



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT  
DE  
BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE

MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETUDES  
APPROFONDIES (D.E.A)  
DE BIOCHIMIE

OPTION : BIOCHIMIE APPLIQUEE AUX SCIENCES MEDICALES

Présenté par:  
**RASOATAHINA Victoire**  
Maître es Sciences

**ETUDE CHIMIQUE ET TOXICOLOGIQUE DES  
PRINCIPES TOXIQUES DE FEUILLES DE  
*Gambeya boiviniana* (SAPOTACEAE)**

Soutenu le: 17 juin 2005

Devant la commission d'examen composée de :

**Président** : Professeur Laurence RALAMBORANTO  
**Rapporteur** : Professeur Victor JEANNODA  
**Examineurs** : Professeur Julia Louise RAZANAMPARANY  
Professeur Marson RAHERIMANDIMBY

## DEDICACE

### *A Dieu Tout puissant,*

Tu m'a toujours dit : « Ma grâce te suffit ».

### *A la mémoire de mon Grand-père,*

Tu es irremplaçable. Actuellement, je sais que tu es fier de moi. Là où tu es, tu ne cesses de veiller sur mon âme. Paix à ton âme !

### *A Maman,*

Tu a été toujours mon soutien, jamais je n'oublierai tous les sacrifices que tu a consentis pour que je puisse terminer mes études.

### *A mon oncle Maharavo,*

Sans ton aide, je ne serai pas parvenue au bout de mon parcours. Ce que j'ai à dire tient dans ce proverbe : « *sitraka enti-matory, valiana raha mahatsiaro* ».

### *A Hery Jacques,*

Merci de m'avoir soutenue tout le temps surtout au cours de la période difficile.  
« *Ny soa atao levenam-bola* ».

### *A mon frère et ma sœur,*

Avec tous mes souhaits de bonne réussite dans la vie.

### *A toute ma famille,*

Mes sincères remerciements !

### *A tous les amis et collègues de la Faculté des Sciences,*

Je préfère m'exprimer par cet adage dans notre langue maternelle : « *tsy hosorisoritina tahaka ny volo na havakavahana toy ny ketsa na asiana ankolafiny toy ny akondro ka hifandroritana* »,

Que les relations qui ont été bonnes jusqu'à ce jour continuent de l'être éternellement.

## REMERCIEMENTS

Le présent travail a été réalisé :

- \* au Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales (LABASM) du département de Biochimie Fondamentale et Appliquée de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo,
- \* au Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement (LME) du Centre National de Recherche sur l'Environnement (CNRE),
- \* au Laboratoire Central d'Anatomie Pathologique du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Joseph RAVOAHANGY-ANDRIANAVALONA.

*Je voudrais adresser toute ma gratitude à Monsieur Le Professeur Victor JEANNODA, Chef de Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, Responsable de la formation en troisième cycle de Biochimie, et encadreur de mon stage, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire malgré ses lourdes responsabilités.*

*J'exprime ma profonde reconnaissance à Madame Le Docteur Danielle RAKOTORANOROMALALA, Maître de conférences, et co-encadreur de mon stage pour les conseils et suggestions qu'elle m'a donnés le long de ce stage et pour son apport précieux dans la réalisation du présent manuscrit, malgré ses nombreuses occupations.*

*Que mes vifs remerciements aillent à Madame Le Professeur RALAMBORANTO Laurence, qui me fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.*

*Que Madame Le Professeur RAZANAMPARANY Louissette et Monsieur Le Professeur RAHERIMANDIMBY Marson, qui ont accepté de faire partie du jury de ce mémoire, malgré leurs multiples obligations, reçoivent ici l'expression de ma reconnaissance.*

*Mes sincères remerciements s'adressent également à :*

- ✓ *Monsieur Le Docteur Luciano RAMAROSON, Chef du LME, et Monsieur Aurélien RASAMIARIMANANA, Responsable scientifique pour m'avoir accueilli favorablement dans leur laboratoire pour l'étude des propriétés anti-microbiennes,*

✓ *Madame Le Docteur Clara RAJEMIARIMOELISOA (Ministère de la Santé), qui a aimablement accepté de m'aider à étudier l'anatomie pathologie.*

*Je tient aussi remercier toutes les personnes qui m'ont aidé et soutenu pour la réalisation de ce travail, en particulier, Monsieur Le Docteur Ranjana RANDRIANARIVO, Mademoiselle Lolona RAKOTOBÉ, de même que l'équipe du laboratoire du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, l'équipe du laboratoire central d'anatomie pathologie du CHU et l'équipe du LME.*

*Enfin, j'adresse toute ma reconnaissance à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.*

## TABLE DES MATIÈRES

	2.2.3 M
	éth
ABREVIATIONS .....	od
GLOSSAIRE.....	es
LISTE DES TABLEAUX.....	de
LISTE DES FIGURES .....	pu
INTRODUCTION GENERALE .....	rifi
<u>PREMIERE PARTIE</u> : ETUDE CHIMIQUE	cat
1 Introduction .....	io
..	n .
2 Matériels et méthodes .....	..
..	..
2.1 Matériels .....	..
..	..
2.1.1 La plante.....	..
..	..
2.1.1.1 Classification .....	..
..	..
2.1.1.2 Description botanique .....	..
.	..
2.1.1.3 Distribution géographique.....	...
.	..
2.1.1.4 Organes utilisés .....	..
.	..
2.1.2 Les produits chimiques .....	..
..	..
2.2 Méthodes.....	..
..	..
2.2.1 Préparation et conservation du matériel.....	.
..	..
2.2.2 Méthodes d'extraction.....	..
.	..
2.2.2.1 Extraction à froid.....	..
.	..
2.2.2.2 Extraction à chaud.....	..
..	..

2.2.3.1	Traitement par la chaleur.....	5
	.	5
2.2.3.1.1	Principe.....	8
	.	8
2.2.3.1.2	Mode opératoire.....	8
	.	8
2.2.3.2	Fractionnement par le n-butanol.....	8
	.	8
2.2.3.2.1	Principe.....	8
	.	8
2.2.3.2.2	Mode opératoire.....	9
	.	9
2.2.3.3	Précipitation par l'acétate neutre de plomb (ANP).....	9
	.	9
2.2.3.3.1	Principe.....	9
	.	9
2.2.3.3.2	Mode opératoire.....	9
	.	10
2.2.3.4	Chromatographie sur gel SEPHADEX.....	10
	.	
2.2.3.4.1	Principe.....	<b>2.2.3.4.2</b>
	.	

pages

vi

vii

viii

ix

1

4

4

4

4

4

4

4

3	Mode opératoire. ....	2.2.5.2.2.3	
3.2.3.4.1.1	Préparation du gel. ....	2.2.5.2.2.4	
3.2.3.4.1.2	Dépôt de l'échantillon. ....	2.2.5.2.2.5	
3.2.3.5	Dialyse. ....	2.2.5.2.2.6	
	.	2.2.5.2.2.7	
3.2.3.5.1	Principe. ....	2.2.5.2.2.8	
	.	2.2.5.2.2.9	
3.2.3.5.2	Mode opératoire. ....	2.2.5.2.2.10	
	.	2.2.5.2.2.11	
2.2.4	Méthode de concentration. ....	2.2.5.2.2.12	
	.	2.2.5.2.2.13	
2.2.5	Méthodes d'analyse. ....	2.2.5.2.2.14	Test de
	.		LIEBE
2.2.5.1	Chromatographie sur couche mince. ....		RMAN
	..		N-
2.2.5.1.1	Principe. ....		BÜRCH
	.		ARD. ...
2.2.5.1.2	Mode opératoire. ....		.....
	.		.....
2.2.5.1.2.1	Dépôt des échantillons. ....		...
	.	2.2.5.2.2.15	Test de
2.2.5.1.2.2	Développement. ....		SALKO
2.2.5.1.2.3	Révélation. ....		WSKI. .
	.		.....
2.2.5.2	Criblage phytochimique. ....		.....
	.		.....
2.2.5.2.1	Les alcaloïdes. ....		.....
	.		...
2.2.5.2.1.1	Test de MAYER. ....		.....
	.		.....
2.2.5.2.1.2	Test de WAGNER. ....		.....
	.		.....
2.2.5.2.1.3	Test de DRAGENDORFF. ....		.....
2.2.5.2.2	Les stéroïdes et les triterpènes. ....		.....
2.2.5.2.2.1			
2.2.5.2.2.2			

2.2.5.2.3	Les désoxyoses: test de KELLER-Kiliani. ....	4
2.2.5.2.4	Les flavonoïdes et les leucoanthocyanes. ....	5
2.2.5.2.4.1	Les flavonoïdes : test de WILSTATER (test à la cyanidine). ...	6
2.2.5.2.4.2	Les leucoanthocyanes : test de BATE-SMITH. ....	7
	.	8
2.2.5.2.5	Les anthraquinones : test de BORNSTRÄGER. ....	9
	.	10
2.2.5.2.6	Les tanins et les polyphénols. ....	11
2.2.5.2.6.1	Test à la gélatine . ....	11
2.2.5.2.6.2	Test à la gélatine salée. ....	11
2.2.5.2.6.3	Test au chlorure ferrique . ....	11
2.2.5.2.7	Les saponines. ....	11
	.	11
2.2.5.2.8	Les iridoïdes. ....	12
	.	12
3	Résultats . ....	12
	..	12
3.1	Extraction . ....	12
		12
		12
		13
		13
		13
		13
		13
		13
		14
		14
		14
		14
		14
		14
		14
		15
		15
		15
		15

15

16

16

16

17

17

Extraction à froid. ....	2.1.1
11.1.1.1 Extraction aqueuse. ....	2.1.2
.	2.1.3
11.1.1.2 Extraction hydroalcoolique. ....	2.1.4
.	2.1.5
11.1.2 Extraction à chaud . ....	2.1.6
.	2.1.7
11.2 Purification . ....	2.1.8
..	
11.2.1 Traitement par la chaleur. ....	
.	
11.2.2 Fractionnement par le n-butanol . ....	
.	
11.2.3 Précipitation par l'ANP. ....	
..	
11.2.4 Chromatographie sur gel Sephadex G25 . ....	
..	
11.2.5 Dialyse. ....	
.	
11.2.6 Rendement. ....	
.	
11.2.7 Degré d'homogénéité des produits . ....	
.	
11.3 Propriétés physico-chimiques. ....	
.	
11.4 Nature chimique . ....	
..	
12 Discussion et conclusion . ....	
..	
<b><u>DEUXIEME PARTIE</u> : ETUDE TOXICOLOGIQUE</b>	
1 Introduction . ....	
..	
2 Matériels et méthodes . ....	
..	
2.1 Matériels . ....	
..	

2.1.9	Les animaux d'expérimentation. ....	17
	.	17
2.1.9.1	Les souris. ....	17
	.	17
2.1.9.2	Les têtards. ....	18
	.	18
2.1.9.3	Les poissons. ....	19
	.	19
2.1.9.4	Les larves de moustique. ....	19
	.	20
2.1.10	Les végétaux d'expérimentation. ....	21
	.	21
2.1.11	Les micro-organismes utilisés. ....	22
2.1.12	Les milieux de culture. ....	23
	.	24
2.2	Méthodes. ....	
	..	25
2.2.1	Méthodes d'étude des effets sur les animaux. ....	25
	.	25
2.2.1.1	Tests sur les animaux à sang chaud. ....	25
	.	25
2.2.1.1.1	Chez la souris. ....	25
	.	26
2.2.1.1.1.1	Estimation de la toxicité. ....	26
	.	26
2.2.1.1.1.2	Détermination de la DL <sub>50</sub> . ....	26
2.2.1.1.1.3	Examen histopathologique. ....	26
	.	27
2.2.1.1.1.3.1	Prélèvement et fixation d'organe. ....	27
	.	27
	.	27
	.	27
	.	28
	.	28
	.	29

2.2.1.1.1.3.2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31 Inclusion .....	2.2.3.3
31.2.1.1.1.3.2 Microtomie et étalement des coupes. ....	2.2.3.4
31.2.1.1.1.3.3 Coloration des coupes et montage des lames .....	2.2.3.5
2.2.1.1.2 Test hémolytique sur les hématies de mouton. ....	2.2.3.6
.....	2.2.3.7
2.2.1.1.2.1 Principe. ....	2.2.3.8
.....	2.2.3.9
2.2.1.1.2.2 Mode opératoire. ....	2.2.3.10
2.2.1.2 Test sur les animaux à sang froid. ....	2.2.3.11
.....	2.2.3.12
2.2.1.2.1 Principe. ....	2.2.3.13
.....	2.2.3.14
2.2.1.2.2 Mode opératoire. ....	2.2.3.15
.....	2.2.3.16
2.2.1.2.2.1 Expérience sur les têtards de grenouille. ....	2.2.3.17
2.2.1.2.2.2 Expérience sur les poissons: <i>Gambusia holbrooki</i> .....	2.2.3.18
2.2.1.3 Test sur les larves de moustique. ....	2.2.3.19
.....	2.2.3.20
2.2.2 Méthodes d'étude des effets sur les végétaux .....	2.2.3.21
.....	2.2.3.22
2.2.2.1 Méthodes d'étude des effets sur le pouvoir germinatif .....	
.....	
2.2.2.2 Méthodes d'étude des effets sur la croissance de jeunes plantules. ....	
.....	
2.2.2.2.1 Principe .....	
2.2.2.2.2 Mode opératoire. ....	
.....	
2.2.2.3 Méthodes d'évaluation des effets sur le développement des bourgeons axillaires .....	
.....	
2.2.3 Méthodes d'études des effets sur la croissance des micro-organismes ....	
.....	
2.2.3.1 Stérilisation. ....	
.....	
2.2.3.2 Isolement et purification des souches. ....	
.....	



3	Méthodes d'étude des effets sur les germes. . . . .	..
3.1.1.1.1	Méthode de diffusion en milieu solide ou méthode de disques. . . . .	..
3.1.1.1.1.1	Préparation de l'inoculum. . . . .	4.3
	.	4.4
3.1.1.1.1.2	Préparation des extraits. . . . .	4.5
	.	
3.1.1.1.1.3	Inoculation des milieux. . . . .	
	.	
3.1.1.1.1.4	Méthode de diffusion par disques. . . . .	
	.	
3.1.1.1.1.5	Norme de lecture des résultats. . . . .	
3.1.1.1.2	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) . . . . .	
4	Résultats. . . . .	
4.1	Effets sur les animaux. . . . .	
	.	
4.1.1	Effets sur les animaux à sang chaud. . . . .	
	.	
4.1.1.1	Estimation de la toxicité sur souris. . . . .	
4.1.1.1.1	Description des symptômes d'intoxication. . . . .	
4.1.1.1.2	Détermination de la DL <sub>50</sub> (24h). . . . .	
4.1.1.1.3	Examens histopathologiques . . . . .	
4.1.1.2	Effets de l'extrait brut et de l'extrait sur les hématies de mouton. . . . .	
4.1.2	Effets sur les animaux à sang froid. . . . .	
	.	
4.1.2.1	Effets de l'extrait sur les têtards de grenouille . . . . .	
4.1.2.2	Effets de l'extrait sur les poissons <i>Gambusia holbrooki</i> . . . . .	
4.1.2.3	Effets de l'extrait brut sur les larves de moustique . . . . .	
4.2	Effets de l'extrait brut et de l'extrait sur les végétaux. . . . .	
	.	
4.2.1	Effets de l'extrait brut sur le pouvoir germinatif des graines. . . . .	..
	.	
4.2.2	Effets de l'extrait brut sur la croissance des jeunes plantules de riz et de petit pois. . . . .	
	.	
4.2.3	Effets des extraits sur le développement des bourgeons axillaires de petit pois. . . . .	

4.6	Effets des extraits sur les micro-organismes. ....	38
	.	38
4.6.1	Isolement et identification des germes. ....	38
4.6.2	Spectre d'activité anti-microbienne. ....	38
4.6.3	Détermination de la CMI. ....	38
5	Discussion et conclusion. ....	38
	.	39
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES. ....	39
	ANNEXES. ....	40
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES. ....	40
		40
		40
		40
		40
		42
		50
		51
		51
		52
		53
		53
		53
		54
		58
		59
		59
		60
		61
		62
		64
		65
		71

## ABREVIATIONS

ANP	: Acétate neutre de plomb
B.A.E	: Butanol / acide acétique /eau distillée
CCM	: Chromatographie sur couche mince
CL <sub>50</sub>	: concentration létale 50%
CMI	: concentration minimale inhibitrice
C.N.R.E	: Centre National de la Recherche sur l'Environnement
Da	: Dalton
DL <sub>50</sub>	: Dose létale 50%
FO.FI.FA	: Foibem-pirenena momba ny fikarohana ho amin'ny fampandrosoana ny eny ambanivohitra
i.p	: intrapéritonéal
IPM	: Institut pasteur de Madagascar
j	: jour
LABASM	: Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales
min	: minute
N	: Normale
§	: Paragraphe
PBS	: Phosphate Buffered Saline
q.s.p	: quantité suffisante pour
trs	: tours
UV	: Ultra-violet
v/v	: volume à volume
°C	: degré Celsius

## GLOSSAIRE

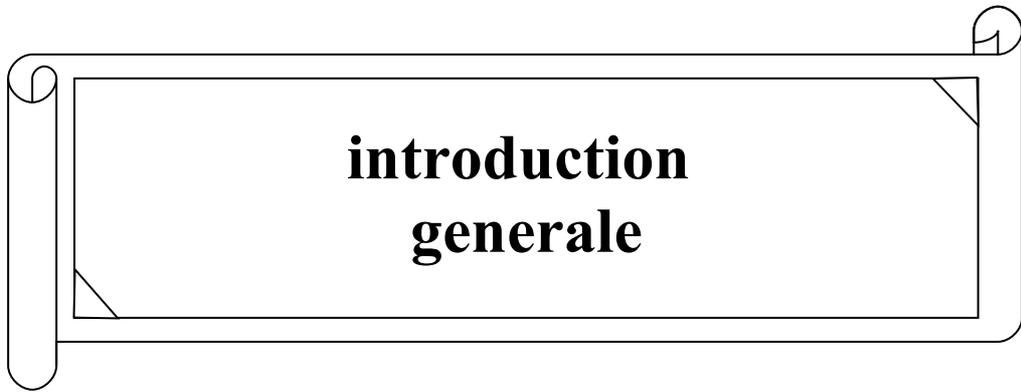
<b>Ataxie</b>	: incoordination et désordre des mouvements volontaires
<b>Convulsion clonique</b>	: alternance brusque, courte et involontaire de contractions et de relâchements musculaires
<b>Hyperhémie</b>	: augmentation de la quantité de sang tissulaire, exprimée par une coloration rouge suite à une dilatation artérielle et capillaire
<b>Enophthalmie</b>	: enfoncement dans la paupière du globe oculaire
<b>Piloérection</b>	: hérissément des poils

## LISTE DES TABLEAUX

	<u>pages</u>
<u>Tableau 1:</u> Caractéristiques des extraits bruts obtenus par les différentes techniques d'extraction. ....	18
.....	23
<u>Tableau 2:</u> Résultats de la détection des familles chimiques sur l'extrait purifié E2 ...	26
<u>Tableau 3:</u> Végétaux d'expérimentation .....	31
...	
<u>Tableau 4:</u> Composition du milieu pour le test hémolytique. ....	39
<u>Tableau 5:</u> Norme utilisée pour l'expression des résultats des méthodes de diffusion ..	41
<u>Tableau 6:</u> Résultats expérimentaux de la détermination de la DL <sub>50</sub> (24h) de l'extrait sur souris .....	42
.....	
<u>Tableau 7:</u> Estimation de la DL <sub>50</sub> (24h) par la méthode de totaux cumulatifs de REED et MUENCH (1938) .....	43
<u>Tableau 8:</u> Lésions histopathologiques provoquées par l'extrait de 159,36 mg/kg de poids sur les différents organes de souris .....	50
.....	52
<u>Tableau 9:</u> Effets des différentes concentrations de EB et de E2 sur les hématies de mouton .....	53
.....	54
<u>Tableau 10:</u> Effets de l'extrait à différentes concentrations sur les têtards .....	58
<u>Tableau 11:</u> Effets de l'extrait sur les <i>Gambusia holbrooki</i> .....	60
<u>Tableau 12:</u> Effets de EB à 1mg/ml sur le pouvoir germinatif des graines .....	61
<u>Tableau 13:</u> Taux d'inhibition de la croissance des épicotyles et des hypocotyles de riz et de petit pois au 13 <sup>ème</sup> jour de l'expérience .....	
<u>Tableau 14:</u> Caractéristiques des souches purifiées et identifiées .....	
<u>Tableau 15:</u> Effets de EB et de E2 sur la croissance des différentes germes-tests .....	

## LISTE DES FIGURES

	<u>pages</u>
Figure 1: La plante: rameau de <i>Gambeya boiviniana</i> . . . . .	6
Figure 2: Répartition géographique de <i>Gambeya boiviniana</i> . . . . .	7
Figure 3: Schéma résumant les différentes étapes de la purification . . . . .	21
Figure 4: C.C.M dans le système B/A/E (60/20/20 ; p/p) des divers extraits obtenus au cours des différentes étapes de purification . . . . .	22
Figure 5: Détermination graphique de la DL50 . . . . .	42
Figure 6: Lésions histopathologiques au niveau du cerveau dues à l'administration par voie intrapéritonéale de l'extrait à la dose de 159,36mg/kg de poids (Grossissement X 400) . . . . .	44
Figure 7: Lésions histopathologiques au niveau du cœur dues à l'administration par voie intrapéritonéale de l'extrait à la dose de 159,36mg/kg de poids (Grossissement X 400) . . . . .	45
Figure 8: Lésions histopathologiques au niveau de l'estomac dues à l'administration par voie intrapéritonéale de l'extrait à la dose de 159,36mg/kg de poids (Grossissement X 400) . . . . .	46
Figure 9: Lésions histopathologiques au niveau du foie dues à l'administration par voie intrapéritonéale de l'extrait à la dose de 159,36mg/kg de poids (Grossissement X 400) . . . . .	47
Figure 10: Lésions histopathologiques au niveau du poumon dues à l'administration par voie intrapéritonéale de l'extrait à la dose de 159,36mg/kg de poids (Grossissement X 400) . . . . .	48
Figure 11: Lésions histopathologiques au niveau du rein dues à l'administration par voie intrapéritonéale de l'extrait à la dose de 159,36mg/kg de poids (Grossissement X 400) . . . . .	49
Figure 12: Effets des différentes concentrations de EB (a) et de E2 (b) sur les hématies de mouton . . . . .	51
Figure 13: Schéma récapitulant les étapes de l'expérience sur les effets de EB sur la croissance de jeunes plantules . . . . .	55
Figure 14: Effets de différentes concentrations de EB sur la croissance des jeunes plantules de riz . . . . .	56
Figure 15: Effets de différentes concentrations de EB sur la croissance des jeunes plantules de petit pois . . . . .	57
Figure 16: Effets des différentes substances sur la croissance de bourgeons axillaires de petit pois . . . . .	59



**introduction  
generale**

## INTRODUCTION GENERALE

Les toxines ou poisons sont des substances qui, introduites ou formées dans un organisme, sont capables de troubler ou d'abolir les fonctions vitales. Elles peuvent être d'origine naturelle et synthétiques. Les toxines d'origine naturelle peuvent provenir d'animaux, de végétaux ou d'organismes microbiens. L'intoxication pourrait être due à la morsure d'animaux ou à la consommation d'aliments ou d'organismes toxiques.

L'homme, bien que conscient du danger que représentent les toxines pour lui-même, a toujours su tirer profit des propriétés de certains organismes toxiques. Il les utilise en effet pour la chasse, la pêche, la lutte contre les animaux nuisibles, à des fins thérapeutiques ou homicides et pour la guerre.

