

## **TABLE DES MATIERES**

---

<b>GLOSSAIRE.....</b>	<b>i</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTES DES FIGURES, DES DIAGRAMMES.....</b>	<b>v</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b><u>PREMIERE PARTIE</u> : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>3</b>
<b>I. ETAT DES CONNAISSANCES SUR LA PLANTE.....</b>	<b>3</b>
I.1 DONNEES BOTANQUES ET ETHNOBOTANQUES .....	3
I.1.1 POSITION SYSTEMATIQUE DE L'ESPECE .....	3
I.1.2 DESCRIPTION BOTANIQUE .....	4
I.1.3 DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE .....	4
I.1.4 UTILISATION EMPIRIQUE.....	4
<b>II. ETAT DES CONNAISSANCES SUR <i>Candida albicans</i> et la candidose .....</b>	<b>5</b>
II.1 GENERALITES SUR <i>Candida albicans</i> .....	5
II.2 GENERALITES SUR LES CANDIDOSES .....	6
II.2.1 Facteurs de virulence.....	7
a) Dimorphisme.....	7
b) Adhésines .....	7
c) Enzymes sécrétées .....	7
II.3 LES ANTIFONGIQUES .....	7
a) Les analogues de pyrimidine .....	8
b) les azoles .....	8
c) les échinocandines .....	8

# *Table des matières*

---

## **DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES**

### **I. MATERIELS**

I.1. MATERIEL VEGETAL .....	10
I.1.1. Sélection de la plante.....	10
I.1.2. Récolte .....	10
I.1.3. Préparation de l'échantillon de la plante .....	11
I.2. MATERIELS TECHNIQUES: .....	11
I.2.1 Matériels pour l'étude chimique.....	11
I.2.2 Matériels pour l'étude biologique .....	12

### **II. METHODES.....12**

#### **II.1.METHODES UTILISEES POUR L'ETUDE CHIMIQUE .....13**

II.1.1 CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE .....	13
a) Principe.....	13
b) Préparation de l'extrait à analyser .....	13
c) Mode opératoire .....	13
II.1.2 EXTRACTION .....	15
a) Principe de l'extraction .....	15
b) Mode opératoire .....	15
II.1.3 CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE .....	16
a) Principe .....	16
b) Mode opératoire .....	17
II.1.4 METHODES DE FRACTIONNEMENT .....	18
II.1.4.1 Chromatographie sur colonne ouverte (CC) .....	18
II.1.4.1.1 Chromatographie d'adsorption en phase normale sur colonne Ouvrte.....	18

## *Table des matières*

---

a) Principe.....	18
b) Mode opératoire .....	18
II.1.4.1.2.Chromatographie d'exclusion sur gel de SephadexLH20.....	18
a) Principe .....	18
b) Mode opératoire .....	19
<b>II. 2.METHODES UTILISEES POUR L'ETUDE BIOLOGIQUE .....</b>	<b>19</b>
II.2.1 METHODE DE MICRODILUTION EN MILIEU LIQUIDE.....	19
II.2.1.1 Principe .....	19
II.2.1.2 Détermination de l'activité antifongique .....	20
II.2.1.3 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) ...	20
II.2.1.4 Mode opératoire .....	20
a) Préparation des matériels utilisés .....	20
b) Préparation de l'inoculum .....	20
c) Préparation de l'extrait à tester.....	21
d) Milieux de cultures .....	21
e) Remplissage et ensemencement des puits de la microplaque.....	21
f) Traitement des résultats .....	22
II.2.2. METHODE DE NUMERATION CELLULAIRE .....	23
II.2.2.1 Principe .....	23
II.2.2.2 Mode opératoire.....	23
a) Préparation du milieu de culture.....	24
b) Préparation de la préculture et affectation des puits de la microplaque .....	24
c) Lecture de la DO du contenu de chaque puits .....	24
d) Ensemencement dans des boîtes de Pétri.....	24
e) Evaluation et traitement des résultats .....	24
II.2.3 TEST DE TOXICITE AIGUE .....	25
II.2.3.1 Principe.....	25

## *Table des matières*

---

II.2.3.2 Mode opératoire .....	25
a) Préparation des souris .....	25
b) Préparation de la solution mère de l'extrait à tester	25
c) Administration de la solution .....	26
d) Méthodes pour la détermination de la dose létale ..	26
<b>TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSIONS .....</b>	<b>28</b>
<b>I. CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE .....</b>	<b>28</b>
<b>II. PROCEDE D'EXTRACTION N°1 ET TESTS D'ACTIVITE</b>	
<b>    ANTIFONGIQUE DES EXTRAITS.....</b>	<b>29</b>
<b>        II.1. TEST D'ACTIVITE DU FLUCONAZOLE, L'ANTIFONGIQUE</b>	
<b>        DE REFERENCE .....</b>	<b>30</b>
<b>        II.2. RESULTAT DU COMPTAGE DES CELLULES DE <i>Candida</i></b>	
<b>        <i>albicans</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>        II.3. TESTS D'ACTIVITE ANTIFONGIQUES DES EXTRAITS ....</b>	<b>34</b>
<b>III. PROCEDE D'EXTRACTION N°2 ET TESTS D'ACTIVITE</b>	
<b>    ANTIFONGIQUE DES EXTRAITS .....</b>	<b>40</b>
<b>IV. TEST DE TOXICITE AIGUE DE L'EXTRAIT ES2Ac .....</b>	<b>41</b>
<b>V. CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE DES EXTRAITS ACTIFS: ES1Bu et</b>	
<b>    ES2Ac.....</b>	<b>44</b>
<b>VI FRACTIONNEMENT BIOGUIDEE ET TESTS D'ACTIVITE DES</b>	
<b>    EXTRAITS ACTIFS: ES1Bu et ES2Ac .....</b>	<b>45</b>
a) Fractionnement bioguidé de l'extrait butanolique ES1Bu.	45
b) Fractionnement bioguidé de l'extrait ES2Ac .....	46
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>51</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>53</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>58</b>

### **GLOSSAIRE**

**Antifongique:** Les antifongiques tirent leur nom du latin **fungus** qui signifie champignons. Ce sont donc des médicaments capables de traiter les mycoses, c'est-à-dire les infections provoquées par des champignons microscopiques.

**Ergostérol:** C'est un composant des membranes des cellules fongiques, remplissant la même fonction que le cholestérol chez les cellules animales (contrôle de la fluidité, précurseur d'autres molécules). La présence de l'ergostérol dans les membranes de cellules fongiques couplée à son absence dans les membranes des cellules animales en fait une cible pour des fongicides.

**Pathogène:** Le pouvoir pathogène (grec ancien πατος [pathos], « souffrance » ; *id.* γένος [genos], « nuisance ») ou pathogénicité d'une bactérie mesure sa capacité à provoquer des troubles chez son hôte. Il varie selon la souche (sérovar) et dépend de son pouvoir invasif (capacité à se répandre dans les tissus et à y établir un ou des foyers infectieux), de son pouvoir toxigène (capacité à produire des toxines) et de sa capacité à se reproduire.

**Hyphe:** L'hyphe constitue l'appareil végétatif des champignons, tandis que la partie visible, celle que l'on appelle improprement champignon est en fait son appareil reproducteur.

Les hyphes sont des filaments plus ou moins ramifiés constitués d'une cellule unique qui peut mesurer plusieurs centimètres de long. Elles contiennent plusieurs noyaux et peuvent parfois être cloisonnées.

**Pharmacodynamie:** Etude des effets des médicaments sur l'organisme ; branche des sciences médicales qui étudie cette action.

**Toxicité:** Propriété d'une substance capable de tuer un être vivant.

**Macération:** Opération qui consiste à laisser séjourner un corps solide dans un liquide ou dans un milieu humide, pour extraire certains principes actifs ou nutritifs de ce corps ou pour obtenir une modification de celui-ci ; état d'un corps soumis à cette action.

**Commensal**: se dit d'un microorganisme qui colonise l'organisme (généralement la peau ou les muqueuses) sans provoquer de maladie; les bactéries commensales peuvent devenir pathogènes pour le sujet immunodéprimé.

**Saprophytes**: Les bactéries saprophytes sont des bactéries qui ne se développent pas dans l'organisme vivant et se nourrissent des déchets générés au sein de celui-ci. On les oppose aux bactéries pathogènes qui pénètrent dans l'organisme et se développent en son sein, entraînant des infections. La plupart des bactéries saprophytes sont inoffensives pour l'homme, mais certaines peuvent être néfastes par le biais de toxines qu'elles sécrètent. On retrouve de nombreuses espèces de bactéries saprophytes dans le corps humain, notamment au niveau de la peau, du tube digestif, de la flore vaginale chez la femme.

**Curarisant**: se dit d'une substance naturelle ou de synthèse dont l'effet est semblable à celui du curare et qui est employée au cours des anesthésies pour relâcher les muscles.

## **LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS**

**AAF** : Activité antifongique

**CMI** : concentration minimale inhibitrice.

**CFU** : Colony Forming Unit

**CLSI** : Clinical Laboratory Standard Institute

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**CNARP** : Centre National d'Application des Recherches Pharmaceutiques

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**DO** : Densité optique

**DL** : Dose létale

**SLGG** : Sabouraud liquide, acide glutamique, glucose.

**SSGG** : Sabouraud solide, acide glutamique, glucose.

**PSB** : Plante séchée et broyée

**°C** : Degré Celsius

**h** : heure

**min** : minute

**g** : gramme

**μl** : microlitre

**μg** : microgramme

**MeoH** : méthanol

**AcOEt** : Acétate d'éthyle

**nBuOH** : Butanol

### **LISTE DES TABLEAUX**

<u>Tableau I</u> : L'utilisation des autres espèces d' <i>Abrahamia</i> en médecine traditionnelle .....	5
<u>Tableau II</u> : Caractérisation des familles chimiques, criblage phytochimique.....	14
<u>Tableau III</u> : Remplissage des puits pour la technique de microdilution .....	22
<u>Tableau IV</u> : remplissage des puits pour la numération cellulaire .....	24
<u>Tableau V</u> : Résultats du criblage phytochimique de l'extrait hydroéthanolique .....	28
<u>Tableau VI</u> : Remplissage des puits de la plaque de microtitration pour le test de référence.....	30
<u>Tableau VII</u> : Résultats en termes de densité optique ; activité antifongique du fluconazole .....	31
<u>Tableau VIII</u> : Variation de la DO en fonction de la concentration d'extrait dans le milieu d'essai. ....	31
<u>Tableau IX</u> : Résultat du test d'activité antifongique du fluconazole .....	32
<u>Tableau X</u> : Valeur de la densité optique lue dans chaque puits .....	33
<u>Tableau XI</u> : variation des valeurs de DO en fonction de dilution du milieu d'essai .....	33
<u>Tableau XII</u> : Résultat du comptage en boîte de Pétri du nombre de CFU correspondant à l'échantillon prélevé dans chaque puits.....	34
<u>Tableau XIII</u> : Résultat des comptages de nombre de CFU dans 3 dilutions de suspension de <i>Candida albicans</i> .....	34
<u>Tableau XIV</u> : Variation de DO en fonction de la concentration cellulaire.....	34
<u>Tableau XV</u> : Activité antifongique des extraits issus de l'extraction-1 par macération.....	36
<u>Tableau XVI</u> : Activité antifongique des extraits issus de l'extraction-1 par extraction liquide-liquide ( <i>Fractions ES1Ac, ES1Bu et ES1Aq</i> ) .....	39
<u>Tableau XVII</u> : Activités antifongiques des extraits issus de l'extraction-2 .....	41
<u>Tableau XVIII</u> : Symptômes évoqués par les animaux après l'administration de ES2Ac.....	42
<u>Tableau XIX</u> : Résultats du criblage phytochimique des extraits actifs.....	44
<u>Tableau XX</u> : Résultats du test antifongique des fractions de S1Bu(F3).....	46
<u>Tableau XXI</u> : Résultats du test antifongique des fractions de ES2Ac (G2 et G4).....	48
<u>Tableau XXII</u> : activités antifongiques des fractions issues de l'extrait G4 ( <i>G4<sub>A</sub>, G4<sub>B</sub>, G4<sub>C</sub></i> ).....	49
<u>Tableau XXIII</u> : activité antifongique des fractions issues de l'extrait G4( <i>G4<sub>D</sub></i> ) .....	50



### **LISTE DES FIGURES**

<b>Figure1:</b> Photo d' <i>Abrahamia deflexa</i> ; tronc et feuille .....	4
<b>Figure 2:</b> Diagramme d'extraction par macération solvants de polarité croissante.....	29
<b>Figure 3 :</b> Courbe de variation de $DO_{525}$ en fonction de la concentration de fluconazole .....	31
<b>Figure 4:</b> Courbe de DO en fonction de nombre de cellules fongiques par ml.....	35
<b>Figure 5:</b> Diagramme d'extraction liquide-liquide par l'acétate d'éthyle et le butanol.....	38
<b>Figure 6:</b> Diagramme d'extraction au soxhlet .....	40
<b>Figure 7:</b> Photo des souris en cours de test de toxicité .....	42
<b>Figure 8:</b> Schéma de fractionnement de l'extrait butanoliqueES1Bu.....	45
<b>Figure 9:</b> Schéma de fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle ES2Ac .....	47

### **INTRODUCTION GENERALE**

Les plantes ont été depuis toujours une source de médicaments. Aujourd'hui encore, la majeure partie de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne avec des remèdes traditionnels à base de plantes (ADJANOHOUN, 1979).

Madagascar est un pays qui dispose d'une grande diversité floristique, à laquelle s'ajoute une tradition séculaire d'utilisation traditionnelle des plantes. Par sa haute diversité et son taux d'endémisme élevé, elle figure dans le groupe des sept pays génétiquement les plus riches du monde (HUFTY, 2001). Sa flore est constituée de 12.000 espèces dont 80 % sont endémiques (KOECHLIN et GANZHORN, 1974). Elle fournit en plus du paysage, des fonctions écologiques, et des médicaments (QUANSAH, 1996).

Malheureusement, ces espèces floristiques sont menacées par l'extension des terrains de culture et d'habitation, l'exploitation minière, les feux de brousse, et la déforestation. Selon (SIGRID, 2003), 435 000 hectares en moyenne de la forêt à Madagascar disparaissent chaque année (ONE, 1997).

Il est important et urgent de mener une étude scientifique sur les espèces locales afin de disposer des données utiles et importantes puis de mieux valoriser la biodiversité en général et les plantes médicinales en particulier par la mise au point des phytomédicaments, entre autres.

Cette flore a déjà contribué à la découverte de nombreux principes actifs qui ont servi à la préparation des médicaments. Les industries pharmaceutiques continuent encore de s'appuyer sur la diversité des métabolites secondaires des végétaux pour trouver des nouvelles molécules biologiquement actives (GUEDE-GUINA, 1997 ; KRA, 2001).

Malgré les efforts et la découverte sans cesse de médicaments, les maladies infectieuses connaissent une forte recrudescence. Pour le cas des maladies fongiques, la candidose est fréquemment rencontrée, entre autres chez les patients immunodéprimés; c'est surtout une infection opportuniste. Elle peut se présenter aussi bien comme une infection superficielle, plus souvent bénigne que profonde ou systémique.

Le Centre National d'Application de Recherches Pharmaceutiques (CNARP) a inséré dans son programme d'activité la recherche de nouvelles molécules d'origine végétale ayant

## *Introduction générale*

---

une propriété antifongique et / ou antibactérienne et pouvant être utilisées comme principes actifs dans la formulation de phytomédicaments. Le but de notre étude consiste à :

- mettre en évidence et évaluer l'activité antifongique des extraits d'*Abrahamia deflexa* (ANACARDIACEES),
- contribuer à la recherche par bioguidage des substances naturelles biologiquement actives de la plante,
- se familiariser aux techniques utilisées au cours d'une étude phytochimique et des tests biologiques *in vitro*,

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre le CNARP et le Département de Biochimie fondamentale et Appliquée de la Faculté des Sciences de l'université d'Antananarivo.

Ce mémoire se divise en trois parties :

- La première partie résume l'état des connaissances botaniques et phytochimiques sur la plante,
- La deuxième partie traite des matériels et méthodes,
- La troisième partie rapporte les résultats et discussions.

PREMIERE PARTIE:

**SYNTHESE**

**BIBLIOGRAPHIQUE**

### **I .ETAT DES CONNAISSANCES SUR LA PLANTE**

La famille des Anacardiaceae est celle des Dicotylédones qui comprend près de 600 espèces réparties en 70 genres. Ce sont des arbres des régions tempérées. A Madagascar, la famille des Anacardiaceae comprend 8 genres : *Camposperma*, *Gluta*, *Abrahamia*, *Micronychia*, *Sorindeia*, *Faguetia*, *Operculicarya* et *Poupartia* (SCHATZ, 2001) *Abrahamia* comprend une vingtaine d'espèces, toutes sont endémiques à l'exception d'*Abrahamia longifolia* qui est originaire d'Afrique (PERRIER, 1946).

Quatre genres contiennent des espèces renfermant des substances bioactives: *Gluta*, *Abrahamia*, *Micronychia* et *Operculi carya*; deux autres espèces introduites: *Anacardium occidentale* et *Mangifera indica* sont également utilisées en médecine traditionnelle (MABBERLEY, 2000).

#### **I.1. DONNEES BOTANIKES ET ETHNOBOTANIKES**

##### **I.1.1 POSITION SYSTEMATIQUE DE L'ESPECE**

Règne : VEGETAL

Sous-règne : TRACHEOBIONTA

Division : MAGNOLIOPHYTA

Classe : MAGNOLIOPSIDA

Sous-classe : ROSIDAE

Ordre : SAPINDALES

Famille : ANACARDIACEAE

Genre et espèce : *Abrahamia deflexa*

Nom vernaculaire: Hazombarorana, hazombaroa, sohy (CRONQUIST, 1988)

Un herbier de référence est déposé au Département de Botanique et d'Ethnobotanique du CNARP.

### I.1.2 DESCRIPTION BOTANIQUE

(SCHAUT, 2001; BRUMMITT, 1992; PERRIER., 1946)

*Abrahamia deflexa* est un petit arbre ne dépassant pas 12 m de haut, à exsudation blanche. Les feuilles sont simples, alternes, sans stipules; limbe glabre, membraneux, vert noirâtre dessus, brun rougeâtre dessous, oblong ou ovale lancéolé (2,8-8,6X1-2,5 cm), peu atténué vers la base très obtuse, ou emarginé au sommet; nervures secondaires immergées et peu visibles sur les deux faces; pétiole grêle de 8-18 mm. Les inflorescences sont en panicules terminales plus ou moins longuement pédonculées, parsemées de quelques rares poils ferrugineux. Elle a des fleurs courtement pédicellées, petites; 5 sépales parsemés de quelques poils à l'extérieur, 5 pétales. La fleur male a 5 étamines extradisquales ; anthères dorsifixes, introrses, à déhiscence longitudinales; disque entourant un ovaire rudimentaire. La fleur femelle est également pentamères; 5 staminodes; ovaire supère Le fruit est ovale ou oblong (2X1-1,5cm), glabre, avec de nombreux canaux résinifères, contenant une graine ovale aiguë.



