



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

DOMAINE :

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

ECOLE DOCTORALE :

SCIENCES DE LA VIE ET DE L'ENVIRONNEMENT



THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biodiversité et Santé

ETUDES PHYTOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES EXTRAITS DE FEUILLES D'*Astrotrichilia parvifolia* (Méliacées), UNE PLANTE MEDICINALE MALGACHE

Présentée et soutenue publiquement par :

RASOLOFONANTENAINA – RAMIANDRISOA Rojovola

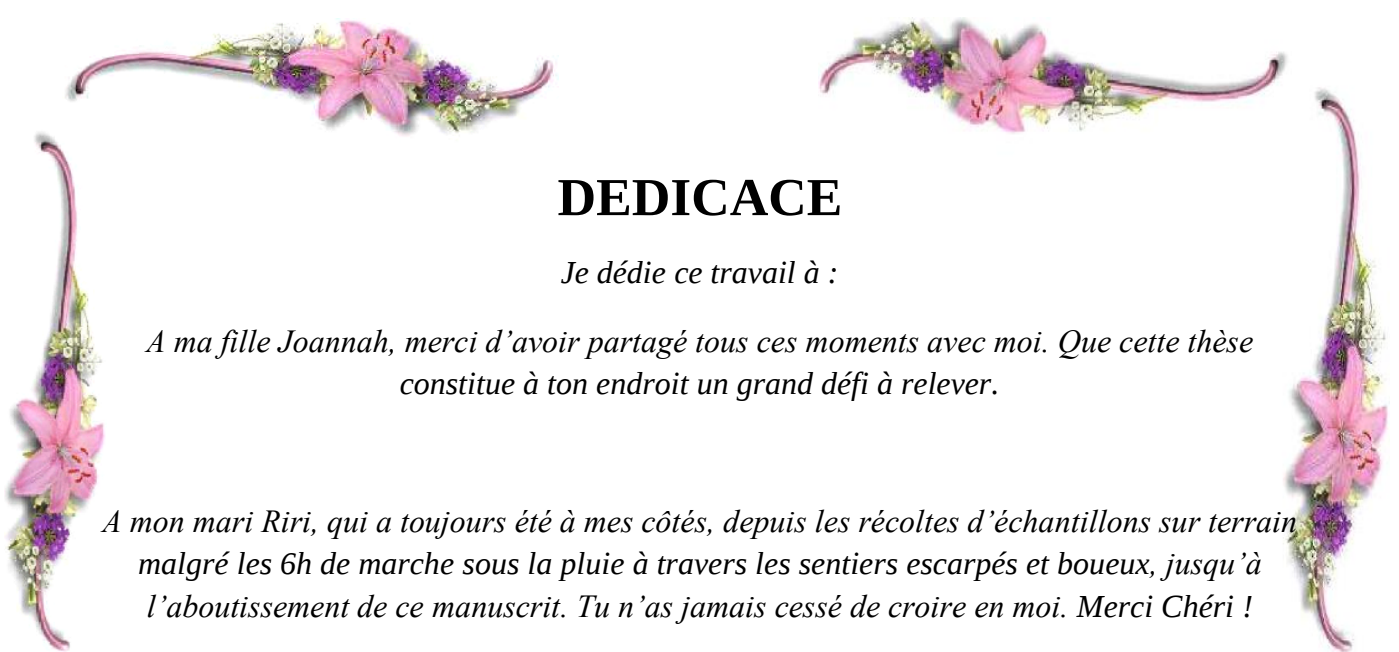
Titulaire de DEA

Biochimie appliquée aux sciences médicales

Le 31 Janvier 2018

Devant le jury composé de :

- Président* : Pr JEANNODA Victor
- Rapporteur interne* : Pr RAZANAMPARANY Louissette
- Rapporteur externe* : Pr RAMANANKIERANA Heriniaina
- Examineurs* : Pr RALISON Charlotte
Pr RANDRIANARIVO Ranjàna
- Directeur de thèse* : Pr RALAMBORANTO Laurence



DEDICACE

Je dédie ce travail à :

A ma fille Joannah, merci d'avoir partagé tous ces moments avec moi. Que cette thèse constitue à ton endroit un grand défi à relever.

A mon mari Riri, qui a toujours été à mes côtés, depuis les récoltes d'échantillons sur terrain malgré les 6h de marche sous la pluie à travers les sentiers escarpés et boueux, jusqu'à l'aboutissement de ce manuscrit. Tu n'as jamais cessé de croire en moi. Merci Chéri !

A mes parents, pour avoir formé des vœux pour ma réussite.

A mes beaux parents, pour leur soutien moral et leurs précieux conseils.

A mes frères (Toky et Fanasina), ma sœur (Iliantsoa), mes beaux-frères (Willy et Landry) et mes belles-sœurs (Miora et Nasandratra), pour tout ce que vous m'avez apporté tout au long de mes études.

A tous mes proches et amis, qui m'ont accompagné, aidé, soutenu et encouragé pendant la réalisation de cette thèse.



REMERCIEMENT

Ce mémoire est le résultat d'un travail de recherche de près de quatre ans. Je tiens à remercier Dieu tout puissant, compatissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

J'adresse mes vifs remerciements à :

- Monsieur le Professeur JEANNODA Victor, Président du jury
- Madame le Professeur RAZANAMPARANY Julia Louisette, rapporteur interne
- Monsieur le Professeur RAMANANKIERANA Heriniaina, rapporteur externe
- Madame le Professeur RALISON Charlotte, examinateur
- Monsieur le Professeur RANDRIANARIVO Hanitra Ranjàna, examinateur, pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Je tiens à exprimer mes reconnaissances à Madame le Professeur RALAMBORANTO Laurence, mon directeur de thèse, pour le temps qu'elle m'a consacré, pour sa grande disponibilité et ses encouragements tout au long de la réalisation de ce travail de mémoire.

Je tiens aussi à témoigner ma gratitude à Madame le Professeur RAKOTO-RANOROMALALA Danielle Aurore Doll, Responsable de l'équipe d'accueil Biodiversité et Santé, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je vous remercie également pour votre aide précieux.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à Monsieur le Professeur JEANNODA Victor, Directeur de l'école doctorale Science de la Vie et de l'Environnement (SVE), pour son apport précieux dans la rédaction et la publication d'article scientifique malgré ses lourdes responsabilités.

J'adresse mes sincères remerciements à toute l'équipe du LABASM, plus particulièrement à:

- Monsieur le Professeur RANDRIANARIVO Ranjàna qui a accepté de me faire partager ses expériences et conseils dans l'accomplissement de ce travail.

- Monsieur le Docteur RANDRIAMAMPIANINA Lovarintsoa Judicaël pour ses conseils et aides précieuses lors de nos travaux aussi bien en laboratoire que sur terrain.

Mes francs remerciements s'adressent aux chercheurs du CNRE et de l'IMRA, notamment :

- à Monsieur le professeur RASOLOMAMPIANINA Rado pour l'accueil dans son laboratoire et ses conseils lors des tests microbiologiques;
- à Madame le Docteur ANDRIAMBELOSON Onja pour ses aides durant les tests microbiologiques et la rédaction d'article scientifique;
- à Monsieur le professeur RAMANITRAHASIMBOLA David d'avoir accepté de réaliser des tests sur souris et cobaye au sein de son unité.

Je ne saurais ne pas exprimer ma reconnaissance envers monsieur RAOBISAONA, chef Fokontany Andranomena, de la commune d'Ambatolaona, et toute sa famille, pour son accueil et ses précieux renseignements concernant la plante « Bibilahy ».

Mes chaleureux remerciements vont à ceux qui ont été mes compagnons de paillasse, Mihaja, Maholy, Ravo, Herizo, Zo (IMRA), Rigobert, Angela et Holy.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

TABLE DES MATIERES

GLOSSAIRE.....	i
LISTE DES ABREVIATIONS	ii
LISTE DES TABLEAUX	iii
LISTE DES FIGURES.....	iv

INTRODUCTION GENERALE	1
------------------------------------	----------

Chapitre I : **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

I.1. Les plantes médicinales.....	6
I.1.1. Historique	6
I.1.2. Définition	7
I.1.3. Les plantes médicinales : Sources de médicament	8
I.1.4. Toxicité des plantes médicinales.....	10
I.1.4.1. Notion d'effet toxique	10
I.1.4.2. Toxicité aiguë	10
I.1.4.3. Toxicité subaiguë	10
I.1.4.4. Causes de toxicité des plantes	10
I.1.4.5. Impact des plantes toxiques sur les organes humains	11
I.1.4.6. Quelques types de plantes toxiques	13
I.1.4.6.1. Les plantes cardiotoxiques	13
I.1.4.6.2. Les plantes hallucinogènes	14
I.1.4.6.3. Les plantes cyanogéniques	14
I.1.4.6.4. Les plantes affectant le système nerveux central	14
I.1.4.6.5. Les plantes associant troubles digestives et hépatiques	15
I.1.4.6.6. Les plantes à toxicité essentiellement digestive	15
I.1.5. Importance des plantes médicinales.....	16
I.1.5.1. Dans le monde	16
I.1.5.2. Les plantes médicinales à Madagascar.....	17

I.2.La resistance aux antimicrobiens	19
I.2.1. La résistance naturelle.....	21
I.2.2. La résistance acquise.....	22
I.2.3. Les plantes medicinales dans le traitement des infections bactériennes	22
I.3.La famille des méliacées	23
I.3.1. Generalites.....	23
I.3.2. Utilisations pharmacologiques des méliacées	23
I.3.3. Travaux phytochimiques et pharmacologiques anterieurs sur les meliacees.....	24
I.3.3.1. Etudes phytochimiques antérieures	24
I.3.3.2. Etudes biologiques antérieures	26
I.3.4. Intérêts économique	27
I.3.5. Le genre <i>Astrotrichilia</i>	27
I.4.La plante : <i>Astrotrichilia parvifolia</i>	28
I.4.1. Distribution géographique d' <i>Astrotrichilia parvifolia</i>	30
I.4.2. Utilisations empiriquesd' <i>Astrotrichilia parvifolia</i>	31
I.5.Les metabolites secondaires des plantes.....	32
I.5.1. Definition	32
I.5.2. Classification des metabolites secondaires	33
I.5.3. Les composés phénoliques	35
I.5.3.1. Les tanins.....	35
I.5.3.2. Les flavonoïdes.....	36
I.5.3.2.1. Définition	36
I.5.3.2.2. Rôle des flavonoïdes.....	38
I.5.3.2.3. Les anthocyanidines-anthocyanines	38
I.5.3.2.4. Les leucocyanidines	39
I.5.3.2.5. Activités biologiques des flavonoïdes	39
I.5.4. Les terpenoïdes et les steroïdes	42
I.5.5. Les alcaloïdes	44
I.5.6. Fonction des metabolites secondaires	45
I.5.6.1. Fonctions pour la plante	45
I.5.6.2. Rôle pour l'Homme.....	46

