

SOMMAIRE

INTRODUCTION

PARTIE 1 : ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chapitre 1 : Généralités sur la plante
- Chapitre 2 : L'activité antibactérienne
- Chapitre 3 : L'activité antioxydante
- Chapitre 4 : La phytochimie
- Chapitre 5 : La chromatographie sur couche mince

PARTIE 2 : APPROCHES EXPERIMENTALES

- Chapitre 6 : Préparation des extraits
- Chapitre 7 : Criblages phytochimiques
- Chapitre 8 : Tests biologiques
- Chapitre 9 : Chromatographie sur couche mince

PARTIE 3 : PRESENTATION DES RESULTATS ET DISCUSSIONS

- Chapitre 10. Résultats des extractions
- Chapitre 11. Résultats des criblages phytochimiques
- Chapitre 12. Résultats des tests biologiques
- Chapitre 13. Résultats des chromatographies sur couche mince
- Chapitre 14. Identification des familles chimiques des substances antioxydantes

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Exemples d'alcaloïdes	22
Tableau 2 : Quelques exemples de composés terpéniques.....	25
Tableau 3 : Exemples de coumarines.....	29
Tableau 4 : Notations des volumes (solvants), masses (plantes et extraits) et rendements des extractions	34
Tableau 5 : Les solvants courants et leurs polarités	37
Tableau 6 : Les réactifs généraux des alcaloïdes	42
Tableau 7 : Les réactifs généraux des flavonoïdes.....	43
Tableau 8 : Les réactifs généraux des tanins et polyphénols.....	44
Tableau 9 : Les réactifs spécifiques des stéroïdes et terpènoïdes	45
Tableau 10 : Normes pour l'appréciation de la sensibilité des souches	48
Tableau 11 : Systèmes d'éluants des extraits.....	49
Tableau 12 : Préparations pour l'évaluation du pouvoir antioxydant de l'extrait	51
Tableau 13 : Préparations pour l'évaluation du pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique ...	51
Tableau 14 : Couleurs caractéristiques de certains composés dans le visible et sous UV 365nm.....	31
Tableau 15 : Couleurs des flavonoïdes après révélation par AlCl ₃	31
Tableau 16 : Couleurs des coumarines et anthocyanes avec la vapeur de NH ₃	32
Tableau 17 : Couleurs des composés terpéniques après giclage avec le réactif de LIEBERMANN-BURCHARD.....	32
Tableau 18 : Rendements en masse des extractions à l'éthanol	54
Tableau 19: Rendements en masse des partages liquide-liquide	56
Tableau 20 : Résultats obtenus lors des screening des alcaloïdes	57
Tableau 21 : Résultats obtenus lors des screening des flavonoïdes et anthocyanes	58
Tableau 22 : Résultats du criblage des tanins et polyphénols.....	59
Tableau 23 : Résultats du criblage des stéroïdes et terpènoïdes.....	60
Tableau 24 : Résultats du criblage des quinones	61

Tableau 25 : Résultats du criblage des coumarines	62
Tableau 26 : Récapitulatif des résultats des criblages	63
Tableau 27 : Résultats des tests antimicrobiens.....	64
Tableau 28 : Résultats des tests antiradicalaires sur les extraits bruts	65
Tableau 29 : Résultats des tests antiradicalaires sur les extraits partagés	67
Tableau 30 : Pourcentage de DPPH réduit (AAR) en fonction de la concentration -Extrait brut de racine	70
Tableau 31 : Pourcentage de DPPH réduit (AAR) en fonction de la concentration - Acide ascorbique.....	69
Tableau 32 : Récapitulatif des résultats de CCM	78
Tableau 33 : Identification des familles des substances actives - Extraits hexanique et DC .	80

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Feuilles et fleur de <i>Pavonia urens</i>	6
Figure 2 : Distribution de <i>Pavonia urens</i>	8
Figure 3 : Structure chimique du DPPH.....	20
Figure 4 : Exemples d'alcaloïdes	22
Figure 5 : Structures du cycle C des différents types de flavonoïdes à partir du squelette flavane.	23
Figure 6 : Structure chimique de l'isoprène.....	24
Figure 7: Structure de base des stéroïdes	24
Figure 8 : Structure chimique du stérane	24
Figure 9 : Exemples de terpènes.....	25
Figure 10 : Structure chimique de l'acide gallique.....	27
Figure 11: Structure de base des tanins condensés	27
Figure 12 : Structure de base des coumarines	28
Figure 13 : Exemples de coumarines	29
Figure 14 : Processus d'obtention des extraits éthanoliques	36
Figure 15 : Photos d'un partage liquide/liquide d'extrait de P.U	38
Figure 16 : Schéma du processus d'obtention des extraits partagés de P.U	40
Figure 17 : Schéma d'une Plaque CCM	53
Figure 18 : Photos d'un ballon contenant l'extrait brut de l'écorce de tige de <i>Pavonia urens</i>	55
Figure 19 : Criblage des flavonoïdes	58
Figure 20 : Criblage de tanins et polyphénols.....	59
Figure 21 : Criblage des stéroïdes et terpеноïdes	60
Figure 22: Criblage des quinones	61
Figure 23: Criblage des coumarines	62
Figure 24: Plaques CCM des extraits éthanoliques, révélées avec le DPPH	66
Figure 25 : Plaques CCM des extraits hexaniques, DCM et BuOH révélées avec le DPPH.	68
Figure 26 : Courbe d'AAR (%) en fonction des concentrations – Acide ascorbique	70

Figure 27 : Courbe d'AAR (%) en fonction des concentrations - Extrait brut de la racine.....	71
Figure 28 : Plaques CCM des extraits hexanique et DCM de PU, observés sous UV 365n..	73
Figure 29: Plaques CCM des extraits hexaniques et DCM	74
Figure 30: Plaques CCM des extraits hexaniques et DCM	75
Figure 31: Plaques CCM des extraits hexaniques et DCM	77
Figure 32 : Compilation des chromatogrammes de l'extrait hexanique de la racine de P.U. .	81
Figure 33 : Compilation des chromatogrammes de l'extrait DCM de la racine de P.U.	82

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

BuOH: Butanol

CCM : Chromatographie sur couche mince

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNRE : Centre National de Recherche sur l'Environnement

DCM: Dichlorométhane

DPPH : 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle

ESPA : Ecole Supérieure Polytechnique d'Antananarivo

EtOH: Ethanol

F: Feuille de *Pavonia urens*

Hex : Hexane

IC50: Concentration réduisant 50% de DPPH

LME: Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement

MHA: Mueller Hinton Agar

MHB: Mueller Hinton Broth

MeOH: Méthanol

R: Racine de *Pavonia urens*

RNS: Reactive Nitrogen Species

ROS: Reactive Oxygen Species

T: Tige de *Pavonia urens*

TLC-DPPH: Thin Layer Chromatography-2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle

UV: Ultraviolet

VIS: Visible

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Démarche méthodologique suivie lors de l'étude

Annexe 2 : Carte de localisation du lieu de récolte

Annexe 3 : Préparations des réactifs

Annexe 4 : Les trois étapes de la méthode de diffusion sur gélose

Annexe 5 : Protocole de mesure de l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS

Introduction

INTRODUCTION

Depuis l'antiquité, les plantes médicinales sont traditionnellement utilisées par l'homme, et même par les animaux pour se guérir de certaines maladies et blessures. Actuellement, elles servent de matières premières pour l'obtention de substances actives. Leur source inépuisable et renouvelable, leur moindre toxicité, et surtout les vertus pouvant en être tirées : tels sont les principaux atouts de ces « merveilles naturelles ».

La recherche de nouvelles activités à l'issus de ces végétaux utilisant des méthodes de plus en plus modernes ne cesse de croître et de s'améliorer, et plusieurs ont déjà abouti à des propriétés pharmacologiques variées : des anesthésiques, des anti-inflammatoires et antimicrobiens, des antiparasitaires, des antioxydants, voire même des anticancéreux.

Madagascar, très connue pour sa biodiversité, tant végétal qu'animal, figure parmi les pays légendaires en matière d'abondance en plantes médicinales et aromatiques. De ce fait, il est devenu le centre d'attention des chimistes naturalistes et biologistes chercheurs, même les médecins et les maîtres parfumeurs, en vue de nouvelles découvertes au profit de l'humanité.

P*avonia urens* est une plante très abondante de notre île. Connue sous le nom malgache de « Tsontsona », elle est très utilisée par les tradipaticiens pour soigner plusieurs sortes de plaies suppuratives. Mais jusqu'à ce jour, ces affirmations n'ont pas été encore démontrées.

Le présent travail, intitulé « Contribution à l'étude des propriétés microbiologiques et antioxydantes de *Pavonia urens* » se base sur la recherche des éventuelles activités de cette plante. Pour cela nous nous sommes fixés les objectifs suivants:

- ♣ Détermination des familles chimiques des constituants du *Pavonia urens*.
- ♣ Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique de leurs extraits par la méthode de diffusion sur gélose.
- ♣ Evaluation du pouvoir piégeur de radicaux libres ou pouvoir antioxydant des extraits de feuilles, écorces de tige et racines de la plante vis-à-vis d'un radical libre relativement stable (DPPH).

C'est ainsi que le présent ouvrage comportera trois parties distinctes. Dans la première partie, nous abordons les approches bibliographiques de notre étude, où nous apportons des données générales sur la plante et sa famille botanique, des généralités concernant les activités antimicrobiennes et antioxydantes, et enfin quelques bases de Phytochimie. La seconde partie nous informe sur les méthodes expérimentales adoptées; et la dernière partie de ce travail rapporte les résultats obtenus, suivis des interprétations y afférentes, que nous terminons par une brève conclusion.

*Partie 1 : Etudes
Bibliographiques*

CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LA PLANTE

Pavonia urens est une plante très répandue à Madagascar, en particulier sur les hautes terres et surtout dans la partie Est de l'île, mais ses vertus thérapeutiques demeurent encore inconnues et mal explorées.

Plante faisant partie des Malvaceae, elle bénéficie des caractères spécifiques de cette famille botanique. Avant d'entrer dans le vif du sujet, quelques détails sur la plante, ainsi que sa famille botanique sont alors indispensables.

1.1. La famille des MALVACEAE

1.1.1. Généralités

La Malvaceae, appelée également Mauve, est la famille dans laquelle appartient *Pavonia urens*, comme de nombreuses autres plantes à fleurs et contient plus de 200 genres avec près de 2300 espèces dont la plupart sont des herbes ou des arbustes, mais certains sont des arbres et des lianes. [1] [2]

Les genres les plus répandues en termes de nombre d'espèces comprennent : l'*Hibiscus* (300 espèces), le *Sterculia* (250 espèces), le *Dombeya* (225 espèces), le *Pavonia* (200 espèces), et le *Sida* (200 espèces).

1.1.2. Description botanique

Ce sont des plantes à fibres cellulosiques. Leurs feuilles alternées, simples ou diversement lobées, ont pour la plupart des formes d'étoiles ; au limbe à la nervation palmée.

Quant à leurs tiges, ils contiennent des canaux et des cavités muqueuses. Les poils sont fréquents. Et le plus souvent, ses fruits sont sous forme de capsules ou de noix.

La plupart des espèces sont entomophiles (pollinisées par les insectes), de raison que l'autopollinisation est souvent évitée par protandrie, c'est-à-dire que les gamètes mâles sont développés avant les gamètes femelles. [1] [3]

1.1.3. Ecologie et distribution

La famille est cosmopolite, présente dans presque tous les pays du monde, et absente seulement des régions très froides. Elle est particulièrement abondante dans les régions tropicales d'Amérique du Sud, dans les pays africains, et est représentée plus minoritairement dans les régions tempérées et autour de la Méditerranée. Madagascar, comme l'archipel d'Hawaii, en possède de nombreux genres et espèces endémiques. [2]

1.1.4. Quelques Malvaceae à vertus antimicrobiennes

Plusieurs plantes appartenant à cette famille sont réputées pour leurs vertus antimicrobiennes:

- ❖ *Sida spinosa*, utilisé pour le traitement des infections en médecine traditionnelle. Des études effectuées par SELVADURAI et ses collaborateurs ont pu démontrer son activité sur certains bactéries et champignons : test à partir des extraits de feuilles sur *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* et *Aspergillus Niger*. [4]
- ❖ *Sida urens*, une Malvacée abondante au Burkina Faso, utilisée traditionnellement dans l'Ouest de ce pays pour le traitement des maladies infectieuses et particulièrement contre la carie dentaire bactérienne et la fièvre. Cette plante est aussi recensée dans la flore de plantes médicinales asiatiques. Elle possède également des propriétés analgésiques. KONATE a confirmé que les fractions riches en polyphénols présentent une activité anti-nociceptive remarquable, et sont très sensibles sur les germes testés. [5]
- ❖ *Hibiscus sabdariffa*, nommée la roselle est connue être une forte antibactérienne, anti-inflammatoire et analgésique. Elle est très utilisée en phytothérapie pour de nombreux traitements : sa capacité antimicrobienne lui permet de calmer la toux et de dégager les voies respiratoires ; c'est aussi un antiseptique urinaire et un diurétique. Les fleurs remédient aux douleurs menstruelles. [6]

1.1.5. Quelques Malvaceae à vertus antioxydantes

- ❖ *Adansonia digitata*, connue sous le nom de Baobab est une MALVACEAE à tant de vertus qui la rendent bénéfique au transit intestinal. La poudre de la pulpe du fruit du baobab est un antioxydant naturel puissant. [7]
- ❖ *Abelmoschus esculentus* (*Hibiscus esculentus*), le gombo, est un légume typique de l'alimentation africaine. Il est également abondant dans le Sud de l'Europe, en Inde, au Moyen-Orient, aux Antilles et en Amérique du Sud. Des études in vitro ont démontré un certain potentiel antioxydant des extraits de cette plante. Ceci est dû à sa richesse en composés antioxydants tels que la quercétine, présente en très grande quantité ; la vitamine C, le β-carotène, la lutéine et la zéaxanthine. [8]

1.1.6. Autres utilisations

Cette famille de plante prend une grande importance, tant sur ses valeurs ornementales – comme les *Hibiscus* en chine – que dans l'agroalimentaire et surtout dans le domaine de la médecine. Elle trouve particulièrement place dans l'industrie textile, notamment dans la fabrication de fibres textiles : les genres *Urena*, comme *Urena lobata*, fournissent des fibres de très bonne qualité. La famille des Malvaceae constitue donc un élément non négligeable, et surtout à prendre en considération sur le plan industrielle. [3]

1.2. *Pavonia urens*

1.2.1. Généralités

Plante originaire d'Afrique tropicale, de Madagascar et de La Réunion, *Pavonia urens* est particulièrement connue sous le nom de « la Pavonie brûlante », en rapport à l'irritation provoquée par les poils piquants de ses tiges et feuilles.

Historiquement, le nom générique du genre : ***Pavonia*** est donné en l'honneur du botaniste espagnol José Antonio Jiménez Pavón (1754-1840) connu pour ses travaux sur la flore du Pérou et du Chili, effectués lors d'une expédition entre 1777 et 1788. [9]

1.2.2. Description botanique

C'est une herbe ou sous-arbrisseau au port buissonnant pouvant atteindre 3 mètres de hauteur. Ses tiges sont cylindriques, dressées et recouvertes de nombreux poils piquants.

Ses feuilles alternées et polymorphes sont portées par des pétioles très tomenteux, longs de 10cm à 20cm. Les plus typiques sont sous forme d'étoiles, à lobes triangulaires, aiguës, marge grossièrement dentée et ciliée. Les feuilles prépondérantes restent nettement plus discrètes, mais toutes sont manifestement tomenteuses, comme la tige et les pétioles.

Cette plante possède des fleurs axillaires, presque sans pédoncules et très rapprochées l'une de l'autre. Leur calice extérieur est composé de sept à neuf folioles et ciliées. La corolle est campanulée (en clochette) de couleur rose, rouge foncé au centre, composée de 5 grands pétales, séparés à leurs sommets. Elles renferment des étamines peu nombreuses, toutes placées à l'extrémité du tube, dont les filaments sont couleur de chair, et les anthères sont écarlates et réniformes.

L'ovaire est très velu, globuleux, pentagone, surmonté d'un style simple, qui se divise en dix filaments épais, velus de couleur pourpre et globuleux à leur extrémité.

Le fruit est une capsule à 5 méricarpes, demeurant incluse dans le calice persistant. Chacun des méricarpes, couvert de courtes écailles, se révèle triaristé à son sommet. [9] [10]

La figure 1 suivante représente les feuilles et fleur de la plante :



Figure 1 : Feuilles et fleur de *Pavonia urens*

Source : Google image, 2013

1.2.3. Position dans la classification systématique

La classification botanique du *Pavonia urens* dans le règne végétal se résume comme suit :

Règne	: Végétal
Embranchement	: Spermaphyte
Sous-embranchement	: Angiosperme
Classe	: Dicotylédone
Ordre	: Malvales
Famille	: MALVACEAE
Genre	: <i>Pavonia</i>
Espèce	: urens
Nom vernaculaire	: Andriambavioravo ou aussi Tsontsona à Madagascar, Pavonie brûlante à La Réunion.
Origine	: Afrique tropicale, Madagascar, Réunion.

1.2.4. Ecologie et distribution

Elle se trouve principalement dans la lisière des bois et des broussailles, mais aussi dans les endroits où la végétation d'origine a été détruite. Cette plante se rencontre la plus souvent dans les localités où la pluviométrie n'est pas trop faible, et généralement elle ne supporte pas le froid excessif. C'est pourquoi elle n'est rencontrée que dans la plupart des régions africaines, comme présentée sur la figure suivante. [9]

Voici un aperçu des principales régions où l'on peut rencontrer *Pavonia urens* en Afrique.

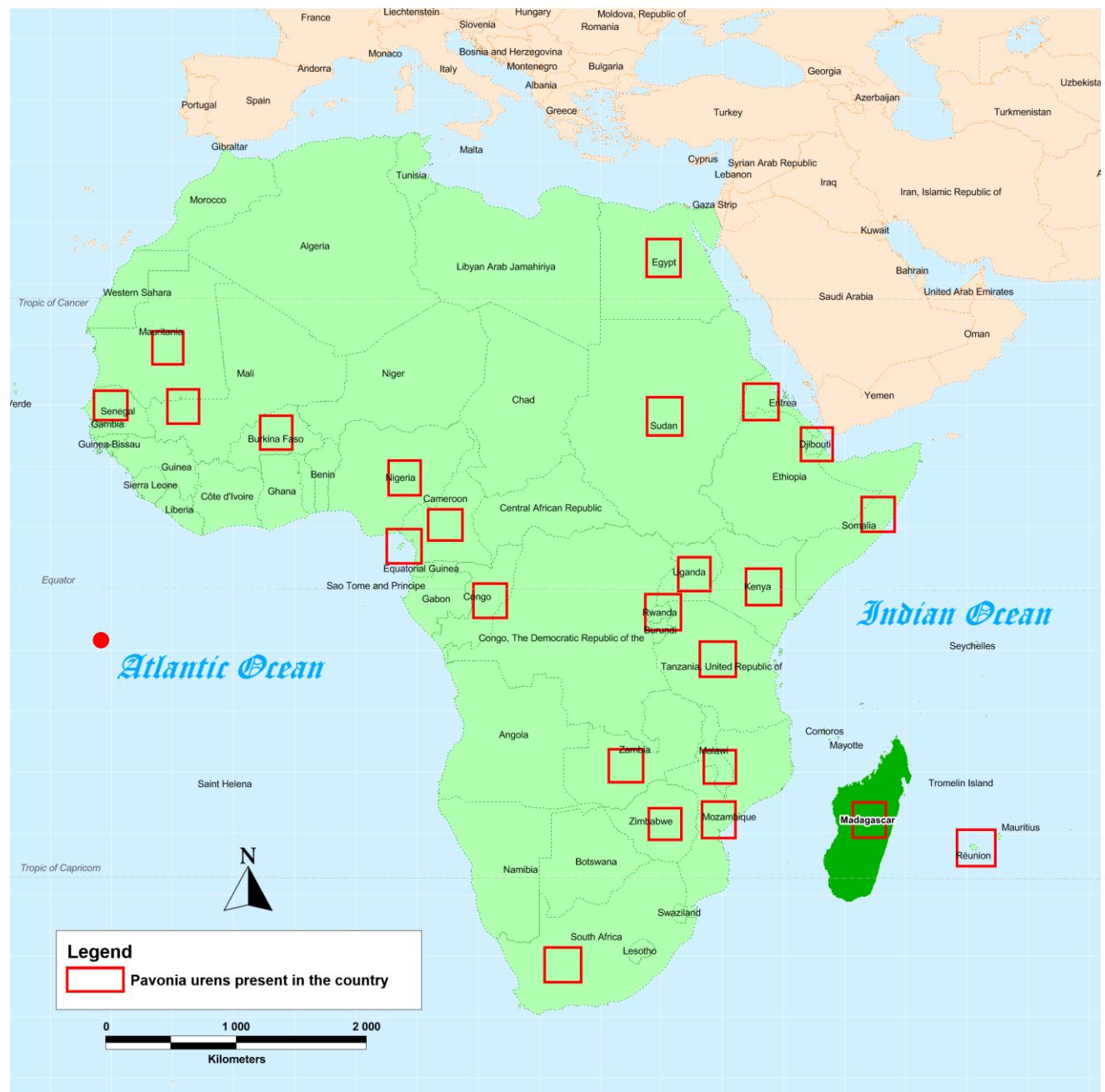


Figure 2 : Distribution de *Pavonia urens*

Source: <http://www.mi-aime-a-ou.com/>

1.2.5. Ethnobotanique

Selon BRINK et al en 2012, elle est couramment utilisée en médecine traditionnelle africaine [11] :

- ❖ En RDC (République Démocratique du Congo), la racine raclée et ramollie s'applique sur les blessures, et comme emplâtres sur les fractures et les luxations. Les feuilles sont cuites à l'eau et sont appliquées sur les yeux en cas de capacité visuelle faible.
- ❖ En Tanzanie, des préparations à base de racine se prennent pour traiter les troubles d'estomac et la pneumonie. La feuille broyée est également prise contre les problèmes d'estomac.
- ❖ Au Burundi, la décoction des racines et feuilles est donnée pour traiter la diarrhée des bébés, celle des feuilles peut également être prise contre la toux et les bouffées délirantes.
- ❖ A Madagascar, la racine est utilisée contre les maux d'estomac et la décoction de parties aériennes est inhalée en cas de fièvre. Certains l'utilisent aussi pour soigner les furoncles, les abcès et les plaies infectieuses. [12]

1.2.6. Travaux antérieurs

En Tanzanie, des chercheurs ont déjà prouvé une activité antifongique et antibactérienne sur ses extraits de racine au méthanol, à l'acétate d'éthyle et à l'eau [11] [13]. Les résultats suivants ont pu être dégagés :

- ❖ L'extrait méthanolique à 2.5g/ml inhibe la croissance de *Pseudomonas syringae* et *Staphylococcus aureus*, et est sensible à *Aspergillus fumigatus*, mais n'a aucun effet sur *Candida albicans*
- ❖ et l'extrait acétate d'éthyle à 0.5g/ml est plutôt intéressant pour inhiber la croissance de *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus*.