La toxicologie ou science des poisons a pour objectif d'étudier les problèmes propres aux toxiques tant sur le plan analytique qu'au point de vue biologique et physiologique. Elle cherche à préciser les mécanismes d'action des poisons à l'échelle moléculaire, cellulaire et à celle des organismes tout entier.

Plusieurs centaines de toxines ont été étudiées de manière approfondie grâce au progrès de diverses disciplines telles que la chimie, la physique, la biochimie, la médecine, la physiologie et la pharmacologie. Leur structure et leur mécanisme d'action sont bien connus.

Ainsi par exemple :

- les ciguatoxines, polyéthers produits par un dinoflagellé (*Gambierdiscus toxicus*) accumulé dans les viscères des poissons, sont des neurotoxiques interférant avec la conduction nerveuse en augmentant la perméabilité aux ions sodium des cellules nerveuses et des muscles striés (HABERMEHL, 1981 ; YASUMOTO et MURATA, 1993) ;
- la morphine, un alcaloïde extrait de la plante *Papaver somniferum*, est utilisée comme analgésique (BRUNETON, 1993) ;
- la nicotine, un alcaloïde extrait des feuilles du tabac (*Nicotina tabaccum*), agit sur le système nerveux central en provoquant des tremblements et des convulsions, et sur le système nerveux autonome en provoquant une tachycardie et une hypertension (BRUNETON, 1987) ;
- le venin de scorpion est constitué de protéines neurotoxiques qui entraînent une hyperexcitabilité neuromusculaire (FREJAVILLE et

- coll., 1981) ;
- la toxine tétanique, une protéine produite par des bactéries anaérobies *Clostridium tetani*, a été utilisée dans l'exploration du fonctionnement du système nerveux central (BIZZINI, 1977) ;

La plupart des toxines connues ont été isolées des végétaux, et de nombreuses plantes malgaches sont toxiques d'après la littérature (BOST, 1961 ; BOITEAU, 1979). Cependant, certaines d'entre elles n'ont pas encore fait l'objet d'études approfondies. C'est pour cette raison que les travaux de recherche de l'unité toxicologique du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée sont orientés vers l'étude chimique et biologique des principes toxiques de plantes. Plusieurs familles ont déjà été prospectées, ainsi :

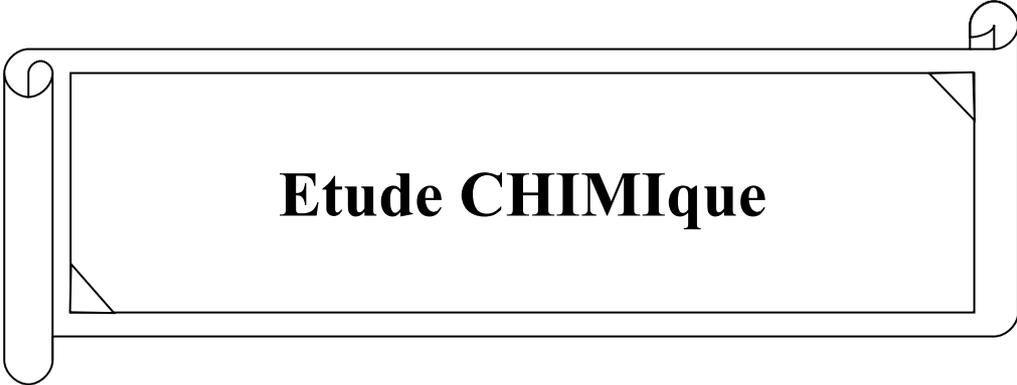
- la famille des BOLETACEAE avec *Boletus affinis* Peck (RAZANAMPARANY, 1987) ;
- la famille des CANTHARELLACEAE avec *Cantharellus cf congolensis* (TONIMALALA, 2003) ;
- la famille des CONNARACEAE avec *Rourea orientalis* (RAKOTO-RANOROMALALA, 1984) ; *Cnestis glabra* et *Cnestis polyphylla* (JEANNODA, 1986) ;
- la famille des CUCURBITACEAE avec *Xerosicyos danguyi* (RAKOTONDRAZANAKA, 1999) ; *Xerosicyos perrieri* (RANDRIAMIHARISOA, 2000) et *Odosicyos bosseri* (RAKOTONDRAZANAKA, 2003) ;
- la famille des EUPHORBIACEAE avec *Croton mongue* (RALISON, 1987) ; *Euphorbia laro* (RAHERINIAINA, 2004) et *Uapaca thoarsii* (RANDRIANANDRASANA, 2004) ;
- la famille des FABACEAE avec plusieurs espèces d'*Albizia* malgache (RAJEMIARIMOELISOA, 1996 et 2000 ; RANDRIANARIVO, 1996 et 2003 ; RAMAMONJISOA, 1998 ; RAHERINIAINA, 1999 ; RAHARISOA, 1999 ; RAONIHARISOA, 2003) ;
- la famille des GENTIANACEAE avec *Tachiadenus longiflorus* (RAKOTO-RANOROMALALA, 1989) ;
- la famille des LAURACEAE avec *Ocotea madagascariensis* (RANDRIAMAHAVALISOA, 2003) ;

▪

- la famille des PHYSENACEAE avec *Physena madagascariensis* (ANDRIANJAKANIRINA, 2004) ;
- la famille des SAPINDACEAE avec *Deinbollia boinensis* (RAKOTOBE, 2003) ;
- la famille des SAPOTACEAE avec *Mimusops commersonii* (RAMAMONJISOA-RAKOTOARIVELO, 2004).

Nous avons choisi de travailler sur les feuilles de *Gambeya boiviniana* (SAPOTACEAE) pour différentes raisons :

- il s'agit d'une plante endémique de Madagascar ;
- la toxicité des feuilles a été mise en évidence lors de tests préliminaires, or aucune étude toxicologique approfondie n'a encore été entreprise sur ces feuilles ;
- cette plante est répartie dans plusieurs régions de Madagascar et elle est facile à trouver ;
- selon les guérisseurs, les feuilles pilées sont utilisées comme emplâtre contre les piqûres de scorpion (AUBERVILLE, 1974) et le décocté de feuilles est utilisé pour guérir l'enfant sujet à des crises convulsives hyperthermiques simples.



**Etude CHIMIQUE**

## 1- INTRODUCTION

D'après la littérature, *Gambeya boiviniana* n'a pas encore fait l'objet d'une étude chimique. La toxicité des feuilles a été démontrée par des tests préliminaires sur souris. Dans la première partie de ce mémoire nous avons cherché à extraire et purifier le ou les principes toxiques, à obtenir des informations sur leurs propriétés physico-chimiques, et à élucider leur nature chimique.

## 2- MATERIELS ET METHODES

### 2.1- MATERIELS

#### 2.1.1.-LA PLANTE

##### 2.1.1.1- Classification (MABBERLEY,1987)

- Règne : Végétal
- Embranchement : Angiospermes
- Sous-embranchement : Phanérogames
- Classe : Dicotylédones
- Sous-classe : Dilleniidae
- Ordre : Ebénales
- Famille : Sapotacées
- Genre : *Gambeya*
- Espèce : *boiviniana* – Pierre
- Noms vernaculaires : Rehiaka, Reheky, Famelo, Famelomana, Fakamboly, Famelomana fotsy, Hazomahogo, Hazomiteraka, Voantsikidy, Voampamelona, Voandrahiaka

##### 2.1.1.2- Description botanique (HUMBERT, 1981 ; SCHATZ, 2001)

*Gambeya boiviniana*, représenté sur la *figure 1*, est l'unique espèce endémique du genre *Gambeya* ou *Chrysophyllum* à Madagascar. La description botanique est présentée en annexe I.

##### 2.1.1.3- Distribution géographique

Le genre *Gambeya* est fréquent dans les forêts littorales ombrophiles. Au sud de Madagascar, il apparaît depuis le niveau de la mer jusqu'à 1750m d'altitude de Fort-

Dauphin à Sambirano. A l'Est, il se trouve dans la baie d'Antongil , dans les environs de Fénériverie et de Mahanoro, puis sur le sable basaltique d'Ambanitazana, Ifandana, Farafangana, Ampasimena, et dans la vallée de la Manampanihy. Au centre, *Gambeya* se répartit sur la montagne d'Ambre et dans la région d'Ambongo-Boina jusqu'à Diègo.

La carte de la répartition est montrée sur la *figure 2*.

#### **2.1.1.4- Organes utilisés**

Nous avons utilisé pour notre étude des feuilles récoltées dans la réserve naturelle de Manombo (au sud de Farafangana), au mois de janvier 2004.

#### **2.1.2- LES PRODUITS CHIMIQUES**

La plupart de produits chimiques utilisés pour réaliser ce travail sont purs ou de qualité pour analyse (marque MERCK, PROLABO, ou BDH).

Des plaques de gel de silice (60F254, de dimensions 20x20cm, d'épaisseur 0,2mm) sont utilisées pour la chromatographie sur couche mince (CCM).

Le gel SEPHADEX G25 (PHARMACIA) est utilisé pour la chromatographie sur colonne.



*Figure 1: La plante: rameau de Gambeya boiviniana Pierre*

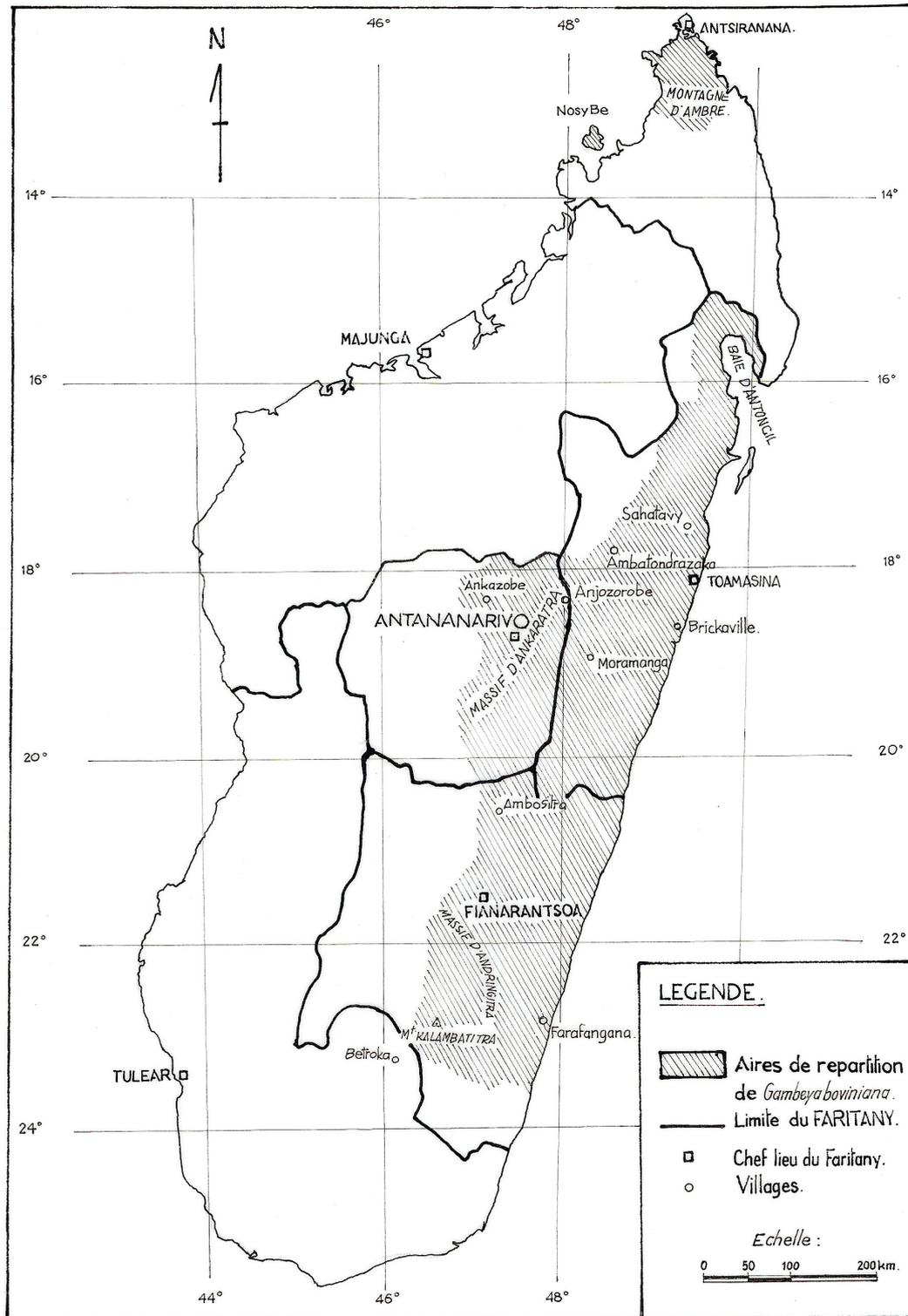


Figure 2 : Répartition géographique de *Gambeya boviniana*

Source : Limites administratives de Madagascar. FTM / 1984

## **2.2- METHODES**

### **2.2.1- PREPARATION ET CONSERVATION DU MATERIEL VEGETAL**

Les feuilles fraîches sont séchées pendant une semaine à l'air libre. Elles sont ensuite broyées à l'aide d'un mortier. La poudre fine obtenue par tamisage du broyat constitue notre matériel de départ. Elle est conservée à la température ambiante dans un flacon bien bouché.

### **2.2.2- METHODES D'EXTRACTION**

#### **2.2.2.1- Extraction à froid**

La poudre de feuilles est mise en suspension dans le solvant d'extraction (eau distillée ou éthanol absolu), suivant le rapport 1/10 (p/v). La suspension est ensuite soumise à une agitation magnétique pendant 3h à la température ambiante, puis laissée macérer à + 4°C pendant une nuit. Le macérat est filtré sur 4 épaisseurs de gaze pour éliminer les tourteaux et le filtrat obtenu est centrifugé à 16000 x g pendant 15min à + 5°C à l'aide d'une centrifugeuse BECKMAN J2-21 (rotor JA-20). Le surnageant est ensuite concentré par évaporation du solvant d'extraction (voir méthode de concentration § 2.2.4 p.11), tandis que le culot est éliminé. Une deuxième centrifugation à 3000trs/min est faite pendant 10min à l'aide d'une centrifugeuse (MARTIN CHRIST- 546) pour éliminer le précipité apparu au cours de l'opération de concentration.

#### **2.2.2.2- Extraction à chaud**

La poudre de feuilles est délayée dans le solvant d'extraction (l'eau distillée) selon le rapport 1/10 (p/v). Le mélange est soumis à un chauffage à reflux sous agitation magnétique durant 3h à 70°C, puis l'ensemble est laissé macérer à + 4°C pendant une nuit. Le macérat est filtré sur 4 épaisseurs de gaze. Le filtrat obtenu est centrifugé à 16000xg pendant 15min à +5°C. Le surnageant est concentré par évaporation et le culot est éliminé.

## **2.2.3- METHODES DE PURIFICATION**

### **2.2.3.1- Traitement par la chaleur**

#### **2.2.31.1- Principe**

Cette méthode est utilisée pour éliminer certaines macromolécules telles que les protéines ou les acides nucléiques qui coagulent sous l'effet de chaleur.

#### **2.2.3.1.2- Mode opératoire**

L'extrait à traiter est chauffé dans un bain-marie bouillant pendant 15min à 96°C. Le précipité est éliminé par centrifugation à 3000trs/min pendant 15min. Le surnageant est recueilli et le culot est éliminé.

### **2.2.3.2- Traitement par le n-butanol (MAHUZIER et HAMON, 1990)**

#### **2.2.3.2.1- Principe**

C'est une technique d'extraction liquide-liquide basée sur le transfert d'un ou de plusieurs constituant(s) d'une phase liquide (phase aqueuse) vers une autre phase liquide extractive (phase butanolique) qui est non miscible à la précédente.

#### **2.2.3.2.2- Mode opératoire**

L'extrait à traiter est mélangé volume à volume au n-butanol dans une ampoule à décanter. Le mélange est agité fortement, puis laissé reposer jusqu'à décantation totale aboutissant à la formation de deux phases nettes : une phase supérieure butanolique ou phase organique et une phase inférieure aqueuse. Les deux phases sont récupérées séparément. La phase aqueuse est soumise de nouveau à trois autres fractionnements successifs.

Les quatre phases butanoliques ainsi obtenues sont rassemblées puis filtrées sur papier filtre pour éliminer les gouttelettes d'eau de saturation. Un grand volume d'eau distillée est ajouté au filtrat puis le butanol est évaporé.

La phase aqueuse est débarrassée des traces de butanol par évaporation après addition d'eau distillée.

### **2.2.3.3- Précipitation par l'acétate neutre du plomb (ANP)**

#### **2.2.3.3.1- Principe**

L'ANP, comme la plupart des sels de métaux lourds, permet la défécation d'extraits biologiques en précipitant les grosses molécules telles que les protéines, les acides nucléiques, les polysaccharides ainsi que d'autres substances comme les acides organiques.

#### **2.2.3.3.2- Mode opératoire**

Une solution aqueuse d'ANP à 20% (p/v), de volume déterminé, est ajoutée goutte à goutte dans l'extrait à purifier soumis à une agitation magnétique. Le précipité formé est éliminé par centrifugation à 3000trs/min pendant 10min. L'addition d'un volume déterminé d'une solution aqueuse de phosphate disodique à 10% (p/v) permet d'éliminer l'excès de plomb dans le surnageant.

Une autre centrifugation à 3000trs/min pendant 10min est réalisée afin d'écarter le précipité formé. Le surnageant est récupéré.

### **2.2.3.4- Chromatographie sur gel SEPHADEX (LEHNINGER, 1977; AUDIGIE et coll., 1989 ; STRYER, 1992)**

#### **2.2.3.4.1- Principe**

C'est un procédé permettant la séparation des substances suivant leur taille et leur forme moléculaire.

Le Sephadex est un gel préparé par réticulation d'un polymère anhydroglucosé : le dextrane. Il joue un rôle de tamis moléculaire. Les grosses molécules ayant un poids moléculaire élevé ne pénètrent pas dans les pores du gel. Elles restent dans le liquide extra-granulaire et sortent les premières dans le volume mort de la colonne. Elles sont dites exclues. Par contre, les petites molécules diffusent facilement dans les pores du gel et leur élution se fait lentement le long de la colonne. Les molécules sont alors éluées par ordre des poids moléculaires décroissants.

#### **2.2.3.4.2- Mode opératoire**

##### **2.2.3.4.2.1- Préparation du gel**

Le gel est mis à gonfler pendant 3h à la température ambiante dans l'eau distillée, puis dégazé sous pression réduite au moyen d'une pompe à vide. La suspension est coulée dans une colonne de verre de dimensions déterminées. La surface supérieure du gel est

stabilisée avec un disque de papier filtre. La colonne est ensuite équilibrée par percolation de trois fois son volume de solvant de chromatographie (eau distillée).

#### **2.2.3.4.2.- Dépôt de l'échantillon et élution**

Après équilibrage, l'échantillon est déposé avec précaution à la surface du gel. Les différentes substances sont ensuite éluées par lavage par gravité à l'eau distillée. Les fractions sont récoltées à volume constant au moyen d'un collecteur de fractions LKB.

Un entretien particulier du Sephadex n'est pas nécessaire après son utilisation. La colonne est immédiatement prête à un autre emploi après lavage avec un grand volume d'eau distillée. En vue de sa conservation, elle est lavée avec une solution d'azide de sodium à 2% pour prévenir toute altération d'origine microbienne.

#### **2.2.3.5- Dialyse** (KAMOUN, 1977 ; AUDIGIER et coll., 1989 ; STRYER, 1992)

##### **2.2.3.5.1- Principe**

La dialyse est une technique de séparation des substances, utilisant leur capacité respective à franchir les pores d'une membrane appelée membrane de dialyse qui est constituée de cellophane sous forme de cylindre allongé appelé boudin ou sac à dialyse. Grâce à la perméabilité sélective de la membrane, les grosses molécules peuvent être séparées des petites molécules par un phénomène d'osmose et de diffusion. La membrane sépare ainsi deux solutions de concentrations différentes : le liquide à dialyser et le liquide contre lequel s'effectue la dialyse. Les solutés diffusent de la solution la plus concentrée vers la plus diluée. Le phénomène s'achève dès que l'équilibre de concentration entre les deux solutions est atteint.

La vitesse de la dialyse est influencée par la température, le rapport entre la surface de la membrane et le volume de la solution à dialyser, le diamètre des pores de la membrane, le temps de contact, la différence de concentration entre les deux milieux.

##### **2.2.3.5.2- Mode opératoire**

La membrane de dialyse contient de la glycérine, des composés sulfurés et des métaux lourds qu'il faut préalablement éliminer. Pour ce faire, elle est mise à bouillir dans de l'eau distillée pendant 15min. L'eau est ensuite changée et l'opération est répétée trois fois. La membrane ainsi préparée peut être conservée dans la dernière eau bouillie à + 4°C pendant quelques jours.

Le boudin à dialyse contenant l'extrait à dialyser est noué à ses deux extrémités en prévoyant suffisamment d'espace pour les échanges. Il est immergé complètement dans le liquide de contre-dialyse. La formation de gradient de concentration des substances diffusibles dans le liquide contre-dialyse est évitée par agitation magnétique. L'utilisation d'un volume important de liquide de contre-dialyse ou son fréquent renouvellement permet d'accélérer la dialyse (voir schéma en *annexe IV*).

#### **2.1.4- METHODE DE CONCENTRATION**

Toutes les opérations d'évaporation de solvant et de réduction de volume sont réalisées au moyen d'un évaporateur rotatif HEIDOLPH à 50 - 55°C. La pression est diminuée à l'aide d'une pompe à vide.

#### **2.2.5- METHODES D'ANALYSE**

**2.2.5.1- Chromatographie sur couche mince** (RANDERATH, 1964 ; VERNIN, 1970 ; AUDIGIE et coll., 1989 ; MAHUZIER et HAMON, 1990)

##### **2.2.5.1.1- Principe**

C'est un procédé d'analyse au cours duquel les substances à séparer migrent dans une direction déterminée. La vitesse de déplacement des substances dépend de leur affinité pour la phase mobile organique d'une part, et des forces d'adsorption dues au support d'autre part.

##### **2.2.5.1.2- Mode opératoire**

###### **2.2.5.1.2.1- Dépôt des échantillons**

Les plaques de gel de silice (voir caractéristiques § 2.1.1.4 p.5) peuvent être découpées aux dimensions voulues. Les extraits à analyser sont déposés à l'aide d'un capillaire, en traits horizontaux de 7mm de large, espacés de 6mm, et situés à 1,5cm du bord inférieur et à 1,3cm des deux bords latéraux de la plaque. Les dépôts sont séchés immédiatement à l'aide d'un séchoir à main.

###### **2.2.5.1.2.2- Développement**

La plaque est placée verticalement à l'intérieur d'une cuve à chromatographie (DESAGA) dont les parois ont été tapissées de papier filtre pour saturer son enceinte par les vapeurs du solvant de migration.

Nous avons utilisé le système de solvants : n-butanol/acide acétique/eau distillée ou B.A.E 60/20/20 (p/p).

Il s'agit d'une migration ascendante qui est arrêtée dès que le front du solvant parvient à 0,5cm du bord supérieur de la plaque. Cette dernière est retirée de la cuve puis séchée au moyen d'un séchoir à main.

#### **2.2.5.1.2.3- Révélation**

Les chromatogrammes sont révélés par deux méthodes :

- exposition aux rayonnements ultraviolets (U.V) de longueur d'onde  $\lambda=254\text{nm}$  et  $\lambda=366\text{nm}$  ;
- pulvérisation de réactifs spécifiques : la vanilline/acide sulfurique ou le réactif à la ninhydrine.

La composition de réactifs est donnée en *annexe II*.

#### **2.2.5.2- Criblage phytochimique**

Pour tous les tests, 2ml de l'extrait à analyser sont évaporés à sec.