I.6.Le stress oxydatif et les plantes	47
I.6.1. Généralités sur l'oxydation et les antioxydants	47
I.6.2.Consequences du stress oxydatif chez l'homme	48

Chapitre II : ETUDE CHIMIQUE

II.1.Introduction	49
II.2.Matériels et méthodes.....	49
II.2.1. Collecte et préparation du matériel	49
II.2.2. Les produits chimiques	49
II.2.3.Extraction	50
II.2.3.1.Extraction à chaud au Soxhlet	50
II.2.3.2.Préparation des extraits pour la détermination des familles chimique.	50
II.2.4.fractionnement et purification partielle par chromatographie	51
II.2.4.1.Historique de la chromatographie	51
II.2.4.2.Définition	51
II.2.4.3.Chromatographie sur colonne ouverte à basse pression	52
II.2.4.4.Chromatographie sur couche mince (CCM)	53
II.2.5.Criblage chimique	55
II.2.5.1.Caractérisation des saponosides	55
II.2.5.2.Caractérisation des alcaloïdes	56
II.2.5.3.Les flavonoïdes et les leucoanthocyanes	56
II.2.5.4.Caractérisation des tanins et polyphenols	56
II.2.5.5.Caractérisation des stéroïdes et triterpènes	56
II.2.5.6.Les hétérosides	57
II.2.5.7.Les anthraquinones (<i>test de Bornsträger</i>).....	57
II.2.5.8.Les désoxyoses (<i>test de keller-kiliani</i>)	57
II.2.5.9.Les iridoïdes	57
II.3.Résultats	58
II.3.1.Rendements d'extraction	58
II.3.2.Familles chimiques détectées dans les extraits MeOH et AcOEt	59
II.3.3.Résultats du fractionnement de l'extrait MeOH obtenu au soxhlet	60
II.3.4.Degré d'homogénéité des fractions	62
II.4.Conclusion	63

Chapitre III : ETUDE BIOLOGIQUE

III.1.Introduction.....	64
III.2.Matériels et méthodes	64
III.2.1.Etude des activités antibactériennes	64
III.2.1.1.Souches bactériennes	64
III.2.1.2.Milieux de culture.....	65
III.2.1.3.Disques pour antibiogramme	65
III.2.1.4.Antibiotique de référence	65
III.2.1.5.Test antibiogramme	66
III.2.1.6.Méthode de diffusion sur gélose (Test antibiogramme).....	66
III.2.1.7.Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB).....	67
III.2.2.Etude de l'activité antioxydante : méthode de DPPH	69
III.2.3.Etude de la toxicité aiguë	70
III.2.3.1.Animaux d'expérimentations	70
III.2.3.2.Voies d'administrations	70
III.2.3.3.Détermination de la DL50 (24h).....	71
III.2.3.4.Etude des effets toxiques de l'extrait MeOH sur les organes	72
III.2.3.4.1. Sur Organe isolé : le cœur du cobaye	72
III.2.3.4.2. Sur le système rénal, la fonction hépatique et pancréatique (<i>in vivo</i>) sur les souris	72
III.2.3.5.Analyses statistiques	74
III.3.Résultats.....	75
III.3.1.Effet antibactérien des extraits	75
III.3.1.1.Effets des extraits MeOH et AcOEt	75
III.3.1.2.Effets des fractions issus du fractionnement de l'extrait MeOH	76
III.3.1.3.CMI ET CMB des extraits	78
III.3.2.Effet toxique des extraits	81
III.3.2.1.Toxicité aiguë par voie orale	81
III.3.2.2.Toxicité aiguë par voie intra-péritonéale	82
III.3.2.3.Effets toxiques de l'extrait MeOH observés sur organe isolé (cobaye) et sur le rein, le foie et le pancréas (<i>in vivo</i> chez la souris).....	83
III.3.2.3.1.Effet de l'extrait MeOH sur le cœur de cobaye	83

III.3.2.3.2.Effets de l'extrait MeOH sur le foie, le rein et le pancréas.	85
III.3.3.Activité antioxydante des extraits	86
III.4.Conclusion	88
DISCUSSION GENERALE	89
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	93
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	94

ANNEXES

- I. Composition des réactifs généraux pour les alcaloïdes
- II. Composition du milieu de MUELLER-HINTON et du milieu gélosé COLUMBIA
- III. Composition du réactif à la vanilline sulfurique
- IV. Composition du PBS (Phosphate Buffered Saline)
- V. Publications scientifiques

GLOSSAIRE

Apoptotique	:	se dit d'une auto-destruction des cellules en réponse à un signal
Astringente	:	substances qui ont comme propriétés de resserrer et d'assécher les tissus, et peut faciliter leur cicatrisation
Chélate	:	Complexe de coordination d'un ion métallique
Chronotrope	:	qui désigne la variation de la fréquence cardiaque
Convulsions cloniques	:	contractions saccadées, brèves et répétées à courts intervalles
Enophtalmie	:	enfoncement des globes oculaires
Exophtalmie	:	protrusion du globe oculaire hors de l'orbite (en avant) liée à une augmentation du contenu de l'orbite
Fébrifuge	:	qui sert à baisser la fièvre
Hyperpnée	:	Augmentation de la fréquence respiratoire
Inotrope	:	qui désigne la contractilité myocardique
Piloérection	:	érection des poils
Prooxydant	:	Se dit d'une substance qui déclenche un stress oxydatif par l'augmentation des radicaux libres, des molécules réactives connues pour endommager les cellules
allélopathie	:	Se dit d'un phénomène biologique par lequel une plante produit une ou plusieurs substances biochimiques destinées à influencer la croissance, la survie et la reproduction d'autres plantes
Tonique	:	qui stimule l'activité de l'organisme

LISTE DES ABREVIATIONS

AcOEt	:	acétate d'éthyle
ALAT	:	alanine aminotransférase
ASAT	:	aspartate aminotransférase
ATCC	:	American type culture collection
BAE	:	n-Butanol/Acide acétique/Eau
CCM :	:	chromatographie sur couche mince
CMB	:	concentration minimale bactéricide
CMI	:	concentration minimale inhibitrice
DCM	:	dichlorométhane
DL50	:	dose létale 50 %
DPPH	:	1,1-diphényl 1-2 picrylhydrazyle
ED	:	eau distillée
IC50	:	concentration provoquant 50 % d'inhibition
ip	:	intrapéritonéale
IMRA	:	Institut Malagasy de Recherches Appliquées
INT	:	para-iodonitrotétrazolium
IPM	:	Institut Pasteur de Madagascar
J	:	jour
JC	:	Jésus Christ
LABASM	:	Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales
MeOH	:	méthanolique
MHA	:	Mueller Hinton agar
MHB	:	Mueller Hinton bouillon
min	:	minute
PBS	:	Phosphate Buffered Saline
UI	:	unité internationale
V/V	:	volume à volume

LISTE DES TABLEAUX

	<u>Pages</u>
<u>Tableau 1:</u> Principaux effets toxiques observés sur le foie	12
<u>Tableau 2:</u> Les formes d'intoxication	13
<u>Tableau 3:</u> Aspects et rendement des extraits bruts obtenus selon le solvant d'extraction	58
<u>Tableau 4:</u> Résultats du criblage phytochimique sur la poudre de feuille et sur les extraits AcOEt et MeOH de feuille	59
<u>Tableau 5:</u> Les souches utilisées	65
<u>Tableau 6:</u> Normes utilisées pour la lecture des résultats des tests antibiogrammes	67
<u>Tableau 7:</u> Effet des extraits d' <i>Astrotrichilia parvifolia</i> sur les bactéries testées	75
<u>Tableau 8 :</u> Résultats des tests antibactériens des 5 fractions LH-20 (à 100µg/disque) obtenues à partir de l'extrait MeOH sur <i>Staphylococcus aureus</i> .	77
<u>Tableau 9:</u> Concentration Minimale Inhibitrice (µg/ml) des extraits bruts sur les bactéries	79
<u>Tableau 10:</u> Concentration Minimale Bactéricide (µg/ml) des extraits brutssur les bactéries	80
<u>Tableau 11:</u> Valeurs des rapports CMB/CMI des extraits AcOEt et MeOH	81
<u>Tableau 12:</u> Résultats expérimentaux de la détermination de la DL ₅₀ (24 h) avec r = 1,02	82
<u>Tableau 13:</u> Variation du poids des souris traitées par voie orale à l'extrait brut MeOH (52,3 mg/kg) pendant 30 jours	85
<u>Tableau 14 :</u> Effets de l'extrait MeOH d' <i>Astrotrichilia parvifolia</i> (52,3 mg/kg) sur les fonctions rénales, hépatiques et pancréatiques	85
<u>Tableau 15 :</u> Activité antioxydante des extraits MeOH et AcOEt d' <i>Astrotrichilia parvifolia</i>	87
<u>Tableau 16 :</u> Résultats du criblage phytochimique des fractions F1 à F5.	60
<u>Tableau 17:</u> Activités des produits antibactériens selon Dalmarco et al. (2010)	78

LISTE DES FIGURES

	<u>Pages</u>
<u>Figure 1 :</u> Obtention des médicaments à partir d'une plante entière ou partie de la plante	9
<u>Figure 2:</u> Synthèse des acides limonoïques	25
<u>Figure 3:</u> Structure chimique de l'Azadirachtine	25
<u>Figure 4:</u> Structure du 20R, 24R-epoxy-25-hydroxy-3,4-seco-5a-dammar-4(28)-en-3-oic acid connu sous le nom de « shoreic acid ».	26
<u>Figure 5 :</u> <i>Astrotrichilia parvifolia</i> : a) La plante ; b) feuilles et boutons floraux ; c)fruit	29
<u>Figure 6 :</u> Relations biogénétiques entre les principales classes de métabolites secondaires, sources de principes actifs	34
<u>Figure 7:</u> Structure des flavonoïdes	37
<u>Figure 8:</u> Structure de quelques anthocyanidines.	38
<u>Figure 9 :</u> Structure des polyphénols à activité antibactérienne isolés du thé vert du Japon	40
<u>Figure 10:</u> Exemples de flavonoïdes isolés de l'extrait organique de <i>Monotes africanus</i>	40
<u>Figure11 :</u> Voie de l'acide mévalonique et synthèse des terpénoïdes	42
<u>Figure 12 :</u> Structure des saponosides triterpéniques tétracycliques et pentacycliques	43
<u>Figure 13 :</u> Structure des saponosides stéroïdiques	44
<u>Figure 14 :</u> Structures de quelques Alcaloïdes	45
<u>Figure 15:</u> Procédé d'obtention de la fraction F5 à partir de l'extrait brut méthanolique de feuille obtenu au soxhlet à chaud.	61
<u>Figure 16:</u> Chromatogramme révélé à la vanilline sulfuriquedes fractions obtenues après fractionnement sur chromatographie sur gel de Sephadex LH-20.	62