Par ailleurs, ses vertus antioxydantes n'ont jamais été sujet de quelconques études.

CHAPITRE 2 : L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

Ces dernières décennies, de nombreuses recherches ont été effectuées sur l'activité antimicrobienne de milliers de plantes. La résistance aux antibiotiques des germes pathogènes depuis plusieurs années en est la principale cause, étant donné que la seule alternative fiable est la recherche des antimicrobiens naturels issus de plantes médicinales ou de leurs huiles essentielles.

2.1. Les microorganismes ou microbes

Selon le Dictionnaire Larousse, un microbe se définit comme étant un organisme microscopique ou ultramicroscopique unicellulaire, et plus spécialement l'un des organismes qui causent les fermentations et les maladies. [14]

Ce terme englobe une variété d'espèces très différentes, à savoir les bactéries, les levures et les champignons. Certains incluent aussi les virus, bien qu'ils soient à la limite du vivant.

2.2. Les souches microbiennes

Les souches sélectionnées pour les tests antimicrobiennes sont des bactéries, dont deux à gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*) et deux à gram négatif (*Escherichia coli* et *Salmonella enteridis*), ainsi qu'une souche levurienne (*Candida albicans*).

2.2.1. *Staphylococcus aureus*

Aussi appelée Staphylocoque doré, c'est une bactérie se présentant sous forme de sphère (cocci) à Gram positif. Il est immobile, non sporulé et mesure de 0,5 à 1 µm de diamètre.

Elles trouvent généralement refuge dans le corps humain et chez les animaux à sang chaud. Ces bactéries sont également isolées de l'environnement naturel (sol, eau douce et eau de mer, poussière, air), de l'environnement domestique de l'Homme (cuisine, réfrigérateur), de l'environnement hospitalier et des ateliers de préparation alimentaire ainsi qu'à partir de denrées alimentaires.

Ce germe est le premier responsable des infections cutanées suppuratives tels que les furoncles, les anthrax, les panaris et autres. Il est aussi connu comme le

facteur d'intoxications alimentaires dues à une entérotoxine produite dans l'aliment ingéré, souvent des aliments à risque de contamination comme la viande et la crème glacée. [15] [16]

2.2.2. *Bacillus cereus*

La morphologie de cette bactérie correspond à un grand bacille en forme de bâtonnet de 1 µm de large pour 3 à 4 µm de long, sporulé, mobile, présentant une positivité à la coloration de Gram.

Le germe *Bacillus cereus* est fréquemment responsable de toxi-infections alimentaires opportunistes, caractérisées par des symptômes diarrhéiques et d'intoxications se traduisant par des symptômes émétiques.

Il s'agit très souvent de l'ingestion d'aliments non réfrigérés après cuisson et après une première consommation, comme par exemple le riz cuit. Le nombre de germes suffisant pour entraîner une intoxication est de un million. [16] [17]

2.2.3. *Escherichia coli*

E.coli, ou encore "colibacille" fait partie des bactéries en forme de bâtonnets qu'on appelle également bacilles. Ces bactéries à Gram négatif sont mobiles, isolés ou en chaînettes. *E. coli* prend le plus souvent refuge dans l'intestin de l'être humain et des animaux à sang chaud.

Ce sont des germes inoffensifs dans la plupart des cas. En revanche, certaines, comme *E. coli* entérohémorragique (ECEH), peuvent provoquer de graves maladies d'origine alimentaire.

Elle est transmise à l'homme par la consommation d'aliments contaminés, généralement crus ou mal cuit comme de la viande hachée, du lait, des légumes et des graines germées contaminées. Leur présence traduit alors une contamination d'origine fécale quasiment sûre du substrat analysé. [18]

2.2.4. *Salmonella enteridis*

Ces bactéries à Gram négatif ont une forme droite. Ces Entérobactéries sont mobiles, ubiquitaires et aérobies facultatives.

Les germes *Salmonella enteridis* peuvent survivre plusieurs semaines en milieu sec et plusieurs mois dans l'eau. Elles se rencontrent donc fréquemment dans les

milieux aquatiques pollués, la contamination par les excréments d'animaux porteurs étant très importante. Ces germes sont aussi présents dans les aliments riches en protéines issus de volailles, de bovins, d'ovins contaminés, notamment les viandes, le lait, et un œuf dont la coquille est brisée.

Encore appelée bacille de Gartner, cette *salmonelle* est considérée comme un des agents les plus fréquents des toxi-infections alimentaires provoquant des diarrhées, des vomissements, de la fièvre et des douleurs abdominales. [19]

2.2.5. *Candida albicans*

Candida albicans est classé comme étant un champignon asexué. C'est l'espèce de levure la plus importante et la plus connue du genre *Candida*. Elle vit généralement dans l'intestin sans nuire à l'organisme mais en se nourrissant de matières organiques mortes.

Elle provoque des infections fongiques ou candidose essentiellement au niveau des muqueuses digestive et gynécologique, facteur de mortalité important pour les personnes atteintes du sida, ainsi que les cancéreux. Par ailleurs, elle peut aussi engendrer des infections superficielles cutanées, (comme un érythème fessier chez les nouveau-nés), une bronchopneumonie et/ou une pneumonie, une vaginite, une balanite ou être responsable d'infections profondes. [20]

2.3. Les antimicrobiens [51]

En médecine humaine, un agent antimicrobien désigne une substance pouvant être naturelle ou chimique, un médicament, utilisé pour le traitement d'une maladie causée par un microbe, sans qu'il n'endommage les tissus de l'organisme, et compatible à la défense naturelle de l'organisme.

Les médicaments antimicrobiens peuvent être groupés en fonction des microorganismes principalement ciblés. Par exemple, les antibactériens, communément appelés antibiotiques, sont utilisés contre les bactéries ; et les antifongiques, contre les champignons. Ils peuvent aussi être classés selon leur fonction : Certains, comme les bactéricides, les virucides et les fongicides tuent les microorganismes, et d'autres inhibent leur croissance en un seuil déterminé (bactériostatiques, fongistatiques).

2.4. Les infections microbiennes

Une infection microbienne est un ensemble de troubles qui résultent du développement de microbes pathogènes dans un organisme. [21]

Elle peut être :

- Locale, lorsqu'elle se manifeste uniquement au niveau où les germes ont atteint.
- Générale, lorsqu'un germe franchit les barrières opposées par l'organisme à son entrée (Peau, muqueuses) ou au niveau des ganglions, il pénètre dans le sang et se dissémine par celui- ci dans tout l'organisme.
- Focale : c'est l'infection en foyer dans les tissus ou organes où les germes sont apportés par la circulation sanguine.

2.5. Traitement des infections microbiennes

Les antibiotiques et les huiles essentielles sont reconnus comme étant les principaux agents antimicrobiens :

2.5.1.Les antibiotiques [22]

Ce terme désigne toute substance naturelle (d'origine biologique élaborée par un organisme vivant), ou chimique (produite par synthèse), et parfois semi-synthétique (obtenue par modification chimique d'une molécule de base naturelle), ayant les propriétés suivantes :

- Activité antibactérienne
- Activité en milieu organique
- Une bonne absorption et bonne diffusion dans l'organisme

Les antibiotiques ont la propriété d'interférer directement avec la prolifération des micro-organismes à des concentrations tolérées par l'hôte.

2.5.2.Les huiles essentielles [23]

Extraites de plantes aromatiques, les huiles essentielles, contrairement aux antibiotiques, sont constituées de si nombreuses molécules que les bactéries ne peuvent y résister en mutant.

Les mécanismes d'action des huiles essentielles, ainsi que leurs sélectivités envers certaines bactéries restent difficiles à expliquer. Cette sélectivité pourrait être le résultat de la composition variée des fractions actives des huiles, qui présentent souvent des actions synergiques. Ce mécanisme est lié essentiellement à la structure de la paroi et à la perméabilité membranaire des bactéries à Gram+ et Gram- et se déroule en trois phases. Les substances actives :

- Attaquent d'abord la paroi bactérienne, provoquant ainsi une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires;
- Puis acidifient l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure;
- Et enfin détruisent le matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

2.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Il existe plusieurs manières d'évaluer l'activité antimicrobienne d'un extrait de plante, dont les plus employées sont la méthode de diffusion, la méthode de dilution ainsi que la méthode par TLC-DB (Thin Layer Chromatography – Direct Bioautography). [21] [24] [25]

❖ La méthode de disque ou diffusion sur gélose

Elle consiste à mettre directement l'échantillon en contact des bactéries sur un milieu solide. Le composé à tester est alors mis sur des disques de papier de 6mm de diamètre. Ensuite, les disques sont placés sur la surface d'un milieu de culture gélosé ensemencé par des souches microbiennes. Une inhibition de la croissance bactérienne après incubation sur un périmètre non négligeable démontre l'activité de la substance. Dans cette méthode, une seule concentration de l'extrait est testée. [26]

❖ La méthode par TLC – DB

Elle s'effectue de la même manière que pour la méthode de disque, mais associée à la chromatographie sur couche mince, et apporte donc plus de précision sur la substance responsable de l'activité (ou au moins sa nature), de façon qu'en premier lieu, l'extrait à tester est d'abord développé sur une plaque CCM, puis placé au fond de la culture en milieu gélosé : l'apparition des zones d'inhibition sur les tâches montrent que les substances correspondantes sont actives. [24]

❖ La méthode de dilution

Cette méthode est de type quantitatif. Elle donne la concentration estimative de la substance active et est donc utiliser pour déterminer la **concentration minimale inhibitrice** ou **CMI**. Pour cela, une gamme de concentrations de l'extrait est alors testée. C'est la plus basse concentration causant une inhibition de ces microorganismes après incubation qui correspond à la CMI. [26]

CHAPITRE 3 : L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

L'oxydation est une des plus importantes manifestations à l'origine du vieillissement des produits alimentaires et cosmétiques. Les dégradations oxydatives affectent les qualités nutritionnelles et sensorielles des aliments et peuvent avoir des répercussions sur la santé du consommateur. L'évolution de cette oxydation pourrait être à l'origine de plusieurs maladies telles que le diabète, le cancer, les infections inflammatoires, les maladies cardiaques ou neurodégénératives et accélèrent le processus de vieillissement. [21] [27]

D'autre part, le stress oxydative, définit comme étant le résultat d'un déséquilibre en faveur des espèces prooxydantes par rapport au système de défense de l'organisme (antioxydants) contre ces substances, intervient au cours des processus tumoraux. Il favorise également le vieillissement des cellules, et peut être la cause de diverses maladies dégénératives (Alzheimer, etc.), et d'autres pathologies (arthrite rhumatoïde, dermatites, etc.). Les études scientifiques effectuées dans le secteur des radicaux libres deviennent de plus en plus nombreuses. [28] [29] [30] [31]

Les protéines, les lipides et les acides nucléiques sont les principales cibles de l'oxydation [29] [31] :

- Les protéines sont endommagées par l'oxydation des groupes latéraux des acides aminés qui constituent la chaîne protéique.
- Par ailleurs, l'oxydation lipidique altère les doubles liens de la molécule lipidique en endommageant la membrane cellulaire.
- Les dégâts subis par les acides nucléiques compromettent la structure de l'ADN, ce qui peut être une des causes du vieillissement et de l'apparition du Cancer.

3.1. La réaction d'oxydation

Cette réaction se traduit par un transfert d'électron d'une substance vers un agent oxydant, formant un radical libre très instable, et qui cherche à se stabiliser en agressant toute molécule susceptible de se faire arracher un électron. L'espèce agressée est rendue à son tour radicalaire, initiant de cette façon une chaîne de réactions qui peuvent être dévastatrices.

3.2. Les radicaux libres

Un radical libre se définit comme tout atome, groupe d'atomes ou molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés dits célibataires sur l'orbitale externe. Cette caractéristique les rend très électrophiles car ils vont tenter de ré-apparier leur électron célibataire en agressant toute molécule susceptible de se faire arracher un électron; leur durée de vie est ainsi très courte et leur structure électronique déséquilibrée leur confère une grande réactivité sur les constituants organiques et sur les structures cellulaires. [21]

Ces radicaux libres peuvent être classifiés en deux :

- ❖ Les espèces réactives de l'oxygène dénommées **ROS** (Reactive Oxygen Species), dont les plus courants sont le radical hydroxyl ($\cdot\text{OH}$), l'anion superoxyde ($\cdot\text{O}_2^-$) et les radicaux peroxyles ($\text{ROO}^\cdot-$). Ils endommagent la vie cellulaire en causant l'oxydation des lipides, des protéines et de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Ces espèces sont les plus nocives et présentent un grand danger du fait qu'ils se produisent naturellement au cours de la respiration cellulaire.
- ❖ Les espèces réactives nitrées ou azotées **RNS** (Reactive Nitrogen Species) : les plus importants sont le peroxynitrite (ONOO^-) et l'oxyde nitrique (NO). [32]

3.3. Agents antioxydants

Par définition, un antioxydant est une substance qui, en faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou empêche l'oxydation de ce substrat de manière significative. Ce sont des composés très divers, pouvant être des petites molécules liposolubles (vitamine E, β -carotène) ou hydrosolubles (vitamine C, acide

urique) ou encore des protéines à activité enzymatique (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase) et non enzymatique (séquestrant des métaux).

Par ailleurs, il est nécessaire de mettre une distinction entre les termes antioxydant et antiradicalaire. Ce dernier a pour rôle de piéger les radicaux libres, et l'agent antioxydant peut agir selon d'autres manières pour régulariser le stress oxydative, comme la fixation des métaux de transition, ou encore par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production de ROS. [30]

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants :

- ✿ La vitamine C ou acide ascorbique est connue comme le plus important de tous : c'est l'antioxydant standard. Son rôle est de piéger les ions superoxydes O_2^- , le peroxyde d'hydrogéné $OH\cdot$, les radicaux hydroxyles $HO\cdot$ et l'oxygène singlet O_2^{\cdot} . Elle protège ainsi les biomembranes et les lipoprotéines en piégeant les radicaux peroxydes dans la phase aqueuse avant qu'ils initient la peroxydation lipidique.
- ✿ La vitamine E est aussi réputée comme étant un très bon antioxydant rencontré le plus souvent dans les huiles végétales et les noix, et qui prend un grand part sur la protection des cellules contre les dommages associés aux radicaux libres. Par conséquent, elle prolonge la vie cellulaire tout en ralentissant le processus de vieillissement.
- ✿ Les composés phénoliques, comme les flavonoïdes et les tanins stoppent également l'oxydation, d'une part par piégeage des radicaux libres, et d'autre part par chélation des métaux qui sont, dans plusieurs cas, en cause de l'oxydation.
- ✿ Nous pouvons également énumérer le β -carotène, l'albumine, l'acide urique, les œstrogènes, les polyamines....etc. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et ont également une capacité de lier les acides gras libres.

3.4. Evaluation de l'activité antiradicalaire

Les méthodes sont surtout focalisées sur l'évaluation des activités antiradicalaires, en se basant sur le piégeage de certains radicaux libres. Les plus rencontrées, selon POPOVICCI sont: [33]

- La méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter)
- Le test ABTS[•] (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)
- Ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH[•] (diphényl-picrylhydrazyle).

3.4.1. La méthode FRAP

Il s'agit de réduire les ions ferriques. Le réactif est composé d'une solution de 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) et de chlorure ferrique dans un tampon acétate à pH = 3,6 dans le rapport 1 / 1 / 10.

L'extrait est mélangé avec le réactif, et incubé à température ordinaire. L'absorbance est lue à 593nm. L'activité antioxydante de l'extrait de plante est comparée à celle d'un antioxydant de référence en termes d'équivalence ou en termes d'inhibition. [33] [34]

3.4.2. Le test ABTS

Le test TEAC Trolox Equivalent Antioxydant Capacity ou test ABTS est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{•+} de coloration bleu-vert en le transformant en ABTS⁺ incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant. La lecture de l'absorbance se fait à 734nm, et l'activité antioxydante de l'extrait est comparée à celle d'un antioxydant de référence en termes d'équivalence ou en termes d'inhibition. [35]

3.4.3. Le test DPPH [28]

Le DPPH ou 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est le plus utilisé pour l'étude de l'activité antiradicalaire des polyphénols, et c'est la méthode adoptée dans cette étude.

- **Le radical libre DPPH[•] [33]**

Ce radical possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure 3). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, c'est-à-dire que le radical DPPH[•] reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH[•]. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH[•], mesurable par spectrophotométrie UV, aux longueurs d'onde comprises entre 515-518 nm. Voici la figure montrant la formule chimique du DPPH :

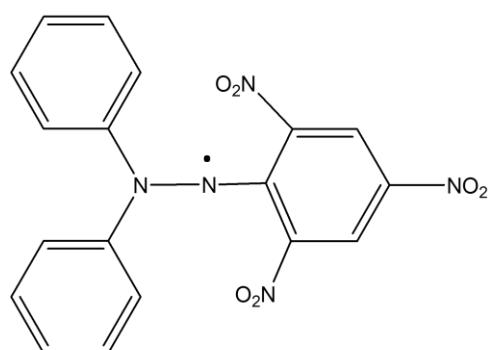
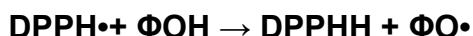


Figure 3 : Structure chimique du DPPH

- **Réaction entre le radical libre DPPH[•] et l'antioxydant**

Dans le cas des composés phénoliques ($\Phi-OH$), le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de H^{\bullet} sur le DPPH[•] alors transformé en une molécule stable DPPH. Sa couleur, initialement bleue violet se transforme en jaune lorsqu'elle est réduite. [33] [36] [37]



Plusieurs voies réactionnelles de rupture de chaîne radicalaire sont alors possibles qui forment des structures plus ou moins stables :



CHAPITRE 4 : LA PHYTOCHIMIE

C'est l'étude de la chimie des plantes. Il s'agit d'étudier les principales familles de substances chimiques que contienne une plante. Ces familles peuvent être classifiées en deux, dont les métabolites primaires et secondaires.

- Les métabolites primaires tels que les lipides, les polysaccharides, les acides aminés sont indispensables à la survie de l'organisme.
- Par contre, les métabolites secondaires, où se rangent les alcaloïdes, les terpènoïdes, les flavonoïdes et polyphénols...ne sont pas vitaux pour l'organisme, mais ont des fonctions bien spécifiques. Ces métabolites lui servent généralement de défense contre les prédateurs, ou d'attraction pour les insectes pollinisateurs. [38] [39]

La présente étude se focalise surtout sur les métabolites secondaires que renferme la plante *Pavonia urens*.