**Figure-1** : Tronc d'*Abrahamia deflexa* et feuilles d'*Abrahamia deflexa*

### I.1.3 DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE

*Abrahamia deflexa* est une plante endémique de Madagascar. Elle se rencontre surtout dans le Nord-Ouest de l'Ile (The digital Flora of Madagascar, 2012).

### I.1.4 UTILISATIONS EMPIRIQUES

Au sein du même genre, d'autres espèces sont utilisées en médecine traditionnelle comme anti-infectieuses selon les enquêtes ethnobotaniques menées par les botanistes du CNARP. Toutefois,

## Synthèse bibliographique

d'après la recherche bibliographique que nous avons effectuée sur *Abrahamia deflexa*, il n'a pas été fait mention de son utilisation dans la thématique antimicrobienne.

L'utilisation des autres espèces d'*Abrahamia* en médecine traditionnelle est résumée dans le Tableau I.

**Tableau-I : L'utilisation des autres espèces d'*Abrahamia* en médecine traditionnelle**

Genre	Espèces	Nom local	Utilisation	Partie utilisée	Références
<i>Abrahamia</i>	<i>grandidieri</i>	Maimbovitsika	Laxatif	Ecorce	BOITEAU et al., 1999
<i>Abrahamia</i>	<i>grandidieri</i>	Maimbovitsika	Constipation habituelle	Ecorce	
<i>Abrahamia</i>	<i>grandidieri</i>	Maimbovitsika	Coliques	Ecorce	
<i>Abrahamia</i>	<i>grandidieri</i>	Manavodrevo	Indigestion	Feuilles	
<i>Abrahamia</i>	<i>latifolia</i>	Malemilahy	Asthénie	Rameaux feuillus	
<i>Abrahamia</i>	<i>Latifolia</i>	Malemilahy	Impuissance	Rameaux feuillus	
<i>Abrahamia</i>	<i>oblongifolia</i>	Manavodrevo	Indigestion	Feuilles	
<i>Abrahamia</i>	<i>oblongifolia</i>	Hazombarorana	Sédatives	Feuilles	BOITEAU, 1977
<i>Abrahamia</i>	<i>sericea</i>	Hazombaroa	Indigestion	Feuilles	
<i>Abrahamia</i>	<i>sericea</i>	Hazombarorana	Sédatives	Feuilles	
<i>Abrahamia</i>	<i>grandidieri</i>	Manavidrevo	Contre la fragilité capillaire	Feuilles	BOITEAU., 1986
<i>Abrahamia</i>	<i>sp</i>	Andriamanamora	Artériosclérose	Feuilles	
<i>Abrahamia</i>	<i>sericea</i>	Tsindriambelona	Désinfectante	Rameaux feuillés	BOITEAU, et al ,1999
<i>Abrahamia</i>	<i>Sericeus</i>	Tsindriambelona	Désinfectante	Rameaux feuillés	
<i>Abrahamia</i>	<i>viguieri</i>	Tsitsebona	Calmante	Feuilles	
<i>Abrahamia</i>	<i>ditimena</i>	Ditimena	Antibactérienne	Rameaux feuillés	RABODOMALALA M.V,2008

## **II. ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES SUR *Candida albicans* ET LA CANDIDOSE**

### **II.1 GENERALITES SUR *Candida albicans***

Il s'agit d'une levure dont la forme sexuée n'est pas connue ; ce serait un Blastomycète de l'ordre des Cryptococcales, de la famille des Cryptococcaceae. Actuellement, d'après les données de la biologie moléculaire, cette levure serait apparentée aux Endomycétales (levure ascoporées (BERKOUT, 1923).

#### **Description**

*Candida albicans* est une levure de forme variable, ronde à allongée dont la reproduction se fait par bourgeonnement multilatéral .Le pseudo-mycélium peut être absent, rudimentaire ou abondant.

#### **Habitat**

Dans les conditions normales, *Candida*, sous la forme levure, vit en commensale sur les muqueuses de notre système digestif (bouche, œsophage, estomac, intestins). (BENNETT, 2005). Il n'y provoque aucun trouble, s'y trouve en quantité faible et fait partie de la flore normale de l'intestin. On en connaît 9 espèces dont 6 peuvent être impliquées dans la pathologie humaine et on la retrouve chez 80% de population. (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida crusei*, *Candida pseudotropicalis* et *Candida glabra* (*Torulopsis*).

### **II.2.GENERALITES SUR LA CANDIDOSE**

Les candidoses sont des maladies insidieuses, pratiquement inconnues il y a 50 ans, mais qui touchent actuellement des millions de personnes dans le monde. Non traitée, cette affection peut s'étendre et détériorer progressivement et gravement la santé en contribuant à l'affaiblissement du système immunitaire.

*Candida albicans* peut provoquer des infections fongiques (candidiase ou candidose) essentiellement au niveau des muqueuses digestives et gynécologiques. Les candidoses sont une cause importante de mortalité chez les patients immunodéprimés comme les patients atteints du sida, les



patients cancéreux sous chimiothérapie ou ceux ayant subi une transplantation de moelle osseuse. Les atteintes dites superficielles sont fréquentes chez les sidéens. *Candida albicans* est responsable de presque tous les cas de candidoses buccales et œsophagiennes et de plus de 80 % des candidoses vaginales (RUHNKE, 2002). Une faible proportion des candidoses profondes est d'origine exogène, la contamination se faisant à partir d'une colonisation cutanée, l'existence de matériel étranger intravasculaire (cathéters) et la toxicomanie par voie intraveineuse. (EGGIMANN, 2003).

Lorsque *Candida* s'infiltré dans le flux sanguin, l'infection devient systémique et on parle alors de candidémie. Les candidémies sont caractérisées par une mortalité de l'ordre de 40%. *Candida albicans* peut donner également une multitude d'autres infections car il s'agit d'un agent pathogène opportuniste très polyvalent.

### II.2.1 Facteurs de virulence

#### a) Dimorphisme (SUDBERY, 2004)

Le dimorphisme correspond à la transition de la forme levure ellipsoïdale, qui se sépare des cellules filles après la cytokinèse, à la forme hyphale, pour laquelle les cellules filles restent liées les unes aux autres par des septa et dont la croissance est apicale. Cette transition peut être induite par un grand nombre de stimuli tels que : le pH, la température, la composition du milieu (SEVILLA, 1986). La forme levure est la forme saprophyte tandis que la forme hyphale est la forme parasite pathogène.

#### b) Adhésines

*C. albicans* possède à sa surface un grand nombre de récepteurs qui lui permettent de reconnaître les cellules de son hôte et de s'y attacher solidement. (SHEPPARDDC, 2004). La paroi des champignons est indispensable à leur survie car elle assure le maintien de leur intégrité, de leur forme cellulaire et les protège des agressions mécaniques et chimiques. Elle joue un rôle essentiel dans les interactions avec les cellules de l'hôte et est donc déterminante pour la virulence (RUIZ-HERRERA, 2006).

#### c) Enzymes sécrétées (BORG-VON ZEPELIN, 1998)

*Candida albicans* possède toute une gamme d'enzymes hydrolytiques qui sont exprimées différemment selon l'environnement. On peut citer par exemple les enzymes de la famille *SAP* (secreted aspartyl proteinase), qui comptent actuellement 10 membres et dont les rôles sont variés :

dégradation de protéines , du système immunitaire ainsi que des structures cellulaires et tissulaires de l'hôte. Leur expression dépend du pH, de la localisation de *C. albicans* et de son état morphologique.

### II.3 LES ANTIFONGIQUES

Les antifongiques utilisés actuellement sont classées en fonction de leur cible respectif; on distingue ainsi ceux qui visent la paroi cellulaire, la membrane plasmique, la synthèse de l'ergostérol, l'ADN, l'ARN. Ces antifongiques peuvent être soit fongistatiques, soit fongicides (LAVERDIERE et al, 2006; MCCALLION, et al 1982. TANIGUCHI, 1988, LEE, 1999 ; HIMEJIMA, KUBO, 1993).

On distingue :

a) Les polyènes (ex. : Amphotéricine B [AmB],)

Ce sont des antifongiques naturels à action fongicide. L'AmB se lie à l'ergostérol de la membrane du champignon et crée des pores, augmentant ainsi la perméabilité de la membrane. Des composés essentiels à la vie du champignon tels que l'ion K<sup>+</sup> entre autres diffusent ainsi hors du cytosol ; ce qui conduit à la mort de l'organisme.

b) Les analogues de pyrimidine

Les analogues de pyrimidine (ex. : 5-fluorocytosine [5-FC]) sont des antifongiques à action fongicide. La 5-FC pénètre la cellule fongique et inhibe la synthèse d'ARN et d'ADN.

c) Les azoles

Les azoles forment la classe la plus répandue d'antifongiques à action fongistatique. On les classe en 2 sous-familles: les imidazoles (kétoconazole, miconazole) et les triazoles, plus récents (fluconazole, voriconazole, itraconazole). Les azoles inhibent l'action du gène *ERG11* impliqué dans la biosynthèse de l'ergostérol. La membrane est ainsi fragilisée et le champignon ne peut plus croître. Le gène *ERG5* est une cible secondaire des azoles.

### d) Les échinocandines

La paroi cellulaire a une fonction importante chez les champignons. C'est pourquoi de nouveaux antifongiques, qui ciblent la synthèse des éléments de la dite paroi ont été développés. Les échinocandines ciblent par exemple le produit du gène *FKS1* de *C. albicans*, qui code une  $\beta$ -1,3-glucane synthétase. Les échinocandines (ex. : caspofongine, micafongine, ...) ont une forte activité fongicide et ne présentent pas de réactivité croisée avec d'autres antifongiques.

La résistance aux antifongiques est un phénomène courant chez *C. albicans*. Il intervient généralement lors de traitements prolongés avec le même médicament. Elle varie selon la classe des antifongiques. (WHITE, 1998).

DEUXIEME PARTIE :

**MATERIELS ET  
METHODES**

### **I. MATERIELS**

#### **I.1 MATERIEL VEGETAL**

##### **I.1.1.Sélection de la plante**

Afin d'augmenter les chances de trouver de nouvelles molécules biologiquement actives, un point de départ pour le développement de nouveaux produits pharmaceutiques et cosmétiques, il convient de sélectionner avec soin la plante à étudier. Quelques critères ont été pris en considération dans le choix de la plante.

Il nous a semblé plus judicieux de réaliser la recherche sur une plante qui n'a pas encore fait l'objet d'une étude scientifique approfondie. La recherche bibliographique menée sur l'espèce, objet de notre travail, a montré qu'aucune étude pharmacologique et phytochimique n'a été publiée jusqu'au moment de la récolte.

*Abrahamia deflexa* est une plante endémique et abondante dans le nord-ouest de Madagascar. Sa distribution géographique est surtout sur la partie ouest de Madagascar.

De par l'accès facile de la zone de récolte, favorisant l'exploitation irrationnelle du matériel végétal pour la production de charbon de bois et du bois de chauffe ainsi que l'extension de parcelles de culture, elle figure parmi les espèces menacées de disparition et constitue ainsi une ressource à préserver. Il s'avère nécessaire et primordial d'entreprendre une étude scientifique sur l'espèce afin de disposer des données importantes rentrant dans le cadre de l'élargissement des connaissances de la biodiversité de notre pays insulaire et qui vont permettre aussi de mieux sensibiliser la population locale aux risques encourus.

En chimiotaxonomie, la classification des végétaux est basée sur la nature des métabolites secondaires. Les plantes appartenant à une même famille botanique, qui poussent dans le même biotope, sont susceptibles de synthétiser des molécules de mêmes familles chimiques. On retrouve souvent les mêmes classes de principes actifs au sein d'un même genre. Ceci nous a conduits à avancer l'hypothèse qu'*Abrahamia deflexa* pourrait contenir des substances ayant une activité antifongique ou antibactérienne, étant donné qu'*Abrahamia ditimena* a présenté une activité antibactérienne.

##### **I.1.2 Récolte**

La plante a été récoltée au mois d'Avril 2012 dans la forêt sèche dégradée d'Ampasimena, Fokontany d'Ambolobozoke, Commune d'Andrafiabe, District

Antsiranana II, dans le nord de Madagascar sur la base de la prédétermination sur terrain. La détermination définitive a été réalisée au CNARP par les chercheurs du Département d'Ethnobotanique et de Botanique.

### **I.1.3 Préparation de l'échantillon de la plante**

Les rameaux feuillés d'*Abrahamia deflexa* constituent notre matériel d'étude. Une fois arrivés au CNARP, ils ont été étalés dans la chambre d'un séchoir électrique et séchés avec de l'air chaud à une température constante de 55 °C jusqu'à leur séchage effectif. Ils ont été ensuite stockés dans des sacs en plastique poreux et conservés à température ambiante à l'abri de la lumière et de l'humidité. A chaque extraction, la quantité nécessaire est broyée avec un broyeur.

## **I.2. MATERIEL TECHNIQUE**

### **I.2.1. Pour l'étude chimique**

- Instruments de mesure: balance de précision (METTLER PM 300); balance (KERN PM 600 ;
- Broyeur mécanique ;
- Solvants d'extraction: hexane, dichlorométhane, méthanol, acétate d'éthyle et butanol ;
- Verreries: ballon de 1l, ballon de 100 ml, réfrigérant, tube à essai, Erlen Meyer, entonnoir, bécher, ballon à fond rond, éprouvette, ampoule à décanter ; chauffe ballon de 2 litres, filtre Büchner, spatule, Rotavapor-210(BUCHI), 3000w ;
- Appareils: Rotavapor-210(BUCHI) ,3000w, Soxhlet, chauffe ballon ;
- Cuve chromatographique; tubes capillaires, récipient de pulvérisation ;
- Etuve Memmert; séchoir Babyliiss1500W, pistolet à air chaud Steinel type 3484 2000W ;
- Système de révélation : lumière UV à 254 nm et 366 nm, révélateurs chimiques :  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{FeCl}_3$ , vanilline sulfurique, vapeur d'ammoniac (voir **annexe1**) ;
- Plaque préfabriquée de gel de silice 60 F<sub>254</sub>, Merck de 0,2 mm d'épaisseur ;
- Plaque préfabriquée de gel de cellulose 0.1 mm cellulose MN 300 UV 254nm et avec un support en plastique.

### **I.2 2. Pour l'étude biologique**

Les tests ont été réalisés sur une souche de *Candida albicans* ATCC 10231 portant la référence 0462U et produite par « Microbiologics »;

Le produit de référence utilisé est le fluconazole;

Les milieux de culture sont :

- Milieu Sabouraud :

Le milieu gélosé de Sabouraud avec 2% de glucose et sous forme de poudre que nous avons utilisé pour la conservation de notre souche de *Candida albicans* et pour le contrôle de pureté de notre souche sur boîte de Pétri est produit par Merck; sa composition et sa préparation sont décrites dans l'**annexe 2**.

- Les milieux SLGG et SSGG:

Les milieux SLGG et SSGG sont des milieux de culture liquide et solide (gélosé) qui, comparé au milieu de Sabouraud, utilisent aussi le glucose comme source de carbone pour le développement de *Candida albicans* mais à une concentration de 5 g/l au lieu de 20g/l. Après l'épuisement de cette source de carbone, l'acide glutamique ajouté au milieu à raison de 0.15g/l prend le relais et induit la transition des cellules de *Candida albicans* de la forme levure à la forme hyphale; c'est le milieu d'essai pour tous nos tests. La composition est donnée dans l'**annexe 3**.

Nous avons utilisé pour nos essais une souche de *Candida albicans* conservé au congélateur sur un milieu solide de Sabouraud.

### **LES MATERIELS ESSENTIELS**

- Microplaque stérile à 96 puits à fond plat et avec couvercle;
- Instrument de mesure : Balance KERN 600mg ;  
Balance SARTORIUS 120g;
- Appareils : Vortex marque HEIDOLPH, Agitateur magnétique;
- Etuve de culture microbiologique MEMMERT 2000W, Bec bunsen;
- Photomètre lecteur de microplaque DYNEX TECHNOLOGY;
- Verreries : tubes à essai, bécher, portoir, Erlen, Pipettes;
- Filtre millipore 0,45µm, seringue pour filtration;
- Souris femelles, de souche swiss, âgées de 5 mois pesant environ 30 g;
- L'extrait à tester;
- Solvant de dissolution des extraits à tester: eau distillée; DMSO/H<sub>2</sub>O (v/v) ;
- Seringue de 1ml et aiguille.

## **II METHODES**

### **II.1 METHODES UTILISEES POUR L'ETUDE CHIMIQUE**

#### **II.1.1.CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE**

La connaissance des familles chimiques des métabolites secondaires présentes dans la plante au cours de son évolution est très importante puisqu'elle permet de nous orienter dans la sélection du mode d'extraction et de la méthode d'isolement à adopter. La valorisation des données chimiotaxonomiques permet aussi de nous indiquer les classes de principes actifs pouvant être rencontrées dans la plante.

##### **a) Principe**

Le criblage phytochimique est une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration ou de précipitation spécifiques à chaque classe de substances naturelles (HOUGHTON, 1998).

##### **b) Préparation de l'extrait à analyser**

Cinquante grammes (50 g) de poudre de plante ont été chauffées à reflux dans le mélange éthanol / eau (80 :20) pendant 1h. L'extrait hydroéthanolique obtenu après filtration et évaporation sous pression réduite du solvant a été soumis aux différents tests phytochimiques.

##### **c) Mode opératoire**

Un screening phytochimique (FONG et al, 1997) a été entrepris sur l'extrait hydroéthanolique à 80% afin de déceler les principales classes de métabolites secondaires présents dans la plante. Les réactions de caractérisation des familles chimiques classiques sont résumées dans le Tableau II. Les descriptions des tests sont détaillées dans l'**annexe 4**.



**Tableau-II : Caractérisation des familles chimiques**

FAMILLES CHIMIQUES	TEST	REACTIFS SPECIFIQUES	REACTION	PRESENCE DE
Alcaloïdes	WAGNER	HgCl <sub>3</sub> /IK	Precipitation	Alcaloïde
	MAYER	I <sub>2</sub> /IK	Precipitation	
	DRAGENDORFF	(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> /BI/IK	precipitation	
Anthraquinones	BORNTRAGER	Benzene NH <sub>4</sub> OH	Coloration de la phase alcaline rouge	Anthraquinone
Saponosides	INDICE DE MOUSSE	Eau distillée	Mousse > 3cm	Saponine
Stéroïdes et terpenoides	SALKOWSKI	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentré	Coloration de l'anneau de séparation rouge	Stérol insaturé
	LIEBERMANN BURCHARD	Anhydre acétique, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrée	-coloration rouge pourpre -violet ou bleu vert	-tri terpène -stéroïdes
	KEDDE	Acide picrique	Coloration rouge	Stéroïde lactonique
	KELLER-KILIANI	FeCl <sub>3</sub> , acide acétique glacial	Anneau de séparation rouge pourpre	Desoxy-2-sucrose
Flavonoides et leucoanthocyanes	WILLSTATTER	HCl tournure de magnésium	Coloration Rouge	Flavone
	WILLSTATTER MODIFIEE	HCl, tournure de magnésium+alcooloisoamyl ique	Rouge pourpre	Flavonol
	BATE-SMITH	HCl concentrée -à chaud -à froid	Coloration -rouge violacée - rouge	Leucoanthocyan Anthocyan
Coumarine		KOH 10%		Coumarine
Iridoïdes		HCl 12% aqueux	Précipitation noir	Iridoïde
Tanins et polyphénols		Gélatine 1%	Précipitation	Tanin
		gélatine salée	Précipitation	Polyphénol
		FeCl <sub>3</sub>	Noir bleuâtre	Tanin hydrolysable pyrogallol

### **II.1.2 EXTRACTION**

#### **a) Principe de l'extraction**

L'extraction, qui a pour but la désorption des molécules d'intérêts des sites actifs de la matière végétale, est une étape primordiale puisqu'elle déterminera la nature et la quantité de molécules extraites, et par conséquent le succès des étapes de l'analyse et de l'identification des molécules bioactives.