##### **2.2.5.2.1- Les alcaloïdes (DALTON, 1979 ; CORDELL, 1981 ; BRUNETON, 1987)**

La détection des alcaloïdes est basée sur leur capacité à se combiner à des métaux lourds. Dans la pratique, trois tests sont effectués en utilisant les réactifs de MAYER, de WAGNER et de DRAGENDORFF. La composition de ces réactifs est donnée en annexe II.

Le résidu d'évaporation à sec de l'extrait à analyser est macéré dans 3ml d'acide chlorhydrique 2N pendant 30min. La solution obtenue est répartie dans 4 tubes à essais, dont un sert de témoin et les 3 autres sont utilisés pour les 3 tests.

##### **2.2.5.2.1.1- Test de MAYER**

L'apparition d'un précipité ou d'une floculation après addition de 5 gouttes de réactifs de MAYER indique la présence d'alcaloïdes.

##### **2.2.5.2.1.2- Test de WAGNER**

La présence d'alcaloïdes est indiquée par l'apparition d'une floculation ou d'un précipité après ajout de 5 gouttes de réactif de WAGNER.

##### **2.2.5.2.1.3- Test de DRAGENDORFF**

L'extrait contient des alcaloïdes si l'addition de 5 gouttes de réactif de DRAGENDORFF donne une floculation ou un précipité.

#### **2.2.5.2.2- Les stéroïdes et les triterpènes (FONG et coll., 1977 ; NOHARA, 1989)**

Le résidu d'évaporation à sec de l'extrait est repris dans 3ml de chloroforme. Après une agitation légère suivie d'une filtration sur papier filtre, la solution chloroformique est répartie dans 3 tubes à essai dont le premier sert de témoin et les deux autres sont utilisés pour le test.

##### **2.2.5.2.2.1- Test de LIEBERMANN-BURCHARD**

Deux gouttes d'anhydride acétique sont ajoutées dans le deuxième tube. Après agitation légère, quelques gouttes d'acide sulfurique concentré sont additionnées en inclinant le tube. Au bout d'une heure, le changement de coloration permet d'apprécier les résultats :

Le virage en bleu-vert indique la présence de stéroïdes.

Le virage au rouge ou au violet indique la présence de triterpènes.

##### **2.2.5.2.2.2- Test de SALKOWSKI**

Dans le troisième tube, 1ml d'acide sulfurique est versé le long de la paroi. La présence de stérols insaturés est indiquée par l'apparition d'un anneau rouge mauve au niveau de l'interface.

##### **2.2.5.2.3- Les désoxyoses : test de KELLER-KILIANI**

Le résidu d'évaporation à sec de l'extrait est repris dans 0,3ml d'une solution aqueuse de chlorure ferrique à 10%. L'ensemble est additionné de quelques millilitres d'acide acétique glacial. Après agitation légère, 0,2ml d'acide sulfurique est versé en inclinant le tube.

La formation d'un anneau pourpre à l'interface indique la présence de désoxyoses.

##### **2.2.5.2.4- Les flavonoïdes et les leucoanthocyanes (FONG et coll., 1977)**

Le résidu sec est repris dans 10ml d'éthanol 80%. La solution alcoolique obtenue est répartie dans 4 tubes à essai dont le premier sert de témoin et les trois autres sont destinés aux tests.

##### **2.2.5.2.4.1- Les flavonoïdes : test de WILSTATER (test à la cyanidine)**

Les solutions dans le deuxième et le troisième tube sont additionnées chacune de 0,5ml d'acide chlorhydrique concentré 12,07N et de deux tournures de magnésium. Un ml d'eau distillée et 1ml d'alcool isoamylique sont ajoutés uniquement dans le troisième tube.

Dans le deuxième tube, le virage de la coloration au rouge indique la présence de flavones, tandis que dans le troisième tube la coloration pourpre indique la présence de flavonols et rouge violacé celle des flavonones.

#### **2.2.5.2.4.2- Les leucoanthocyanes: test de BATE-SMITH**

Dans le quatrième tube ci-dessus, 0,5ml d'acide chlorhydrique concentré (12,07N) est ajouté. Le mélange est chauffé au bain-marie à 100°C pendant 30min. Après refroidissement, l'apparition d'une coloration rouge violacée marque la présence de leucoanthocyanes.

#### **2.2.5.2.5- Les anthraquinones: test de BRONTRÄGER**

Le résidu d'évaporation à sec est dissous dans 3ml d'eau distillée dans une ampoule à décanter. La solution aqueuse obtenue est additionnée du même volume de benzène. Après agitation forte, le mélange est laissé reposer. Deux phases apparaissent : la phase aqueuse et la phase benzénique (ou organique). Cette dernière est recueillie dans un tube à essai puis additionnée de 5 à 8 gouttes d'ammoniaque à 25%. L'ensemble est agité énergiquement puis laissé décanter. L'apparition d'une coloration rouge de la phase inférieure (phase alcaline) traduit la présence d'anthraquinones dans l'extrait.

#### **2.2.5.2.6- Les tanins et les polyphénols (HEMINGWAY et KARCHESY, 1989)**

Le résidu de l'évaporation à sec de l'extrait à étudier est repris dans 4ml d'eau distillée. La solution aqueuse obtenue est répartie dans quatre tubes à essai. Le premier tube sert de témoin, tandis que les trois autres sont utilisés pour la détection et l'identification des tanins et des composés phénoliques.

##### **2.2.5.2.6.1- Test à la gélatine**

Dans le deuxième tube, 4 gouttes de gélatine aqueuse à 10% sont ajoutées. L'apparition d'un précipité blanc indique la présence de tanins hydrosolubles de type catéchique.

##### **2.2.5.2.6.2- Test à la gélatine salée**

Pour le troisième tube, 4 gouttes de gélatine salée aqueuse à 1% sont additionnées (gélatine 1g dans 100ml de solution de chlorure de sodium (NaCl) à 10%). La présence des tanins condensés de type pyrogallique est marquée par la formation d'un précipité.

#### **2.2.5.2.6.3- Test au chlorure ferrique**

Dans le quatrième tube, 4 à 5 gouttes de chlorure ferrique en solution méthanolique sont versées. La formation d'un précipité vert-noir ou noir-bleuâtre prouve la présence de tanins de type catéchol. Le changement de coloration en bleuâtre est caractéristique des tanins de type pyrogallol.

#### **Remarque :**

Si les tests à la gélatine et à la gélatine salée sont négatifs alors que le test au chlorure ferrique montre une coloration bleu-noir ou verte, l'extrait contient d'autres composés polyphénoliques.

#### **2.2.5.2.7- Les saponines (FONG et coll., 1977)**

Le résidu d'évaporation à sec de l'extrait à analyser est dissous dans 1ml d'eau distillée. Après une forte agitation de 30s, la formation d'une mousse de 3cm de hauteur, persistant pendant 30min, indique la présence de saponines dans l'extrait.

#### **2.2.5.2.8- Les iridoïdes**

Le résidu d'évaporation à sec est redissous dans l'eau distillée ; l'extrait aqueux obtenu est additionné de 0,5ml d'une solution d'acide chlorhydrique concentrée. Le mélange est placé dans un bain-marie pendant 30min. L'apparition d'une coloration bleue après refroidissement indique la présence d'iridoïdes.

### 3- RÉSULTATS

#### 3.1- EXTRACTION

Dans cette étude, deux types d'extraction ont été réalisés : l'un à froid et l'autre à chaud. Les solvants d'extraction utilisés sont l'eau distillée et le mélange hydroalcoolique 75%.

##### 3.1.1- EXTRACTION A FROID

###### 3.1.1.1- Extraction aqueuse

Vingt grammes de poudre de feuilles sèches sont délayés dans 200ml (rapport 1/10 ; p/v) d'eau distillée et l'extraction se poursuit selon la méthode décrite au § 2.2.2.1 p.8. Le surnageant obtenu après centrifugation est évaporé jusqu'à un volume final de 20ml (rapport 1/1 ; p/v). L'apparition d'un précipité au cours de l'évaporation de l'extrait rend nécessaire la réalisation d'une nouvelle centrifugation. Le dernier surnageant limpide, de couleur rouge brique, toxique pour la souris (voir méthode d'estimation de la toxicité § 2.2.1.1.1.1 p.27), constitue l'extrait brut (EB).

###### 3.1.1.2- Extraction hydroalcoolique 75%

Vingt grammes de poudre de feuilles sont extraits selon la méthode ci-dessus, mais le solvant d'extraction est le mélange hydroalcoolique 75%. L'extrait brut alcoolique limpide obtenu, de volume final 20ml, de couleur rouge brique, est toxique pour la souris.

##### 3.1.2- EXTRACTION A CHAUD

Vingt grammes de poudre de feuilles sont mises en suspension dans 400ml d'eau distillée et le mélange est chauffé à reflux en appliquant la méthode décrite au § 2.2.2.2 p.8. L'extrait brut obtenu, de volume 20ml, est de couleur rouge brique, limpide. Il est toxique pour la souris.

Les caractéristiques (pH, couleur, aspect, temps de survie des souris) des différents extraits bruts sont résumées dans le *tableau 1*.

*Tableau 1 : Caractéristiques des extraits bruts obtenus par les différentes techniques d'extraction*

Type d'extraction	pH	Couleur	Aspect	Temps de survie des souris
Aqueuse à froid	n.d	Rouge brique	limpide	75min
Hydroalcoolique 75% à froid	4,71	Rouge brique	limpide	42min
Aqueuse à chaud	n.d	Rouge brique	limpide	55min

n.d : non déterminé

Ce tableau nous montre que les extraits bruts ont à peu près les mêmes caractéristiques. Toutefois, la méthode d'extraction hydroalcoolique a été adoptée pour la suite des travaux dans le souci d'obtenir un extrait brut stérilisé (germes éventuels éliminés), et débarrassé des enzymes hydrolytiques. De plus, l'extrait brut correspondant présente la meilleure toxicité.

### **3.2- PURIFICATION**

Cinq techniques de fractionnement ont été éprouvées pour essayer d'isoler les principes toxiques à partir de l'extrait brut hydroalcoolique à froid. Nous rapportons ici les résultats de toutes ces méthodes même si certaines d'entre elles n'ont pas été retenues dans le procédé de purification définitif. En effet, ces techniques ont apporté des informations sur les propriétés physico-chimiques de nos principes toxiques.

La purification est guidée par des tests de toxicité sur souris (voir méthode au § 2.2.1.1.1.1 p.27), et d'homogénéité par CCM (voir méthode au § 2.2.5.1 p.12).

A chaque étape de la purification, l'extrait obtenu est évaporé à sec et le résidu obtenu est pesé.

#### **3.2.1- TRAITEMENT PAR LA CHALEUR**

L'extrait brut (20 ml) est traité par la chaleur selon la méthode décrite au § 2.2.3.1.2 p.9. L'extrait reste limpide et aucun précipité ne se forme. Cette étape n'a pas été retenue car elle ne permet d'éliminer aucun contaminant, mais ces résultats indiquent que les principes toxiques sont thermostables. En effet, l'extrait brut ainsi traité est toxique.

### 3.2.2- FRACTIONNEMENT PAR LE n-BUTANOL

20ml d'extrait brut sont traités par 20ml de n-butanol suivant la méthode décrite au § 2.2.3.2 p.9. Après 4 extractions, deux phases (une phase organique de couleur orange et une phase aqueuse de couleur orange clair) sont obtenues. La phase organique débarrassée du butanol est toxique sur souris, alors que la phase aqueuse ne provoque aucun effet.

Les principes toxiques sont donc solubles dans le butanol. Ce traitement constitue la première étape de la purification. La phase organique limpide de couleur orange est appelée extrait E1.

### 3.2.3- PRECIPITATION PAR L'ANP

A 10ml d'extrait E1 sont ajoutés 1,5ml de solution d'acétate neutre de plomb 20% (voir méthode au § 2.2.3.3 p 9). L'excès de plomb est éliminé par addition de 0,8ml de solution de phosphate disodique 10%.

Le surnageant de couleur jaune clair est limpide, et toxique sur souris. La toxine n'est donc pas précipitée par l'ANP. Cette méthode a été également adoptée dans le protocole définitif. L'extrait obtenu est appelé extrait E2.

### 3.2.4- CHROMATOGRAPHIE SUR GEL SEPHADEX G25

L'extrait E2 (25ml) est évaporé à sec et le résidu est mis en suspension dans de l'eau distillée. La solution obtenue, de volume 3,5ml, est déposée sur une colonne de gel Sephadex G<sub>25</sub> de volume 70cm<sup>3</sup> (1,6 x 35cm) préalablement équilibrée avec de l'eau distillée. Le débit d'éluat effectué par gravité, est d'environ 2,43ml/h/cm<sup>2</sup>. L'éluat collecté par fractions de volume constant (1,5ml/tube) est analysé par chromatographie sur couche mince.

Les chromatogrammes sont d'abord examinés sous UV, puis révélés à l'aide du réactif à la vanilline sulfurique. Les contenus des tubes qui donnent des chromatogrammes similaires sont rassemblés. Cinq groupes de fractions ont été ainsi constitués :

Groupe I : 31,5ml

Groupe II : 4,5ml

Groupe III : 9ml

Groupe IV : 22,5ml

Groupe V : 90ml

Les volumes de chaque fraction sont ramenés à 5ml par évaporation.

Les groupes I, II et III sont toxiques sur souris. Leur évaporation à sec laisse respectivement des résidus de 0,1g ; 0,06g ; 0,075g. Le rendement est donc très faible, respectivement de l'ordre de 0,4%, 0,24%, 0,3%. Par conséquent, cette méthode n'a pas été adoptée.

### 3.2.5- DIALYSE

En utilisant la méthode décrite au § 2.2.3.4 p.10, 10 ml de l'extrait E2 sont dialysés contre environ 6000ml d'eau distillée.

Le liquide à l'intérieur du boudin ou dialysant, de couleur jaune clair et dont le volume est ramené à 10ml, n'est pas toxique pour la souris mais il provoque des symptômes entraînant la mort au-delà de 24h.

Le liquide à l'extérieur du boudin ou dialysat, de couleur jaune clair, provoque aussi la mort des souris au-delà de 24h. D'après ces résultats, une partie des toxines peut montrer une interaction avec la membrane à dialyse et rester à l'intérieur du boudin.

Cette étape n'a pas été retenue car les résultats ne sont pas satisfaisants.

Le procédé de purification définitif comporte alors deux étapes qui sont : le fractionnement par le n-butanol et la précipitation par l'acétate neutre de plomb. Il est résumé sur le schéma de la *figure 3*.

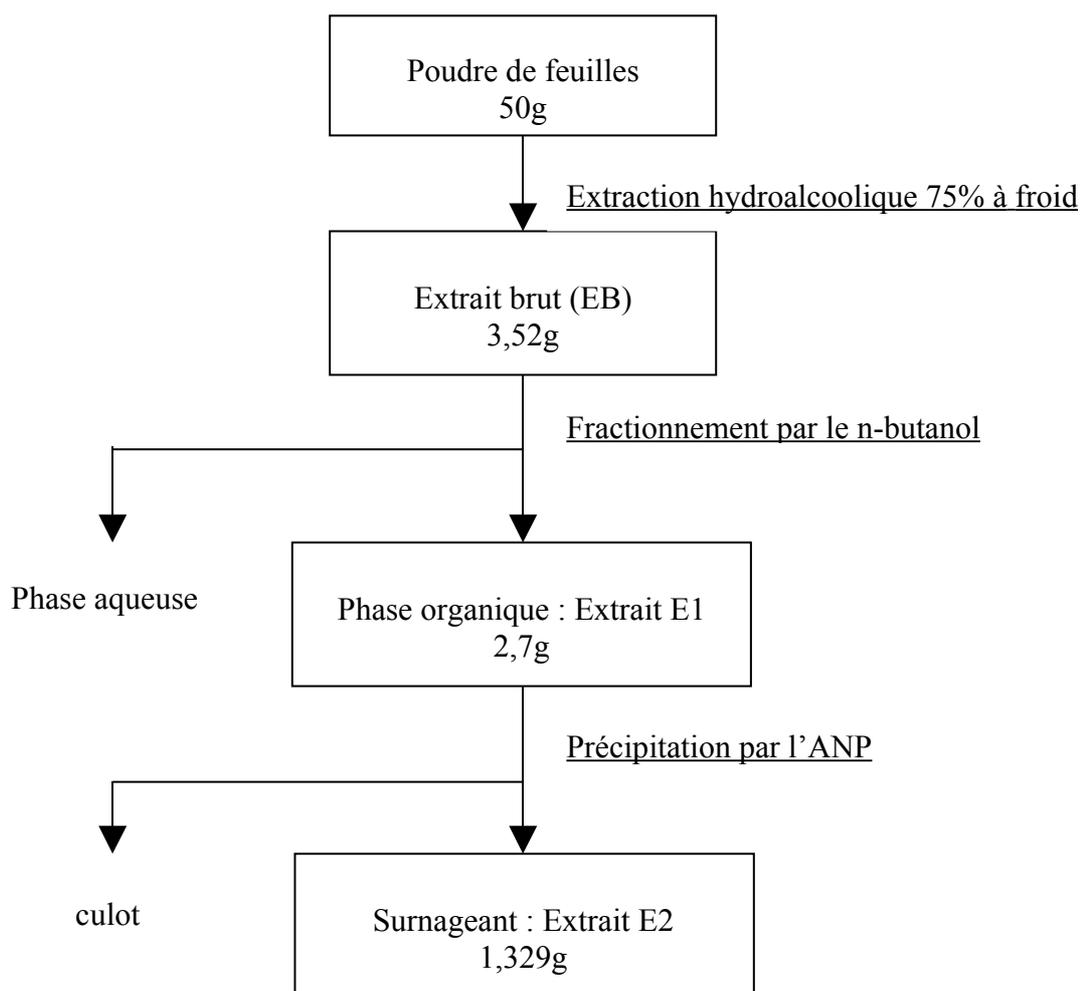


Figure 3: Schéma résumant les différentes étapes de la purification

Les chiffres représentent le poids des résidus d'évaporation à sec des extraits

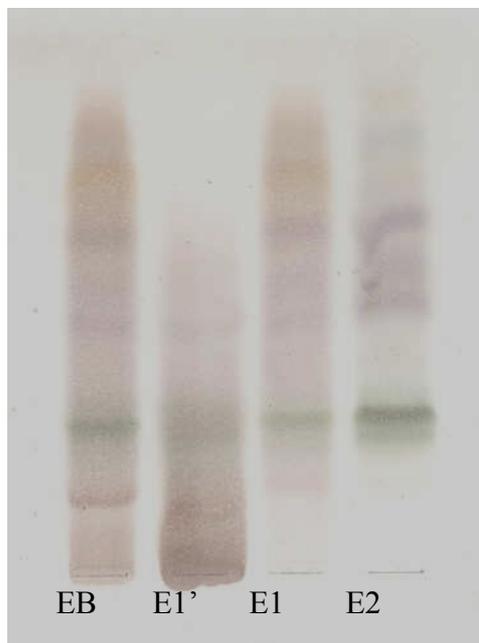
### 3.2.6- RENDEMENT

Les résidus d'évaporation à sec de EB et de l'extrait E2 pèsent respectivement 3,52g et 1,329g. Par conséquent, le rendement calculé par rapport au matériel de départ (50g de poudre de feuilles de *Gambeya boiviniana*), est de l'ordre de 2,658%, et le rendement de purification par rapport à l'EB est d'environ 37,75%.

### 3.2.7- DEGRE D'HOMOGENEITE DES PRODUITS

L'évolution de l'homogénéité des extraits aux cours des différentes étapes de purification a été suivie par chromatographie sur couche mince, en utilisant le système de solvants : butanol/acide acétique/eau B/A/E (60/20/20 ; p/p) .

La révélation à l'aide du réactif à la vanilline sulfurique (*figure 4*), permet d'observer que de l'extrait brut comporte 7 bandes majeures et E2 comporte 4 bandes majeures. La purification a donc permis d'éliminer 3 bandes majeures.



*Figure 4: CCM dans le système B/A/E (60/20/20 ; p/p) des extraits obtenus au cours des différentes étapes de la purification*

EB : extrait brut ; E1 : phase organique ; E1' : phase aqueuse; E2: extrait E2

### **3.3- PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES :**

Le comportement des principes toxiques au cours de l'extraction et de la purification a permis de déduire certaines de leurs propriétés physico-chimiques. Ainsi :

- Ils sont thermostables ;
- Ils sont solubles dans l'eau, l'éthanol, le butanol ;
- Les résidus obtenus après évaporation à sec (EB, E1 et E2) ont une odeur de citron et sont sirupeux ;
- Les opérations de congélation et de décongélation répétée n'affectent pas leur toxicité ;
- D'après leur comportement sur Sephadex G25, les principes toxiques ont un poids moléculaire compris entre 1000 et 5000 Da ;
- Les principes toxiques interfèrent en partie avec la membrane à dialyse ;
- Les principes actifs ont un goût amer.

### 3.4- NATURE CHIMIQUE

Les résultats du criblage phytochimique de l'extrait semi-purifié E2 sont présentés dans le *tableau 2*

*Tableau 2: Résultats de la détection des familles chimiques sur l'extrait E2.*

Famille chimique	Tests	Observations	Résultats
ALCALOIDES	MAYER	Absence de précipité	-
	WAGNER	Absence de précipité	-
	DRAGENDORFF	Absence de précipité	-
STEROIDES et TRITERPENES	LIEBERMANN-BURCHARD	Apparition d'anneau rouge à l'interface	+ (triterpènes)
	SALKOWSKI	Présence d'anneau rouge	+ (stérois insaturés)
DESOXYOSES	KELLER-KILIANI	Formation d'anneau pourpre	+
FLAVONOIDES et LEUCOANTHOCYANES	WILSTATER	Coloration rouge-violacée	+ (flavonones)
	BATE-SMITH	Coloration rouge	+ (leucoanthocyanes)
ANTRHRAQUINONES	BORNSTRÄGER	Absence de coloration rouge de la phase alcaline	-
TANINS et POLYPHENOLS	Test à la gélatine	Absence de précipité	-
	Test à la gélatine salée	Absence de précipité	-
	Test au chlorure ferrique	Coloration bleue verdâtre	+ (composés phénoliques)
SAPONINES	Indice de mousse	Absence de mousse persistante	-
IRIDOIDES	HCl à chaud	Absence de précipité bleu	-

+ : test positif

- : test négatif

D'après ce tableau, l'extrait E2 réagit positivement aux tests des flavonones, des stérois insaturés, des triterpènes et à celui des composés phénoliques.

#### 4- DISCUSSION-CONCLUSION

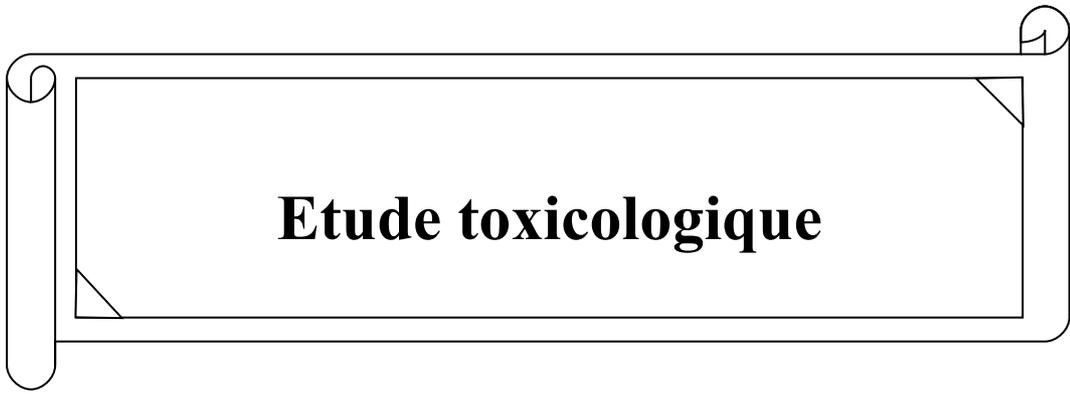
Cette étude chimique a permis de mettre en évidence la toxicité des feuilles de *Gambeya boiviniana* sur la souris.