4.1. Les alcaloïdes

4.1.1. Définition

Ce sont des substances organiques élaborées généralement par les végétaux, et se rencontrent rarement chez les animaux. Les alcaloïdes sont généralement des composés à structures cycliques et renferment toujours un ou plusieurs atomes d'azotes, ce qui leurs confèrent une propriété basique. [38]

4.1.2. Classification

Les trois grandes classes de ce métabolite sont :

- ❖ Les alcaloïdes vrais: ils dérivent d'un acide aminé comme précurseur biologique et comportent un ou plusieurs atomes d'azote dans l'hétérocycle.
- ❖ Les protoalcaloïdes : ils sont élaborés à partir d'un acide aminé et possèdent un atome d'azote exocyclique
- ❖ Les pseudoalcaloïdes : ce sont les alcaloïdes ne dérivant pas d'acides aminés

Le tableau 1 suivant donne un exemple de chaque classe d'alcaloïde

Tableau 1 : Exemples d'alcaloïdes

ALCALOÏDE VRAI	PSEUDOALCALOÏDE	PROTOALCALOÏDE
Nicotine (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Coniine (<i>Conium maculatum</i>)	Mescaline (<i>Peyotl</i>)

Figure 4 : Exemples d'alcaloïdes

4.1.3. Activités biologiques

Malgré sa toxicité aigüe à forte dose, cette famille de métabolites secondaires a de très nombreuses utilisations thérapeutiques. Parmi tant d'autres, nous pouvons citer :

- Ses effets antiviraux (la désoxynojirimycine de *Morus*), antibactériens et antiparasitaires
- Ses activités antitumorales et anticancéreuses (la vinblastine et la vincristine du *Catharanthus roseus*)
- Ses propriétés antalgiques et anesthésiques (comme la morphine extraite des grains du *Papaver somniferum*)

4.2. Les flavonoïdes

4.2.1. Définitions

Etymologiquement, ce terme vient du latin « *flavus* », ou jaune. Les flavonoïdes sont les agents responsables des couleurs des fleurs et fruits des plantes. Ils existent le plus souvent dans l'état naturel sous forme d'hétéroside, provenant de l'union de génine et de sucre. Leur structure de base est le noyau flavane, (figure 5) constitué de deux noyaux aromatiques A et B, connectés par un pont à trois carbones

(structure en C6-C3-C6). Le pont en C3 entre A et B est généralement cyclisé pour former le cycle C. [33] [38]

4.2.2. Classification

La figure 5 nous résume, avec quelques exemples, les divers types de flavonoïdes, ayant tous comme squelette de base le noyau flavane. [3]

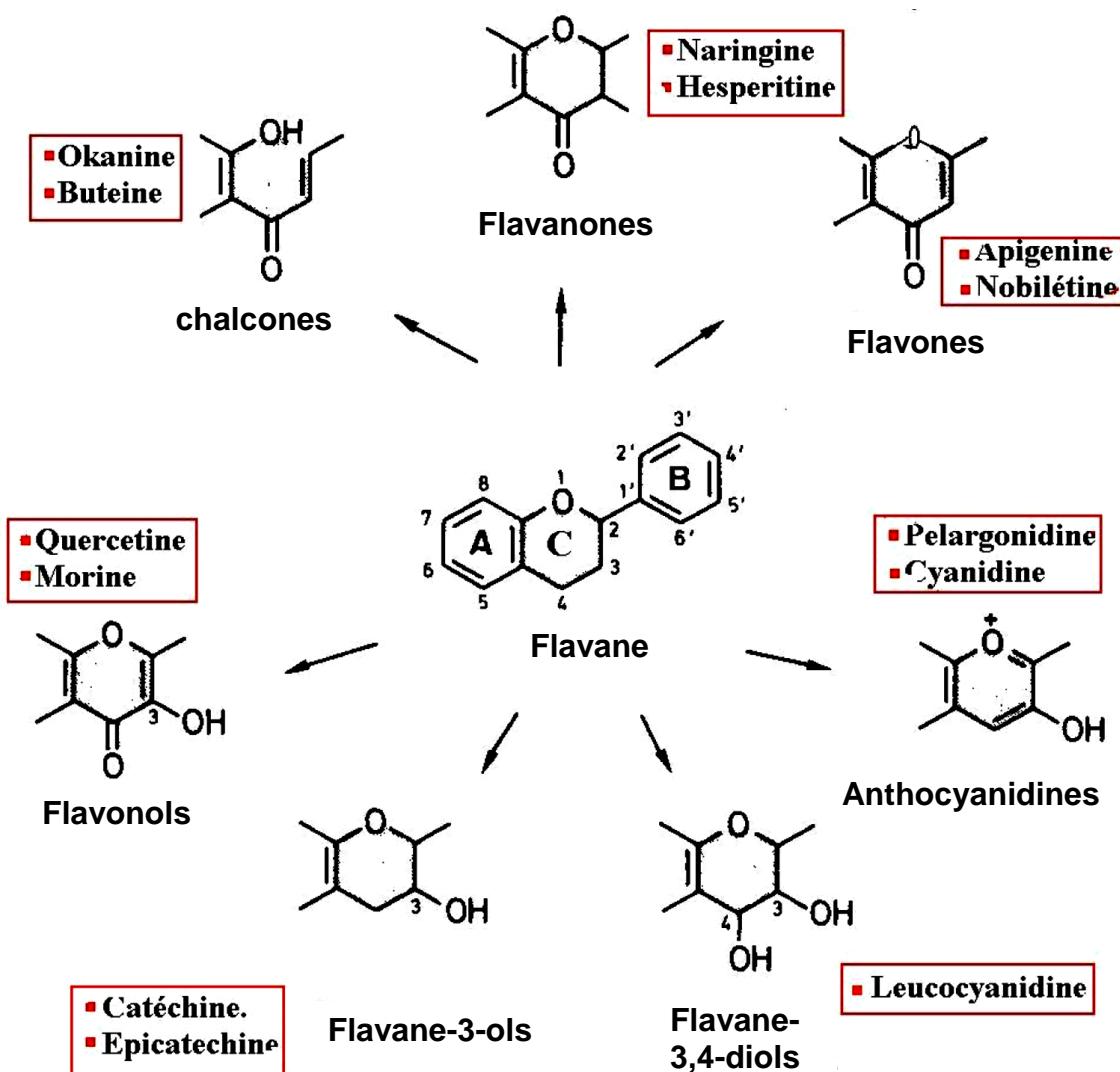


Figure 5 : Structures du cycle C des différents types de flavonoïdes à partir du squelette flavane.

Source : Dacosta, 2003

4.2.3. Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des flavonoïdes

De nos jours, de vastes intérêts biologiques des flavonoïdes ont été déjà démontrés, à savoir leurs activités antivirales, antispasmodiques, antitumorales, antiagrégation plaquettaires, antiallergiques, antiinflammatoires, antihypertensives, antimicrobiennes et hypcholestérolémiantes. [40]

Ces composés sont d'autre part de très forts antioxydants : leur structure chimique aromatique permet une délocalisation électronique importante, donc une stabilisation de leurs formes radicalaires.

4.3. Les terpènoïdes et stéroïdes

4.3.1. Définition

Ils sont définis comme étant des substances chimiques formées d'assemblage d'unités « isoprène ». Ce sont les principaux constituants des huiles essentielles, et sont généralement les agents responsables de l'odeur caractéristique d'une plante, une odeur due à la libération des molécules très volatiles contenant 10, 15, 20 atomes de carbone. [38]

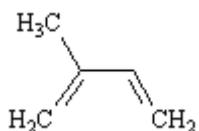


Figure 6 : Structure chimique de l'isoprène

Par ailleurs, les stéroïdes sont des triterpènes tétracycliques qui ont perdu au minimum trois méthyles. Ils ont en commun une structure chimique comportant un squelette perhydrocyclopentanophénantrène : le stérene. [31]

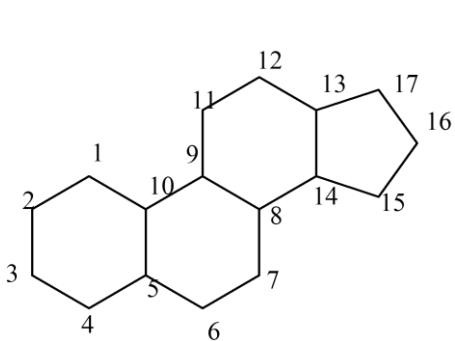


Figure 8 : Structure chimique du stérene **Figure 7: Structure de base des stéroïdes**

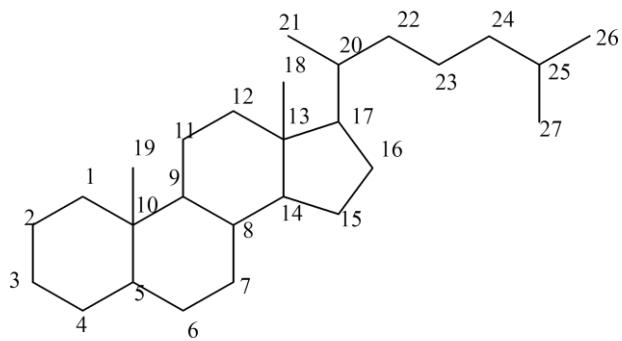


Figure 8 : Structure chimique du stérene **Figure 7: Structure de base des stéroïdes**

4.3.2. Classification

Les terpènes peuvent être classés selon les nombres d'unités isopréniques qu'ils contiennent, à savoir :

- ✿ Les monoterpènes et dérivés : constitués de deux unités d'isoprènes
- ✿ Les sesquiterpènes et dérivés : constitués de trois unités d'isoprènes
- ✿ Les diterpènes et dérivés : constitués de quatre unités d'isoprènes
- ✿ Les sesterpènes et dérivés : constitués de cinq unités d'isoprènes
- ✿ Les triterpènes et dérivés : constitués de six unités d'isoprènes
- ✿ Les tetraterpènes et dérivés : par exemple le β -carotène, ils sont constitués de huit unités isopréniques
- ✿ Les polyterpènes : ce sont généralement des polymères d'isoprènes comme le caoutchouc.

Des exemples de terpènes sont énumérés dans ce tableau :

Tableau 2 : Quelques exemples de composés terpéniques

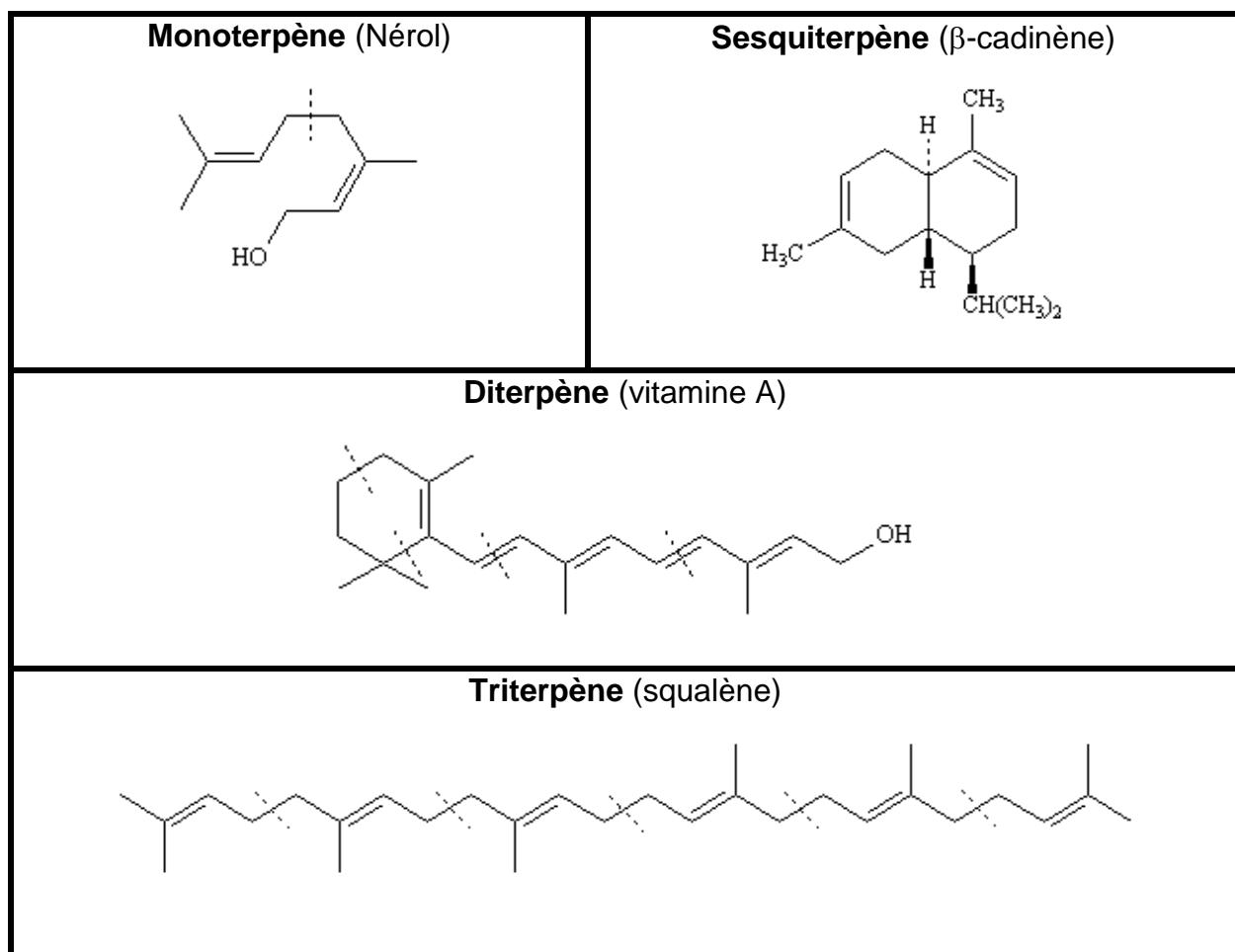


Figure 9 : Exemples de terpènes

4.3.3. Intérêts pharmaceutiques

Comme mentionné précédemment, ce sont les constituants majoritaires des huiles essentielles, notamment les sesquiterpènes. Nombreux terpènes et terpènoïdes possèdent des propriétés antiseptiques.

Le β -Carotène, un tetraterpène très connu, donnant la couleur orange à la carotte joue un rôle essentiel dans la croissance et la vision : son oxydation provoque la coupure de la double liaison centrale et la formation de deux molécules d'un aldéhyde (le Rétinal), dont la réduction donne la vitamine A.

Par ailleurs, les médicaments stéroïdiques (les contraceptifs, anti-inflammatoires, anabolisants) ont un rôle essentiel dans l'industrie pharmaceutique. [38]

4.4. Les tanins

4.4.1. Définition

Les tanins sont des substances naturelles polyphénoliques, solubles dans l'eau et qui peuvent précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines à partir de leurs solutions aqueuses. Ils sont rencontrés dans pratiquement toutes les parties des végétaux (écorces, racines, feuilles, fruits, etc.) où ils jouent le rôle d'armes chimiques défensives contre certains parasites. [38] [41]

Du point de vue structure, ils sont constitués :

- ✿ Soit de polyol (glucose le plus souvent), ou de catéchine ou de triterpénoïde auquel sont attachés des unités galloyles (ou leurs dérivés) ;
- ✿ Soit d'oligomères ou polymères de flavanols.

4.4.2. Classification

Ces substances se divisent en deux groupes selon leurs structures, dont les tanins hydrolysables et les tanins non hydrolysables ou condensés. [42]

- ✿ Les tanins hydrolysables, comme les acides galliques et ellagiques, sont des esters de glucose, c'est à dire un noyau central de glucose sur lequel se fixent des acides, au moyen d'une liaison ester. Leur hydrolyse sépare le glucose des acides phénoliques.

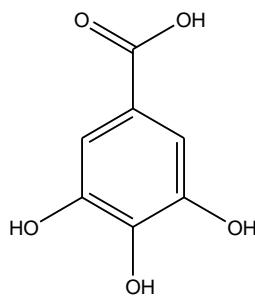


Figure 10 : Structure chimique de l'acide gallique

- Les tanins non hydrolysables ou condensés, appelés également proanthocyanidines ont par ailleurs des structures complexes. Ce sont des polymères de flavan-3-oles (Catéchine) et de flavan-3,4-dioles (leucoanthocyanidines), ou un mélange des deux. Voici la structure de base des tanins condensés :

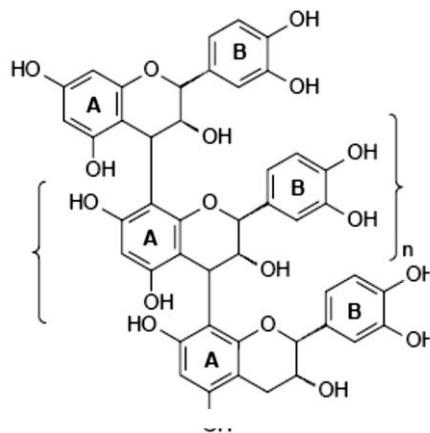


Figure 11: Structure de base des tanins condensés

4.4.3. Intérêts pharmaceutiques

Ce sont des antiseptiques très connus. De plus, leur affinité pour les protéines leur confère un effet antidiarrhéique. Les tanins sont également très connus sur leur effet antioxydants dues à leur noyau phénol, et ont aussi des effets antimicrobiens sur différents bactéries, virus et champignons. Les propriétés antioxydantes des tanins expliquent certains effets bénéfiques du vin sur la santé (protection cardiovasculaire à doses modérées). [38] [43]

4.5. Les coumarines

4.5.1. Définition

Historiquement, ce terme vient de «cumaru» qui est le nom, dans une langue amazonienne, de l'arbre de tonka (*Dipteryx odorata* Willd, fabaceae) dont les fèves contiennent 1 à 3% de coumarine. Elles ont été isolées pour la première fois en 1820. [21] [31]

Concernant leur structure chimique, il s'agit des composés dont la structure de base est à 9 atomes de carbones, appartenant au groupe des benzopyran-2-one. La structure générale des coumarines est représentée ci-après. [31]

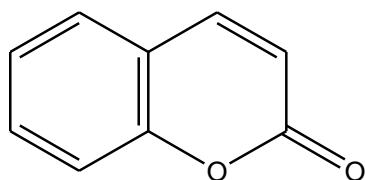


Figure 12 : Structure de base des coumarines

4.5.2. Classification

Selon les substituants, ils peuvent être subdivisés en :

- Coumarines simples, les plus répandues dans le règne végétal, sont substitués par des groupements OH et OCH₃.
- Furanocoumarines, substituées par des noyaux furane, tel que le psoralène
- Pyranocoumarines, exemple le xanthylétine
- Dicoumarines : le daphnoréiyne
- Tricoumarines, issus de l'union de trois unités coumariques comme le Triumbellatine

Tableau 3 : Exemples de coumarines

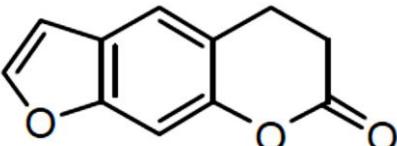
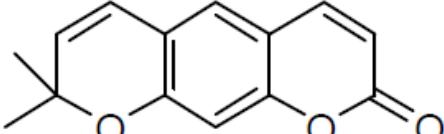
Exemples de coumarines	
	
psoralène	xanthylétine

Figure 13 : Exemples de coumarines

4.5.3. Intérêts pharmaceutiques

Nombreux sont les activités biologiques de ces composés, selon les substituants sur le cycle benzopyrone. Certains dérivés sont de puissants anticoagulants, comme le dicoumarol (uniquement utilisé comme raticide) et l'esculoside, tous deux des veinotoniques et vasculoprotecteurs. La visnadine est connue pour ses propriétés vasodilatatriques. D'autres furanocoumarines sont également utilisés pour traiter le psoriasis. [31]

CHAPITRE 5 : LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

5.1. Généralités

C'est une chromatographie d'adsorption solide-liquide effectuée pour analyser et séparer un mélange. La phase stationnaire solide est fixée sur une plaque, et la phase mobile liquide, nommée éluant est un solvant ou un mélange de solvants. [25] [39]

Une petite quantité du mélange à séparer est déposée sur la phase fixe, qui serait, par la suite, mise en contact avec la phase mobile. La migration de cette phase mobile se fait de bas en haut le long de la phase fixe en entraînant les constituants du mélange. C'est une migration ascendante, par capillarité. Ce phénomène d'élution permet la séparation des constituants du mélange à analyser.

Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, pour laquelle le rapport frontal ou rétention frontale (R_f) est déterminée par la formule :

$$R_f = \frac{\text{Distance de migration d'une substance}}{\text{Distance parcourue par le front de solvant}}$$

5.2. Révélateurs

Chaque révélateur est spécifique à une famille chimique. Certains composés se visualisent directement à l'œil nu dans le visible, ou sous la lumière U.V 365nm.

❖ Visualisation directe sous UV 265nm

Cette méthode est employée pour l'identification de certains composés phénoliques indiqués dans ce tableau-ci :

Tableau 4 : Couleurs caractéristiques de certains composés dans le visible et sous UV 365nm

Composés révélés	Couleurs des taches fluorescentes	Auteurs
Coumarines	Jaune, vert	GEORGIEVSKII, 1990
Xanthones	Orange	LADIGUINA et al., 1983
Flavonols et /ou aurones	Jaune quelconque	DAWSON et al., 1991
Coumarines, flavones méthylées	Bleu, pourpre	DAWSON et al., 1991
Anthocyanidine-3 glucoside	Rouge	DAWSON et al., 1991

Source : N'GAMAN et al, 2009

❖ Révélation avec AlCl_3 1% dans EtOH absolu

A l'œil nu ou sous UV 365nm, ce réactif révèle des composés flavonoïdiques énumérés ci-après, avec leurs couleurs distinctives :

Tableau 5 : Couleurs des flavonoïdes après révélation par AlCl_3

Composés révélés	Dans le visible	Sous UV-365 nm	Auteurs
Flavonoïdes	Jaune	Jaune	MERCK, 1980 ; LAGNIKA, 2005 ; LADIGUINA et al., 1983
	Jaune	Vert	
	Jaune pâle	Bleu (puis vire au brun)	
	Jaune pâle	Vert	
Flavonol	Jaune pâle	Jaune pâle	

Source : N'GAMAN et al, 2009

❖ Vapeur de NH_3 (solution à 25%)

Le réactif d'ammoniac est spécifique pour révéler les coumarines et les anthocyanes. La plaque est exposée à la vapeur de NH_3 durant quelques minutes, puis les changements de couleurs sont observés:

Tableau 6 : Couleurs des coumarines et anthocyanes avec la vapeur de NH₃

Composés	Dans le visible	Sous UV 365 nm	Auteurs
Coumarines	Vert	Vert	DEKKER, 2002 ; MERCK, 1980
	Jaune	Bleu	
	Jaune	Orange	
	Jaune vert	Orange	
	Jaune	Marron	
Anthocyanes	Jaune	Bleu	

Source : N'GAMAN et al, 2009

❖ Révélation avec le réactif de LIEBERMANN-BURCHARD

Le réactif de Liebrmann-Burchard révèle les triterpènoïdes et les stéroïdes, visualisables sous UV 254nm et 365nm.

Tableau 7 : Couleurs des composés terpéniques après giclage avec le réactif de LIEBERMANN-BURCHARD [38] [44] [45] [47]

Composés révélés	Sous UV-254 nm	Sous UV-365 nm	Auteurs
Stéroïdes	Bleu	Jaune vert	BRUNETON, 1999 ; LAGNIKA, 2005 ; MERCK1980
	Bleu foncé	Jaune	
	Non révélé	Jaune	
Triterpène de type oléanane, ursane	Bleu	Rouge	CHAIB, 2004 ; LAGNIKA 2005
Triterpène de type lupane	Orange	Orange	BRUNETON, 1999 ; LAGNIKA, 2005 ; MERCK1980

Source : N'GAMAN et al, 2009 [47]

❖ Révélation avec FeCl_3 1% [48]

Ce réactif permet de révéler les tanins, ainsi que les polyphénols.

L'apparition d'une couleur bleue, directement observable à l'œil nu est la preuve que l'extrait contient des tanins ou d'autres composés phénoliques.

5.3. Applications

C'est une méthode capitale lors des études des chimies des végétaux et des animaux :

- La CCM est surtout utilisée pour séparer, puis identifier préalablement les composés d'un mélange en comparant leurs R_f avec ceux déjà connus, de façon qu'une même substance migre à la même hauteur dans des conditions opératoires identiques. Ceci lui permet alors d'indiquer, dans certains cas, le nombre de composants d'un mélange.
- Elle est également connue comme étant une méthode préparative. Elle précède souvent une chromatographie sur colonne pour rechercher le meilleur système de solvants d'élution.
- Mais aussi, dans des conditions opératoires connues, elle peut confirmer rapidement la pureté d'un composé organique.
- Certaines analyses, comme pour les tests antimicrobiens ou antioxydants peuvent être combinées à la CCM. Cette dernière peut servir d'indicateur pour plus de précision sur l'élément actif, en faisant d'abord migrer l'extrait sur une plaque, avant de tester ou révéler par le réactif approprié.

Tout cela confirme que cette méthode chromatographique est indispensable pour n'importe quelle étude en chimie des substances naturelles.