L'extraction des produits naturels est généralement du type solide-liquide c'est-à-dire un solide, la matière végétale, est mélangé avec un liquide, le solvant d'extraction.

Les méthodes d'extraction spécifiques peuvent être appliquées selon la nature des familles chimiques des constituants présents dans la plante (BLANCHARD, 1998).

Pour l'extraction liquide/liquide, les deux composants non miscibles du mélange (la solution contenant l'extrait et le solvant d'extraction) sont mis en contact par agitation dans une ampoule à décanter. Après l'opération, deux phases sont obtenues : une phase organique et une phase aqueuse. L'extrait est obtenu par évaporation à sec sous pression réduite du solvant de la phase organique.

#### **b) Mode opératoire**

##### **Première méthode d'extraction**

L'extraction successive par des solvants de polarité croissante permet une extraction des constituants selon leur polarité :

- L'hexane pour le dégraissage et extraction de produits peu polaires,
- Le dichlorométhane pour les composés moyennement polaires,
- Le méthanol pour l'extraction des produits polaires.

Pour éviter la dégradation des principes actifs, l'extraction consiste à macérer la poudre de plante dans du solvant organique à la température ambiante. Chaque macération (est effectuée pendant 24 heures ×3), est suivie d'une filtration et le filtrat obtenu est évaporé à sec sous pression réduite.

L'extrait méthanolique sec est repris dans de l'eau distillée et soumis à une extraction liquide-liquide successivement par l'acétate d'éthyle et le n- butanol.

### Deuxième méthode d'extraction

Cette méthode, plus ou moins sélective, est fastidieuse et nécessite un temps long et une grande quantité de solvant ; une autre voie a alors été essayée. Elle consiste à extraire la poudre de la plante avec du chlorure de méthylène en utilisant un soxhlet afin d'extraire les produits peu et moyennement polaires. Le marc épuisé est extrait par macération à froid avec du méthanol suivie d'une filtration ; le filtrat obtenu est évaporé à sec sous pression réduite. L'extrait obtenu a été repris dans de l'eau et soumis à une extraction liquide-liquide successivement avec de l'acétate d'éthyle et du n-butanol. Les phases organiques et aqueuses ont été évaporées à sec sous pression réduite.

Les extraits secs obtenus à l'issue des deux essais sont soumis à des tests antifongiques.

L'adoption du mode d'extraction est fonction de plusieurs critères : l'activité biologique des extraits, le rendement et la durée de l'extraction, la disponibilité et le volume nécessaire des solvants ainsi que la stabilité des constituants, entre autres. Après chaque extraction, les rendements sont calculés par la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{\text{Masse de l'extrait obtenu}}{\text{Masse de poudre initiale}} \times 100$$

Les extraits actifs ont été soumis aux réactions de caractérisation des classes de substances naturelles déjà détectées lors du criblage chimique préliminaire effectué sur l'extrait hydroéthanolique afin de vérifier leur présence ou non dans ces extraits puis de nous orienter dans le choix des systèmes de solvant et des réactifs de révélation lors du processus de séparation et d'isolement des molécules bioactives.

### **II.1.3. La chromatographie sur couche mince** (.IKAN et al, 1964),

(HOREHAMMER et al, 1964), (WAGNER et PLANT, 1996)

#### a) Principe

La chromatographie sur couche mince (CCM), à caractère analytique, est basée surtout sur des phénomènes d'adsorption: la phase mobile, un solvant ou un mélange de solvants, progresse le long d'une phase stationnaire constituée d'une couche d'adsorbant d'environ 0,25 mm fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. L'échantillon à analyser est mis en solution (2 à 5 %) dans un solvant volatil,

qui n'est pas forcément le même que l'éluant. Il est déposé sous forme de solution sur la phase stationnaire à un point situé à 1 cm du bas de la plaque à l'aide d'un tube capillaire. Une fois la plaque placée en position verticale dans une cuve, l'éluant, dont le niveau est à environ 0,5 cm du fond de la cuve, monte par capillarité le long de la phase stationnaire.

Chaque composant se déplace à sa propre vitesse qui dépend des forces électrostatiques retenant le composant sur la phase stationnaire et de sa solubilité dans la phase mobile. La vitesse dépend donc de la nature de la substance et de celle du mélange de solvants.

Pour les adsorbants constitués de silice en phase normale, l'alumine ou le polyamide, les produits peu polaires migrent plus rapidement que les substances polaires.

### b) Mode opératoire

Les systèmes d'éluant cités ci-après ont été essayés: (EGGER., 1964)

#### C C M sur gel de silice normale :

- Hexane / AcOEt (8-2); Hexane / AcOEt (1-9);
- Hexane / AcOEt / MeOH (5-5:1);
- Hexane / AcOEt (9-1) et (5-5) ; DCM / MeOH (8-2); DCM / MeOH (3-7);
- Hexane / AcOEt, AcOEt / MeOH / H<sub>2</sub>O (100 : 13,5 : 10).

#### C C M sur cellulose:

- H<sub>2</sub>O / AcOH (95/5) ; H<sub>2</sub>O / AcOH (90/10), AcOH (75/25), B A E (4:1:5)

Pour la révélation, la plaque de silice est observée sous lumière U V à 254 nm et à 366 nm avant et après pulvérisation de réactifs spécifiques de caractérisation (la solution éthanolique d'AlCl<sub>3</sub> à 1 % (**annexe 1**) et la vapeur d'ammoniaque) puis avec des révélateurs universels (MATTHEWS, 1963) disponibles au laboratoire: la vanilline sulfurique (**voir annexe 1**) et l'acide sulfurique à 5% dans l'éthanol. La plaque est ensuite chauffée à 100°C pendant 15 minutes.

La plaque de cellulose est révélée sous lumière U V des deux longueurs d'onde à 254 nm et à 366 nm et pulvérisée ensuite avec une solution éthanolique de FeCl<sub>3</sub> à 5 % (TYIHIK E., 1963) (**voir annexe 1**).

Ne disposant pas des produits pour leur préparation, le réactif de Neu et le réactif à l'anisaldéhyde, caractéristiques des flavonoïdes, n'ont pas pu être mis à profit.

### **II.1.4. FRACTIONNEMENT BIOGUIDE DES EXTRAITS ACTIFS**

#### **II.1.4.1. Fractionnement par chromatographie sur colonne ouverte (CC)**

La chromatographie sur colonne est une méthode de séparation des différents constituants dans un extrait par entraînement de la phase mobile le long de la phase stationnaire en fonction de leur affinité pour la phase mobile et de la force de rétention exercée par la phase stationnaire. C'est une méthode chromatographique préparative.

Plusieurs types de phase peuvent être utilisés dans des colonnes de verre. Le choix de la taille et du diamètre de la colonne est fonction de la quantité de produits à séparer et de la résolution souhaitée. Les fractions recueillies, qui ont les mêmes profils chromatographiques après analyse sur CCM, sont rassemblées. Les fractions groupées ont été soumises aux tests biologiques.

#### **II.1.4.1.1. Chromatographie d'adsorption sur gel de silice en phase normale**

##### **a) Principe**

L'adsorption est la fixation des molécules dissoutes, par une phase stationnaire contenue dans une colonne de verre. Cette fixation est due à l'établissement de liaisons secondaires de surface entre l'adsorbant et la molécule adsorbée. (GRAMEGNA, 2004).

La phase stationnaire utilisée est la silice en phase normale. La quantité de silice employée est généralement 40 à 80 fois supérieure à la masse du mélange de produits à analyser. L'échantillon à fractionner est déposé sous forme de solution dans le mélange de solvants d'élution. Toutefois, il peut être adsorbé sur une quantité de silice correspondant à 1,5 fois ou deux fois sa masse et le dépôt a lieu sous forme solide.

L'élution est effectuée par simple gravité. Sous l'action de l'éluant et des liaisons qu'elles établissent avec l'adsorbant, les molécules vont se déplacer différemment dans la colonne.

### b) Mode opératoire

La poudre de silice, représentant 80 fois la masse de l'extrait à fractionner, est mise en suspension dans un volume de mélange de solvant. Elle est ensuite introduite dans la colonne de verre et est mise à décanter.

L'extrait à fractionner est adsorbé sur une quantité de silice correspondant à environ 2 fois sa masse et le dépôt de l'extrait a lieu sous forme solide. L'élution est effectuée selon le gradient d'éluant et/ou en mode isocratique. Les fractions recueillies à la sortie de la colonne sont regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM. Les fractions rassemblées sont soumises aux tests antifongiques.

### **II.1.4.1.2. Chromatographie d'exclusion sur gel de Séphadex L H 20**

#### a) Principe

Le Sephadex LH20 est un gel de séparation qui possède des propriétés lipophiles et hydrophiles. La récupération des échantillons au cours des expériences de séparation est presque totale. Les solvants utilisés sont le méthanol mélangé ou non au dichlorométhane (AMSERHAM, 1978).

#### b) Mode opératoire

L'échantillon à fractionner est introduit sous forme liquide après dissolution dans un petit volume d'éluant. Le système d'éluant utilisé est le dichlorométhane/méthanol (1:1) en mode isocratique.

Les fractions ayant les mêmes profils chromatographiques sont rassemblées et les fractions groupées sont soumises à des tests biologiques afin de localiser les principes actifs.

## **II.2. METHODES UTILISEES POUR L'ETUDE BIOLOGIQUE**

### **II.2.1. METHODE DE MICRODILUTION EN MILIEU LIQUIDE**

La méthode de microdilution en milieu liquide que nous avons utilisée s'est inspirée du protocole de référence décrit par le CLSI et portant la référence M27-A2. (LEE-YANG et al, 2002). C'est une méthode qui est plus sensible que celle de la diffusion sur milieu solide utilisant un disque de cellulose (SCORZONI, 2007).

### II.2.1.1 Principe

La méthode de microdilution en milieu liquide est utilisée pour l'évaluation in vitro et en milieu liquide de l'activité antifongique d'une substance synthétique ou naturelle et permet d'en déterminer la concentration minimale inhibitrice ou CMI.

La méthode a l'avantage d'offrir la possibilité :

- d'estimer l'activité antifongique sur une quantité infime d'extrait végétal, de l'ordre du microgramme, et ce sous un volume de milieu d'essai de 100µl ;
- d'évaluer l'activité antifongique de plusieurs concentrations de l'extrait en une seule session ;
- de réaliser chaque test en triple, facilitant ainsi le traitement statistique des résultats .

### II.2.1.2 Détermination de l'activité antifongique

La croissance ou non du germe est évaluée par une lecture de la Densité Optique du contenu de chaque puits à 525 nm pour en apprécier la turbidité; la lecture est effectuée sur un photomètre lecteur de microplaque.

### II.2.1.3 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est la plus faible concentration de la substance antimicrobienne qui inhibe la croissance du germe-test.

L'évaluation des concentrations minimales inhibitrices des extraits est effectuée par une comparaison de la turbidité, des cultures en présence d'extrait à tester avec les témoins sans produits antifongiques.

### II.2.1.4 Mode opératoire

#### a) Préparation des matériels utilisés

Tous les matériels et les solutions nécessaires à la manipulation microbiologique sont stérilisés au préalable afin d'éviter toute contamination ; les porte-filtres, les bacs, les pointes des pipettes, ainsi que tous les verreries. Chaque manipulation devrait être effectuée autour d'une zone aseptique (20 cm autour de la flamme de bec bunsen).

## ***Matériels et méthodes***

---

### b) Préparation de l'inoculum :

Cinq colonies bien isolées de *Candida albicans* provenant d'une culture de 48 heures à 35°C et sur le milieu gélosé SSGG et préparée en boîte de Pétri sont prélevées avec une oese.

Le prélèvement est transféré dans 20ml de milieu liquide SLGG et mis à incuber dans l'étuve à 35°C et pendant 48 heures.

Pour l'ensemencement du milieu d'essai ,4 gouttes de cette préculture sont prélevées et diluées dans 20ml de milieu SLGG.

### c) Préparation de l'extrait à tester :

Pour chaque extrait, une solution mère à 5mg/ml a été préparée dans le mélange DMSO/H<sub>2</sub>O (solvant de dilution de l'extrait), la solution obtenue est stérilisée par filtration sur une membrane millipore dont le diamètre des pores est de 0.45µm.

### d) Milieux de culture

Chez *Candida albicans*, la transition de sa morphologie de la forme levure vers la forme hyphale peut être induit *in vitro* essentiellement par des facteurs environnementaux incluant les acides aminés, des sels, le changement de pH, l'élévation de température, le sérum, la mise à jeun en éléments carbonés.

Trois milieux de culture ont été utilisés :

Milieu Sabouraud : pour la conservation des souches de *Candida albicans* (voir annexe 2) ;

Le milieu SLGG pour le test de microdilution en milieu liquide (voir annexe 3) ;

Le milieu SSGG : pour la vérification de la pureté des souches (voir annexe 3).

### e) Remplissage et ensemencement des puits de la microplaque

Les puits de la microplaque à 96 puits sont disposés sur 12 colonnes numérotés de 1 à 12 et 8 lignes notés de A à H.

Les puits des lignes A, B, C, D seront affectés à l'évaluation de l'activité antifongique d'un premier extrait noté E1.



## *Matériels et méthodes*

Les puits des lignes E, F, G, H seront affectés à l'évaluation de l'activité antifongique d'un premier extrait noté E2.

- Les puits de la colonne 1 seront laissés vides;
- Dans chaque puits de la colonne 2, 20µl d'extrait de manière à obtenir à terme dans le milieu d'essai une concentration finale en extrait de 1000µg/ml noté SM2 ;
- Chaque puits de la colonne 3 recevra la solution SM2 dilué de ½ avec le mélange DMSO/H<sub>2</sub>O, noté SM3 ;
- Une dilution de moitié en cascade de SM3 est réalisé jusqu'à la colonne 11 correspond à SM11 ;
- Les puits de la colonne 12 recevront uniquement 20µl du solvant de dilution de l'extrait ; correspond à SM12. Le remplissage des puits pour la technique de microdilution est donné dans le tableau III.

**Tableau III : Remplissage des puits pour la technique de microdilution**

	Colonnes											
Lignes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		SM2	SM3	SM4	SM5	SM6	SM7	SM8	SM9	SM10	SM11	SM12
B		SM2	SM3	SM4	SM5	SM6	SM7	SM8	SM9	SM10	SM11	SM12
C		SM2	SM3	SM4	SM5	SM6	SM7	SM8	SM9	SM10	SM11	SM12
D		SM2	SM3	SM4	SM5	SM6	SM7	SM8	SM9	SM10	SM11	SM12
E		SM2	SM3	SM4	SM5	SM6	SM7	SM8	SM9	SM10	SM11	SM12
F		SM2	SM3	SM4	SM5	SM6	SM7	SM8	SM9	SM10	SM11	SM12
G		SM2	SM3	SM4	SM5	SM6	SM7	SM8	SM9	SM10	SM11	SM12
H		SM2	SM3	SM4	SM5	SM6	SM7	SM8	SM9	SM10	SM11	SM12

- Après une nuit de séchage à l'étuve à 35°C,

- Dans chaque puits de la ligne A, B, et C et de la colonne 2 à la colonne 12, 100µl de milieu de cultureensemencé sont ajoutés ;
- Dans chaque puits de la ligne D et de la colonne 2 à la colonne 12 100 µl de milieu de culture nonensemencé sont ajoutés ;

Le schéma de remplissage est donné dans l'**annexe 5**

- La culture ainsi préparée est placée à l'étuve à 35°C pendant 48 heures.

### f) Traitement des résultats

Après l'incubation, la turbidité du contenu de chaque puits est évaluée par une mesure de la DO lue sur un lecteur de microplaque.

La DO lue à 525 nm pour chaque essai correspondant à une concentration donnée est comparée à celle du témoin de croissance sans produit antifongique;

La méthode de comparaison utilisée est celle de Student appliquée aux faibles effectifs ; elle permet de constater si la différence de la DO lue pour chaque puits contenant un essai et celle du témoin de croissance est significative.

## **II.2.2. METHODE DE NUMERATION CELLULAIRE**

### **II.2.2.1 Principe**

Lorsque des cellules microbiennes sont en suspension dans un milieu liquide traversé par un faisceau lumineux monochromatique, la quantité de lumière absorbée et dispersée par la suspension dépend de la concentration des cellules et de leur taille.

Il existe une corrélation entre l'absorbance de la suspension et la concentration en cellules. Ainsi en partant d'une série de couple de valeurs apparient une concentration de cellule et la densité optique correspondante, on peut construire un courbe étalon ayant la formule générale suivante : **absorbance ou DO = f (concentrations en cellules)**.

En partant d'une suspension-mère de *Candida albicans*, des dilutions décimales successives sont effectuées de manière à obtenir une gamme de concentrations allant de 1000 à 2µg/ml ; la turbidité de chaque suspension cellulaire est ensuite évaluée à 525 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque.

Ainsi à chaque dilution de suspension-mère du germe-test correspond une valeur de DO.

Dans un deuxième temps nous avons procédé à l'évaluation du nombre de cellules fongiques présentes dans chaque dilution.

Les résultats du comptage sont exprimés en CFU/ml (Colony-forming-Unit per milliliter) pour les liquides et CFU/g pour les solides.

## *Matériels et méthodes*

En microbiologie, l'expression « Colony-forming-unit » traduit une estimation approximative du nombre viable de cellules bactériennes ou de champignons contenus dans un échantillon; le mot « viable » signifie : apte à se multiplier sous les conditions définies par le protocole expérimental qui prévaut.

### **II.2.2.2 Mode opératoire**

#### a) Préparation du milieu de culture

200 ml de milieu SLGG (voir § I.2.2.) sont préparés et répartis dans 11 tubes à essai numérotés de 1 à 11 à raison de 4,5 ml par tube.

#### b) Préparation de la préculture et affectation des puits de la microplaque

Cinq colonies de souches de *Candida albicans* sont prélevées à partir d'un milieu solide SSGG ; ensemencées dans 20ml de milieu liquide SLGG puis mises à incuber à l'étuve à 35°C pendant 48 heures.

Une gamme de concentrations de la suspension fongique est ensuite préparée (le schéma de dilution de la suspension fongique est décrit dans (l'annexe 6) et déposée dans les puits de la plaque de microtitration selon le tableau IV suivant:

**Tableau IV : remplissage des puits pour la numération cellulaire**

	Colonnes											
Lignes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tube de dilution n°		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Valeur de la dilution		1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>
<b>A</b>		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>B</b>		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>C</b>		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>D</b>		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>E</b>		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>F</b>		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>G</b>		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>H</b>		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Les puits de la colonne 1 sont laissés vides;

Les puits des lignes A, B, C, D, E: recevront 100µl du milieu de culture **ensemencé**.