<u>Figure 17:</u>	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	69
<u>Figure 18 :</u>	Répartition géographique d' <i>Astrotrichilia parvifolia</i>	30
<u>Figure 19:</u>	Effet des extraits AcOEt et MeOH d' <i>Astrotrichilia parvifolia</i> sur la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> en milieu solide (dépôt = 1000µg/disque ; T = témoin = gentamycine à 10µg/disque)	76
<u>Figure 20:</u>	Effets des 5 fractions LH-20 obtenu à partir de l'extrait MeOH sur la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> en milieu solide (dépôt : 100µg/disque)	77
<u>Figure 21:</u>	Variation de la coloration de la solution de <i>p</i> -iodonitrotetrazolium chloride induite par la croissance des bactéries en fonction de la concentration des extraits bruts sur les souches testées	79
<u>Figure 22 :</u>	Détermination graphique de la DL ₅₀ (24 h) par la méthode graphique de Reed et Muench (1938)	83
<u>Figure 23:</u>	Effet de la concentration et du temps de contact de l'extrait brut d' <i>Astrotrichilia parvifolia</i> sur le nombre de battement par minute et sur l'amplitude de la contraction auriculaire isolée du cobaye	84
<u>Figure 24:</u>	Inhibition du DPPH en fonction des concentrations des extraits d' <i>Astrotrichilia parvifolia</i> et de la vitamine C.	87

INTRODUCTION GENERALE

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base: nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité (Gurib-Fakim, 2006). En outre, les plantes sont des sources de bois, utilisé entre autres, pour l'ornementation.

Une plante médicinale est une plante dont un ou plusieurs de ses organes contiennent des substances qui peuvent être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs de la synthèse des médicaments (Junaid *et al.*, 2006). Les plantes médicinales ont toujours eu une place importante dans l'arsenal thérapeutique de l'humanité en particulier dans la couche de population confrontée à la pauvreté et au manque d'accès à la médecine moderne qui selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), représente environ 65-80% de la population mondiale dans les pays en développement. Des chercheurs travaillant dans le domaine de l'éthnopharmacologie, ont montré que les plantes utilisées en médecine traditionnelle ont été testées souvent d'une part pour leur efficacité dans les modèles pharmacologiques et d'autre part pour leur absence de toxicité (Gurib-Fakim, 2006). Utilisées depuis des millénaires :

- d'une part, les plantes médicinales jouent un rôle essentiel dans le développement des cultures humaines à travers le monde entier : D'après Delaveau *et al.*, (1985), pendant l'Antiquité égyptienne, grecque et romaine, il y a une accumulation des connaissances empiriques nombreuses qui seront transmises en particulier par l'intermédiaire des arabes aux héritiers européens. On peut citer comme exemple parmi les plantes utilisées par les Egyptiens : le grenadier ou *Punica granatum* (Lythraceae) et l'ail ou *Alium sativum* (Liliaceae). A l'île de la Réunion, les plantes médicinales constituent des recours thérapeutiques dans le cancer et elle répond à la multiplicité des besoins physiques (recherche de soulagement, guérison), psychologiques et spirituels des malades. (Cathebras, 1996 ; Schmitz, 2006 ; Molassiotis, 2005). La Chine est sans doute le pays le plus avancé en ce qui concerne l'union systématique de la médecine par les plantes aux méthodes thérapeutiques naturelles. (Xiao, 2013).
- d'autre part, les plantes médicinales constituent une richesse de ressources d'ingrédient qui peut être utilisée dans le développement de médicament

naturel et de médicament de synthèse. (Bernard, 2001 ; Leslie, 2000 ; Catherine *et al.*, 2008). Selon l'OMS, Les médicaments à base de plantes, élément essentiel des soins de santé partout dans le monde depuis les premiers jours de l'espèce humaine, sont encore largement utilisés et ont une importance considérable dans le commerce international. La reconnaissance de leur valeur clinique, pharmaceutique et économique continue de croître, bien que cela varie fortement selon les pays. (Jayasuriya, 1990 ; Catherine *et al.*, 2008). Plusieurs principes actifs de plante ont été extraits et utilisés en médecine. On peut citer parmi eux : la galangine (flavonol) et les diarylheptanoïdes d'*Alpinia officinarum* (Zingiberaceae) à activité antigrippaux, et anti-inflammatoire (Sawamura *et al.*, 2010 ; Konno *et al.*, 2013) ; la vincamine qui est un alcaloïde indolique isolé des feuilles du *Vinca minor* stimule la circulation cérébrale (Bruneton, 1993) ; l'allicine contenu dans *Allium sativum* possède des propriétés antimicrobiennes et anti-cancer (Vinay *et al.*, 2008), le cardenolide extraite de *Digitalis purpurea* est utilisé dans les insuffisances cardiaques aiguës ou chroniques (Bruneton, 1993) ; la vincristine et la vinblastine, des alcaloïdes isolés du *Catharanthus roseus*, sont utilisées pour lutter contre le cancer et la leucémie (Bruneton, 1999).

Dans le monde, la résistance des microorganismes pathogènes aux antibiotiques est l'une des menaces les plus graves pour la santé humaine. La recherche d'antibiotiques novateurs devient l'une des préoccupations des spécialistes de la santé. Une alternative serait l'isolement de composés actifs issus d'espèces végétales scientifiquement inexploitées et généralement utilisées en médecine traditionnelle dans le but de promouvoir des produits biologiques et de minimiser l'utilisation d'antimicrobiens synthétiques.

Madagascar a une diversité végétale très riche avec un degré d'endémicité inégalé et une richesse de patrimoine éthno médical. Actuellement, plus de 13 000 espèces végétales ont été recensées dont 80% sont endémiques (Rasoanaivo, 2000). Plusieurs d'entre elles sont utilisées par les malgaches. Parmi les principales, on peut citer :

- le *dingadingana* ou *Psiadia altissima* : le décocté de feuilles peut servir à nettoyer les plaies (la gale) (Rabesa, 1986) ;
- le *hofika* ou *Dioscorea bulbifera* : la poudre des bulbilles aériennes séchées et râpées, appliquée sur les blessures et les plaies, entraîne leur guérison (Debray *et al.*, 1971)

- le décocté de feuilles de *Psiadia altissima*, administré par voie orale, est efficace pour calmer les maux de ventre, rétablir une indigestion et guérir la blennorragie (Rabesa, 1986) ;
- le *romba* ou *Ocimum gratissimum* dont le décocté de feuilles est administré par voie orale est un anti-diarrhéique et un anti-vomitif, de plus, les feuilles de cette plante sont utilisées en application externe pour calmer la douleur au niveau des dents dont les gencives sont gonflées (Pernet et Meyer, 1957) ;
- le *aviavy* ou *Ficus megapoda* est un antitussif et peut stopper les éternuements fréquents. Les feuilles fraîches pilées sont à aspirer par le patient (Debray *et al.*, 1971) ;
- le décocté des feuilles du *tanantanamanga* ou *Ricinus communis* ou ricin ou du *vahimasinaombilahy* ou *Paullinia pinnata* est administré par voie orale pour guérir le rhume, une hypothermie prolongée ou la malaria (*tazo*) (Rabesa, 1986).
- le *hanidraisoa* ou *Senecio faujasioides* dont le décocté de feuilles est utilisé en bain pour toute dermatose, eczéma et pour traiter la gale (Rakoto-Ramiarantsoa, 1995) ;
- l'inhalation du fumé dégagé par le décocté de feuille du *kininimpotsy* ou *Eucalyptus globulus* est efficace pour traiter un rhume ou une grippe fébrile (Rakoto-Ramiarantsoa, 1995).

Pour la plupart des malgaches, l'utilisation traditionnelle des plantes pour l'automédication est une caractéristique importante de la vie familiale. Les médicaments chimiques sont, certes, connus et les centre de soins fréquentés, mais leur accès, souvent difficile, limite l'usage : on s'y adresse le plus souvent en dernier lieu. L'utilisation des plantes est d'autant plus courante que la région est isolée. La connaissance des végétaux se perpétue de différentes manières : indications des guérisseurs traditionnels, conseils des parents, partages d'expériences lors de visites de malades. Par conséquent, si on observe le nombre de plantes utilisées en thérapeutique traditionnelle, rares sont celles qui ont déjà fait l'objet d'études scientifiques.

Aujourd'hui, la recherche est surtout axée vers les études phytochimiques et pharmacologiques de nouvelles substances extraites de végétaux, afin d'identifier et d'isoler de nouvelles molécules médicamenteuses d'origine naturelle. De ce fait, la valorisation de la médecine traditionnelle est une préoccupation qui devient de plus en plus importante dans de

nombreux pays et pourrait conduire notamment à la mise au point de médicaments à base de plantes.

C'est pour ces raisons que l'Unité de Toxicologie au sein du laboratoire du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée (DBFA) a orienté ses travaux de recherche sur les plantes. Plusieurs plantes antimicrobiennes endémiques malgaches ont ainsi été étudiées. On peut citer entre autres:

- *Crotalaria micans* Link (Fabaceae) (Randrianarison, 2017) ;
- *Crotalaria bernieri* Baill. (Fabaceae)(Andriamampianina *et al.*, 2016) ;
- *Albizia arenicola* (Fabaceae) (Mounidati, 2009) ;
- *Mystroxydon aethiopicum* (Celastraceae) (Raharimanana, 2015);
- *Dombeya macrantha* (Malvaceae) (Marina, 2015);
- *Pittosporum senecioideum* (Pittosporaceae) (Razafintsalana, 2006).

La conception et la réalisation de notre travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation d'extraits d'*Astrotrichilia parvifolia* appartenant à la famille des Méliacées endémiques malgaches au niveau du genre, exploitées par la pharmacopée traditionnelle. A notre connaissance, il n'a pas encore fait l'objet d'étude biologique. La plante est utilisée dans la région des Hautes Terres Malgaches pour soigner les plaies infectées et pour soulager les maux de dents. Des activités sur des bactéries pathogènes (élevée sur *Staphylococcus aureus*, une bactérie infectant les plaies, moindre sur *Streptococcus sanguis* qui est une bactérie cariogène) et sur quelques animaux à sang chaud ont été mises en évidence lors des tests préliminaires sur les extraits de feuilles de la plante (Rasolofonantenaina, 2012).