La méthode d'extraction hydroalcoolique a été choisie pour extraire les principes toxiques car l'extrait brut obtenu est stérile et débarrassé des enzymes hydrolytiques.

Deux d'entre les techniques de purification testées ont été retenues, à savoir le fractionnement par le n-butanol et la précipitation par l'acétate neutre de plomb. Ces méthodes basées sur la différence de solubilité, constituent les étapes du procédé de purification aboutissant à un extrait partiellement purifié. Le rendement est de 37,75%.

Les techniques de fractionnement utilisées, retenues ou non dans le procédé de purification, ont fourni des renseignements sur les propriétés physico-chimiques des principes actifs. Il s'agit de composés thermostables, solubles dans l'eau, l'éthanol, le butanol. Ils ne sont pas précipitables par l'acétate neutre de plomb. Ils montrent une adsorption aspécifique partielle sur la membrane de dialyse.

Les résultats du criblage phytochimique indiquent que l'extrait purifié E2 comporte des flavonones, des triterpènes, des stérols insaturés et des composés phénoliques. Il ne contient pas de saponosides, contrairement à *Mimusops commersonii*, une autre Sapotacée dont l'extrait de graines contient des principes actifs de nature saponosidique (RAMAMONJISOA-RAKOTOARIVELO).



**Etude toxicologique**



## 1-INTRODUCTION

L'étude chimique a permis d'obtenir un extrait toxique partiellement purifié, à partir de la poudre de feuilles sèches qui nous a servi du matériel d'étude.

Dans cette deuxième partie, nous avons exploré les propriétés toxicologiques des principes actifs sur des organismes animaux, végétaux, et microbiens. Ainsi, nous avons examiné :

- l'effet-dose, les symptômes d'intoxication et les lésions provoquées au niveau de différents organes chez la souris ;
- le pouvoir hémolytique sur les hématies de mouton ;
- les effets chez les animaux à sang froid (poissons, têtards de grenouille, larves de moustique) ;
- les effets sur la germination des graines de plusieurs espèces de plantes monocotylédones et dicotylédones ;
- les effets sur la croissance de divers germes pathogènes.

Les tests ont été réalisés avec l'extrait partiellement purifié E2 ou extrait. Pour les expériences nécessitant une quantité relativement importante de toxines, nous avons eu recours à l'extrait brut.

## 2-MATERIELS ET METHODES

### 2.1-MATÉRIELS

#### 2.1.1-LES ANIMAUX D'EXPÉRIMENTATION

##### 2.1.1.1-Les souris

Les souris (*Mus musculus*), de race TANA-SWISS stabilisée depuis plusieurs années à l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) proviennent de l'animalerie du laboratoire de Biochimie Fondamentale et Appliquée (LABASM).

##### 2.1.1.2-Les têtards

Les têtards de grenouille (*Ptychadena mascareniensis*), sans pattes, sont capturés dans des rizières situées dans le campus de l'Université d'Antananarivo sis à Ankatso. Ils sont adaptés dans un aquarium contenant de l'eau de pluie quelques jours avant les tests.

### 2.1.1.3-Les poissons

Les Pirina (*Gambusia holbrooki*) proviennent des rizières d'Ankatso. Les tests sont effectués après quelques jours d'adaptation des poissons dans un aquarium.

### 2.1.1.4-Les larves de moustique

Les larves de moustique (*Culex quinquefasciatus*) sont prises dans des rizières d'Ankatso. Les larves ne sont capturées que le jour du test.

## 2.1.2-LES VÉGÉTAUX D'EXPÉRIMENTATION

Les graines utilisées proviennent de la collection du FO.FI.FA (Ambatobe Antananarivo). Elles sont présentées dans le *tableau 3* .

*Tableau 3: Végétaux d'expérimentation*

Nom vernaculaire	Espèce	Famille
Carotte	<i>Docus carotta</i>	APIACEAE
Tissam white	<i>Brassica sp</i>	BRASSICACEAE
Concombre	<i>Cucumis sp</i>	CUCURBITACEAE
Petit pois	<i>Pisum sativum</i>	FABACEAE
Haricot	<i>Phaseolus vulgaris</i>	FABACEAE
Oignon	<i>Allium cepa</i>	LILIACEA
Riz	<i>Oryza sativa</i>	POACEAE
Maïs	<i>Zea mays</i>	POACEAE
Morelle noire	<i>Solanum nigrum</i>	SOLANACEAE

## 2.1.3-LES MICRO-ORGANISMES UTILISÉS

Les germes utilisés ont été isolés à partir de la collection du C.N.R.E (Centre National pour la Recherche sur l'Environnement).

## 2.1.4-LES MILIEUX DE CULTURE (MUELLER et HINTON, 1941 ; MARCHAL et BORDON, 1987 ; MEYER, DEIMA et LECLERE, 1995 ; LE MINOR et HERON, 1999 )

Deux milieux de culture ont été utilisés pour l'isolement des germes :

- **Le bouillon nutritif**: c'est un milieu liquide permettant la croissance des bactéries qui n'ont pas d'exigence particulière. Le bouillon nutritif est également utilisé pour la relance des souches.
- **La gélose ordinaire**: c'est un milieu solide utilisé pour l'isolement, le contrôle et la conservation des colonies microbiennes.

Cinq milieux ont servi à l'identification des bactéries:

- **Milieu de SIMMONS**: ce milieu est utilisé pour identifier les bactéries par mise en évidence de l'utilisation du citrate de sodium comme seule source de carbone.
- **Milieu lysine-fer**: il s'agit d'un milieu solide riche en lysine. Ce milieu est utilisé pour mettre en évidence la production de sulfure d'hydrogène et la fermentation du glucose.
- **Milieu mannitol-mobilité-nitrate**: c'est un milieu semi-mou permettant la recherche simultanée de la fermentation du mannitol, de la mobilité et de la réduction du nitrite en nitrate.
- **Milieu HAJNA-KLIGLER (lactose-glucose-H<sub>2</sub>S)**: c'est un milieu solide utilisé pour rechercher l'utilisation du glucose et du lactose par les microorganismes. Ce milieu est aussi utilisé pour la détection de la production de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S).
- **Milieu urée-indole**: il s'agit d'un milieu liquide permettant de rechercher l'uréase, la production d'indole et la tryptophane désaminase TDA.

Le milieu utilisé pour étudier la sensibilité des bactéries aux antibiotiques est celui de **MUELLER-HINTON**.

La composition de tous ces milieux est présentée en *annexe III*.

## **2.2- MÉTHODES**

### **2.2.1- MÉTHODES D'ÉTUDE DES EFFETS SUR LES ANIMAUX**

#### **2.2.1.1- Tests sur les animaux à sang chaud**

##### **2.2.1.1.1- Chez la souris**

##### **2.2.1.1.1.1- Estimation de la toxicité**

La toxicité est estimée par injection de 0,3ml d'extrait par voie intrapéritonéale (i.p.). Un lot de 3 souris mâles de 25±2g est utilisé pour chaque test. Un autre lot de 3 souris mâles de 25±2g, recevant 0,3ml de sérum physiologique, sert de témoin.

Pendant l'expérience, les symptômes d'intoxication et le temps de survie de chaque animal sont notés.

#### **2.2.1.1.1.2- Détermination de la $DL_{50}$** (REED et MUENCH, 1938)

La  $DL_{50}$  (24h) est la dose qui tue 50% des animaux en 24 h. Elle est déterminée par la méthode de REED et MUENCH (1938).

Différentes doses en progression géométrique de l'extrait à tester sont injectées à des lots de 5 souris mâles de 25±2g. Ces doses se situent entre la  $DL_{100}$  (dose létale la plus faible qui tue 100% des animaux testés en 24h) et la  $DL_0$  (dose la plus élevée provoquant 0% de mortalité).

Pour chaque lot, une dose d'extrait à étudier est injectée à raison de 0,3ml par 25g de poids et par voie i.p.

Un lot de 5 souris mâles recevant du sérum physiologique sert de témoin.

La mortalité pour chaque dose est notée toutes les heures.

La valeur de la  $DL_{50}$  (24h) est évaluée de deux façons:

- à l'aide de la formule suivante :

$$\log DL_{50} = \log B + \frac{(0,5 - N)}{M - N} \log r$$

Où : B = dose immédiatement inférieure à la  $DL_{50}$

N = mortalité provoquée par la dose B en fraction décimale

M = mortalité provoquée par la dose immédiatement supérieure à la  $DL_{50}$  en fraction décimale

r = raison de la progression géométrique

- à l'aide de la méthode graphique, consistant en la projection du point d'intersection de la courbe des totaux cumulatifs des survivants et de celle des totaux cumulatifs des morts, en fonction des doses injectées.

#### **2.2.1.1.1.3- Examen histopathologique** (DELARUE et coll., 1969 ; HOULD, 1984 ; CHOMETTE et coll., 1984 ; DIEBOLD et coll., 1991)

L'étude des lésions histopathologiques s'effectue en plusieurs étapes :

- le prélèvement et la fixation d'organes

- l'inclusion
- la microtomie et l'étalement des coupes
- la coloration des coupes et le montage des lames

#### **2.2.1.1.3.1-Prélèvement et fixation d'organe**

C'est le traitement des organes prélevés pour conserver les cellules dans l'état normal par le blocage du processus de déshydratation et de putréfaction des tissus.

Les souris ayant bien développé des symptômes d'intoxication sont sacrifiées. Le cœur, le foie, les reins, le cerveau, le poumon, l'estomac sont rapidement prélevés et plongés dans le liquide fixateur ou liquide de BOUIN. Après 48h, chaque organe est fragmenté en coupes minces de 5mm d'épaisseur à l'aide d'un bistouri.

##### Composition du liquide de BOUIN :

- acide picrique	5ml
- formol à 40%	20ml
- acide acétique glacial	5ml

#### **2.2.1.1.3.2-Inclusion**

L'inclusion consiste en l'incorporation des fragments tissulaires dans des blocs de paraffine. Elle comporte une série de traitements des fragments de tissu, appelée circulation.

Les étapes sont :

- la déshydratation des fragments par l'alcool, étape pendant laquelle l'eau tissulaire est remplacée par l'alcool
- l'imprégnation des fragments par le toluène (qui est un solvant de la paraffine) pour permettre la fixation de la paraffine,
- l'imprégnation des fragments par la paraffine.

Le fragment issu de chaque cassette est ensuite plongé dans la paraffine liquide à 56°C, coulée dans un moule métallique (TISSUE TEK). Les moules sont placés à +4°C pour solidifier la paraffine. Ainsi, les fragments tissulaires se trouvent inclus dans un bloc solide de paraffine à partir duquel va s'effectuer la microtomie.

#### **2.2.1.1.3.3-Microtomie et étalement des coupes**

Des coupes minces régulières de 5µm d'épaisseur sont pratiquées à l'aide d'un microtome rotatif à partir des fragments inclus dans le bloc de paraffine. Les coupes sont étalées dans un bain thermostaté, puis elles sont dépliées délicatement à l'aide d'un scalpel.

Finalement, les coupes sont montées sur une lame préalablement enduite de colle.

#### **2.2.1.1.1.3.4 -Coloration des coupes et montage des lames**

Avant leur coloration, les lames sont d'abord débarrassées de la paraffine par le toluène puis réhydratées. Le tissu devient incolore, puis il est coloré à l'aide d'un colorant basique, l'hématoxyline (qui colore le noyau en bleu ou en noir), et d'un colorant acide, l'éosine (qui colore le cytoplasme en rose ou en rouge). Le tissu conjonctif est fixé par du safran.

Les lames ainsi colorées sont alors déshydratées encore une fois par l'alcool, rincées par le toluène et recouvertes d'abord d'une goutte de baume de Canada pour les protéger puis de lamelles. L'observation des coupes se fait au microscope optique au grossissement X100.

#### **2.2.1.1.2-Test hémolytique sur les hématies de mouton**

##### **2.2.1.1.2.1-Principe**

En présence d'une substance hémolytique, les hématies sont lysées et libèrent l'hémoglobine, rendant le surnageant rouge. Les hématies intactes sédimentent.

##### **2.2.1.1.2.1-Mode opératoire**

Une suspension de sang frais de mouton est utilisée. Trois lavages successifs sont effectués en mélangeant la suspension de sang avec du sérum physiologique, puis en centrifugeant l'ensemble à 3000trs/min (centrifugeuse BERMET 52) pendant 5min. Le culot est récupéré tandis que le surnageant est éliminé par aspiration. Le culot obtenu au troisième lavage constitue les hématies à 100%. Une suspension d'hématies à 50% est obtenue en mélangeant volume-à-volume le culot précédent et du sérum physiologique. Une suspension à 2% est préparée par dilution de la suspension à 50% avec du tampon « phosphate buffered saline » (PBS) dont la composition est la suivante :

- Chlorure de sodium 7,65g
- Phosphate disodique 0,724g
- Phosphate monopotassique 0,210g
- Eau distillée 1000ml

L'extrait à tester est dilué en cascade avec du PBS (progression géométrique de raison 0,5).

Dans les cupules d'une micro-plaque à fond en «V » contenant chacune 50µl d'extrait à tester de concentrations décroissantes, 50µl de suspension d'hématies à 2% sont versées.

Deux témoins sont réalisés :

- un témoin positif (T+) contenant 50µl d'eau distillée mélangés avec 50µl de suspension d'hématies à 2% ; ce mélange présente une hémolyse
- un témoin négatif (T-) contenant 50µl de PBS mélangés avec 50µl de suspension d'hématies à 2% ; aucune hémolyse n'apparaît

Le *tableau 4* montre la composition du milieu pour le test hémolytique.

*Tableau 4: Composition du milieu pour le test hémolytique*

<b>Numéro cupule</b>	T+	T-	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Extrait à tester (µl)			50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,196	0,098
Eau distillée(µl)	50											
PBS (µl)		50		25	37,5	43,75	46,88	48,44	49,28	49,61	49,80	49,90
Concentration (mg/ml)			2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,008	0,004
Hématies à 2% (µl)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Volume final (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

La microplaque est incubée à 37°C pendant 3h, puis à +4°C pendant une nuit. La lecture des résultats se fait à l'œil nu.

Les critères de lecture sont :

- aucune hémolyse n'apparaît (test négatif) si la solution devient incolore avec un culot d'hématies au fond du puits;
- s'il y a une hémolyse totale (test positif) si la solution reste colorée en rouge;
- dans le cas d'une hémolyse partielle, la solution est colorée en rouge et on observe un culot d'hématies au fond du puits.

### **2.2.1.2-Tests sur les animaux à sang froid**

#### **2.2.1.2.1-Principe**

Les expériences sur les animaux à sang froid aquatiques consistent à tester leur résistance vis-à-vis d'une intoxication de leur milieu. De ce fait, les tests de toxicité se font par addition de différentes doses de toxines dans le milieu.

#### **2.2.1.2.2-Mode opératoire**

Les animaux sont répartis par lot de 7 dans des cristallisoirs contenant de l'eau de pluie.

L'extrait est ajouté de façon à avoir des concentrations finales suivant une progression géométrique de raison déterminée, allant de la  $CL_0$  (concentration maximale à laquelle tous les animaux survivent) à la  $CL_{100}$  (concentration minimale tuant 100% des animaux).

Un lot non-traité sert de témoin.

L'expérience dure 24h.

La détermination de la  $CL_{50}$  24h (BOYD, 1966), ou la concentration qui tue 50% des animaux testés en 24h, se fait par une méthode graphique, utilisant la régression linéaire de la relation :

$$\% \text{ de mortalité} = f(\log C)$$

Où : C : concentration en  $\mu\text{g/ml}$

L'équation de la régression est de la forme :

$$Y = A + B \log C$$

Où : Y = % de mortalité

A = une constante

B = le coefficient de régression

$\log C$  = le logarithme décimal de la concentration C

#### **2.2.1.2.2.1-Expérience sur les têtards de grenouille**

Six lots de sept têtards sans pattes sont testés avec six concentrations différentes d'extrait à tester, en progression géométrique. Ces concentrations sont déterminées d'après les résultats des tests préliminaires.

#### **2.2.1.2.2.2-Expérience sur les poissons : *Gambusia holbrooki***

Sept concentrations différentes en progression géométrique de l'extrait sont testées sur sept lots de sept *Gambusia holbrooki*.

### **2.2.1.3-Test sur les larves de moustique (OMS,1970)**

Les larves sont prélevées au moyen d'un tamis et réparties par lots de 10 dans des petits cristallisoirs contenant de l'eau de source.

Dans des béchers, différents volumes d'extrait à tester sont ajoutés de manière à avoir des concentrations en progression géométrique de raison  $r$ , allant de la  $CL_0$  (où il y a survie des larves de moustique) à la  $CL_{100}$  (tuant 100% des larves de moustique).

Les larves de moustique sont alors introduites dans le milieu en versant le contenu d'un cristallisoir dans le bécher contenant l'extrait.

Le dénombrement des larves mortes est fait au bout de 24h. Pour calculer le pourcentage de mortalité à chaque concentration, on additionne le nombre des larves moribondes et des larves mortes. Les larves sont considérées comme :

-mortes, quand, touchées par une aiguille dans la région cervicale, elles ne bougent plus ;

-moribondes, quand elles sont incapables de plonger ou de monter en surface quand on agite l'eau ;

Les larves qui se changent en nymphes pendant le test ne sont pas prises en compte.

## **2.2.2- MÉTHODES D'ÉTUDE DES EFFETS SUR LES VÉGÉTAUX**

### **2.2.2.1- Méthodes d'étude des effets sur le pouvoir germinatif**

Le test est effectué sur des graines des Monocotylédones et des Dicotylédones.

Deux lots de graines sont trempés dans l'eau de robinet pendant 48h à l'obscurité et à 30°C, pour chaque espèce étudiée. Après trempage, le premier lot est mis à germer sur du coton imbibé d'eau, et le deuxième sur du coton imbibé de l'extrait à tester de concentration déterminée.

Les résultats sont observés 72h après le trempage.

### **2.2.2.2- Méthodes d'étude des effets sur la croissance de jeunes plantules**

Le matériel végétal est constitué de jeunes plantules âgées de 4 jours d'un représentant des Monocotylédones et de celui des Dicotylédones.

#### **2.2.2.2.1- Principe**

Les effets de l'extrait à étudier se traduisent par des différences de développement des hypocotyles et des épicotyles des graines mises à germer en présence de l'extrait et de celles qui ne sont pas traitées.

#### **2.2.2.2.2- Mode opératoire**

Neuf lots de 7 graines sont utilisés pour chaque plante.

Les deux premiers lots sont trempés dans l'extrait à étudier de concentration déterminée, pendant 48h à l'obscurité et à 30°C, tandis que les sept autres lots sont trempés dans l'eau (de robinet) dans les mêmes conditions.

Après lavage à l'eau, l'un de deux lots trempés dans l'extrait est placé sur du coton arrosé du même extrait, tandis que l'autre lot est arrosé d'eau.

Après le trempage, six parmi les sept lots trempés dans l'eau sont arrosés d'extrait à six concentrations différentes, tandis que le dernier lot, servant de témoin, est toujours arrosé d'eau.

Les longueurs des hypocotyles et des épicotyles sont mesurées tous les jours pendant deux semaines.

Chaque expérience est réalisée en double.

#### **2.2.2.3-Méthodes d'évaluation des effets sur le développement des bourgeons axillaires** (HELLER et coll., 1995)

Pour évaluer les effets des extraits à tester sur le développement des bourgeons axillaires, des jeunes plantules de petit pois (*Pisum sativum*) sont utilisées. Elles sont obtenues par germination de graines dans l'eau de robinet.

Les plantules groupées en 5 lots de 5 individus sont décapitées au-dessus du deuxième bourgeon axillaire. 28µg de produit à tester (extraits toxiques, hormones de référence : gibbérelline et auxine), mélangés avec de lanoline, sont déposés sur la partie sectionnée de la plantule. Un lot traité par l'eau sert de témoin. L'expérience est toujours réalisée en double.

L'évolution des bourgeons axillaires est observée durant deux semaines.

## **2.2.3- MÉTHODES D'ÉTUDE DES EFFETS SUR LA CROISSANCE DES MICRO-ORGANISMES**

### **2.2.3.1-Stérilisation** (DUMAS et coll., 1951)

Les milieux de culture, les disques pour antibiogramme et les cônes des micropipettes sont stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15min. la verrerie est stérilisée dans un four sec à 180°C pendant 30min.

### **2.2.3.2- Isolement et purification des germes** (BONNET et NEVOT, 1955 ; LARPENT et LARPENT-GOURGAUD, 1990 ; SINGLETON, 1994)

L'isolement commence par la relance de la culture des différentes souches dans du bouillon nutritif à 37°C pendant 24h. Le milieu de culture devient trouble quand le nombre de bactéries croît.

Une ansée de souche réactivée est étalée en stries transversales sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose ordinaire. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.

Après incubation, la pureté de chaque souche est vérifiée. Les souches pures sont caractérisées par :

- des colonies d'aspect uniforme et identiques à l'œil nu ;
- des bactéries uniformes au microscope ;
- des caractères culturels et biochimiques spécifiques à la souche.

En présence de contaminants, la souche présente d'autres types de colonies sur boîte. Dans ce cas, l'isolement est répété jusqu'à l'obtention d'une souche pure.

### **2.2.3.3-Vérification des caractères d'identification morphologiques** (DUMAS et coll., 1951 ; FERRON, 1994)

#### **2.2.3.3.1-Observation macroscopique**

Elle consiste à observer de l'aspect de colonies isolées sur un milieu solide, à savoir :

- la taille et la forme (bombée, semi-bombée, plate,...)
- la transparence (transparent, translucide, opaque,...)
- l'aspect de la surface (lisse, rugueuse, muqueuse,...)
- la consistance (grasse, crémeuse, sèche...)
- la couleur (grisâtre, ocre, blanche ...)

### **2.2.3.3.2- Observation microscopique**

Elle permet de déterminer les caractères morphologiques des bactéries tels que la forme, le mode de groupement, la présence de capsule, de flagelle, de pili,....

L'observation à l'état frais et la coloration de Gram sont alors pratiquées.

#### **2.2.3.3.2.1- Observation à l'état frais**

Elle est réalisée sur des bactéries vivantes ou des levures en l'absence de toute fixation et de coloration. Elle permet de voir la morphologie des bactéries, leur mobilité, leur mode de groupement...

Pour cela, une ansée d'une colonie isolée, suspendue dans une goutte d'eau distillée, est déposée entre lame et lamelle puis observée au microscope après lutage de côtés avec de la paraffine.

#### **2.2.3.3.2.2- Coloration de Gram**

Cette méthode permet de connaître la morphologie des bactéries et de les classer en deux groupes bien distincts : Gram + et Gram -.

Une ansée de la colonie est mise en suspension dans 3 gouttes d'eau distillée. Une aliquote de la suspension ainsi obtenue est déposée sur une lame. Le frottis obtenu est séché au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen, puis fixé par trois passages sur la même flamme. La lame est ensuite colorée successivement par le violet de gentiane pendant 1min, par le lugol pendant 1min, et enfin elle est lavée à l'alcool pendant 30secondes. Après rinçage à l'eau, la lame est recolorée par la fuschine de Ziehl. Après 1min de contact, la lame est lavée de nouveau à l'eau, puis elle est séchée entre deux couches de papier buvard. Finalement, le frottis est recouvert de 3 gouttes d'huile d'immersion et la lame est observée sous microscope optique (grossissement X 100).

L'observation de la lame montre que :

- les bactéries Gram - sont colorées en rose ou en rouge ;
- les bactéries Gram + sont colorées en violet foncé.

### **2.2.3.4- Vérification des caractères d'identification biochimique**

(DUMAS et coll., 1951 ; FERRON, 1994)

Chaque souche estensemencée sur différents milieux d'identification (voir composition en *annexe III*). Les milieuxensemencés sont incubés à 37°C en aérobiose.

