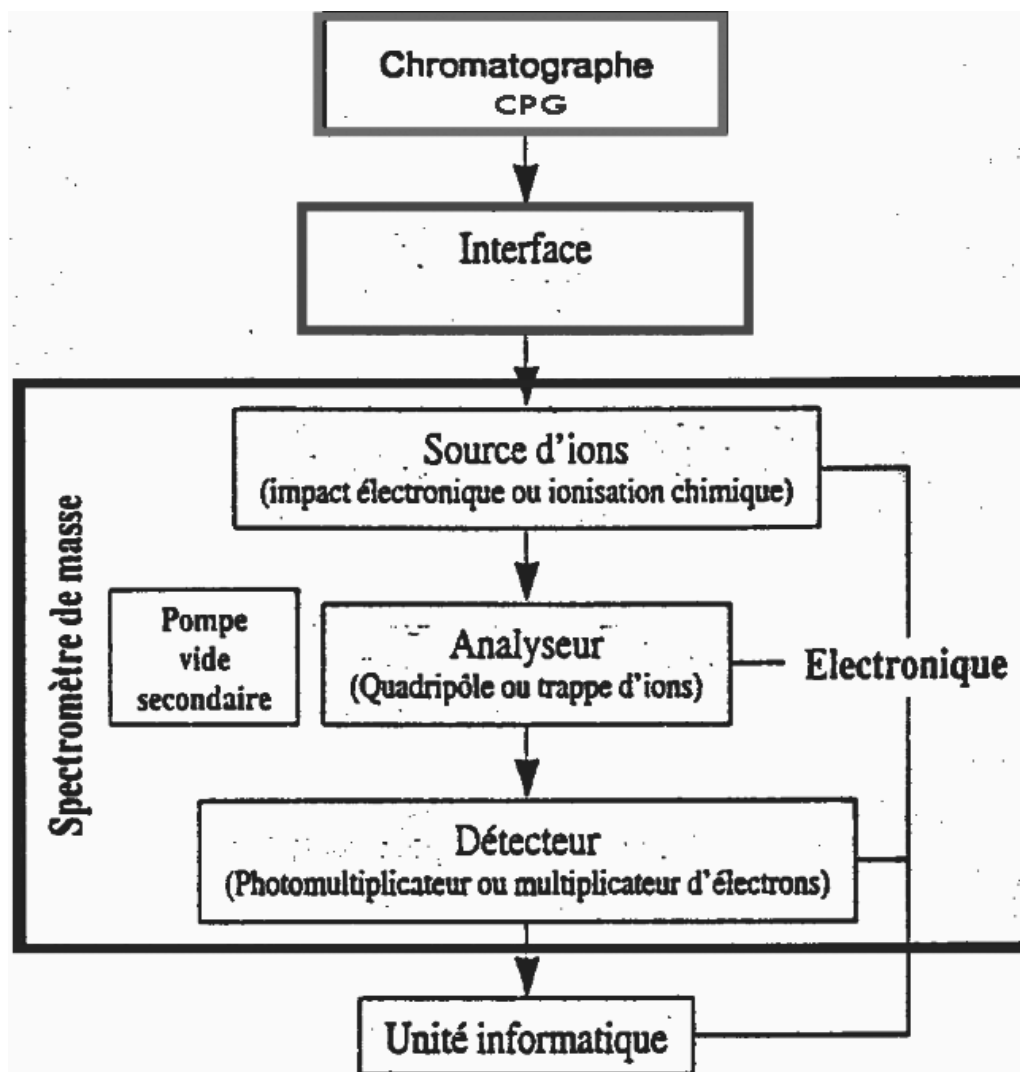


Schéma 2 : Diagramme fonctionnel d'un système de couplage CPG/SM

A chaque pic du chromatogramme correspond un produit dont le spectre de masse est enregistré. L'interprétation de ce dernier conduit à sa structure.

L'appareillage utilisé a les caractéristiques suivantes :

CPG :

Numéro du modèle	: Supelco 33859-08 SPB-5
Colonne capillaire	: SPCWX 10M-(60m x 320µm x 0,25µm)
Gaz vecteur	: Hélium
Mode	: Débit constant
Débit initial	: 0,7mL/mn
Pression nominale initiale	: 1,85psi
Vitesse moyenne	: 22cm/sec
Température du four	: 60°C à 320°C
Détecteur	: FID

SM :

Mode d'ionisation	: Impact électronique
Température de la source	: 230°C à 250°C (max)

III.2.3. Résultats et discussion

III.2.3.1. Etude cinétique de l'HE

Un des objectifs visés en premier lieu dans ce travail a été de fixer une durée pour l'extraction de l'HE.

A cet effet, deux séries d'expériences ont été menées :

- la première série a été effectuée sur l'HE des feuilles collectées en période sèche ;
- la seconde série a concerné l'HE des feuilles de la période pluvieuse.

Les résultats obtenus sont portés sur le **tableau 4**.

Tableau 4: Evolution du volume d'huile essentielle cumulée en fonction du temps pour les deux périodes de récolte

PERIODE SECHE (Octobre-Novembre 2012)									
Temps	0	0h30	1h	1h30	2h	2h30	3h	3h30	4h
Volume de l'HE cumulée (mL)	0	0	0	0,010	0,050	0,080	0,085	0,085	0,085
Volume de l'HE cumulée (mL) x 100*	0	0	0	1	5	8	8,5	8,5	8,5
PERIODE PLUVIEUSE (Avril 2013)									
Temps	0	0h30	1h	1h30	2h	2h30	3h	3h30	4h
Volume de l'HE cumulée (mL)	0	0	0,010	0,015	0,090	0,110	0,120	0,125	0,125
Volume de l'HE cumulée (mL) x 100*	0	0	1	1,5	9	11	12	12,5	12,5

*Pour faciliter la lecture

On constate que :

- pour l'HE des feuilles de la période sèche : au bout de 2h30 toute l'HE a été pratiquement distillée ;
- dans le cas de l'HE des feuilles de la période pluvieuse : jusqu'à 3h d'extraction, le rendement a augmenté progressivement pour se stabiliser.

La **figure 10** montre la cinétique d'extraction dans les cas.

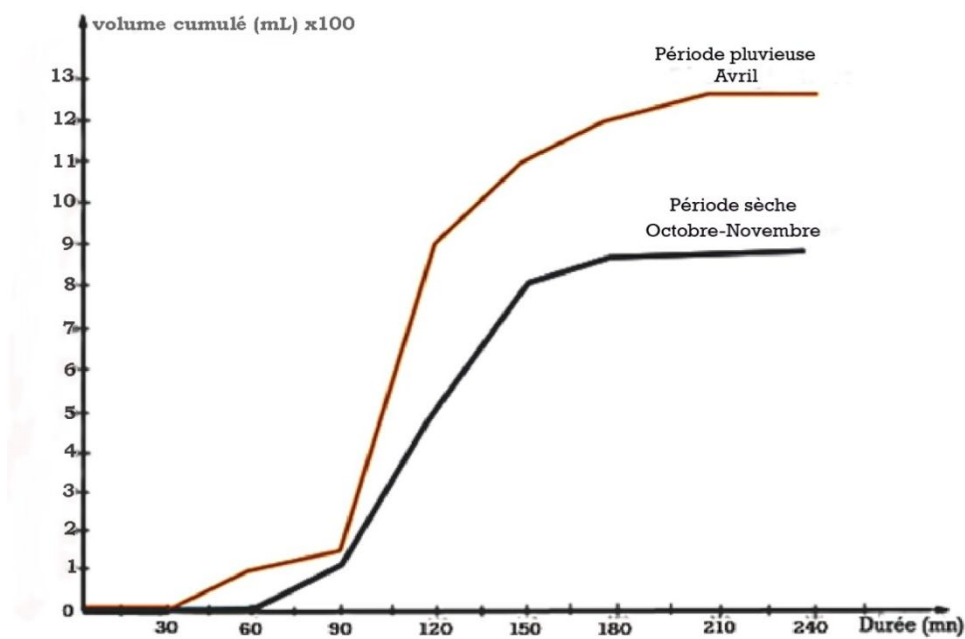


Figure 10 : Cinétique d'extraction de l'HE de *Beilschmiedia microphylla* (période pluvieuse et période sèche)

Nous ne devons analyser sur le plan matériel qu'une seule HE, nous avons choisi l'HE de la période pluvieuse.

En effet, le rendement a été relativement plus élevé, ce qui nous a permis d'avoir un peu plus de produit pour les analyses.

Les résultats des extractions d'HE sont portés sur le **tableau 5**.

Tableau 5: Résultat de l'extraction effectuée pendant la période pluvieuse

Jour de l'extraction	Masse de la plante (g)	Volume huile essentielle (ml)	Rendement volume/masse [%]	Durée d'extraction
06-04-13	200	0,125	0,06	3h30
08-04-13	200	0,125	0,06	3h30
	200	0,125	0,06	3h30
10-04-13	200	0,125	0,06	3h30
	200	0,100	0,05	3h30
	200	0,125	0,06	3h30
	200	0,125	0,06	3h30
	200	0,125	0,06	3h30
	200	0,125	0,06	3h30
	200	0,125	0,06	3h30
	200	0,100	0,05	3h30
11-04-13	250	0,125	0,05	3h30
	200	0,125	0,06	3h30
12-04-13	200	0,100	0,05	3h30
	200	0,100	0,05	3h30
	200	0,100	0,05	3h30
	200	0,100	0,05	3h30
15-04-13	250	0,100	0,05	3h30
	200	0,100	0,05	3h30
Total	3900	2,175	0,06	

On constate qu'à partir d'une quantité totale de 3900g (3,9kg) des feuilles fraîches de *Beilschmiedia microphylla*, un volume égal à 2,175 ml d'huile essentielle a été obtenu. Ce qui donne un rendement moyen de 0,06% (volume/masse) pour les 19 extractions effectuées.

Des caractéristiques physiques de l'huile sont portées dans le **tableau 6**.

Tableau 6 : caractéristiques physiques de l'HE

Aspect physique	<ul style="list-style-type: none"> - liquide mobile, limpide, plus légère que l'eau - couleur jaune pâle
Odeur	<ul style="list-style-type: none"> - citronné

III.2.3.2. Analyse par CPG

Les chromatogrammes obtenus sont portés sur la :

- **figure 12** (page 34) : chromatogramme A de l'HE pure analysée sur CPG OV101;
- et **figure 13** (page 35) : chromatogramme B du mélange HE pure et d'alcane (C₆-C₂₀) coinjecté sur CPG OV101.

Les résultats du calcul des IK sont rassemblés dans le **tableau 7**

Tableau 7 : Indices de Kovats des 04 composés majoritaires de l'HE

Tr carbone C _n (mn)	Tr du constituant	Tr carbone C _{n+1} (mn)	Teneur en %	IK calculé	IK littérature [39]	Proposition de nom du constituant
3,40	17,06	17,74	5,79	981	981	β-myrcène
17,74	20,13	24,31	5,09	1024	1030	(E)-β-ocimène
17,74	19,76	24,31	11,83	1031	1031	Limonène
44,38	45,70	50,36	22,88	1422	1428	β-caryophyllène

Ainsi, 04 constituants majoritaires ont été identifiés, correspondant à 45,59% de teneur en huile totale. Il s'agit du β-caryophyllène 22,88%(tr = 45,70min), limonène 11,83%(tr = 19,76min), β-myrcène 5,79%(tr = 17,06min) et β-ocimène 5,09% (tr = 20,13min).

III.2.3.3. Analyse par CPG-SM

Les résultats de l'analyse par CPG-SM de l'huile essentielle totale sont donnés dans le **tableau 9** (page 31, 32, 33.) dont le chromatogramme est présenté sur **la figure 11**.

Dans le cadre de ce travail et pour appliquer les bases reçues au cours de notre formation en spectrométrie de masse, les spectres de masse des 4 produits majoritaires ont été exploités et interprétés.

Le tableau 8 résume l'organisation dans la présentation des résultats.

Tableau 8 : Organisation dans la présentation des résultats

Produits	Spectre de masse		Interprétation	
	Figures	Pages	Schémas	Pages
β-caryophyllène	14	36	3	37
limonène	15	38	4	39
β-ocimène	16	40	5	41
β-myrcène	17	42	6	43

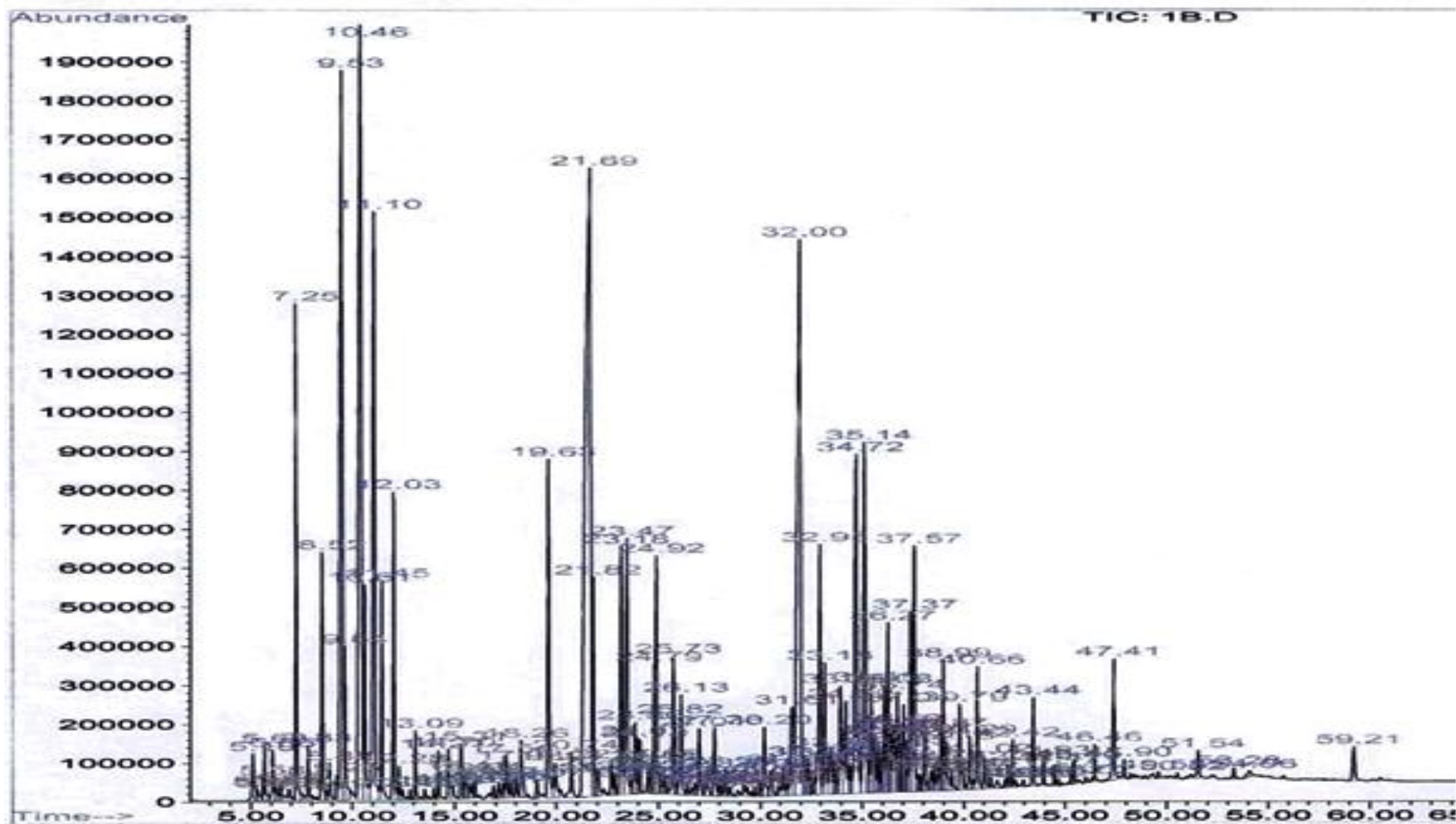
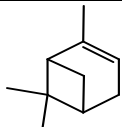
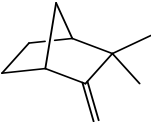

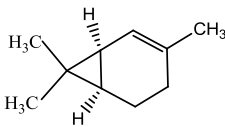
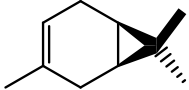
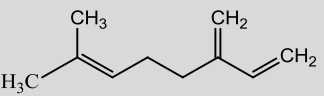
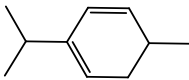
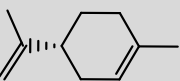
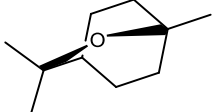
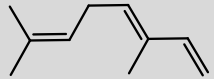
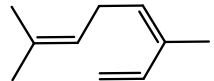
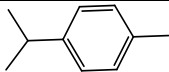
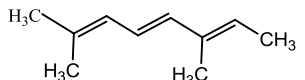
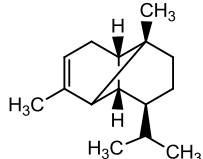
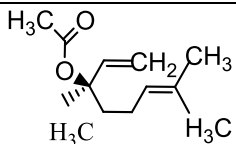
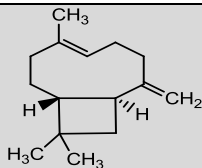
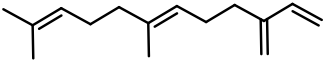
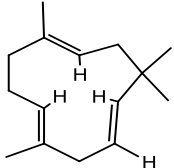
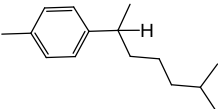


Figure 11 : Chromatogramme issu du CPG/SM de l'HE de *Beilschimidia microphylla*

Tableau 9 : Constituants identifiés dans l'HE de *Beilschmiedia microphylla*

	N° Pic	Tr	Teneur En %	PROB EN (%)	NOM	FORMULE	RELEVES m/z(ABONDANCE) SM/IE
1	10	7,25	2,3	96	α -pinène		136(10) [M ⁺], 121(13), 105(13), 93(100), 77(29), 39(16)
2	12	7,83	0,31	98	camphène		136(16) [M ⁺], 121(65), 107(29), 93(100), 79(42), 67(33)
3	13	8,52	1,38	96	β -pinène		136(9)[M ⁺] , 121(13), 93(100), 79(26), 69(33), 41(39)
4	15	8,88	0,24	97	(+)-2-Carene		136(68) [M ⁺], 121(87), 105(25), 93(100), 79(29), 39(26)
5	16	9,25	0,2	96	δ -3-carène		136(16) [M ⁺], 121(19), 105(13), 93(100), 77(35), 39(19)
6	17	9,52	6,22	94	β-myrcène		136(6)[M ⁺], 121(6), 93(100), 79(16), 69(68), 41(74)
7	18	9,64	0,82	91	α -phellandrène		136(23) [M ⁺], 105(3), 63(100), 77(55), 39(7)
8	19	10,46	8,18	94	limonène		136(32)[M ⁺], 121(32), 107(29), 93(87), 79(42), 68(100)

9	20	10,61	1,09	92	eucalyptol		204(10)[M ⁺], 161(35), 133(94), 105(58), 93(100), 41(90)
10	21	11,10	4,65	96	(E)- β -ocimène		136(3)[M ⁺], 121(13), 105(16), 93(100), 79(39), 41(19)
11	22	11,46	1	94	ocimene Z		136(6)[M ⁺], 121(16), 105(19), 93(100), 79(61), 41(29)
12	23	12,03	1,56	95	<i>p</i> -Cymene		134(29)[M ⁺], 119(100), 91(26), 77(6), 65(5), 39(5)
13	31	14,70	0,33	96	Allocimène		136(26)[M ⁺], 121(100), 105(48), 91(35), 79(39), 41(26)
14	46	18,26	0,53	99	α -copaène		204(16)[M ⁺], 179(10), 161(71), 119(100), 105(97), 93(48)
15	48	19,62	2,12	93	Acétate de linalyl		204(1)[M ⁺], 121(19), 93(71), 71(100), 55(58), 43(71).
16	51	21,69	12,34	99	Caryophyllène (β - caryophyllène)		<u>204(10)</u> [M ⁺], 189(19), 110(35), 133(94), 105(61), 63(100)

17	57	23,18	1,65	91	(E)- β -Farnésène		204(3)[M ⁺], 161(13), 133(23), 93(58), 69(100), 41(77)
18	58	23,47	1,98	97	Humulène		204(6)[M ⁺], 147(16), 121(26), 107(13), 93(100), 80(35)
19	73	26,14	0,58	96	α -Curcumène		202(26)[M ⁺], 145(29), 132(90), 119(100), 105(52), 91(29)