Aussi, une vérification plus élaborée du bienfondé scientifique de l'utilisation empirique d'*Astrotrichilia parvifolia*, sera réalisée avec son spectre d'activité sur d'autres bactéries pathogènes, de plus la recherche de la ou des molécule(s) responsable(s), des activités biologiques sera entreprise.

Dans la première partie de cette thèse, nous proposerons un aperçu bibliographique traitant les plantes médicinales et leurs propriétés éventuelles (activités antibactériennes, toxiques, et antioxydants) et présentant la famille des Méliacées et la description botanique de la plante étudiée. Quelques métabolites secondaires, leur importance dans l'organisme végétal et la biosynthèse de certains d'entre eux y seront également rapportés.

Dans la deuxième partie, nous aborderons les études chimique et biologique de la plante. Dans l'étude biologique, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'activité antibactérienne, au pouvoir antioxydant et à une éventuelle toxicité de quelques extraits de notre matériel végétal.

Les résultats que nous avons obtenus ont fait l'objet de 4 publications dont 1 article scientifique, 2 communications orales et 1 communication affichée (AnnexeV).

CHAPITRE I :

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1.LES PLANTES MEDICINALES

I.1.1. HISTORIQUE(Quetin-leclercq, 2002)

L'utilisation des plantes médicinales remontent depuis l'antiquité. D'après Kassel, 2003 « Très tôt au cours de l'évolution, les hommes pour se soigner, utilisèrent les ressources présentes dans leur environnement naturel ». Les noms des premières drogues en écriture cunéiforme sur des documents Sumériens et Babyloniens ont été découverts en 4.000 avant JC et copiés sur des tablettes d'argile datant du 7ème siècle avant JC. Un papyrus découvert à Ebers (Egypte) donne des informations concernant les maladies et leurs remèdes utilisés en 1600 avant JC. En Ve siècle avant JC, Hippocrate, un des médecins grecs célèbres, utilisaient à côté d'animaux et de minéraux, de nombreuses plantes. En 77 après JC, Dioscoride recueille plus de 500 plantes médicinales, aromatiques et matières minérales dans « *materia medica* ». Cette œuvre ne décrit pas seulement l'usage de ces drogues, mais aussi les doses, les modes de préparation et de conservation. En 1978, 54 de ces plantes décrites par Dioscoride ont été reprises dans la liste des plantes essentielles de l'OMS. Vers le 15^{ème} siècle, les vertus des plantes se faisaient connaître de plus en plus. Ainsi, la liste des drogues décrites par Dioscoride est élargie par Celse et Pline l'ancien Romain du 1er siècle de notre ère, pendant que Galien, qui attachera son nom à ce qu'on appelle la pharmacie galénique décrit le mode d'emploi des principes actifs de la drogue.

Après la chute de l'Empire Romain, la rédaction de traités en la matière se raréfie. Cependant, la culture des plantes médicinales est poursuivie dans les monastères (Capitulaires de Charlemagne vers 800 après JC, création au 11ème siècle de l'école médicale de Salerne où furent écrits différents ouvrages dont le « *Flos medicinae* » qui mentionne 100 drogues importantes). Par contre, durant la même période, le monde arabe élargit ses connaissances (1500 drogues décrites par Ibn al-Baitar au 13ème siècle dans son ouvrage traduit en latin sous le titre: « *Corpus simplicium medicamentorum* »). Les croisades, la découverte de l'Amérique et les contacts avec d'autres cultures entraînent l'apparition en Europe de nouvelles drogues « exotiques » et de nouvelles épices. Paracelse (1493-1541) marque le début de la pharmacie expérimentale en introduisant les premières notions de spécificité et de principes actifs. Dans sa « théorie des signatures », il reprend l'idée de Théophraste (372-287 avant JC), philosophe grec qui prétendait que toute plante était porteuse d'un message.

D'après cette théorie, les plantes donneraient, par exemple, par la forme de certains de leurs organes, leur goût ou leur couleur, une indication des maladies qu'elles seraient susceptibles de soigner. Ainsi, l'hépatique (*Hepatica nobilis*, Renonculacée), petite plante des zones montagneuses dont les feuilles rappellent un lobe de foie, soignerait les maladies du foie et de la vésicule. Les quelques travaux réalisés sur cette plante n'ont pas mis en évidence d'effet positif sur le système hépatique. Un autre exemple est la chélidoine (*Chelidonium majus*, Papavéracée), dont le latex jaune ferait penser à la bile. Cette plante était donc utilisée pour combattre les affections hépatiques et biliaires. Les recherches ont montré que la chélidoine contient des alcaloïdes à noyau tétrahydroisoquinoléinique (chélidonine, sanguinarine, berbérine, ...) à actions spasmolytiques et cholagogues, mais aussi cytotoxiques, antibactériennes et antivirales *in vitro*. La plante est utilisée à faibles doses pour traiter les crampes du système biliaire et gastro-intestinal en Allemagne par exemple, mais, en Belgique, on n'utilise que le latex en usage externe pour traiter les verrues. Cette théorie, "redécouverte" et remise au goût du jour par certains auteurs contemporains peut engendrer des risques pour la santé publique: plantes inactives et/ou toxiques, remplacement de médicaments essentiels dans des maladies graves. Citons la betterave rouge (*Betavulgaris* var *conditiva*, Chénopodiaceae) dont le jus, rouge, est censé être, d'après cette théorie, un reconstituant sanguin et est préconisé, dans certaines publications récentes "pseudo-scientifiques" dans le traitement de leucémies.

Les 16^{ème}-18^{ème} siècles voient l'apparition des premières publications scientifiques, la classification systématique des plantes (Linné) et la séparation nette entre médecine et pharmacie. Les progrès de la chimie aux 18^{ème} et 19^{ème} siècles permettent l'extraction des premiers principes chimiques, dont les structures ne seront déterminées que plus tard, Les débuts de la pharmacie et de la médecine modernes datent de l'époque de Claude Bernard (1813-1878) qui introduit les essais pharmacologiques et l'étude des relations structure-activité.

I.1.2.DEFINITIONS

Une plante médicinale est définie par la pharmacopée française note 1 comme une « drogue végétale dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses ». Une « drogue végétale » est une plante ou une partie de plante, utilisées en l'état, soit le plus souvent sous la forme desséchée, soit à l'état frais.

L'expression *drogue végétale* ou, plus couramment, *drogue*, désigne donc une matière première naturelle servant à la fabrication des médicaments.

La Phytothérapie est une médecine qui utilise des plantes - ou la seule "partie active" de ces plantes ayant des propriétés thérapeutiques. Ces plantes sont appelées "plantes médicinales". Les préparations peuvent être obtenues par macération, infusion, décoction, ou sous forme de teinture, poudre totale, extraits,... etc. Les plantes médicinales peuvent être des espèces cultivées mais dans la plupart des cas des espèces sauvages.

I.1.3.LES PLANTES MEDICINALES : SOURCES DE MEDICAMENT

50% des médicaments sont d'origines végétales (Girre, 2006). En effet, il existe deux types de médicament d'origine végétale: les médicaments naturels et les médicaments de synthèse.

Les médicaments naturels : depuis l'antiquité, les plantes médicinales sont toujours les principales sources de médicament naturel. Les médicaments à base de plantes sont des produits médicinaux finis qui renferment des principes actifs provenant exclusivement d'une plante ou des associations de plantes, à l'état brut ou sous forme de préparations qui aboutit à des constituants isolés (figure 1, page 9) ou à des extraits totaux (obtenus par décoction, macération, infusion ou percolation avec différents solvants). Les plantes médicinales sont également utilisées comme matière première pour l'extraction des principes actifs (dont la procédure d'obtention est représentée dans la figure1, page 9). Ainsi, la majorité des alcaloïdes (ex : morphine, ergotamine, quinine, ajmaline), des hétérosides (digitaline et digoxine), des antibiotiques (pénicilline, stréptomycine, tétracyclines, céphalosporines) sont extraits des végétaux.

Les médicaments de synthèse : la chimie de synthèse s'est surtout développée dans les dernières décennies du XXe siècle. On peut citer les antimalariques de synthèse, les antihistaminiques, les barbituriques, les tranquillisants : dérivés de la phénothiazine, les antituberculeux (isoniazide, acide para-aminosalicylique). (**Boutamina, 2014**)