Partie 2 :

Approches expérimentales

CHAPITRE 6 : PREPARATION DES EXTRAITS

6.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué par les feuilles, les écorces de tige, ainsi que les racines de *Pavonia urens*. La récolte a été effectuée en Novembre 2013, à la commune de Sambaina, district de Manjakandriana, région Analamanga. (**Annexe 2**)

Chaque partie de la plante, c'est-à-dire les feuilles, les racines et les écorces de tiges a été séchée à l'ombre à la température ambiante afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules de la plante, en minimisant tous risques de dégradations ou fermentations. Puis les plantes sèches ont été broyées, puis tamisées à des granulométries inférieures à 2mm.

Dans la suite, nous allons considérer les abréviations, ainsi que les notations qui suivent :

Tableau 8 : Notations des volumes (solvants), masses (plantes et extraits) et rendements des extractions

EXTRAITS	FEUILLE (F)	TIGE (T)	RACINE (R)
Volume EtOH	V(F)	V(T)	V(R)
Masse charbons actifs	x(F)	x(T)	x(R)
Masse initiale	m_0 (F)	m_0 (T)	m_0 (R)
Extrait brut	m_1 (F)	m_1 (T)	m_1 (R)
Extrait HEX	m_2 (F)	m_2 (T)	m_2 (R)
Extrait DCM	m_3 (F)	m_3 (T)	m_3 (R)
Extrait BuOH	m_4 (F)	m_4 (T)	m_4 (R)
Rendement de l'extraction i	r_i (F)	r_i (T)	r_i (R)

6.2. Matériels techniques

Les pesées effectuées durant toutes les manipulations ont été faites avec des balances de précisions.

Le rotavapor Büchi a servi lors des évaporation des extraits.

6.3. Macération hydro-éthanolique

Le solvant utilisé est un mélange éthanol-eau 80%, obtenu par dilution à partir de l'éthanol 90%. Pour une préparation de 500ml, 444ml d'éthanol 90% a été mis dans une éprouvette graduée et ramenée jusqu'à un volume de 500ml avec de l'eau distillée.

La poudre sèche de chaque partie de la plante a été macérée dans le solvant de volume V_i pendant 24 heures (volume assurant l'immersion totale de la poudre). Après filtration sur Büchner, il a été nécessaire d'enlever les chlorophylles, à l'exception de la racine, à l'aide de charbon actif de masse x_i finement pulvérisés. Filtrer alors, de nouveau pour enlever le charbon actif, et obtenir un extrait éthanolique propre.

L'opération a été refaite 3 fois pour assurer l'épuisement total de la plante. Les 3 filtrats ont été assemblés, puis évaporés à sec sous vide à une température d'environ 40°C, température permettant de préserver les substances chimiques de leur dégradation sous l'action de la chaleur. L'extrait hydroalcoolique de masse m_1 ainsi obtenu contient globalement tous les constituants de la plante. Cet extrait a servi dans la suite pour :

- Le partage par solvants,
- Les criblages phytochimiques
- Et les diverses tests et analyses biologiques.

Le flow-sheet qui suit résume les diverses étapes du processus permettant l'obtention des extraits hydroalcooliques :

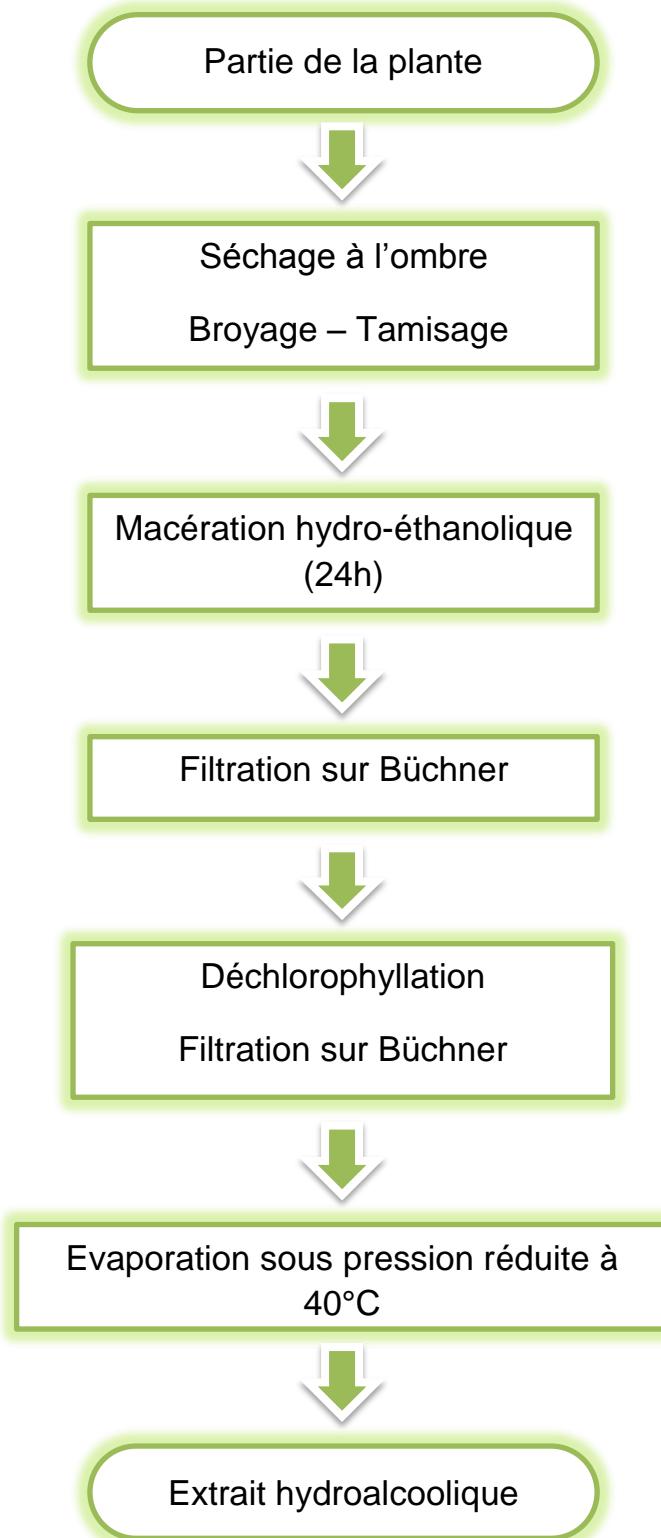


Figure 14 : Processus d'obtention des extraits éthanoliques

6.4. Extraction par solvant

6.4.1. Principe

Le principe de l'extraction des substances naturelles par les solvants est basé sur la règle de similitude qui signifie que « le semblable se dissout dans le semblable ». Ainsi, un solvant polaire dissout les substances polaires, les solvants non polaires dissout les produits de mêmes polarités et les produits moyennement polaires sont dissous dans les solvants moyennement polaires. [31]

Voici quelques exemples de solvants couramment utilisés, ainsi que les substances chimiques de polarités voisins. [26]

Tableau 9 : Les solvants courants et leurs polarités

Polarité	Exemples de solvants	Substances extraites
Non polaires	- Ether de pétrole - Hexane - Cyclohexane	- Les huiles essentielles - Les Carbures - Les lipides
Moyennement polaires	- Toluène - Chloroforme - Dichlorométhane	- Les Chlorophylles - Les flavonoïdes non glycosylés et fortement méthoxylés - Les anthraquinones - Les terpènes, stéroïdes, alcaloïdes
Polaires	- Butanol - Méthanol - Eau	- Les Tanins et les Phénols - Les saponosides - Les acides organiques - Les hétérosides - Les polyols

Deux méthodes peuvent être alors utilisées :

- La première consiste à extraire les produits par une série de partages liquide-liquide dans deux solvants non miscibles.
- Et la seconde s'effectue à l'aide d'une série de solvants par ordre de polarité croissante.

6.4.2. Mode opératoire

La première méthode a été adoptée pour notre cas.

Pour ce faire, il a été nécessaire de préparer 200ml d'éthanol 50% par dilution d'éthanol 90% : 111ml d'éthanol 90% a été mis dans une burette graduée, puis ramené jusqu'à un volume de 200ml avec de l'eau distillée.

Une masse m_1 de l'extrait hydroalcoolique est reprise avec le volume d'éthanol préparé précédemment. Puis, la solution hydroalcoolique est transvasée dans une ampoule à décanter, et épuisée successivement par trois solvants non miscibles à l'éthanol lui-même, selon la manière suivante:

- ✚ D'abord avec 200ml d'hexane : le mélange est agité, puis dégazé par ouverture de l'ampoule, et laissé au repos pour que les deux solvants se décentrent. Les deux phases : aqueuse (inférieure) et hexanique (supérieure) sont récupérées dans deux bêchers. Par la suite, la phase aqueuse est retransvasée dans l'ampoule à décanter. L'opération est répétée trois fois et les trois phases hexaniques ainsi obtenues sont rassemblées.
- ✚ Puis, par le dichlorométhane : il est à noter qu'avant d'ajouter ce solvant, une évaporation partielle de la phase éthanolique est nécessaire pour augmenter sa polarité, ceci dans le but d'éviter que le DCM n'extraie les substances polaires de la plante. L'opération est, comme précédemment, répétée 3 fois.
- ✚ Et enfin avec 3x200ml de butanol, selon la manière définie ci-dessus.



Figure 15 : Photos d'un partage liquide/liquide d'extrait de P.U

Source : Cliché de l'auteur

Les trois phases : hexanique, dichlorométhane et butanolique ont été évaporées à sec à l'aide d'un rotavapor. Mais avant l'évaporation des solutions hexaniques et dichlorométhanes, il a été nécessaire de dessécher par du sulfate de sodium anhydre pour enlever toute trace d'eau.

Quatre extraits ont alors été obtenus: extrait brut (hydroalcoolique) de masse m_1 , l'extrait hexanique (m_2), l'extrait dichlorométhane (m_3) et l'extrait butanolique (m_4).

Le procédé se résume dans le graphique ci-après, avec quelques exemples des substances extraites par chaque solvant.

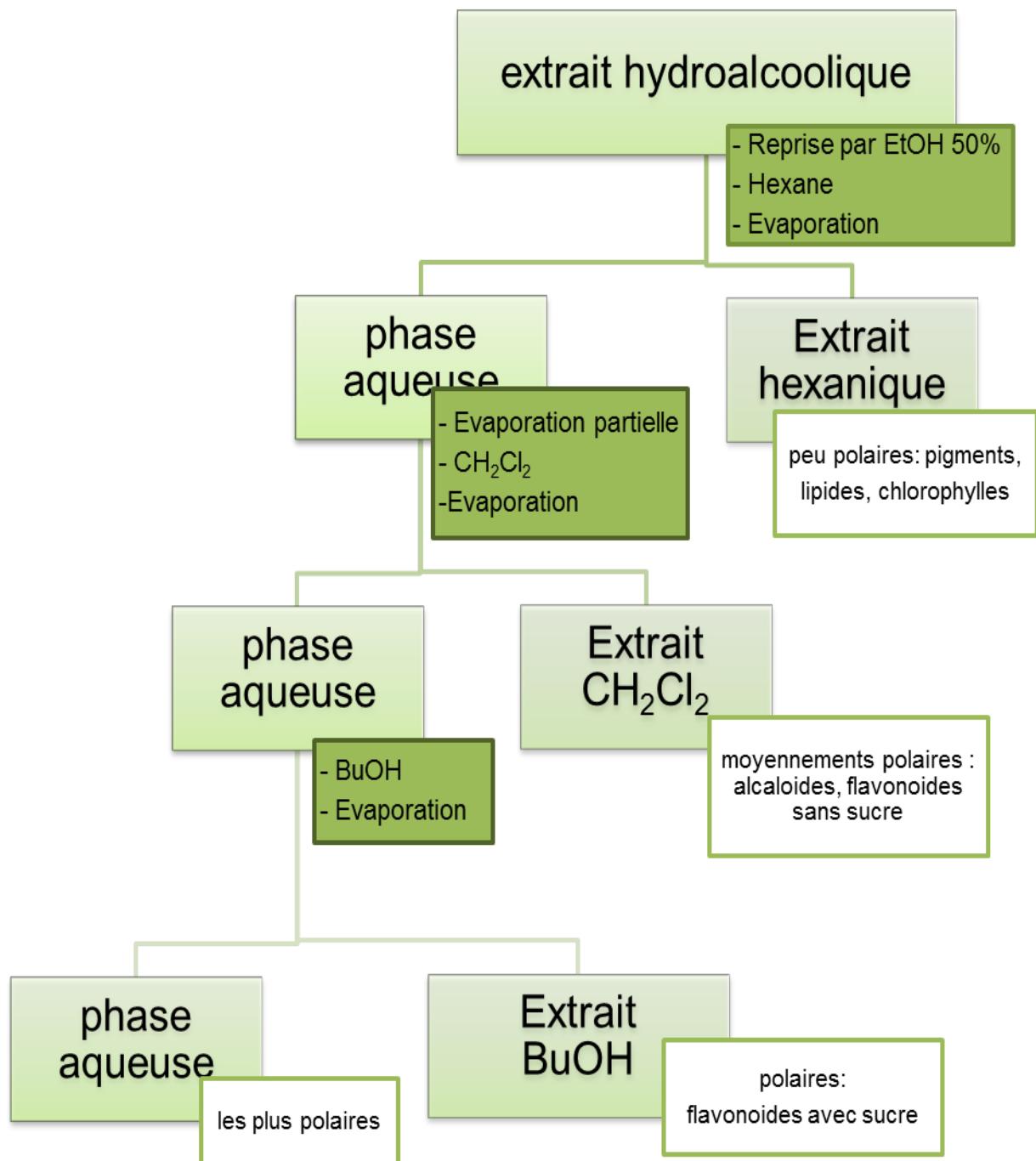


Figure 16 : Schéma du processus d'obtention des extraits partagés de P.U

CHAPITRE 7 : CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE

C'est un ensemble de tests effectués généralement sur des extraits des organes des plantes étudiées ou directement sur la poudre, dont le but est de déterminer qualitativement les principales familles de substances naturelles qui y sont présentes. Ils sont basés :

- Sur la formation de complexes insolubles : utilisant des réactions de précipitation.
- Ou bien sur la formation de complexes colorés : se référant sur des variations de couleur ou réactions de colorations. [53]

7.1. Criblage des alcaloïdes

7.1.1. Principe

Comme les alcaloïdes sont des substances azotées, ils présentent des propriétés alcalines et forment des sels avec les acides (sulfates, chlorhydrates...).

En outre, ils précipitent les hydrates de métaux lourds tels que le bismuth, le mercure, le tungstène, l'iode, leur permettant d'adopter une structure d'ammonium quaternaire. Ainsi, ils peuvent alors être caractérisés par la formation de précipité en présence des réactifs de Valser Mayer, Draggendorf, Wagner. [52]

Le screening s'effectue généralement en deux étapes dont la macération chlorhydrique ou test préliminaire, ainsi que le test de confirmation.

- ✿ **La macération chlorhydrique** : il s'agit de tester directement la poudre de plante, après macération avec HCl, par les réactifs généraux énumérés ci-dessus.
- ✿ **Test de confirmation** : ce test n'est nécessaire que si le précédent s'avère positif. Ceci est basé sur la méthode classique d'extraction des alcaloïdes. Il s'agit d'abord de les alcaliniser avec une solution de NH₄OH. Puis, après extraction au chloroforme et reprise avec de l'acide chlorhydrique, les tests avec les trois réactifs généraux sont à refaire.

7.1.2.Mode opératoire

1g de poudre de plante a été macérée dans une solution 1 à 2 % d'acide chlorhydrique HCl pendant 15 minutes. Après filtration sur coton, le filtrat est répartit dans 3 tubes à essais : le premier a servi de témoin, et les tubes 2 et 3 sont ajoutées respectivement de 5 gouttes de réactifs de Wagner et de Draggendorf.

Le tableau 10 suivant définit les réactifs généraux de détection des alcaloïdes, ainsi que les résultats attendus.

Tableau 10 : Les réactifs généraux des alcaloïdes

Réactifs de		Couleur du précipité
Valser Mayer	Mercuri-iodure de potassium	Blanc jaunâtre
Draggendorf	Iodobismuthate de potassium	Orange
Wagner	Iodo-ioduré	Rouge orangée

Source : N'GUESSAN, 2009

7.2. Criblage des flavonoïdes et leucoanthocyanes

7.2.1.Principe

Pour détecter la présence de flavonoïdes dans une plante, on peut faire appel au *test à la cyanidine*, de façon à les réduire, en présence d'un acide concentré et de magnésium, en anthocyanidines de couleur rouge, après élimination d'une molécule d'eau.

Par ailleurs, les anthocyanes sont des dérivés du flavan-3,4-diols et se transforment en anthocyanidols correspondants par traitement acide. [52]

7.2.2.Mode opératoire

Pour les tests, une quantité d'extrait éthanolique brut et sec, équivalente à 3g de plante sèche a été dépigmentée jusqu'à épuisement à l'aide de l'hexane. Ensuite, après dissolution du résidu par l'éthanol, le filtrat est réparti dans 5 tubes à essais, dont le premier a servi de témoin.

Dans le tableau 11 sont énumérés les réactifs spécifiques pour la détection des flavonoïdes et des anthocyanes.

Tableau 11 : Les réactifs généraux des flavonoïdes et anthocyanes

Tests	Tubes	Réactifs	Colorations	Classe chimique
WILLSTATER	2	<ul style="list-style-type: none"> - HCl concentré - Tournures de Mg 	Rouge	Flavones
			Rouge à rouge pourpre	Flavonols
			Rouge violacée	Flavanones et Flavanols
WILLSTATER modifié	3	<ul style="list-style-type: none"> - HCl concentré - Tournures de Mg - Alcool isoamylique 	Rouge	Flavones
			Pourpre	Flavonols
BATH-SMITH	4	HCl concentré à chaud	Rouge violacée	Leucoanthocyanes
	5	HCl concentré à froid	Rouge	Anthocyanes

Source : N'GUESSAN, 2009

7.3. Tanins et polyphénols

7.3.1. Principe

Les tanins sont des composés polyphénoliques hydrosolubles ayant la propriété de précipiter les protéines comme la gélatine.

Le criblage se fait avec du chlorure ferrique (FeCl_3) en solution diluée. Ce dernier forme avec les phénols des colorations variant du bleu au violet, qui sont dues à la formation de complexes d'oxydation. [38] [52]

7.3.2. Mode opératoire

Environ 100mg d'extrait brut hydroalcoolique sec a été additionné de 15 ml d'eau distillée. Après chauffage et agitation, 4 gouttes de solution de NaCl 10% y ont été ajoutées.

Après filtration, le filtrat est reparti dans 4 tubes, puis ajouté des réactifs cités dans le tableau 12 ci-dessous.

Tableau 12 : Les réactifs généraux des tanins et polyphénols

Tube	Réactifs	Observations	Classe chimique
2	4 à 5gouttes de Gélatine à 1%	Précipités	Polyphénols
3	4 à 5gouttes de Gélatine salée (gélatine1% + NaCl10%)	Précipités	Tanins
4	4 à 5gouttes de FeCl_3 à 10% en solution méthanolique	Coloration bleu-vert ou vert noir	Tanins du type catéchols (tanins condensés)
		Coloration noir bleuâtre	Tanins de type pyrogallols (tanins hydrolysables)

Source : N'GUESSAN, 2009

7.4. Criblage des stéroïdes et terpènoïdes

7.4.1.Principe

Ce sont des réactions de coloration et de fluorescence, et non pas de précipitation. Les tests sont effectués avec des réactifs spécifiques, à savoir les tests LIBERMANN-BURCHARD, SLAKOWSKI, BADJET-KEDDE et le test de KELLER-KILLIANI. [52]

7.4.2.Mode opératoire

L'extrait brut hydroalcoolique sec, équivalent de 5g de plante a été dépigmenté par l'hexane, puis filtrer, puis additionné de 10 ml de CHCl_3 , tout en agitant durant 5 minutes. Après décantation, la solution est desséchée grâce à du sulfate de sodium Na_2SO_4 anhydre et filtrée. Cinq tubes sont à pourvoir, le premier étant toujours le témoin :

Tableau 13 : Les réactifs spécifiques des stéroïdes et terpènoïdes

Tube	Réactifs	Fluorescences	Famille chimique
2 LIEBERMANN BURCHARD	- 3 à 4 gouttes d'anhydride acétique - 3 à 4 gouttes H_2SO_4 concentré	Pourpre	Triterpènoïdes
3 SALKOWSKI	- 3 à 4 gouttes anhydride acétique	Violet ou bleu vert	Stéroïdes
	- 3 à 4 gouttes H_2SO_4 concentré - Inclinaison à 45° - 1 ml de H_2SO_4 concentré	Anneau de séparation rouge	Stérols insaturés
4 BADJET KEDDE	- Quelques grains d'acides picriques	Rouge	Stéroïdes lactoniques
5 KELLER- KILLIANI	- 4 gouttes de $FeCl_3$ 10% - 4 gouttes d'acide acétique glacial	Anneau de séparation rouge pourpre	Désoxy-2-sucre

Source : N'GUESSAN, 2009

7.5. Screening des saponines

7.5.1. Principe

Ce sont des hétérosides à génine stéroïdique ou triterpènoïdique, caractérisés par des propriétés physiques et physiologiques telles que:

- Pouvoir moussant en solution aqueuse.
- Hémolytique
- Toxique pour les animaux à sang froid. [52]

Ainsi, un simple test de mousse permet de savoir si une plante contient ou non des saponines.

7.5.2.Mode opératoire

Une masse de 1 g de poudre de plante est additionnée de 10 ml d'eau distillée dans un tube à essai. Le mélange est agité vigoureusement pendant 30 secondes. Après que le tube soit maintenu au repos verticalement pendant 30 minutes, la hauteur de la mousse restante est mesurée. Si elle est supérieure ou égale à 3cm, la plante contient des saponines.

7.6. Criblage des quinones

7.6.1.Principe

Ce sont des substances oxygénées engendrées par l'oxydation des composés aromatiques et caractérisées par un motif 1,4-dicétocyclohexa-2,5-diène. Une de leurs propriétés est leur facilité de se réduire en hydroquinone. Ils ont également la propriété de changer de couleur par alcalinisation. [54]

7.6.2.Mode opératoire

L'extrait hydroalcoolique de masse 500 mg est repris dans 15ml d'eau distillée, puis filtré. Le filtrat est par la suite extrait avec du benzène, puis ajouté de 2ml de NaOH. Après que les phases se séparent, le changement de la coloration de celle inférieure (alcaline) en rouge violacée affirme que la plante contienne de la quinone.