Les puits des lignes F, G, H: recevront 100µl du milieu de culture **non ensemencé**.

### c) Lecture de la DO du contenu de chaque puits

Après le dépôt, les valeurs de DO sont immédiatement lues au lecteur de microplaque à 525 nm.

### d) Ensemencement dans des boîtes de Pétri

Chaque contenu des puits est ensemencé et étalé sur le milieu solide SSGG préparé en boîtes de Pétri puis incubé pendant 24h à l'étuve de 35°C.

### e) Evaluation et traitement des résultats

L'évaluation des résultats se fait par le comptage des colonies de cellules fongiques (CFU) issues du repiquage sur milieu solide, seules les colonies comprises entre 30 et 300 sont prises en considération.

En faisant une correspondance entre les valeurs de DO<sub>525</sub> et le nombre de CFU dénombré un abaque permettant de calibrer l'inoculum devant servir à nos tests pourrait être établi.

## **II.2.3. TEST DE TOXICITE AIGUE**

La détermination de la toxicité aigüe est la première étape de tout programme de criblage ou d'étude pharmacodynamique d'une substance médicamenteuse.

### **II.2.3.1 Principe**

C'est une étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques qui se manifestent pendant une période donnée résultant d'une administration unique à forte dose du composé à tester. L'objectif du test est la détermination de la concentration létale du produit sur souris dans 24h si elle existe (GERIN, 2003).

### **II.2.3.2 Mode opératoire**

#### a) Préparation des souris

Des souris femelles de race SWISS pesée environ 30g ont été utilisées. Chaque souris est marquée, puis distribuée en 9 lots à raison de 5 souris par lot.

## ***Matériels et méthodes***

---

### b) Préparation de la solution de l'extrait à tester

Un premier test a été préalablement effectué sur un effectif réduit de souris en tenant compte de la solubilité de l'extrait à tester pour détecter l'intervalle de concentrations qui conviendrait.

La différence que nous avons fixée entre deux doses successives est de 50 mg /kg.

Préparation de solution mère (S.M) d'extrait à injecter (en tenant compte du poids moyen des souris de chaque lot)

- **SM à 25,56 mg /ml** : 4ml de l'eau distillée sont ajoutées à 102 mg de l'extrait à tester pour préparer une solution notée **D1** (*destiné à l'administration pour la dose à 450mg/kg*) ;
- **SM à 21,76 mg/ml** : 4ml de l'eau distillée sont ajoutées à 87 mg de l'extrait à tester pour préparer une solution notée **D2** (*destiné à l'administration pour la dose à 400mg/kg*) ;
- **SM à 17,36 mg/ml** : 4ml de l'eau distillée sont ajoutées à 69 mg de l'extrait à tester pour préparer une solution notée **D3** (*destiné à l'administration pour la dose à 350mg/kg*) ;
- **SM à 18 mg/ml** : 4ml de l'eau distillée sont ajoutées à 72 mg de l'extrait à tester pour préparer une solution notée **D4** (*destiné à l'administration pour la dose à 300mg/kg*) ;
- **SM à 15,8 mg/ml** : 4ml de l'eau distillée sont ajoutées à 63 mg de l'extrait à tester pour préparer une solution notée **D5** (*destiné à l'administration pour la dose à 250mg/kg*) ;
- **SM à 11,34 mg/ml** : 4ml de l'eau distillée sont ajoutées à 33.6 mg de l'extrait à tester pour préparer une solution notée **D6** (*destiné à l'administration pour la dose à 200mg/kg*) ;
- **SM à 8,4 mg/ml** : 4ml de l'eau distillée sont ajoutées à 24 mg de l'extrait à tester pour préparer une solution notée **D7** (*destiné à l'administration pour la dose à 150mg/kg*) ;
- **SM à 6 mg/ml** : 4ml de l'eau distillée sont ajoutées à 10.7mg de l'extrait à tester pour préparer une solution notée **D8** (*destiné à l'administration pour la dose à 100mg/kg*) ;
- **SM à 2,68 mg/ml** : 4ml de l'eau distillée sont ajoutées à 10.7mg de l'extrait à tester pour préparer une solution notée **D9** (*destiné à l'administration pour la dose à 50mg/kg*).

### c) Administration de la solution

La solution notée **D1** est injectée chez la souris du **lot1** à raison de 0.5ml par animal par voie intra péritonéale (LAUTIER, 1998) Les souris du lot 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 et 9 recevront aussi respectivement 0.5 ml des solutions D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, et D9.

**N.B** : L'heure d'administration sera notée, ainsi que les symptômes présentés par les animaux et le nombre de souris mortes.

## ***Matériels et méthodes***

---

### d) Méthodes pour la détermination de la dose létale

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées, mais 2 méthodes sont optées pour notre test.

- Méthode algébrique de Behrens et Karber (GILLES ,1974)
- Méthode graphique de Reed et Muench (AUBERT ,1982)

#### Par la méthode algébrique

La DL<sub>50</sub> est obtenue par la formule :

$$DL_{50}=DL_{100}-\sum (a \times b) /m$$

a : différence entre deux doses successives

b : moyenne de la somme des morts à des doses successives

m : nombre d'animaux utilisé par expérience

Cette méthode de calcul n'est applicable que :

- a) Si le nombre de mort est croissant au fur et à mesure que la dose en mg/kg
- b) S'il y a au minimum 3 lots d'animaux :
  - un lot correspondant à la plus forte dose ne provoquant aucune mortalité;
  - un lot correspondant à la plus petite dose à laquelle tous les animaux ont succombés ;
  - un lot intermédiaire entre les deux.

#### Par la méthode graphique

La DL<sub>50</sub> est déterminée par l'intersection de deux courbes de:

- variation de nombre des souris survivantes en fonction de la dose injectée,
- variation de nombre des souris mortes.

TROISIEME PARTIE :

**RESULTATS ET  
DISCUSSIONS**

### I. CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE

Les résultats du criblage phytochimique effectué sur l'extrait hydroéthanolique à 80 % sont consignés dans le Tableau V.

**Tableau V: Résultats du criblage phytochimique de l'extrait hydroéthanolique.**

FAMILLES CHIMIQUES		RESULTATS
Alcaloïdes		-
Anthraquinones		+
Iridoides		-
Flavonoïdes	Leucoanthocyane	+
	Flavone	+
	Flavonol	+
Saponosides		-
Stéroïdes et triterpènes	Stérol insaturé	+
	triterpène	+
	Stéroïdes	+
Tanins et polyphénols	Tanins	+
	Polyphénols	+
	Pyrogallols	+
Coumarine		-

+: présence; -: absence

Le screening phytochimique a révélé la présence dans la plante des :

- flavonoïdes, anthraquinones, tanins et polyphénols (composés moyennement et/ou polaires),
- stéroïdes et triterpènes (composés apolaires et/ ou peu polaires).

### II. PROCEDE D'EXTRACTION N°1 ET TESTS D'ACTIVITE ANTIFONGIQUE DES EXTRAITS

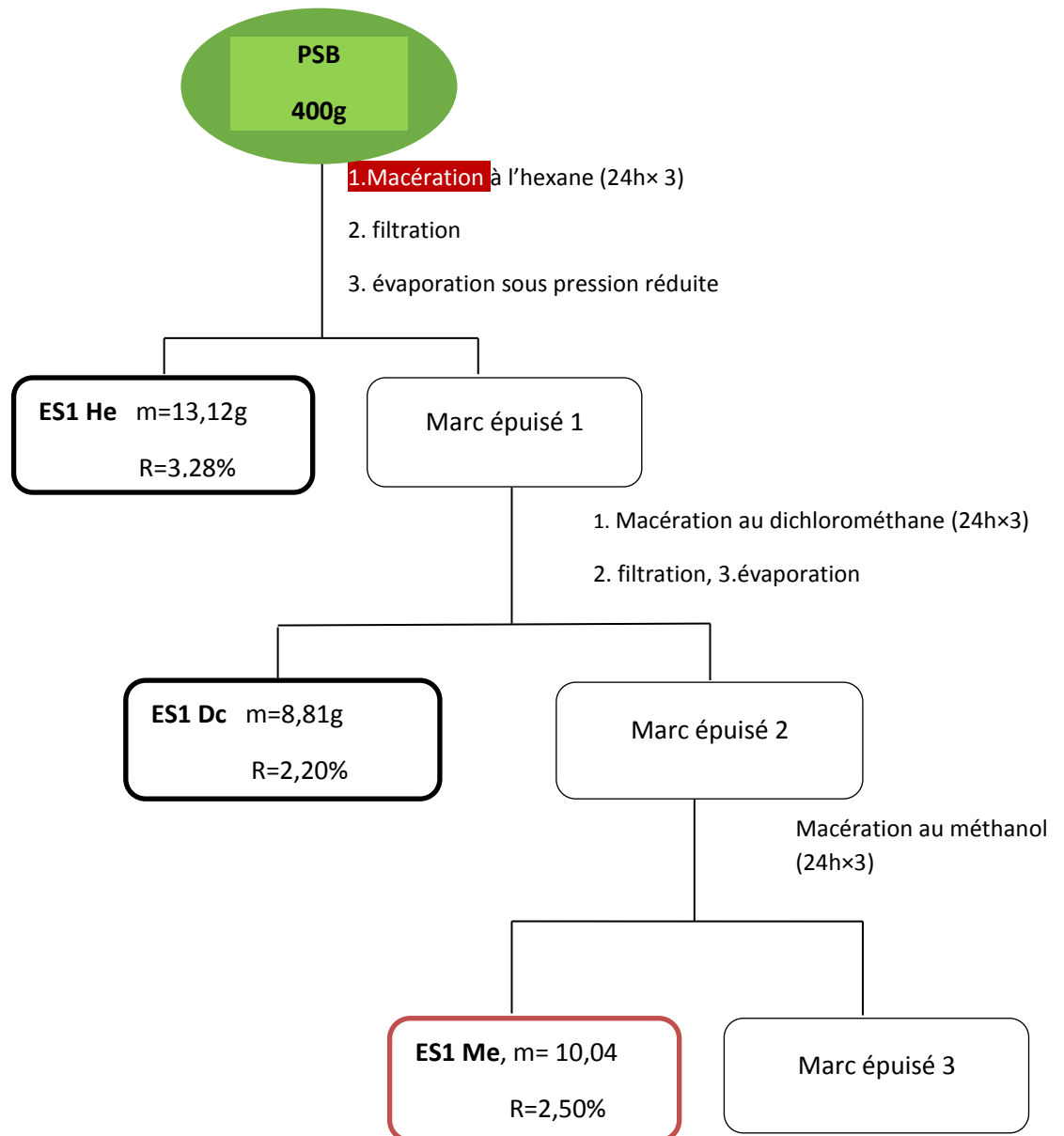
La mise en évidence de la présence de produits peu polaires, moyennement polaires et polaires par le biais du screening phytochimique de la plante a orienté notre choix vers une extraction



## Résultats et discussions

successive par macération de la poudre de plante à température ambiante avec des solvants de polarité croissante: hexane, dichlorométhane et méthanol (Voir §II.1.2).

Les extraits obtenus sont évaporés et séchés sous vide. Les rendements des extractions sont donnés dans la figure 2.



**Figure 2:** schéma d'extraction1 par macération

ES1 He: extrait hénanique

ES1Dc: extrait dichlorométhanoïque

ES1 Me: extrait méthanolique

Les extraits obtenus ont été soumis aux tests antifongiques (voir § II.2.1).

## Résultats et discussions

Avant de procéder aux tests d'activité des 3 extraits, nous avons effectué un test d'activité antifongique d'une substance prise comme référence. L'objectif en est de valider le protocole expérimentale et standardiser la taille de la suspension de germe test que nous utilisons à chaque essai.

### II.1 TEST D'ACTIVITE DU FLUCONAZOLE, L'ANTIFONGIQUE DE REFERENCE

Nous avons utilisé comme substance de référence le fluconazole, un antifongique à action fongistatique; il est indiqué surtout dans le traitement de candidoses vaginales et périnéales aiguës et récidivantes, il s'agit d'un antimycosique bistriazolé à usage systémique ;

Le test d'évaluation a été effectué, dans un environnement et milieu de culture où la forme hyphale de *Candida albicans* prédomine dans le milieu d'essai.

La sensibilité du germe-test à une gamme de concentrations de fluconazole allant de 593 µg/ml à 0 µg/ml a été évaluée in vitro et en utilisant la méthode de microdilution en milieu liquide et sur une plaque de microtitration (voir § II.2.1.2)

Les différents puits ont été remplis selon le protocole montré dans le Tableau VI.

**Tableau VI : Remplissage des puits de la plaque de microtitration pour le test de référence.**

		Concentration de fluconazole dans le milieu d'essai (en µg/ml)											
ligne	Concentration de fluconazole		593	297	148	74	37	18.5	9.27	4.6	2.3	1.16	0
↓	Colonne n°	→ 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Fluconazole + candida albicans (Hyphale)	Blanc	593	297	148	74	37	18,5	9,27	4,6	2,3	1,16	0
<b>B</b>		Blanc	593	297	148	74	37	18,5	9,27	4,6	2,3	1,16	0
<b>C</b>		Blanc	593	297	148	74	37	18,5	9,27	4,6	2,3	1,16	0
<b>D</b>	Fluconazole non ensemencé	Blanc	593	297	148	74	37	18,5	9,27	4,6	2,3	1,16	0

- Les puits des lignes A, B et C allant de la colonne 2 à la colonne 11 contiennent les cultures de *Candida albicans* en présence d'une concentration décroissante de fluconazole ; les tests sont ainsi effectués en triple.

## Résultats et discussions

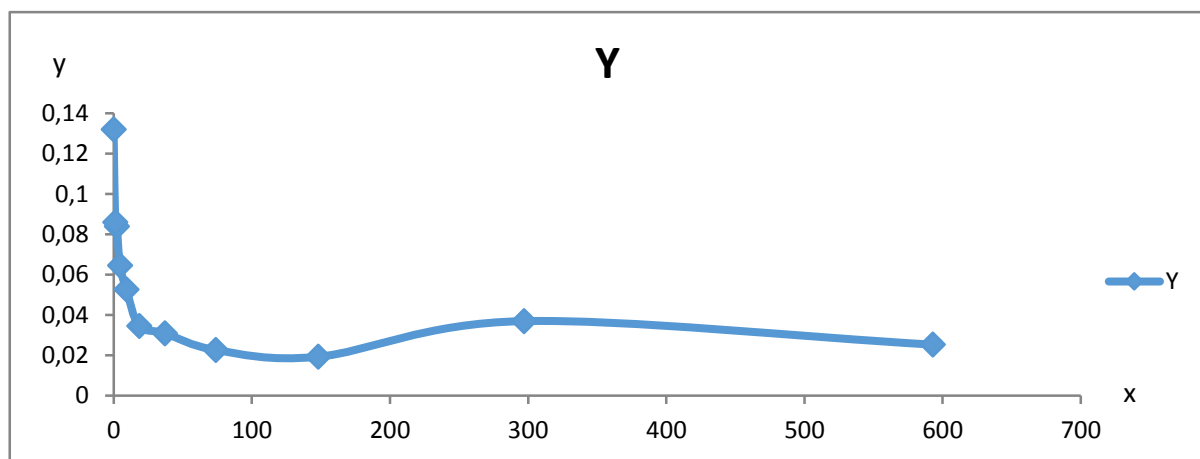
- Dans les puits de la ligne D sont consignées les différentes concentrations de fluconazole dans un milieu de culture non ensemencé.
- Le puits au point D12 ne contient **ni** de fluconazole **ni** de germe-test ; elle nous fournira la densité optique propre du milieu de culture utilisé.
- Les puits A12, D12 et C12 sont les témoins de culture.

**Tableau VII : Résultats en termes de densité optique ; activité antifongique du fluconazole-**

	concentration .de fluconazole (µg/ml)		593	297	148	74	37	18,5	9,27	4,6	2,3	1,16	0
	Colonne n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Flu+Candidaalbicans	Blanc	0,092	0,089	0,084	0,086	0,093	0,098	0,115	0,129	0,157	0,141	0,193
B		Blanc	0,069	0,080	0,069	0,070	0,071	0,071	0,088	0,104	0,13	0,135	0,165
C		Blanc	0,068	0,080	0,064	0,074	0,085	0,094	0,114	0,126	0,145	0,135	0,188
		Moy.	0,076	0,083	0,072	0,077	0,083	0,088	0,106	0,120	0,144	0,137	0,182
D	Fluconazole non ens.	Blanc	0,051	0,046	0,053	0,054	0,052	0,053	0,053	0,055	0,06	0,051	0,05

**Tableau VIII : Variation de la DO en fonction de la concentration d'extrait dans le milieu d'essai.**

X:concentration de fluconazole	593	297	148	74	37	18,5	9,27	4,6	2,3	1,16	0
Y: DO (525nm)	0,025	0,037	0,019	0,023	0,031	0,035	0,053	0,065	0,084	0,086	0,132



**Figure 3:** Courbe de variation de DO<sub>525</sub> en fonction de la concentration de fluconazole

## Résultats et discussions

### Commentaires :

- La valeur moyenne de DO<sub>525</sub> se rapportant aux témoins de culture est ici de **0,132** ; toutes les valeurs de DO se rapportant aux puits affectés au test et qui sont **inférieures** à 0,132 indiquent une **activité antifongique** ;

- L'étape suivante du traitement des résultats consiste à calculer si cette différence par rapport aux témoins de croissance est significative ou non ;

- Nous avons utilisé pour ce faire le test de Student appliqué aux petits échantillons ;

Le traitement du résultat par le test statistique est détaillé dans **l'annexe 7**.

Les résultats sont donnés dans le Tableau **IX**.

**Tableau IX : Résultat du test d'activité antifongique du fluconazole**

Identification de l'extrait	Intervalle de concentration testée (en µg/ml)		ACTIVITE		Concentration (µg/ml)	Comparaison par rapport au témoin		CMI (en µg/ml)
	Min (µg/ml)	Max (µg/ml)	Inactif	Actif				
Fluconazole	0	593		A	593		S	<1,16µg/ml
				A	297		S	
				A	148		S	
				A	74		S	
				A	37		S	
				A	18,5		S	
				A	9,27		S	
				A	4,6		S	
				A	2,3		S	
				A	1,16		S	

Légende: A: Actif; S: la différence par rapport au témoin de culture est significative

**Commentaires:** Le fluconazole est très actif sur le *Candida albicans* en forme hyphale.

L'activité observée est significative par rapport au témoin de culture.

La CMI correspond à la plus faible concentration d'extrait pour laquelle la différence entre la DO lue pour l'extrait actif et celle du témoin de croissance est significative ; ici à 1, 16µg/ml, l'activité est encore significative. La valeur du **CMI est inférieure à 1, 16µg/ml**.

## *Résultats et discussions*

### **II.2. RESULTAT DU COMPTAGE DES CELLULES DE *Candida albicans***

#### **II.2.1 Construction de la droite d'étalonnage**

##### **1) Réalisation d'une série de dilutions de la suspension initiale**

La souche de *Candida albicans* ATCC 10231 a été mise en culture sous une condition favorisant la transformation de la forme levure à la forme hyphale ;

Après une incubation à 35°C pendant 48 heures, une suspension-mère de *Candida albicans* est obtenue, nous effectuons ensuite une dilution en cascade en utilisant les puits d'une microplaque.