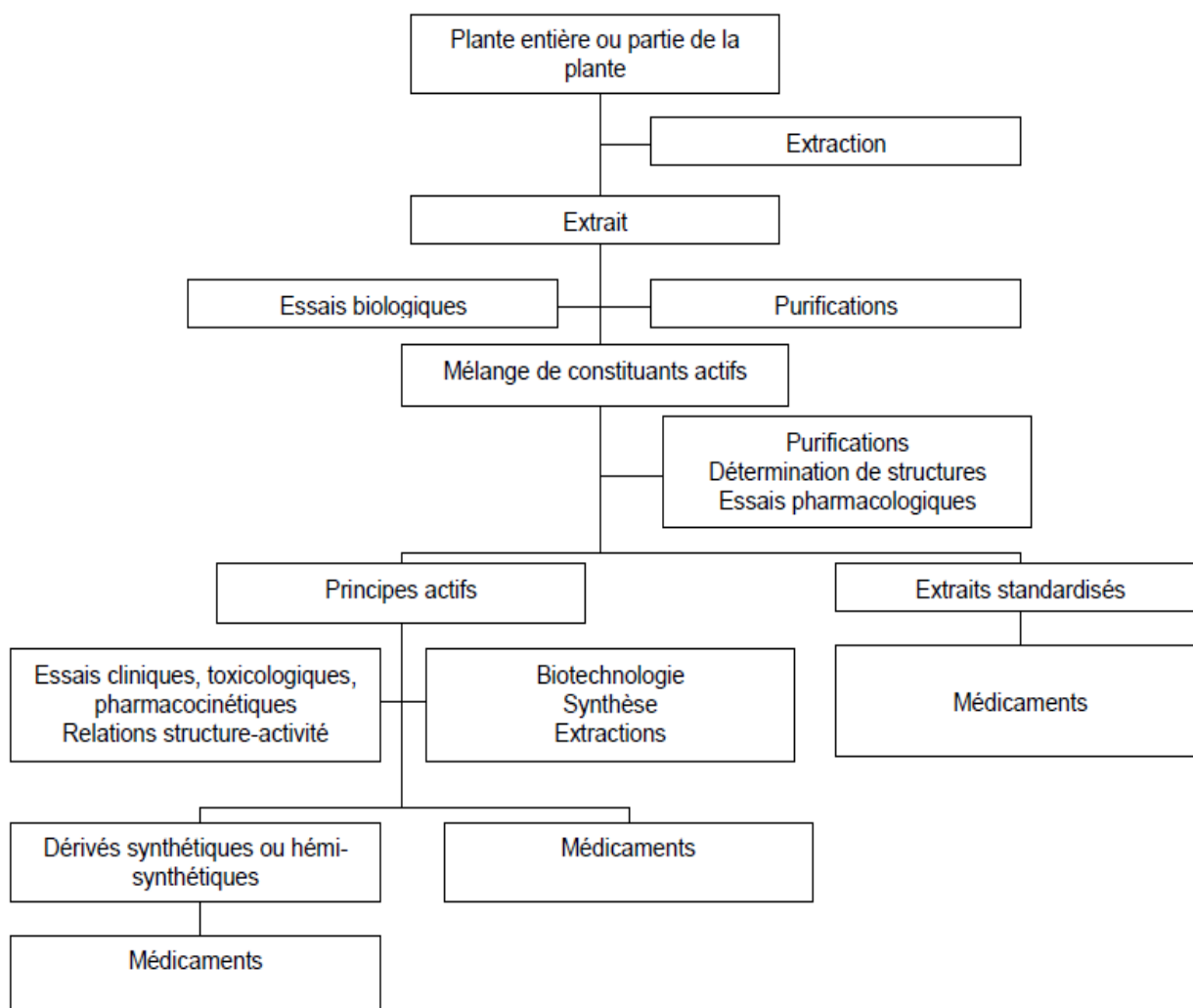


Figure 1 : Obtention des médicaments à partir d'une plante entière ou partie de la plante (Quetin-Leclercq, 2002)

I.1.4.TOXICITE DES PLANTES MEDICINALES

I.1.4.1.Notion d'effet toxique

Lorsqu'un individu absorbe des produits chimiques, divers effets biologiques peuvent se produire et se révéler bénéfiques ou néfastes. La notion d'effet toxique suppose des conséquences nocives pour l'organisme. Selon la fréquence et la durée de l'exposition ou l'administration du toxique, on peut distinguer plusieurs formes de toxicité : la toxicité aiguë et la toxicité à terme : subaiguë et chronique.

I.1.4.2.Toxicité aiguë

La toxicité aiguë englobe tous les phénomènes spécifiques et les signes adverses, qui se manifestent juste après l'exposition de l'organisme à une prise unique ou plusieurs prises très rapprochées d'un agent chimique. L'effet toxique aigu est généralement considéré comme un effet qui se produit immédiatement ou dans les premiers jours après l'exposition (Leblanc, 2010).

I.1.4.3.Toxicité subaiguë

La toxicité subaiguë est due à l'exposition répétée à une dose du toxique, qui ne cause aucune toxicité aiguë évidente, pendant une période assez prolongée mais à condition de ne pas constituer une partie significative de la vie de l'espèce examinée. (Hodgson et Cunney, 2010)

I.1.4.4.Causes de toxicité des plantes

La toxicité des plantes médicinales peut être expliquée par:

- *la toxicité intrinsèque des constituants* : les plantes médicinales sont des mélanges complexes de molécules diverses pourvues d'une activité biologique notoire, entre autres des hétérosides, des alcaloïdes, des anthocyanes, des tannins et des stéroïdes. Comme toutes les molécules bioactives, ces constituants peuvent, à un certain degré de concentration, présenter une toxicité intrinsèque et leur teneur peut «naturellement» varier d'une préparation à une autre;
- *l'identification imprécise des composants* : un de ses constituants, non identifié ou mal identifié est susceptible d'avoir des effets toxiques graves;

- *les altérations* : la toxicité peut être aussi liée à la présence de composants qui altèrent chimiquement les préparations à base de plantes, qu'il s'agisse de végétaux ou de substances chimiques médicamenteuses;
- *les contaminations*: les contaminants toxiques, tels les pesticides et les métaux lourds, ainsi que des pollens, des champignons microscopiques et des moisissures sont susceptibles de causer des réactions allergiques et/ou toxiques.

I.1.4.5.Impact des plantes toxiques sur les organes humains

Les toxiques ne produisent pas des effets avec la même intensité sur tous les organes. Celui-ci dépend de nombreux facteurs, y compris l'importance de l'organe et la quantité de substances toxiques et/ou des métabolites réactifs qu'il contient. Des organes tels que le rein et le foie sont bien approvisionnés avec le sang et sont métaboliquement actifs, parce qu'ils ont un rôle important dans la biotransformation et l'excrétion des toxiques. Ces organes sont appelés organes cibles puisqu'ils sont plus vulnérables et plus exposés aux toxiques que les organes ou les tissus mal irrigués ou métaboliquement moins actifs tels que la peau et l'os. (Timbrell, 2000 ; Lapointe, 2004)

Après absorption d'une plante toxique, des troubles digestifs communs, notamment des nausées et des vomissements associés à une diarrhée violente, visant à éliminer le toxique en cause, apparaissent plus ou moins rapidement. Des douleurs abdominales ou des coliques liées à l'accélération du transit intestinal peuvent aussi survenir. Ces troubles sont parfois plus sérieux avec présence de sang dans les selles ou les vomissements et peuvent évoluer vers une déshydratation importante, accompagnée de pertes potassiques avec risque de troubles hydroélectrolytiques et de collapsus. Outre cet impact sur le plan digestif, d'autres manifestations plus spécifiques avec notamment des troubles au niveau cardiaque, rénal, respiratoire, neurologique, hépatique peuvent avoir lieu. En particulier les atteintes du foie sont complexes et diverses. Le tableau 1, de la page 12 résume les principaux effets toxiques observés.

Tableau 1: Principaux effets toxiques observés sur le foie

Lésions hépatiques	Caractéristiques
Stéatose	Elle correspond à l'envahissement du tissu par des graisses. Les toxiques agissent en bloquant l'élimination des triglycérides hépatiques dans le sang
Nécrose	Elle suppose la destruction des hépatocytes et correspond généralement à lésion aiguë
Cholestase	Diminution ou arrêt de l'écoulement de la bile par modification de l'excrétion biliaire
Cirrhose	Présence d'infiltrations de collagène dans la masse hépatique
Hépatite	Manifestations cliniques de l'inflammation du foie
Cancérogénèse	Tumeurs primitives malignes du foie

Quant au rein, (Lapointe, 2004), les atteintes concernent principalement le glomérule en diminuant la filtration, mais également les tubules proximaux qui concentrent les toxiques du fait de leur forte activité d'absorption et de sécrétion. D'autre part leur forte teneur en cytochrome P₄₅₀ leur permet de détoxifier ou d'activer les toxiques. Les principaux néphrotoxiques sont les métaux lourds, les antibiotiques, les analgésiques et certains hydrocarbures halogénés (dérivés chlorés) (Lu, 1992).

Tableau 2: Les formes d'intoxication

Forme d'intoxication	Fréquence d'administration	Durée de l'exposition (Rongeurs)
Aiguë	Unique	≤ 24 heures
intoxication subaiguë	Répétée	= 1 mois
Subchronique	Répétée	De 1 à 3 mois
Chronique	Répétée	> 3 mois

I.1.4.6. Quelques types de plantes toxiques (Debray, 1975 ; Boustié *et al.*, 2002 ; Flesh Fey *et al.*, 2003)

La toxicologie des végétaux tropicaux est complexe, compte tenu de la grande diversité des plantes. Elle dépend à la fois du type de contact entre la plante et l'homme et de la nature des toxiques.

- Le type de contact: c'est soit un contact par ingestion qui peut avoir différentes motivations (accidentelle surtout chez les jeunes enfants, liée à des habitudes alimentaires, en rapport avec la médecine traditionnelle, ou liée à une recherche volontaire d'intoxication dans un but de suicide ou d'homicide), soit un contact cutané en rapport avec la présence dans la sève ou suc de la plante d'une substance toxique irritante ;
- La nature des toxiques : il s'agit soit d'hétérosides (hétérosides stéroïdiques cardiotoxiques ou saponosides, hétérosides cyanogénétiques), soit d'alkaloïdes, soit d'acide oxalique, soit de protides (phytotoxines, acides aminés). Certaines plantes toxiques contiennent plusieurs toxiques à l'origine de symptomatologies complexes.

I.1.4.6.1. Les plantes cardiotoxiques:

En zones tropicales et intertropicales, plusieurs plantes sont cause d'intoxications par ingestion dues à des hétérosides cardiotoxiques:

- le laurier-rose ou oléandre (*Nerium oleander*) est un arbuste de la famille des Apocynacées ;
- originaire du Proche-Orient, la liane à caoutchouc ou Lombiro (*Cryptostegia madagascariensis*) est un arbuste lianoïde appartenant à la famille des Periplacacées. Très répandu à Madagascar, c'est une plante responsable de morts criminelles ;
- le bois d'Ako (*Antiaris toxicaria*) est un arbre de la famille des Moracées. Il est très répandu en Afrique ;
- le faux manguier (*Cerbera manghas*) est un petit arbre de 4 à 10m de haut originaire de Madagascar, de la famille des Apocynacées. La plante et principalement les graines ont été utilisées dans les ordalies à Madagascar (le tanguin) pour déterminer la culpabilité ou l'innocence de personnes accusées de sorcellerie.

I.1.4.6.2. Les plantes hallucinogènes :

La Belladone (*Atropa belladonna*), la Jusquiame noire (*Hyoscyamus niger*) et le Datura (*Datura stramonium*) de la famille des Solanacées. Les plantes tropicales hallucinogènes sont toutes des *Solanaceae*, comme le Cestreau, la Solandre, la Mandragore, la Trompette des anges, la Morelle d'Amérique. L'intoxication a lieu lors de l'ingestion et accessoirement lors de l'inhalation de fumée. La Pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) de la famille des *Apocynaceae*, originaire de Madagascar et d'Inde, riche en principes actifs, dont la vinblastine et la vincristine, peut être hallucinogène.

I.1.4.6.3. Les plantes cyanogéniques :

A l'origine d'intoxications très graves d'évolution très rapide (moins d'une heure). Le toxique est un hétéroside, l'acide cyanhydrique (HCN). Une des références des intoxications par les plantes cyanogéniques en Europe est l'intoxication par l'amande amère, fruit de l'amandier commun (*Amygdalus communis*) de la famille des Rosacées. Dans les zones tropicales, des intoxications cyanogéniques par ingestion peuvent être dues au pois sabre, ou haricot sabre (*Canavalia ensiformis*) qui est une plante de la famille des Fabacées.