7.7. Screening des coumarines

7.7.1.Principe

Les coumarines présentent une fluorescence caractéristique lorsqu'elle est directement observée sous lumière UV. [52] [55]

7.7.2.Mode opératoire

Une quantité d'extrait brut éthanolique équivalent à 5g de plante séchée a été mise dans des tubes à essai, puis dissoute dans de l'eau distillée. Dans la partie supérieure du tube est placé un papier imbibé d'une solution aqueuse de NaOH 20% (m/v). Une fluorescence nette de ce papier à la lumière UV indique la présence de coumarines. Cette mise en évidence ne correspond qu'à une indication et non une identification puisque d'autres composés présentent également une fluorescence aux rayons UV.

CHAPITRE 8 : TESTS BIOLOGIQUES

8.1. Tests antimicrobiens

Les essais antimicrobiens ont été effectués sur les extraits bruts éthanoliques, hexaniques, DCM et butanoliques des feuilles, écorces de tige et racines de *Pavonia urens*. Au total, 12 extraits ont été testés.

Pour chaque extrait, les tests ont été opérés selon la méthode de diffusion sur gélose au sein du Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement du Centre National de Recherche sur l'Environnement ou **CNRE** sis à Tsimbazaza.

Les cinq souches sélectionnées sont respectivement :

- deux bactéries à gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*),
- deux bactéries à gram négatif (*Escherichia coli* et *Salmonella enteridis*),
- et une souche levurienne (*Candida albicans*).

8.1.1. Mode opératoire :

La méthode de diffusion sur gélose a été adoptée. Les trois étapes qui ont été suivies, détaillées dans l'annexe 4 sont :

- ❖ La préparation du milieu de culture (inoculum)
- ❖ La Préparation des disques
- ❖ Et l'exécution du test

L'incubation se fait à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 30°C durant 48 à 72 h pour *C. albicans*. Les opérations ont été effectuées en double pour chaque souche, afin d'avoir une meilleure précision sur les résultats.

Des antibiotiques de référence ont été préparés et testés avec les échantillons. Les antibiotiques utilisés ont été l'acide nalidixique et l'acide fusidique.

8.1.2. Appréciation des résultats

Après incubation, le diamètre X représentant la zone d'inhibition du halo est mesuré. Selon des normes assez précises décrites ci-dessous, cette valeur, exprimée en millimètre permet d'évaluer la sensibilité de la souche à l'extrait.

Tableau 14 : Normes pour l'appréciation de la sensibilité des souches

Diamètre d'inhibition (X en mm)	Résultats	Sensibilité des germes
X ≤ 7	-	Non sensibles
7 ≤ X ≤ 8	+	Assez sensibles
8 < X ≤ 9	++	Sensibles
X > 9	+++	Très sensibles

8.2. Tests antiradicalaires

La méthode employée est le test au DDPH. Lors de la manipulation, deux étapes ont été suivies :

- ✿ La première, le test de révélation permet de tester qualitativement la présence ou non de l'activité : l'extrait est migré sur une plaque CCM, puis révélé par du DPPH (Méthode TLC-DPPH).
- ✿ Si le test précédent s'avère positif, la concentration qui réduit la moitié de DPPH (IC50) est déterminée par la méthode spectrophotométrique.

8.2.1. Tests de révélation

Nous avons d'abord travaillé sur les extraits bruts afin de tester préalablement l'activité de chaque partie de la plante.

Pour ce faire, les extraits bruts ont été migrés sur une plaque CCM avec comme système d'éluants le mélange DCM/MeOH/AcOH (94ml ; 6 ml ; 1 goutte). Une fois la plaque sèche, elle est révélée avec une solution méthanolique de DPPH à 0.2%. Le test est dit positif si une ou plusieurs tâches correspondant à des substituants de l'extrait présente des spots jaunes sous fond violet ou pourpre.

Si un extrait brut est actif, ses extraits partagés ont été testés selon la même manière, après avoir défini le meilleur système de solvants donnant la meilleure élution pour chaque extrait.

Ces systèmes d'éluants sont donnés dans ce tableau-ci.

Tableau 15 : Systèmes d'éluants des extraits

EXTRAITS	SYSTEME DE SOLVANTS	PROPORTION
Hexanique	Hexane – Acétate d'éthyle	85/15 (V/V)
DCM	DCM – Acétate d'éthyle – MeOH – Acide acétique	85/10/5 :1goutte (V/V/V + 1 goutte)
Butanolique	DCM – Acétate d'éthyle - Méthanol	85/10/5 (V/V/V)

8.2.2. Quantification de l'activité antiradicalaire

La capacité antioxydante des extraits de plante a été déterminée selon la méthode de KIM et ses collaborateurs. Nous avons opté pour le test au DPPH sur spectrophotométrie. [35]

8.2.2.1. Principe

Le principe est de déterminer la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH•. Pour une série de concentrations, l'absorbance ou densité optique est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS à une longueur d'onde de 517nm.

L'activité antiradicalaire AAR(%) est exprimée en pourcentage de DPPH réduit où l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant est reliée avec l'absorbance du mélange sans aucun antioxydant (solution témoin ou blanc) à un temps t.

$$AAR (\%) = \frac{\text{Absorbance blanc} - \text{Absorbance échantillon}}{\text{Absorbance blanc}} \times 100$$

AAR (%) : Pourcentage d'Activité Antiradicalaire

La concentration d'extrait réduisant 50% de DPPH (**IC50**) est obtenue à partir de la courbe donnant l'AAR en fonction de la concentration d'extrait. [56] [57]

8.2.2.2. Mode opératoire

Pour mieux interpréter les résultats, la valeur de la concentration **IC50** de l'extrait de plante obtenue est comparée à celle obtenue avec l'acide ascorbique, un antioxydant standard. Pour cela, les mesures des AAR(%) de l'acide ascorbique ont précédé celles des AAR(%) de l'extrait à évaluer.

❖ Evaluation du pouvoir antiradicalaire de l'acide ascorbique

L'acide ascorbique est pris comme antioxydant de référence. Il est donc nécessaire de trouver la concentration d'acide ascorbique permettant d'inhiber la moitié de DPPH à 40mg/l. Pour cela, les étapes suivantes ont été suivies:

- L'acide ascorbique subit d'abord une série de dilutions dans du méthanol, afin d'obtenir les concentrations définies dans le tableau 12. Ces dilutions d'effectue à partir d'une solution méthanolique d'acide ascorbique à 20mg/ml, obtenue par ajout de 1mg d'acide ascorbique dans 50 ml de méthanol.
- Pour la préparation de la solution méthanolique de DPPH à 40mg/l de DPPH, 1mg de DPPH a été mis dans 25ml de méthanol.
- Une fois le DPPH à 40mg/l et les solutions méthanoliques de l'acide ascorbiques prêtes, 2ml de chaque solution à doser est alors prélevée, puis mélangée avec 2ml de solution de DPPH. Le mélange ainsi obtenu est agité et laissée incuber à température ambiante (15 à 25°C) durant 30minutes.
- L'étalonnage du spectromètre UV a été effectué à l'aide du méthanol pur (Etalon E) et lecture de la densité optique a été faite à 517 nm. Un blanc correspondant à l'absorbance maximale, et composé de solution de DPPH à 40mg/l a été également lu (Blanc B).

Tableau 12 : Préparation pour l'évaluation du pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique

Solutions	Etalon	Blanc	1	2	3	4	5	6	7
Concentrations (µg/ml)	0,0	0,0	1,5	2	2,5	5	10	15	20
V solution extrait (ml)	4,0	0,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
V DPPH (ml)	0,0	4,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
V total (ml)	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0

❖ **Evaluation du pouvoir antioxydant de l'extrait de la plante :**

Pour évaluer le pouvoir antiradicalaire de l'extrait de la plante, les mêmes étapes que pour l'acide ascorbique ont été suivies.

Pour la préparation des concentrations du tableau 13, 1.6mg d'extrait est d'abord pesé et mis dans 10ml de méthanol, ce qui correspond à une concentration de 160 µg/ml, dénommé solution (a). Puis, 8ml de (a) a été ajoutée de 2 ml de méthanol, afin d'obtenir une concentration de 128 µg/ml. Ensuite, un prélèvement de 4ml de cette dernière a été additionné de 4ml de méthanol afin d'avoir la concentration 64 µg/ml, et ainsi de suite.

Voici le tableau résumant ces diverses valeurs :

Tableau 13 : Préparation pour l'évaluation du pouvoir antioxydant de l'extrait

Solutions	Etalon	Blanc	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Concentrations (µg/ml)	0,0	0,0	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0	24,0	32,0	64,0	128,0
V solution extrait (ml)	4,0	0,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
V DPPH (ml)	0,0	4,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
V total (ml)	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0

CHAPITRE 9 : CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Le but de la chromatographie est d'identifier les familles chimiques des substances responsables des activités biologiques de *Pavonia urens*. Ainsi, seuls les extraits présentant des résultats positifs lors des tests microbiologiques et antiradicalaires sont analysés par CCM.

Les analyses par CCM sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium Silicagel 60 F254, 60/15µm, d'épaisseur égale à 0.2mm et de dimension de 20x20cm. Les cinq étapes détaillées ci-dessous ont été suivies :

9.1. Préparation du système d'éluant

Le système de solvants préparé (mêmes systèmes que ceux utilisés lors des tests antiradicalaires) est versé dans la cuve chromatographique, puis agité. La cuve est ensuite laissée au repos durant 15 à 20 minutes avant l'élution pour qu'elle se sature de solvants. Le volume total du mélange de solvants doit être égal à 20ml selon les proportions.

9.2. Préparation de la plaque chromatographique

A l'aide d'un crayon bien taillé, la ligne théorique correspondant au front de solvant est tracée à 8mm du bord supérieur de la plaque, ainsi que celle du dépôt des échantillons sise à 12mm du bord inférieur de la plaque. Il faut également marquer les centres de dépôts.

Puis, la plaque CCM est activée par chauffage à l'étuve, maintenue à 110°C pendant 30 minutes pour éliminer la trace d'humidité, pouvant nuire à la bonne migration des composés. Après refroidissement, elle est alors prête pour le dépôt de l'échantillon.

9.3. Dépôt de l'échantillon

Pour avoir un bon dépôt, les extraits sont dissous dans leurs solvants d'origine, c'est-à-dire que les extraits hexaniques sont par exemple dilués dans de l'hexane et ainsi de suite. Il est aussi possible de les dissoudre avec des solvants plus polaires.

L'échantillon est alors déposé à l'aide d'une micropipette en verre, maintenue perpendiculairement et avec précaution sur la plaque pour éviter les tâches irrégulières. Les dépôts sont répétés au moins 3 fois au même point de la substance, afin d'assurer une quantité suffisante d'échantillon sans que le diamètre de la tâche ne soit ni trop large, ni trop épaisse. La distance entre deux dépôts doit être au moins égale à 7 mm, et celle par rapport au bord de la plaque est de 8 à 10mm.

La plaque est alors séchée à l'air libre ou à l'aide d'un sèche-cheveux pendant environ 10 minutes pour s'assurer que le solvant de l'échantillon soit totalement évaporé. La plaque ainsi prête va alors subir l'élution.

La figure suivante montre les dimensionnements de la plaque CCM.

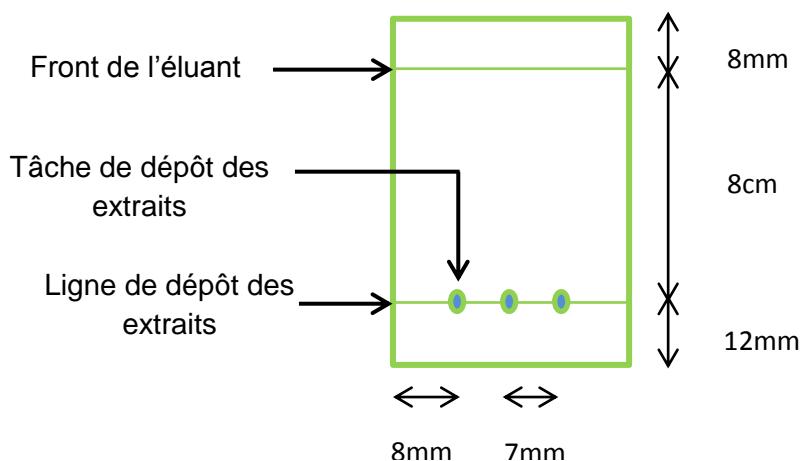


Figure 17 : Schéma d'une Plaque CCM

9.4. Elution

La durée de l'élution varie avec l'affinité de l'extrait avec la silice et le système de solvants utilisé. Techniqueusement, les composés apolaires sont élués en premier et les composés polaires sont assez difficiles à migrer. L'élution peut durer un certain temps, pouvant aller de 30 minutes à 2 heures. Quand le solvant franchit la ligne du front de solvant, la plaque est enlevée de la cuve pour arrêter la migration. La plaque est ensuite laissée à l'air libre pour évaporer le reste de solvant d'élution.

9.5. Révélations

Pour chaque extrait, les résultats obtenus lors des criblages phytochimiques de leur extrait brut ont servi d'indications au choix des révélateurs.

Partie 3 :

Présentation des résultats et

Discussions

CHAPITRE 10 : RESULTATS DES EXTRACTIONS

10.1.Résultat de la macération hydroalcoolique

Dans tout ce qui va suivre, la formule utilisée pour le calcul de rendement est la suivante :

$$r_i = \frac{m_i}{m_0} * 100$$

r_i : rendement de l'extraction i de la partie de la plante extraite

m_i : masse de l'extrait obtenu après l'extraction i

m_0 : masse initiale de la poudre de plante à extraire

Où i varie selon les solvants :

1 : Ethanol-eau

2 : Hexane

3 : DCM

4 : Butanol

Le tableau 16 exprime les résultats d'extraction éthanolique de *Pavonia urens* :

Tableau 16 : Rendements en masse des extractions à l'éthanol

	FEUILLE	TIGE	RACINE
m_0 (g)	100	100	50
V_0 (ml)	3x1000	3x1000	3x500
x_i (g)	7,0	3,5	-
m_1 (g)	6,729	4,114	8,724
r_1 (%)	6,729	4,114	17,448

Où x_i est la masse de charbons actifs nécessaire lors de la déchlorophyllation.

Pavonia urens est une plante très légère et se gonfle considérablement en présence de l'éthanol, notamment la feuille et l'écorce de tige. Ceci est dû à son caractère amplement poilu. Ce qui explique le fait que sa macération dans l'éthanol nécessite beaucoup de solvant. D'où l'obtention du faible rendement, dont 4.114% pour l'écorce de tige et 6.729% pour la feuille.

Malgré cela, un rendement remarquable de l'ordre de 17.448% est quand même noté pour la racine.



Figure 18 : Photos d'un ballon contenant l'extrait brut de l'écorce de tige de *Pavonia urens*

10.2.Extraction par solvant

Le partage, selon le protocole de la figure 16, a donné les masses **m** des extraits et les rendements des extractions **r** par rapport à la plante macérée consignés ci-dessus :

Tableau 17: Rendements en masse des partages liquide-liquide

EXTRAITS	FEUILLE		TIGE		RACINE	
	m	r	m	r	m	r
Masse de la matière végétale extraite (m_o)	100	-	100	-	25	-
Extrait EtOH	6,729	-	4,114	-	4,362	-
Extrait Hexanique	0,351	0,351	0,511	0,511	0,746	2,984
Extrait DCM	1,494	1,494	0,279	0,279	0,307	1,228
Extrait BuOH	0,975	0,975	1,270	1,270	0,819	3,276

Pour la feuille, 100g de plante sèche a donné respectivement 0,351% d'extrait hexanique, 1.494% d'extrait DCM et 0,975% d'extrait butanolique. Ces rendements sont plutôt faibles. Ce commentaire est également valable pour l'écorce de tige, qui n'a donné respectivement que 0,511%, 0,279% et 1,270% d'extraits partagés.

Par ailleurs, le résultat est plus satisfaisant pour la racine avec, respectivement 2,984%, 1,228% et 3,276% d'extraits par partage avec les solvants organiques.

CHAPITRE 11 : RESULTATS DES CRIBLAGES PHYTOCHIMIQUES

Dans tous les résultats du tableau, les notations suivantes seront considérées pour les appréciations de présence de substances chimiques lors des criblages phytochimiques :

- : Test négatif
- + : Faible présence
- ++ : Présence moyenne
- +++ : Présence abondante

11.1.Criblage des alcaloïdes

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-après.

Tableau 18 : Résultats obtenus lors des screening des alcaloïdes

Partie de la plante	F	T	R
Tube 1 (Mayer)	-	-	-
Tube 2 (Wagner)	-	-	-
Tube 3 (Draggendorf)	-	-	-

D'après ces résultats obtenus après macération chlorhydrique de la poudre de plante, il est clair que la plante en question est dépourvue d'alcaloïdes.

11.2.Criblage des flavonoïdes et leucoanthocyanes

Tableau 19 : Résultats obtenus lors des screening des flavonoïdes et anthocyanes

Tests	Tubes	Colorations	Classe chimique	F	T	R
WILLSTATER	2	Rouge	Flavones	-	-	+++
		Rouge à rouge pourpre	Flavonols	-	-	-
		Rouge violacée	Flavanones et Flavanols	-	-	-
WILLSTATER MODIFIE	3	Rouge	Flavones	-	-	+++
		Pourpre	Flavonols	-	-	-
BATH-SMITH	4	Rouge violacée	Leucoanthocyanes	++	+	+++
	5	Rouge	Anthocyanes	-	-	++

Lors du screening des flavonoïdes, la présence de flavone dans la racine a été deux fois prouvée par les deux tests de Wilstater, donnant une couleur rouge en milieu chlorhydrique et en présence de Mg. Les images suivantes prises lors de la manipulation indiquent ces résultats : le premier tube est le témoin et le second correspond aux extraits de la racine.



Figure 19 : Criblage des flavonoïdes

Source : Cliché de l'auteur, 2014

Nous pouvons aussi constater que la plante entière, notamment la racine contient des leucoanthocyanes. Cependant, selon le test de BATH-SMITH, seule cette partie de la plante renferme des anthocyanes, comme résumé dans ce tableau-même.

11.3.Tanins et polyphénols

Voici les résultats obtenus lors du criblage.

Tableau 20 : Résultats du criblage des tanins et polyphénols

Tubes	Observations	Classes chimiques	T	F	R
2	Précipités	Polyphénols	-	-	+++
3		Tanins	-	-	+++
4	Bleu-vert	Tanins condensés	+++	++	+++
	Noir bleuâtre	Tanins hydrolysables	-	-	-

Lors de la détection des tanins et polyphénols, seule la racine a donné un test positif avec l'apparition d'un précipité en présence de gélatine, comme vu sur la figure qui suit.



Figure 20 : Criblage de tanins et polyphénols

Source : Cliché de l'auteur, 2014

Par contre, la feuille et l'écorce de tige, comme la racine changent de coloration en bleu vert par ajout de FeCl_3 . Ceci implique que les feuilles et les écorces de tige, avec une réaction négative à la gélatine salée renferment d'autres types de composés phénoliques autres que les tanins. Et de son côté, la réaction positive à la fois avec FeCl_3 et la gélatine salée prouvent que la racine présente bien des tanins condensés.

11.4.Criblage des stéroïdes et terpènoïdes

Les conclusions consignées dans le tableau 21 qui suit ont été obtenus:

Tableau 21 : Résultats du criblage des stéroïdes et terpènoïdes

Tube	Fluorescences	Familles chimiques	F	T	R
2	Pourpre	Triterpènoïdes	-	-	-
3	Violet ou bleu vert	Stéroïdes	-	-	-
	Rouge	Stérols insaturés	+++	++	++
4	Rouge	Stéroïdes lactoniques	-	-	-
5	Rouge pourpre	Désoxy-2-sucre	-	-	-

En se référant à ces résultats, la plante est dépourvue de stéroïdes, ainsi que de triterpènoïdes. Cependant, toutes ses parties renferment des stérols insaturés.



Figure 21 : Criblage des stéroïdes et terpènoïdes

Source : Cliché de l'auteur, 2014

11.5.Screening des saponines

Le criblage des saponines a donné des résultats négatifs : aucune mousse n'a été observée pour les trois parties de la plante. Ceci dit que *Pavonia urens* est donc dépourvue de ces composés.

11.6.Criblage des quinones

L'apparition de la couleur rouge violacée pour l'extrait de la racine dans la phase ammoniacale déduit la présence de quinone. Lors de la manipulation, ce changement de couleur n'a été observé que pour la racine.

Tableau 22 : Résultats du criblage des quinones

QUINONES			
Observations	F	T	R
Rouge violacée	-	-	++

Voici une image, prise lors de la manipulation pouvant illustrer ce résultat, où le premier tube est le témoin, et le second est celui contenant la racine.



Figure 22: Criblage des quinones

Source : Cliché de l'auteur, 2014

11.7.Screening des coumarines

Lors du criblage des coumarines, les résultats sont consignés dans le tableau 23 ci-dessus :

Tableau 23 : Résultats du criblage des coumarines

COUMARINES			
Fluorescence bleue violet en UV 365 nm	F	T	R
	++	+	++

Sous la lampe UV à la longueur d'onde 365 nm, nous avons pu observer des fluorescences bleues considérables pour la feuille et la racine, comme montrée sur la figure qui va suivre. Pour la tige, la couleur n'est pas assez marquée.

Avec ces résultats, il est possible de dire que ces deux parties de la plante renferment peut-être de la coumarine. Mais il est à noter que d'autres composés présentent également des fluorescences en UV 365nm.

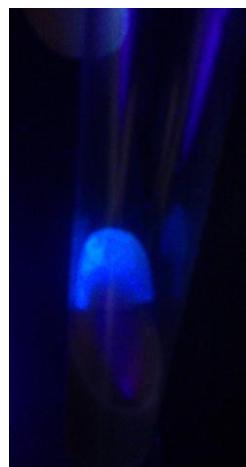


Figure 23: Criblage des coumarines

Source : Cliché de l'auteur, 2014

11.8.Récapitulation des résultats du criblage

En guise de résumé des résultats énumérés précédemment, le tableau qui ci-dessous va donner les diverses classes chimiques contenues dans chaque partie de la plante.

Tableau 24 : Récapitulatif des résultats des criblages

FAMILLES CHIMIQUES	F	T	R
Flavone	-	-	+++
Anthocyanes	-	-	+++
Leucoanthocyanes	-	-	+++
Polyphénols	-	-	+++
Tanins	-	-	+++
Autres composés phénoliques	+++	++	-
Stérols insaturés	+++	++	++
Quinones	-	-	++
Coumarine	++	+	++

Du point de vue chimie, la racine est donc la partie la plus riche de la plante en matière de substances naturelles. Ce résultat confirme les rendements obtenu lors du partage.