Pourcentage des produits identifiés : 47,5%

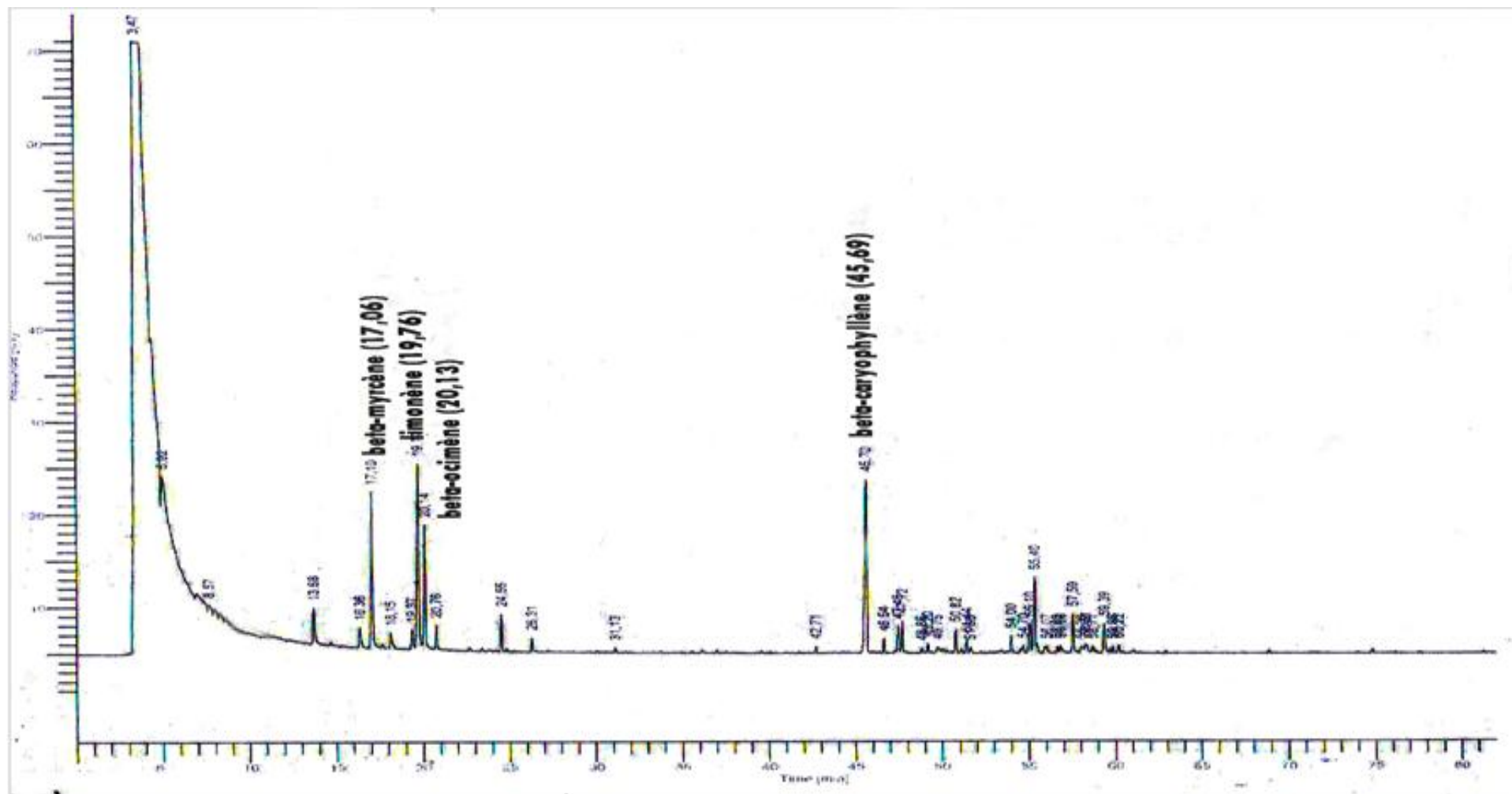


Figure 12 : Chromatogramme A de l'HE pure analysée sur CPG OV101

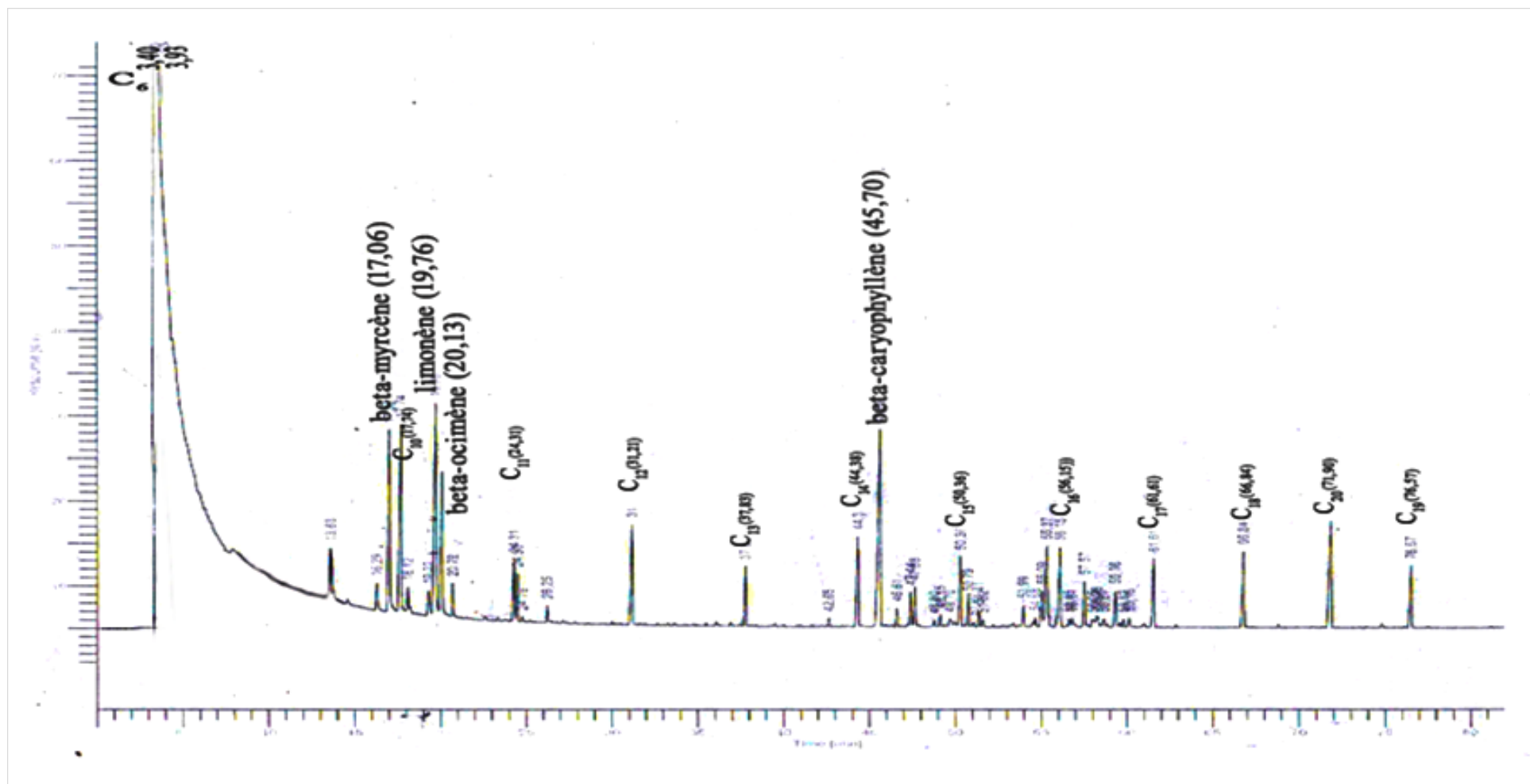


Figure 13 : Chromatogramme B du mélange HE pure et mélange d'alcane (C₆-C₂₀) coinjécté sur CPG OV101

III.2.3.4. Interprétation des spectres de masse des quatre composés majoritaires

III.2.3.4.1. β -caryophyllène

La figure 14 illustre le spectre de fragmentation du β -caryophyllène.

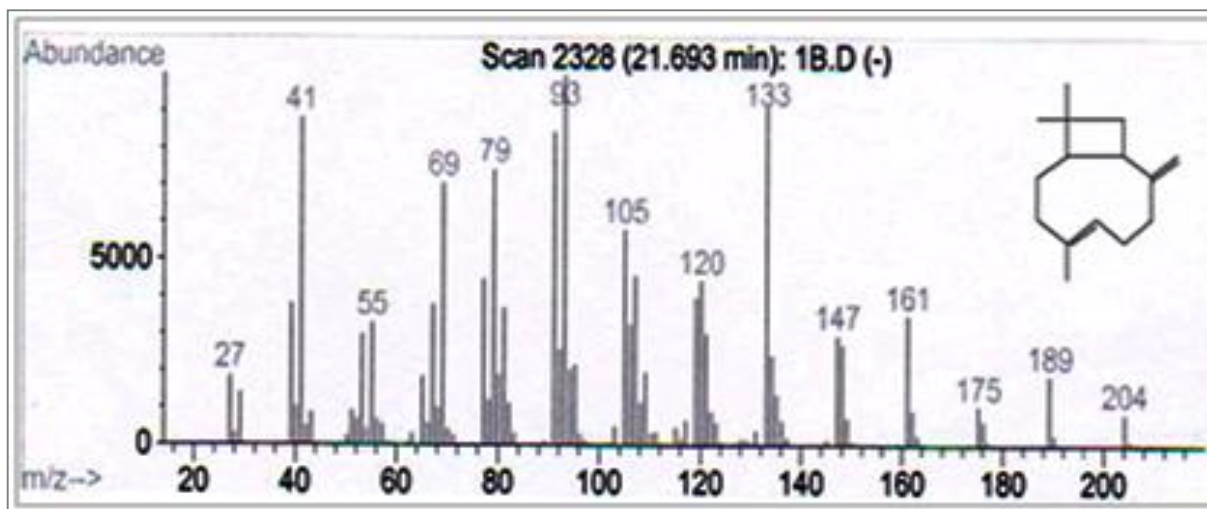


Figure 14 : Spectre de fragmentation du β -caryophyllène en SM/IE

➔ Le pic moléculaire attribué au fragment à $m/z=204$.

➔ Le pic à $m/z=93$ constitue celui du pic de base. Il a été obtenu après que le cation fragment de rapport $m/z=120$ a libéré un radical éthylényle. Cette rupture aura lieu à la suite d'un transfert d'hydrogène sur la liaison éthylénique exocyclique en position para de l'hydrogène mobile, suivi d'un clivage homolytique au niveau de la liaison covalente carbone-carbone du cycle, conduisant à la rupture du cycle à six sommets et formation de deux nouvelles doubles liaisons éthyléniques menant ainsi à la formation du cation caractérisant ce pic de base.

➔ Le fragment à $m/z=41$ est issu d'un clivage hétérolytique qu'a subi le cation radical de cycle ouvert à $m/z=120$.

➔ Un équilibre intramoléculaire conduisant à la formation d'un composé à noyau de base bicyclique suivi d'une élimination d'un radical méthyle de l'ion moléculaire donnera naissance au fragment correspondant à $m/z=189$.

➔ Du fragment à $m/z=189$, un transfert d'hydrogène du cycle vers le radical isopropyle exocyclique engendre l'ouverture du cycle portant le groupe isopropyle. Par élimination d'une molécule neutre 2-méthyle propylène on obtient le cation fragment possédant le rapport $m/z=133$. Cette hypothèse de fragmentation est explicitée par le schéma 3.

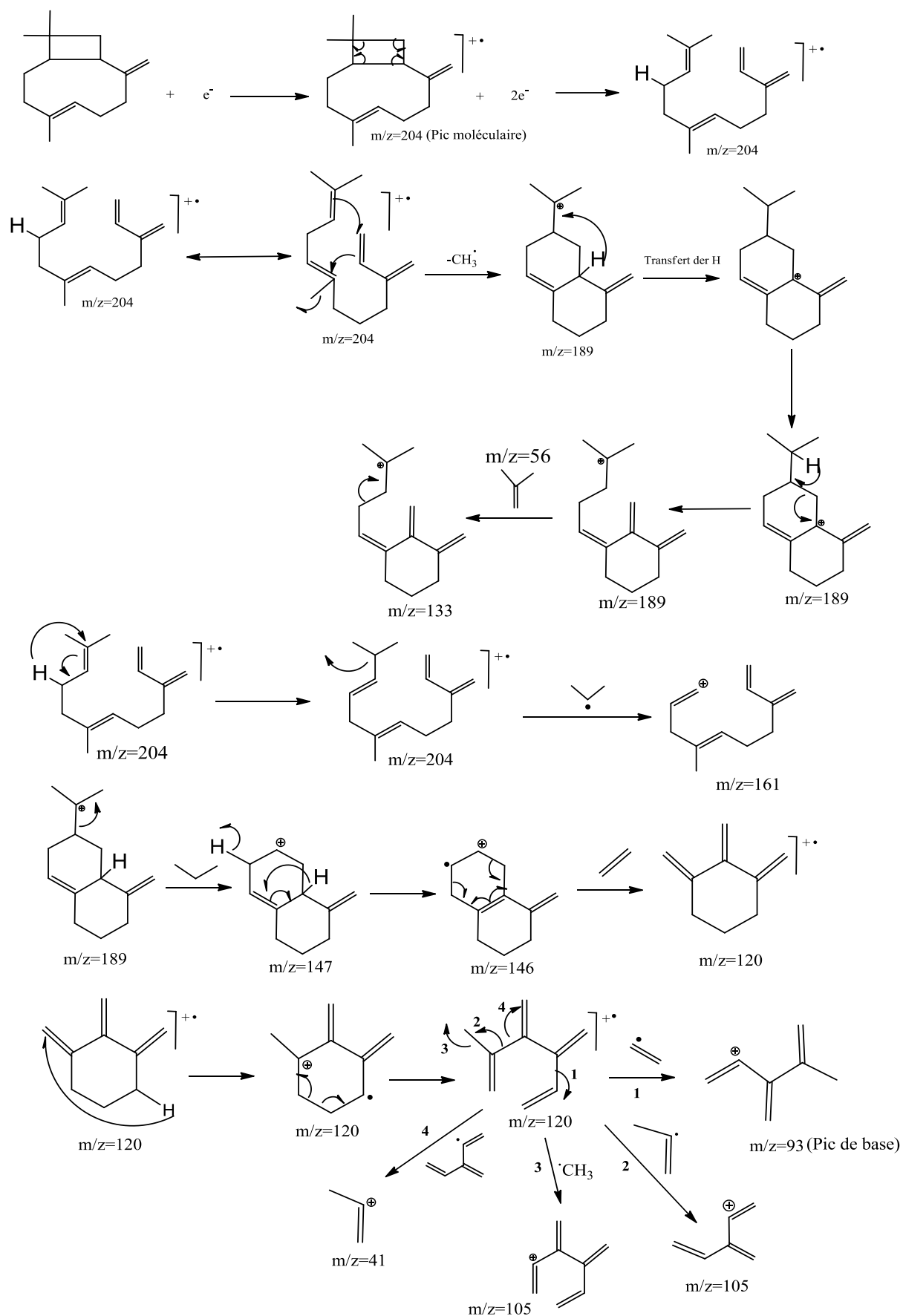


Schéma 3 : Hypothèse de fragmentation du β -caryophyllène

III.2.3.4.2. Limonène

La figure 15 montre la fragmentation en masse du limonène.

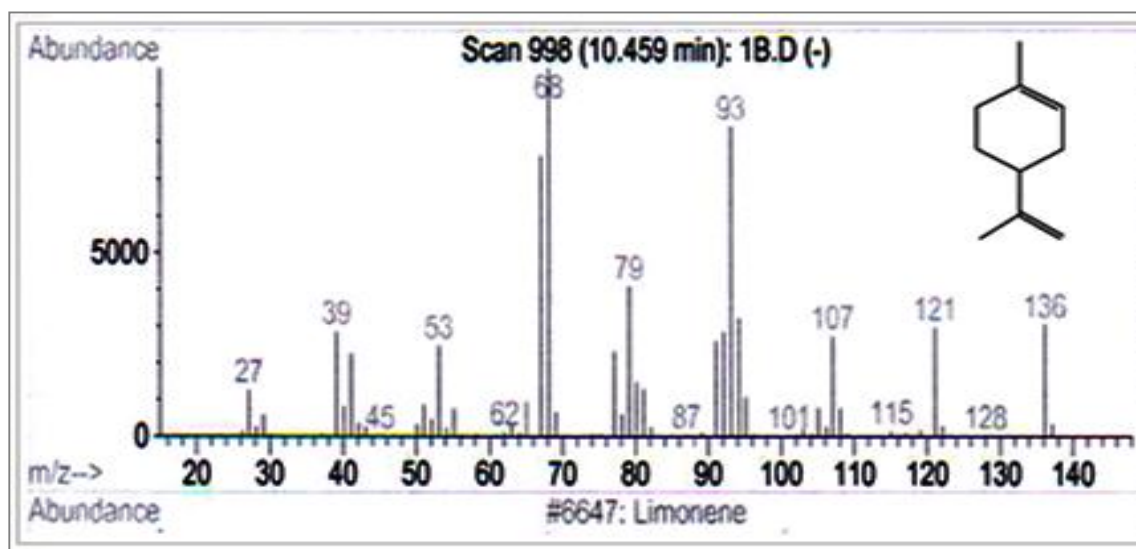


Figure 15 : Spectre de fragmentation du limonène en SM/IE

L'hypothèse de fragmentation de ce composé a été décrite comme suit :

➔ Le pic à $m/z = 136$ correspond au pic moléculaire

➔ Le pic à $m/z = 68$ correspond au pic de base. Il a été obtenu selon le mécanisme de type retro Diels-Alder par lequel l'ouverture du cycle par des clivages homolytiques au niveau de l'ion moléculaire génère le radical cation constituant le pic de base et une autre molécule neutre (non détectée).

➔ Après éjection d'un groupement radical libre méthyle, L'ion moléculaire a donné le fragment dont le rapport $m/z=121$. Ce clivage peut se produire soit par rupture au niveau du groupe méthyle en « 1 » du cyclohexène, soit par rupture au niveau du groupement propényle substituant fixé sur la quatrième position du cyclohexène.

➔ Le fragment à $m/z=93$ résulte du départ d'un radical libre propyle à partir de l'ion moléculaire auparavant stabilisé par effet de la délocalisation de la liaison π du côté du substituant propylénique en « 4 » du cyclohexène.

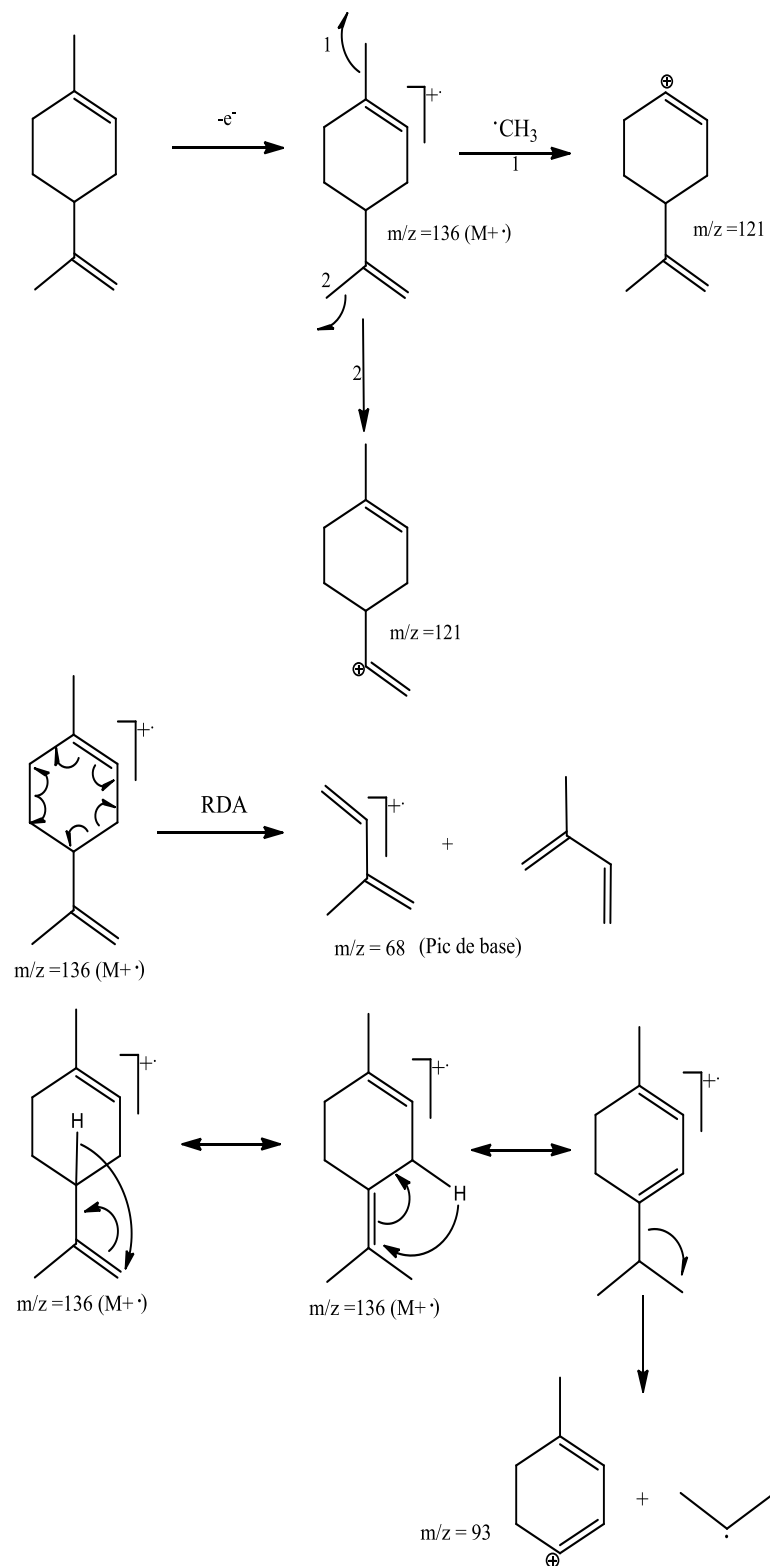


Schéma 4 : Hypothèse de fragmentation du limonène en SM/IE

III.2.3.4.3. β -myrcène

Le spectre de masse représenté par la **Figure 16** représente la fragmentation en masse du β -myrcène.

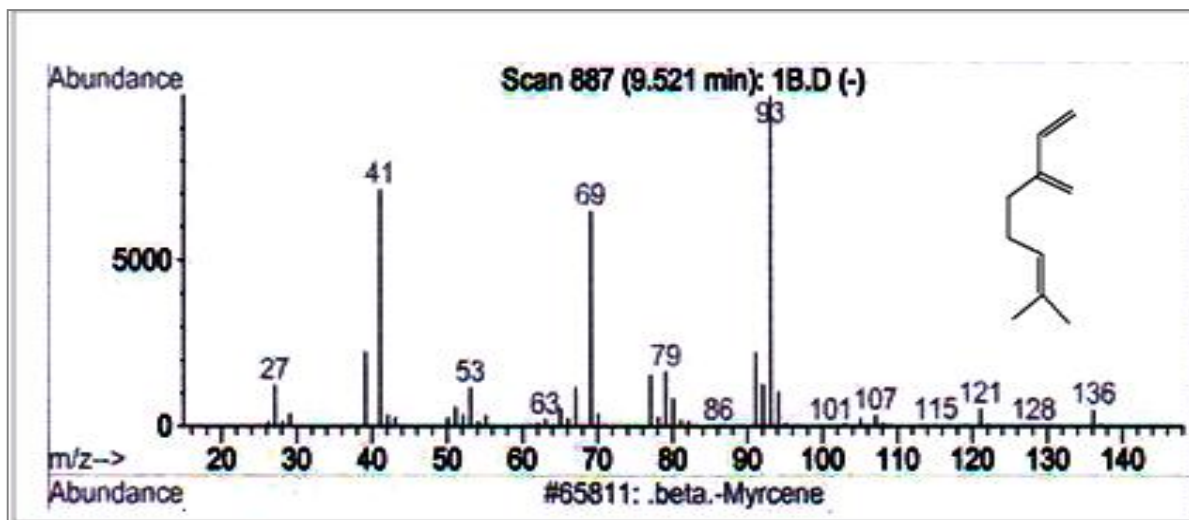


Figure 16 : Spectre de fragmentation du β -myrcène en SM/IE

➔ Le pic de base du β -myrcène correspond au fragment à $m/z=93$. Celui-ci résulte d'un réarrangement intramoléculaire conduisant ensuite à l'éjection d'un radical libre propyle pour donner le pic de base à $m/z=93$.

➔ La valeur $m/z=136$ correspond à celui du pic de l'ion moléculaire.

➔ De l'ion moléculaire, l'éjection d'un radical libre méthyle conduit à la formation du fragment correspondant au pic à $m/z=121$.

➔ Ce même ion moléculaire produit le fragment à $m/z=69$ après avoir expulsé un radical libre dérivé d'alcène (-diène).

➔ Le pic à $m/z=41$ est issu d'un réarrangement intramoléculaire au niveau de l'ion moléculaire suivi d'une éjection d'un radical libre dérivé d'alcène (Hexa-1,3-diène)

Le **schéma 5** met en évidence ces hypothèses de fragmentation.

Ainsi, ces hypothèses de fragmentation nous a permis de justifier l'identité de ces quatre composés majoritaires de l'huile essentielle de *Beilschmiedia microphylla*.

L'analyse en CPG/SM de l'huile essentielle nous a permis d'identifier dix-neuf (19) constituants. Parmi lesquels, quatre sont majoritaires : β -caryophyllène 12,34% (tr = 21,69min), limonène 8,18% (tr = 10,46min), β -myrcène 6,22% (tr = 9,52min) et β -ocimène 4,65% (tr = 11,10min), soit 31,39% de l'huile essentielle. Le reste (68, 61%) a une teneur inférieure à 4%, comme l' α -pinène 2,3% (tr=7,25min), (E)- β -Farnésène 1,65% (tr =23,18min) et l' α -copaène 0,53% (tr=18,26min).