I.1.4.6.4. Les plantes affectant le système nerveux central :

La Ciguë vireuse (*Cicuta virosa*), de la famille des Apiacées.

I.1.4.6.5. Les plantes associant troubles digestifs et hépatiques :

Plusieurs genres de plantes sont impliqués : *Heliotropium*, *Senecio*, *Crotalaria*, *Symphytum*. Les substances toxiques sont des alcaloïdes de la pyrrolizidine toxiques pour les veinules du foie.

I.1.4.6.6. Les plantes à toxicité essentiellement digestive :

La référence d'intoxication par les plantes à toxicité essentiellement digestive est l'intoxication par le ricin (*Ricinus communis*), arbuste originaire de la région méditerranéenne de la famille des *Euphorbiaceae*. Le principe actif est une lectine : la ricine, qui interfère avec la synthèse protéique. La ricine n'est présente que dans la graine. L'intoxication survient après une période de latence de quelques heures à quelques jours. Les effets principaux sont des troubles digestifs sévères (nausées, vomissements, diarrhée, douleurs abdominales) avec déshydratation et collapsus. Les principales plantes tropicales à toxicité essentiellement digestive sont le petit Flamboyant rouge (*Caesalpinia pulcherrima*), un arbuste de la famille des *Caesalpiniaceae*, originaire d'Amérique du sud. L'ingestion des graines entraîne des vomissements et des troubles gastro-intestinaux. D'autres flamboyants ont une toxicité digestive comme le Flamboyant jaune, le Mimosa du Japon ou l'Oiseau de paradis jaune (*Caesalpinia gilliesii*), arbuste originaire de Madagascar, de 1,50 à 2m de haut, avec des fleurs jaune rouge. La Margose ou Pomme de merveille contient un principe hypoglycémiant la charantine. Son utilisation à forte doses (sous forme de jus) peut majorer les effets des médicaments hypoglycémiant oraux et entraîner une hypoglycémie chez les diabétiques en particulier.

I.1.5. IMPORTANCE DES PLANTES MEDICINALES

I.1.5.1. Dans le monde

Selon les pays, sorciers, guérisseurs, curanderos, tradipraticiens, herboristes et récemment biochimistes végétaux savent tirer parti des principes actifs synthétisés par des plantes médicinales du monde. L'usage des plantes médicinales n'est pas uniquement une lointaine coutume ; 90% de la population mondiale utilise encore uniquement des plantes brutes et des extraits non raffinés de plantes pour se soigner (Duke, 1985; Balandrin *et al.*, 1993). En 1986, environ 119 substances chimiques obtenues à partir de 91 espèces végétales étaient utilisées comme des médicaments importants dans 62 classes thérapeutiques. En 1995, sur les 25 produits pharmaceutiques les mieux vendus dans le monde, 12 étaient d'origine

naturelle (Baker *et al.*, 1995). En 1999, environ 139 000 métabolites secondaires ont été recensés dans le dictionnaire des produits naturels et environ 4 000 nouvelles molécules sont recensées chaque année (Verpoorte, 1999).

La valeur commerciale de composés bioactifs d'origine végétale se situerait aux alentours de 30 milliards de dollars par année dans le monde entier (Deans et Svoboda, 1990). Des plantes supérieures sont à l'origine d'environ 120 médicaments commerciaux, et entre 10% et 25% de tous les produits de prescription renferment au moins un principe actif issu d'une plante supérieure (Duke, 1993).

En Asie du sud, environ 800 millions de personnes se traite par des plantes. En effet, en Chine, les préparations à base de plantes représentent entre 30 et 50% de la consommation totale de médicament (WHO, 2005). L'Inde a une riche tradition en matière d'utilisation et de conservation de plantes médicinales, soutenue par des pratiques socio-culturelles comme l'adoration des plantes et des animaux et la protection des bois sacrés.

Aux États-Unis, il existe environ 1 800 espèces de plantes médicinales disponibles commercialement. Environ 25% de tous les médicaments vendus proviennent des produits naturels, tandis que 25% résultent des modifications structurales des molécules naturelles. Depuis la préhistoire, les chamans ainsi que les sorciers et les sorcières d'Eurasie et d'Amérique ont acquis des connaissances très poussées sur les plantes médicinales.

Des centaines d'autres espèces étaient également utilisées par les Premières nations du Canada (Arnason *et al.*, 1981). Une enquête réalisée en 1997 a montré que 23 % des Canadiens ont déjà utilisé des plantes médicinales.

En Afrique, selon l’OMS, plus de 80% de la population ont recours à la médecine traditionnelle et aux plantes médicinales pour ses soins de santé primaire. Le manque de médicament essentiel, l’insuffisance des soins de santé, le coût élevé des médicaments et les habitudes socio-culturelles des populations expliquent le recours aux pratiques traditionnelles à base de plantes médicinales.

À l’île de la Réunion, les plantes médicinales constituent une ressource thérapeutique fréquemment mobilisée par les personnes atteintes d’un cancer. (Desprès, 2011)

I.1.5.2.Les plantes médicinales à Madagascar

A Madagascar, dysenterie, toux, céphalées, fièvre se traitent par différents modes d’emploi de feuilles, racines, écorces aux vertus reconnues. La décoction donne un *tambavy*, qui est un breuvage amer faisant partie du quotidien de la plupart des malgaches. Son contenu est fonction de l’usage.

Parmi les plantes médicinales les plus connues, on peut citer :(Rakoto-Ramiarantsoa, 1995)

- le mandravarotraou *Cinnamomum fragrans*, signifiant plante qui vient à bout des maux les plus difficiles, est une plante qui a le pouvoir de servir d’antidote aux poisons, de défendre l’organisme et de purifier le sang. La grippe, la toux, la fièvre, les bronchites et les infections du foie peuvent être traitées par le mandravarotra. Elle a également des propriétés thérapeutiques permettant de protéger le corps contre certaines maladies chroniques comme l’hypertension, les dermatoses et les rhumatismes. Ces pouvoirs mystérieux découlent de sa richesse en phénols, en thymol, en carvacols et bien d’autres principes actifs. Elle est d’ailleurs recommandée à titre de remède complémentaire pour le traitement de certains types de tumeurs ;
- le *Katrafay* ou *Cedrelopsis grevei* : l’huile de cette plante est préconisée en massage dans les fatigues générales, les lumbagos, les sciaticques et névralgies ;
- le *talapetraka* ou *Centella asiatica* est bu, contre les maux de ventre, le *Mahatanandro* ou *Drosera ramentacea* est préparé et utilisé de la même façon pour soigner les céphalées ;

- la préparation à base de tiges et de feuilles de *kijejy* (*Vernonia sp.*) est utilisée pour stimuler l'appétit ;
- le *voafotsy* (*Aphloia theiformis*) a un gout doux, il est utilisé comme fébrifuge et calme les maux de tête ;
- *le vahona ou Aloe vahombe* a de multiples vertus : Il a un effet cicatrisant, renforce les défenses immunitaires, agit sur tout l'appareil digestif. Il est utilisé en prévention de certaines formes de tumeurs et de maladies de dégénérescence. C'est aussi un anti-inflammatoire naturel. Il est considéré comme facteur de jouvence et de longévité en prise quotidienne (Solar *et al.*, 1980 ; Ralamboranto *et al.*, 1982 ; Brossat *et al.*, 1987 ; Ralamboranto, 1988).

Selon l'OMS, 70% de la population locale utilisent les plantes médicinales pour se soigner. En plus de leur utilisation sur le territoire malgache, plusieurs d'entre ces plantes sont exportés dans les pays étrangers comme l'Europe, l'Asie et les Etats-Unis (Alain, 2012).

I.2.LA RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS

De nombreuses maladies infectieuses (variole, rage, rougeole, herpès, jaunisse, rhume du cerveau,...) furent décrites dès la plus haute antiquité (Berche, 2007). Ces maladies sont dues à des agents tels que les virus, les bactéries, les mycètes, les protozoaires et les helminthes qui peuvent être transmis d'un hôte à un autre. Les conséquences de cette maladie peuvent être bénignes, sévères ou mortelles pour l'hôte. Malgré l'existence de vaccin et d'antibiotique, les maladies infectieuses restent l'une des premières causes de mortalité et de handicap dans le monde. A l'heure actuelle, le phénomène de résistance bactérienne est connu pour toutes les familles d'antibiotiques. Une bactérie est dite résistante lorsqu'elle possède une information génétique lui permettant d'élaborer et de réaliser des mécanismes d'échappement à l'action des antibiotiques (Billing *et al.*, 1998).

Selon le rapport de l'OMS du 30 avril 2014 et du 21 Septembre 2016 :

- du fait de la résistance aux antimicrobiens, les patients sont malades plus longtemps et le risque de décès augmente. On estime par exemple que chez les personnes atteintes du *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), le risque de décès est supérieur à 64% comparé au risque pour les personnes atteintes d'une forme non résistante de l'infection. La résistance augmente également le coût des soins du fait de la prolongation des séjours à l'hôpital et des soins plus intensifs requis. La résistance aux antimicrobiens compromet la prévention et le traitement efficace d'un nombre croissant d'infections provoquées par des bactéries, des parasites, des virus et des champignons. Elle constitue une menace croissante pour la santé publique mondiale qui exige la prise de mesures à l'échelle de tous les secteurs gouvernementaux et de la société tout entière. La résistance aux antimicrobiens existe dans toutes les parties du monde ;
- *Klebsiella pneumoniae*, est une cause majeure d'infections nosocomiales telles que la pneumonie, les infections hématologiques ou celles contractées par les nouveau-nés et les patients des unités de soins intensifs. Dans certains pays, du fait de la résistance, les carbapénèmes sont inefficaces chez plus de la moitié des patients traités pour des infections à *Klebsiella pneumoniae* ;

- la résistance à l'un des médicaments antibactériens les plus largement utilisés pour le traitement des infections des voies urinaires dues à *E. coli*, – les fluoroquinolones – est très largement répandue. Dans les années 1980, lorsque ces médicaments ont été introduits pour la première fois, la résistance était quasiment nulle. Aujourd'hui, dans certains pays de nombreuses parties du monde, le traitement est désormais inefficace pour plus de la moitié des patients ;
- l'échec du traitement de dernier recours contre la gonorrhée, les céphalosporines de troisième génération, a été confirmé en Afrique du Sud, en Australie, en Autriche, au Canada, en France, au Japon, en Norvège, au Royaume-Uni, en Slovénie et en Suède. On estime à 106 millions le nombre de personnes infectées par le gonocoque chaque année (estimation de 2008) ;
- De nouveaux mécanismes de résistance apparaissent et se propagent à l'échelle mondiale. En 2012, on dénombrait 450 000 nouveaux cas de tuberculose multi résistante (tuberculose-MR). La tuberculose ultra résistante (tuberculose-UR) a été identifiée dans 92 pays. Les souches de tuberculose résistantes exigent des traitements beaucoup plus longs et moins efficaces ;
- La résistance à la précédente génération d'antipaludéens est très répandue dans la plupart des pays d'endémie palustre. La propagation, ou l'émergence dans d'autres régions, de souches du parasite résistantes à l'artémisinine pourrait compromettre les acquis importants de la lutte contre la maladie enregistrée récemment ;
- La résistance est une préoccupation émergente dans le traitement de l'infection à VIH, suite à l'élargissement rapide de l'accès aux médicaments antirétroviraux ces dernières années; des enquêtes nationales sont en cours pour détecter et surveiller la résistance. Fin 2011, plus de 8 millions de personnes recevaient un traitement antirétroviral contre le VIH dans les pays à revenu faible ou intermédiaire. Même si de bonnes pratiques programmatiques permettent de la maintenir à un minimum, on s'attend à ce qu'une résistance aux médicaments utilisés pour traiter le VIH apparaisse.