#### **2.2.3.4.1- Milieu de SIMMONS**

L'ensemencement se fait en stries à l'aide d'une anse de platine sur de la gélose pente. Le bleu de bromothymol est utilisé comme indicateur de pH. La coloration vire au bleu ou au bleu-vert si la réaction est positive. Les bactéries sont alors dites citrate +.

#### **2.2.3.4.2- Milieu lysine-fer**

L'inoculation est enfoncé dans le culot puis à la surface de la pente au moyen d'une anse de platine. Le bromocrésol est utilisé comme indicateur de pH. L'apparition d'une coloration noire traduit la formation de sulfure d'hydrogène. L'utilisation du glucose est mise en évidence par changement de la coloration violette en jaune.

#### **2.2.3.4.3- Milieu mannitol-mobilité-nitrate**

L'ensemencement se fait par piqûre centrale à l'aide d'une anse. L'indicateur de pH utilisé est le rouge de phénol. Si les bactéries utilisent le mannitol dans leur métabolisme, la coloration rouge devient jaune. La mobilité des bactéries se traduit par la turbidité du milieu.

#### **2.2.3.4.4-Milieu de HAJNA-KLIGLER : lactose-glucose-H<sub>2</sub>S**

L'ensemencement se fait au fond du milieu avec l'anse de platine puis à la surface de la pente. Le rouge de phénol est utilisé comme indicateur de pH. Le virage de la coloration rouge au jaune indique l'utilisation de glucose ou de lactose par la souche. L'apparition d'une coloration noire dans le culot met en évidence la formation du sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S).

#### **2.2.3.4.5- Milieu urée-indole**

L'inoculum est mis en suspension directement dans le milieu liquide. La réaction est dite urée + si la coloration orange devient rouge ou violette et indole + s'il y a formation d'anneau rouge à la surface, après addition au milieu urée-indole ensemencé de 3 gouttes de réactif de KOVACS.

#### Composition du réactif de KOVACS :

- paradiméthylamine	5g
- alcool amylique	75ml
- acide chlorhydrique	25ml

Le test au tryptophane désaminase (TDA) est positif, quand, après addition de 3 gouttes de réactif hyperchlorure de fer, il y a apparition de précipité blanc dans le milieu ensemencé.

#### **2.2.3.5- Méthodes d'étude des effets sur les germes (DUVAL et SOUSSY, 1990)**

Les effets des extraits sur les micro-organismes sont étudiés en milieu solide par la méthode des disques.

##### **2.2.3.5.1-Méthode de diffusion en milieu solide ou méthode des disques**

L'agent antimicrobien entre en contact direct avec les germes par diffusion en milieu gélosé. L'activité antimicrobienne est appréciée par mesure du diamètre de la zone d'inhibition qui apparaît autour du disque imprégné de la substance active.

###### **2.2.3.5.1.1- Préparation de l'inoculum**

Les souches pures sont relancées à nouveau dans du bouillon nutritif au bout de 18h pour les bactéries et de 24h pour les levures.

###### **2.2.3.5.1.2- Préparation des extraits**

Les extraits à tester sont stérilisés par filtration sur filtre millipore avant de les charger sur les disques.

###### **2.2.3.5.1.3- Inoculation des milieux**

Le milieu utilisé est l'agar de MUELLER-HINTON, coulé en boîte de Pétri. Environ 20min après la préparation du milieu, l'inoculum est ensemencé sur la gélose selon la technique d'inondation. Les boîtes ensemencées sont laissées pendant 15 min à l'étuve à 37°C pour les bactéries et à 30°C pour les levures pour permettre une bonne adhérence des germes. Ensuite, l'excès d'inoculum dans les boîtes est aspiré à l'aide d'une pipette.

###### **2.2.3.5.1.4- Préparation des disques**

Les extraits sont déposés sur des disques de cellulose stériles, à raison de 20µl par disque. Les disques imprégnés sont séchés à l'étuve à 37°C pendant quelques minutes puis appliqués sur la gélose ensemencée. L'incubation se fait pendant 24h à 48h à 37°C pour les bactéries et à 30°C pour les levures.

### 2.2.3.5.1.5- Norme de lecture des résultats

Un germe est qualifié de sensible quand une zone d'inhibition apparaît autour du disque. Le diamètre du halo d'inhibition ainsi formé est proportionnel à la sensibilité du germe à l'agent anti-bactérien.

La norme utilisée pour l'expression des résultats, est présentée dans le *tableau 5*.

*Tableau 5: Norme utilisée pour l'expression des résultats des méthodes de diffusion.*

Diamètre de la zone d'inhibition x	Résultats	
	sensibilité	Symbole
x < 7mm	insensible	-
7mm < x < 8mm	assez sensible	+
8mm < x < 9mm	sensible	++
x > 9mm	très sensible	+++

x : diamètre du halo

### 2.2.3.5.2- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est la plus faible concentration d'extrait pour laquelle il n'y a pas de croissance visible. Elle est déterminée par la méthode de diffusion en milieu solide sur le milieu de MUELLER-HINTON. Elle correspond à la plus faible concentration qui provoque l'apparition d'un halo d'inhibition de diamètre compris entre 7 mm et 8mm.

<b>3-RESULTATS</b>
--------------------

**3.1- EFFETS SUR LES ANIMAUX****3.1.1- EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG CHAUD****3.1.1.1- Effets sur la souris****3.1.1.1.1- Description des symptômes d'intoxication**

- Immédiatement après injection de l'extrait E2, à la dose létale 159,36mg/kg, les souris tournent en rond dans leur cage.
- Cinq minutes après l'injection, elles respirent profondément, la fréquence respiratoire passe de 90 à 150 par minute. Les pavillons des oreilles sont tirés vers l'arrière et une hyperhémie est observée.
- Après 20min, les souris restent immobiles et montrent une piloérection.
- Au bout de 2h 30min, une diminution progressive du rythme respiratoire et une enophtalmie sont observées. Une ataxie prend place.
- Les symptômes ci-dessus persistent pendant environ 8h. Puis, les souris montrent des convulsions cloniques espacées, juste 30min avant leur mort. Ces convulsions deviennent de plus en plus fortes entraînant la mort de l'animal au bout de 9h.

A la dose sub-létale 84,69mg/kg, une augmentation de la fréquence respiratoire apparaît aussi pour les souris injectées. Leurs oreilles sont tirées vers l'arrière.

Après 30min, les souris bougent rarement et montrent une piloérection et une enophtalmie.

Les souris restent immobiles pendant quelques heures. Huit heures après l'injection, une rémission des sujets apparaît et ceux-ci reviennent progressivement vers un état normal.

**3.1.1.1.2-Détermination de la DL<sub>50</sub>(24h)**

Sept doses en progression géométrique de raison  $r$  égale à 0,9 allant de 84,69mg/kg (0%de mortalité) à 159,36mg/kg (100% de mortalité) sont administrées par voie i.p. à des lots de 5 souris (voir méthodes au § 2.2.1.1.1.2 p.28). Un lot formé de 5 souris sert de témoin.

Les résultats sont résumés dans le *tableau 6*.

*Tableau 6: Résultats expérimentaux de la détermination de la DL<sub>50</sub>(24h) de l'extrait sur souris.*

Dose en mg/kg	Nombre de décès après						Total des décès	Total des survivantes	% de mortalité
	9h	12h	15h	18h	21h	24h			
159,36	1	3	1	0	0	0	5	0	100
143,42	0	2	0	1	1	0	4	1	80
129,08	0	1	1	1	0	0	3	2	60
116,17	0	0	2	0	0	0	2	3	40
104,55	0	0	1	0	1	0	2	3	40
94,10	0	0	0	1	0	0	1	4	20
84,69	0	0	0	0	0	0	0	5	0

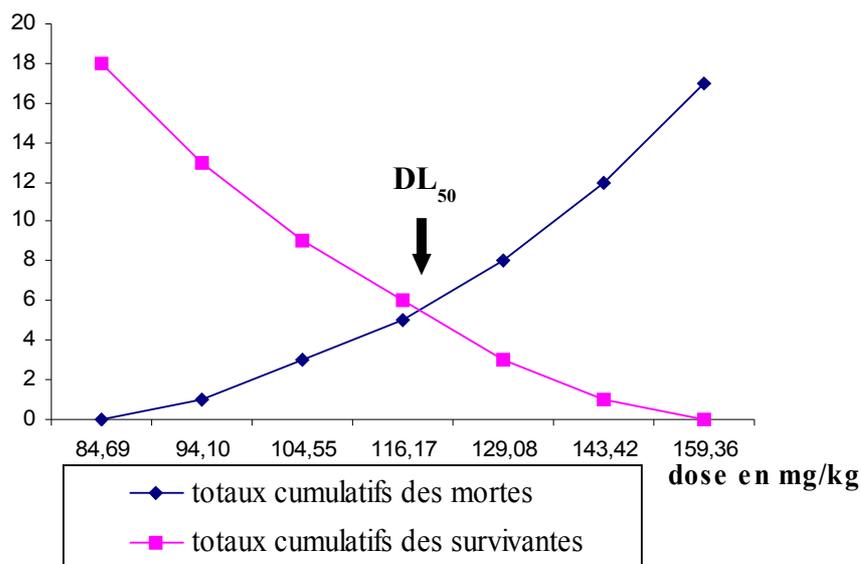
Selon la relation de REED et MUENCH (§ 2.2.1.1.1.2 p.28) ; B= 116,17mg/kg ; N= 40% soit 0,4 ; M= 60% soit 0,6 ; r = 0,9.

La valeur de la DL<sub>50</sub> est donc estimée à **122,39mg/kg** de souris.

D'après la méthode des totaux cumulatifs (tableau 7), la DL<sub>50</sub> déterminée graphiquement est de **118,15mg/kg** de souris (figure 5).

*Tableau 7: Estimation de la DL<sub>50</sub>(24h) par la méthode de totaux cumulatifs de REED et MUENCH (1938)*

Dose en mg/ kg	Nombre de souris à tester	Nombre de souris		Totaux cumulatifs des	
		mortes	survivantes	mortes	survivantes
159,36	5	5	0	17	0
143,42	5	4	1	12	1
129,08	5	3	2	8	3
116,17	5	2	3	5	6
104,55	5	2	3	3	9
94,10	5	1	4	1	13
84,69	5	0	5	0	18



*Figure 5 : Détermination graphique de la DL<sub>50</sub> (24h)*

La valeur de la DL<sub>50</sub> est donc comprise entre **118,15mg/kg** et **122,39mg/kg**.

### 3.1.1.1.2- Examen histopathologique

Les effets de E2 au niveau tissulaire sont étudiés à la dose létale 159,36mg/kg de souris, par voie i. p. Après le sacrifice de l'animal, les organes sont prélevés rapidement puis traités suivant la méthode décrite au § 2.2.1.1.3.1 p.29.

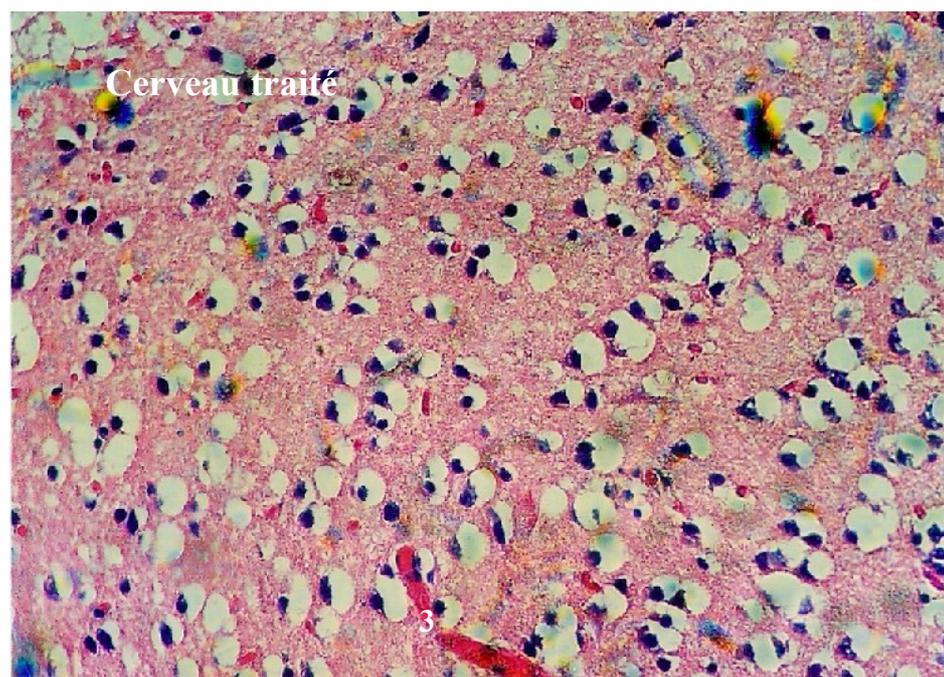
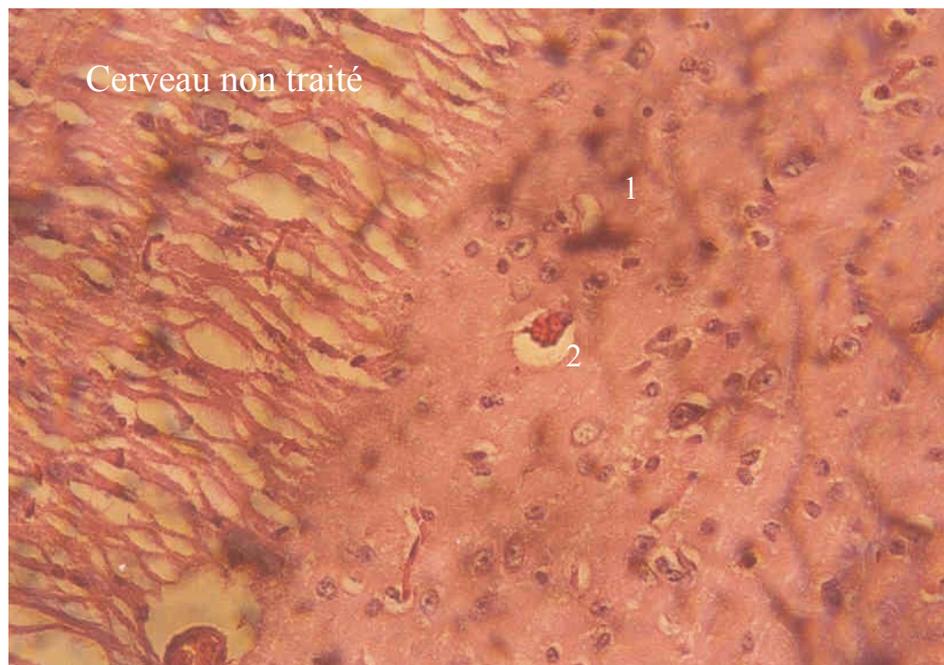
Les lésions occasionnées par l'extrait sur chaque organe sont résumées dans le *tableau 8* et indiquées sur les *figures 6 à 11*.

*Tableau 8: Lésions histologiques provoquées par l'extrait à 159,36mg/kg de poids sur les différents organes de souris*

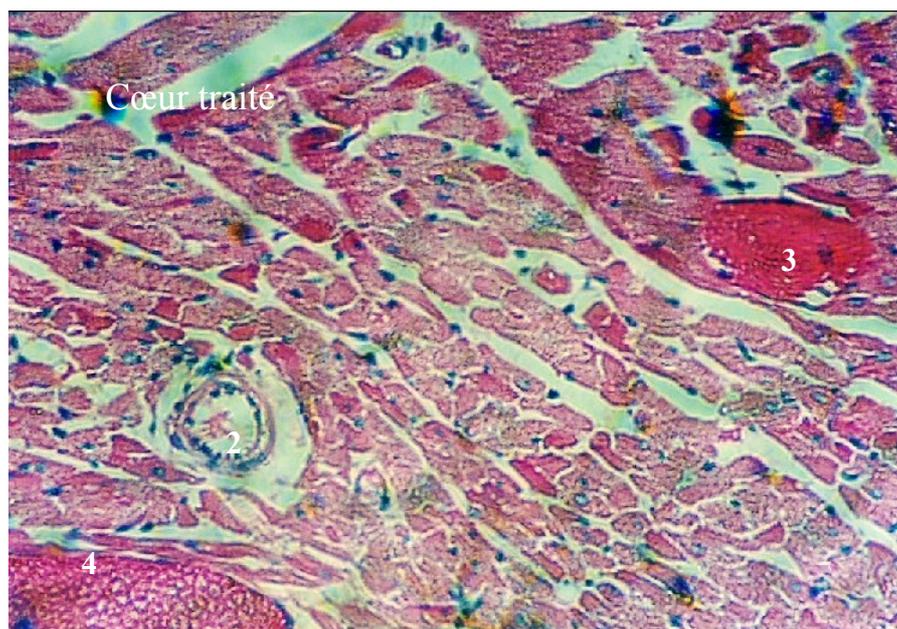
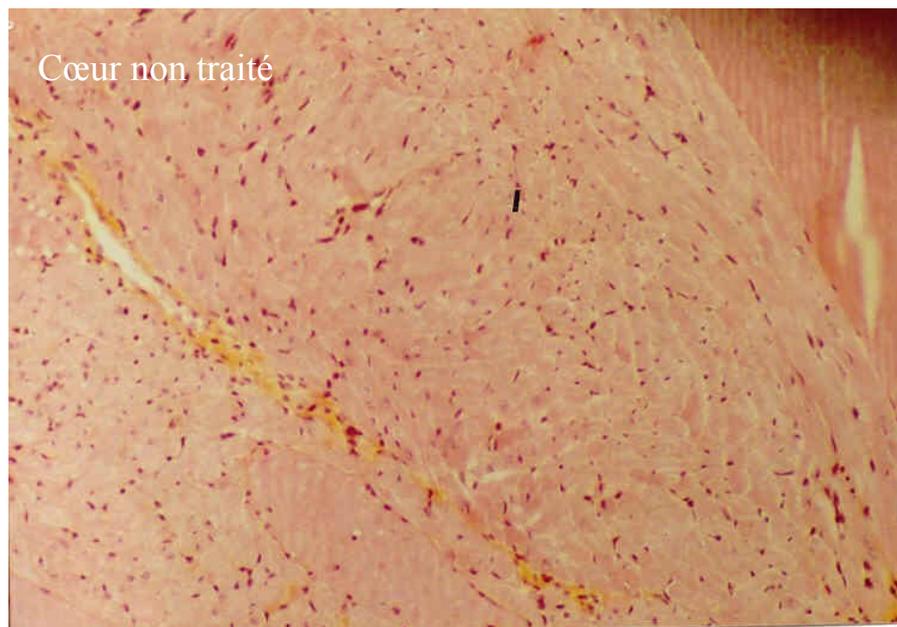
<b>Organe</b>	<b>Lésions observées</b>
<b>Cœur</b>	capillaires dilatés nappes hémorragiques
<b>Estomac</b>	capillaires dilatés au niveau de la musculuse et de la séreuse
<b>Rein</b>	nappes hémorragiques
<b>Foie</b>	capillaires sinusoidaux dilatés nappes hémorragiques
<b>Cerveau</b>	nappes hémorragiques au niveau du parenchyme cérébral
<b>Poumon</b>	nappes hémorragiques

Au niveau du cœur et du foie, les lésions sont caractérisées par une dilatation des capillaires et des nappes hémorragiques. Ces dernières apparaissent également au niveau du poumon, du cerveau et du rein.

Au niveau de l'estomac, une dilatation des capillaires est observée.

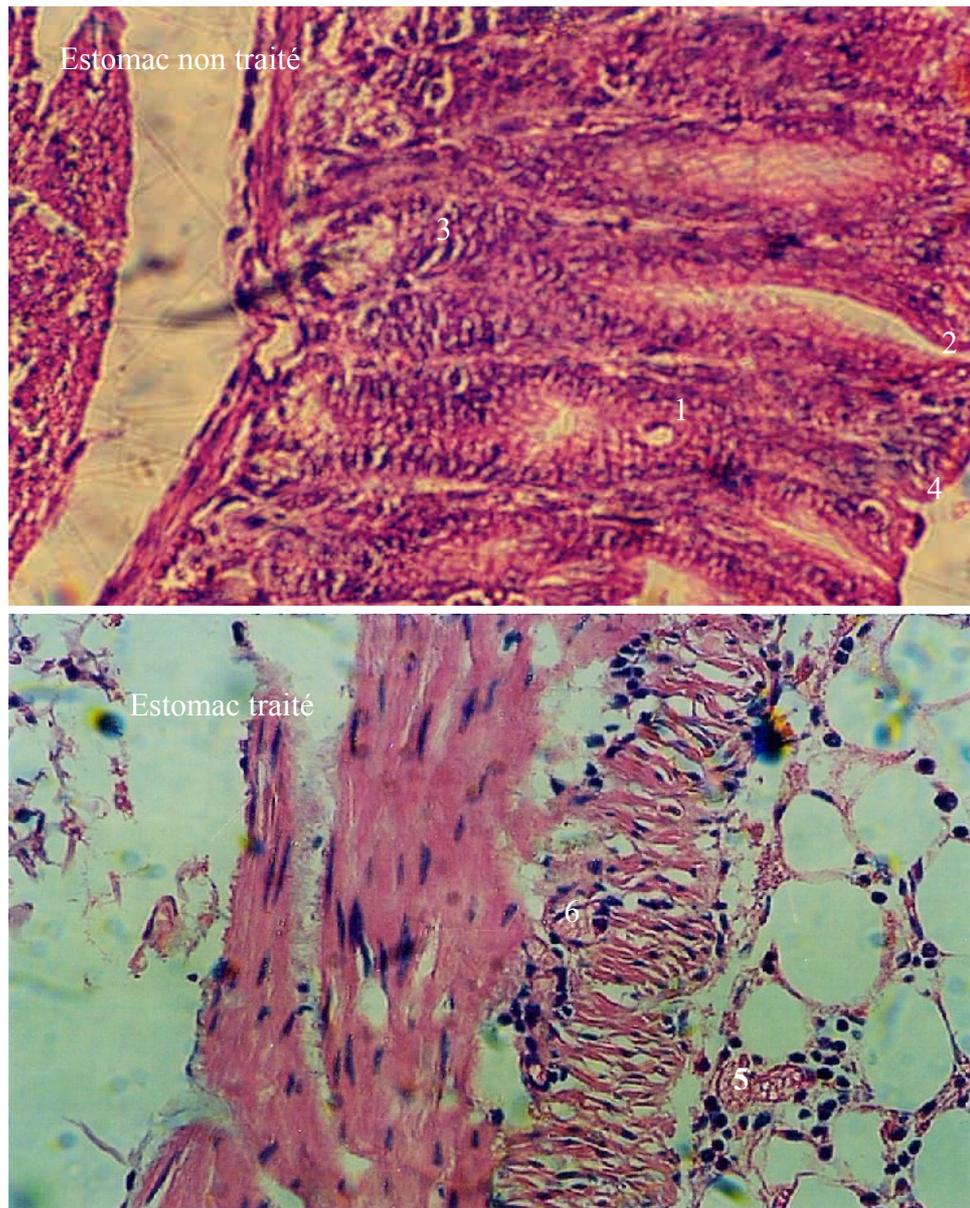


*Figures 6: Lésions histologiques au niveau du cerveau dues à l'administration par voie i.p. de l'extrait E2 à la dose de 159,36mg/kg de poids (grossissement X 400).  
1 :Parenchyme ; 2 :capillaire normal ;3 : nappe hémorragique*