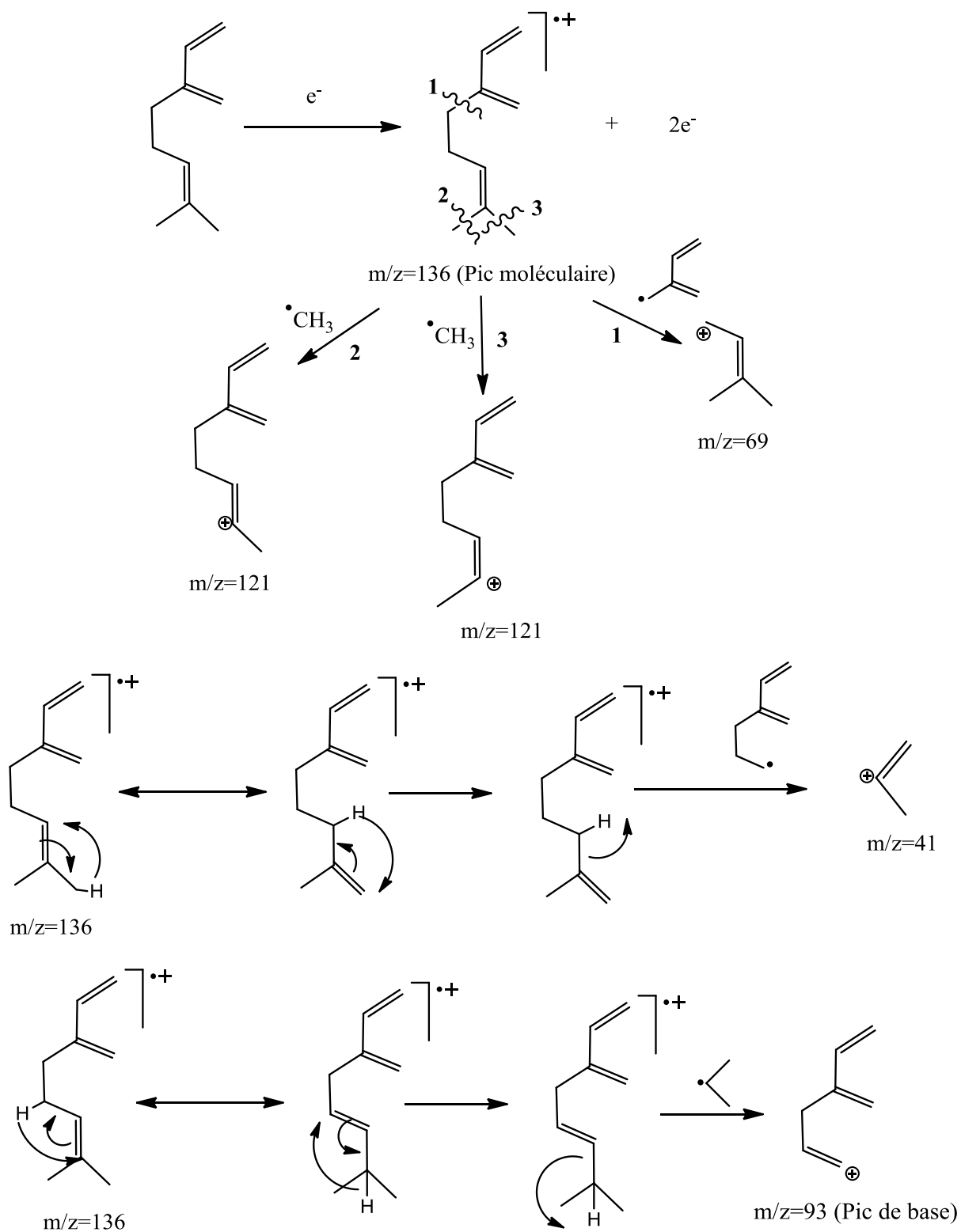


Schéma 5 : Hypothèse de fragmentation du β -myrcène par SM/IE

III.2.3.4.4. (E)- β -ocimène

La **figure 17** indique le spectre de la fragmentation du trans- β -ocimène.

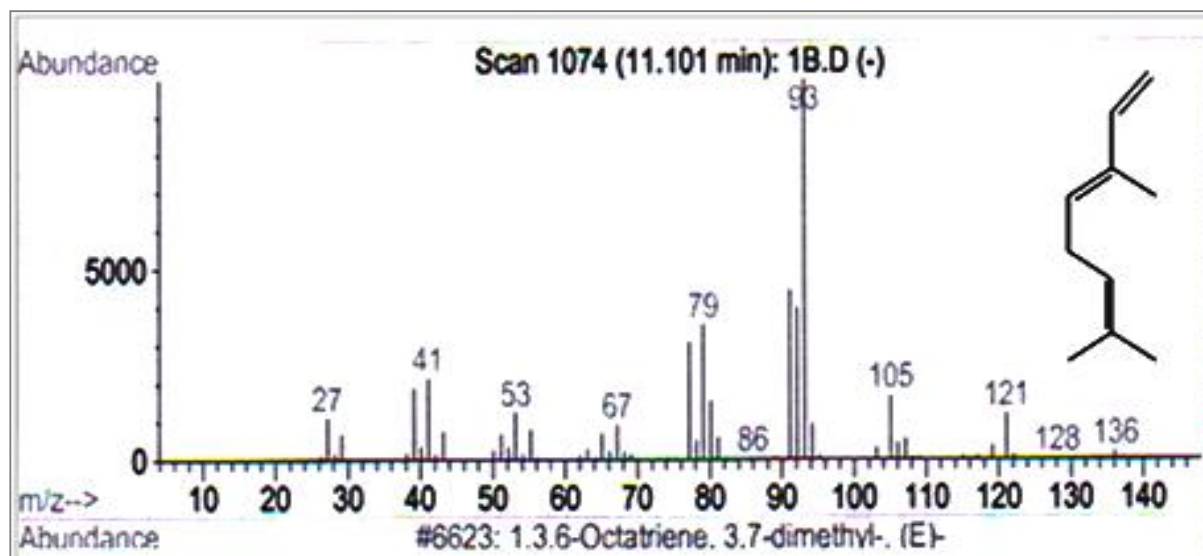


Figure 17 : Spectre de fragmentation de l'E- β -ocimène en SM/IE

➔ Sur ce spectre, l'abondance 100% se trouve à m/z égale à 93. Celle-ci constitue le pic de base le spectre de fragmentation du trans- β -ocimène.

➔ La valeur $m/z=136$ qui est la plus élevée de tous les autres rapports masse/charge correspond à celui du pic de l'ion moléculaire. Ce dernier résulte de l'arrachement d'un électron sur la molécule de départ.

➔ De l'ion moléculaire, l'éjection d'un radical libre méthyle conduit à la formation du fragment correspondant au pic à $m/z=121$.

➔ Ce même ion moléculaire produit le fragment à $m/z=67$ après avoir expulsé un radical libre dérivé d'alcène. (2-méthylbut-2-ényl-)

➔ L'ion moléculaire a subi un réarrangement intramoléculaire conduisant ensuite à l'éjection d'un radical libre propyle pour donner le pic de base à $m/z=93$.

Ces hypothèses de fragmentation sont données dans le **schéma 6**.

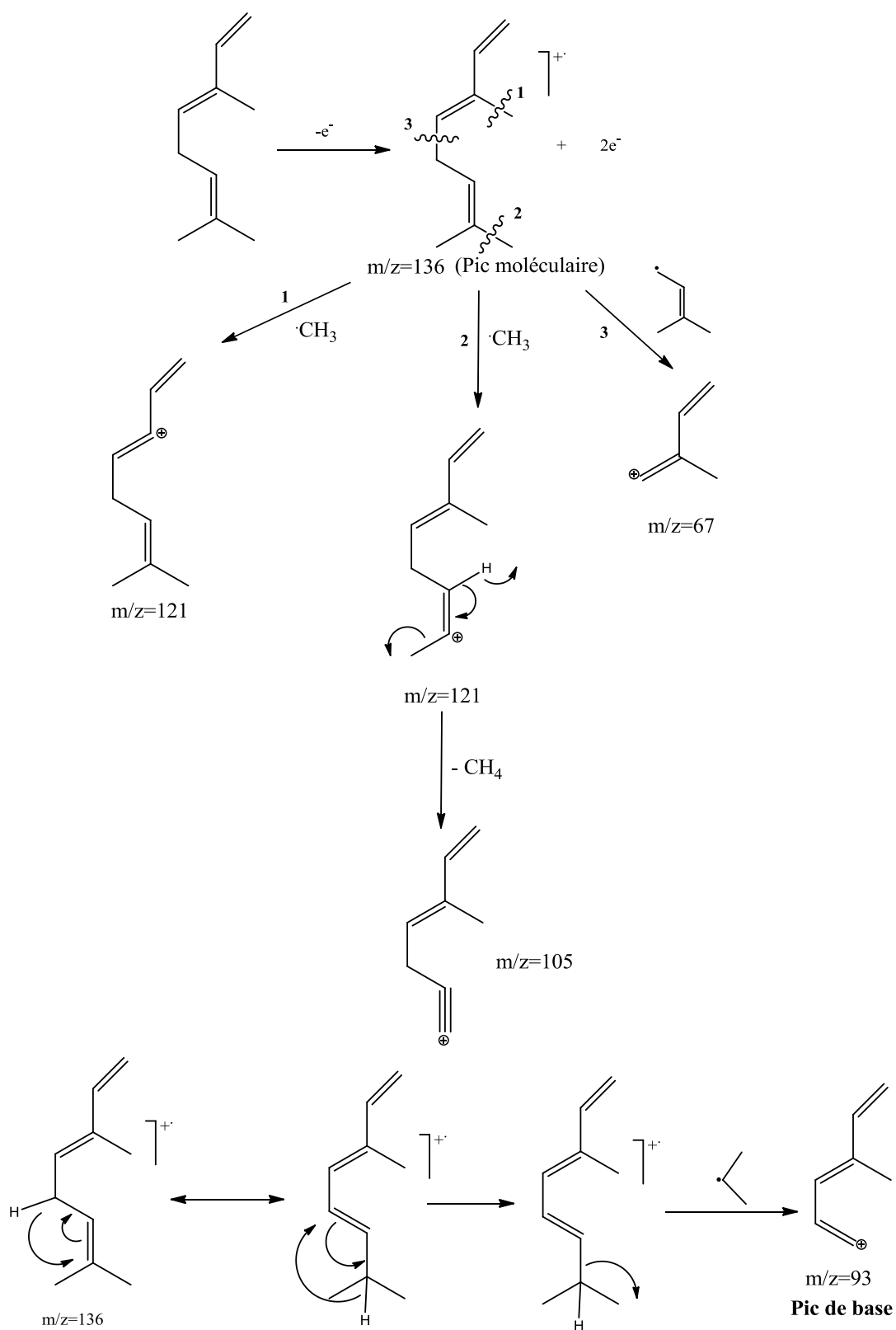


Schéma 6 : Hypothèse de fragmentation du (E)-β-ocimène en SM/IE

Chapitre 3 : Etudes de l'extrait des feuilles

III.3. ETUDE DE L'EXTRAIT DES FEUILLES DE *Beilschmiedia microphylla* (HE2847F₁₁₂)

Sur cette partie, nous avons pour but d'isoler un des composés de l'extrait des feuilles en appliquant la méthode bioguidée. C'est une technique qui combine la méthode d'analyse en phytochimie avec le test biologique. L'objectif est que la molécule isolée soit le responsable de l'activité biologique.

III.3.1. Isolement et analyse structurale du produit HE2847F₁₁₂-II

III.3.1.1. Obtention de l'extrait étudié HE2847F₁₁₂-II

Le **Schéma 7** montre la démarche suivie. La liste des matériels utilisés est illustrée par le **tableau 10**.

Tableau 10 : Matériels pour l'étude de l'extrait

Matériels	Usage
Balance METTLER TYPE AM100, de portée max=100g Balance METTLER TYPE AM 300 de portée max=300g	Pesage
Bain thermostaté MEMMERT à température réglable de 20°C à 110°C	Bain marie
Ampoule à décanter	Décantation (séparation liquide liquide)
Evaporateur rotatif BUCHI R-3000 de température réglable variant de 0°C à 90°C Evaporateur rotatif ROTAVAPOR R-210 de température réglable jusqu'à 180°C. Dessicateur, azote liquide	Séchage (concentration de l'extrait)
Ultrason type VWR ULTRASONIC CLEANER	Dissolution
Colonne de verre munie d'un robinet de longueur 50cm, de diamètre interne Ø=2cm. Colonne de verre munie d'un robinet de longueur 20cm et de diamètre interne Ø=1cm.	Fractionnement et isolement
Lampe UV SPECTROLINE $\lambda=254\text{nm}$	Révéléateur (observation des taches sur CCM)
Plaques de silice prêtes à l'emploi POLYGRAM SIL G/UV254 Cuve chromatographique	Chromatographie sur couche mince
Pulvérisateur	Révéléateur universel (vanilline sulfurique)
Plaque chauffante, chauffe ballon Barnstead Electrothermal	Chauffage
RMN ¹ H et RMN ¹³ C type BRUKER 300 (300MHZ)	Obtention des spectres en RMN pour l'identification structurale.

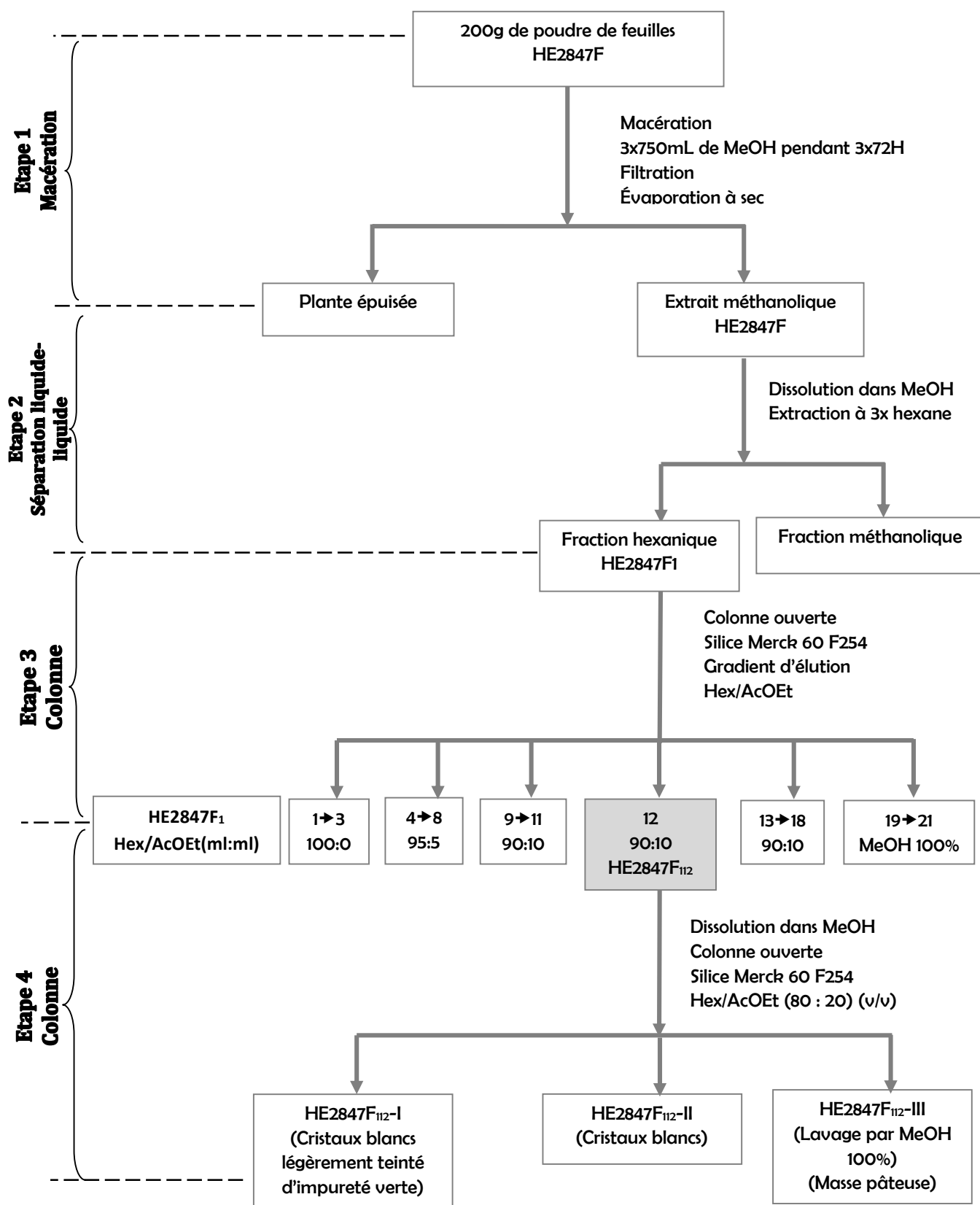


Schéma 7 : Protocole d'obtention du produit HE2847F₁₁₂-II

III.3.1.2. Analyse structurale de HE2847F₁₁₂

La spectrométrie RMN a été mise à profit.

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une technique destinée à l'analyse de la structure moléculaire. La spectroscopie par RMN constitue l'un des plus puissants instruments de détermination de la structure des espèces organiques aussi bien qu'inorganiques.

III.3.1.2.1. Spectre RMN ¹H [32], [34]

Le spectre de RMN ¹H est caractérisé par :

- le cadre de déplacement chimique compris entre 0 à 15 ppm.
- Les signaux sont sous forme de pics, l'allure (appelé aussi multiplicité) pouvant être singulet (un seul pic), doublet (2 pics), triplet (3 pics) ou multiplet (plusieurs pics). Chaque signal représente un site protonique.
- présence des courbes appelées courbes d'intégration, ce sont des courbes en forme de palier représentant l'intégration de la surface sous chaque pic d'un signal, la hauteur du palier est proportionnel au nombre de proton correspondant au signal.
- Pour un proton considéré, plus l'environnement chimique est électronégatif, plus le proton est déblindé c'est-à-dire absorbe vers les $\delta(\text{ppm})$ supérieur.

Pour le repérage des déplacements chimiques des noyaux d'un échantillon à analyser, une substance standard est utilisée comme référence le tétraméthylsilane (TMS).

III.3.1.2.2. Spectre RMN ¹³C (Broad Band Decoupling) [32], [34]

Ce spectre est caractérisé par :

- des valeurs de déplacements chimiques variant de 0-250ppm ;
- des signaux uniquement sous forme de singulet ;
- absence d'une courbe d'intégration.

Ce spectre donne le nombre de carbone dans la molécule à condition qu'il n'y ait pas chevauchement de signaux indiquant des carbones isochrones (même environnement chimique).

Procédure de l'analyse spectrale

Le composé isolé HE2847F₁₁₂-II a été analysé en RMN¹H et en RMN¹³C. Le spectromètre utilisé est de type Bruker AC 300 de fréquence 300MHz.

L'enregistrement des spectres a été effectué au Laboratoire de Pharmacognosie, UMR 8638, Université Paris Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques.

III.3.2. Résultats et discussions

III.3.2.1. Résultats de l'obtention de HE2847F_{112-II}

Nous avons réalisé 4 étapes successives pour aboutir au produit final HE2847F_{112-II} (*cf* **Tableau 11**).

Tableau 11 : Les étapes réalisées pour l'obtention de HE2847F_{112-II}

Etapes	Descriptions	Produits Obtenus
1	Macération alcoolique	HE2847F
2	Séparation Liquide-Liquide	HE2847F ₁
3	Fractionnement sur Colonne	HE2847F ₁₁₂
4	Isolement sur Colonne	HE2847F _{112-II}

Le **schéma 8** montre la démarche utilisée ainsi que les résultats obtenus pour chaque étape.

Chaque extrait obtenu après l'étape 2 (Séparation Liquide-Liquide) ont été soumis au test d'activité antimalariale, antioxydant et antimicrobien.

La valeur de IC₅₀=13,46µg/ml de la fraction hexanique HE2847F₁ s'avère intéressant. Nous avons donc concentré la suite de notre travail sur l'extrait hexanique.

Le choix du solvant d'élution nécessaire pour la réalisation du fractionnement sur colonne (Etape 3) nous conduit à faire un CCM de l'extrait HE2847F₁ (**Figure 18**)



Eluant : Hex/AcOEt (90 : 10)

Adsorbant : Gel de silice 60

Echantillon : HE2847F₁ (Extrait hexanique)

Révélateur : vanilline sulfurique

Figure 18 : Profil chromatographique sur CCM de l'extrait hexanique

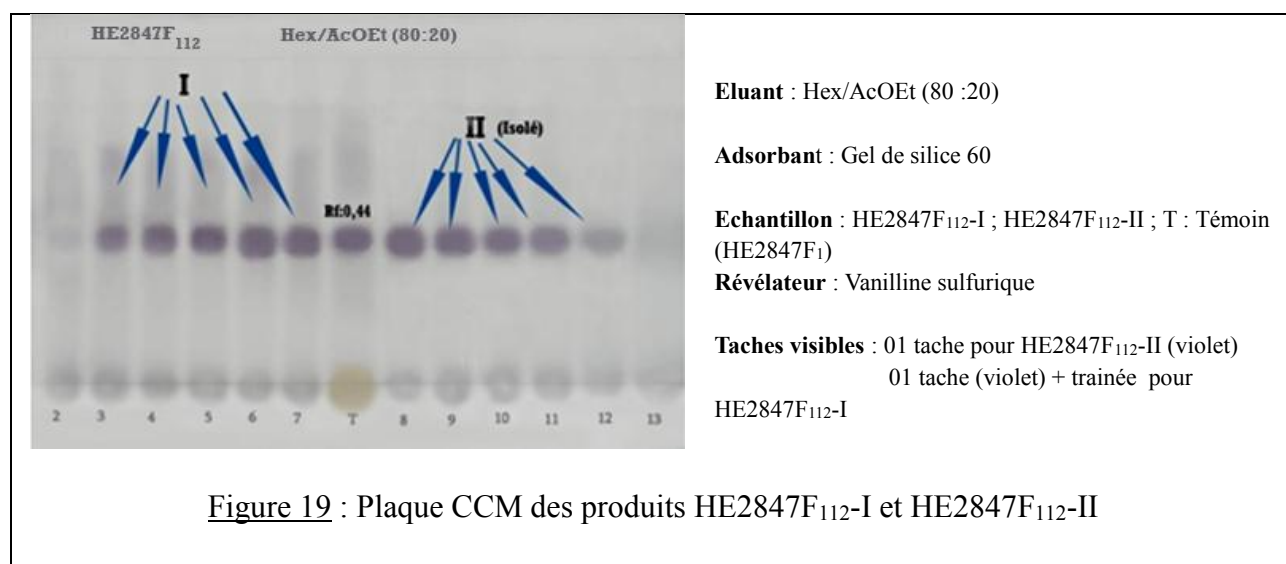
L'interprétation de cette chromatographie est résumée sur le **tableau 12**.

Tableau 12 : Résultats de l'analyse en CCM [Hex/AcOEt (90/10)]
de la fraction HE2847F₁

N° tache	Couleur	Référence frontale
1	Vert avocat	0,17
2	Bronze	0,24
3	Brun	0,41
4	Bronze foncé	0,48
5	Bronze clair	0,55
6	Brun clair	0,63
7	Bronze clair	0,68
8	Bronze clair	0,75
9	Bronze foncé	0,81

La fraction HE2847F₁₁₂, sous forme de cristaux, et présentant une IC₅₀=0,39µg/ml a été retenue pour les différents tests biologiques (*cf.* schéma 10, § III.4.3.1. Résultats des analyses antiplasmodiales de *Beilschmiedia microphylla* p. 70). La valeur de IC₅₀ < 0,39µg/ml indique une activité antimalariale intéressante comparé à celui du Quinine (IC₅₀ = 3,5µg/mL) [8].