L'analyse des données provenant des enquêtes OMS visant les personnes ayant été récemment infectées par le VIH indique des niveaux croissants de résistance à la classe des inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) utilisés pour traiter le VIH. Cette augmentation est particulièrement remarquable en Afrique, où la prévalence de la résistance aux INTI a atteint 3,4% (IC 95%, 1,8-5,2%) en 2009. On n'a pas clairement établi que la résistance à d'autres classes de médicaments anti-VIH augmente. Sur 72 études de la résistance transmise du VIH aux médicaments conduites entre 2004 et 2010, 20 (28%) ont été classées comme entraînant une prévalence modérée (entre 5% et 15%) de la résistance. Les données disponibles suggèrent une association entre des niveaux plus élevés de couverture du traitement antirétroviral et des niveaux accrus de résistance du VIH aux médicaments ;

- Depuis 10 ans, les médicaments antiviraux sont devenus des outils importants dans le traitement de la grippe épidémique et pandémique. Plusieurs pays ont mis au point des orientations nationales concernant leur utilisation et ont stocké des médicaments pour se préparer à une pandémie. La nature en constante évolution de la grippe signifie que la résistance aux antiviraux évolue continuellement. En 2012, pratiquement tous les virus grippaux A en circulation chez l'homme étaient résistants aux médicaments fréquemment utilisés pour la prévention de la grippe (amantadine et rimantadine), tandis que la fréquence de la résistance à l'oseltamivir, inhibiteur de la neuraminidase, reste faible (1-2%). La sensibilité aux antiviraux est suivie de près dans le cadre du Système mondial OMS de surveillance et d'action.

I.2.1.LA RESISTANCE NATURELLE (Normak, 2002)

Quand l'information fait partie du patrimoine génétique de la bactérie, on parle d'une résistance naturelle. En effet, c'est un caractère qui touche toutes les bactéries de l'espèce considérée. Ainsi, *Klebsiella sp* produit naturellement des bêta-lactamases. Cette enzyme est présente dans l'espace périplasmique de la bactérie et conduit à la destruction d'antibiotiques comme les pénicillines A, avant que ceux-ci ne puissent atteindre leur cible bactérienne.

I.2.2.LA RESISTANCE ACQUISE (Goossens *et al.*,2006 ; Lozniewski *et al.*, 2010 ; Murphy ;2001 ; Rybak, 2004)

La résistance acquise est un caractère qui ne concerne que quelques souches d'une espèce donnée. Elle a été observée dès le début de l'antibiothérapie mais sa fréquence était initialement faible. Elle peut résulter d'une mutation d'origine chromosomique ou extra-chromosomique (les plasmides). Ainsi, l'antibiotique révèle la résistance acquise par mutation en éliminant les bactéries sensibles. Il existe trois types de mécanismes biochimiques pouvant intervenir chez les bactéries mutantes :

- la diminution de la perméabilité et l'éjection des antibiotiques hors de la bactérie grâce à un canal. Cet efflux conduit à une diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique ;
- la modification de la cible des antibiotiques ;
- la production d'enzymes inactivant les antibiotiques.

I.2.3.LES PLANTES MEDICINALES DANS LE TRAITEMENT DES INFECTIONS BACTERIENNES

L'utilisation des plantes supérieures à des fins thérapeutiques a eu un regain d'intérêt avec les premières recherches sur les propriétés antibactériennes des plantes pour tenter de donner une base scientifique à ces pratiques empiriques (Mela, 1950 ; Osborn, 1943 ; Loubaki *et al.*, 1999). Actuellement, l'intérêt pour la phytochimiothérapie se retrouve partout dans le monde (Paul *et al.*, 2012).

Les plantes synthétisent plus de 100 000 petites molécules dotées pour la plupart d'une activité antibiotique. En général, cette activité est inférieure à celle exercée par les antibiotiques d'origine microbienne (Tegos *et al.*,2002 ; Lewis *et al.*, 2006). Les concentrations requises pour exercer une activité antimicrobienne sont donc plus élevées pour les molécules isolées de plantes que pour celles issues de bactéries et de champignons.

I.3.LA FAMILLE DES MELIACEES

I.3.1.GENERALITES

La famille des Méliacées regroupe des arbres et arbustes dicotylédones. Elle compte plus de 50 genres et 1400 espèces (Nakatani *et al.*, 2001) distribués dans les régions tropicales et subtropicales. Les méliacées présentent un feuillage dépourvu de stipules et caduc, dont les feuilles sont alternées et pennées, composées et le plus souvent sempervirentes, elles ont une inflorescence rassemblée en thyrses ou en grappe ou en épis, elles sont, soit monoïques (fleurs mâles et femelles sur un même pied), soit dioïques (les fleurs mâles et les fleurs femelles sont sur des pieds différents), avec des petites fleurs actinomorphes et bisexuées ou unisexuées.

I.3.2.UTILISATIONS PHARMACOLOGIQUES DES MELIACEES

Plusieurs plantes appartenant à la famille des méliacées sont utilisées en médecine traditionnelle, parmi elles :

- l'espèce *Trichilia emetica* est utilisée en Afrique pour le traitement du paludisme, de la toux, de l'ulcère gastrique, des dysménorrhées, de l'asthme, de la cirrhose, des vers intestinaux. Elle est également utilisée contre l'empoisonnement, l'hépatite, l'hypertension artérielle, les infections de la peau et les infections buccales (Diallo, 2000) ;
- en Inde, l'espèce *Azadirachta indica* connu sous le nom de *Neem* à des propriétés bactéricides, fortifie les gencives, et a des vertus détoxiques, immuno-stimulantes, anti-inflammatoires, fébrifuges, bactéricides, fongicides, anti-virales, anti-diabétiques, vulnérinaires, vermifuges, anti-paludéennes et contraceptives. (Puri, 2003 ; Roger, 1992 ; Ermel *et al.*, 1986) ;
- *Turraea heterophylla* communément appelé "cure-dent gouro", est employé dans le traitement traditionnel de l'impuissance sexuelle en Côte d'Ivoire. (BOUA *et al.*, 2013) ;

- en Afrique, l'huile de *Carapaspp* est particulièrement recommandée en dermatologie pour soigner les douleurs ostéo-articulaires et les piqûres d'insectes, mais aussi pour traiter le cheptel contre les parasites. Par ailleurs, *Carapa procera* est utilisé comme anti-inflammatoire dans la médecine traditionnelle sénégalaise. (Natalie *et al*, 2009 ; Mbaye *et al*, 2013).

1.3.3. TRAVAUX PHYTOCHIMIQUES ET PHARMACOLOGIQUES ANTERIEURS SUR LES MELIACEES

1.3.3.1. Etudes phytochimiques antérieures

Plusieurs espèces de la famille ont déjà fait l'objet d'étude. Ainsi, diverses classes de composés chimiques ont été isolées à partir de différents organes des Méliacées. La synthèse des limonoïdes est caractéristique de la famille (Paritala *et al*, 2015). Le terme limonoïdes a été dérivé de la limonine, le premier tétranortriterpénoïde (produit de dégradation de squelette triterpénique) obtenu à partir des principes amers des agrumes (Roy *et al.*, 2006). Une étude chimique des écorces de la tige d'*Astrotrichilia parvifolia* provenant de Fénérive Est (déposée sous la référence 04.99 MJ/MDUL à l'Université d'Antananarivo) a révélé la présence de « shoreic acid » ou acide 20R, 24R-époxy-25-hydroxy-3,4-seco-5a-dammar-4(28)-en-3-oic appartenant à la famille des triterpénoides (Langlois, 2000). De nombreux genres appartenant à des familles de l'ordre des sapindales (Rutacées, Meliacées, Simaroubacées, Cneoracées) sont capables de dégrader profondément le squelette triterpénique. Les modifications principales sont une cyclisation (limonoïdes) ou une élimination de la chaîne latérale en C-17 (chez la plupart des quassinoïdes) ainsi qu'une ouverture oxydante du cycle D (quassinoïdes) et/ou du cycle A (limonoïdes). (Bruneton, 2009)

a) Les limonoïdes

Plus de 300 limonoïdes issus du métabolisme d'un 4,4,8-triméthyl-17-furanylstéroïdes sont actuellement décrits (Taylor, 1986; Champagne *et al.*, 1992). Celui-ci se forme à partir du Δ^7 -tirucallol (ou du Δ^7 - euphol) : l'ouverture d'un époxyde 7(8) permet la migration C-14->C-8 du méthyle et la genèse d'une insaturation 14(15) par départ d'un proton en 15 ; elle rend compte de la présence constante d'un hydroxyle en C-