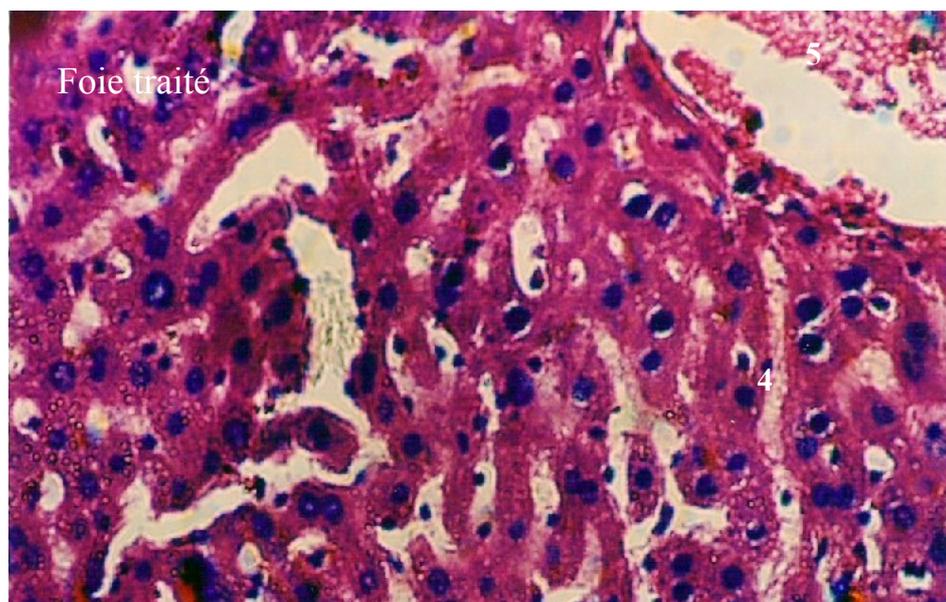
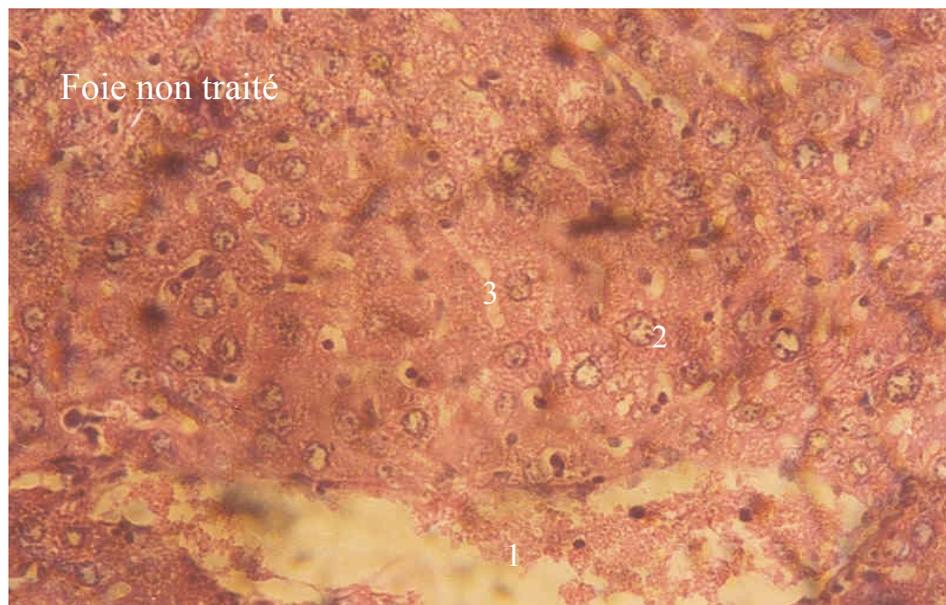


*Figures 7: Lésions histologiques au niveau du cœur dues à l'administration par voie i.p. de l'extrait E2 à la dose de 159,36mg/kg de poids (grossissement X 400).*

*1 : Myocarde ; 2 : Myocarde détruit ; 3 : capillaire dilaté ; 4 : nappe hémorragique*

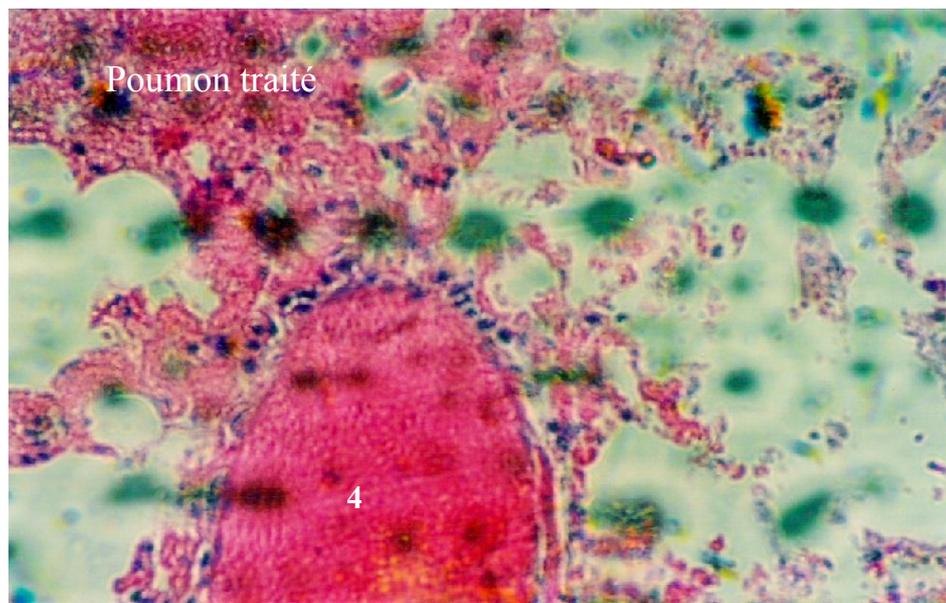
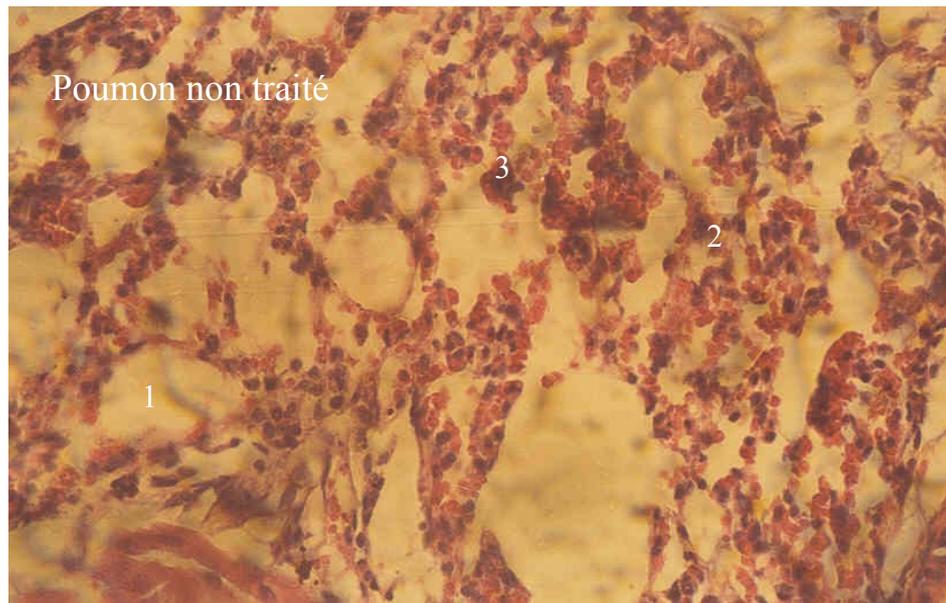


*Figures 8: Lésions histologiques au niveau de l'estomac dues à l'administration par voie i.p. de l'extrait E2 à la dose de 159,36mg/kg de poids (grossissement X 400).  
1 : muqueuse ; 2 : bordure épithéliale ; 3 : glande ; 4 ; cavité gastrique ;  
5 : capillaire dilaté au niveau de la séreuse ; 6 :capillaire dilaté au niveau de la musculieuse.*



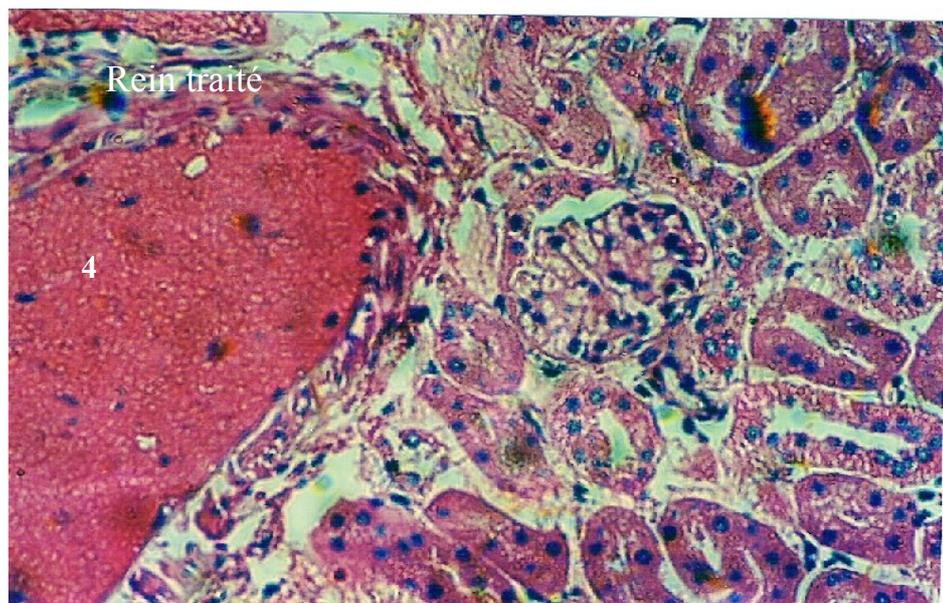
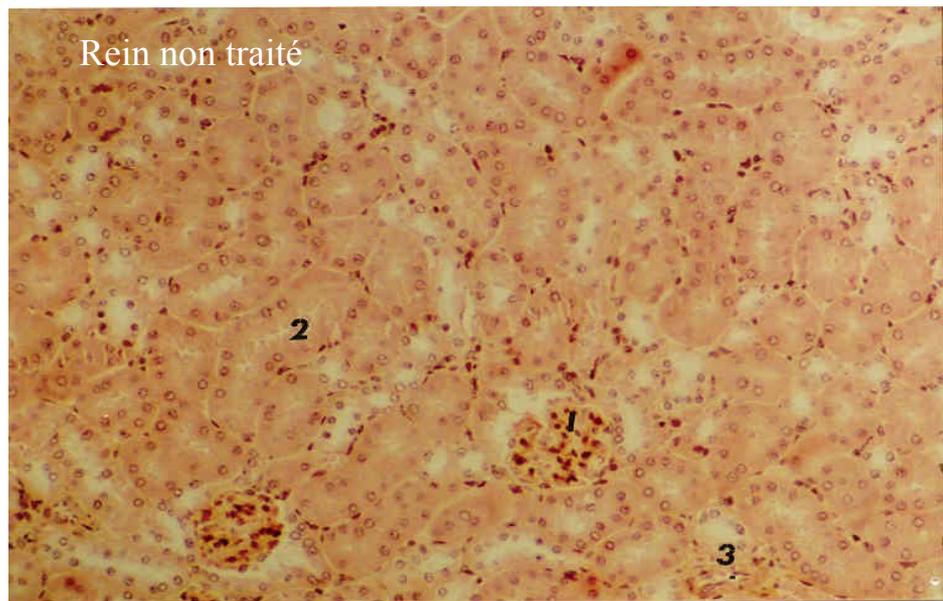
*Figures 9: Lésions histologiques au niveau du foie dues à l'administration par voie i.p. de l'extrait E2 à la dose de 159,36mg/kg de poids (grossissement X 400).*

*1 : veine centro-lobulaire ; 2 : hépatocyte ; 3 : capillaire sinusöide normal ;  
4 : capillaire sinusödale dilaté ; 5 : nappe hémorragique*



*Figures 10: Lésions histologiques au niveau du poumon dues à l'administration par voie i.p. de l'extrait E2 à la dose de 159,36mg/kg de poids (grossissement X 400).*

*1 : alvéole ; 2 : tissu inter-alvéolaire ; 3 : capillaire normal ; 4 : nappe hémorragique*



*Figures 11: Lésions histologiques au niveau du rein dues à l'administration par voie i.p. de l'extrait E2 à la dose de 159,36mg/kg de poids (grossissement X 400).*

*1 : glomérule normal ; 2 : tubule normal ; 3 : capillaire normal ; 4 : nappes hémorragiques*

### 3.1.1.1.3- Effets de l'extrait brut et de l'extrait sur les hématies de mouton

Le pouvoir hémolytique des extraits est testé sur une suspension d'hématies de mouton à 2% en utilisant la méthode décrite au § 2.2.1.1.2 p.30. Les effets de l'extrait brut ont été comparés à ceux de l'extrait. Le test est effectué en présence de deux témoins : témoin négatif (PBS) et témoin positif (eau distillée).

Les résultats sont montrés dans le tableau 9 et la figure 12 montre la microplaque avec laquelle le test hémolytique a été effectué.

*Tableau 9: Effets des différentes concentrations de EB et de E2 sur les hématies de mouton*

Concentration en mg/ml	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,008	0,004
<b>EB</b>	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	-
<b>E2</b>	+++	+++	+++	+	+	+	-	-	-	-

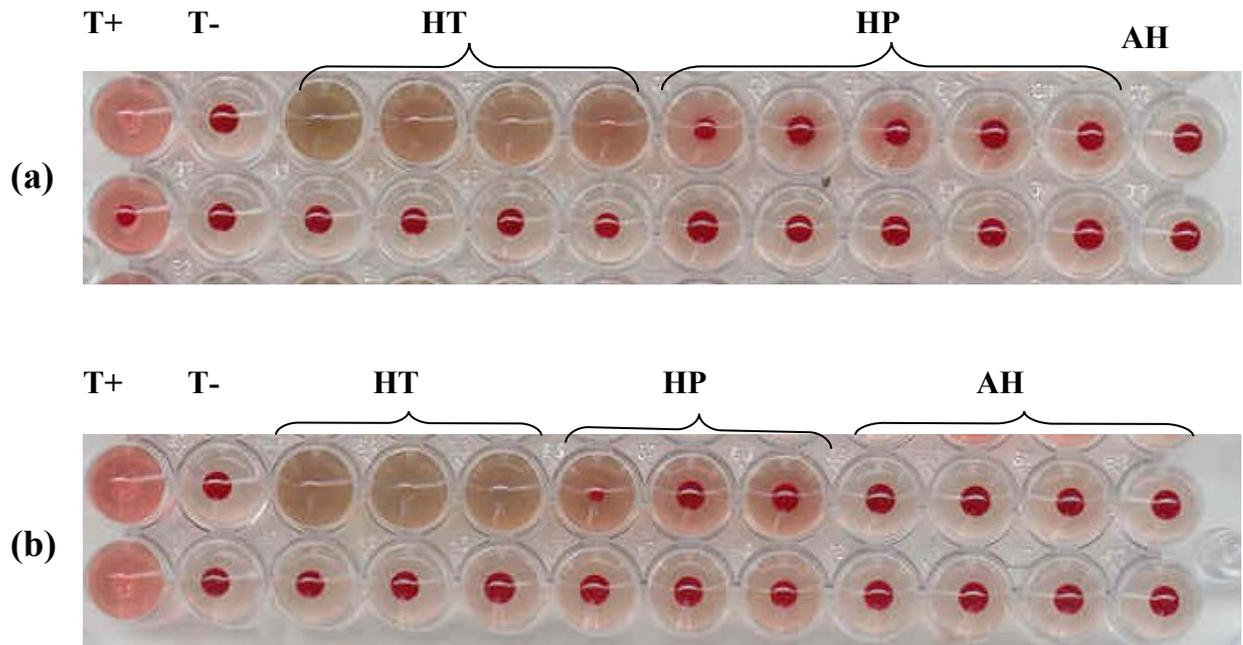
+++ : hémolyse totale

+ : hémolyse partielle

- : absence d'hémolyse

Les effets varient en fonction de la concentration de l'extrait. Ainsi, on obtient :

- une hémolyse totale à des concentrations de EB supérieures ou égales à 0,25mg/ml et à celles de E2 supérieures ou égales à 0,5mg/ml ;
- une hémolyse partielle à des concentrations comprises entre 0,125mg/ml et 0,008mg/ml pour EB et entre 0,25mg/ml et 0,062mg/ml pour E2.
- Aucune hémolyse à des concentrations de EB et de E2 inférieures ou égales respectivement à 0,004mg/ml et 0,031mg/ml.



HT : hémolyse totale

HP : hémolyse partielle

AH : aucune hémolyse

*Figure 12: Effets des différentes concentrations de EB(a) et de E2(b) sur les hématies de mouton*

### 3.1.2- EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG FROID

#### 3.1.2.1- Effets de l'extrait sur les têtards de grenouille

Six lots de 7 têtards sont testés avec six concentrations de l'extrait, en progression géométrique de raison  $r = 1,05$ , dont le premier terme est  $48,62\mu\text{g/ml}$ .

Les résultats obtenus dans les conditions expérimentales décrites précédemment au § 2.2.1.2.2 p.32, sont résumés dans le *tableau 10*.

*Tableau 10: Effets de l'extrait à différentes concentrations sur les têtards*

<b>Concentrations (µg/ml)</b>	<b>logC</b>	<b>Nombres de décès</b>	<b>Nombres de survivants</b>	<b>% de décès</b>
48,62	1,686	7	0	100
46,30	1,665	6	1	85,71
44,1	1,644	5	2	71,42
42	1,623	5	2	71,42
40	1,602	3	4	42,85
38,09	1,589	0	7	0

D'après ce tableau, l'extrait a une activité toxique sur les têtards. Un effet-dose est observé.

Ces résultats ont permis de calculer la  $CL_{50}$  (24h). L'équation de droite de régression linéaire est :

$$Y = -1322,85 + 847,55X, \text{ avec un coefficient de corrélation } r = 0,939.$$

On a  $\log CL_{50} = 1,619$  d'où  $CL_{50} = 41,66 \mu\text{g/ml}$

### **3.1.2.2- Effets de l'extrait sur les poissons *Gambusia holbrooki***

Sept concentrations de l'extrait allant de  $8,93 \mu\text{g/ml}$  à  $9,77 \mu\text{g/ml}$ , avec une raison géométrique de 1,015, sont testés chacune sur un lot de 7 *Gambusia holbrooki*.

Les résultats obtenus sont montrés dans le *tableau 11*.

Tableau 11: Effets de l'extrait sur les poissons *Gambusia holbrooki*

<b>Concentrations (µg/ml)</b>	<b>logC</b>	<b>Nombres de décès</b>	<b>Nombres de survivants</b>	<b>% de décès</b>
9,77	0,989	7	0	100
9,62	0,983	7	0	100
9,48	0,976	7	0	100
9,34	0,970	7	0	100
9,20	0,963	0	70	0
9,06	0,957	0	7	0
8,93	0,950	0	7	0

A cause de la très faible fourchette de valeur entre la concentration provoquant 100% de mortalité et celle qui provoque 0% de mortalité, il n'y a pas été possible de calculer la CL<sub>50</sub> (24h). Aucun effet- dose n'a été observé. L'effet de l'extrait obéit à la « loi du tout ou rien ».

### **3.1.2.3- Effets de l'extrait brut sur les larves de moustique**

L'extrait brut à 2mg/ml a été testé sur un lot de dix larves de moustique suivant la méthode décrite au § 2.2.1.3 p.32. Au bout 24h, les larves sont toujours survivantes. L'extrait brut ne provoque aucun effet sur ces larves à la concentration utilisée.

## **3.2- EFFETS DE L'EXTRAIT BRUT ET DE L'EXTRAIT SUR LES VÉGÉTAUX**

### **3.2.1- EFFETS DE L'EXTRAIT BRUT SUR LE POUVOIR GERMINATIF DES GRAINES**

Le test sur les végétaux exigent une quantité importante de toxines. Comme nous ne disposons pas d'extrait purifié en quantité suffisante, nous avons étudié les effets de EB sur le pouvoir germinatif des graines.

Les graines sont trempées et mises à germer en présence de EB à 1mg/ml (voir méthode au § 2.2.2.1 p.33). Les résultats sont inscrits dans le *tableau 12*.

Tableau 12: Effets de EB à 1mg/ml sur le pouvoir germinatif

Nom vernaculaire	Espèce	%de germination
Carotte	<i>Docus carotta</i>	30
Tissam white	<i>Brassica sp</i>	60
Concombre	<i>Cucumis sp</i>	100
Petit pois	<i>Pisum sativum</i>	100
Haricot	<i>Phaseolus vulgaris</i>	70
Oignon	<i>Allium cepa</i>	60
Riz	<i>Oryza sativa</i>	100
Maïs	<i>Zea mays</i>	100
Morelle noire	<i>Solanum nigrum</i>	0

D'après ce tableau, la sensibilité des graines vis-à-vis de EB à 1mg/ml est variable :

- les grains de riz, de maïs, de petit pois et de concombre sont insensibles à l'extrait brut à 1mg/ml ;
- la germination de morelle noire est totalement inhibée.

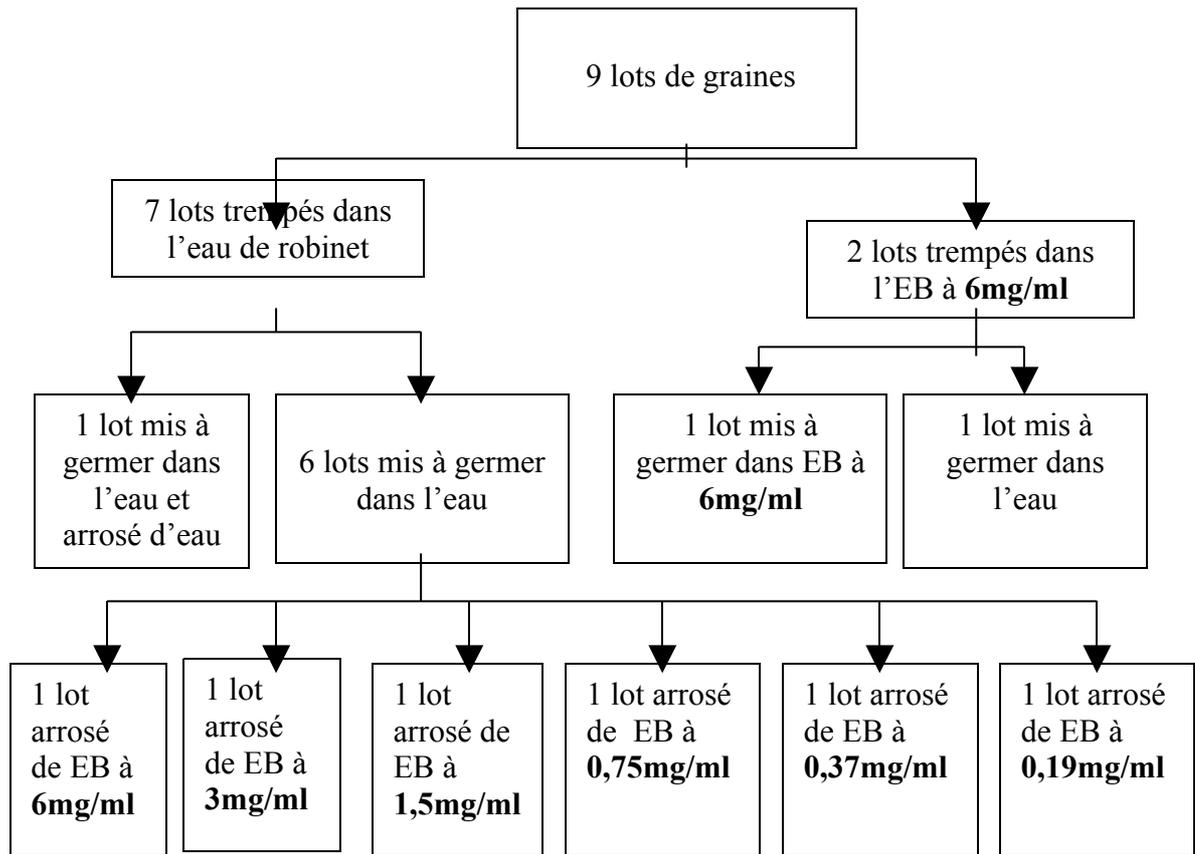
Pour les autres graines, l'inhibition va de 30% à 70%.