L'étape 4 (Isolement sur colonne) était suivie par le CCM illustré ci-dessous montrant l'aspect des fractions obtenues. (**Figure 19**)



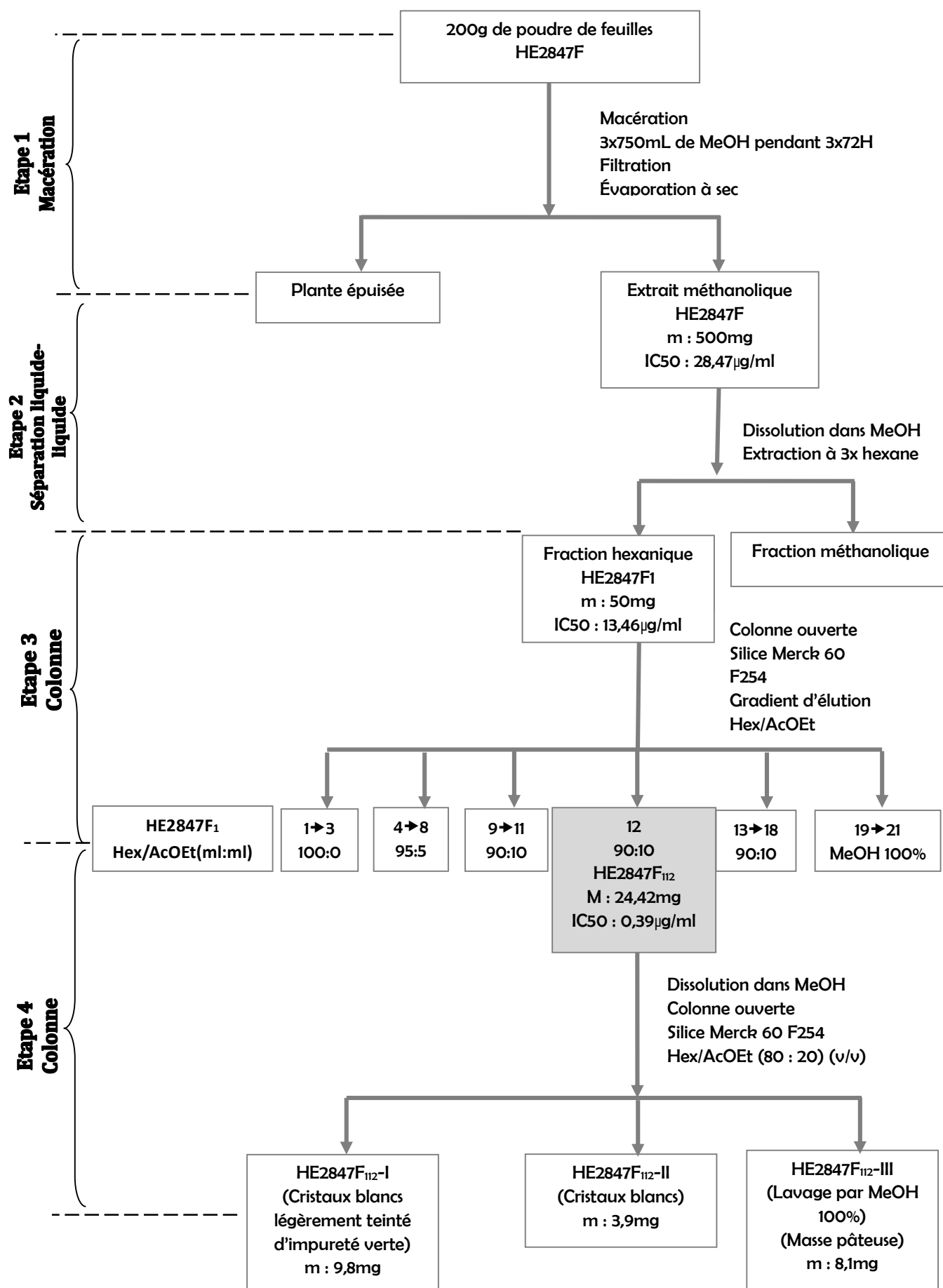


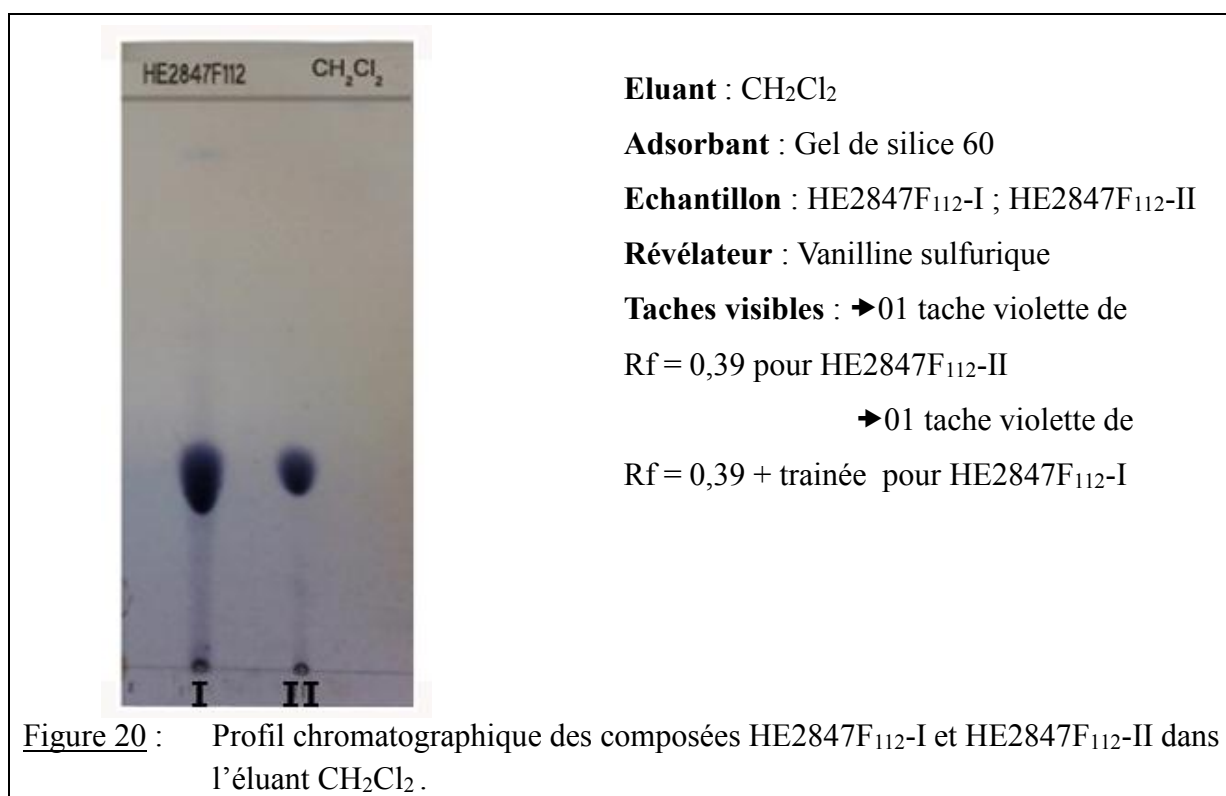
Schéma 8 : Résultats pour chaque étape d'obtention du produit HE2847F_{I12-II}

L'isolement sur colonne ouverte d'adsorbant silice Merck 60 F254 sur système d'éluant isocratique hexane/AcOEt (80 : 20) de l'extrait HE2847F₁₁₂ nous a permis de récupérer trois fractions qui après évaporation montrent des aspects différents :

- ➔ HE2847F₁₁₂-I se cristallise en donnant des cristaux à éclat blanc teinté de vert ;
- ➔ HE2847F₁₁₂-II se cristallise en cristaux à éclat tout blanc ;
- ➔ HE2847F₁₁₂-III se présente sous forme de masse pâteuse.

Une vérification de pureté des deux composés HE2847F₁₁₂-I et HE2847F₁₁₂-II a été effectuée en utilisant le CH₂Cl₂ comme éluant. Après révélation à la vanilline, le composé référencié par « I » présente une tache violette de référence frontale 0,39 mais encore accompagné d'une trainée allongée à partir de la tache du dépôt jusqu'à celle de l'échantillon. Par contre, le composé référencié par « II » ne présente qu'un seul spot de couleur violette ayant pour de référence frontale 0,39. Ce résultat nous montre que HE2847F₁₁₂-II a un degré de pureté plus élevé par rapport au composé HE2847F₁₁₂-I.

Le profil chromatographique obtenu est donné dans la **figure 20**.



III.3.2.2. Analyse structurale

II.3.2.2.1. Identification des spectres

Le **tableau 13** montre l'identification des deux spectres de RMN, S1 et S2 enregistrés pour le composé HE2847F₁₁₂-II.

Tableau 13 : Identification des spectres

SPECTRES	S1	S2
IDENTIFICATIONS	<ul style="list-style-type: none">➔ Domaine de δppm : 0,6 à 5,4ppm.➔ Présence des valeurs montrant l'intégration de la surface des signaux.➔ L'allure des signaux se présente sous forme de singulet et de multiplet. S1a, S1b, S1c, S1d, S1e sont les étalements des signaux des zones des δ ppm respectifs de 2,15 – 2,35ppm ; 5,30 – 5,40ppm ; 4,97 – 5,2ppm ; 0,75 – 1,05ppm ; 3,45 – 3,60ppm	<ul style="list-style-type: none">➔ Domaine de δppm : 5 à 145ppm.➔ Les signaux se présentent uniquement par des singulets. $\delta(\text{ppm}) = 77,03$: solvant CDCl ₃
CONCLUSIONS ET INFORMATIONS A TIREES	Spectre RMN ¹ H 1D Ce spectre permet de voir les différents types de sites protoniques ainsi que l'enchaînement des sites protoniques de la molécule.	Spectre RMN ¹³ C monodimensionnel « Broadband Decoupling » Ce spectre informe sur le nombre d'atomes de carbone à condition qu'il n'y ait pas chevauchement des signaux.

II.3.2.2.2. Interprétation des spectres

Identification du solvant

La présence du signal intense à 77,03ppm sur le spectre S2 du produit HE2847F₁₁₂-II montre que le solvant utilisé est le chloroforme deutérié (CDCl₃). Cette hypothèse a été confirmée par l'absence du signal à $\delta = 7,23$ ppm sur le spectre S1 du même composé.

Table de référence

$\delta^1\text{H}$ 7,23ppm : Chloroforme-d1

$\delta^{13}\text{C}$ 77,00ppm : Chloroforme-d1

Elucidation structurale de HE2847F₁₁₂-II

- Interprétation du spectre S1

Le spectre S1 est donné dans la **figure 21**



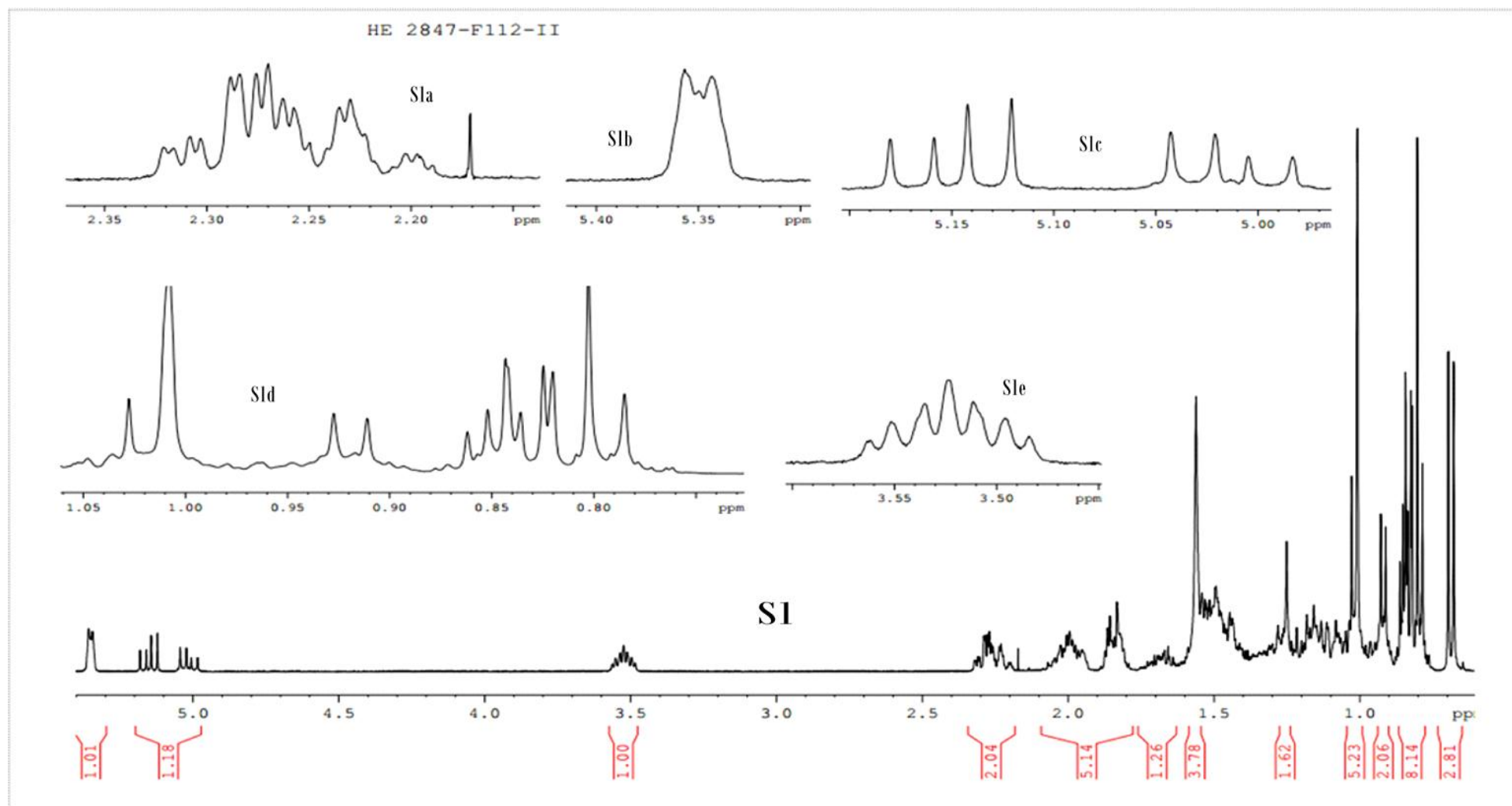


Figure 21: Spectre (S1), RMN ^1H du composé HE2847F $_{112}$ -II

Les informations relevées du spectre S1 sont rassemblées sur le **tableau 14**.

Tableau 14 : Informations tirées du spectre RMN¹H (S1)

δ ppm	Multiplicité des pics et allure	Nombre des protons
5,34	doublet	1
5,17	Doublets dédoublés	1
5,03	Doublets dédoublés	1
3,52	Multiplet	1
2,34 – 2,21	Multiplet	2
1,03	Masqué	3
1,01	Singulet	3
0,92	doublet	3
0,81	Masqué	3
0,84	doublet	3
0,68	Singulet	3

Le spectre RMN ¹H (cf. figure spectre S1 avec étalement) de ce produit présente des signaux correspondants à 6 **méthyles** à $\delta=0,68, 0,81, 0,84, 0,92, 1,01$ et $1,03$ ppm, un multiplet intégrant pour un proton à $\delta=3,52$ ppm, 3 résonances de **protons éthyléniques** à $\delta=5,03 ; 5,17 ; 5,34$ ppm et un multiplet intégrant 2 protons à δ ppm compris entre $2,34 - 2,21$.

Table de référence $\delta^1\text{H}$	
$\text{CH}_3\text{—}$	0,6 - 1,4ppm
— CH = CH — (aliphatique) :	4,6 - 8ppm
— CH = CH — (cyclique) :	5 - 6ppm

-Interprétation du spectre S2

Le spectre S2 est donné dans la **figure 22**

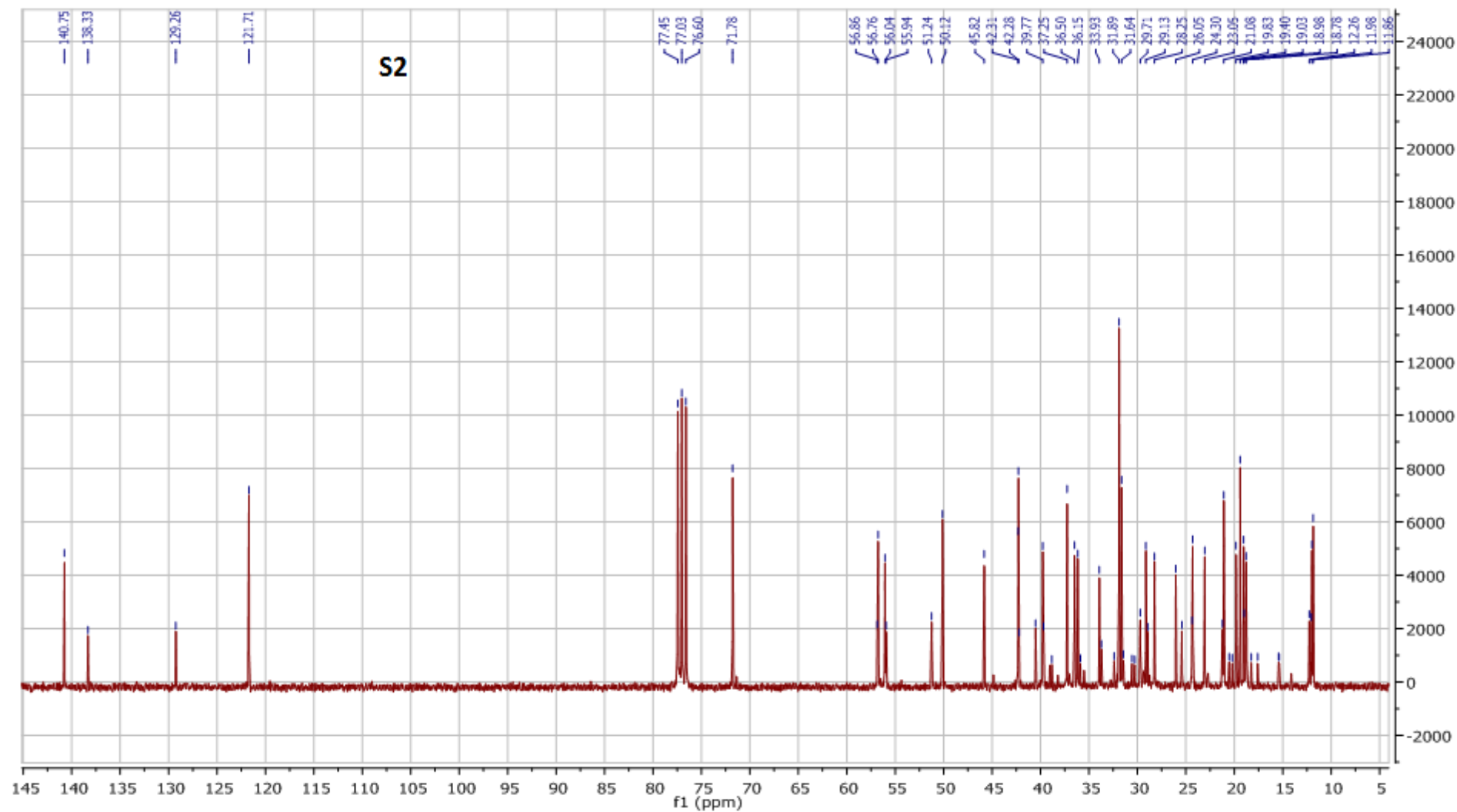


Figure 22 : Spectre (S2), RMN ^{13}C du composé HE2847F₁₁₂-II

Le spectre ^{13}C permet d'obtenir le nombre de carbone constituant la molécule à condition qu'il n'y ait pas superposition de signaux. Le spectre ^{13}C totalement découplé (Broad Band Decoupling) enregistré dans le chloroforme deutérié (CDCl_3) montre 29 atomes de carbones. Le composé $\text{HE2847F}_{112}\text{-II}$ comporte au total **29 carbones**.

A partir du spectre RMN ^{13}C (S2) du produit $\text{HE2847F}_{112}\text{-II}$, on a relevé les informations suivantes :

➔ Dans la région de déplacement chimique compris entre 120ppm à 145ppm, **04 pics** ont été observés dont leurs déplacements chimiques respectifs sont δ : **140,75 ; 138,33 ; 129,26 ; 121,71ppm**.

➔ Dans la région de déplacement chimique compris entre 60ppm à 75ppm, **01pic** a été observé. Son signal apparaît pour $\delta = 71,78\text{ppm}$.

➔ Dans la région de déplacement chimique allant de 10ppm à 60ppm, **24 pics** ont été observés. Leurs signaux apparaissent pour $\delta = 56,86 ; 56,76 ; 51,24 ; 50,12 ; 45,82 ; 42,31 ; 42,28 ; 39,77 ; 37,25 ; 36,50 ; 33,93 ; 31,89 ; 31,64 ; 29,71 ; 28,25 ; 26,05 ; 24,30 ; 23,05 ; 21,08 ; 19,83 ; 19,40 ; 19,03 ; 12,26 ; 11,98 \text{ ppm}$.

A cette étape, les résultats permettent de poser comme hypothèse une structure « triterpénique » au composé isolé $\text{HE2847F}_{112}\text{-II}$, qui serait soutenue par la présence de nombreux pics rassemblant à « une forêt », dans la région des δppm blindés compris entre 0,7ppm à 1,6ppm » [34].

Selon la littérature [30] le pic apparaissant à la valeur de $\delta 71,83\text{ppm}$ est caractéristique d'un groupe hydroxyle (-OH) porté par le carbone en C3 du noyau stéroïdique. Ainsi la structure probable du produit serait celle stérol. D'après les travaux d'Agrawal PK [1], les déplacements chimiques $\delta 140,77\text{ppm}$ et $121,72\text{ppm}$ sont caractéristiques de la double liaison entre les carbones en C5 et C6 du stigmastérol. Ainsi, ces deux dernières informations peuvent permettre d'envisager pour $\text{HE2847F}_{112}\text{-II}$ une structure du type stigmastérol.

Les valeurs de δppm des ^1H et ^{13}C de $\text{HE2847F}_{112}\text{-II}$ et du stigmastérol sont portées dans les tableau 15 et 16 [21], [27], [28], [41]. La figure 23 indique la numérotation conventionnelle de la chaîne carbonée.

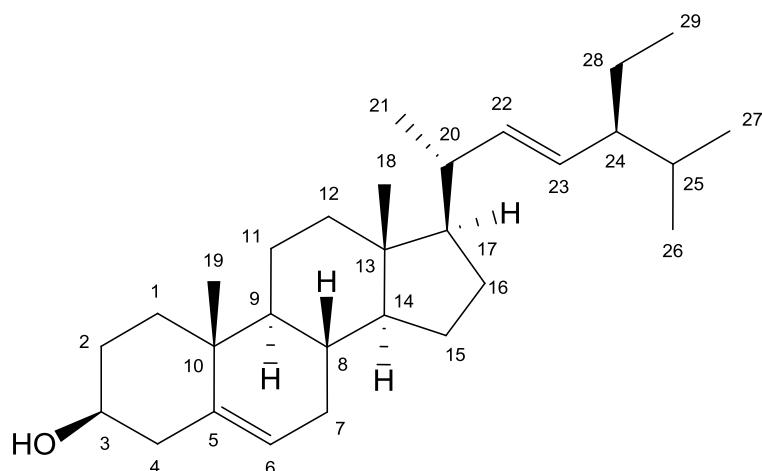


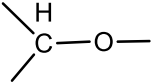




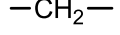
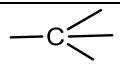

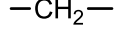
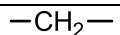
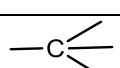


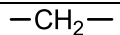
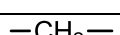
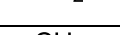
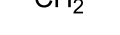
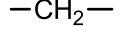

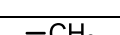





Figure 23 : structure du STIGMASTEROL

Tableau 15 : Comparaison des déplacements chimiques des ^1H de HE2847F₁₁₂-II avec du stigmasterol

δ ppm des ^1H du produit HE2847F ₁₁₂ -II	δ ppm des ^1H du stigmasterol [27], [41]	Protons concernés	Nombre des protons
5,34	5,33	H-6	1
5,17	5,16	H-22	1
5,03	5,02	H-23	1
3,52	3,51	H-3	1
2,34 – 2,21	2,28 – 2,21	H-4	2
1,03	1,03	H-21	3
1,01	1,009	H-19	3
0,92	0,92	H-26	3
0,81	0,82	H-29	3
0,84	0,84	H-27	3
0,68	0,68	H-18	3

Tableau 16 : Comparaison des valeurs des déplacements chimiques en RMN¹³C du produit HE2847F₁₁₂-II avec ceux du stigmasterol

δ ppm ^{13}C de HE2847F ₁₁₂ -II	δ ppm ^{13}C du stigmasterol [28]	Carbones concernées dans la structure du stigmasterol	Type de carbone	Structure carbonée correspondante (Relevé de la table des déplacements chimiques, RMN ¹³ C)
140,75	140,8	C-5	Cq	$=\text{C}$
138,33	138,3	C-22	CH	$=\text{CH}-$
129,26	129,3	C-23	CH	$=\text{CH}-$
121,71	121,7	C-6	CH	$=\text{CH}-$

71,78	71,8	C-3	CH	
56,86	56,8	C-14	CH	
56,76	56,1	C-17	CH	
51,24	51,2	C-24	CH	
50,12	50,1	C-9	CH	
45,82	45,8	C-4	CH ₂	
42,31	42,3	C-13	Cq	
42,28	40,5	C-20	CH	
39,77	39,8	C-12	CH ₂	
37,25	37,2	C-1	CH ₂	
36,50	36,5	C-10	Cq	
33,93	33,9	C-8	CH	
31,89	31,9	C-25	CH	
31,64	31,6	C-7	CH ₂	
29,71	29,71	C-2	CH ₂	
28,25	28,25	C-16	CH ₂	
26,05	26,00	C-28	CH ₂	
24,30	24,3	C-15	CH ₂	
23,05	23,10	C-21	CH ₃	
21,08	21,1	C-11	CH ₂	
19,83	19,8	C-26	CH ₃	
19,40	19,4	C-19	CH ₃	
19,03	19,0	C-27	CH ₃	
12,26	12,0	C-18	CH ₃	
11,98	11,9	C-29	CH ₃	

Ainsi les valeurs de δ ppm des ^1H et ^{13}C de HE2847F₁₁₂-II sont identiques à celle du stigmastérol. L'hypothèse de cette dernière pour HE2847F₁₁₂-II est probable.