CHAPITRE 12 : RESULTATS DES TESTS BIOLOGIQUES

12.1. Tests antimicrobiens

Lors des tests microbiologiques effectués au sein du CNRE, selon la méthode de diffusion sur gélose, les diamètres des halos d'inhibition (en millimètres) sont énumérés ci-dessus :

Tableau 25 : Résultats des tests antimicrobiens

Germes testés	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enteridis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Bacillus cereus</i>
F(EtOH)	6	6	6	6	6
F(Hex)	7	6	6	6	6
F(DCM)	6	6	6	6	6
F(BuOH)	6	6	6	6	6
T(EtOH)	8	6	6	6	6
T(Hex)	6	6	6	6	6
T(DCM)	8	6	6	6	6
RBuOH)	6	6	6	6	6
R(EtOH)	6	6	6	6	6
R(Hex)	6	6	6	6	7
R(DCM)	6	6	6	6	6
R(BuOH)	6	6	6	6	6

D'après ce tableau, et en comparant avec les normes d'évaluation du tableau 10, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- Les germes *Escherichia coli*, *Salmonella enteridis* et *Candida albicans*, de même que *Bacillus cereus* sont résistants aux extraits de *Pavonia urens*.
- Quant au *Staphylococcus aureus*, l'extrait dichlorométhane de la plante est plus ou moins actif à ce germe responsable de plaies et infections cutanées suppuratives diverses. Néanmoins cette valeur reste insignifiante pour une activité.

Comparé aux hypothèses données lors des recherches bibliographiques, notre plante n'est pas assez active vis-à-vis des germes testés. La diversité climatique et géographique entre les lieux de récolte peut être à l'origine de ces résultats, pouvant impliquer une différence de compositions chimiques sur une même plante : la *chimintaxonomie*. Mais aussi, ces résultats peuvent être dus aux méthodes d'extraction et de conservation de nos extraits, ou à d'éventuelles erreurs de manipulations lors de l'exécution des tests.

12.2.Résultats des tests antiradicalaires

12.2.1. Test de révélation

12.2.2. Sur les extraits bruts

Après avoir révélé les plaques CCM des extraits brut par du DPPH, les résultats suivants ont été obtenus.

Tableau 26 : Résultats des tests antiradicalaires sur les extraits bruts

Partie de la plante	Nombre de spots jaunes	Capacité antioxydante
Feuille	3	++
Tige	3 et trainée	++
Racine	4 et trainée	+++

Avec le système d'éluants employé, les résultats ont été presque les mêmes pour les trois parties de la plante. Tous ont présentés des spots jaunes:

- ✿ au dépôt : des substances actives très polaires n'ont pas migré, ces substances sont sûrement présentes dans l'extrait butanolique.
- ✿ presque sur le front du solvant : ce sont des composés apolaires ou moyennement polaire, présentant une activité marquée, et peuvent se trouver dans les extraits DCM ou hexaniques.
- ✿ D'autres spots, ainsi que des trainées jaunes ont été également vus.

Cependant, les couleurs sont particulièrement marquées pour la racine. Cela confirme que la plante entière est dotée d'un pouvoir antioxydant, surtout la racine.



Figure 24: Plaques CCN des extraits éthanoliques, révélées avec le DPPH

Source : Cliché de l'auteur, 2014

Système d'éluants : DCM/MeOH/AcOH (94ml ; 6 ml ; 1 goutte)

12.2.3. Sur les extraits actifs partagés

Une fois confirmé que la plante présente une activité antiradicalaire, les extraits partagés sont alors testés à leurs tours avec les systèmes d'éluants définis dans le Tableau 11. Les tests ont donné les résultats ci-après :

Tableau 27 : Résultats des tests antiradicalaires sur les extraits partagés

Extraits		Nombre de spots jaunes (Actifs)	Potentiel antioxydante
Hexaniques	F	1	+
	T	1	+
	R	3	+++
DCM	F	1	+
	T	1 et trainée	++
	R	3 et trainée	+++
BuOH	F	Trainée	++
	T	Trainée	+++
	R	Trainée	+++

- o **Extraits hexaniques**

La feuille et la tige ont des extraits hexaniques presque indemnes au DPPH. Nous remarquons seulement une tâche de très faible couleur jaune n'ayant pas migré à la ligne de dépôt.

Par contre, la racine présente trois spots jaunes très distincts, l'un à $R_f=0$ et les deux autres respectivement aux rapports frontaux $R_f=0,16$ et à $R_f=0,56$.

o Extraits DCM

La tige est plus active que précédemment, avec une tâche vive jaune au dépôt, et une trainée jaune jusqu'au milieu de la plaque. Quant à l'extrait de feuille, le résultat est presque le même que celui de l'extrait hexanique, avec seulement une faible tâche à la ligne de dépôt.

L'extrait DCM de la racine, par ailleurs, dispose d'une plus forte capacité antioxydante, comparé à son extrait hexanique. Ceci est logique car l'extrait DCM est normalement riche en composés plus polaires, et renferme probablement des composés phénoliques et flavonoïdiques, qui sont généralement des antioxydants, comme énoncé dans la partie bibliographique : deux spots jaunes très vifs sont visibles, l'un à la ligne de dépôt, l'autre à $R_f=0,43$, et un autre moins marqué à $R_f=0,80$, avec des trainées jaunes se trouvant entre eux.

o Extraits BuOH

Des trainés jaunes intenses migrent tout au long de la plaque pour les trois dépôts. Ceci confirme que les extraits butanoliques sont tous très riches en molécules antiradicalaires. Ces constituants étant très polaires et nombreux, il nous a été très difficile de les séparer malgré les différents essais pour un meilleur système d'éluants.

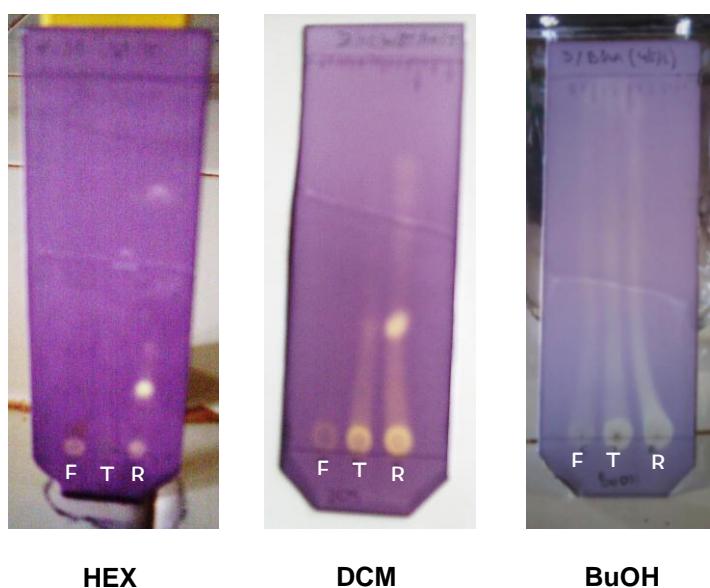


Figure 25 : Plaques CCM des extraits hexaniques, DCM et BuOH révélées avec le DPPH

12.2.4. Quantification de l'activité antiradicalaire

Pour une meilleure évaluation, l'activité antiradicalaire de *Pavonia urens* a été comparée à celle de l'acide ascorbique, dans les mêmes conditions opératoires.

12.2.4.1. Evaluation de l'activité de l'acide ascorbique :

Après lecture au spectrophotomètre à 517nm, et en appliquant la formule de l'activité antiradicalaire AAR (%), les résultats obtenus lors de la quantification de l'activité antiradicalaire de l'acide ascorbique sont énumérés dans le tableau 28 :

$$\text{AAR (\%)} = \frac{\text{Absorbance blanc} - \text{Absorbance échantillon}}{\text{Absorbance blanc}} \times 100$$

AAR (%) : Activité antiradicalaire de l'échantillon

Absorbance blanc : Absorbance maximale, correspondant à celle de la solution de DPPH à 40mg/l.

Tableau 28 : Pourcentage de DPPH réduit (AAR) en fonction de la concentration - Acide ascorbique

Solutions	E	B	1	2	3	4	5	6	7
Concentrations (µg/ml)	0	0	1,5	2	2,5	5	10	15	20
Absorbance	0,000	0,193	0,111	0,100	0,093	0,086	0,065	0,048	0,025
AAR (%)	-	-	42,61	48,72	51,62	56,10	66,58	75,28	98,78

E : Etalon – Méthanol pur

B : Blanc – Solution méthanolique de DPPH à 40mg/l

Voici la courbe, donnant les diverses valeurs de l'activité antiradicalaire AAR(%) de l'acide ascorbique, en pourcentage du DPPH réduit, en fonction de ses concentrations :

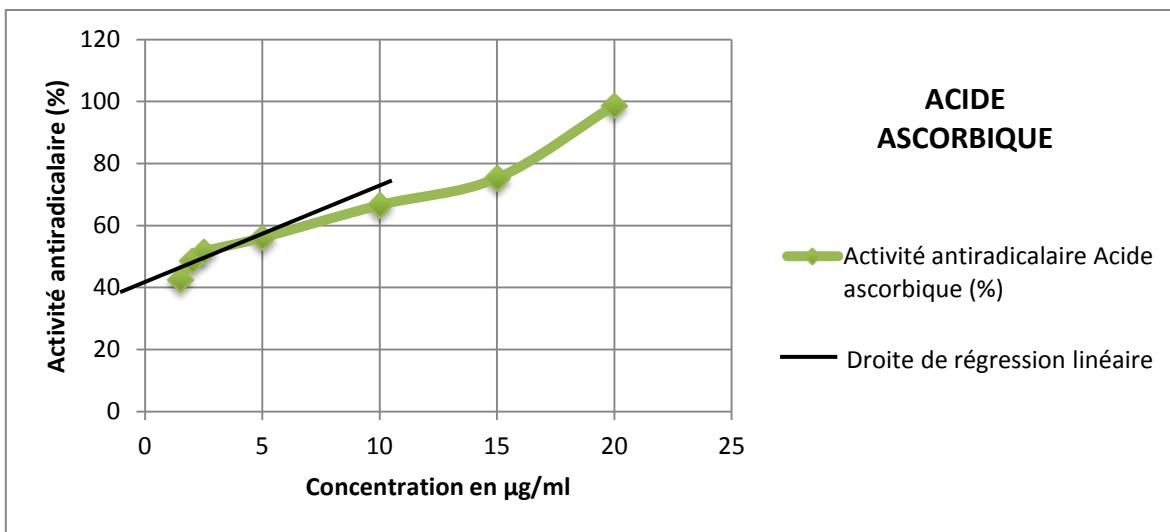


Figure 26 : Courbe d'AAR (%) en fonction des concentrations – Acide ascorbique

En appliquant la méthode des moindres carrés, l'équation de la droite de régression linéaire est :

$$y = 3,24 \times + 40,84$$

La valeur correspondant à IC50, c'est-à-dire $Y=50$ est donc :

$$\boxed{\text{IC50} = 2,82 \mu\text{g}/\text{ml}}$$

12.2.4.2. Evaluation de l'activité de l'extrait brut de la racine

A la même longueur d'onde, avec la même concentration de DPPH et les mêmes conditions opératoires, les résultats décrits dans le tableau 29 ont été obtenus:

Tableau 29 : Pourcentage de DPPH réduit (AAR) en fonction de la concentration - Extrait brut de racine

Solutions	E	B	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Concentration s ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0	0	1	2	4	8	16	24	32	64	128
Absorbance	0,0000	0,1956	0,1113	0,1052	0,0958	0,0785	0,0492	0,0263	0,0191	0,0072	0,0036
AAR (%)	-	-	43,11	46,22	51,04	59,87	74,86	86,56	90,25	96,31	98,14

E : Etalon – Méthanol pur

B : Blanc – Solution méthanolique de DPPH à 40mg/l

Ce tableau montre une activité croissante de l'activité antiradicalaire de la solution : pour une même durée d'incubation, le pourcentage de DPPH réduit (AAR) est fonction croissante de la concentration, jusqu'à un seuil à laquelle la totalité du DPPH est presque réduite. Cette valeur est dans les environs de 128µg/ml.

La concentration réduisant la moitié de DPPH IC50 est comprise entre 2 et 4µg/ml, et une concentration d'environ 128µg/ml permet de le réduire en totalité. En tenant uniquement compte de ces valeurs, nous pouvons alors dire que la racine de *Pavonia urens* dispose d'un fort potentiel antioxydant car, même à très faible concentration, son activité est marquée.

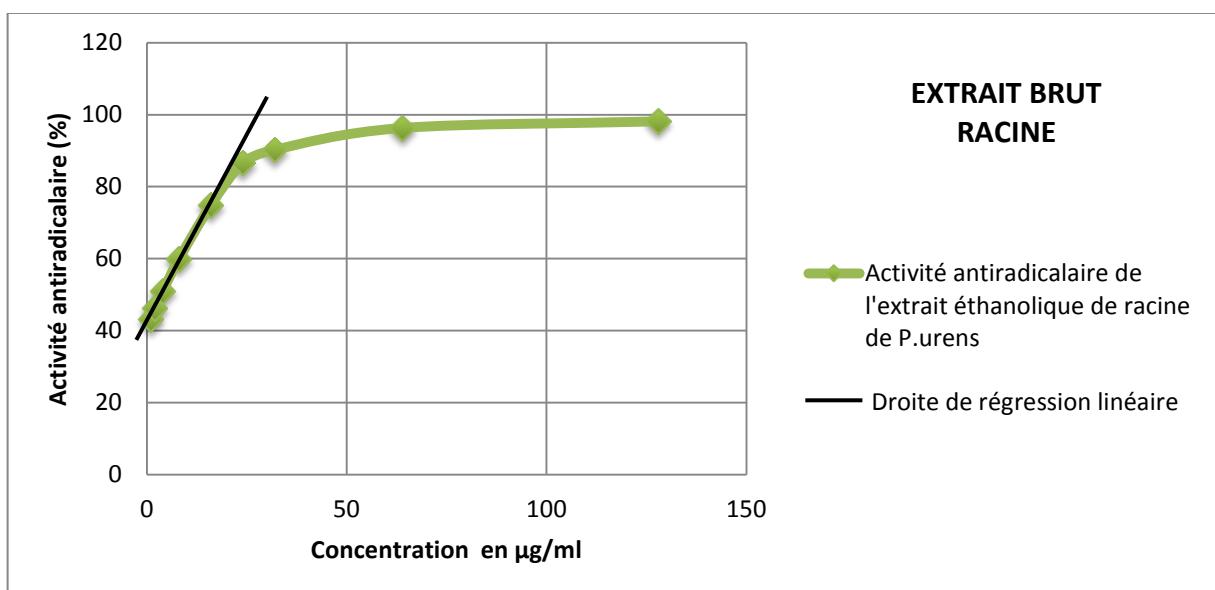


Figure 27 : Courbe d'AAR (%) en fonction des concentrations - Extrait brut de la racine

L'équation de cette droite de régression linéaire étant la suivante :

$$y = 2,27 x + 41,81$$

En appliquant la méthode des moindres carrées, la valeur de la concentration inhibitrice IC50 est donc :

$$\boxed{IC50 = 3,62 \mu\text{g/ml}}$$

La valeur de la concentration qui inhibe la moitié de DPPH étant très faible pour l'extrait testé, ce résultat démontre donc le fort pouvoir antiradicalaire de l'extrait brut de la racine de *Pavonia urens*. Comparativement à la valeur obtenue pour l'acide ascorbique, considéré comme antioxydant de référence, qui est de 2,82 µg/ml, nous pouvons justifier l'importance de l'activité antiradicalaire de la racine de la plante.

CHAPITRE 13 : RESULTATS DES CHROMATOGRAPHIES SUR COUCHE MINCE

Le but étant de déterminer les familles chimiques des substances présentant des résultats positifs lors des tests biologiques, les extraits hexaniques et DCM de la racine, présentant des fort potentiels antiradicalaires ont été choisi pour les diverses analyses par CCM.

Les systèmes d'éluants sont ceux déjà utilisés lors des tests antioxydants:

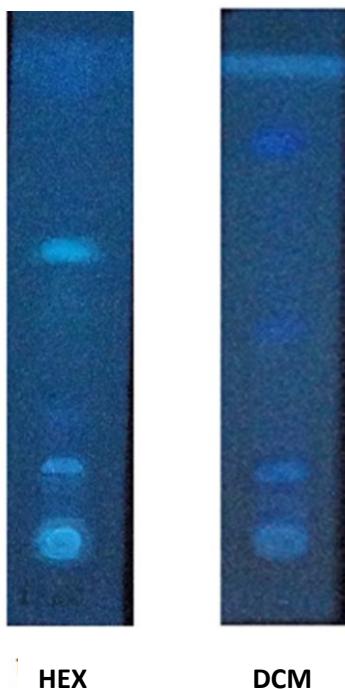
- Extrait hexanique : Hex/AcOEt 80 :20 (V/V)
- Extrait DCM : DCM/AcOEt/MeOH/AcOH 85/10/5 :1goutte (V/V/V + 1 goutte)

13.1. Visualisation directe sous UV 365nm

Certaines substances peuvent être directement identifiées en visualisant la plaque CCM sous la lumière UV à la longueur d'onde 365nm. Les résultats, pour les deux extraits sont consignés ci-dessous :

- Sous UV 365nm, trois tâches distinctes ont pu être observées sur la plaque de l'extrait hexanique :
 - La première, restant non migrée à la ligne de dépôt, de couleur jaune, peut correspondre à un flavonol ou une coumarine.
 - De même, une autre tâche jaune à $R_f=0.15$ peut aussi appartenir aux classes chimiques citées précédemment.
 - Une dernière tâche jaune vert a également été observée à $R_f=0.56$, et peut s'agir d'une coumarine.
- Pour l'extrait DCM, quatre tâches ont été détecté, dont une tâche jaune à la ligne de dépôt (pouvant être une coumarine, un flavonol ou un aurone), et trois autres bleues aux rapports frontaux respectifs 0,12 ; 0,40 et 0,78 (correspondant à des coumarines ou flavones méthylés).

Les figures ci-dessous montrent les plaques CCM des deux extraits, directement vues sous lumière UV à 365nm.



**Figure 28 : Plaques CCM des extraits hexanique et DCM de PU,
observés sous UV 365nm**

Révélation : UV 365 nm

13.2.Révélation par la vapeur d'ammoniac

La vapeur, dégagée par une solution à 25% de NH₄OH permet de révéler les coumarines des extraits :

- L'extrait hexanique présente deux tâches :
 - l'une, présente à la ligne de dépôt est de couleur jaune dans le visible et marron lorsque la plaque est visualisée sous UV 365nm. Il s'agit probablement d'un pigment.
 - et l'autre tâche, à Rf=0,56 est jaune à la fois dans le visible et sous la lumière UV à 365 nm. Elle peut correspondre à une coumarine.
- Pour l'extrait DCM, cinq tâches ont été observées.

13.3. Révélation avec KOH

Pour s'assurer du résultat obtenu par la vapeur d'ammoniac, la plaque a été giclée par une solution méthanolique de KOH à 7% :

- L'extrait hexanique a montré deux tâches, aux mêmes rapports frontaux que précédemment.
- De même, les cinq tâches ont été également remarquées pour l'extrait DCM, et correspondent donc à des coumarines.

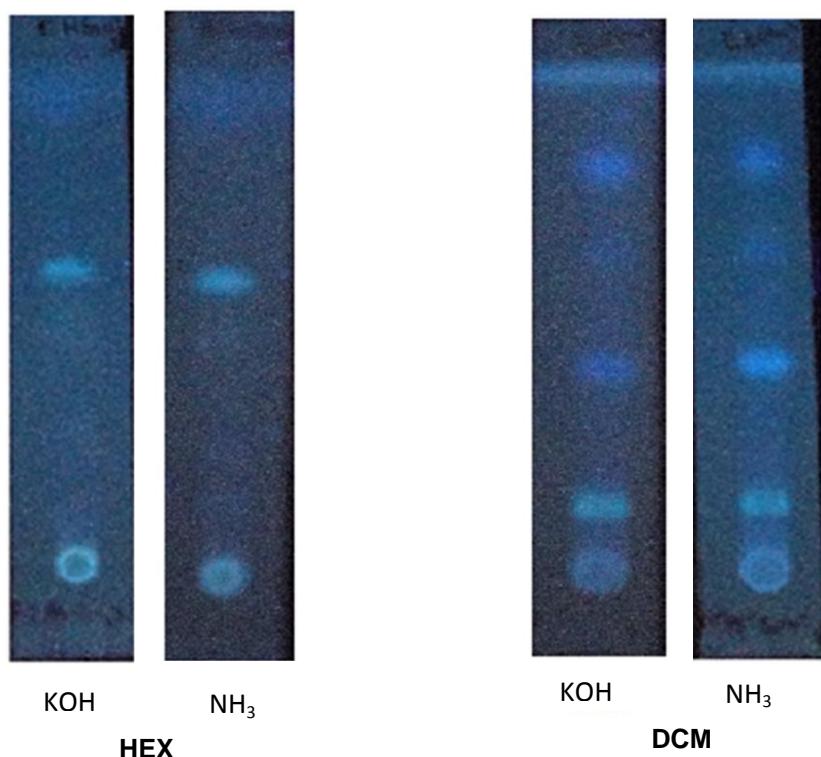


Figure 29: Plaques CCM des extraits hexaniques et DCM
Révélateurs : KOH et vapeur d'ammoniac

En comparant les deux résultats issus des deux réactifs KOH et NH₃, il est fort possible que les extraits hexanique et DCM contiennent des coumarines.

13.4. Révélation avec AlCl_3

La révélation des flavonoïdes est faite par pulvérisation des plaques avec AlCl_3 1% dans EtOH absolu.

Pour les deux extraits, aucune transformation n'a été observable à l'œil nu. Ceci est probablement dû à la faiblesse des dépôts. Mais sous UV 365nm, les couleurs des tâches ont été très marquées :

- Pour l'extrait hexanique, une tâche verte à $R_f=0,61$ et une autre jaune (à la ligne de dépôt) sont observées : il s'agit éventuellement de deux flavonoïdes
- Pour l'extrait DCM, trois tâches sont remarquées, deux tâches bleues respectivement aux $R_f=0,15$ et $0,80$, et une verte au dépôt. Elles peuvent correspondre également à des flavonoïdes.