Mesure de DO dans chaque puits et traitement des résultats.

Les valeurs de la DO du contenu de chaque puits ont été ensuite relevées à l'aide d'un photomètre lecteur de plaque. Elles sont consignées dans le Tableaux X.

**Tableau X: Valeur de la densité optique lue dans chaque puits.**

			Dilution de la suspension du germe-test <i>Candida albicans</i>										
			1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>
	Colonne n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Milieu SLGG + <i>Cand.albi</i> "H"	Blanc	0,093	0,069	0,087	0,040	0,101	0,095	0,089	0,012	0,069	0,032	0,024
<b>B</b>		Blanc	0,096	0,083	0,118	0,072	0,112	0,067	0,021	0,018	0,125	0,126	0,017
<b>D</b>		Blanc	0,093	0,097	0,101	0,091	0,129	0,123	0,117	0,044	0,130	0,080	0,040
<b>E</b>		Blanc	0,089	0,055	0,094	0,072	0,074	0,072	0,069	0,016	0,033	0,028	0,032
		<b>Moy.</b>	<b>0,093</b>	<b>0,076</b>	<b>0,100</b>	<b>0,069</b>	<b>0,104</b>	<b>0,089</b>	<b>0,074</b>	<b>0,023</b>	<b>0,089</b>	<b>0,067</b>	<b>0,028</b>
<b>F</b>	Milieu SLGG	Blanc	0,030	0,027	0,018	0,02	0,018	0,018	0,016	0,016	0,018	0,018	0,016
<b>G</b>		Blanc	0,032	0,027	0,021	0,018	0,016	0,016	0,016	0,014	0,015	0,016	0,013
		<b>Moy.</b>	<b>0,031</b>	<b>0,027</b>	<b>0,020</b>	<b>0,019</b>	<b>0,017</b>	<b>0,017</b>	<b>0,016</b>	<b>0,015</b>	<b>0,017</b>	<b>0,017</b>	<b>0,015</b>

Variation des valeurs de DO en fonction de la dilution du milieu d'essai

**Tableau-XI: variation des valeurs de DO en fonction de dilution du milieu d'essai**

X	1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>
Y	0,062	0,049	0,081	0,050	0,087	0,072	0,058	0,008	0,073	0,05	0,014

**X** : Dilution de la suspension microbienne à partir de la solution-mère

**Y** : Densité optique de la suspension lue à 525 nm

## *Résultats et discussions*

Un échantillon de 50µl est prélevé dans chaque puits et repiqué et étalé sur le milieu SSGG préparé en boîte de Pétri. Les résultats du comptage des CFU après 1 nuit d'incubation à 35°C sont rapportés dans le tableau ci-après :

**Tableau XII : Résultat du comptage en boîte de Pétri du nombre de CFU correspondant à l'échantillon prélevé dans chaque puits**

Boite N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Dilution	1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>
DO <sub>525</sub> de chaque dilution	0,062	0,049	0,08	0,05	0,087	0,072	0,058	0,008	0,072	0,05	0,013
Nb de CFU	Inc	Inc	Inc	Inc	154	101	36	13	18	22	13

**Légende :** Inc: incomptable

Nous n'avons tenu compte que des effectifs compris entre 30 et 300 CFU. Par ailleurs, comme nous avons effectué le comptage sur un volume de 50µl de suspension, si nous corrigeons les résultats en les rapportant au nombre de CFU/ml le tableau XIII est obtenu.

**Tableau XIII: Résultat des comptages de nombre de CFU dans 3 dilutions de suspension de *Candida albicans***

Boite n°	5	6	7
Dilution	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
DO <sub>525</sub> de chaque dilution	0,087	0,072	0,058
Nb de CFU/50µl	154	101	36
Nb de CFU/ml	3080	2020	720

**Tableau XIV : Variation de DO en fonction de la concentration cellulaire**

**X** concentration cellulaire dans chaque puits

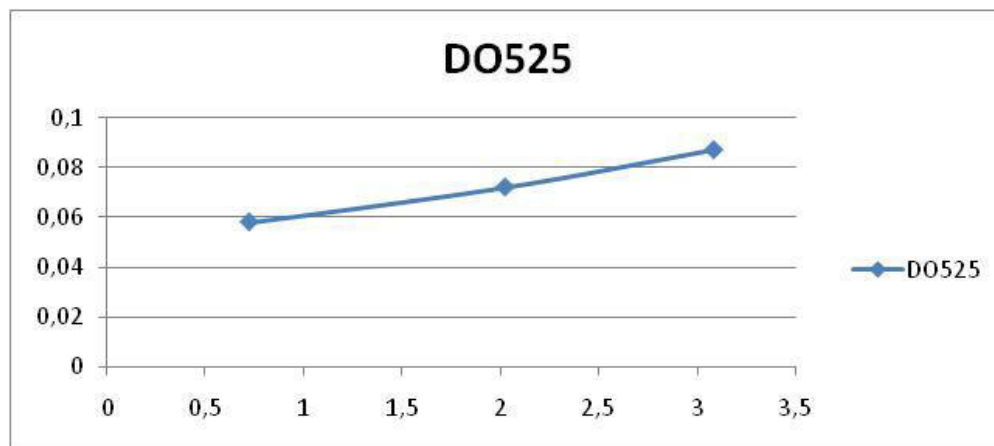
**Y** densité optique lue à 525 nm

X	720	2020	3080
Y	0,058	0,072	0,087

## Résultats et discussions

Tracé du graphique  $DO_{525} = f(\text{cellules})$

Nombre des (x) cellules/ml	0,72	2,02	3,08
DO à 525 nm (Y)	0,058	0,072	0,087



**Figure 4:** Courbe des valeurs de DO en fonction de nombre de cellules par ml

### Commentaires

La concentration en cellules de la culture ayant servi à ce dénombrement peut ainsi être évaluée.

La DO de 0,087 correspond à 3080 cellules par ml. Mais compte tenu du fait que cette suspension est une dilution à  $10^{-4}$ , la concentration en cellules de la suspension mère est de  $308 \cdot 10^5$  cellules/ ml

Nous remarquons toutefois que si on avait fait le calcul avec la suspension fille de dilutions  $10^{-5}$  ou  $10^{-6}$  la valeur calculée de la concentration en cellules de la suspension mère est différent.

Cette méthode convient mieux à des formes de cellules arrondies tel que la forme levure de *Candida albicans*. Et dès le moment où en présence à la fois d'un et de la forme hyphale, les opérations de dilution deviennent ainsi moins précises.

Pour essayer de minimiser cette erreur, nous avons pour chacun de nos tests ajusté la taille de l'inoculum en nous repérant à un intervalle de valeur de DO.

Ainsi pour chaque test, la DO lue à 525 nm de la préculture devant servir à l'inoculum a été ajustée à une valeur comprise entre 0,058 et 0,087.



### II.3. TESTS D'ACTIVITE ANTIFONGIQUE

**Tableau –XV:** Activité antifongique des extraits issus de l'extraction-1

(Fractions *ES1He*, *ES1Dc* et *ES1Me*)

Identification de l'extrait	Intervalle de concentration testée en µg/ml		ACTIVITE		Concentration (µg/ml)	Comparaison par rapport au témoin de croissance	
	Valeur inférieure (µg/ml)	Valeur supérieure (µg/ml)	Inactif	Actif			
ES1 He	0	1000		A	1000	NS	
				A	31,25	NS	
				A	15,6	NS	
ES1 Dc	0	1000		A	500	NS	
				A	2	NS	
ES1 Me	0	1000		A	1000	NS	
				A	500	NS	
				A	250	NS	
				A	15,6	NS	
				A	4	NS	
				A	2	NS	

NS: non significatif ; A: actif ; S : Significatif ; NS : Non significatif

#### Commentaires:

##### L'extrait ES1He :

Les résultats obtenus pour les 3 puits parmi les 11 testés ont montré des activités ; la différence entre les valeurs respectives des DO pour chacun de ces puits à celle du témoin de croissance **n'est pas significative**.

Par ailleurs, il est difficile de déterminer la valeur de la CMI car la place des « **puits révélant une activité** » sur la gamme des concentrations étudiées semble aléatoire.

Nous pensons que ceci serait lié au fait que l'extrait hexanique, se dissolvant très mal dans notre milieu de culture, n'est pas réparti de manière homogène et conformément au protocole de dilution prévu.



### L'extrait ES1Dc:

L'extrait se dissout très mal dans notre milieu d'essai.

Une activité a été notée au niveau de 2 puits ; mais la différence entre leur valeur en termes de densité optique et celle du témoin de croissance **n'est pas significative**.

Par ailleurs, il est difficile de déterminer la valeur de la CMI car la place des « **puits révélant une activité** » sur la gamme des concentrations étudiées semble aléatoire.

Nous pensons que ceci serait aussi lié au fait que l'extrait dichlorométhanoïque, se dissolvant très mal avec notre milieu de culture, n'est pas reparti de manière homogène et conformément au protocole de dilution prévu.

### L'extrait ES1Me:

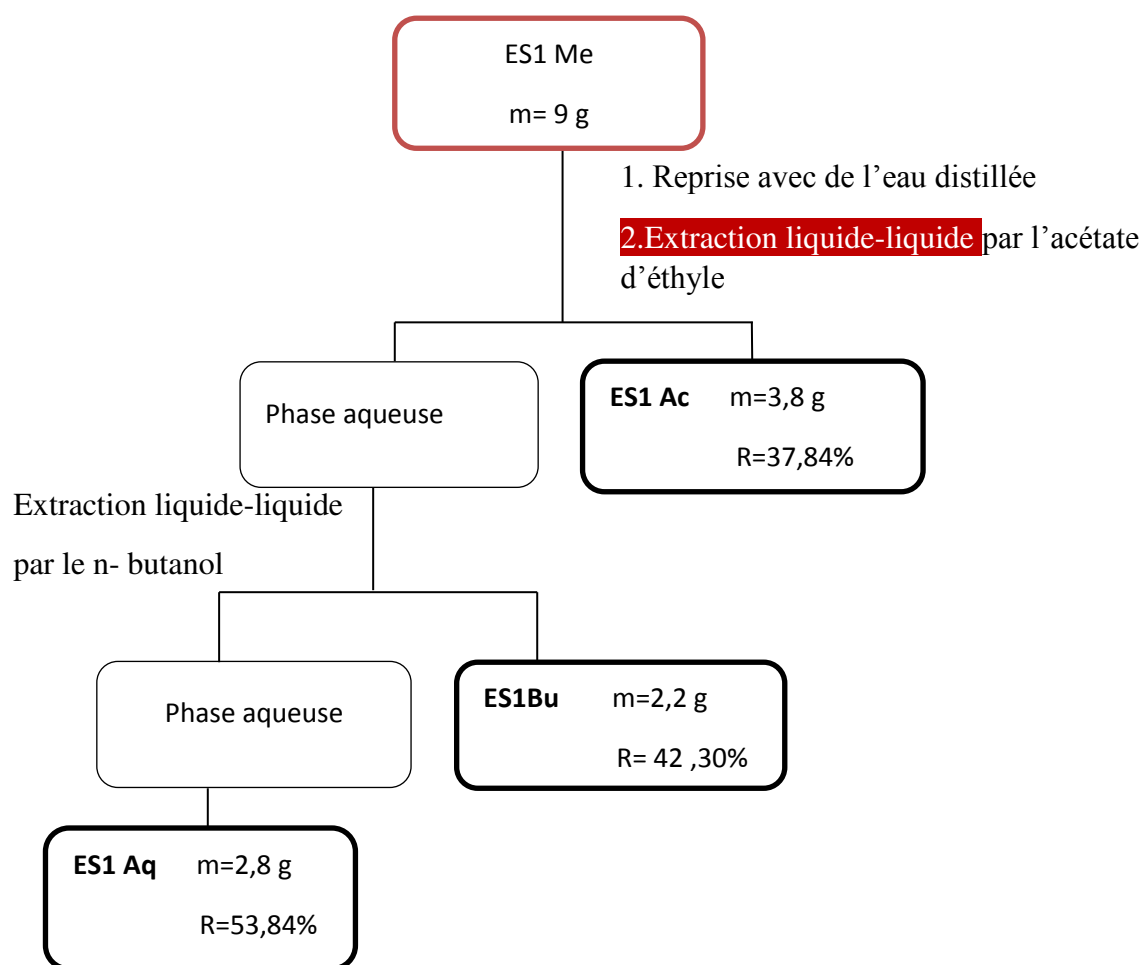
Cet extrait se dissout très bien dans notre milieu d'essai

Une activité à toutes les concentrations testées comprises entre 0 et 1000µg/ml a été notée;

Toutefois, la différence entre d'une part les valeurs de DO respectivement lues pour chaque essai et celle du témoin de culture calculée par le test de Student n'est pas significative ;

Il n'y aurait pas une augmentation de l'activité parallèlement à celle de la concentration de l'extrait dans le milieu d'essai

L'extrait méthanolique, actif et plus soluble dans notre milieu d'essai, est repris avec de l'eau distillé et soumis à une extraction liquide-liquide successive avec l'acétate d'éthyle et le n-butanol. Le schéma d'extraction est résumé dans la figure 5.



**Figure 5:** schéma d'extraction 1 par extraction liquide-liquide

ES1 Ac: extrait acétate d'éthyle

ES1 Bu: extrait butanolique

ES1 Aq: extrait aqueux

Ces extraits sont soumis à des tests antifongiques (voir § II.1.1.) et le tableau XVI montre l'activité antifongique des extraits issus du partage liquide-liquide de l'extrait méthanolique.

## Résultats et discussions

**Tableau –XVI:** Activité antifongique des extraits issus de l'extraction- 1  
(Fractions ES1Ac, ES1Bu et ES1Aq)

Identification de l'extrait	Intervalle de concentration testée (en µg/ml)		ACTIVITE		Concentration (µg/ml)	Comparaison par rapport au témoin de croissance		CMI (µg/ml)
	Valeur inférieure (µg/ml)	Valeur supérieure (µg/ml)	Inactif	actif				
ES1Ac	0	1000	INA		1000			
ES1Bu	0	1000		A	1000		S	7.8
				A	500		S	
				A	250		S	
				A	125		S	
				A	62,5		S	
				A	31,25		S	
				A	15,6		S	
				A	7,8		S	
			INA		4			
			INA		2			
ES1 Aq	0	1000	INA		1000			125
			INA		500			
				A	250	NS		
				A	125		S	
				A	15,6		S	
			INA		4			
			INA		2			

A: Actif ; INA: Inactif ; S: Significatif ; NS: non significatif

### Commentaires:

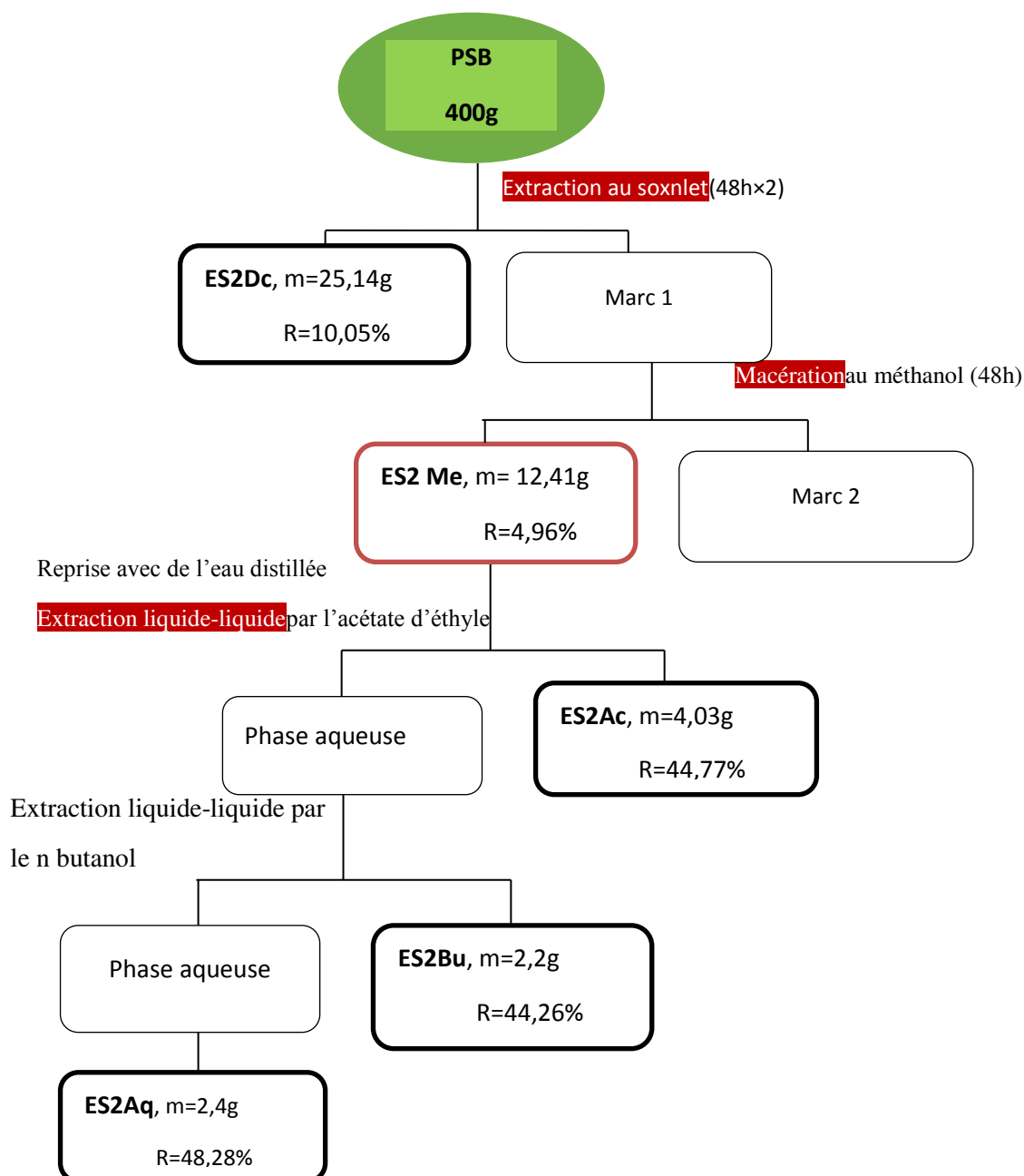
- **L'extrait ES1Ac** est inactif pour le schéma d'extraction-1 dans l'intervalle de concentration étudié
- **L'extrait ES1Bu** est actif dans l'intervalle 7,8 à 125 µg/ml et la différence des DO par rapport à celle des témoins de croissance est significative. La valeur de la CMI est de 7,8µg/ml.

## Résultats et discussions

- **L'extrait ES1Aq** est actif dans l'intervalle de concentration 15,6 à 250µg/ml.

Nous avons essayé une autre voie en procédant dans la première étape par une extraction au soxhlet avec du dichlorométhane pour extraire les produits peu et moyennement polaires. Une telle méthode consomme peu de solvant et réduit la durée d'extraction.

### III PROCEDE D'EXTRACTION N°2 ET TESTS D'ACTIVITE ANTIFONGIQUE DES EXTRAITS



**Figure 6: Schéma de l'extraction 2 et rendements**

ES2 Me: extrait méthanolique  
ES2Ac: extrait acétate d'éthyle  
ES2Bu: extrait butanolique  
ES2Aq: extrait aqueux

## *Résultats et discussions*

Le Tableau **XVII** présente les résultats des tests antifongiques.