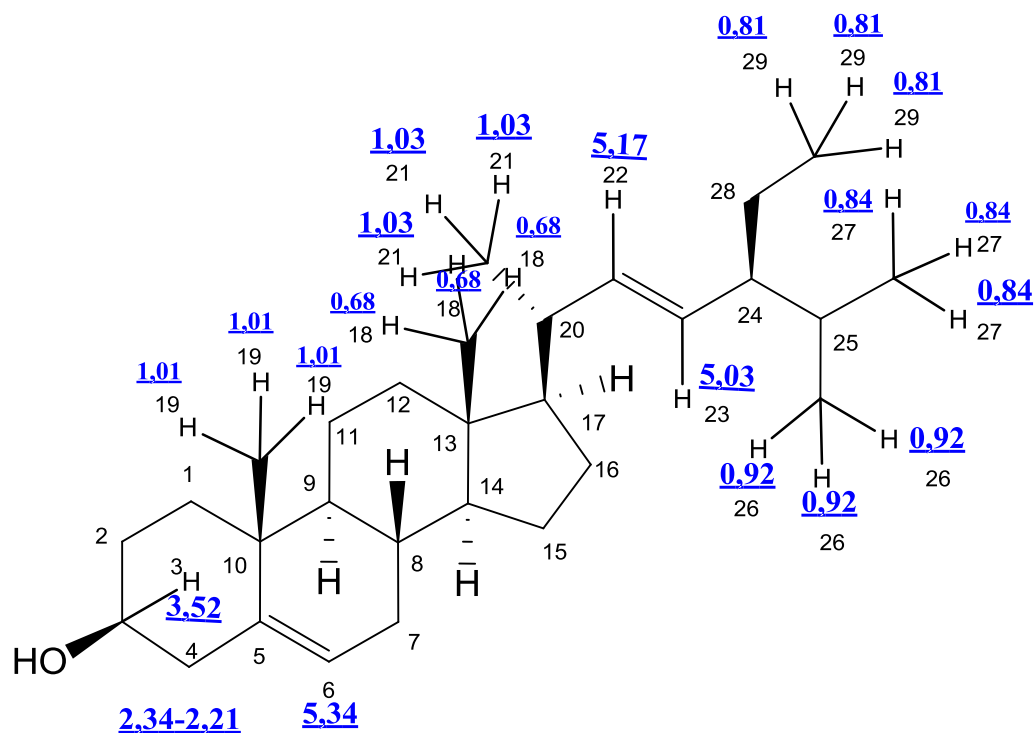


Figure 24 : Déplacements chimiques des protons du stigmasterol

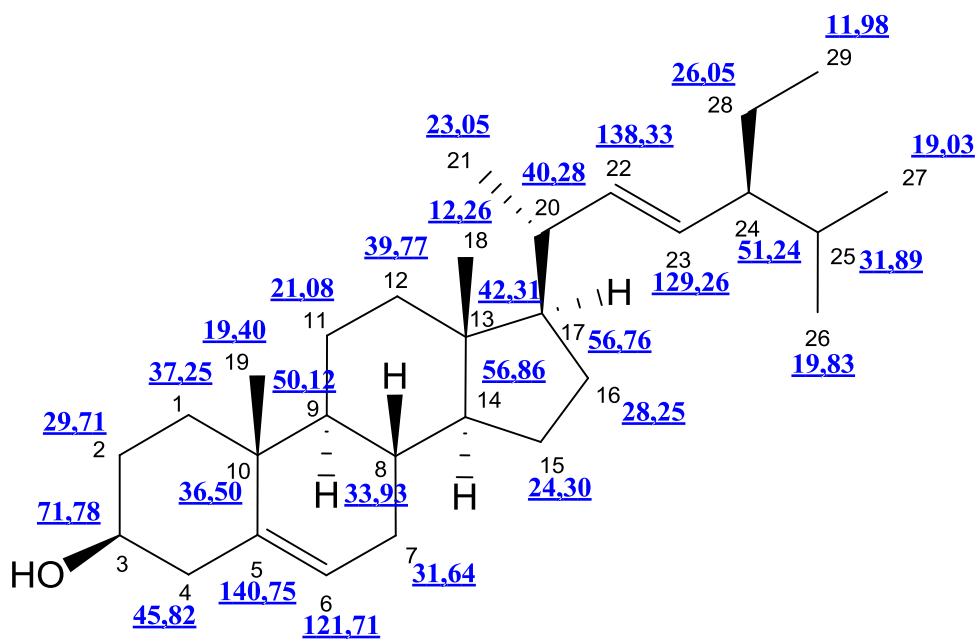


Figure 25 : Déplacements chimiques des carbones du stigmasterol

Chapitre 4 : Travaux biologiques

III.4. ETUDES BIOLOGIQUES

Selon la littérature, des espèces du genre *Beilschmiedia* ont des activités antimalariales (*B. cryptocaryoïde*), antioxydante (*B. zenkeri*) et antibactérienne (*B. anacardioïde*).

L'objectif de cette partie du travail consiste à évaluer ces trois activités pour l'espèce *B. microphylla*. Le même produit HE2847F a été utilisé à cet effet.

III.4.1. Matériels

III.4.1.1. Les germes utilisés

Le **tableau 17** regroupe les différents germes utilisés (moisissures, levures, bactéries).

Tableau 17 : Liste des germes utilisés

champignons	levures	bactéries	
		Gram +	Gram -
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Aspergillus terreus</i> <i>var terreus</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Listeria monocytogènes</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Fusarium monoliforme</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Streptococcus pyogène</i>	<i>Echerichia coli</i>
<i>Trichoderma viride</i>	<i>Candida dubliniensis</i>		<i>Salmonella enterica</i>
<i>Fusarium sporotricoides</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
			<i>Shigella flexneri</i>
			<i>Proteus mirabilis</i>

Pour le test antiplasmodial : *Plasmodium falciparum* FCM 29

III.4.1.2. Milieux de cultures

Mueller Hinton Agar, Sabouraud Agar et eau peptonée sont les milieux de cultures utilisés.

Le Mueller Hinton Agar est un milieu polyvalent servant à la culture d'un grand nombre de microorganismes (exigeants et non exigeants).

L'eau peptonée est un milieu de culture liquide qui permet la culture de bactéries, de levures et de moisissures.

Le Sabouraud Agar est un milieu d'isolement des moisissures et des levures.

Pour le test antioxydant, une solution de DPPH à 0,004% a été utilisée comme révélatrice de la plaque CCM.

III.4.1.3. Extraits à tester

Pour les études biologiques, 04 extraits provenant de la poudre de feuille de *Beilschmiedia microphylla* ont été testés. Il s'agit de : l'extrait méthanolique HE2847F, l'extrait Hexanique HE2847F₁, l'extrait aqueux HE2847F₃, l'extrait acétate d'éthyle HE2847F₂, 21 autres des fractions obtenues à partir de l'extrait hexanique HE2847F₁₁ à HE2847F₁₂₁.

III.4.2. Méthodes

III.4.2.1. Tests antiplasmodiaux

III.4.2.1.1. Culture des parasites [36]

La souche a été maintenue en culture continue in vitro par la méthode modifiée Trager et Jensen. Le milieu de culture est composé de RPMI 1640 standard, 25 mM NaHCO₃, 2 mM de glutamine, 25mM HEPES (Sigma, St Louis, MO), complété avec 10% de sérum humain 0+, (banque de sang de HJRA) et inactivé à 60°C pendant une heure. Au milieu de culture sont ajoutés des globules rouges humains qui proviennent de donneurs sains locaux. Ces globules rouges sont préparés dans un anticoagulant citrate-phosphate-dextrose (Sigma) à un hémocrite de 2 %. La densité de parasite est maintenue à 2% dans une atmosphère micro-aérophile (Méthode de la cloche à bougie). Pour chaque expérience, les cultures de parasite pour les essais ont été diluées dans un milieu de culture contenant suffisamment d'érythrocytes humains 0+ non infectés pour obtenir un hémocrite final de 2% et une parasitémie de 1%. Tous les essais ont été réalisés avec des cultures synchronisées au stade « ring¹ » par du sorbitol (5%) et dans des plaques de microtitration.

III.4.2.1.2. Evaluation de l'activité antiplasmodiale [37]

La méthode adoptée est celle de **Tyler N. Bennett et al.** Le principe est fondé sur la mesure de la fluorescence de la solution contenant le *Plasmodium falciparum* par ajout d'un fluorophore le SYBR Green I.

Un volume total de 200 µl composé de :

- ➔ 100µl de suspension de globules rouges infectés par la souche FCM29 de *P. falciparum* (1% de parasitémie et 2% d'hémocrite dans un milieu RPMI 1640 complété avec 20% de sérum humain).

- ➔ 50µl des extraits de plantes dilués en série

- ➔ 50µl de milieu non enrichi en sérum humain sont répartis dans les 96 puits d'une plaque.

La plaque est ensuite incubée dans une atmosphère microaérophile à 37°C pendant 72h.

Un volume de 50 µl de solution de SYBR Green I (Microprobes, Oregon, États-Unis), dilué 20 fois dans un milieu supplémenté avec du sérum humain, est ajouté dans chaque puits. Les solutions résultantes sont mélangées et laissées au repos pendant 60 minutes à l'abri de la lumière à 37°C. La

¹ Stade où les parasites sont à l'état jeune.

fluorescence est lue à 485nm/518nm (Biotek - Lecteur de microplaques FLX800) après ces 60 minutes d'incubation. Le taux de fluorescence est considéré comme proportionnel à la quantité de *P. falciparum* respective dans chaque puits (Bennett *et al.*, 2004). Les valeurs de IC₅₀, les concentrations de médicaments qui réduisent de 50% le taux de fluorescence, donc la croissance, sont ensuite déduites par calcul.

III.4.2.2. Tests antioxydants

III.4.2.2.1. Evaluation préliminaire par la méthode bioautography

Principe de la méthode bioautography [12], [14], [19], [26]

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

Elle permet de localiser sur le chromatogramme une ou plusieurs bandes actives parmi les constituants d'un extrait testé.

Mode opératoire

Avant d'évaluer quantitativement l'activité antioxydante de 04 extraits de plante, un test préliminaire à titre qualitatif en procédant par la méthode bioautography a été réalisé.

Pour ce fait, les quatre extraits dont HE2847F (extrait brut éthanolique), HE2847F₁ (extrait hexanique), HE2847F₂ (extrait AcOEt) et HE2847F₃ (extrait aqueux) ont été déposés sur la ligne de dépôt de la plaque en verre recouvert de gel de silice 60 comme adsorbant. Après l'élution par le système Hex : AcOEt (1:1), la plaque a été séchée à l'air libre. Puis, elle a été révélée à l'aide d'une solution de DPPH à 0,004% de couleur violette.

L'activité antioxydante est positive si une tâche de couleur jaune apparaît sur une zone où une bande correspondant à une référence frontale (R_f) à la surface de la plaque. Ce phénomène indique que le composé situé à cette R_f réduit le radical libre DPPH. A noter que la réaction pourrait être rapide, marquée par l'apparition immédiate des tâches jaunes, ou lente après révélation.

L'activité est négative si aucune tâche n'est apparue. Toute la surface de la plaque reste violette.

III.4.2.2.2. Evaluation de l'activité antioxydant par la méthode de DPPH

Principe de la méthode de DPPH [2], [29], [31]

Cette méthode fait appel à l'utilisation d'un radical libre stable, le 1,1-DiPhényl-2-Picryl-Hydrazyl (DPPH).

Ce radical est stable grâce à la délocalisation importante de l'électron célibataire sur la totalité de la molécule empêchant ainsi la dimérisation de se produire comme c'est souvent le cas pour les autres radicaux. En outre, cette délocalisation est à l'origine de la coloration violette en solution éthanolique ou méthanolique caractérisée par une bande d'absorption dans le visible à 516nm.

L'addition du radical DPPH· à une solution éthanolique (ou méthanolique) contenant un composé potentiellement antioxydant et pouvant céder un atome d'hydrogène entraîne une diminution de la coloration violette caractéristique de l'apparition de la forme réduite du DPPH (**schéma 9**).

Simultanément, il se forme un autre radical, lui-même pouvant engendrer des réactions secondaires, notamment des dimérisations¹. Au terme de la réaction, il persiste une légère couleur jaune due au groupe picryl résiduel.

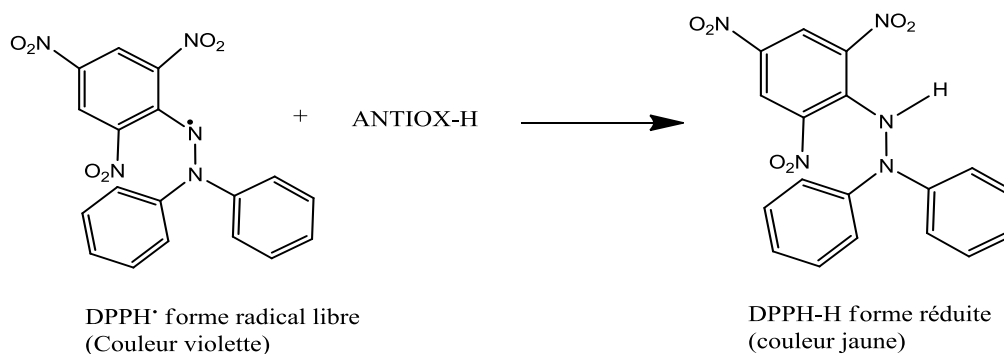


Schéma 9 : Réaction de l'antioxydant avec le DPPH·

Mode opératoire [9]

Un volume égal à 20µl de solution à tester est déposé dans chaque puits d'une microplaque de 96 puits. On ajoute ensuite 280µl de solution de DPPH à 0,004% (4mg/10ml). Le mélange est incubé pendant 1heure à 30°C. L'absorbance est ensuite mesurée à 515nm où le trolox est l'antioxydant de référence. Le test est répété en triple.

Ainsi, l'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition selon la formule

$$\% \text{ d'inhibition} : 100 - 100 (A_{\text{produit testé}} / A_{\text{blanc}})$$

A : Absorbance

Le pourcentage d'inhibition ainsi calculé a été comparé à une courbe d'étalonnage de Trolox entre 150 et 600µmol/l.

III.4.2.2.3. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode d'ORAC

La méthode d'ORAC [2]

La méthode ORAC ou Oxygen Radical Absorbance Capacity est basée sur la décroissance de la fluorescence de la fluorescéine en présence d'un oxydant chimique l'AAPH (un radical peroxy libre stable). Le produit à tester peut être capable de protéger la fluorescéine et réduire la vitesse de dégradation de la fluorescence. C'est la seule méthode qui combine à la fois le pourcentage d'inhibition de la réaction d'oxydation et la longueur dans le temps de cette inhibition en une seule

¹ Réaction d'addition entre deux monomères aboutissant à la formation d'un dimère

mesure. Le pourcentage d'inhibition peut être standardisé en le ramenant à la courbe de l'équivalent trolox exprimée en mM/mg/L d'extrait.

Mode opératoire [6]

En procédant par la méthode sus-citée, la manipulation a été réalisée de la manière suivante :

➔ Une solution tampon phosphate de 75mM (pH : 7,4) a été préparée dans 100ml de l'eau déionisée.

➔ La solution d'AAPH (2,2'-Azobis [2-methyl-propionamidin] dihydrochloride) a été préparée à l'aide de 0,414g d'AAPH dans 10ml de tampon phosphate 75mM (pH : 7,4) pour obtenir une concentration finale de 153mM.

➔ Une solution de fluoresceine à $4,19.10^{-3}$ mM a été ensuite réalisée dans une solution de tampon phosphate 75mM (pH : 7,4). Celle-ci doit être conservée au réfrigérateur à l'abri de la lumière. A chaque analyse une solution à $8,38.10^{-5}$ mM a été préparée à l'aide de la solution et du tampon phosphate 75 mM (pH : 7,4). Une solution mère de Trolox a été également réalisée à l'aide de 0,01g de Trolox dans 10ml de tampon phosphate 75mM ou de méthanol, de manière à préparer une gamme étalon de 6,25-75 μ M.

➔ 25 μ l d'échantillon ont été déposés dans chaque puits de la microplaque, puis un ajout de 150 μ l de solution de fluoresceine à $8,38.10^{-5}$ mM a été faite. La microplaque a été mise à incuber pendant 15minutes à 37°C puis 25 μ l d'AAPH (153mM) ont été ajoutés dans chaque puits. Par la suite, la microplaque a été analysée par le lecteur de microplaque du spectrofluorimètre pendant 1h 40mn, à une longueur d'onde d'excitation et d'émission respectivement de 485 ± 9 nm et 530 ± 20 nm.

Expression des résultats :

L'aire sous la courbe (fluorescence en fonction du temps) des échantillons est comparée à une gamme étalon de Trolox de 6,25-75 μ M réalisée simultanément à l'analyse.

Les résultats sont exprimés en valeur ORAC ou en équivalent Trolox (mM/mg/L) d'extrait.

$$\text{Valeur ORAC} = \frac{AUC_{\text{éch}} - AUC_{\text{blk}}}{AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{blk}}} \times \frac{C_{\text{Trolox}}}{C_{\text{éch}}}$$

$AUC_{\text{éch}}$: Air sous la courbe de l'échantillon

AUC_{blk} : Air sous la courbe du blanc

C_{Trolox} : Concentration du Trolox

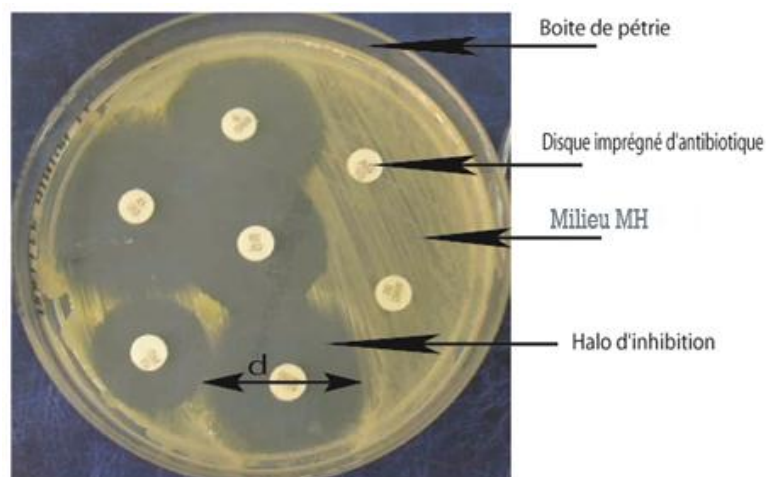
$C_{\text{éch}}$: Concentration de l'échantillon

III.4.2.3. Evaluation des activités antimicrobiennes

III.4.2.3.1. L'antibiogramme [40]

Cette méthode permet de mesurer la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne (**figure 26**). Elle consiste à une diffusion de disque préalablement imprégné d'un échantillon d'antibiotique ou d'extrait à tester.

L'objectif de cette méthode est de mesurer le diamètre de l'halo d'inhibition observé sur le milieu de culture en comparant à celui d'un antibiotique de référence.



d : Diamètre de l'halo d'inhibition

Figure 26 : Méthode de diffusion de disque (antibiogramme)

III.4.2.3.2. Méthode de disque [7], [23]

L'activité antimicrobienne *in vitro* des extraits et des fractions a été évaluée par la méthode développée par Nielsen et *al.*, 2000, Pyun et *al.*, 2006 et Ngameni et *al.*, 2009 :

➔ 2ml de suspension de bactéries et de levures correspondant à 0,5 Mac Farland sont étalées uniformément respectivement à la surface du milieu Mueller Hinton Agar pour (*Clostridium perfringens*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*) et du milieu Sabouraud Agar (pour *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii* et *Candida dubliniensis*).

➔ Des disques stériles (6mm de diamètre, BioMérieux) imprégnés de 10µl des extraits bruts de concentration de la solution mère égale à 100 mg/ml soit 1mg/disc sont placés à la surface des géloses ensemencées. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 37°C pour les bactéries et à 25°C pour les levures.

➔ Les antibiotiques de références utilisés sont : La kanamycine (30µg Bio-discs TM) la Streptomycine (10µg Bio-discs TM), le Gentamycine (30µg/disc) et l'Acide Oxolinique (10µg/disc)

➔ Miconazole (50µg par disc) est l'antifongique de référence.

➔ le diamètre de la zone d'inhibition (mm) autour de chaque disque est mesuré après 24h.

Les résultats sont évalués en se référant aux normes utilisées par l'IPM (le diamètre du disque est 6 mm).

Tableau 18 : Normes utilisées pour la lecture des résultats par la méthode des disques selon l'IPM : le diamètre du disque est 6 mm.

Diamètre du halo d'inhibition (X)	Sensibilité des germes
$X < 7 \text{ mm}$	Insensible
$7 \text{ mm} < X < 8 \text{ mm}$	Assez sensible
$8 \text{ mm} < X < 9 \text{ mm}$	Sensible
$X > 9 \text{ mm}$	Très sensible

III.4.2.4. La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) [4]

La CMI qui désigne la concentration minimale inhibitrice est une méthode permettant de mesurer l'activité antibactérienne d'un antibiotique. Elle donne comme information, la plus petite concentration pour qu'un antibiotique puisse inhiber toute culture d'une souche bactérienne après 18 heures de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique d'un antibiotique.

La CMB désigne la plus petite concentration d'antibiotique ne laissant subsister 0,01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 18 heures de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactéricide d'un antibiotique.

III.4.2.4.1. Détermination de la CMI et de la CMB [15], [23]

La Concentration Minimale inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de tous les extraits qui présentent des activités antibactériennes lors de l'antibiogramme en milieu solide ont été effectuées sur les souches de bactéries (**tableau 3**) sensibles à l'extrait.

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

➔ Des cultures de 24h de *Listeria monocytogène*, *Clostridium perfringens*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocoliticoccus*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogène*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* sont diluées dans le Bouillon Mueller Hinton (MHB).

➔ L'inoculum a été standardisé entre 0,5 et 1 Macfarland

➔ La poudre de chaque extrait a été dissoute dans de l'eau distillée pour avoir une concentration égale à 7000µg/ml puis stérilisée par filtration (Sartorius stedim biotech).

➔ 100µl de chaque extrait testé ont été dilués avec 95µl du MHB puis répartis dans les microplaques à 96 puits; 5µl d'inoculum sont ajoutés dans chaque puits. Ces dilutions ont été réalisées de façon à avoir des concentrations finales des extraits comprises entre 3,42µg/ml et 3500µg/ml.

➔ Un témoin négatif et un témoin positif ont été utilisés :

-Témoin négatif : 100µl du MHB

-Témoin positif : 95 µl du MHB additionnés de 5 µl d'inoculum

Les plaques sont ensuite recouvertes de papier aluminium stérile, puis incubées à 37°C pendant 24h.

La CMI a été évaluée par ajout de 40µl de solution de *p*-iodonitrotetrazolium chloride à une concentration de 0,2mg/ml dans chaque puits, après incubation à 37°C pendant 30min. Le *p*-iodonitrotetrazolium chloride, un indicateur coloré de couleur jaune vire au violet lorsqu'il y a croissance bactérienne. En effet, la CMI est indiquée par la cupule qui contient la plus faible concentration d'extrait où aucun changement de coloration n'est observé.

Pour la détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB), 5 µl de chaque puits qui ne présente pas de trouble sont ensemencés sur Mueller Hinton Agar (MHA)

La CMB correspond à la plus faible concentration où aucune colonie bactérienne ne pousse après incubation à 37°C pendant 24h.

III.4.2.4.2. Evaluation des activités anti-moisissures [17], [35], [46], [47]

L'étude de l'activité antifongique de 02 extraits HE2847F (extrait brut méthanolique) et HE2847F₂ (extrait AcOEt) sur *Aspergillus terreus var terreus* ; *Fusarium moniliforme* ; *Trichoderma viride* ; *Aspergillus flavus* et *Fusarium sporotricoides* a été réalisée par la technique décrite par Favel *et al.* en 1994. Un millilitre de chaque extrait de plante de concentration finale égale à 1mg /ml est ajouté dans 19ml de milieu de culture sabouraud Agar maintenu à 45 °C. Le mélange est ensuite versé dans des boîtes de Pétri. Ces dernières sont mises à sécher pendant 15minutes à 37 °C. 10µl de chaque germe testé à une suspension correspondante à 0,5 Macfarland sont déposés à la surface du milieu. Les boîtes de pétri sont incubées à 25 °C pendant 72 heures. Sont considérées positives les cultures où il y a une croissance visible des moisissures. Les témoins négatifs ont été préparés par spot des souches testées à la surface des milieux sans extraits¹.