### 3.2.2- EFFETS DE L'EXTRAIT BRUT SUR LA CROISSANCE DES JEUNES PLANTULES DE RIZ ET DE PETIT POIS

Dans une autre expérience, nous avons étudié les effets de EB, à des doses plus élevées sur un représentant des Monocotylédones (le riz) et un représentant des Dicotylédones (le petit pois). En effet, nous avons voulu vérifier si l'absence d'effet de l'extrait brut à 1mg/ml sur ces deux plantes est due à une insuffisance de dose.

Neuf lots de sept graines sont utilisés pour le riz et le petit pois. Deux d'entre eux sont trempés dans EB à 6mg/ml tandis que les sept autres sont trempés dans l'eau. L'expérience se déroule suivant la méthode décrite au § 2.2.2.2 p.33.

Les différentes étapes de cette manipulation sont résumées sur la *figure 13*.



*Figure 13: Schéma récapitulant les étapes de l'expérience sur l'étude des effets de EB sur la croissance de jeunes plantules*

Pour les graines de petit pois préalablement trempées dans EB à 6mg/ml, le lot mis à germer en présence de la même concentration ne germe pas, tandis que celui placé dans l'eau germe, mais avec un retard par rapport au témoin.

Pour les graines de riz préalablement trempées dans EB à 6mg/ml, le lot mis en présence de la même concentration et celui placé dans l'eau ne germent pas.

Quant aux lots préalablement trempés dans l'eau, puis mis à germer et arrosés en présence de différentes concentrations de EB, il y a une inhibition qui est fonction de la concentration en EB. Les grains de riz pourrissent même au 11<sup>ème</sup> jour avec une concentration en EB de 6 mg/ml.

L'évolution de la longueur de l'épicotyle et de l'hypocotyle est montrée sur les figures 14 et 15. Les taux d'inhibition en fonction de la concentration au treizième jour de l'expérience sont alors donnés dans le tableau 13.

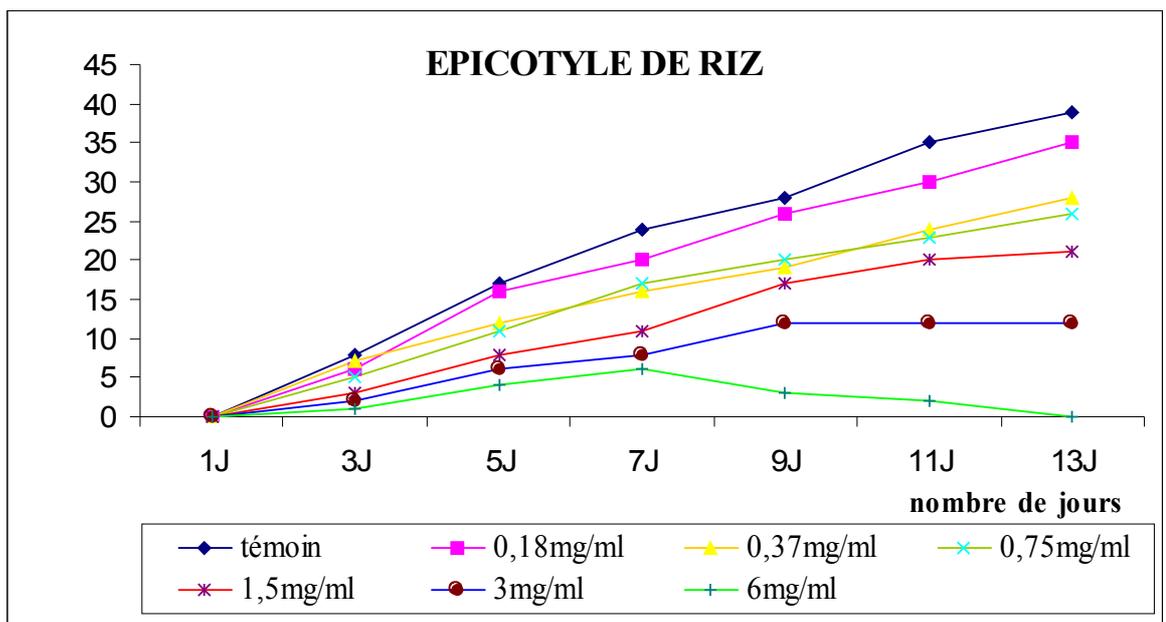
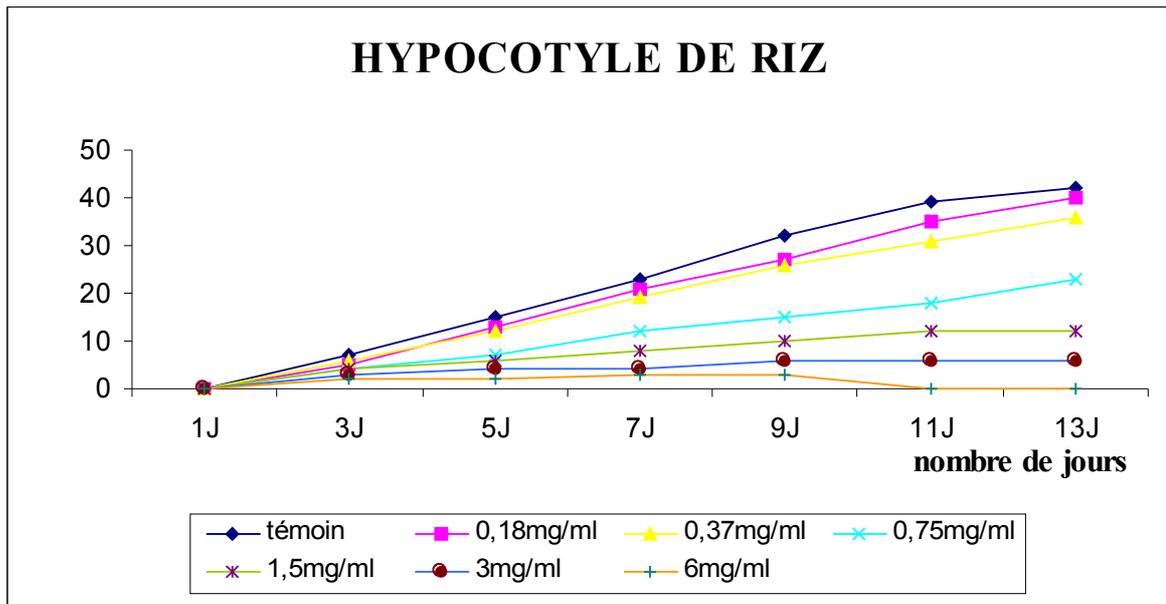


Figure 14: Effets des différentes concentrations de EB sur la croissance des plantules de riz

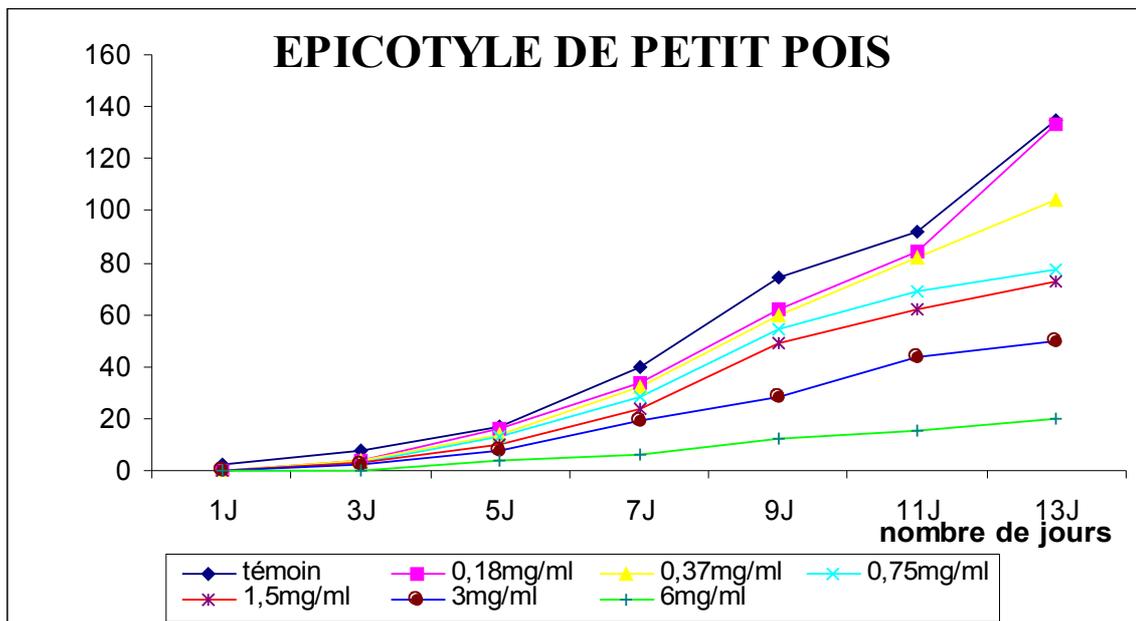
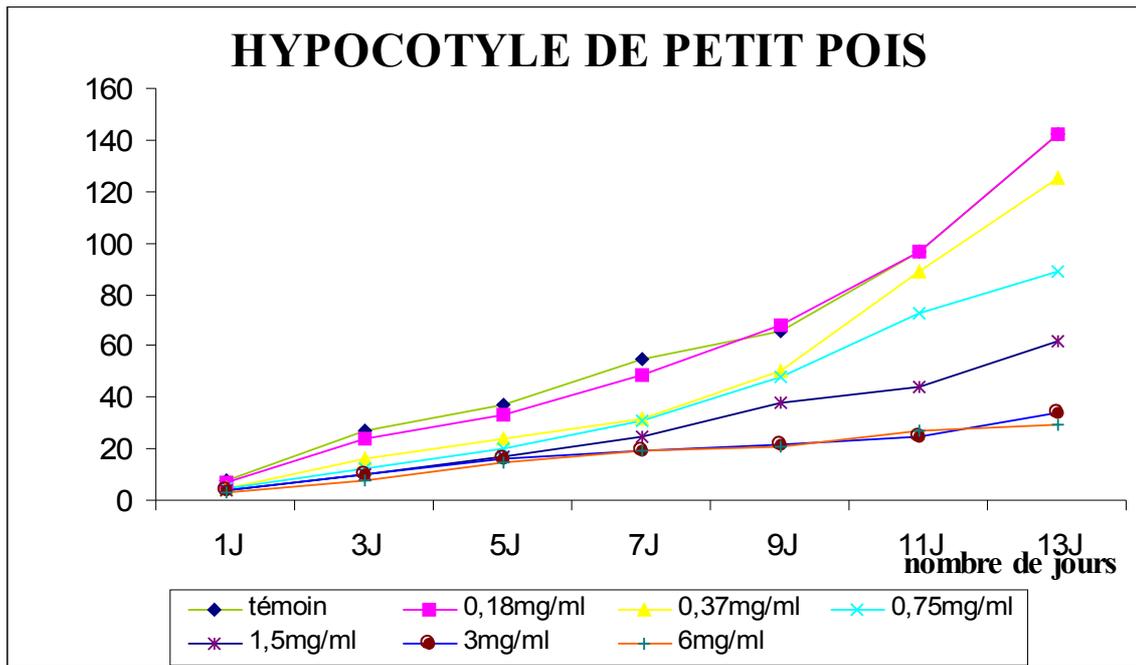


Figure 15: Effets des différentes concentrations de EB sur la croissance des plantules de petit pois

Tableau 13: Taux d'inhibition de croissance des épicotyles et des hypocotyles de riz et de petit pois au treizième jour de l'expérience

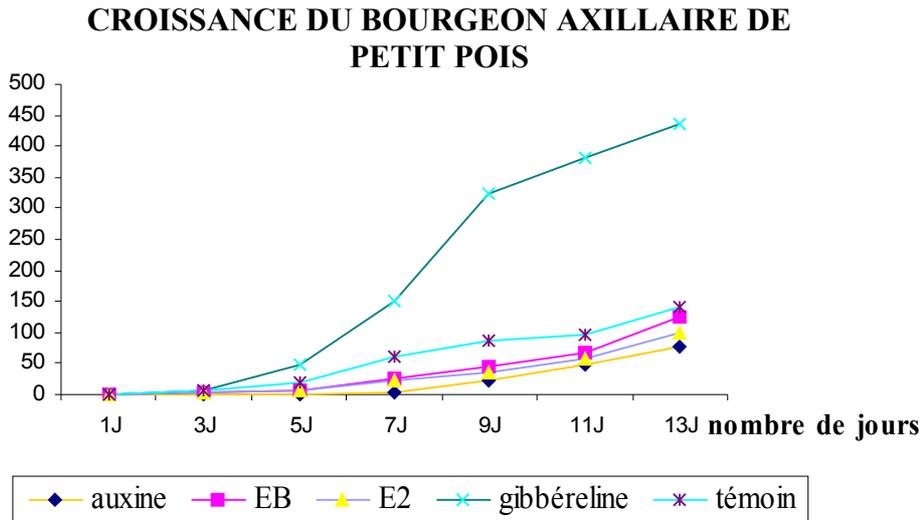
		Témoin (eau de robinet)	Concentration de EB (mg/ml)					
			0,18	0,37	0,75	1,5	3	6
<b>Riz</b>	Longueur de l'hypocotyle(mm)	42	40	36	23	12	6	0
	Inhibition (%)	0	4,75	14,19	45,24	71,43	85,75	100
	Longueur de l'épicotyle (mm)	39	35	28	26	21	12	0
	Inhibition(%)	0	10,25	28,21	33,33	46,15	69,23	100
<b>Petit pois</b>	Longueur de l'hypocotyle(mm)	142	142	125	89	62	34	29
	Inhibition (%)	0	0	11,97	37,32	56,34	76,06	79,58
	Longueur de l'épicotyle (mm)	135	133	104	77	73	50	20
	Inhibition (%)	0	1,48	22,96	42,93	45,93	62,96	85,19

### 3.2.3- EFFETS DES EXTRAITS SUR LE DÉVELOPPEMENT DES BOURGEONS AXILLAIRES

Les effets de EB et de l'extrait sur le développement des bourgeons axillaires de jeunes plantules sont comparés à ceux de deux hormones végétales, la gibbérelline (qui stimule la croissance de bourgeons axillaires) et l'auxine (qui inhibe la croissance de bourgeons axillaires).

Les expériences sont réalisées sur des plantules de petit pois (*Pisum sativum*) selon la méthode décrite au § 2.2.2.3 p.34.

Les effets des extraits sont estimés par mesure de la croissance des bourgeons axillaires des plantules traitées, et les résultats obtenus sont résumés sur la *figure 16*.



*Figure 16: Effets des différentes substances sur la croissance du bourgeon axillaire des jeunes plantules de petit pois*

Les 2 extraits à la dose de 28 $\mu$ g/ml montrent un effet inhibiteur similaire à celui de l'auxine sur la croissance des bourgeons axillaires des plantules de petit pois.

L'effet de EB est semblable à celui de E2 jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour, c'est-à-dire que les bourgeons ont la même longueur. Au 13<sup>ème</sup> jour, une inhibition de la croissance du bourgeon, respectivement de 11,3% pour EB et 23,95% pour E2, est observée. Notons cependant que cette inhibition est moindre par rapport à celle provoquée par l'auxine (50,4% au 13<sup>ème</sup> jour).

### **3.3- EFFETS DES EXTRAITS SUR LES MICROORGANISMES**

#### **3.3.1- ISOLEMENT ET IDENTIFICATION**

Six souches bactériennes et deux souches de levures ont été isolées et identifiées. Leurs caractères biochimiques sont résumés dans le *tableau 14*.

Tableau 14: Caractéristiques des souches purifiées et identifiées

<i>Bacillus cereus</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	+	+	-	+	+	-	+			+	-	-	-
<i>Shigella boydii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-			+										
<i>Staphylococcus aureus</i>	+													
<i>Candida membranaefaciens</i>	+													
<i>Cryptococcus neoformans</i>														

TDA: tryptophane désaminase

LDC: Lysine décarboxylase

LDA: Lysine désaminase

### 3.3.2- SPECTRE D'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE

Les activités de EB à 50mg/ml et de E2 à la même concentration ont été étudiées sur les huit souches isolées et identifiées. Chaque disque est chargé de 20µl d'extrait, la quantité de toxine sur chaque disque étant de 1000µg (EB et E2). Après 24h d'incubation, les résultats sont récapitulés dans le *tableau 15*.

Tableau 15: Effets de EB et de E2 sur la croissance des différents germes-tests

Nom des souches	GRAM	Sensibilité	
		EB	E2
<i>Bacillus cereus</i>	+	Assez sensible	Assez sensible
<i>Candida membranaefaciens</i>	+	Insensible	Insensible
<i>Cryptococcus neoformans</i>		Assez sensible	Assez sensible
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Insensible	Insensible
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	Insensible	Insensible
<i>Shigella boydii</i>	-	Insensible	Insensible
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Assez sensible	Assez sensible
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	Insensible	Insensible

D'après ce tableau, E2 et EB ont la même activité sur toutes les souches. *Bacillus cereus*, *Cryptococcus neoformans* et *Staphylococcus aureus* sont assez sensibles, tandis que *Klebsiella oxytoca*, *Shigella boydii*, *Enterobacter cloacae* et *Streptococcus pneumoniae* sont insensibles à l'extrait E2 et EB à la concentration de 50mg/ml.

### 3.3.3- DÉTERMINATION DE LA CMI

La CMI pour EB et E2 est déterminée sur les trois souches assez sensibles (*Bacillus cereus*, *Cryptococcus neoformans*, *Staphylococcus aureus*), suivant la méthode décrite précédemment au § 2.2.3.5.2 p.39.

Trois concentrations (45mg/ml ; 50mg/ml ; 55,55mg/ml), calculées selon une progression géométrique de raison  $r = 0,9$  sont utilisées. Les résultats observés pour les trois souches sont toujours identiques pour les deux extraits. A la concentration 50mg/ml de EB et de E2, le diamètre du halo est compris entre 7mm et 8mm. La CMI pour EB et E2 est alors de **50mg/ml** sur ces trois souches.

#### 4- DISCUSSION ET CONCLUSION

Il a été démontré que l'extrait purifié E2 des feuilles de *Gambeya boiviniana* a une activité toxique sur divers organismes animaux, végétaux et microbiens.

Sur la souris, l'administration par voie i.p de E2 provoque des symptômes d'intoxication caractérisés essentiellement par une piloérection, une ataxie et des convulsions cloniques. L'ensemble de ces réactions permet de supposer que la (ou les) toxine (s) attaque (attaquent) le système nerveux central.

La valeur de la DL<sub>50</sub>, estimée entre 118,15mg/kg et 122,39mg/kg, montre que les substances contenues dans E2 sont faiblement toxiques, sachant que ces valeurs sont supérieures à 70mg/kg (RAMADE, 1979). Par rapport aux principes toxiques de feuilles déjà étudiées au LABASM, ces principes sont moins actifs que ceux des feuilles de *Deinbollia boinensis* (DL<sub>50</sub> entre 60,25mg/kg et 66,55mg/kg) (RAKOTOBE, 2003), mais plus toxiques que ceux des feuilles de *Ocotea madagascariensis* (DL<sub>50</sub> entre 265,99mg/kg et 272,25mg/kg) (RANDRIAMAHAVALISOA, 2003).

L'examen histopathologique révèle que l'extrait provoque des lésions caractérisées par des nappes hémorragiques et une dilatation des capillaires au niveau des tous les organes de souris traitées. Ces résultats seraient probablement dus à des propriétés vasoactives de principes actifs.

L'extrait brut et l'extrait E2 lysent les hématies de mouton mais E2 est moins actif que EB. On peut en déduire qu'il y a eu une diminution de l'activité hémolytique au cours de l'étape de purification. Notons que la présence de saponosides n'a pas été mise en évidence au cours du criblage phytochimique. Des travaux plus approfondis pourraient apporter des explications sur la lyse des globules rouges.

Sur les animaux à sang froid, un effet-dose a été observé chez les têtards de grenouille et la valeur de la CL<sub>50</sub> est de l'ordre de 41,66µg/ml. Chez les poissons (*Gambusia holbrooki*), les effets obéissent à la loi du tout ou rien. Enfin, EB, à la concentration de 2mg/ml, n'a aucun effet sur les larves de moustique.

La sensibilité des différentes graines à EB à 1mg/ml est variable. Ainsi, la germination de certaines d'entre elles (tissam white, carotte, haricot, oignon) est inhibée de 30% à 70%, alors que celles des autres n'est pas affectée (concombre, riz, petit pois, maïs). L'inhibition pourrait être due à la destruction des embryons ou à l'inactivation des enzymes nécessaires à l'utilisation des substances de réserves contenues dans les cotylédons.

Sur les jeunes plantules de riz et de petit pois, l'extrait brut inhibe le développement des épicotyles et des hypocotyles. Cette inhibition est proportionnelle à la dose. Les graines de riz sont plus sensibles que ceux de petit pois.

Comme l'auxine, EB et E2 ont un effet inhibiteur sur le développement du bourgeon axillaire de plantules de petit pois.

Comme les extraits de *Phyllarthron madagascariense* (IBRAHIM, 2005) EB et E2 inhibent la croissance des souches de micro-organismes *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Cryptococcus neoformans*. Avec une CMI égale à 50mg/ml sur *Bacillus cereus*, ils sont moins actifs que les extraits de *Phyllarthron madagascariense* (37,5mg/ml). Par contre, ils sont plus actifs que ces derniers sur *Cryptococcus neoformans* (50mg/ml pour EB et E2 contre 75mg/ml pour les extraits de *Phyllarthron madagascariense*).

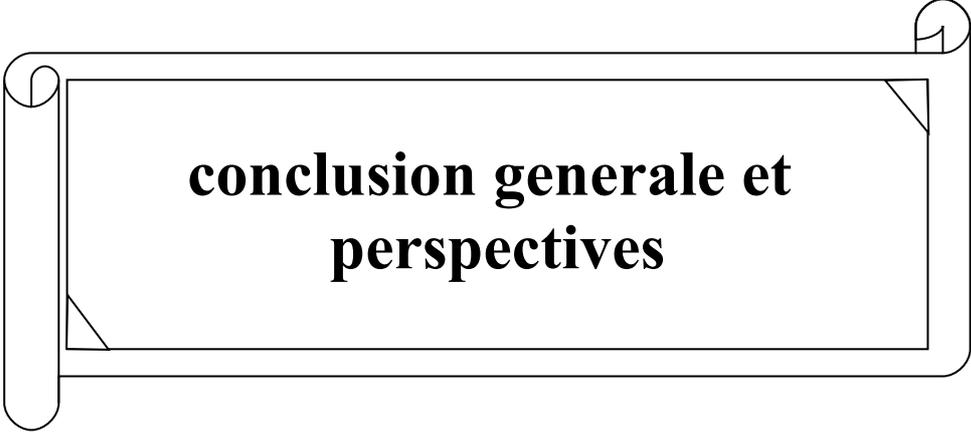
## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les travaux réalisés sur *Gambeya boiviniana*, une Sapotacée endémique malgache, bien que préliminaires, nous ont permis de :

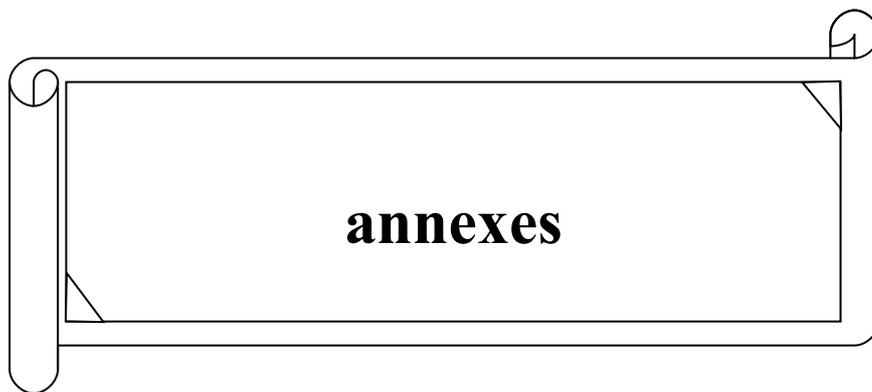
- mettre en évidence la toxicité des feuilles;
- donner les premières informations sur les propriétés physico-chimiques des principes toxiques ;
- déterminer leur pouvoir toxique sur des organismes animaux, végétaux et microbiens.