Voici les images des plaques, prises lors de la manipulation :

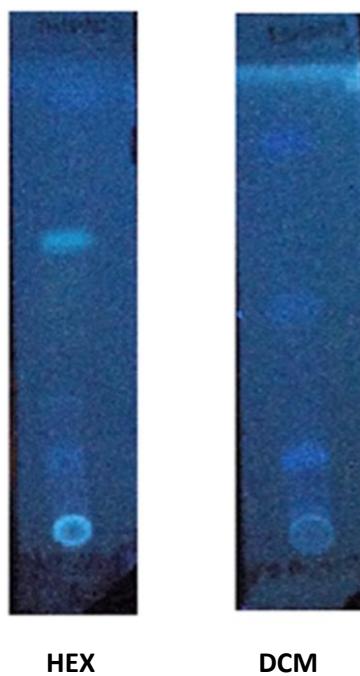


Figure 30: Plaques CCM des extraits hexaniques et DCM

Révélation : AlCl_3 1% dans EtOH absolu

13.5.Révélation avec FeCl₃ 2%

Ce réactif est spécifique aux tanins et les polyphénols.

Les plaques CCM des extraits hexaniques et DCM n'ont montré aucun changement après être giclées par FeCl₃. Ceci dit que ces extraits ne présentent ni tanins ni d'autres polyphénols.

13.6.Réactif de LIEBERMANN-BURCHARD

Le réactif de LIEBERMANN-BURCHARD, fraîchement préparé permet de révéler les stéroïdes et les triterpènes. Après giclage des plaques par ce réactif, puis chauffage à 110°C durant 10 minutes, les changements suivants ont pu être observés :

- Pour l'extrait hexanique, plusieurs tâches ont été visualisées. Cet extrait est sûrement riche en composés terpéniques :
 - Trois tâches intenses, de couleurs oranges pourraient s'agir de triterpènes de type lupane, respectivement aux rapports frontaux : Rf=0 ; Rf=0,35 et Rf=0,98.
 - Une tâche verte à 0.65 peut correspondre à un stéroïde.
 - Et une tâche bleue à Rf=0,56 peut s'agir d'un pigment.
- Par ailleurs, à la même longueur d'onde, l'extrait DCM présente :
 - une tâche orange à Rf=0,97, qui peut s'agir d'un triterpène
 - et deux tâches bleues sont également visibles sur la plaque, mais ces composés ne sont pas identifiables.

Les images ci-après représentent les photos des chromatogrammes des extraits hexanique et DCM de l'extrait brut de la racine, après pulvérisation du réactif de LIEBERMANN-BURCHARD et observé à UV 365 nm :

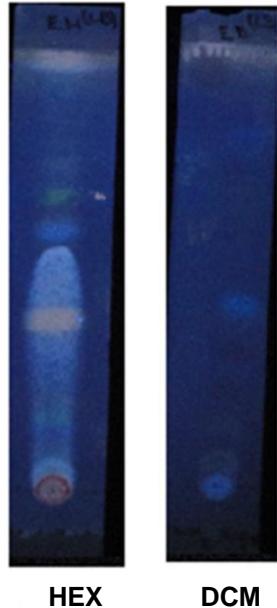


Figure 31: Plaques CCM des extraits hexaniques et DCM

Révélation : Réactif de LIEBERMANN-BURCHARD

13.7.Récapitulation des résultats

Le tableau suivant résume les résultats obtenus lors de la chromatographie sur couche mince, avec les valeurs respectifs des rétentions frontales, les couleurs des composés après révélation, ainsi que les natures possibles des composés.

Tableau 30 : Récapitulatif des résultats de CCM

Visualisation directe sous UV 365 nm			
	Rf	Couleurs	Composés possibles
Extrait hexanique	0,00	Jaune	Coumarine ou flavonol
	0,15	Jaune	Coumarine ou flavonol
	0,56	Jaune vert	Coumarine
Extrait DCM	0,02	Jaune	Coumarine ou flavonol ou aurone
	0,12	Bleu-jaune	Coumarine ou flavone méthylé
	0,40	Bleu-jaune	Coumarine ou flavone méthylé
	0,78	Bleu violacée	Coumarine ou flavone méthylé
Révélation avec AlCl_3 1% dans EtOH absolu (Visualisation sous UV 365 nm)			
	Rf	Couleurs	Composés possibles
Extrait hexanique	0,00	Jaune	Flavonoïde
	0,61	Vert	Flavonoïde
DCM	0,00	Jaune	Flavonoïde
	0,15	Bleu	Flavonoïde
	0,78	Bleu	Flavonoïde

Révélation avec KOH 7% dans MeOH (Visualisation sous UV 365 nm)			
	Rf	Couleurs	Composés possibles
Hexanique	0,00	Jaune	Pigment
	0,56	Vert	Coumarine
DCM	0,00	Jaune-vert	Coumarine
	0,13	Jaune	Non identifié
	0,38	Bleu	Coumarine
	0,80	Bleu	Coumarine
	0,95	Vert	Coumarine
Révélation avec le réactif de LIEBERMANN-BURCHARD (Visualisation sous UV 365 nm)			
	Rf	Couleurs	Composés possibles
Hexanique	0,00	Orange	Triterpène (lupane)
	0,35	Orange	Triterpène (lupane)
	0,56	Bleu	Pigment
	0,65	Vert	Stéroïde
	0,98	Orange	Triterpène (lupane)
DCM	0,00	Bleu	Non identifié
	0,41	Bleu	Non identifié
	0,97	Orange	Triterpène (lupane)

CHAPITRE 14 : IDENTIFICATION DES FAMILLES CHIMIQUES DES SUBSTANCES ANTIOXYDANTES

Extrait hexanique :

Tableau 31 : Identification des familles des substances actives des extraits hexanique et DCM

EXTRAIT HEXANIQUE		
Numérotation (figure 32)	Rf	Composés possibles
H1	0,00	Flavonol
H2	0,16	Flavonol
H3	0,56	Coumarine

EXTRAIT DCM		
Numérotation (figure 33)	Rf	Composés possibles
D1	0,02	Coumarine et/ou flavonol (Plusieurs composés qui n'ont pas migrés)
D2	0,13	Flavone méthylé
D3	0,40	Coumarine
D4	0,78	Flavone méthylé

D'une manière générale, les composés flavonoïdiques, plus précisément les flavonols (**H1** et **H2**) et les flavones méthylés (**D2** et **D4**), ainsi que les coumarines (**H3** et **D3**) sont responsables des activités antiradicalaires de l'extrait hexanique de la racine de *Pavonia urens*.

A la ligne de dépôt de la plaque CCM de l'extrait hexanique, la tâche **H1** est révélée à la fois par AlCl_3 (spécifiques aux flavonoïdes) et par KOH (pour les coumarines). Il est probable que deux ou plusieurs substances n'ont pas migré, les uns étant des flavonoïdes et les autres, des coumarines, tous pouvant contribuer à l'activité antiradicalaire de l'extrait.

Ces résultats concordent bien avec les données bibliographiques concernant les flavonoïdes, des composés reconnus être de très bons antioxydants. Pour les coumarines, les substituants du cycle benzopyrone sont sûrement à l'origine de ceux-là.

Voici les compilations des chromatogrammes pour les deux extraits :

Extrait hexanique :

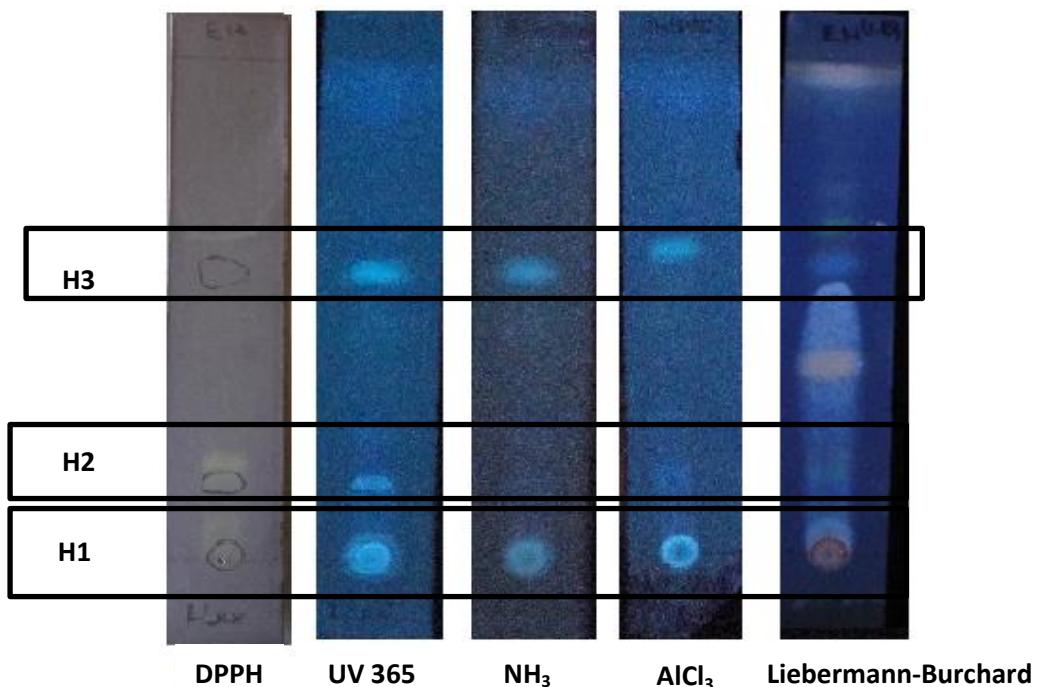


Figure 32 : Compilation des chromatogrammes de l'extrait hexanique de la racine de P.U.

Système éluant : Hex/AcOEt (80 :20)

Extrait DCM :

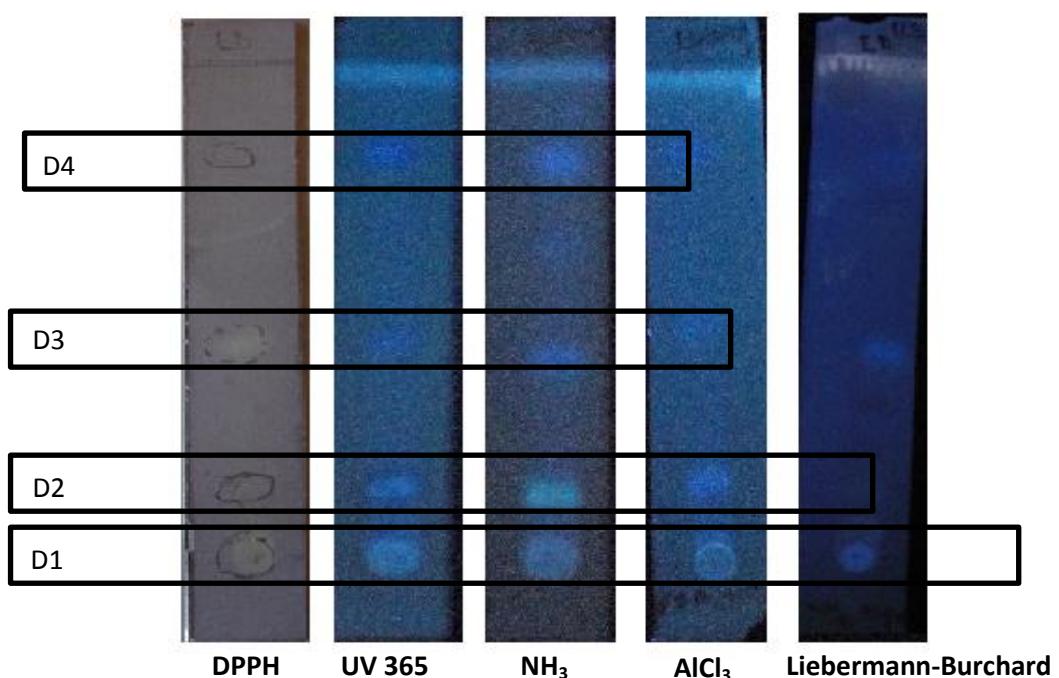


Figure 33 : Compilation des chromatogrammes de l'extrait DCM de la racine de P.U.

Système éluant : DCM/AcOEt/MeOH/AcOH (85 : 10 : 5 + 1goutte)

Conclusion

Et

Perspectives

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

Les travaux réalisés dans ce mémoire ont porté sur la contribution à l'étude des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes du *Pavonia urens* de Madagascar:

La plante *Pavonia urens* appartient à la famille des MALVACEAE. Les recherches bibliographiques et études antérieures ont abouti à ces hypothèses :

- ♣ Cette plante est couramment utilisée en Afrique, comme à Madagascar pour soigner les infections cutanées et plaies suppuratives, comme d'autres maladies.
- ♣ Des recherches effectuées en Tanzanie ont démontré que ses extraits méthanoliques et acétate d'éthyle détiennent un fort pouvoir antimicrobien vis-à-vis des souches testées : *Pseudomonas syringue*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans*.

En premier lieu, différents extraits de la plante ont été obtenu par macération hydro-éthanolique de poudres sèches de feuilles, écorces de tige et racines de la plante suivie de partages liquide /liquide au moyen de solvants non miscibles des extraits obtenus.

A l'issue des criblages phytochimiques sur les extraits éthanoliques ou sur les parties de la plante sèche pulvérisée, la présence de plusieurs familles chimiques a été mise en évidence, à savoir les flavonoïdes, les tanins condensés, les coumarines et les stérols insaturés. Ces derniers sont tous dotés de propriétés pharmacologiques spécifiques, et pouvant être à l'origine des vertus biologiques que possède la plante.

En deuxième étape, à partir des indications de résultats biologiques de *Pavonia urens* de Tanzanie, nous avons réalisé des tests biologiques d'extraits de cette espèce récoltée à Manjakandriana sur cinq germes dont *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteridis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* et *Candida albicans*. Cependant, les résultats de nos tests ont pratiquement donné des résultats négatifs sur toutes ces souches. Ces faits démontrent que l'espèce *Pavonia urens* poussant à Manjakandriana paraît ne pas détenir d'activité antimicrobienne. La différence des

constituants chimiques, due à la diversité climatique et géographique de Madagascar et de Tanzanie pourrait en être la cause. Mais également, ces résultats peuvent être dus aux méthodes d'extraction ou de conservation de nos extraits.

En troisième lieu, comme cette plante est réputée traditionnellement cicatriser les plaies infectées, nous avons mené des essais de détermination de ses pouvoirs antioxydants. En effet, les tests TLC-DPPH que nous avons réalisé ont montré que toutes les parties de *Pavonia urens*, et particulièrement la racine sont de très bons piègeurs de radicaux libres. La quantification de l'activité antioxydante d'extrait brut éthanolique de racine par la méthode de mesure spectrophotométrique, à la longueur d'onde 517 nm, nous ont permis de trouver que sa concentration inhibitrice IC₅₀ réduisant la moitié de DPPH est très proche de celle que nous avons mesuré sur l'acide ascorbique (antioxydant de référence). Nous concluons donc que l'extrait brut éthanolique de la racine de *Pavonia urens* détient d'un fort pouvoir antioxydant qui favorise donc la protection et la cicatrisation de la peau.

L'analyse CCM des différents extraits partagés de racine de *P. urens* nous a amené à dire que la capacité antioxydante des extraits hexaniques et DCM de la racine sont en très grande partie due à des coumarines et des flavonoïdes, même si certaines substances actives n'ont pas pu être déterminées.

Ces résultats étant préliminaires, la suite logique de ce travail est de poursuivre les investigations sur la plante en se focalisant sur les extraits de la racine. Ainsi, des travaux d'isolement et de purification, ainsi que des travaux d'identification structurale sont nécessaires afin de connaître les molécules réellement responsables des activités antioxydantes de cette plante. Enfin, il est également souhaitable de faire une étude dans le domaine toxicologique de cette plante active afin de pouvoir la mettre à la disposition de la population avec des posologies précises.

Références Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] EXELL A. W., 1961 ; Flora Zambesiaca Taxon Détail ; volume de FZ: 1 partie: 2 MALVACEAE.
- [2] <http://www.plante-botanique.org/famille> ; Malvaceae (consulté le 18.02.14).
- [3] DACOSTA Y. ; 2003 ; Les phytonutriments bioactifs ; Editions Yves Dacosta. Paris ; 317 pages. D. GODOT DE MAUROY, 1955 ; Flore de Madagascar et des Comores, MALVACEAE, vol. 129: p. 157.
- [4] SELVADURAI S., SENTHAMARAI R., SRI VIJAYA K. T., VASUKI K.; Antimicrobial activity of ethanolic extract of the whole plant of *Sida Spinosa* Linn. (Malvaceae).
- [5] KONATE K.; Les propriétés anti-nociceptives chez les rongeurs et la possibilité d'utiliser des fractions riches en polyphénols du *Sida urens* L. (Malvaceae) contre la carie dentaire bactérienne.
- [6] ADJE A. F., 2013 ; Conservation durable des extraits de bissap (*Hibiscus sabdariffa* L. - MALVACEAE) en conditions ambiantes ; Laboratoire de Procédés Industriels, de Synthèse, de l'Environnement et des Energies Nouvelles (LAPISEN) ; Côte d'Ivoire.
- [7] VERTUANI S., BRACCIOLI E., BUZZONI V. et MANFREDINI S., 2002 ; capacité antioxydant des pulpes de fruits et feuilles de *Adansonia digitata*; Faculté de pharmacie, Université de Ferrara- Italie.
- [8] ZAMORE R. et EBROÏN A. ; Vertus et secrets des plantes médicinales.
- [9] <http://www.mi-aime-a-ou.com/>; *Pavonia urens* (consulté le 18.11.13).
- [10] <http://www.plant-identification.co.uk/>; *Pavonia urens* (Consulté le 17.11.2013).
- [11] BRINK M. et ACHIGAN-DAKO E. G., 2012 ; Ressources végétales de l'Afrique tropicale 16 Plantes à fibres ; Fondation PROTA/ CTA Wageningen, Pays-Bas ; 659 pages.
- [12] BOST R., 1961 ; Pharmacopée malgache. Mémoire de l'Institut scientifique de Madagascar, série B, Tome 10, Fasc. 2, 159 - 234.

- [13] BOER H. J. , KOOLA A., BROBERGB A., WILLIAM R. M., HEDBERGA I., JOLANTA J. L., 2005; Anti-fungal and anti-bacterial activity of some herbal remedies from Tanzania; *Journal of Ethnopharmacology* 96 ; 461–469.
- [14] <http://www.larousse.fr/dictionnaires/français>; Microbes (consulté le 28.05.14).
- [15] LE LOIR Y. et GAUTIER M., 2009 ; *Staphylococcus aureus*, collection : Monographies de microbiologie, Éditions Tec&Doc Lavoisier.
- [16] <http://www.anses.fr/> ; Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments (consulté le 18.02.14).
- [17] DROMIGNY, 2008 ; *Bacillus cereus*. Collection « Monographies de microbiologie ». Éditions Lavoisier Paris.
- [18] <http://www.vulgaris-medical.com/>; *Escherichia coli* (consulté le 15.02.14)
- [19] CLAVE D., ARCHAMBAUD M., 2009 ; Fiche Technique Bactériologie : *Salmonella enteridis*, Laboratoire de Bactériologie-Hygiène ; Centre Toulousain pour le contrôle de qualité en Biologie clinique ; 4pages.
- [20] <http://www.vulgaris-medical.com/>; Candidose (consulté le 15.02.14)
- [21] DJAMILA DJEMOUI, 2012 ; « Contribution à l'étude de l'activité antioxydante et antibactérienne de quelques coumarines synthétisées » ; Mémoire d'obtention du Master académique, université KASDI MERBAH OUARGLA.
- [22] BOISSIER Z.R., ASSELIMEAN J., JZALTA.P., 1993 ; Les antibiotiques : Structures et exemples de mode d'action ; Herma ; Paris.
- [23] HAMMER K. A., CARSON C. F., RILEY T. V., 1999; Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts; *J. Appl. Microbial.*; Volume 86.
- [24] CHOMA I. M., GRZELAK E. M.; 2010; Bioautography detection in thin-layer chromatography.
- [25] RANDERATH K., 1964; Chromatographie sur couches minces. Paris: Edition Gauthier-Villars.
- [26] RAKOTOMANANA H., 2014 ; Etude chimique et biologique de *Aloe macroclada* et des fruits *Fragaria ananassa* et *Annona muricata* ; mémoire de DEA Chimie Appliquée à l'Industrie et à l'Environnement, option Chimie organique, ESPA, Université d'Antananarivo, 101 pages.

- [27] DIMAKATSO T. K., Décembre 2007; Isolation and characterization of antioxidant compounds from *Combretum apiculatum* (Sond.) subsp apiculatum leaf extracts.
- [28] BIDIE A., YAPO F., N'GUESSAN et DJAMAN A., 2011 ; Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne ; Article originale Sciences & Nature Vol. 8 N°1: 1 – 11.
- [29] BOUZID W., 2009 ; Etude de l'Activité Biologique des Extraits du Fruit de *Crataegus monogyna* Jacq. ; Mémoire pour l'obtention du diplôme de Magister en Biologie, option Biochimie Appliquée.
- [30] FIORUCCI S, 2006 ; Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes: Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire; Thèse, Université de Nice-sophia Antipolis.
- [31] RAKOTOARIVELO V., 2010 ; Contribution aux études chimique et biologique de deux plantes malgaches : *Vepris elliotii* Radlk, *Voandjeia subterranea* L ; Thèse de chimie organique ; Faculté des sciences ; Université d'Antananarivo. ; 136 pages.
- [32] <http://www.ortasinternationalgroup.com/> ; Les radicaux libres (Consulté le 22.04.14)
- [33] POPOVICI C., SAYKOVA et TYLKOWSKI, 2009 ; Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH ; Revue de génie industriel 2009, 4, 25-39.
- [34] DONATIEN KONE, 2009 ; Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes - extraction, identification d'alcaloïdes - caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante ; Thèse de Chimie organique, Université Paul Verlaine (France).
- [35] KIM D. O., Lee K. W., Lee H. J., Lee C. Y., 2002; Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals. J. Agric. Food Chem; 50: 3713-3717.
- [36] HUANG D., 2005; the chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 1841-1856.