¹ Senhaji et al. 2005

III.4.3. Résultats des études biologiques

Les principaux objectifs de cette partie sont de :

- ➔ Montrer l'activité antiplasmodiale de l'extrait méthanolique et des fractions isolées de *Beilschmiedia microphylla* en procédant au fractionnement bioguidé sur *Plasmodium falciparum*.
- ➔ Evaluer d'autres activités biologiques (antioxydantes, antimicrobiennes) des extraits bruts de la plante.

III.4.3.1. Résultats des analyses antiplasmodiales de *Beilschmiedia microphylla*

En suivant la méthode décrite au paragraphe III-4-2-1-2 [matériels et méthodes], les résultats des tests issus des 25 extraits de la plante contre *Plasmodium falciparum* sont montrés dans le **schéma 10**.

D'après cette figure, les tests antiplasmodiaux des extraits : HE2847F(MeOH), HE2847F₁(Hex), HE2847F₂(AcOEt) et HE2847F₃(H₂O) avec ses fractions HE2847F₁₁ à HE2847F₁₂₁ montrent que ces extraits ont un effet sur le parasite à des concentrations variant de 28,47µg/ml à 45,25µg/ml.

➔ Pour l'extrait hexanique, en partant d'une IC₅₀ = 28,47µg/ml de l'extrait méthanolique, les séries de séparation telles que la séparation liquide-liquide, le fractionnement par gradient de solvant diminuent cette valeur jusqu'à 0,39µg/ml.

➔ Pour l'extrait acétate d'éthyle, la diminution de la valeur de l'IC₅₀ est faible, allant de 28,47µg/ml (extrait méthanolique de départ) à 23,38µg/ml (l'acétate d'éthyle). Ces deux extraits ont des activités proches vis-à-vis du *Plasmodium falciparum*.

➔ Pour l'extrait aqueux, activité moindre. La valeur de l'IC₅₀ augmente de 28,47µg/ml (extrait méthanolique) à 45,25µg/ml (extrait aqueux).

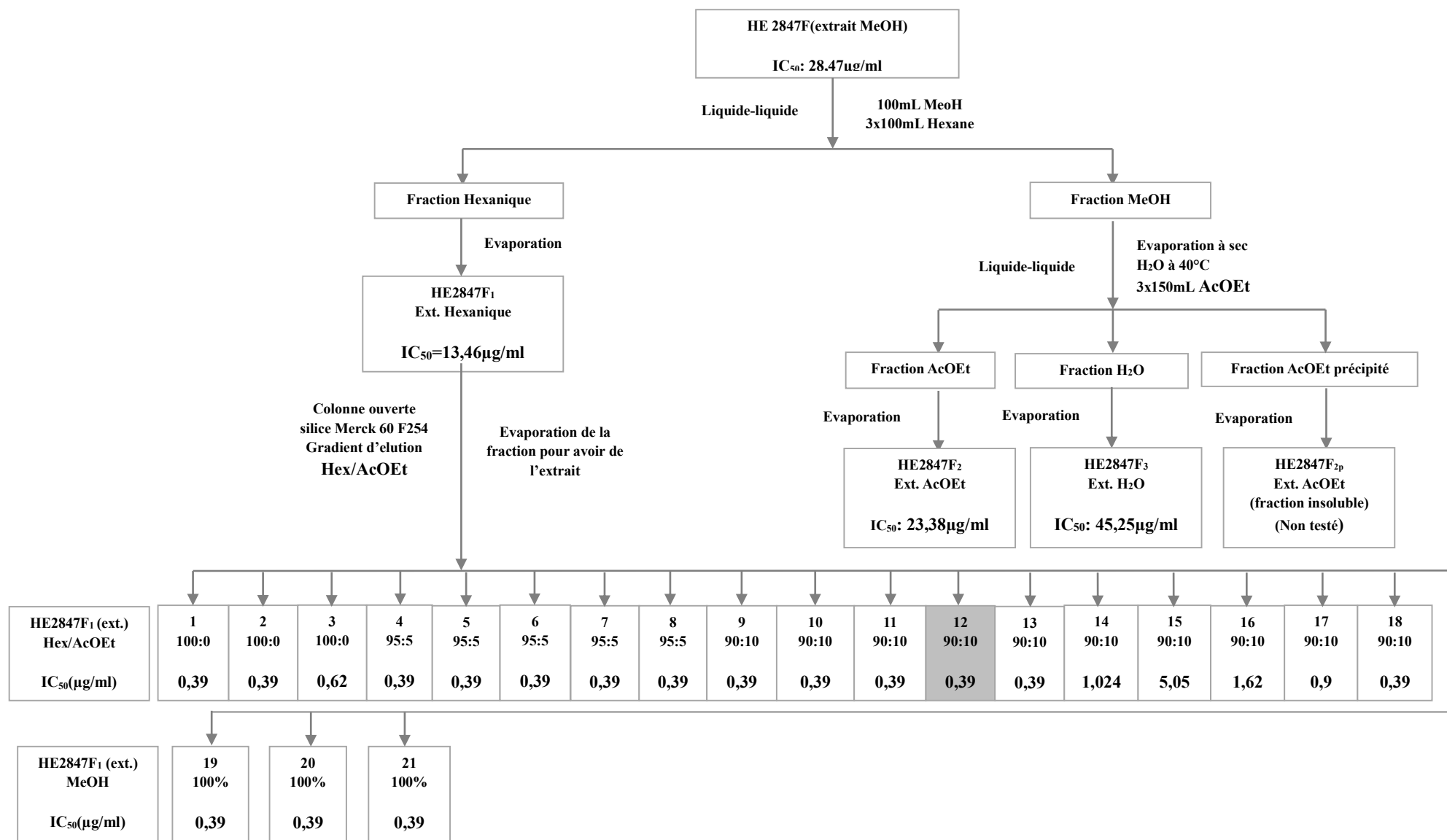


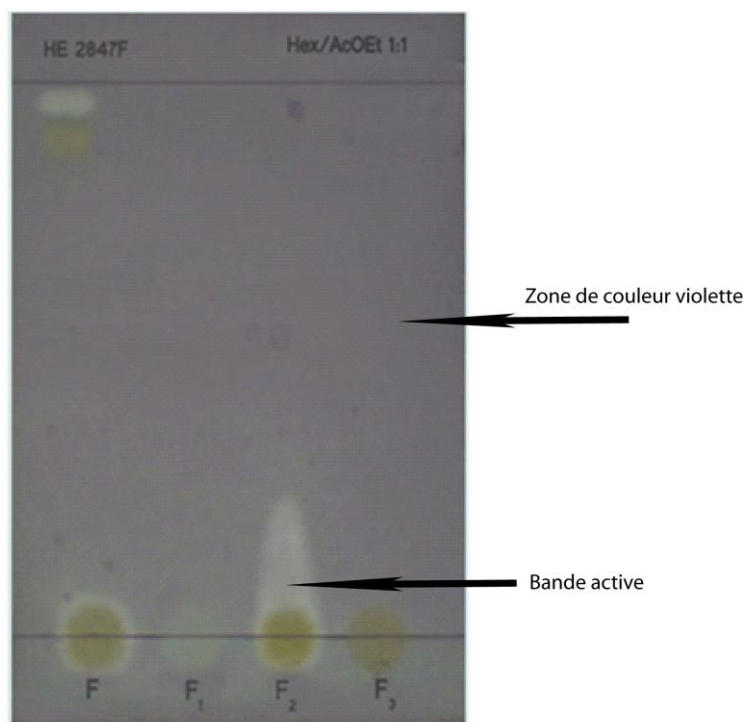
Schéma 10 : Résultats des tests antiplasmodiaux

Ainsi, l'activité antiplasmodiale de *Beilschmiedia microphylla* se trouve dans les fractions hexaniques qui renferment les composés apolaires avec une $IC_{50}=0,39\mu g/ml$. Cette valeur marque la quantité de l'extrait qui réduit 50% le taux de fluorescence du complexe d'ADN (viable¹)/SYBR Green I. Comme cette fluorescence est proportionnelle au nombre de parasites régnant dans le milieu de culture. Une baisse de ce taux de fluorescence suppose une diminution en nombre des parasites.

III.4.3.2. Evaluation des activités antioxydantes de *Beilschmiedia microphylla*

III.4.3.2.1. Evaluation préliminaire (test par CCM)

Les résultats de l'évaluation préliminaire de l'activité antioxydante en utilisant la méthode décrite au paragraphe III-4-2-2-1 [matériels et méthodes] des extraits HE2847F, HE2847F₁, HE2847F₂ et HE2847F₃ sont montrés sur la **figure 27**.



F : extrait Méthanolique (HE2847F)

F₁ : extrait hexanique (HE2847F₁)

F₂ : extrait acétate d'éthyle (HE2847F₂)

F₃ : extrait aqueux (HE2847F₃)

Figure 27 : Activité antioxydante de *Beilschmiedia microphylla* par la méthode bioautography

¹ ADN qui a conservé sa structure intacte (ADN double brin)

Sur cette figure on observe trois zones claires de couleurs jaunes:

Concernant l'extrait méthanolique F, on note

➔ une première tâche claire sur la ligne de dépôt enveloppant l'empreinte du dépôt sous forme d'auréole.

➔ Une deuxième tâche d'apparence pâle avec une R_f : 0,9

Concernant l'extrait acétate d'éthyle HE2847F₂, la bande active apparaît sous la forme d'une trainée rattachée au point de dépôt avec une R_f : 0,3

Ces taches claires expliquent le piégeage du radical libre DPPH de couleur violette par les composants organiques de l'extrait méthanolique et de l'extrait acétate d'éthyle de la plante. Ce sont les extraits qui ont un effet antioxydant.

Pour les extraits hexanique HE2847F₁ et aqueux HE2847F₃, aucun changement de coloration n'est observé. Elle reste violette. Ceci marque l'effet négatif de ces extraits vis-à-vis du DPPH.

Deux approches ont été appliquées pour quantifier l'activité antioxydante que possèdent les extraits méthanolique F et acétate d'éthyle F₂. Il s'agit d'une part de la détermination du pourcentage de la réduction relative du radical DPPH• à un temps de référence par la méthode de DPPH et d'autre part, la détermination du pourcentage d'inhibition du radical peroxy et la longueur dans le temps de cette inhibition en une seule mesure par la méthode ORAC.

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont portés par rapport au Trolox (acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique), un antioxydant dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E.

III.4.3.2.2. Activité antioxydante par la méthode de DPPH

L'activité antioxydante des extraits HE2847F et HE2847F₂ par la méthode de DPPH en utilisant la méthode décrite au paragraphe **III-4-2-2-2 [matériels et méthodes]** est montrée dans le **tableau 19**.

Tableau 19 : Activités antioxydantes mesurées par la méthode de DPPH

Extrait	Concentration en mg/ml	% d'inhibition	Trolox équivalent (mM/mg.l) d'extrait
HE2847F	0,1	73,37±19,8	5084,9
HE2847F ₂	0,1	57,73±6,51	4006,3

Les valeurs représentent la moyenne des trois essais ± écart-type

D'après ce tableau, à une concentration de 0,1mg/ml, l'extrait hexanique HE2847F inhibe à 73,37±19,8% de l'équivalent trolox égal à 5084,9 mM/mg/l d'extrait, le radical DPPH. L'inhibition est égale à 57,73±6,51% (équivalent trolox 4006,3mM/mg/l d'extrait) pour l'extrait acétate d'éthyle HE2847F₂.

Ces profils d'activités révèlent que ces 02 extraits possèdent une activité anti-radicalaire. L'extrait HE2847F dont la valeur de pourcentage d'inhibition est plus importante montre une activité particulièrement élevée que l'extrait HE2847F₂.

Ces activités ont déjà été mises en évidences lors de l'étude préliminaire.

III.4.3.2.3. Activité antioxydante par la méthode d'ORAC

Les résultats obtenus par la méthode ORAC en fonction de l'équivalent trolox (mM /mg/l d'extrait) sont présentés dans le **tableau 20**.

Tableau 20 : Activités antioxydantes mesurées par la méthode d'ORAC

Extraits	Concentration (mg/ml)	Trolox équivalent (mM/mg.l) d'extrait
HE2847F	0,5	18,63± 0,82
HE2847F ₂	0,5	29,35± 0,80

Les valeurs représentent la moyenne des trois essais ± écart-type

➔Ce tableau nous informe que l'extrait brut méthanolique (HE2847F) et l'extrait acétate d'éthyle (HE2847F₂) testés dans les mêmes concentrations n'ont pas les mêmes valeurs d'équivalents Trolox.

➔L'activité antioxydante de HE2847F avec une valeur d'équivalent TROLOX égale à 18,63±0,82 mM/mg.L d'extrait est inférieure à celle de HE2847F₂ (trolox équivalent 29,35±0,80 mM/mg/L d'extrait).

Cette observation n'est pas conforme à celle de la méthode de DPPH citée ci-dessus. En effet, La capacité d'un produit pour piéger le radical libre varie d'une méthode à l'autre. Celle-ci est basée sur la spécificité du radical libre. En outre, le pouvoir antioxydant d'une substance à inhiber le radical peroxy est connu par la méthode ORAC [11]. Quant à la technique de DPPH, elle est non spécifique, le radical à piéger n'a aucune particularité.

III.4.3.3. Evaluation des activités antimicrobiennes

III.4.3.3.1. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits HE2847F et HE2847F₂

Cette étude a été procédée en vue de poursuivre l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique HE2847F et de l'extrait acétate d'éthyle HE2847F₂ à une concentration égale à 1mg/disque, sur 10 souches bactériennes (dont 03 grams positifs et 07 grams négatifs) en suivant la méthode de disque.

Les résultats issus du **tableau 21** montrent :

D'une part, sur les 03 souches à gram positif :

➔ *L. monocytogène*, *C. perfringens*, *S. pyogène*, sont sensibles à l'extrait méthanolique des feuilles (HE2847F). Le diamètre d'halo d'inhibition varie de $7\pm 0,66$ mm à $12\pm 0,0$ mm. *S.pyogène* est la souche la plus sensible.

➔ *C. perfringens* est la seule montrant une sensibilité vis-à-vis de l'extrait acétate d'éthyle HE2847F₂.

Par rapport aux antibiotiques de référence, les extraits sont faiblement actifs contre les souches testées.

D'autre part, pour les 07 souches de bactéries à gram négatif, aucune sensibilité n'est observée sur toutes les souches testées.

Pour une meilleure comparaison de l'activité antibactérienne des extraits traités, nous avons complété ces tests antibiogrammes par la méthode de micro dilution en milieu liquide qui permet de déterminer la CMI.

Les CMI et CMB de HE2847F et HE2847F₂ vis-a-vis des souches sensibles ont été déterminées.

Tableau 21 : Recherche de l'activité antibactérienne des extraits HE2847F et HE2847F₂

	Gram +			Gram -						
Souches	<i>Lystéria monocytogène</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Streptococcus pyogène</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Shigella flexnerii</i>	<i>Yersinia enterocoliticaccus</i>	<i>S. typhi</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Halo d'inhibition (mm)			Halo d'inhibition (mm)						
HE2847F	7±0,66	10±0,0	12±0,0	0	0	0	0	0	0	0
HE2847F ₂	0	8±0,0	0	0	0	0	-	-	0	0
Sterptomycine (10µg/disc)	22±0,33	15±0,0	-	20±0,33	20±0,66	17±0,33	-	-	-	-
Kanamycine (30µg/disc)	30±0,0	20±0,0	35±0,0	27±0,33	21±0,66	-	-	-	20±0,0	11±0,0
Gentamycine (30µg /disc)	-	-	-	-	-	-	-	19±0,0	-	-
Acide Oxolinique (10µg/disc)	-	-	-	-	-	-	35±0,0	-	-	-

- : Non testé 0 : inactif

III.4.3.3.2. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et Concentration Minimale Bactéricide (CMB) des extraits HE2847F et HE2847F₂ sur les bactéries

CMI des extraits HE2847F et HE2847F₂ sur les bactéries (concentration des extraits entre 3,42 à 3500µg/ml)

L'évaluation de la concentration minimale inhibitrice des extraits HE2847F et HE2847F₂ sur la croissance des 03 bactéries à gram+ a été réalisée en milieu liquide en utilisant la méthode décrite au paragraphe **III-4-2-4-1 [matériels et méthodes]**. Leurs concentrations ont été préparées de manière à obtenir une gamme allant de 3,42µg/ml à 3500µg/ml. Les résultats sont présentés dans le **tableau 22**.

Tableau 22 : Concentration Minimale Inhibitrice des extraits HE2847F et HE2847F₂ sur la croissance des bactéries

	Gram +		
souches	<i>Listeria monocytogène</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Streptococcus pyogène</i>
	Concentration minimale inhibitrice (CMI : µg/ml)		
HE2847F	3500	3500	3500
HE2847F ₂	IN	3500	IN

IN : Inactif

Ce tableau montre que l'extrait HE2847F inhibe la croissance de *Listeria monocytogène*, *Clostridium perfringens* et *Streptococcus pyogène* à une concentration de 3500µg/ml.

HE2847F₂ n'inhibe que la souche *Clostridium perfringens* à une concentration égale à 3500µg/ml.

Ces résultats confirment ceux du test de diffusion sur gélose. En effet, selon *Holetz et al* (2002) [18] une substance:

- ➔ a une bonne activité antibactérienne si CMI <100 µg/ml
- ➔ a une activité antibactérienne moyenne si CMI est comprise entre 100 et 500 µg/ml
- ➔ a une activité antibactérienne faible si CMI est entre 500 et 1000 µg/ml
- ➔ est inactive quand la CMI > 1000 µg/ml

Nous pouvons en déduire que HE2847F et HE2847F₂ sont inactifs contre ces 3 souches.

Détermination des CMB des extraits HE2847F et HE2847F₂

Les repiquages des cultures de tous les puits qui ne présentent pas de trouble visible, par stries sur gélose, permettent de déterminer les valeurs de la CMB des extraits HE2847F et HE2847F₂. D'après les résultats présentés dans le **Tableau 23** :

Tableau 23 : Concentration Minimale Bactéricide des extraits HE2847F et HE2847F₂ sur la croissance des bactéries

	Gram +		
souches	<i>Listeria monocytogène</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Streptococcus pyogène</i>
	Concentration minimale bactéricide (CMB : µg/ml)		
HE2847F	>3500	3500	>3500
HE2847F ₂	-	3500	-

IN : Inactif

D'après ce tableau :

- ➔ Pour HE2847F, les CMB sont supérieurs à 3500µg/ml contre *Listeria monocytogène* et *Streptococcus pyogène*. Elle est égale à 3500 µg/ml vis-à-vis de *Clostridium perfringens*
- ➔ Pour HE2847F₂, la CMB est égale à la CMI (3500 µg/ml) contre *Clostridium perfringens*

III.4.3.4. Evaluations de l'activité antifongique des extraits HE2847F et HE2847F₂

L'évaluation de l'activité antifongique des extraits HE2847F et HE2847F₂ (concentration 1mg/disque pour les levures et 1mg/ml pour les champignons filamenteux), en suivant les méthodes décrites aux paragraphes III-4-2-3-2 et III-4-2-4-2 [matériels et méthodes] ont permis d'obtenir les résultats suivants :

III.4.3.4.1. Effets des extraits sur les levures

Les écarts-types sont calculés à partir de trois essais.

Pour les 04 souches de levures, les trois extraits à tester ne présentent aucune activité. L'effet de l'antifongique de référence (le miconazole) est nettement visible contre les souches testées. Elles sont toutes très sensibles contre le miconazole.

Tableau 24 : Effets des extraits HE2847F, HE2847F₂ sur les levures

	Diamètre de l'halo d'inhibition (mm)			
Souches	<i>C. albicans</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. dupliniensis</i>	<i>C. Glabrata</i>
HE 2847F	0	0	0	0
HE2847F ₂	0	0	0	0
Miconazole(50µg par disc)	30± 0,0	34±0,33	22 ±0,0	34±0,33

0 : inactif

III.4.3.4.2. Effets de l'extrait brut sur la croissance des champignons filamenteux

L'activité antifongique de l'extrait HE2847F disponible en grosse quantité a été réalisée suivant la méthode décrite au paragraphe III-4-2-4-2 [matériels et méthodes].

Les résultats issus de cette analyse sont enregistrés dans le **tableau 25**.

Tableau 25 : Effets de l'extrait HE2847F sur la croissance des champignons filamenteux

	Pourcentage d'inhibition de la croissance des moisissures (mm)				
Souches	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus terrus Var.terrus</i>	<i>Fusarium monoliforme</i>	<i>Fusarium sporotrichoides</i>	<i>Trichoderma viride</i>
HE2847F	29±0,0	22±0,0	36±0,0	11±0,0	14±0,0
Témoin (milieu Sans extrait)	0	0	0	0	0

Ce tableau montre que par rapport au témoin, l'extrait HE2847F inhibe la croissance des champignons filamenteux de 11% à 36%. En général, l'inhibition est faible, mais l'extrait a une activité plus marquée contre la souche *Fusarium monoliforme* (36%), par rapport aux autres souches testées.

Pour le témoin, l'inhibition est nulle.

Conclusion générale

IV. CONCLUSION GENERALE

Ce travail est la première étude scientifique en matière de chimie et biologie sur *Beilschmiedia microphylla*, plante endémique de Madagascar de la famille des Lauracées.

L'analyse en CPG/SM de l'HE extraites des feuilles de cette plante a permis d'identifier 19 constituants dont 04 majoritaires : Le β -ocimène (4,65%), le β -myrcène (6,22%), limonène (8,18%) et β -caryophyllène (12,64%). Leur présence a été confirmée par deux méthodes : le calcul de leurs indices de Kovats et l'interprétation de leurs fragmentations en spectrométrie de masse.

Le criblage phytochimique réalisé sur les extraits éthanoliques des tiges et des feuilles a révélé que la plante renferme des flavonoïdes, des leucoanthocyanes, des stéroïdes, des triterpènes, des polyphénols et des tanins.

Le composé HE2847F₁₁₂-II a été isolé par fractionnement bioguidé à partir de l'extrait méthanolique des feuilles de *Beilschmiedia microphylla*, la structure a été identifiée à celle du stigmastérol sur la base de ses spectres RMN¹H et RMN¹³C. HE2847F₁₁₂-II présente une activité antiplasmodiale sur *Plasmodium falciparum* FCM29 (IC₅₀= 0,39µg/ml).

Les tests au DPPH et ORAC sur les extraits méthanolique et acétate d'éthyle des feuilles se sont avérés positifs, démontrant ainsi une activité antioxydante. Par ailleurs, cette propriété biologique a été déjà décelée chez les espèces *Beilschmiedia madagascariensis*, *Beilschmiedia madang* Blume, *Beilschmiedia Zenkeri*.

Alors que l'extrait méthanolique des feuilles est actif vis à vis de *L. monocytogène*, *Streptococcus pyogène* et *Clostridium perfringens*, l'extrait acétate d'éthyle réagit avec *Clostridium perfringens*. Les déterminations de CMI et CMB sur ces 2 extraits révèlent qu'ils sont inactifs contre ces trois souches. Les tests antifongiques réalisés sur les extraits méthanolique et acétate d'éthyle ont révélé une activité plus marquée sur l'extrait acétate d'éthyle vis à vis de *Fusarium moniliforme* (36%).

Ainsi le présent travail nous a permis d'appliquer nos acquis dans le domaine de l'analyse moléculaire à des produits naturels et nous a initiés aux tests d'analyse biologique.

Parmi nos perspectives figure l'isolement et l'identification d'autres métabolites secondaires de *Beilschmiedia microphylla* riche en activité biologique.