Dans l'avenir, nous envisageons :

- d'améliorer les différentes méthodes d'extraction et de purification en vue d'obtenir des toxines pures ;
- de déterminer la nature chimique des toxines présentes ;
- d'élargir les recherches par la prospection d'autres propriétés permettant de mieux utiliser cette plante ;
- d'approfondir l'étude de leur mécanisme d'action.



**conclusion generale et  
perspectives**



## ANNEXES

### ANNEXE I : Description botanique (AUBERVILLE, 1974 ; SCHATZ, 2001)

#### 1- Description du genre *Gambeya*

C'est un arbre, à feuilles alternes souvent tomenteuses dessous, ferrugineuses, dorées ou grises. Les fleurs sont en fascicules ou axillaires avec 5 sépales, une corolle de 5 lobes courts ciliés, un tube court. Les étamines, à filet inséré vers la base du tube, ont 5 épipétales. Les fruits ont à 1-5 graines marqués d'une cicatrice linéaire ou étroitement oblongue, occupant presque toute la longueur de l'étroite face ventrale.

Le genre *Gambeya* est essentiellement africain, une seule espèce est brésilienne. Ce genre a 4 espèces : *Gambeya mammosa*, *Gambeya subnuda*, *Gambeya africana* et *Gambeya boiviniana* (ou *Gambeya madagascariensis*) qui est la seule et unique espèce malgache.

#### 2-Description de *Gambeya boiviniana*

*Gambeya boiviniana*, aux feuilles portant une pubescence dense de couleur rouille dessous, est un arbre de moyenne altitude. Il est connu sous le nom de Reheky, Rehiaka, Famelo, Famelomana.... Les feuilles sont alternes, simples, aux nervations secondaires et tertiaires parfois plus ou moins égales, denses et parallèles. Les fleurs sont petites, à 5 sépales libres et 5 étamines insérées au milieu ou vers la base du tube corollaire. Les fruits à grande baie charnue, indéhiscente, contiennent 5 graines peu comprimées latéralement avec une étroite cicatrice linéaire parcourant la longueur de la face ventrale.

**ANNEXE II : composition des réactifs****1- Composition des réactifs pour la révélation des chromatogrammes****Réactif à la vanilline sulfurique :**

Vanilline	0,5g
acide sulfurique concentré	100ml

La pulvérisation de ce réactif entraîne l'apparition des taches roses violacées qui noircissent après chauffage à l'étuve à 120°C pendant 5min.

**2-Composition des réactifs pour les tests des alcaloïdes****Réactif de MAYER :**

Chlorure mercurique	13,5g
Iodure de potassium	60g
Eau distillée q s p	1000ml

**Réactif de WAGNER :**

Iodure de potassium	2g
Iode	1,47g
Eau distillée	1000ml

**Réactif de DRAGENDORFF :****Solution A**

Silicate de Bismuth	1,7g
Acide tartrique concentré	20g
Eau distillée	30ml

**Solution B**

Iodure de potassium	10g
Eau distillée	40ml

Un volume de solution A est mélangé à un volume de solution B puis additionné de la solution ci-dessous :

Acide tartrique	10g
Eau distillée	100ml

**ANNEXE III : Composition des milieux de cultures**(MUELLER et HINTON, 1941 ; MARCHAL et BOURDON, 1987 ; MEYER, DEIMA et LECLERE, 1995 ; LE MINOR et HERON, 1999)

**1-Milieux de culture pour l'isolement et la purification des germes**

**Bouillon nutritif pour les bactéries :**

nutriment de BROTH	1,6g
extrait de levure	0,8g
glucose	1g
eau distillée	200ml

**Milieu Sabouraud pour les levures**

tryptone	1g
glucose	4g
eau distillée q s p	100ml

**Gélose ordinaire pour les bactéries**

peptone	5g
extrait de viande	1g
chlorure de sodium	5g
extrait de levure	2g
agar	15g
eau distillée q s p	1000ml
pH = 7,4	

**Gélose Sabouraud pour les levures**

tryptone	1g
glucose	4g
agar	2g
eau distillée q s p	100ml

**2-Milieux d'identification des bactéries****Milieu de SIMMONS :**

Citrate de sodium	1g
Chlorure de sodium	5g
Sulfate de magnésium	0,2g
Phosphate monoammoniaque	1g
Phosphate potassique	1g
Bleu de bromothymol	0,08g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH = 7,1

**Milieu lysine-fer**

Peptone bactériologique	5g
Extrait de levure	3g
Glucose	1g
L-lysine	10g
Citrate de fer ammoniacal	0,5g
Thiosulfate de sodium	0,04g
Pourpre de bromocrésol	0,02g
Gélose	14,5g
Eau distillée q s p	1000ml

pH = 6,7

**Milieu mannitol-mobile-nitrate**

Hydrolysats tryptique de caséine	10g
Nitrate de potassium	1g
Mannitol	8,5g
Rouge de phénol	0,04g
Agar	3,5g
Eau distillée q s p	1000ml

pH = 7,6

**Milieu HAJNA-KLIGLER**

Peptone	15g
Extrait de viande	3g
Extrait de levure	3g
Peptone pepsique de viande	5g
Chlorure de sodium	5g
Sulfate ferreux	0,2g
Thiosulfate de sodium	0,3g
Lactose	10g
Glucose	1g
Rouge de phénol	0,024g
Agar	11g
Eau distillée q s p	1000ml
pH = 7,5	

**Milieu urée-indole**

L-tryptophane	0,3g
Phosphate monopotassique	0,1g
Phosphate dipotassique	0,1g
Chlorure de sodium	0,5g
Urée	2g
Alcool à 90°C	1ml
Rouge de phénol à 1%	0,25ml
Eau distillée	100ml

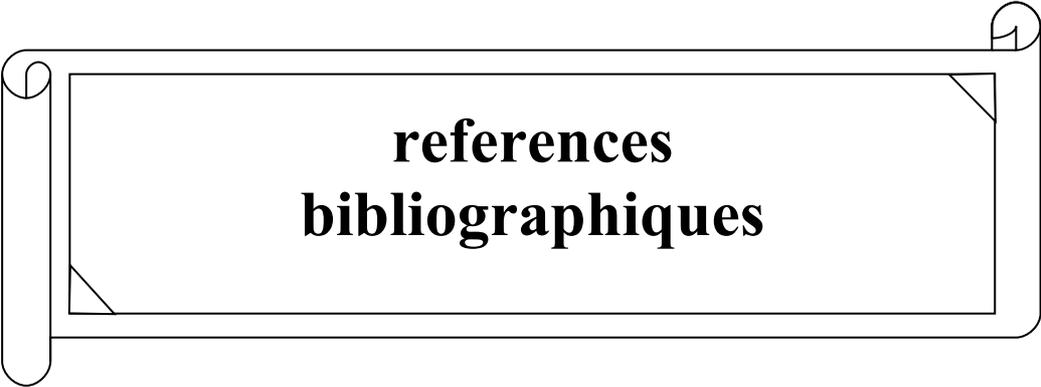
**3-Milieu utilisé pour les tests de toxicité****Milieu de MUELLER-HINTON**

Infusion de viande de bœuf déshydratée	300g
Hydrolysat acide de caséine	17,5g
Amidon de maïs	1,5g
Agar	10g
Eau distillée q s p	1000ml
pH = 7,4	

**ANNEXE IV :**



Figure : Dispositif de la dialyse



**references**  
**bibliographiques**



**RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. ANDRIANJAKANIRINA L. Etude chimique et toxicologique d'extraits de graines de *Physena madagascariensis* (Physenecaea). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2004.
2. AUBREVILLE A. 164<sup>ème</sup> famille – Sapotaceae. Notes sup. Afr équa.: Not syst., 1974; 16 (3-4): 223-227.
3. AUDIGIE C., DUPONT G., ZONSZAIN F. Principes des méthodes d'analyses biochimiques. Paris : Doin éditeur, 1989 ; 190p.
4. BIZZINI B. Tetanos toxin structure as basis for elucidating, its immunological and neuropharmacological activities. In: The specificity and action of animal; bacterial and plant toxins. (Receptors and recognition, serie B; vol I). Edited by CUATRECASAS P. Chapman and Hall; London, 1977; 175-218.
5. BOITEAU P. Précis de matière médicale malgache. Antananarivo : Librairie de Madagascar, 1979 ; 97p.
6. BONNET H., NEVOT A. Travaux pratiques d Bactériologie, 4<sup>ème</sup> éd. Paris : Masson et C<sup>ie</sup>, 1955 ; 210p.
7. BOST R. Pharmacopée malgache. Mém. Int Sci Madagascar, 1961 ; 2: 159-234.
8. BOYD. Fundamentals of immunology, 4<sup>ème</sup> éd. New-York: Wiley and Son, 1966; 503p.
9. BRUNETON J. Eléments de phytochimie et de pharmacognosie. Paris : Technique et Documentation – Lavoisier, 1987 ; 585p.
10. BRUNETON J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2<sup>ème</sup> éd. Paris : Technique et Documentation – Lavoisier, 1993 ; 915p.
11. CHOMETTE G., AURIOL M., DELCOURT A., LECLERE J.-P. Manuel d'anatomie pathologie générale, 2<sup>ème</sup> éd. Paris : Masson, 1984 ; 4 -5.
12. CORDELL G.-A. Introduction to alkaloid a biogenetic approach. New-York: John Wiley, 1981; 1055p.
13. DALTON D.-R. The alkaloïds. The fondamental chemistry, approach. New-York: Marcell Dekker, 1979; 789p.
14. DELARUE J., LAUMONIER R. Pathologie spéciale Anatomie pathologique, T3. Paris : Editions médicales Flammarion, 1969 ; 318p..
15. DIEBOLD J., CAMILLARI J.-P., REYNES M., CALLARD P. Anatomie pathologie générale; 2<sup>ème</sup> éd. Paris : Technique et Documentation -Lavoisier, 1991 ; 331p.

16. DUMAS J., BORDET P., LAPORTE R., LEPINE P., POCHON J., PREVOT A.-R. Bactériologie médicale. Paris : Les éditions médicales Flammarion, 1951 ; 117-184.
17. DUVAL J., SOUSSY C.-J. Antibiothérapie. Paris : Masson et C<sup>ie</sup>, 1990; 37-38.
18. FERRON A. Bactériologie médicale, 15<sup>ème</sup> éd. Paris : C et R, 1997 ; 422p.
19. FONG H.H.S., TIN W.A.M., FARNSWORTH N. Phytochemical screening review. Chicago: University of Illinois, 1977; 73-126.
20. FREJAVILLE J.-P., BISMUTH C., CONSO F. Toxicologie clinique, 3<sup>ème</sup> éd. Paris : Flammarion, 1981 ; 289.
21. HABERMEHL G. Venomous animals and their toxins. Springer-Verlag. Berlin : Heidelberg, 1981 ; 195p.
22. HELLER R., ESNAULT R., LANCE C. Abrégé de Physiologie végétale: développement; 5<sup>ème</sup> éd. Paris : Masson, 1995 ; 90-126.
23. HEMINGWAY P.W., KARCHESY J.J. Chemistry and significance of condensed tannins. New-York: Plenum press, 1989; 249-264.
24. HOULD R. Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Paris : Edition Maloine, 1984 ; 272p.
25. HUMBERT H. Flore de Madagascar et des Comores. Paris : Laboratoire de phanérogamie, 1981 ; 107-109.
26. IBRAHIM S.A. Etude chimique, biochimique et biologique des feuilles de *Phyllarthron madagascariense* (Bignoniaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2005.
27. JEANNODA V. Etude chimique, biologique et toxicologique du principe convulsivant des Connaracées de Madagascar. [Thèse de Doctorat d'Etat : Sciences]. Strasbourg : Université Louis Pasteur de Strasbourg, 1986.
28. KAMOUN P. Appareils et méthodes en biochimie ; 3<sup>ème</sup> éd. Paris : Médecine-Sciences Flammarion, 1987 ; 373p.
29. LARPENT J.P., LARPENT-GOURGAUD M. Mémento technique de microbiologie ; 3<sup>ème</sup> éd. Paris : Technique et documentation, 1997 ; 59-108.
30. LEHNINGER A.L. Biochimie ; 2<sup>ème</sup> éd. Paris: Médecine-Sciences Flammarion, 1977; 155-159.
31. LE MINOR L., VERON M. Bactériologie médicale; 2<sup>ème</sup> éd. Paris : Médecine-Sciences Flammarion, 1989 ; 1107p.
32. MABBERLEY D.J. The plant-book : a portable dictionary of the higher plants ... New-York : Cambridge university, 1987; 627-629.

33. MAHUZIER G., HAMON M. Abrégé de chimie analytique. Méthode de séparation, 2<sup>ème</sup> éd. Paris : Masson, 1990 ; 2 : 262p.
34. MARCHAL M., BOURDON J.L., RICHARD C. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries ; 3<sup>ème</sup> éd. Paris : Doin éditeur, 1987 ; 511p.
35. MEYER A., DEIANA J., LECLERE H. Cours de microbiologie générale. Nouveau programme. Paris : Doin éditeur, 1985 ; 365p.
36. MUELLER J.H., HINTON J. Milieu de culture. Proc. Soc. Exp. Biol. Méd. 1941 ; 48 : 330-333.
37. NOHARA T. Analysis of steroid and another biologically significant steroids. San Diego: NES.W.D. ET Parish E.J., 1989; 119-132.
38. OMS. Résistance aux insecticides et lutte antivectorielle. 17<sup>ème</sup> rapport de comité OMS d'experts des insecticides. Série et rapports techniques n°443. Genève, 1970 ; 306p.
39. RAHARISOA N. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes toxiques de *Albizia bernieri* (Mimosoïdeae-Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1999.
40. RAHELINAINAMANDIMBY L. Etude chimique et biologique d'extraits toxiques de *Olax lanceola* (Olaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003.
41. RAHERINAINA C.E. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes toxiques d'*Albizia boivini* (Mimosoïdeae-Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1999.
42. RAHERINAINA C.E. Etude chimique et toxicologique du principe ichtyotoxique de *Euphorbia laro* (Euphorbiaceae)-Impact de la pêche au Laro.[Thèse de Doctorat : Biochimie]. Tuléar : Université de Tuléar, 2004.
43. RAJEMIARIMOELISOA C. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes actifs de *Albizia polyphylla* (Mimosoïdeae-Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1996.
44. RAJEMIARIMOELISOA C. Isolement, caractérisation chimique et biologique des principes toxiques de *Albizia odorata* (Mimosoïdeae-Fabaceae). [Thèse de Doctorat de 3<sup>ème</sup> cycle: Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2000.
45. RAKOTO-RANOROMALALA D.A.D. Isolement et caractérisation partielle du principe toxique de *Rourea orientalis* (Connaraceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1984.

46. RAKOTO-RANOROMALALA D.A.D. Purification et étude des propriétés physico-chimiques et biologiques des principes toxiques de *Tachiadenus longiflorus* (Gentianaceae). [Thèse de Doctorat de 3<sup>e</sup> cycle : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1989.
47. RAKOTOBE L. Etude chimique et biologique des extraits toxiques de feuilles de *Deinebollia boinensis* (Sapindaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003.
48. RAKOTONDRAZANAKA L. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes toxiques de *Xerosicyos danguyi* (Cucurbitaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1995.
49. RAKOTONDRAZANAKA L. Isolement, caractérisation chimique et biologique des principes toxiques de *Odosicyos bosseri* (Cucurbitaceae). [Thèse de Doctorat: Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003.
50. RALISON C. Isolement et études biochimique, toxicologique et biologique de la monguine ; principe toxique du *Croton mongue* (Euphorbiaceae). [Thèse de Doctorat d'Etat : ESS Sciences]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1987.
51. RAMAMONJISOA-RAKOTOARIVELO N.S.A. Etude chimique et toxicologique des principes toxiques de graines de *Mimosopus commersonii* (Sapotaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2004.
52. RAMAMONJISON E.D. Contribution à l'étude chimique et biologique des principes toxiques de graines de *Albizia species* (Mimosoïdeae-Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1998.
53. RAMADE. Ecotoxicologie. Paris : Masson, 1979 ; 228p.
54. RANDEKATH K. Chromatographie sur couche mince. Paris : édition GAUTHIER-VILLARS, 1964 ; 296p.
55. RANDRIAMAHAVALISOA T.F. Etude chimique et toxicologique des extraits toxiques de feuilles d'*Ocotea madagascariensis* (Lauraceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003.
56. RANDRIAMIHARISOA F. Etude chimique et biologique d'extraits toxiques de feuilles de *Xerosicyos perrieri* (Cucurbitaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2000.
57. RANDRIANANDRASANA J. Etude chimique et toxicologique des extraits toxiques d'écorces des tiges de *Uapaca thouarsii* (Euphorbiaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2004.

58. RANDRIANARIVO H.R. Purification et caractérisation partielle des principes actifs de *Albizia arenicola* (Mimosoïdeae, Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1996.
59. RANDRIANARIVO H.R. Isolement et caractérisation chimique et biologique des principes toxiques de *Albizia arenicola* (Mimosoïdeae, Fabaceae). [Thèse de Doctorat : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003.
60. RAONIHARISOA P. . Etude chimique et toxicologique des extraits toxiques d'écorce de graines de *Albizia tulariensis* (Mimosoïdeae, Fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003.
61. RAZANAMPARANY L. Purification et étude des propriétés physico-chimiques et biologiques de la bolaffinine, toxine protéique extraite de *Boletus affinis* Peck (Boletaceae). ). [Thèse de Doctorat.d'Etat: ESS Sciences]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 1987.
62. REED L., MUENCH H.A. Simple method of estimating fifty per cent points. AM J.Hy. 27,1938; 493p.
63. SCHATHZ G.E. Flore générique des arbres de Madagascar. Grande Bretagne : Linklater R. 2001 ; 399-400.
64. SIGLETON P. Bactériologie ; 2<sup>ème</sup> éd. Paris : Masson, 1994 ; 247p.
65. STRYER L. Organisation moléculaire de la vie. In : La Biochimie, 3<sup>ème</sup> éd. Paris : Médecine-Sciences Flammarion, 1992 ; 43-48.
66. TONIMALALA M.H. Etude chimique et toxicologique des extraits toxiques de champignon *Cantharalus cf.congolensis* (Cantharellaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2003.
67. VERNIN G. La chromatographie sur couche mince : technique et application en chimie organique. Paris : Dunod, 1970 ; 178p.
68. YASUMOTO T., MURATA M. Marine toxins. *Chem.Rev.*, 1993; 93: 1817-1909.

**Name :** RASOATAHINA

**First name:** Victoire

**Title of the memory:** Chemical and toxicological studies about the toxic principle of leaf of *Gambeya boiviniana* (SAPOTACEA).

### **ABSTRACT**

*A toxic activity was found in a leaf extract of Gambeya boiviniana, an endemic Sapotaceae of Madagascar.*

*A purification process including a butanol fractionation and neutral acetate of Lead precipitation allow us to get a partly purified toxic extract from a crude extract.*

*The toxic principles are thermostable, soluble in water, in ethanol and in butanol. They are not precipitable by neutral acetate of Lead. They taste bitter.*

*They could be flavonons, unsaturated sterol, triterpenes or a phenol compound.*

*Crude and partly purified extracts act on different organisms such as animals, plants and micro-organisms.*

*In mouse, the purified extract leads to the symptoms which suggest that the central nervous system attacked. The (24h) LD<sub>50</sub> is comprised between 118,15mg/kg and 122,39mg/kg of the mouse weight. It causes histological lesion characterized by a vascular congestion and an haemorrhage.*

*Crude and partly purified extracts cause an haemolytic activity on red cells of sheep.*

*The purified extract is toxic in tadpoles, an dose effect was been observed with 41,66µg/ml of LC<sub>50</sub>. In fish, the inhibiting effect seems to repound to the law of "all or nothing".*

*The crude extract has no effect on mosquito larva.*

*It inhibits seed germination, the growth of rice and garden pea. The two extracts inhibit the growth of axillary buds.*

*They have a similar antimicrobial activity over the growth of Bacillus cereus, Cryptococcus neoformans and Staphylococcus aureus on a solid medium, with 50mg/ml of CMI.*

**Key words:** Gambeya boiviniana, Sapotaceae, toxic, LD<sub>50</sub>, LC<sub>50</sub>, haemolytic activity, histological lesion, germination inhibition, anti-microbial property.

**Supervisors:** Professor Victor JEANNODA

**Doctor Danielle A.D.RAKOTO-RANOROMALALA**

**Nom** : RASOATAHINA

**Prénom** : Victoire

**Titre de mémoire** : Etude chimique et toxicologique des principes toxiques de feuilles de *Gambeya boiviniana* (SAPOTACEAE)

### **RÉSUMÉ**

*Une activité toxique a été mise en évidence dans l'extrait des feuilles de Gambeya boiviniana, une Sapotacée endémique de Madagascar.*

*Un procédé de purification comportant un fractionnement par le n-butanol et une précipitation par l'acétate neutre de plomb a permis d'obtenir un extrait partiellement purifié à partir de l'extrait brut hydroalcoolique.*

*Les principes actifs sont thermostables, solubles dans l'eau, l'éthanol et le butanol. Ils ne sont pas précipitables par l'acétate neutre de plomb. Ils ont un goût amer. Ils pourraient être des flavonones, des stérols insaturés, des triterpènes ou des composés phénoliques.*

*L'extrait partiellement purifié E2 entraîne, chez la souris des symptômes qui suggèrent une atteinte du système nerveux central. La DL<sub>50</sub> est compris entre 118,15mg/kg et 122,39mg/kg de poids de souris. Au niveau tissulaire, il cause des lésions histologiques caractérisées par des nappes hémorragiques et une dilatation des capillaires. L'extrait brut et l'extrait E2 provoquent aussi une lyse des hématies de mouton.*

*L'extrait E2 est toxique chez les têtards de grenouille ; un effet-dose a été observé et la CL<sub>50</sub> est de 41,66µg/ml. Chez les poissons, l'effet inhibiteur de E2 semble répondre à la loi du tout ou rien. Par contre, aucune activité n'a pu être observée chez les larves de moustique à des concentrations inférieures ou égales à 2mg/ml en extrait brut.*

*L'extrait brut inhibe la germination de graines de Monocotylédones et de Dicotylédones et la croissance des jeunes plantules de riz et de petit pois. L'extrait brut et l'extrait E2 inhibent le développement des bourgeons axillaires de jeunes plantules de petit pois.*

*L'extrait brut et E2 ont une activité antibactérienne similaire sur la croissance des germes de Bacillus cereus, Cryptococcus neoformans, Staphylococcus aureus en milieu solide. Leur CMI est de 50mg/ml.*

**Mots clés**: *Gambeya boiviniana*, Sapotaceae, toxique, DL<sub>50</sub>, CL<sub>50</sub>, hémolyse, lésions tissulaires, inhibition germination, propriétés anti-microbiennes.

**Encadreurs** : Professeur Victor JENNODA

**Docteur Danielle A.D.RAKOTO-RANOROMALALA**