**Tableau-XVII: Activités antifongiques des extraits issus de l'extraction- 2**

Identification de l'extrait	Intervalle de concentration testée (en µg/ml)		ACTIVITE		Concentration (µg/ml)	Comparaison par rapport au témoin		CMI (en µg/ml)
	Valeur inférieure (µg/ml)	Valeur supérieure (µg/ml)	Inactif	Actif				
<b>ES2Ac</b>	<b>0</b>	<b>1000</b>		<b>A</b>	<b>1000</b>		<b>S</b>	<b>62,5</b>
				<b>A</b>	<b>500</b>		<b>S</b>	
				<b>A</b>	<b>250</b>		<b>S</b>	
				<b>A</b>	<b>125</b>		<b>S</b>	
				<b>A</b>	<b>62,5</b>		<b>S</b>	
				<b>A</b>	<b>31,3</b>	<b>NS</b>		
				<b>A</b>	<b>4</b>	<b>NS</b>		
				<b>A</b>	<b>2</b>	<b>NS</b>		

A: Actif ; S: Significatif ; NS: non significatif

### **Commentaire :**

L'extrait ES2Ac est actif jusqu'à la concentration de 2µg/ml et la différence d'activité par rapport au témoin de croissance est significative jusqu'à 62,5 µg/ml. Vu le résultat intéressant du test antifongique, il nous a semblé opportun de procéder à un test de toxicité aigüe de l'extrait avant d'entreprendre la purification.

### **V. TEST DE TOXICITE AIGUE DE L'EXTRAIT ES2Ac**

Le test consiste à évaluer la mortalité provoquée par l'administration en une seule fois de doses croissantes de l'extrait brut codé S2Ac à des lots de souris SWISS, chaque animal d'un même lot recevant une dose identique. (Voir§II.2.3.2).

Des symptômes sont apparus après l'administration des doses, donnés dans le tableau XVIII

## *Résultats et discussions*

**Tableau- XVIII: Symptômes observés par les animaux après l'administration du produit ES2Ac**

Lot n°	Nb de souris	Poids moyen (g)	Dose administrée (mg/kg)	Mortalité	Observations				
					Immédiat	10minutes	20 minutes	12heures	24heures
1	5	28 ,4	450	5/5 (après 24h)	Diminution de l'activité motrice	Diminution de l'activité motrice	Diminution de l'activité motrice	Paralysie des pattes postérieures	Paralysie des pattes postérieures
2	5	27 ,2	400	5/5 (après 24h)	Diminution de l'activité motrice	Diminution de l'activité motrice	Diminution de l'activité motrice	Paralysie des pattes postérieures	Paralysie des pattes postérieures
3	5	24 ,8	350	5/5(après 24h)		Diminution de l'activité motrice	Diminution de l'activité motrice		Paralysie des pattes postérieures
4	5	30	300	5/5 (après 24h)		Diminution de l'activité motrice	Diminution de l'activité motrice		Paralysie des pattes postérieures
5	5	31,6	250	5/5 (après 24h)		Diminution de l'activité motrice	Diminution de l'activité motrice		Paralysie des pattes postérieures
6	5	28,4	200	5/5 (après 24h)		Diminution de l'activité motrice	Diminution de l'activité motrice		Paralysie des pattes postérieures
7	5	28	150	5/5 (après 24h)		Diminution de l'activité motrice	Diminution de l'activité motrice		Paralysie des pattes postérieures
8	5	30	100	5/5 (après 24h)		Diminution de l'activité motrice	Diminution de l'activité motrice		Paralysie des pattes postérieures
9	5	26,8	50	0/5 (après 24h)					



La patte arrière droite est paralysée



Placé sur le dos, la souris n'arrive plus à se remettre sur ses pattes.

**Figure 7: photo des souris au cours du test de toxicité**

### Commentaires :

La détermination de la toxicité aigüe consiste à évaluer à l'aide de méthode appropriée la mortalité provoquée par l'administration en une seule fois de doses croissantes du produit à tester. Concernant notre expérimentation, nous avons fait les observations suivantes :

#### Symptômes observés :

Nous avons noté dès la 10<sup>ème</sup> minute après l'administration de l'extrait et à partir de la dose de 100 mg/kg, une diminution progressive de l'activité motrice de l'animal suivie d'une paralysie de pattes postérieures, alors que l'animal reste toujours éveillé; ses pattes antérieures peuvent toujours s'accrocher aux grilles et ses yeux restent bien ouverts. Mise sur le dos, la souris n'arrive plus à se remettre sur ses pattes;

Ces manifestations observées assez tôt pour les doses très élevées (à 400 et 450 mg/kg) et décelables quoique faiblement exprimées aux doses plus faibles sont irréversibles jusqu'à la mort de la souris.

En nous référant à l'ouvrage élaboré par SANDBERG (1990), ces signes observés seraient imputables à une dépression du système nerveux central ; l'extrait ES2Ac contiendrait un principe qui agirait comme un curarisant.

#### Pourcentage de mortalité :

- 50 mg/kg qui est la plus petite dose testée ne provoque aucune mortalité ; à partir de 100 mg/kg, tous les animaux testés ont succombé.
- Nous n'avons pas pu évaluer des valeurs intermédiaires pour déterminer le **DL50** tel que décrit dans la partie « matériels et méthodes » ; l'extrait dont nous disposions n'était plus suffisant pour ce faire.
- Nous notons toutefois que la quantité d'extrait administré à chaque souris du lot 9 pour avoir une dose de 50mg /kg est de **1340µg** et celle du lot 8 (dose de 100 mg/kg) est de **3000 µg**. Ces valeurs sont élevées si on le compare à la CMI de l'extrait sur le développement de la forme hyphale de *Candida albicans* qui est de **62,5µg/ml**.

Mais, on ne peut pas, à ce niveau, se prononcer sur une éventuelle interférence ou lien de ces manifestations avec l'activité antifongique de l'extrait d'*Abrahamia* sur *Candida albicans* qui est le principal objet de ce travail.

### **V. CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE DES EXTRAITS ACTIFS: ES1Bu et ES2Ac**

Les extraits ES1Bu et ES2Ac, se sont avérés les plus actifs, ont été sélectionnés pour être soumis à des tests de caractérisation afin de vérifier la présence ou non des classes de métabolites secondaires déjà détectés lors du screening phytochimique de l'extrait hydroéthanolique à 80% et de nous permettre de mieux choisir les techniques chromatographiques à utiliser Pour la suite des travaux. Les résultats de ces tests sont résumés dans le Tableau **XIX**.

**Tableau-XIX : Résultats du criblage phytochimique des extraits actifs**

FAMILLES CHIMIQUES		ES1Bu	ES2Ac
Alcaloïdes		-	-
Anthraquinones		+	+
Iridoides		-	-
Flavonoïdes	Leucoanthocyane	+	+
	Flavones	+	+
	Flavonols	+ /-	+
Saponosides		+	-
Stéroïdes et triterpènes	Stérol insaturé	-	+
	tri terpènes	-	+
	Stéroïdes	-	+
Tanins et polyphénols	Tanins	+	+
	Polyphénols	+/-	+
	Pyrogallols	+	+
Coumarine		-	-

Les tests phytochimiques ont permis de mettre en évidence l'absence des stéroïdes et des tritérènes dans l'extrait ES1Bu. Les familles chimiques présentes dans l'extrait brut hydroéthanolique sont retrouvées dans l'extrait ES2Ac, c'est à dire les composés stéroïdiques et terpéniques sont épuisés par l'extraction à l'acétate d'éthyle, l'extraction a présenté une certaine sélectivité.



### VI FRACTIONNEMENT BIOGUIDE ET TESTS D'ACTIVITE DES EXTRAITS ACTIFS: ES1Bu et ES2Ac

Les extraits butanolique ES1Bu (CMI = 7,8 $\mu$ g / ml) et acétate d'éthyle ES2Ac (CMI = 62,5  $\mu$ g / ml) ont montré la meilleure activité antifongique. Afin d'isoler la ou les molécules responsables de l'activité biologique, les deux extraits ont été soumis à des investigations phytochimiques et biologiques approfondies. Deux procédés de séparation chromatographique sont détaillés dans la partie **matériels et méthodes** (voir §II.1.4 )

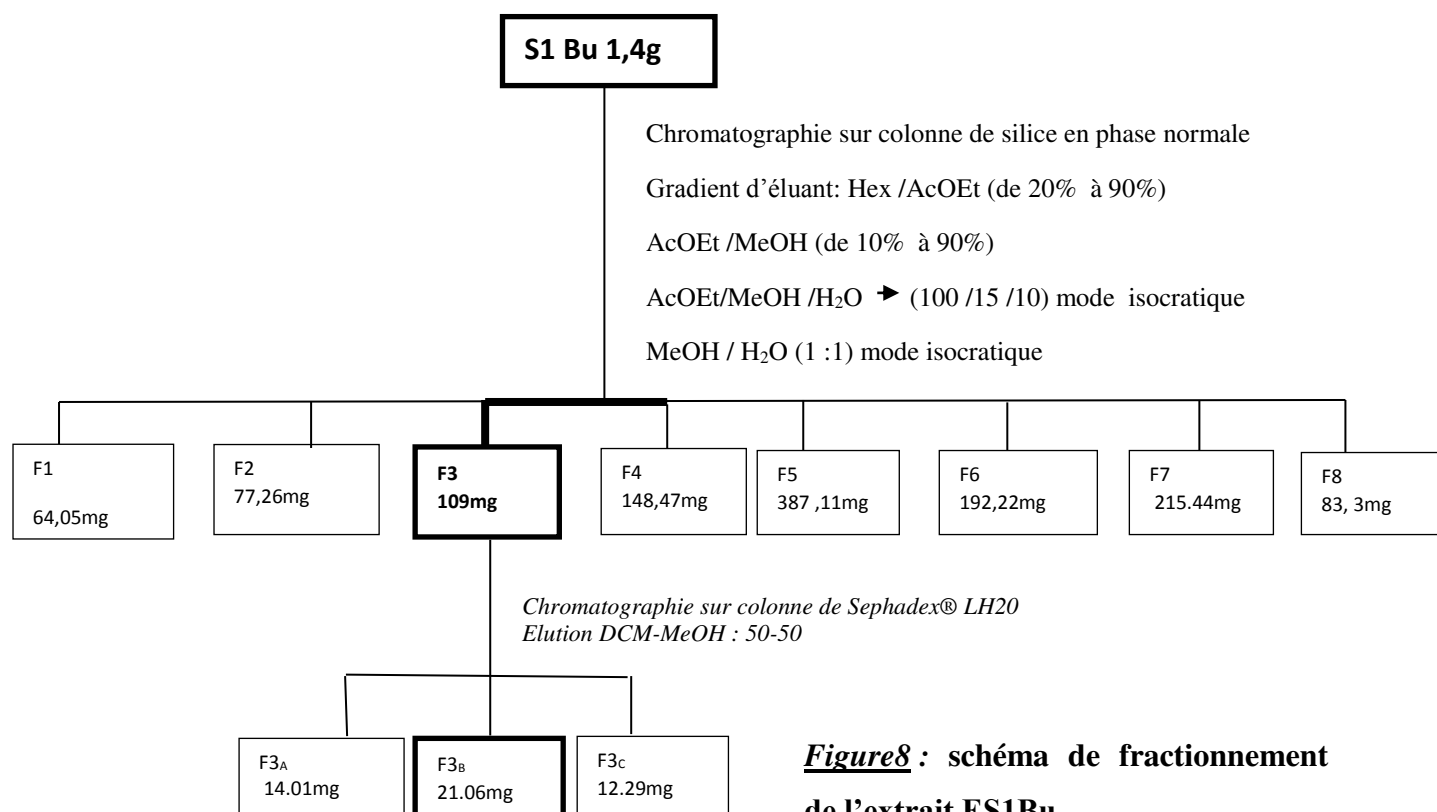
Les fractions, qui présentent des profils identiques en CCM, sont rassemblées puis soumises aux tests antifongiques. La fraction la plus active est ensuite purifiée.

#### a) Fractionnement bioguidé de l'extrait butanolique ES1Bu

L'extrait ES1Bu, qui a présenté une activité significative, a subi en premier lieu un fractionnement par chromatographie d'adsorption sur gel de silice en phase normale éluée successivement par les mélanges de solvant sus cités (voir § I.4.1.1) pour donner 08 fractions groupées. Les fractions rassemblées ainsi obtenues ont été soumises aux tests antifongiques AAF dont les résultats sont résumés dans le Tableau **XX**.

La fraction F3 la plus active, a été fractionnée par chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex LH 20, éluée avec un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH (1 :1) pour donner .trois fractions groupées (F3<sub>A</sub> à F3<sub>C</sub>) qui ont été soumises aux tests antifongiques.

Le schéma de fractionnement de l'extrait ES<sub>1</sub>Bu est récapitulé dans la figure 8.



**Figure8 : schéma de fractionnement de l'extrait ES1Bu.**

## *Résultats et discussions*

**Tableau XX:** Résultats du test antifongique des fractions de S1Bu(F3)

Identification de l'extrait	Intervalle de concentration testée (en µg/ml)		ACTIVITE		Concentration (µg/ml)	Comparaison par rapport au témoin		CMI(en µg/ml)
	Valeur inférieure (µg/ml)	Valeur supérieure (µg/ml)	Inactif	Actif				
F3	0	200		A	200		S	25
				A	100		S	
				A	50		S	
				A	25		S	
				A	12,5	NS		
				A	6,25	NS		
				A	3,13	NS		
			INA		1,6			
			INA		0,8			
			INA		0,4			
F3 <sub>B</sub>	0	200			200		S	<0.39
					100		S	
					50		S	
					25		S	
					12.5		S	
					6.25		S	
					3.13		S	
					1.5		S	
					0.78		S	
					0.39		S	
					0			

A: Actif ; INA : Inactif ; S: Significatif ; NS: non significatif

### **b) Fractionnement bioguidé de l'extrait ES2Ac**

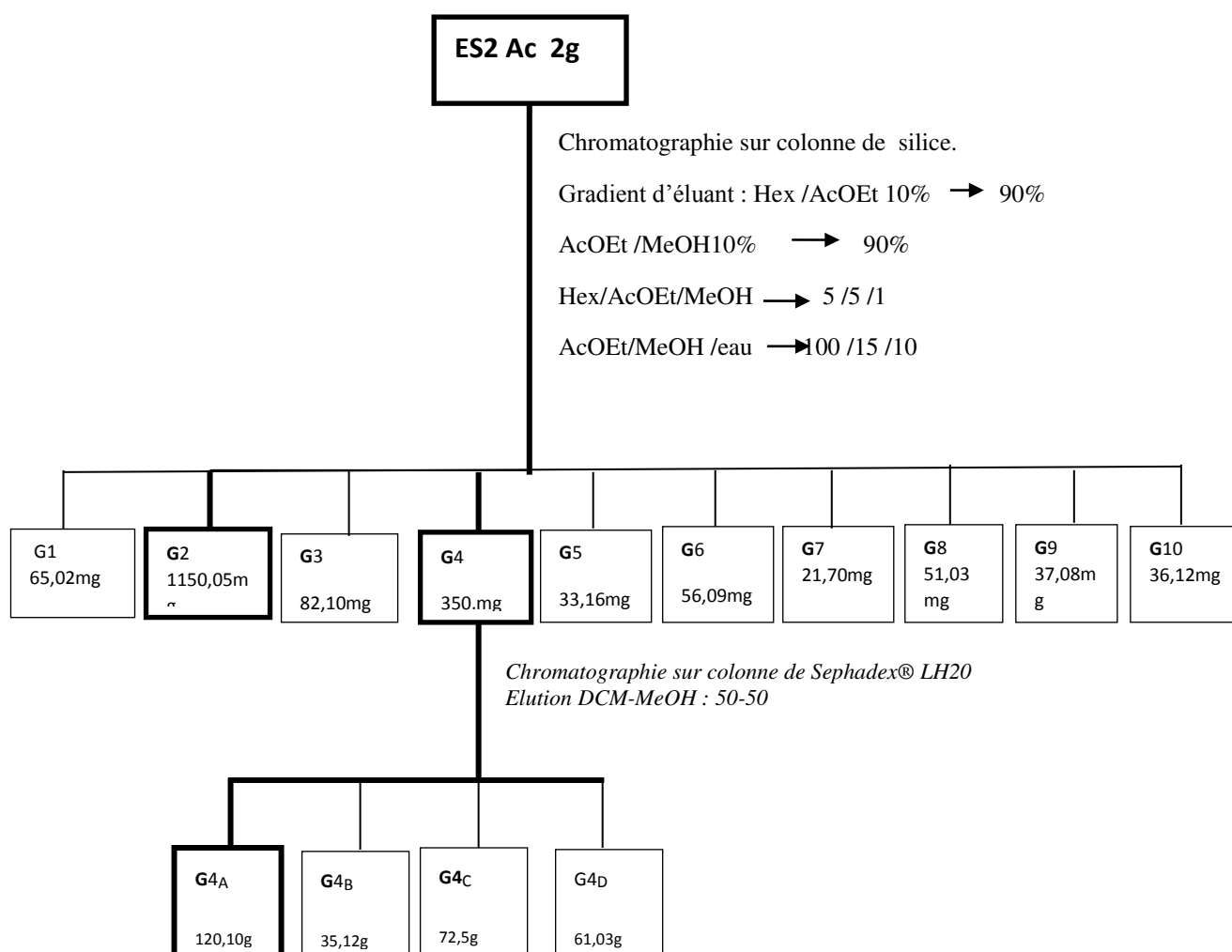
Conformément aux résultats du criblage phytochimique et de la CCM, les constituants d'ES2Ac se trouvent dans une gamme de polarité ce qui rend l'isolement des principes actifs délicat.

## Résultats et discussions

L'extrait ES2Ac a été fractionné en premier lieu par chromatographie sur colonne sur gel de silice normale conduisant à l'obtention de 10 fractions groupées. Les deux extraits qui ont eu les plus grandes quantités ont été soumis aux tests antifongiques et les résultats sont rapportés dans le Tableau XXI.

La fraction G<sub>4</sub> la plus active a subi ensuite un fractionnement par chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex LH 20 élue avec le mélange MeOH/ H<sub>2</sub>O (1:1) permettant d'obtenir 4 fractions groupées qui ont été soumises aux tests biologiques.

Les résultats de ces tests sont rapportés dans le tableau XXII. Le schéma de fractionnement de l'extrait ES2A c'est présenté dans la figure 9.



**Figure 9** : schéma de fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle ES2Ac

## *Résultats et discussions*

**Tableau XXI: Résultats du test antifongique des fractions de ES2Ac (G2 et G4)**

Identification de l'extrait	Intervalle de concentration testée (en µg/ml)		ACTIVITE		Concentration (µg/ml)	Comparaison par rapport au témoin		CMI (en µg/ml)
	Valeur inférieure (µg/ml)	Valeur supérieure (µg/ml)	Inactif	Actif				
S2Ac G2	0	200		A A A	200 100 50	NS	S S	100
S2Ac G4	0	200		A A A A A A A A A A	200 100 50 25 12,5 6,25 3,12 1,56 0,78 0,39		S S S S S S S S S S	<0.39

A: Actif ; INA, Inactif S: Significatif ; NS: non significatif

### **Commentaires :**

- L'extrait G2 est actif à 100 et 200µg/ml; la différence entre les valeurs de DO y afférent et celles des témoins de culture est significative .La valeur de la CMI serait de 100 µg/ml;
- L'extrait G4 est actif dans la gamme de concentrations étudiée allant de 0,39 à 200µg/ml; nous constatons que la différence entre la valeur de DO des essais et celle du témoin de culture est significative; la lecture que l'on pourrait en faire est la suivante: CMI est inférieure à 0,39µg/ml.