<p>Références bibliographiques</p> <p>Références webographiques</p>

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- [1] AGRAWAL P.K., JAIN D.C., GUPTA R.K, THAKUR R.S., 1985. Carbon -13 NMR Spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins. *Phytochemistry. Res* 1985; 24(11):2476-96.
- [2] AGROBIO, 2009, *évaluation de capacité antioxydante par des tests in vitro*, p.1
- [3] ARCHAMBAUD M., **2000**, *Méthodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques, Brûlures*, vol. 1 - Copyright 2001, Ed. Carr. Méd.
- [4] ARCHAMBAUD M., **2009**, *Méthodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques in vitro*, Laboratoire Bactériologie-Hygiène, CHU Rangueil Toulouse.
- [5] Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL), **2010-2011**. Cours paludisme. Université Médicale virtuelle Francophone (UMVF), 27p.
- [6] BARTOSZ G., **2003**, Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, 9, 5-21.
- [7] BAUER, A.W, KIRBY, W.M.M., SHERRIS, J.C., and TURCK M., **1966**, Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin Pathol.*, 45: 493-496.
- [8] BODOSOA H. RAKOTONJATOVO, RASOLOFOARIMANGA A. H., ANDRIAMANANTOANINA H., RANARIVELO L., MAHARAVO J., RAMAROSON L., RATSIMBASON M., **2010**, A microfluorimetric method to screen marine products for antimalarial activity- Preliminary results, *11th NAPRECA Symposium Book of Proceedings*, Antananarivo, Madagascar, pp.154-160.
- [9] BURITS M., BUCAR F. **2000**, Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res.* 14:323–328. *African Journal of Biotechnology* October 2006 Vol. 5 (20), pp. 1924-1928, 16.

- [10] Cameroon Biosciences Society (C.B.S.). Comité Camerounais de Biosciences (CCB), **2009**. *Book of abstracts, biosciences and foods security*, sixteenth annual conference of bioscience, University of Yaoundé I. 105p.
- [11] CAO G., VERDON CP., WU AHB., WANG H., PRIOR RL., **1995**, Automated assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity, with the cobas fara II. *Clin Chem* ; 41:1738-1744.
- [12] Colorado R.J., Galeano J.E., Martínez M.A., **2007**, Development of direct bioautography as reference method for testing antimicrobial activity of Gentamicin against *Escherichia coli*. *vitae*, 14 (1).
- [13] DIALLO A., **2005**, étude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* WILLD. (MYRTACEAE). Thèse de DOCTORAT, Faculté de Médecine, Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie du Mali.
- [14] EJIKEME U.C., JOSIAH O. A. and ABDULSALAAM I. A, **2010**, Bioautographic determination of the antistaphylococcal components of the stem bark of *Parkia biglobosa* (JACQ) BENTH (MIMOSACEAE). *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 2(8), 108-112.
- [15] FAWOLE, O.A., FINNIE, J.,F, Van, S., J., **2009**, Antimicrobial activity and mutagenic effects of twelve traditional medicinal plants used to treat ailments related to the gastro-intestinal tract in South Africa. *South Africa Journal of Botany*, 75, 356-362.
- [16] Ferdinand M. T., MARC L. , MICHAEL S., JONATHAN O. BAUER, CARSTEN S., ANDRIANAMBININA A. RAZAKARIVONY, ANDRIAMIHAJA B., **2013**, antibacterial and antiplasmodial constituents of *Beilschmiedia cryptocaryoides*. *J. Nat. Prod.* 76 (1), pp 97–102.
- [17] FEZAN H., TRABi, N'Guessan, Kouane F., Favel A. et FALLAGUE K., **1994**, activités antifongiques de quelques plantes de flore Ivoirienne. *Science et Nature* Vol.4. N°2 :117-122(2007).
- [18] HOLETZ, F.B., PESSINI, G.L., SANCHES, N.R., CORTEZ, D.A.G., NAKAMURA, C.V., FILHO, B.P.D., **2002**, Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 1027-1031.

- [19] HOSTETTMANN, K., **1999**, *Strategy for the biological and chemical evaluation of plant extract*. Pure and Applied Chemistry, 70, 2122.
- [20] I. HININGER-FAVIER, 2010, *le «stress oxydant»*, Laboratoire de Biologie du stress Oxydant. Faculté de Pharmacie. Grenoble.
- [21] ISAH Y. , NDUKWE I., JOSEPH O. A., **2012**, Isolation of stigmasterol from Aerial Plant Part of Spillanthos Acmella Murr. World J Life Sci. and Medical Research 2012;2(2):77
- [22] KOSTERMANS A. J.G.H., **1939**. 81^e famille LAURACEES (LAURACEAE) *Apollonias microphylla* Kostern., in Not. Syst., VIII.
- [23] KUETE, V., NANA, F., NGAMENI, B., MBAVENG, A. T., KEUMEDJIO, F., NGADJUI, B. T., **2009**, Antimicrobial activity of the crude extract, fractions and compounds from stem bark of *Ficus ovata* (MORACEAE). *Journal ethnopharmacologie*, 124(3) : 556-6.
- [24] LENTA BN., TANTANGMO F., DEVKOTA K.P., WANSI JD, CHOUNA JR, SOH RC, NEUMANN B., STAMMLER H.G., TSAMO E., SEWALD N, **2009**, Bioactive constituents of the stem bark of *Beilschmiedia zenkeri*, *J. Nat Prod.* Dec 2009; doi : 10.1021/np900341f. 72(12): 2130-4.
- [25] Organisation mondiale de la santé, **2013**. *Paludisme*, Aide-mémoire N°94.
- [26] OYI AR., **2001**. *A study of antimicrobial and phytochemical properties of the latex of Jatropha curcas* linn (EUPHORBIACEA). Ph.D. Dissertation. A. B. U. Zaria, Nigeria.
- [27] PATEH UU., HARUNA AK., GARBA M., ILIYA I., SULE IM., ABUBAKAR M., AMBI A.A. **2009**, Isolation of β -Stigmasterol, β -Sitosterol and 2-hydroxyhexadecanoic acid methyl ester from the rhizomes of *Stylochiton Lacifolius* Pyer and Kotchy (Araceae). *Nigeria journal of pharmaceutical Sciences* 2009;8:19-25.
- [28] POTTERAT O., JEROME D., MSONTHI, Hostettmann K., **1988**, 'Four iridoid glucosides and a phenylpropanoid glycoside from *Sesamum angolense*'. *Phytochemistry* 1988, 27, 2677-2679.

- [29] POURMORAD, F., HOSSEINIMEHR, S. J., SHAHABIMAJD, N., **2006**, Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Journal Africa of Biology*, 5, 1142-1145.
- [30] PRETSCH E.B., AFFOLTER A., **2000**, Structure determination of organic compounds Table of spectra data. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. p.71-150.
- [31] PROUILLAC C., **2006**, synthèse et évaluation de nouveaux composés organiques et phosphorés contre les effets des rayonnements ionisants. Etude de leur mécanisme d'action « in vitro » ; Doctorat de l'Université Paul Sabatier de Toulouse III, Chimie – Biologie – Santé.
- [32] RAHARISOLOLALAO A., **2009**. Cours sur la Résonance Magnétique Nucléaire. AEA « GÉOCHIMIE ET SCIENCE DE L'ENVIRONNEMENT », Faculté des Sciences. Université de Fianarantsoa.
- [33] RANARIVELO Y., **2004**, Screening phytochimique selon les méthodes de Fong et al., cours de Chimie des Produits Naturels. Département de Chimie Organique, Université d'Antananarivo.
- [34] RAZAFINANAHARY A. F., **2010**, Contribution à l'étude chimique des écorces de *Embellia concinna* Baker var. *sclerophylla*. Mémoire de recherche, DEA de Chimie, Option « Produits Naturels ». Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.
- [35] SENHAJI O., FAID M., ELYACHIOUI M., DEHHAOUI M., **2005**, étude de l'activité antifongique de divers extraits de cannelle. Ed. Elseiver, *Journal de mycologie médicale*, 15(2005) ; 220-229.
- [36] TRAGER W., JENSEN JB., **1976**, Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193, (4254) : 6673-5.
- [37] TYLER N. BENNETT, MICHELLE P., BOJANA G., CLEMENT S., ANDREW D. KOSAR, EUGENE D., ROEPE P. D., **2004**, Novel, rapid and inexpensive cell-based quantification

of antimalarial drug efficacy, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, May 2004, Vol 48, N°5, pp1807-1810.

- [38] VALISOALALAO J. **1990**, Inventaire et étude des plantes aromatiques et médicinales des Etats de l'Océan Indien, Projet FED/COI/AIRDOI, Commission de l'Océan Indien, Antananarivo.
- [39] Walter Jennings & Takayuky Shibamoto. Table de la littérature.
- [40] ZOUATNI B., **2013**, AntibioGramme et réalisation. Institut National d'Hygiène. 54p.
- [41] Yinusa I., IlogbulemG N., Joseph O. A. **2012**, Isolation of stigmasterol from Aerial Plant Part of *Spillanthos Acmella* Murr. *World J Life Sci. and Medical Research* 2012;2(2):77

REFERENCE WEBOGRAPHIQUE



- [42] <http://file:///H:/Beilschmiedia%20%E2%80%94%20%C3%A9dia.htm>
- [43] http://www.plantes-botanique.org/famille_Lauraceae
- [44] <http://www.tropicos.org/Specimen/2551432?projectid=17>
- [45] <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-and-health/phytochemicals-from-Beilshmedia-anacardioides>
- [46] <http://www.ajol.info/index.php/Scinat/Article/view file/42136/58997>
- [47] http://www.fr.Scribd.com/doc/82335431/Etude_de_L_activit  -antifongique

Annexes

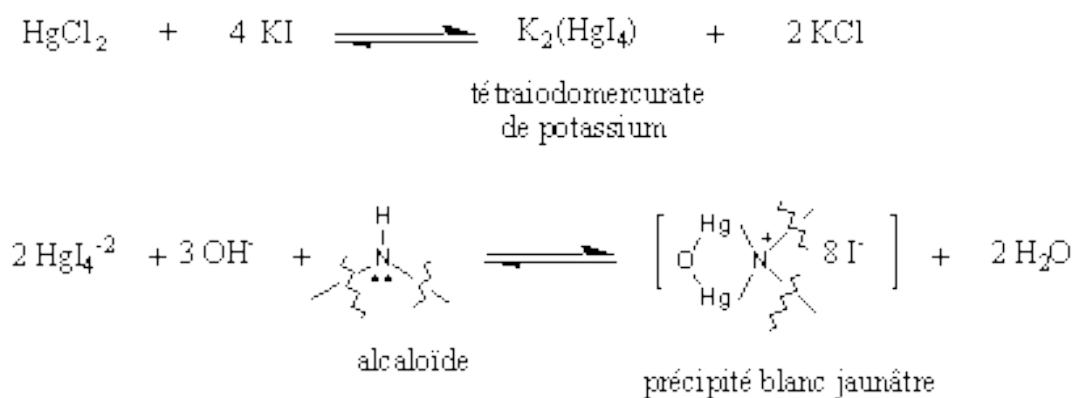
ANNEXE-I : Phytochimie

I.1.Les grandes familles chimiques

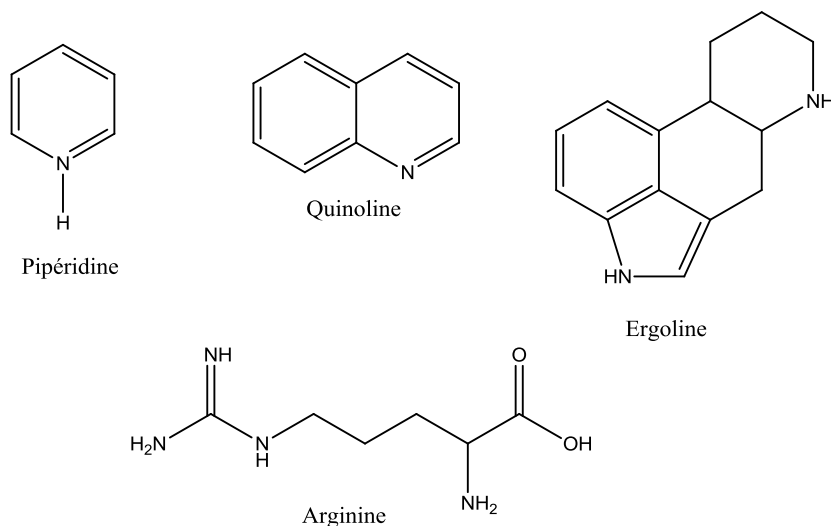
I.1.1. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances azotées surtout d'origine végétale, rarement d'origine animale. Chez les végétaux, ces substances sont abondantes chez certaines familles (Rutaceae, Solanaceae, Légumineuses, Rubiaceae...). Du point de vue chimique il s'agit de bases secondaires, très souvent tertiaires et parfois quaternaires.

Tous les alcaloïdes présentent des propriétés alcalines plus ou moins marquées et forment des sels avec les acides (sulfates, chlorhydrates...). Ils peuvent aussi précipiter les hydrates de métaux lourds tels que le bismuth, le mercure, le tungstène, l'iode, leur permettant ainsi d'adopter une structure d'ammonium quaternaire selon le mécanisme décrit comme suit :



Quant à leurs structures, elles sont différentes d'une espèce à l'autre. Ainsi, voici quelques structures d'alcaloïdes :



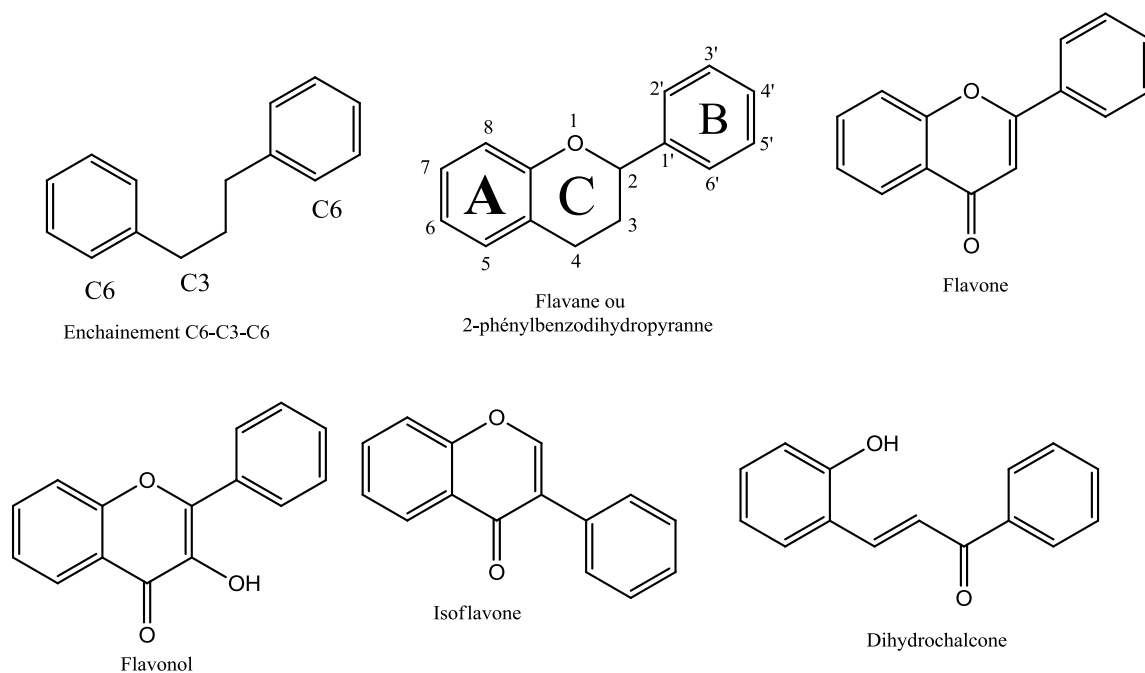
I.1.2. Flavonoïdes et polyphénols

Les flavonoïdes appartiennent à la famille des polyphénols : ce sont des molécules aromatiques polysubstituées ayant un rôle de métabolites secondaires chez les plantes.

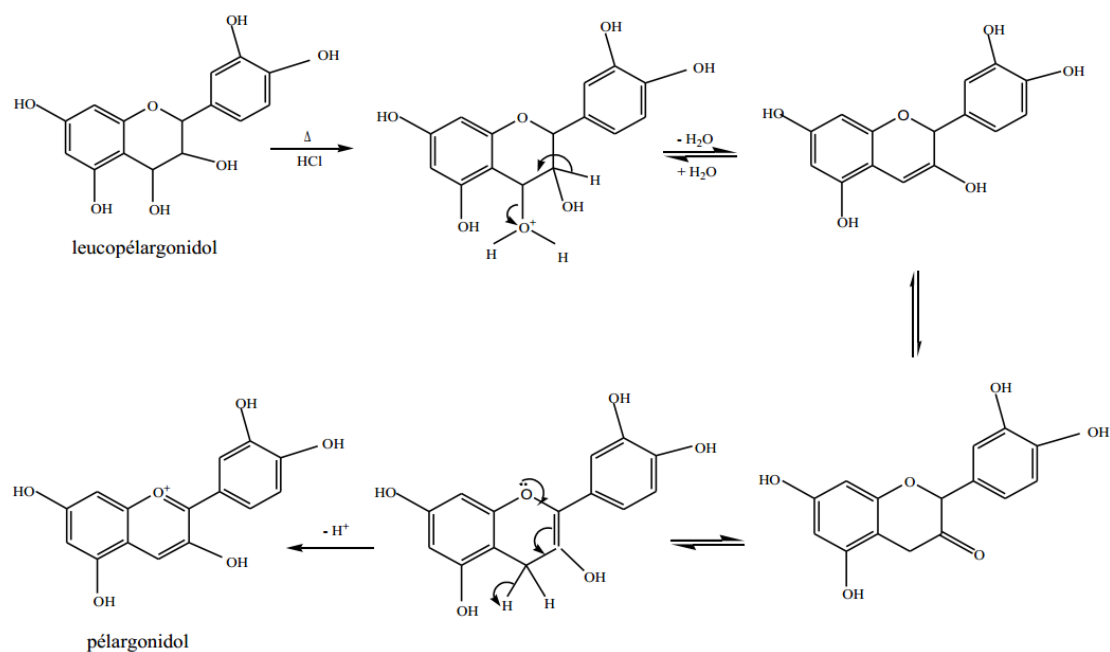
Ces composés sont réputés pour leur caractère anti-oxydant, neutralisant les radicaux libres et limitant ainsi certains dommages oxydatifs responsables de maladies. Ils sont donc à l'origine d'effets physiologiques bénéfiques pour l'organisme humain et méritent l'intérêt croissant que la recherche leur porte.

Les Flavonoïdes sont des molécules uniquement présentes dans les plantes et responsables des couleurs rouges, bleues, brunes des fleurs et des fruits.

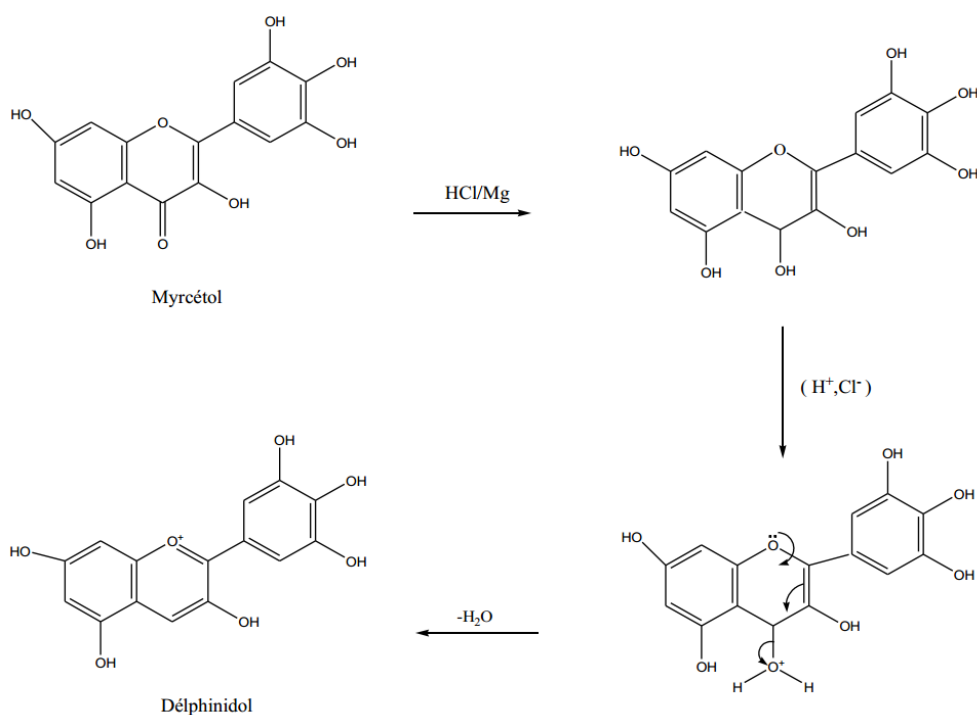
Quant à leurs structures, ce sont des composés polyphénoliques ayant un squelette de base en $C_6 - C_3 - C_6$ dans lequel C_6 : représente un noyau benzénique et C_3 une chaîne carbonée à trois atomes de carbones. Le chaînon propyle C_3 peut être complété par une fonction éther formant ainsi un cycle central, appelé cycle C. Sur ces structures de base peuvent se substituer différents groupements : méthyle - acyle - formyle - alkyle azoté - benzyle... La figure suivante montre quelques structures des flavonoïdes :



Ces flavonoïdes sont mis en évidence par les tests de Bate-Smith et Wilstater. Pour Bate-Smith, Les leucoanthocyanes ou proanthocyanidols sont des dérivés du flavan-3,4-diol qui se transforment en anthocyanidols par traitement acide. Le mécanisme de la réaction, illustré par l'exemple du leucopélargonidol, est donné sur le schéma suivant.



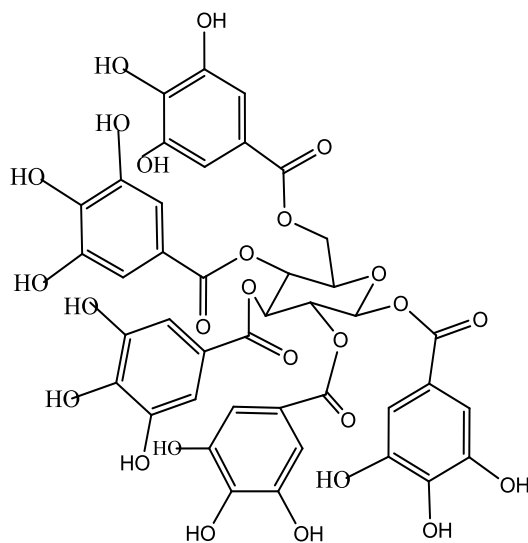
Pour Wilstater, Le test en solution acide chlorhydrique concentrée en présence de quelques tournures de magnésium donne des colorations différentes selon la nature des flavonoïdes. L'exemple du Myrcétol illustre ce mécanisme.



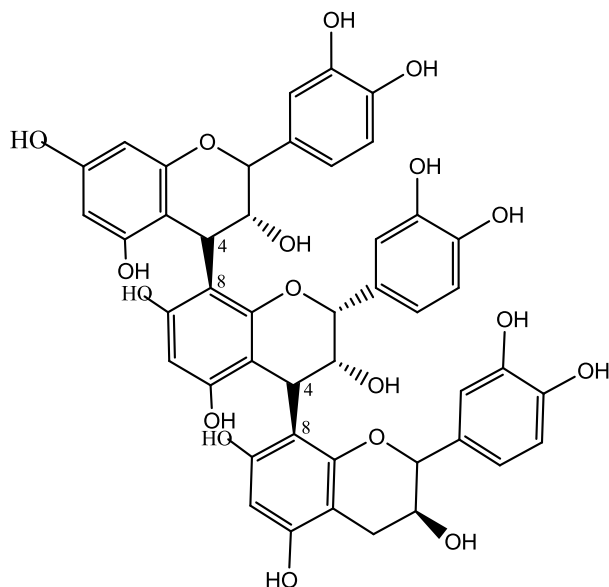
I.1.3.Tanins

Ce sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire entre 500 et 3.000 et la propriété de précipiter les protéines comme la gélatine. On distingue deux types de tanins :

➔ Tanins hydrolysables : polyesters de glucose et d'acide phénoliques. Ils sont caractéristiques des Dicotylédones. Exemple : tanin gallique, pentagalloylglucose



➔ Tanins non hydrolysables (ou proanthocyanidols condensés) : ce sont des polymères d'unités flavaniques le plus souvent liées entre elles par des liaisons C4-C8. Ils sont surtout présents chez les Fougères et les Gymnospermes. Exemple : tanin catéchique, épicatechol (4β→8) catéchol



ANNEXE-II : Préparation des réactifs

II.1. Réactifs pour screening phytochimique

II.1.1. Réactif de Dragendorff

Solution A : Dissolution de 1,7g de sous-nitrate de bismuth et 20g d'acide tartrique dans 30mL d'eau distillée.