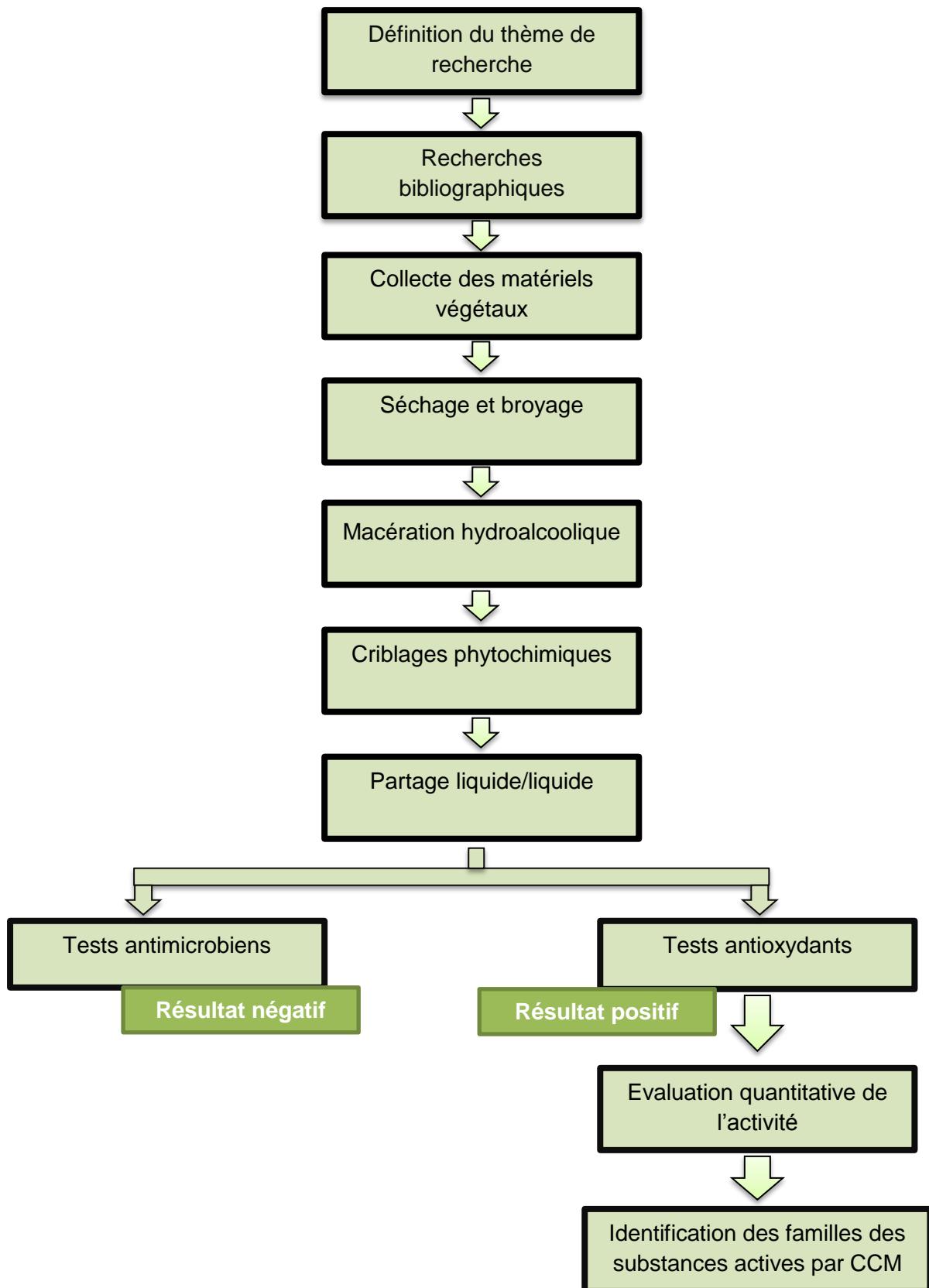
- [37] MOLYNEUX P., 2004; the use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J. Sci. Technol.
- [38] BRUNETON J. ; 1999 ; Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales ; 3ème Edition ; Editions Tec&Doc. Paris.
- [39] RAZAFINDRABE R. C., 2005; contribution à l'étude des grenouilles *Mantella* des régions Nord, Nord-Est et Centre-Est : Etude des composés Déshydro-5,8-Indolyzidines ; mémoire de DEA Chimie Organique, option Substances Naturelles ; Faculté des Sciences ; Université d'Antananarivo, 130 pages.
- [40] YANNICK T. M. U., 2011 ; Activité antidirépanocytaire et stabilité physico-chimique des anthocyanes, extraits des bulbes d'*Hypoxis angustifolia* et des feuilles d'*Ipomoea batatas* ; Licence en Chimie-physique.
- [41] BIAYE M., 2002 ; Actions pharmacologiques des tanins ; Thèse de Pharmacie.
- [42] GHESTEM A., SEGUIN E., PARIS M., ORECCHIONI A.M., 2001. Le préparateur en pharmacie ; Dossier 2, Botanique-Pharmacognosie-Phytothérapie-homéopathie ; Tec et Doc (Ed), 272 pages.
- [43] AGANGA A., MOSASE K., 2001; Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarous capussa*, *Ziziphus mucropata*, *Sclerocarya birrea* and *Rhus lancea* seeds. Animal-Feed Science and Technology, 91:107-113.
- [44] LAGNIKA L., 2005. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur (Strasbourg/France): 267 pages.
- [45] MERCK E., 1980 ; Révélateurs pour la CCM et sur papier, D-6100, Darmstadt 1980.
- [46] DAWSON R., ELLIOTT D., ELLIOTT W., JONES K., 1991 ; Dictionnaire de biochimiste ; Edition Mir, Moscou.
- [47] CHAAIB K. F., 2004. Thèse de doctorat, université de LAUSANNE (Suisse): 211 pages.
- [48] DEKKER M., 2002. Coumarins: analysis by TLC. Encyclopedia of chromatography: 1-3.

- [49] GEORGIEVSKII V. P., KOMISSARENKO N. F., DMITROUK S. E, 1990; Substances bioactives des plantes médicinales, Edition Naouka, Novosibirsk: 336 pages. (Traduit du russe).
- [50] LADIGUINA E. Y., SAFRONICH L. N., 1983; Khimicheskii analiz lekarstvenii rastenii, Moskva vischaya chkola: 172 pages. (traduit du russe)
- [51] N'GAMAN et als, 2009 ; Sur la Composition en Métabolites secondaires et l'activité antioxydante d'extraits Bruts de *Gmelina Arborea* Roxb. (Verbanaceae) de Côte d'Ivoire, Afrique de l'Ouest: Analyse par Chromatographie en Couche Mince.
- [52] N'GUÉSSAN K., KADJA B., ZIRIHI G. N., TRAORE N. D., AKE-ASSI L., 2009; Screening phytochimiques de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte d'Ivoire) ; *Science & nature* ; Volume 6, N°1 ; 15 pages.
- [53] FONG H., TIN W., FARNSWORTH N., 1997. Phytochemical screening; Review; University of Illinois, Chicago.
- [54] <http://www.refer.mg/cours/yr/chimieorganique/html>; Cours de chimie organique (Consulté le 17.11.2013).
- [55] RIZK A., 1982; Constituents of plants growing in Qatar. Fitoterapia
- [56] MICHELLINE K., 2009 ; Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiacées du Burkina Faso : cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* vahl et *Orthosiphon pallidus* Royle ex Benth ; Mémoire de DEA en Sciences Biologiques Appliquées.
- [57] OZGEN M., REESE R. N., TULIO J. R., SCHEERENS J. C., MILLER A. R., 2006; Modified 2, 2-Azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2, 2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *J. Agric. Food Chem.*; 54: 1151-1157.
- [58] RASOANAIVO P. et RATSIMAMANGA-URVERG, 1993; Biological evaluation of plants with reference to the malagasy flora; 102pages.

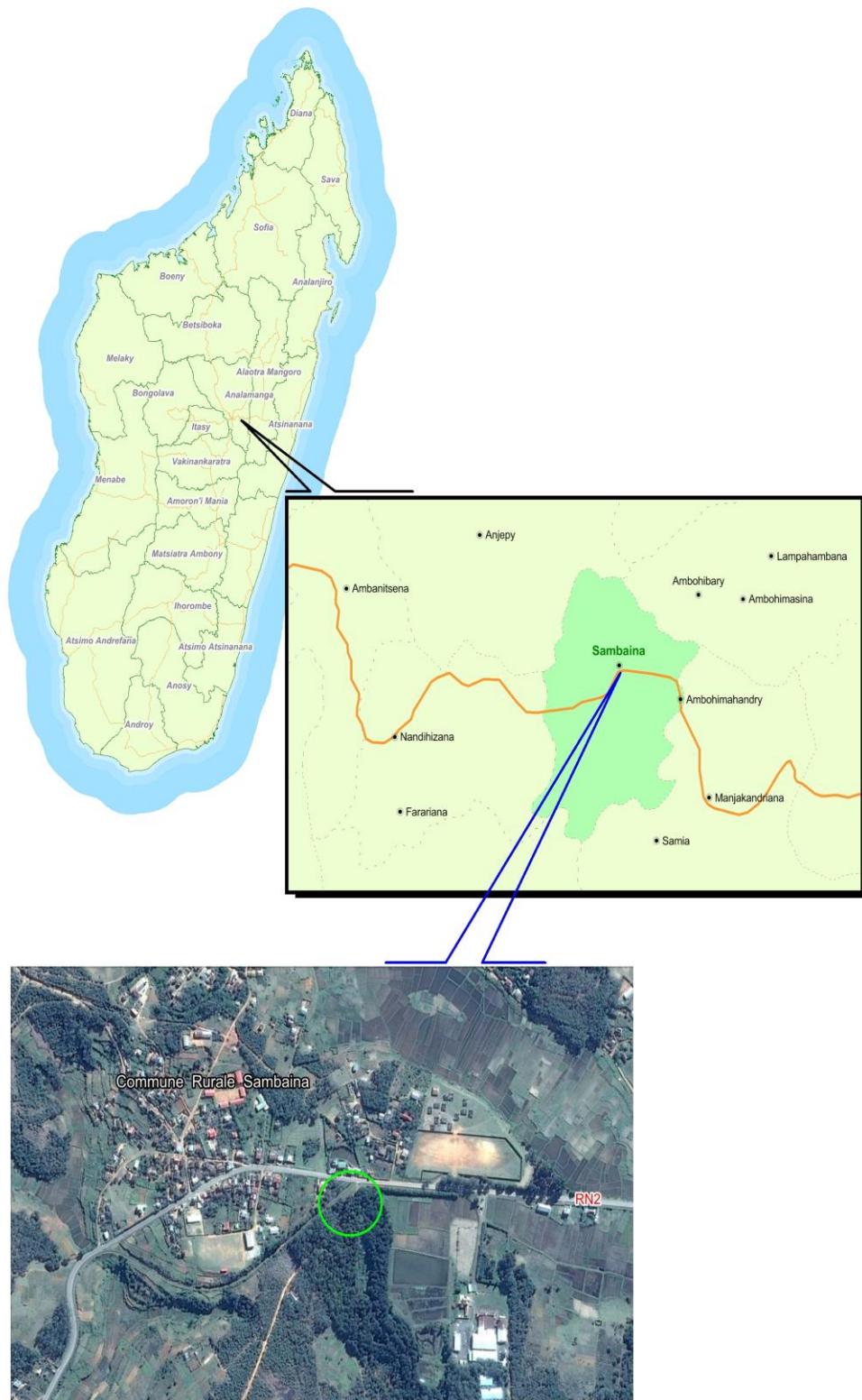
Annexes

ANNEXES

Annexe 1 : Démarche méthodologique suivie lors de l'étude



Annexe 2 : Carte de localisation du lieu de récolte



Annexe 3 : Préparation des réactifs

Réactifs de DRAGENDORFF et de WAGNER [52]

Réactif	Mode de préparation
DRAGENDORFF (Iodobismuthate de potassium : BiNO ₃ /KI)	- Solution A : 0,25g de Bi(NO ₃) + 10ml d'AcOH + 40ml de H ₂ O - Solution B : 16g de KI + 40ml de H ₂ O Au moment de l'emploi, mélanger 2,5ml de A et 2,5ml de B et ajouter 10g d'acide tartrique dissout dans 50ml de H ₂ O.
WAGNER (iodo-ioduré : I ₂ /KI)	Mélanger 2g de KI et 1,27g de I ₂ , puis ajouter 100ml de H ₂ O, et agiter jusqu'à dissolution complète.

Réactif de LIEBERMANN-BURCHARD (Révélateur des terpénoïdes et stéroïdes) [45]

La préparation se fait juste avant l'emploi. Pour ce faire, mélanger prudemment et sous réfrigération:

- 2ml d'anhydride acétique
- 2ml d'acide sulfurique
- 20ml d'éthanol absolu

Annexe 4 : Les trois étapes de la méthode de diffusion sur gélose [58]

Etape 1 : Préparation du milieu de culture (inoculum)

- Le bouillon nutritif est préparé en premier : une masse **m** de MHB (Mueller Hinton Broth) est additionnée d'eau distillée stérile, puis mixée. Le mélange est ensuite stérilisé dans l'autoclave à 120°C pendant 20minutes, à moins de 1bar de pression, puis mis dans des boîtes de Pétri préalablement stérilisées, avec la même épaisseur de 4mm. L'ensemble est laissé incuber à 37°C durant 24 heures.
- Les souches microbiennes sont, par la suite, mises dans 9 ml du bouillon nutritif préparé précédemment (MHB) puis incubées à 37°C pendant 18-24 h pour avoir des colonies jeunes pour le test. Une turbidité du bouillon nutritif marque le développement des souches revivifiées.
- Après incubation, les souches sont ensuite ensemencées sur un milieu gélosé MHA (Mueller Hinton Agar), puis incubées à 37°C durant 24 h avant les tests.
- A partir des jeunes colonies isolées, une ou deux colonies sont prélevées pour chaque souche puis diluées dans de l'eau distillée. A une longueur d'onde de 550 nm, la turbidité du mélange est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre, à une longueur d'onde 550 nm.

Etape 2 : Préparation des disques

- L'extrait est dilué dans l'éthanol, et une solution éthanolique est ainsi obtenue, de façon à ce que 10µl de solution contient 1mg d'extrait à tester.
- 20µl de cette solution est précautionneusement pipetée sur son milieu, et empreignée dans un disque en papier Wattman de diamètre égal à 6mm.
- Les disques sont séchés dans l'étude pendant 15 minutes

Etape 3 : Exécution du test

- Aussitôt que possible, pas plus de 15mn après inoculation des plaques, le disque doit être mis sur la culture, avec pression afin d'assurer un total contact entre le disque et la surface de milieu de culture.
- L'ensemble est incubé à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 30°C durant 48 à 72 h pour *C. albicans*.

Annexe 5 : Protocole de mesure de l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS

Lors des mesures des absorbances **A** des solutions, pour le dosage de l'activité antiradicalaire, les étapes suivantes ont été suivies:

- La longueur d'onde a d'abord été sélectionnée, soit égale à 517nm.
- Puis, l'étalonnage à zéro du spectromètre a été fait avec du méthanol pur, placé dans la cuve porte échantillon, et correspond à une absorbance $A = 0$.
- Par la suite vient la mesure de l'absorption maximale, correspondant à celle de la solution de DPPH. Celle-ci répond à la précision optimale de mesure de l'absorbance.
- C'est après que les absorbances **A** des solutions à doser sont lues.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	i
SOMMAIRE	iv
LISTE DES TABLEAUX	v
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	ix
LISTE DES ANNEXES	x
INTRODUCTION.....	1

Partie 1: Etudes bibliographiques

CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LA PLANTE.....	3
1.1. La famille des MALVACEAE	3
1.2. <i>Pavonia urens</i>	5
CHAPITRE 2 : L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE	10
2.1. Les microorganismes ou microbes	10
2.2. Les souches microbiennes.....	10
2.3. Les antimicrobiens.....	12
2.4. Les infections microbiennes	13
2.5. Traitement des infections microbiennes.....	13
2.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne	14
CHAPITRE 3 : L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE	16
3.1. La réaction d'oxydation	17
3.2. Les radicaux libres.....	17
3.3. Agents antioxydants	17
3.4. Evaluation de l'activité antiradicalaire.....	19
CHAPITRE 4 : LA PHYTOCHIMIE	21
4.1. Les alcaloïdes.....	21
4.2. Les flavonoïdes	22
4.3. Les terpènoïdes et stéroïdes.....	24
4.4. Les tanins	26
4.5. Les coumarines	28

CHAPITRE 5 : LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE	30
5.1. Généralités.....	30
5.2. Révélateurs.....	30
5.3. Applications.....	33

Partie 2: Approches expérimentales

CHAPITRE 6 : PREPARATION DES EXTRAITS	34
6.1. Matériel végétal.....	34
6.2. Matériels techniques.....	35
6.3. Macération hydro-éthanolique	35
6.4. Extraction par solvant.....	37
CHAPITRE 7 : CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE	41
7.1. Criblage des alcaloïdes.....	41
7.2. Criblage des flavonoïdes et leucoanthocyanes	42
7.3. Tanins et polyphénols	43
7.4. Criblage des stéroïdes et terpènoïdes.....	44
7.5. Screening des saponines	45
7.6. Criblage des quinones	46
7.7. Screening des coumarines.....	46
CHAPITRE 8 : TESTS BIOLOGIQUES	47
8.1. Tests antimicrobiens	47
8.1.1. Mode opératoire	47
8.1.2. Appréciation des résultats	48
8.2. Tests antiradicalaires	48
8.2.1. Tests de révélation	48
8.2.2. Quantification de l'activité antiradicalaire	49
CHAPITRE 9 : CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE	52
9.1. Préparation du système d'éluant.....	52
9.2. Préparation de la plaque chromatographique	52
9.3. Dépôt de l'échantillon	52
9.4. Elution	53
9.5. Révélations	53

Partie 3: Présentation des résultats et discussions

CHAPITRE 10 : RESULTATS DES EXTRACTIONS	54
10.1. Résultat de la macération hydro-éthanolique	54
10.2. Extraction par solvant.....	55
CHAPITRE 11 : RESULTATS DES CRIBLAGES PHYTOCHIMIQUES	57
11.1. Criblage des alcaloïdes	57
11.2. Criblage des flavonoïdes et leucoanthocyanes	58
11.3. Tanins et polyphénols	59
11.4. Criblage des stéroïdes et terpènoïdes.....	60
11.5. Screening des saponines	61
11.6. Criblage des quinones.....	61
11.7. Screening des coumarines.....	62
11.8. Récapitulation des résultats du criblage.....	63
CHAPITRE 12 : RESULTATS DES TESTS BIOLOGIQUES	64
12.1. Tests antimicrobiens	64
12.2. Résultats des tests antiradicalaires	65
12.2.1.Test de révélation.....	65
12.2.4.Quantification de l'activité antiradicalaire	69
CHAPITRE 13 : RESULTATS DES CCM.....	72
13.1. Visualisation directe sous UV 365nm	72
13.2. Révélation par la vapeur d'ammoniac.....	73
13.3. Révélation avec KOH	74
13.4. Révélation avec AlCl ₃	75
13.5. Révélation avec FeCl ₃ 2%	76
13.6. Réactif de LIEBERMANN-BURCHARD	76
13.7. Récapitulation des résultats	77
CHAPITRE 14 : IDENTIFICATION DES FAMILLES CHIMIQUES DES SUBSTANCES ANTIOXYDANTES	80
CONCLUSIONS et PERSPECTIVES	83
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	85
ANNEXES	94
TABLE DES MATIERES	VI

Contribution à l'étude des propriétés microbiologiques et antioxydantes de *Pavonia urens*

Auteur : Haritiana ANDRIANASOLO (andriharitiana@gmail.com / 034 16 547 36)

Encadreur : Dr. Edouard ANDRIANARISON (edoravali@yahoo.fr/ 034 38 702 44)

Nombre de pages : 84

Nombre de tableaux : 33

Nombre de figures : 33

RESUME

Les criblages phytochimiques des extraits bruts de *Pavonia urens* obtenus par macération dans un mélange éthanol-eau à 80% des parties de cette plante ont révélé la présence de plusieurs classes de substances chimiques dans cette plante : flavonoïdes, coumarines, tanins condensés et stérols insaturés. Les extraits bruts sont partagés par extraction en cascade avec des solvants à polarité croissante (hexane, DCM, n-butanol et eau) puis testés biologiquement sur cinq souches : *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteridis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* et *Candida albicans*, mais ces souches ont tous été résistantes aux extraits testés. Ensuite, des tests d'activité antioxydante sur le pouvoir piégeur du radical DPPH ont été réalisés. A priori, les extraits bruts des parties de la plante, testés par la méthode DPPH-TLC, présentent tous des activités antioxydantes, particulièrement la racine. La quantification de l'activité antiradicalaire de l'extrait brut de racine par méthode spectrophotométrique UV à 517nm a montré une concentration inhibitrice IC₅₀ de 3,62µg.mL⁻¹ voisine de celle de l'acide ascorbique (antioxydant de référence). Ainsi, l'extrait éthanolique de la racine détient une forte capacité antiradicalaire. Le criblage phytochimique en CCM a montré que les familles de substances responsables de cette activité sont des coumarines, des flavones méthylés et des flavonols.

Mots-clés : *Pavonia urens*, activité antiradicalaire, DPPH, coumarines, flavonoïdes.

SUMMARY

Phytochemical screening of the crude extracts of *Pavonia urens* obtained by maceration in ethanol-water at 80% of the parts of this plant have revealed the presence of several classes of chemicals in this plant flavonoids, coumarins, sterols and unsaturated condensed tannins. The crude extracts are divided by cascading extraction with solvents of increasing polarity (hexane, DCM, water and n-butanol) and biologically tested five strains: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteridis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, and *Candida albicans*, but these strains were all resistant to the tested samples. Then testing antioxidant activity DPPH radical scavenging power has been made. A priori, the crude extracts of plant parts, the DPPH-tested by TLC method, all exhibit antioxidant activities, especially the root. The quantification of the antiradical activity of the crude extract of root by spectrophotometric method at 517nm UV showed an inhibitory concentration IC₅₀ of 3.62 microg x mL⁻¹, similar to that of ascorbic acid (reference antioxidant). Thus, the ethanol extract of the root has a strong antioxidant capacity. Phytochemical screening TLC showed that the families of substances responsible for this activity are coumarins, flavones and flavonols methylated.

Keywords: *Pavonia urens*, antiradicalaire activity, DPPH, coumarins, flavonoids