## Résultats et discussions

**Tableau XXII:** Activités antifongiques des fractions issues de l'extrait G4 ( $G4_A$ ,  $G4_B$ ,  $G4_C$ )

Identification de l'extrait	Intervalle de concentration testée (en $\mu\text{g/ml}$ )		ACTIVITE		Concentration $\mu\text{g/ml}$	Comparaison par rapport au témoin		CMI (en $\mu\text{g/ml}$ )
	Valeur inférieure ( $\mu\text{g/ml}$ )	Valeur supérieure ( $\mu\text{g/ml}$ )	Inactif	Actif				
<b>G4<sub>A</sub></b>	0	1000		Actif	1000		S	<2
				Actif	500		S	
				Actif	250		S	
				Actif	125		S	
				Actif	62,5		S	
				Actif	31,3		S	
				Actif	16		S	
				Actif	8		S	
				Actif	4		S	
				Actif	2		S	
					0			
<b>G4<sub>B</sub></b>	0	1000		Actif	1000	NS		
			INACTIF		500			
			INACTIF		250			
			INACTIF		125			
			INACTIF		62,5			
			INACTIF		31,3			
			INACTIF		16			
			INACTIF		8			
			INACTIF		4			
			INACTIF		2			
					0			
<b>G4<sub>C</sub></b>	0	1000		Actif	1000	NS		
				Actif	500	NS		
				Actif	250	NS		
				Actif	125	NS		
				Actif	62,5		S	
				Actif	31,3		S	
				Actif	16		S	
				Actif	8	NS		
				Actif	4	NS		
				Actif	2	NS		

## Résultats et discussions

**Tableau XXIII: Activité antifongique des fractions issues de l'extrait G4** ( $G_{4D}$ )

Identification de l'extrait	Intervalle de concentration testée (en µg/ml)		ACTIVITE		Concentration (µg/ml)	Comparaison par rapport au témoin		CMI en (µg/ml)
	Min (µg/ml)	Max (µg/ml)	Inactif	Actif				
<b>G<sub>4D</sub></b>	0	1000		A	1000	NS		
				A	500	NS		
				A	250	NS		
				A	125	NS		
			INA		62,5			
			INA		31,3			
			INA		16			
			INA		8			
			INA		4			
			INA		2			
					0			

A : Actif ; INA : Inactif ; S : Significatif ; NS : non significatif

- Commentaires :

- L'extrait **G<sub>4A</sub>** a la meilleure activité antifongique; il est actif de 2 à 1000µg/ml et sa CMI est <2µg/ml.
- L'extrait **G<sub>4B</sub>** n'est actif qu'à 1000 µg/ml et par ailleurs cette valeur n'est pas significative.

L'extrait **G<sub>4C</sub>** est actif de 0 à 1000 µg/ml mais la différence entre ces valeurs et celles du témoin de croissance n'est pas significative; il existe 3 points de mesure où les valeurs sont significatives mais il est difficile d'évaluer la CMI avec les données expérimentales obtenues.

L'extrait **G<sub>4D</sub>** est actif entre 125 et 1000µg/ml mais la différence entre les valeurs de DO s'y rapportant et celles du témoin de culture n'est pas significative. De 62.5 µg/ml à 2µg/ml l'extrait est inactif.

### CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'étude phytochimique bioguidée d'*Abrahamia deflexa* rentre dans le cadre de la dynamique de recherche de nouveaux agents antifongiques et antibactériens du programme d'activité du CNARP.

Le criblage phytochimique, réalisé sur un extrait hydroéthanolique à 80% de la plante, a révélé la présence de métabolites qui sont situés dans une zone de polarité et appartenant à une gamme de poids moléculaires. Ceci nous a poussés à mettre au point une méthode d'extraction successive avec des solvants de polarité croissante. L'activité des extraits obtenus a été évaluée *in vitro* sur *Candida albicans*. L'extrait butanolique codé ES1Bu (CMI=7,8 µg/ml) et l'extrait à l'acétate d'éthyle noté ES2Ac (CMI=62,5 µg/ml) ont montré une activité antifongique prometteuse.

Le criblage phytochimique effectué sur les deux extraits actifs a permis de mettre en évidence l'absence de composés du type tritérpénique et stéroïdique dans l'extrait butanolique.

Le fractionnement bioguidé des extraits actifs, mettant en œuvre pour chaque cas une chromatographie d'adsorption sur gel de silice en phase normale suivie d'une chromatographie d'exclusion sur gel de Séphadex LH20, a permis de situer une activité notable au niveau de la fraction F3<sub>B</sub> (CMI< 0,39µg/ml) de l'extrait butanolique et de la fraction G4<sub>A</sub> (CMI<2 µg/ml) de l'extrait acétate d'éthyle. Ce processus de purification a entraîné une nette amélioration de l'activité antifongique.

Un test de toxicité effectué sur des souris « SWISS » et avec l'extrait d'acétate d'éthyle ES2Ac a apporté les constats suivants :

- En dessous de la dose de 50mg/kg administré une seule fois par voie péritonéale, il n'y a pas de mortalité ;
- de 100 mg/kg à 450 mg/kg. les 5 souris des lots sont toutes mortes pendant la durée de l'observation qui est de 24 heures ;
- à partir de 100 mg/kg et jusqu'à 450 mg/kg, une paralysie des pattes postérieures des souris et la mort de l'animal après 24 heures.

En nous référant à l'ouvrage produit par (SANDBERG, 1990) nous pensons que les signes observés seraient imputables à une dépression du système nerveux central. Ainsi en plus de l'activité antifongique, principal objet de notre travail, l'extrait ES2Ac agirait comme un curarisant.

## *Conclusion et Perspectives*

---

En perspective, notre travail sera axé principalement à:

- la poursuite de l'isolement et de l'identification de(s) molécule(s) potentiellement antifongique(s) et antibactérienne(s), issues des extraits actifs ES1Bu et ES2Ac ;
- l'évaluation de la toxicité aigüe et de l'activité antifongique de (s) fraction(s) active(s) et des principe(s) antifongique(s) et antibactérien (s).



**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

### **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. **ADJANOHOUN, E. J., ADJAKIDJE, V., AHYI, M. R. A., AKÉ ASSI, L.,** (1989) Médecine traditionnelle et pharmacopée : contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Togo. *ACCT*, 671.
2. **AMSERHAM,** (1978) Séphadex LH-20 chromatography in organic solvents .*Pharmacia Fine Chemicals AB*,10.
3. **AUBERT, M.F.A.,** (1982) une méthode simple de calcul des titres des suspensions virales, vaccinales ou séroneutralisantes: la méthode graphique. *rev.sci.tech.off.int.Epiz*, ,1(3) ,823-833.
4. **BENNETT, R.J., JOHNSON, A.D.** (2003) Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *EMBO J.* **22**, 2505-2515.
5. **BENNETT, R.J., JOHNSON, A.D.** (2005) Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu.Rev.Microbiol* 59,233-255.
6. **BOITEAU P.,** (1986) Précis de matière médicale malgache .Médecine traditionnelle et pharmacopée. *Paris. ACCT*, 141.
7. **BORG-VON ZEPELIN, M., BEGGAH S., BOGGIAN K., SANGLARD D. AND M. MONOD.,** (1998) the expression of the secreted aspartyl proteinases sap4 to sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages .*Microbiology*. 28, 543-554.
8. **BLANCHARD-DESCE, M., FOSSET, B., GUYOT, F., JULIEN, L., PALACIN S.,** (1998) Chimie Organique Expérimentale. *Hermann Edition*, 387.
9. **BRUMMITT, R. K.,** (1998) Vascular plant, Family and genera. England. *Royal botanic garden Kew*, 804.
10. **CRONQUIST, A.,** (1988) the evolution and classification of the flowering plant.2<sup>nd</sup>edition.*The New York Botanical Garden*.
11. **EGGER, K.,** (1964) plante médicinale. *Journal de pharmacognosie*.271.
12. **EHAB, A., RAGAB, MOHAMMED, H., HAZEM, A., HASSAN, A.,** (2010) Flavanone glycoside from *Gleditsiacaspi*. *Journal of natural products* 3:36-46.
13. **EGGIMANN, P., J. GARBINO, AND PITTET, D.,** (2003) Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis*, 3:685-702.
14. **FONG, H., TIN W., FARNSWORTH, N.R.,** (1997) Phytochemical screening. *Rev.universite of Illinois, Chicago, Sc*, 275,218-220.

## Références bibliographiques

---

15. GANZHORN, J.U., LOWRY, P.P., SCHATZ, G.E. et SOMMER, S., (2001). The biodiversity of Madagascar: one of the world's hottest hotspots on its way out. *ORYX* 4, 346-348.
16. GILLES, J., (1974) Calcul des index de toxicité aiguë par la méthode de régression linéaire. Comparaison à la méthode de Karber et Behrens. *Eur J Toxicol Environ Hyg. Mar-Apr;7(2)*, 77-84.
17. GUÉDÉ-GUINA, F., VANGAH-MANDA, M., HAROUNA, D. & BAH, C. (1993). Potencies of MISCA, a plant source concentrate against fungi *Submitted to J. of Ethno pharmacol.* 14 (2) 45-53.
18. HARBONE, J. B., (1984) Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. 2e edition. *New York: Chapman and hall*, 38.
19. HIMEJIMA, M., KUBO, I., (1993) Fungicidal activity of polygodial in combination with anethole and indole against *Candida albicans*. *J. Agric. Food Chem.*, 41: 1776-1779.
20. HUFTY (M), (2001) transactions et action collective dans la gestion environnementale. (*support de cours DEA Forêt*).
21. HOUGHTON, P.J. AND RAMAN, A., (1998) Laboratory Hand book for Fractionation of Natural Extracts. *Chapman et Hall, London, 1<sup>st</sup> ed.* pp100-107.
22. HOSTETTMANN, K., MARSTON, A., HOSTETTMANN, M., (1998) Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Product Isolation. *Springer Verlag Edt.*
23. HOERHAMMER, L., AGNER, H., HEIN, K., (1964) Silica gel-thin layer chromatography of flavonoids. *Journal of chromatography* 13, 235-237.
24. IKAN, R., KASHMAN, J., BERGMANN, E. D., (1964) Thin-layer chromatography of tetra- and pentacyclic triterpenes. *Journal of chromatography* 14, 275-279.
25. JORK, H., FUNK, W., FISCHER, W., WIMMER, H., (1994). Thin layer chromatography Reagents and Detection methods. vol 1. *VCH. Verlags gesellschaft, weinheim, Cambridge, New york.*
26. KRA, A. M., (2001). Evaluation et amélioration par séquençage chromatographique d'une action antifongique de MISCA contre *Aspergillus fumigatus*. Thèse de doctorat de 3ème cycle. Biochimie, Microbiologie. *Université de Cocody, UFR. Biosciences. Abidjan, Côte d'Ivoire.* 124 p.
27. KOEHLIN J., GUILLAUMET J., MORAT P., (1997). Flore et végétation de Madagascar. *Vaduz Ganter, Germany.*

## Références bibliographiques

---

28. **KUBO, I. & TANIGUCHI, M.**, (1988) Polygodial, an antifungal potentiator .*Journal of Natural Products* 51 (1), 22-29.
29. **LEE, S.H., LEE, J.R., LUNDE, C.S. & KUBO, I.**, (1999) In vitro antifungal susceptibilities of *Candida albicans* and other fungal pathogens to polygodial, a sesquiterpene dialdehyde .*Planta Medica* 65, 204-208.
30. **LAVERDIÈRE, M. et al.**, (2006) Progressive loss of echinocandin activity following prolonged use for treatment of *Candida albicans* oesophagitis .*J. Antimicrob Chemother* 57, 705-708.
31. **LAURENCE D.R., BACHARACH A.L.**, (1964), evaluation of drug activities: pharmacometrics. *Academic press. London and New York*. vol 1
32. **LAUTIER, J.**, (1998) Manuel de travaux pratiques en pharmacodynamie. *Université de Montpellier Analyses biologiques et biochimiques 2<sup>ème</sup> année*. 74.
33. **OREN A.**, (1986), *Journal of general microbiology* 132, 3084-3088.
34. **MABBERLEY, D. J. .**, (2008) the plant book .*A portable dictionary of the plants*. 858.
35. **MATTHEWS, J.S.**, (1963) *Biochimie. Biophys. Acta*, 69, 163.
36. **MCCALLION, R.F., COLE, A.L.J, WALKER, J.R.L., BLUNT, J.W. AND MUNRO, H.G.**, (1982) antibiotic substances from newzealand plants. Polygodial, an anti-*Candida* agent from *Pseudowintera colorata* .*Planta Medica* 44, 34-38.
37. **MARIO, C.**, (2004) Structure and bonding in metal sulfoxide complexes: an update .*coordination Chemistry Reviews*, vol. 248, 351–375.
38. **PERRIER DE LA BATHIE, H.** (1946). Flore de Madagascar et de Comores Famille . 114.
39. **RABODOMALALA Violette Marie Irène**, (2008). Mémoire pour l'obtention de diplôme d'étude approfondie: contribution l'étude chimique et antibactérienne de *Protorhus ditimena* (ANACARDIACEAE). *FACULTE DES SCIENCES. UNIVERSITE D'ANTANANARIVO. Département chimie organique*.
40. **RUIZ-HERRERA, J., M. V. ELORZA, E. VALENTIN, AND R. SENTANDREU** (2006). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res.* 6, 14-29.

## Références bibliographiques

---

41. **SANDBERG FIN, RATSIMBASON M., ANDRIANTSOA M.** (1990) Criblage pharmacologique de plantes médicinales ; .Vienne : *organisation des nations unies pour le développement industriel*.28
42. **SCHWARTZ, D.**, (1969) Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes .3<sup>ème</sup> édition. *Flammarion médecine –sciences*.141-58.
43. **SCHATZ, G.E.**, (2001) Flore générique des arbres de Madagascar. *Royal Botanic Garden et Missouri Botanical Garden*.516.
44. **SEVILLA M-J, F. C.ODDS.**, (1986) Développement of *Candida albicans* hypha in growth media variation in growth rates, cells dimensions and timing of morphogenetic events. *Journal of General Microbiology* , 132, 3083-3088.
45. **SHEPPARD, DC et al.**, (2004) Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans* .*J Biol Chem*.279: 30480-9.
46. **SUDBERY P, N. GOW AND J. BERMAN.** (2004) états distincts morphogéniques de *Candida albicans*. *Trends in microbiology*, 12 (7):317-24.
47. **SCORZONI L.1, BENADUCCI T.1, ALMEIDA A.M.F.1, SILVA D.H.S.2 BOLZANI V.S.2, MENDES-GIANNINI M.J.S.1.**, (2007).Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. *Rev. Ciênc. Farm.BásicaApl.* 28 (1), 25-34.
48. **TYIHIK E., VAGUJFALVI D., HAGONY.P.L.** (1963).Révélateurs pour la chromatographie en CCM et sur papier .*J.Chromatog*, 11,45.
49. **QUANSAT. (N)**, (1996).Problème de gestion des plantes médicinales à Madagascar. *Les cahiers du CITE spécial Plantes médicinales aromatiques – Revue d'information scientifique et technique – CITE- LAC – série n°4*.
50. **WENDY LEE-YANG et al.** (2002) Comparative Evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST Broth Microdilution Procedures for Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Species.*antimicrob agent chemother*, 46(11), 3644–3647.
51. **WATSON, L. and DALLWITZM, J.**, (1994) The Families of Flowering Plant .*Nordic journal of botany*. 14(5), 486.
53. **WAGNER, PLANT, S.B.**, (1996) Drug Analysis: a Thin Layer Chromatography Atlas, 2.ed. *SpringerVerlag Berlin, Heidelberg, New York*.

## *Références bibliographiques*

---

**54. WHITE, T.C., MARR, K.A, and BOWDEN, R.A.,** (1998).Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol Rev.* *11*,382-402.

### REFERENCES WEBOGRAPHIQUES

1. <http://es.wikipedia.org/wiki/Abrahamia>
2. [http://www.botanywebsite.com/flora of Madagascar/index.php?page=Abrahamia deflexa.](http://www.botanywebsite.com/flora%20of%20Madagascar/index.php?page=Abrahamia_deflexa)

# ANNEXES

### **ANNEXE 1**

#### **Préparation des réactifs révélateurs**

Vanilline sulfurique : Solution A :( 5g de vanilline dans 50ml d'éthanol)

Solution B :( 5ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dans 50ml ethanol)

FeCl<sub>3</sub> 10%: 1g de FeCl<sub>3</sub> dans 10ml d'éthanol

AlCl<sub>3</sub> 1% : 1g d'AlCl<sub>3</sub> dans 100ml d'éthanol

### **ANNEXE 2**

#### **Préparation de milieu Sabouraud :**

Dissoudre 47g de poudre Sabouraud 2% glucose dans 1 litre d'eau distillé, chauffer jusqu'à dissolution complète et stériliser pendant 15 mn dans l'autoclave à 120°C.

### **ANNEXE 3**

Composition des milieux de culture I

#### **Milieu SLGG**

	Composition	
	1litre	200ml
Peptone bactériologique	10g	2g
Glucose	5g	1g
Acide glutamique	0,15g	0,03g

#### **Milieu SSGG**

	Composition	
	1litre	200ml
Peptone bactériologique	10g	2g
Glucose	5g	1g
Acide glutamique	0,15g	0,03g
Agar	17g	0,34g



### **ANNEXE 4**

#### **Criblage phytochimique**

##### **Préparation des extraits bruts**

Placer 50 g de plante dans un ballon de 500ml Additionner 200ml d'éthanol à 80 %. Adapter un réfrigérant .Porter le ballon dans un bain-marie bouillant pendant 1h .Refroidir sous courant d'eau le contenu du ballon et filtré sur Büchner.

##### **SCREENING DES TANINS ET POLYPHENOLS.**

Evaporer la solution équivalente de 5g de plantes dans un cristalliseur ; additionner 15ml d'eau distillé ; chauffer et agiter ; ajouter 4gouttes de solution de NaCl 10% ; filtrer et repartir dans 4 tubes à essais

T1 : témoin de culture

T2 : additionner 4 gouttes de gélatine à 1%.

T3 : additionner 4gouttes de gélatine salé (1% de gélatine + NaCl 10% ; V/V 1/1)

T4 : additionner 4 gouttes de FeCl<sub>3</sub> 10% dans méthanol

##### **SCREENING DES FLAVONOIDES ET LEUCOANTHOCYANES**

Evaporer la solution équivalente à 3g de plante dans un cristalliseur au bain-marie. Refroidir et éliminer les pigments par épuisement avec l'éther de pétrol ; dissoudre le résidu avec l'éthanol puis filtrer repartir le filtrat dans 4 tubes à essais.