Solution B : Dissolution de 8g d'iodure de potassium dans 40 ml d'eau distillée.

Révélation : Au moment de l'emploi 2,5mL de A; 2,5mL de B et 10mL d'une solution d'acide tartrique à 20% sont mélangés soigneusement.

II.1. Réactif de Wagner

Il est obtenu en mélangeant dans un erlenmeyer de 250ml, 2g d'iodure de potassium, 1,27g d'iode et 100ml d'eau distillée. Puis le mélange est agité jusqu'à dissolution complète des produits.

II.1.3. Réactif de Mayer

Il est préparé en dissolvant 1,35g de chlorure mercurique (II) dans 94mL d'eau distillée. Après addition de 5g d'iodure de Potassium, le mélange est agité jusqu'à dissolution complète des produits puis la solution ainsi obtenue est ramenée à 100mL avec de l'eau distillée.

II.1.4. Gélatine 1%

La solution à 1% est préparée en mettant en suspension dans 100ml d'eau distillée 1g de gélatine.

II.1.5. Chlorure de sodium 10%

La solution est préparée par dissolution de 10g de chlorure de sodium dans 100mL d'eau distillée.

II.1.6. Gélatine salée

Elle est obtenue en mélangeant à volumes égaux les solutions de gélatine à 1% et de chlorure de sodium à 10%.

II.1.7. Acide chlorhydrique 5%

Dans une éprouvette, 95mL d'eau distillées ont versées puis ramenées à 100mL avec de l'acide chlorhydrique concentré.

II.1.8. Réactif de Kedde

Solution 1 : dissolution de 2g d'acide 3,5-dinitrobenzoïque dans 100mL de méthanol,

Solution 2 : dissolution de 5,6g de potasse dans 100ml d'eau distillée (solution potasse normale).

Pulvérisation : Au moment de l'emploi, on mélange à volumes égaux la solution 1 et la solution 2.

II.1.9. Réactif de Keller-Killiani

On dissout dans 100ml d'eau distillée 10g de chlorure ferrique.

Au moment de l'emploi, on mélange 0,3 ml de la solution précédente à 50ml d'acide acétique glacial.

II.1.10. Chlorure ferrique à 10% dans le méthanol

On dissout dans 10ml de méthanol, 1g de chlorure ferrique, sous agitation et au bain-marie chauffant jusqu'à dissolution complète des produits.

II.1.11. Picrate de sodium

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

II.1.12. Vanilline sulfurique (Révélateur)

Solution A : On mélange 0,5g de vanilline dans 50mL d'éthanol

Solution B : 2mL d'acide perchlorhydrique (HClO_4 , 60%) a été mélangé dans 38mL d'eau au moment de l'emploi, la solution A et la solution B sont mélangées à volumes égaux.

Solution C (Préparation H_2SO_4 , 30%) : Un volume de 10,26mL H_2SO_4 concentré a été dilué avec 18mL d' H_2O à froid. Cette quantité a été ajustée par ajout de l'eau jusqu'à obtenir un volume finale égale à 60mL.

Révélation : Au moment de la révélation, la pulvérisation de la plaque s'est effectuée en deux temps. Pulvérisation par le mélange (solution A + solution B), puis par la solution C suivit de chauffage.

II.2. Réactif DPPH (test antioxydant, pulvérisation de la plaque CCM)

Solution de DPPH à 0,004% : 4mg de DPPH a été dissous dans 100ml d'éthanol.

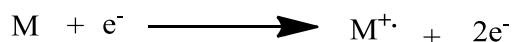
ANNEXE-III : Composition chimiques des milieux de cultures

Milieu de culture	Composition chimique
Müeller-Hinton	Caséine hydrolysate acide de qualité technique :17,5g
	Bouillon de viande :300g
	Amidon (empois) :1,5g
	Gélose :17g
	Eau distillée.....1000ml
Eau peptonée	Peptone bactériologique.....10g
	Chlorure de sodium.....5g
	Eau distillée.....1000ml
Sabouraud solide (Gélose ordinaire)	Peptone.....5g
	Extrait de viande.....3g
	Chlorure de sodium.....5g
	Extrait de levure.....2g
	Agar.....15g
	pH.....7,4g
	Eau distillée.....1000ml

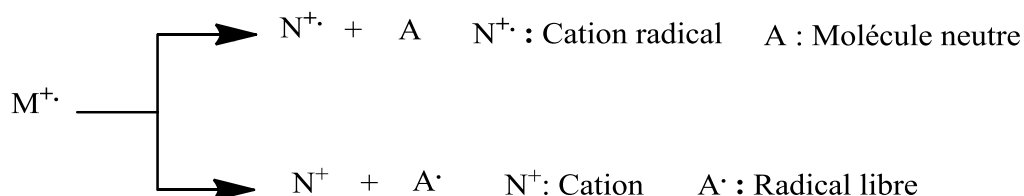
ANNEXE-IV : Modes de fragmentation en SM

En Impact électronique, Des électrons émis par un filament rencontrent les molécules qui entrent dans la source : lors de la rencontre, si l'énergie cinétique des électrons est suffisante, un électron est

arraché de la molécule M, la transformant en un ion radical $M^{\cdot+}$. Celui-ci peut ensuite se fragmenter suivant son énergie interne. L'IE conduit ainsi à un spectre assez fourni, avec de nombreux fragments, très riche en informations structurales.

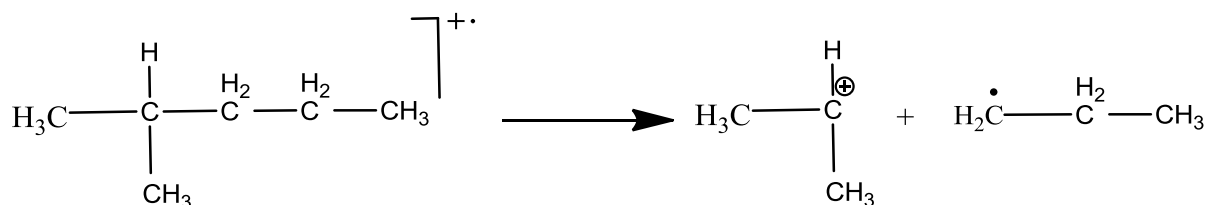


M: Molécule parent $M^{\cdot+}$: Ion moléculaire

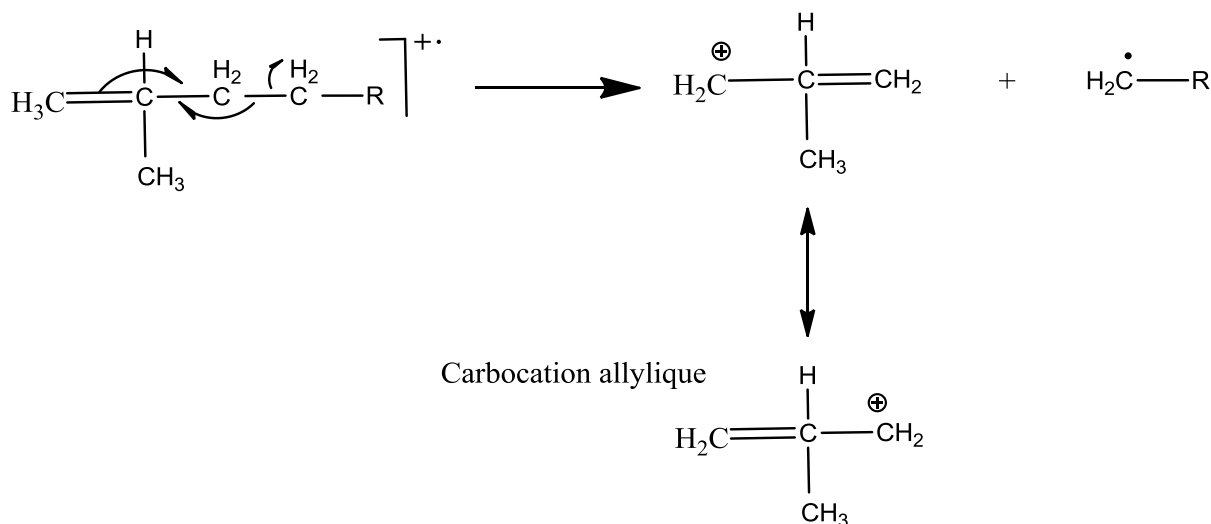


Modes de fragmentation :

1-Rupture au niveau du carbone le plus substitué (le moins hydrogéné)

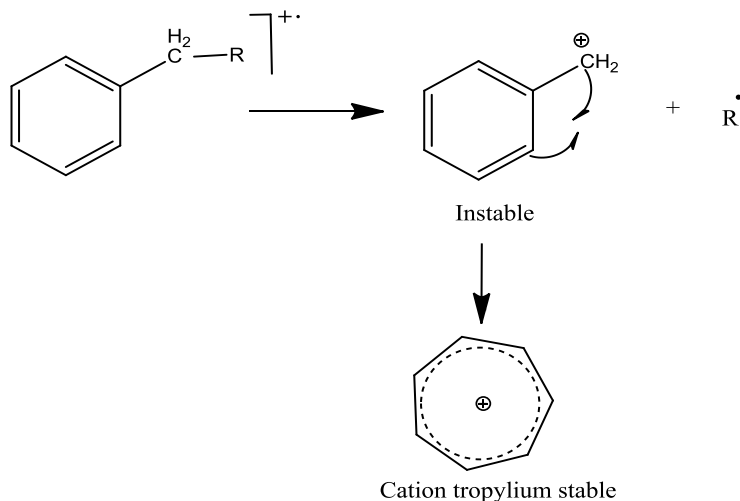


2-Rupture de type allylique : Cette rupture est favorisée par la présence d'une double liaison et qui génère un carbocation allylique stabilisé par résonance.

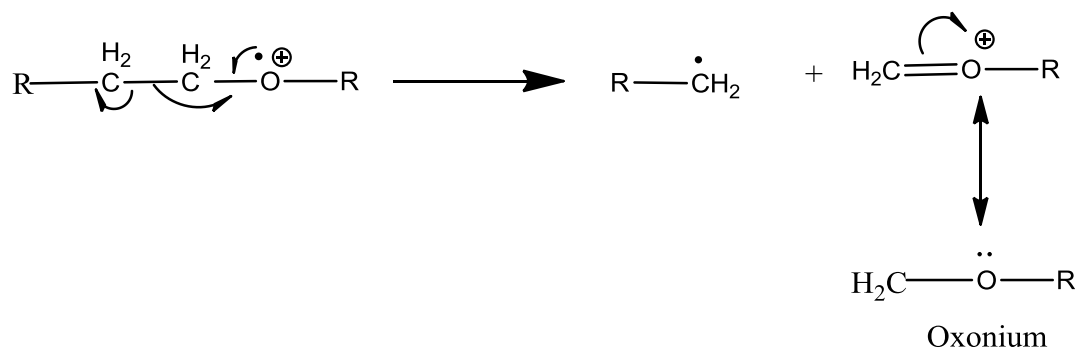


2-Rupture de type allylique : Cette rupture est favorisée par la présence d'une double liaison et qui génère un carbocation allylique stabilisé par résonance.

3-Coupure en β du cycle aromatique : Rupture conduisant à la formation d'un cation benzylique instable qui se transforme en cation tropylium stable.

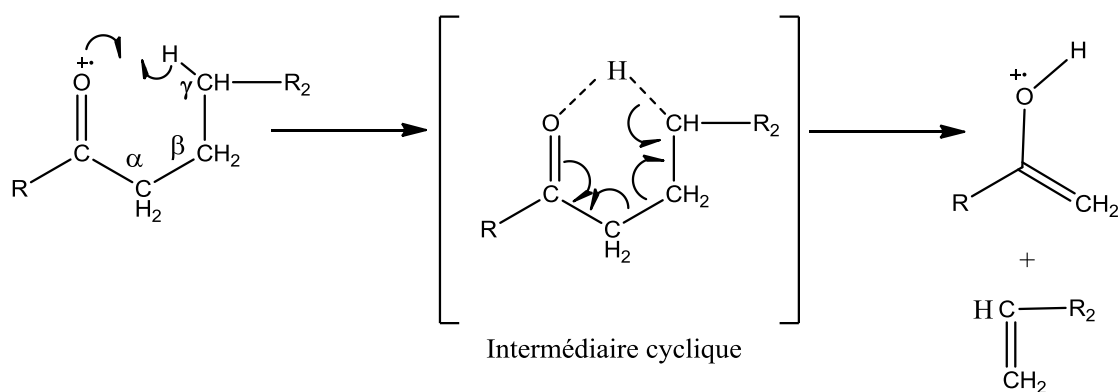


4-Rupture d'une liaison C-C en α d'un hétéroatome : Formation d'un oxonium stabilisé par mésomérie.



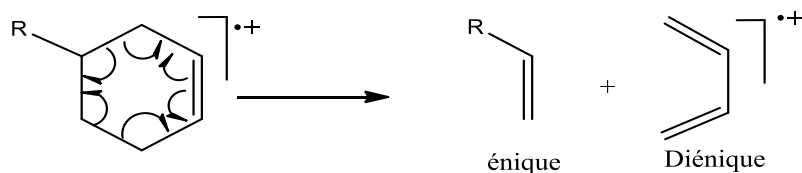
5-Réarrangement ionique : Mac LAFFERTY

Il implique la migration d'un atome d'hydrogène H placé en γ du carbone doublement lié et suppose la formation d'un état transitoire cyclique suivie de la rupture de la liaison placée en β .



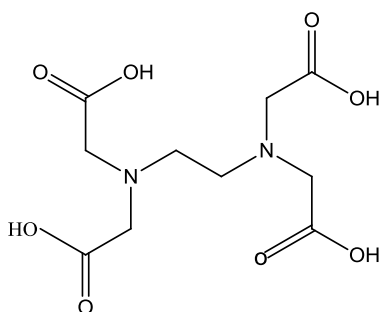
6-Fragmentation retro DIELS-ALDER

Elle a lieu lorsqu'une structure cyclique comporte une double liaison. Elle donne naissance à deux fragments : énique neutre et diénique. La réaction de rupture de liaison est concertée.

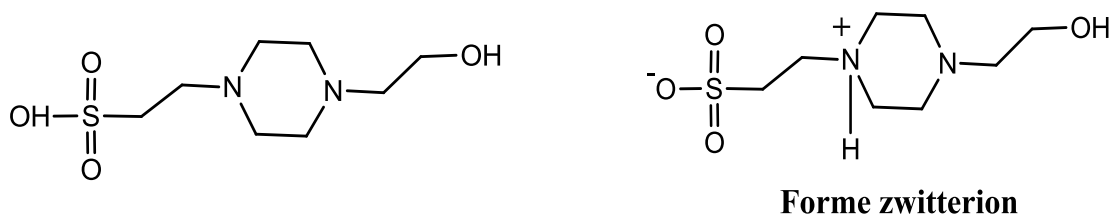


ANNEXE V : Structures de quelques molécules (réactifs biologiques)

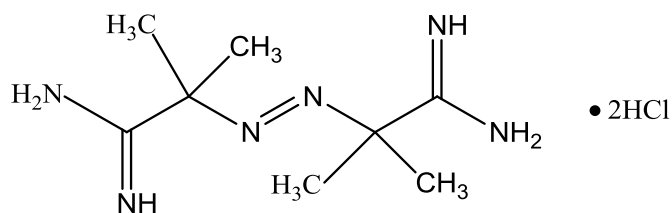
EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) : C'est un agent chélatant, souvent employé comme anticoagulant.



L'HEPES (ou acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) est un composé organique zwitterionique (Composé neutre possédant en nombre égal des charges électriques formelles d'une unité et de signes opposés). Il est couramment utilisé sous forme de solution tampon en biochimie. Il est largement préféré au tampon bicarbonate pour la culture cellulaire en raison d'une meilleure stabilité au pH physiologique.

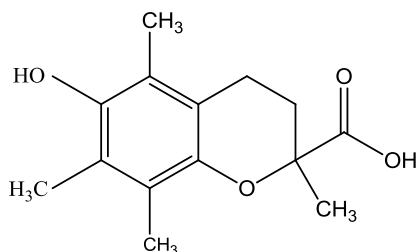


AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) : est un composé chimique générateur de radical libre. Utilisé pour évaluer l'activité antioxydante d'un échantillon.

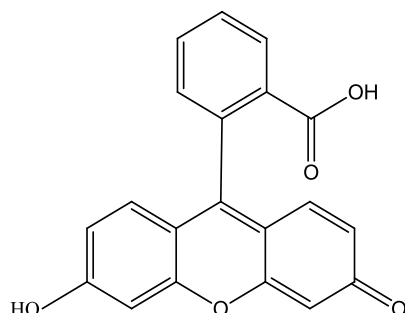


Trolox : l'acide 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique est un composé hydrosoluble analogue de la vitamine E. C'est un agent antioxydant. Il est employé dans des tests antioxydants comme composé de référence.

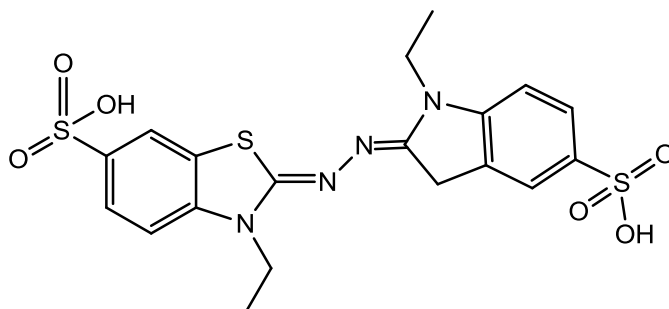
TEAC est une mesure de force antioxydante basée sur Trolox. Son unité de mesure est appelé Trolox Equivalents (TE), par exemple micromolTE/100g.



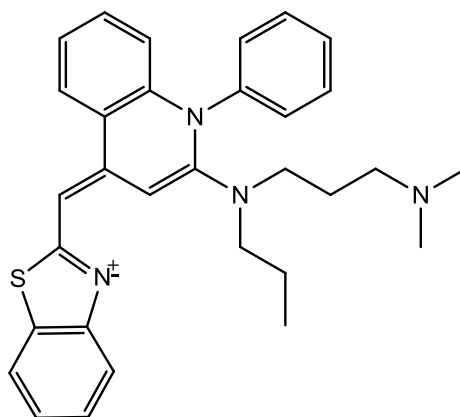
La **fluorescéine** est une substance chimique complexe composée de deux molécules de phénols liées à un cycle pyrane lui-même relié à un acide benzoïque. Cette substance de couleur rougeâtre vue en transparence, et verte-fluo vue par réflexion de la lumière du jour, émet une lumière réfléchie de fluorescence lorsqu'elle est excitée sous les ultraviolets.



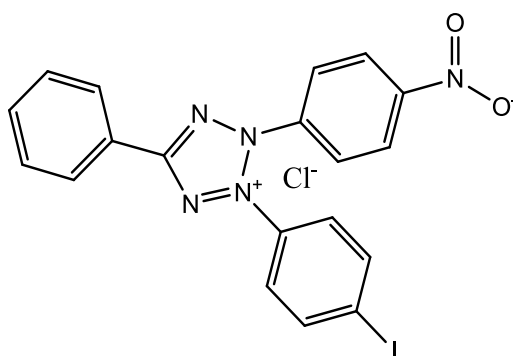
ABTS : 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), est un réactif chimique utilisé en tant que donateur d'électron pour la réduction d'espèce oxydante dans une réaction d'oxydo-réduction.



Le **SYBR Green I** ([2-[N-(3-diméthylaminopropyl)-N-propylamino]-4-[2,3-dihydro-3-méthyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-méthylidène]-1-phényl-quinolinium]⁺ : est un composé organique aromatique de formule chimique C₃₂H₃₇N₄S faisant partie des cyanines asymétriques (fluorophores). Le SYBR green I est une molécule pouvant se fixer sur tous les types d'acides nucléiques doubles brins et devenant alors un très bon fluorophore.



Le **chlorure d'Iodonitrotetrazolium** est un accepteur d'électron utilisé dans diverses analyses colorimétriques. Ce produit chimique a été principalement connu pour sa mesure d'activité de déshydrogénase. Il a été également employé pour étudier l'activité de transport d'électron dans les cultures pures d'enzymes aussi bien que l'activité de kinase⁵ de diphosphate de nucléotide.



⁵ Enzymes du groupe des transférases catalysant les réactions de phosphorylation par l'ajout d'un ion phosphate à une molécule cible

Auteur : RAKOTOARIVELO Joël Flavien

Adresse : Laboratoire de Chimie Organique et Spectrométrie de Masse (LCO-SM),
Ampasapito, Département de Chimie Organique,
Faculté des Sciences-Université d'Antananarivo BP 06

Contact : 034 37 753 32

E-mail : rjolflavien@yahoo.com

Titre : Analyse de l'huile essentielle, isolement du stigmastérol, étude des activités biologiques
de *Beilschmiedia microphylla* LAURACEAE

Nombre de pages : 80

Nombre de figures : 27

Nombre de schémas : 10

Nombre de tableaux : 25

Nombre des annexes : 5

Nombre de références : 47

RESUME

Les travaux de recherches ont été réalisés dans le cadre de coopération entre le Laboratoire de Chimie Organique et Spectrométrie de Masse (LCO-SM) et Le Centre National d'Application des Recherches Pharmaceutiques (CNARP).

Cette première étude chimique effectuée sur *Beilschmiedia microphylla* LAURACEAE, endémique de Madagascar, confirme son caractère aromatique. L'huile essentielle contenue dans cette plante, analysée sur couplage CPG/SM, révèle que les composés majoritaires sont constitués de β -caryophyllène(12,34%), du limonène(8,18%), de β -myrcène(6,22%) et de β -ocimène(4,65%). Le stigmastérol a été isolé.

Cette première étude biologique réalisée sur *Beilschmiedia microphylla* montre que la plante est douée des propriétés suivantes : antioxydante et antipaludéenne. Les tests microbiologiques effectués sur l'extrait brut alcoolique révèlent son caractère antibactérien vis-à-vis des souches, *L. monocytogène*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus Pyogène*. Son activité antifongique est prépondérante pour *Fusarium monoliforme*.

Mots clés : *Beilschmiedia microphylla*, huile essentielle, stigmastérol, antioxydant, antiplasmodial, antibactérien.

ABSTRACT

Summary of : « Chemical and biological studies of *Beilschmiedia microphylla* LAURACEAE »

These works have been effectuated by the cooperation between the two laboratories LCO-SM (Laboratoire de Chimie Organique et Spectrométrie de Masse) and CNARP (Centre National d'Application des Recherches Pharmaceutiques).

The first chemical study on *Beilschmiedia microphylla* LAURACEAE, Madagascar's, endemic plant, affirms its aromatic character. The essential oils in this plant have been analyzed by GC/MS. The β -caryophyllen(12,34%), the limonene(8,18%), the β -myrcen(6,22%) and β -ocimen(4,65%) was the majority compounds. Stigmasterol has been isolated to the leaves. Whose structure has been elucidated by the combination of spectroscopy NMR¹H and NMR¹³C.

The first biological study realized on *Beilschmiedia microphylla* shows that the plant is endowed with following properties: antioxidant and antimalaria. The micobiological tests were doing on alcoholic raw extract reveal antibacterial character opposite to stumps: *Clostridium perfringens*, *L. monocytogène*, *Streptococcus pyogène*. Its antifungal activity is predominating for *Fusarium monoliforme*.

Key words: *Beilschmiedia microphylla*, essential oils, stigmastérol, antioxidant, antimalaria, antibacterial.

Directeur de mémoire : Docteur Dimby Andrianina RALAMBOMANANA

Laboratoire de Chimie Organique et Spectrométrie de Masse (LCO-SM),
Ampasapito, Département de Chimie Organique,
Faculté des Sciences-Université d'Antananarivo BP 06

Co-encadreur : Docteur Lalasoanirina RANARIVELO RANAIVOARISON

Centre National d'Applications des Recherches Pharmaceutiques (CNARP),
Laboratoire de contrôle de qualité / Département de Chimie - B.P. 702
Antananarivo, 101 Madagascar.