T1 : témoin

T2 : ajouter 0.5ml de HCl concentré et tournure de magnésium, observer la coloration après 10 mn. (TEST DE WILLSTATER)

T3 : ajouter 0,5ml de HCl concentré et quelques tournure de magnésium, additionner 1ml d'eau distillé et 1ml d'alcool isoamylique. Après 10mn, observer la coloration de la phase supérieure.

T4 : ajouter 0,5ml de HCl concentré, chauffer pendant 30mn au bain-marie .Laisser refroidir et observer la coloration. (TEST DE BATE-SMITH).

##### **TEST D'ALCALOIDES**

Le screening est effectué en 3 étapes:

Macération

Test préliminaire

Test de confirmation

### 1-macération chlorhydrique

Prendre environ 5g de poudre sèche faire macérer dans HCl 12 % pendant 15mn filtrer éventuellement sur coton diviser dans 4 Tubes à essais ajouter un peu de solution acide si nécessaire pour avoir une solution limpide et claire

Faire le test : T1 sert de témoin

T2 ajouter 5gouttes de réactif de Wagner

T3 ajouter 5gouttes de réactif de Mayer

T4 ajouter 5gouttes de réactif de Dragendorff

L'apparition de précipité indique que le test est positif

### 2-Test préliminaire

A partir de la solution hydro alcoolique précédemment préparé prendre un volume équivalent à 2 g de poudre et placer dans un cristalliseur évaporer l'alcool jusqu'à obtention d'un résidu de consistance sirupeuse ajouter 10ml de solution HCN 2N et agiter à l'aide d'une baguette de verre tout en chauffant dans un bain marie bouillant pendant 3 à 5 mn refroidir la solution jusqu'à température ambiante. Additionner 0,5g de Na Cl Agiter et filtrer. Laver le précipité avec un volume suffisant de HCl 2N

Diviser le filtrat en 4 et procéder comme en 1

### TEST DE SAPONOSIDES

Mettre 1g de plante dans un tube à essai additionner 10ml d'eau distillé et agiter vigoureusement pendant 30 seconde. Placer le tube verticalement pendant 30 mn. Mesurer la hauteur de mousse.

### SCREENING DE STEROIDES ET TRITERPENES

Evaporer la solution alcoolique équivalente à 5 g de plante dans un cristalliseur au bain-marie. Laisser refroidir et additionner dépigmenter par l'éther de pétrole, agiter et filtrer. Additionner 10ml de chloroforme et agiter pendant 5mn .Décanté et sécher la solution avec l'anhydre. Filtrer et repartir dans 4 tubes à essais

T1 : témoin

T2 : additionner 4gouttes de l'anhydre acétique et 4 gouttes de H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> concentré et observer la coloration. (TEST DE LIEBERMAN-BURCHARD)

T3 : incliner le tube à 45°, ajouter 1ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré .observer l'anneau de séparation (TEST DE SALKOWSKI)

T4 : ajouter quelques gouttes de solution méthanolique de FeCl<sub>3</sub> 10% et quelques gouttes d'acide acétique glacial (TEST DE KELLER-KILIANI)

### SCREENING D'IRIDOIDES

Evaporer la solution équivalente de 3g de plante, ajouter 1ml d'HCl 12 % aqueux. Observer la précipitation.

## SCREENING DES COUMARINES

Evaporer la solution alcoolique équivalente à 1g de plante ; ajouter 1ml d'une solution méthanolique de KOH 10% .Observer la fluorescence sous la lumière UV à 254nm.

## ANNEXE 5

### Méthode de microdilution: remplissage des puits

Concentration  (µg/ ml)			Point 1000	Point 500	Point 250	Point 125	Point 62.5	Point 31.25	Point 15.6	Point 7.8	Point 4	Point 2	Point 0	
Colonnes			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C (µg/ml)				1000	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	4	2	0
E1+M.E	A	Blanc	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	4	2	0	
	B	Blanc	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	4	2	0	
	C	Blanc	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	4	2	0	
E1+MNE	D	Blanc	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	4	2	0	
E2+ME	E	Blanc	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	4	2	0	
	F	Blanc	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	4	2	0	
	G	Blanc	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	4	2	0	
E2+MNE	H	Blanc	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	4	2	0	

E1 : Extrait 1 ;

M.E : milieuensemencé

M.N.E : milieu nonensemencé

E2 : Extrait 2

A → H: ligne du puits

1 → 12:colonne du puits

1000 → 2C (µg/ ml) : concentration de l'extrait

## ANNEXE 6

### Numération cellulaire : Dilutions de la suspension fongique de la préculture

Tube n°	Vol.ume (ml)	Milieu SLGG (Vol. en ml)	Dilution (au final)
Tube n°1 :Préculture d'une solution.mère	0	4,5	10
Tube n°2	0,5	4,5	10 <sup>-1</sup>
Tube n°3	0,5	4,5	10 <sup>-2</sup>
Tube n°4	0,5	4,5	10 <sup>-3</sup>
Tube n°5	0,5	4,5	10 <sup>-4</sup>
Tube n°6	0,5	4,5	10 <sup>-5</sup>
Tube n°7	0,5	4,5	10 <sup>-6</sup>
Tube n°8	0,5	4,5	10 <sup>-7</sup>
Tube n°9	0,5	4,5	10 <sup>-8</sup>
Tube n°10	0,5	4,5	10 <sup>-9</sup>
Tube n°11	0,5	4,5	10 <sup>-10</sup>

## ANNEXE 7

### TRAITEMENT DES RESULTATS par le test de student -EVALUATION DE LA CMI de la Fluconazole-

#### Pt 593

	A		B			(x-mA)	(x-mA) <sup>2</sup>	Pt.0µg/ml	(x-mB)	(x-mB) <sup>2</sup>
	Pt. 593		Pt. 0µg/ml		Pt. 593					
1	0,041		0,143			0,016	0,000245		0,011	0,00012
2	0,018		0,115			0,007	5,38E-05		-0,017	0,00029
3	0,017		0,138			0,008	6,94E-05		0,006	3,6E-05
val.moyenne	<b>0,025</b>		<b>0,132</b>		Somme		<b>0,000369</b>	Somme		<b>0,00045</b>

pour ddl=4	s <sup>2</sup> =	0,0002	
α=0,05	Dénom de t=		0,0117
t=2,776	t=	-9,154	

pour le risque 5% la différence **est significative**

## Annexes

Pt 297

	A		B							
	Pt. 297		Pt. 0µg/ml		Pt. 297	(x- mA)	(x-mA) <sup>2</sup>	Pt.0µg/ml	(x- mB)	(x-mB) <sup>2</sup>
1	0,043		0,143			0,006	0,000036		0,011	0,00012
2	0,034		0,115			- 0,003	9E-06		-0,017	0,00029
3	0,034		0,138			- 0,003	9E-06		0,006	3,6E-05
val.moyenne	<b>0,037</b>		<b>0,132</b>		Somme		<b>5,4E-05</b>	Somme		<b>0,00045</b>

pour ddl=4	s <sup>2</sup> =	0,00013	
α=0,05	Dénom de t=		0,0091
t=2,776	t=	-10,407	

pour le risque 5% la différence est **significative**

Pt 148

	A		B							
	Pt. 148		Pt. 0µg/ml		Pt. 148	(x- mA)	(x-mA) <sup>2</sup>	Pt.0µg/ml	(x- mB)	(x-mB) <sup>2</sup>
1	0,031		0,143			0,012	0,000136		0,011	0,00012
2	0,016		0,115			- 0,003	1,11E-05		-0,017	0,00029
3	0,011		0,138			- 0,008	6,94E-05		0,006	3,6E-05
val.moyenne	<b>0,019</b>		<b>0,132</b>		Somme		<b>0,000217</b>	Somme		<b>0,00045</b>

pour ddl=4	s <sup>2</sup> =	0,00017	
α=0,05	Dénom de t=		0,0105
t=2,776	t=	-10,721	

pour le risque 5% la différence est **significative**

Pt 74

	A		B							
	Pt. 74		Pt. 0µg/ml		Pt. 74	(x- mA)	(x-mA) <sup>2</sup>	Pt.0µg/ml	(x- mB)	(x-mB) <sup>2</sup>
1	0,032		0,143			0,009	8,71E-05		0,011	0,00012
2	0,016		0,115			- 0,007	4,44E-05		-0,017	0,00029
3	0,020		0,138			- 0,003	7,11E-06		0,006	3,6E-05
val.moyenne	<b>0,023</b>		<b>0,132</b>		Somme		<b>0,000139</b>	Somme		<b>0,00045</b>

## Annexes

pour ddl=4	s <sup>2</sup> =	0,00015	
$\alpha=0,05$	Dénom de t=		0,0099
t=2,776	t=	-11,076	pour le risque 5% la différence est <b>significative</b>

Pt37

	A		B							
	Pt. 37		Pt. 0µg/ml		Pt. 37	(x-mA)	(x-mA) <sup>2</sup>	Pt.0µg/ml	(x-mB)	(x-mB) <sup>2</sup>
1	0,041		0,143			0,010	0,0001		0,011	0,00012
2	0,019		0,115			0,012	0,000144		-0,017	0,00029
3	0,033		0,138			0,002	4E-06		0,006	3,6E-05
val.moyenne	<b>0,031</b>		<b>0,132</b>		Somme		<b>0,000248</b>	Somme		<b>0,00045</b>

pour ddl=4	s <sup>2</sup> =	0,00017	
$\alpha=0,05$	Dénom de t=		0,0108
t=2,776	t=	-9,391	pour le risque 5% la différence est <b>significative</b>

Pt 18,5

	A		B							
	Pt. 18,5		Pt. 0µg/ml		Pt. 18,5	(x-mA)	(x-mA) <sup>2</sup>	Pt.0µg/ml	(x-mB)	(x-mB) <sup>2</sup>
1	0,045		0,143			0,010	0,000107		0,011	0,00012
2	0,018		0,115			0,017	0,000278		-0,017	0,00029
3	0,041		0,138			0,006	4,01E-05		0,006	3,6E-05
val.moyenne	<b>0,035</b>		<b>0,132</b>		Somme		<b>0,000425</b>	Somme		<b>0,00045</b>

pour ddl=4	s <sup>2</sup> =	0,00022	
$\alpha=0,05$	Dénom de t=		0,012
t=2,776	t=	-8,080	pour le risque 5% la différence est <b>significative</b>

Pt 9,27

	A		B							
	Pt. 9,27		Pt. 0µg/ml		Pt. 9,27	(x-mA)	(x-mA) <sup>2</sup>	Pt.0µg/ml	(x-mB)	(x-mB) <sup>2</sup>
1	0,062		0,143			0,009	8,71E-05		0,011	0,00012
2	0,035		0,115			0,018	0,000312		-0,017	0,00029
3	0,061		0,138			0,008	6,94E-05		0,006	3,6E-05
val.moyenne	<b>0,053</b>		<b>0,132</b>		Somme		<b>0,000469</b>	Somme		<b>0,00045</b>

pour ddl=4	s <sup>2</sup> =	0,00023	
$\alpha=0,05$	Dénom de t=		0,0123
t=2,776	t=	-6,425	pour le risque 5% la différence est <b>significative</b>

## Annexes

### Pt 4,6

	A		B							
	Pt. 4,6		Pt. 0µg/ml		Pt. 4,6	(x- mA)	(x-mA) <sup>2</sup>	Pt.0µg/ml	(x- mB)	(x-mB) <sup>2</sup>
1	0,074		0,143			0,009	8,71E-05		0,011	0,00012
2	0,049		0,115			- 0,016	0,000245		-0,017	0,00029
3	0,071		0,138			0,006	4,01E-05		0,006	3,6E-05
val.moyenne	<b>0,065</b>		<b>0,132</b>		Somme		<b>0,000373</b>	Somme		<b>0,00045</b>

pour ddl=4	s <sup>2</sup> =	0,00020	
α=0,05	Dénom de		0,0117
t=2,776	t=	-5,764	pour le risque 5% la différence est <b>significative</b>

### Pt 2,3

	A		B							
	Pt. 2,3		Pt. 0µg/ml		Pt. 2,3	(x- mA)	(x-mA) <sup>2</sup>	Pt.0µg/ml	(x- mB)	(x-mB) <sup>2</sup>
1	0,097		0,143			0,013	0,000169		0,011	0,00012
2	0,070		0,115			- 0,014	0,000196		-0,017	0,00029
3	0,085		0,138			0,001	1E-06		0,006	3,6E-05
val.moyenne	<b>0,084</b>		<b>0,132</b>		Somme		<b>0,000366</b>	Somme		<b>0,00045</b>

pour ddl=4	s <sup>2</sup> =	0,00020	
α=0,05	Dénom de		0,0116
t=2,776	t=	-4,126	pour le risque 5% la différence est <b>significative</b>

### Pt 1,16

	A		B							
	Pt. 1,16		Pt. 0µg/ml		Pt. 1,16	(x- mA)	(x-mA) <sup>2</sup>	Pt.0µg/ml	(x- mB)	(x-mB) <sup>2</sup>
1	0,090		0,143			0,004	1,6E-05		0,011	0,00012
2	0,084		0,115			- 0,002	4E-06		-0,017	0,00029
3	0,084		0,138			- 0,002	4E-06		0,006	3,6E-05
val.moyenne	<b>0,086</b>		<b>0,132</b>		Somme		<b>2,4E-05</b>	Somme		<b>0,00045</b>

pour ddl=4	s <sup>2</sup> =	0,00012	
α=0,05	Dénom de		0,0089
t=2,776	t=	-5,197	pour le risque 5% la différence est <b>significative</b>

**LA CMI DE "AR1" est inférieure à 1,16µg/ml**

## ABSTRACT

**Nom : HANITRINIAINA**

**Prénom : Véronique**

**Titre du mémoire : Etudes chimique et antifongique d'*Abrahamia deflexa* (ANACARDIACEAE)**

*Abrahamia deflexa* is an endemic plant of Madagascar; this study aims:  
-to evaluate in vitro antifungal activity against a strain of *Candida albicans* ATTC10231,  
-to contribute to the search for new (s) molecule (s) bioactive (s) by bioguidage. Culturing for hyphal morphology, the tests were performed by the method of broth microdilution using a medium called SLGG. The growth of test microorganism in each well of the microtiter plate is evaluated, after incubation at 35 ° C for 48 hours, with a reading of their optical density at 525 nm using a photometer plate reader. Treatment results of comparing the DO525 value of each test medium to that of the growth control was used to assess the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of each extract. This test microorganism's sensitivity to each extract was used for the purification bioguidage work in chemistry.

A phytochemical screening performed on an 80% aqueous alcoholic extract has revealed the presence of polar compounds: flavonoids, anthraquinone, tannins and polyphenols and non-polar compounds and / or low polarity: steroids and triterpenes. This led us to develop a method of extraction of actives compounds with solvents of increasing polarity. The extracts obtained were evaluated in vitro against *Candida albicans*. The butanol extracts (MIC = 7,8 µg / ml) and ethyl acetate (MIC = 62,5 µg / ml), which showed an interesting antifungal activity, underwent bioguided fractionation implementing alternating adsorption chromatography normal phase silica gel and filtration on Sephadex LH-20gel. This purification process allowed us to locate the active compounds and situate significant activity at F3<sub>B</sub> fractions (MIC <0,39µg / ml) the butanol extract and G4<sub>A</sub> (MIC <2 µg / ml) of ethyl acetate extract.

A toxicity test performed on mice "SWISS" and with ES2Ac ethyl acetate extract let us to note the following observations:

- Below the dose of 50mg / kg administered once and intraperitoneally, there is no animals dead,

- from 100 to 450 mg / kg; the 5 mice of the lot are died within 24 hours, elsewhere there is a paralysis of the hind legs of mice and the death of the animal after 24 hours.

Referring to the book published by SANDBERG (1990), we believe that the sign observed are due to depression of the central nervous system; so in addition to the antifungal activity, the main focus of our work. S2Ac extract would act as a curare.

**Keywords:** *Candida albicans*, candidiasis, hyphae, *Abrahamia deflexa*, microdilution, chromatography.

**Encadreurs:** Professeur RAKOTO Danielle Doll

Docteur ANDRIANTSOA Maminirina



## RESUME

**Nom :** HANITRINIAINA

**Prénom :** Véronique

**Titre du mémoire :** Etudes chimique et antifongique d'*Abrahamia deflexa* (ANACARDIACEAE)

*Abrahamia deflexa* est une plante endémique de Madagascar. La présente étude a comme objectif d'évaluer in vitro son activité antifongique vis-à-vis d'une souche de *Candida albicans* ATTC 10231. Le germe-test est cultivé dans un milieu dénommé SLGG de manière à rendre majoritaire la morphologie hyphale qui est la forme pathogène. Le test est effectué par la méthode de microdilution en milieu liquide.

La croissance du germe-test dans chaque puits de la microplaque est appréciée, après une incubation à 35°C pendant 48 heures, par une lecture de leur densité optique à 525 nm à l'aide d'un photomètre lecteur de plaque. Le traitement des résultats consiste à comparer la valeur de DO<sub>525</sub> lue pour chaque milieu d'essai à celle du témoin de croissance ; ceci permet d'évaluer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de chaque extrait. Cette sensibilité du germe-test à chaque extrait a été utilisée pour le bioguidage des travaux de purification effectués en chimie.

Un criblage phytochimique réalisé sur un extrait hydroéthanolique à 80% a permis de détecter la présence de composés polaires : flavonoides, anthraquinone, tanins et polyphénols et de composés apolaires et/ou peu polaires : stéroïdes et triterpènes. Ceci nous a conduits à mettre au point une méthode d'extraction des principes actifs par des solvants de polarité croissante. Les extraits obtenus ont été évalués in-vitro sur *Candida albicans*. Les extraits butanolique (CMI=7,8 µg/ml) et d'acétate d'éthyle (CMI=62,5 µg/ml), qui ont montré une activité antifongique intéressante, ont fait l'objet d'un fractionnement bioguidé mettant en œuvre en alternance une chromatographie d'adsorption sur gel de silice en phase normale et une filtration sur gel de Sephadex LH 20. Ce processus de purification nous a permis de localiser les principes actifs et de situer une activité notable au niveau des fractions F3<sub>B</sub> (CMI< 0,39µg/ml) de l'extrait butanolique et G4<sub>A</sub> (CMI<2 µg/ml) de l'extrait acétate d'éthyle.

Un test de toxicité effectué sur des souris « SWISS » et avec l'extrait d'acétate d'éthyle ES2Ac a apporté les constats suivants :

- En dessous de la dose de 50mg/kg administré une seule fois par voie intra péritonéale, il n'y a pas de mortalité ;
- de 100 à 450 mg/kg, les 5 souris des lots sont tous mortes pendant la durée de l'observation qui est de 24 heures ;
- à partir de 100 et jusqu'à 450 mg/kg, on note une paralysie des pattes postérieures des souris et la mort de l'animal après 24 heures.

En nous référant à l'ouvrage publié par SANDBERG, (1990) nous pensons que les signes observés seraient imputables à une dépression du système nerveux central ; ainsi en plus de l'activité antifongique, principal objet de notre travail, l'extrait ES2Ac agirait comme un curarisant.

**Mots clés :** *Candida albicans*, candidose, hyphe, *Abrahamia deflexa*, microdilution, chromatographie.

**Encadreurs :** Professeur RAKOTO Danielle Doll

Docteur ANDRIANTSOA Maminirina