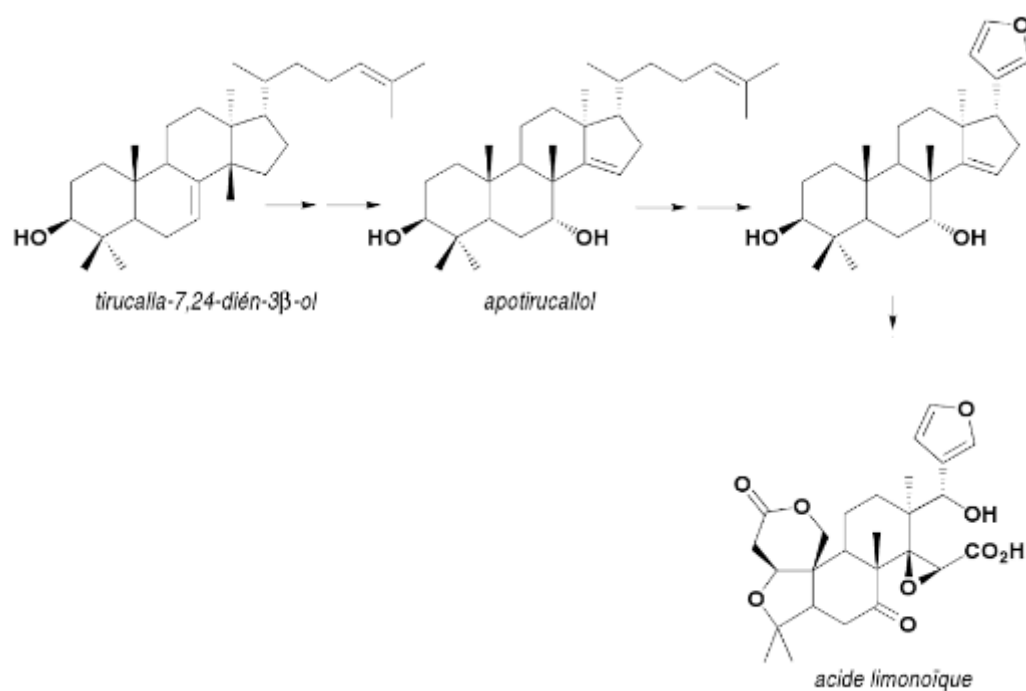


Figure 2: Synthèse des acides limonoïques (Bruneton, 2009)

On peut citer parmi les limonoïdes isolés des différents membres de la famille des Meliacées, l'azadirachtine (Figure 3) provenant d'*Azadirachta indica*. Cette molécule se comporte comme un facteur antinutritif à l'encontre des insectes. Par ailleurs et à faibles doses, l'azadirachtine, par une action complexe au niveau des régulations neuro-hormonales des insectes : elle induit un retard de croissance, une inhibition de la mue et des malformations. Divers produits insecticides renferment de l'azadirachtine et, éventuellement, de l'huile de graine d'*Azadirachta*.

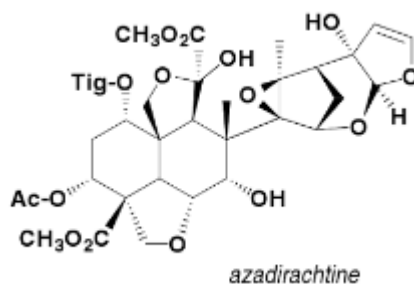


Figure 3: Structure chimique de l'Azadirachtine (Bruneton, 2009)

b) Le « Shoreic acid » (Langlois, 2000)

C'est une molécule (Figure 4) obtenue à partir de la purification de l'extrait hexanique des écorces de la tige d'*Astrotrichilia parvifolia*.

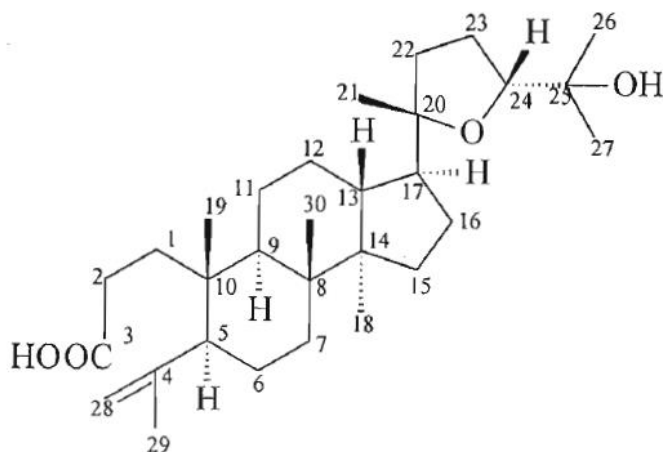


Figure 4: Structure du 20R, 24R-epoxy-25-hydroxy-3,4-seco-5a-dammar-4(28)-en-3-oic acid connu sous le nom de « shoreic acid ».

1.3.3.2. Etudes biologiques antérieures

De nombreuses activités des plantes appartenant à la famille des méliacées ont été démontrées scientifiquement. On peut citer entre autres :

- l'activité antiinflammatoire, antalgique, antioxydants et anti-radicalaire des extraits aqueux et hydro éthanolique des feuilles et des écorces de la racine de *Trichilia emetica* (Timbo, 2003),
- les activités antibactériennes et antifongiques des extraits méthanoliques de feuille d'*Azadirachta indica* (Mishra *et al.*, 2013), des extraits méthanoliques, éthanoliques, aqueux et l'extrait à l'éther de pétrole de feuille de *Melia azedarach* (Sen *et al.*, 2012), et des extraits aqueux et butanoliques des feuilles et des branches de *Walsura robusta* (Moreno *et al.*, 2004),

- l'activité antituberculeuse de l'extrait purifié de *Cabralea canjerana* (Leitao *et al.*, 2008),
- l'activité anti malaria des extraits de feuilles d'*Azadirachta indica* et des extraits d'écorces de *Cedrela odorata* (MacKinnon *et al.*, 1997).

1.3.4. INTERETS ECONOMIQUE

L'intérêt économique principal de la famille des méliacées est de fournir des bois d'œuvre de haute qualité : acajou d'Afrique (*Khaya grandifolia*, *Khaya ivorensis*,...), acajou de Honduras (*Swietenia macrophylla*) (Bruneton, 2009).

En Afrique de l'Ouest, l'huile de *Carapa* revêt une importance traditionnelle (Weber *et al.*, 2010). De plus, les arbres du genre *Carapa* sont utilisés en médecine traditionnelle en Amérique. Les écorces, les feuilles et les graines ont des usages multiples en pharmacopée et en cosmétique.

Les genres *Lansium*, avec l'espèce *Lansium domesticum* et *Aglaiia* fournissent des fruits comestibles.

Connu sous le nom de Neem, *Azadirachta indica* est une plante médicinale traditionnelle en Inde et une source d'insecticide (Puri, 2003 ; Roger, 1992 ; Ermel *et al.*, 1986).

La famille des Méliacées compte plusieurs plantes ornementales comme *Aglaiia*, *Azadirachta*, *Melia* et *Turraea*.

1.3.5. LE GENRE *Astrotrichilia*

Astrotrichilia est un genre d'arbres endémiques de Madagascar . Il est représenté par 12 espèces : *A. asterotricha*, *A. diegoensis*, *A. elegans*, *A. elliotii*, *A. masoalensis*, *A. parvifolia*, *A. procera*, *A. rakodomena*, *A. thouvenotii*, *A. valiandra*, *A. voamatata* et *A. zombitsyensis*.

Quelques plantes du genre *Astrotrichilia* ont déjà fait l'objet d'études chimique et/ou biologique. Parmi les molécules chimiques isolées on peut citer : (Mulholland *et al.*, 1996 ; Mulholland *et al.*, 1999 ; Mulholland *et al.*, 2000 ; Harinantenaina *et al.*, 2011 ; Paritala *et al.*, 2015)

- l'astrotricoumarine d'*Astrotrichilia* sp. Cette molécule inhibe *in vitro* la prolifération des cellules cancéreuses humaines de la lignée A 2780,
- les voamantins A, B, C et D provenant d'*Astrotrichilia voamatata*,
- et l'astrotrichilin isolée d'*Astrotrichilia asterotricha*.

I.4.LA PLANTE : *Astrotrichilia parvifolia*(Leroy *et al.*, 1996)

La classification de la plante est la suivante :

Règne	: PLANTAE
Embranchement	: TRACHEOBIONTA
Classe	: EQUISETOPSIDA
Sous-classe	: MAGNOLIIDAE
Super-ordre	: ROSANAE
Ordre	: SAPINDALES
Famille	: MELIACEAE
Genre	: <i>Astrotrichilia</i>
Espèce	: <i>parvifolia</i>

Astrotrichilia parvifolia est un arbre d'environ 10m de hauteur connue sous le nom de « Bibilahy » dans la commune d'Ambatolaona, « Etakoaka », « Hetakoaka », « Tavia » ou « Ramaindafa » dans la région de Perinet. Il se reconnaît aisément par ses folioles émarginées, coriaces, et par ses fleurs et fruits glabres.



Figure 5 : *Astrotrichilia parvifolia* : a) La plante ; b) feuilles et boutons floraux ; c) fruit

I.4.1.DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE D'*Astrotrichilia parvifolia*

On peut trouver la plante dans les forêts humides de Fianarantsoa, Mandraka, Moramanga, Mananara avaratra, Vavatenina, et de Fénérive-Est.



Figure 18: Répartition géographique d'*Astrotrichilia parvifolia*

Fonds de carte : www.madascope.com

I.4.2.UTILISATIONS EMPIRIQUES D'*Astrotrichilia parvifolia* (Rasolofonantenaina, 2012)

Une enquête ethnobotanique effectuée à Ambatolaona a permis de noter trois modes d'utilisation de cette plante :

- trois à quatre feuilles de cette plante sont mâchées, puis la mixture (broyat de feuilles et salive) est appliquée sur la plaie comme cicatrisant ;
- le filtrat de broyat de deux feuilles d'*Astrotrichilia parvifolia*, est appliqué quelques minutes au niveau de la dent cariée pour calmer la douleur ;
- l'infusion de feuilles (environ une poignée de feuilles dans deux litres d'eau bouillie), bue à raison de 20ml par prise, est utilisée comme vermifuge et pour tonifier le corps.

I.5.LES METABOLITES SECONDAIRES DES PLANTES

Tous les êtres vivants ont un métabolisme primaire qui fournit les molécules de base (acides nucléiques, lipides, protéines, acides aminés et glucides). Les plantes produisent, en plus, un grand nombre de composés qui ne sont pas issus directement lors de la photosynthèse, mais résultent des réactions chimiques ultérieures. Ces composés sont appelés **métabolites secondaires**. De nos jours, un grand nombre de ces composés sont utilisés en médecine moderne et une majorité de ceux-ci le sont selon leur usage traditionnel. Nous citerons ci-dessous quelques importants groupes phytochimiques, source de molécules biologiquement actives

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais représente une source importante de molécules utilisables par l'Homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (Jeaun *et al.*, 2005).

I.5.1.DEFINITION

L'ensemble des réactions chimiques qui se déroule dans un organisme vivant est appelé métabolisme.

Le terme «métabolite secondaire», qui a probablement été introduit par Albrecht Kossel en 1891,est utilisé pour décrire une vaste gamme de composés chimiques dans les plantes, qui sont responsables des fonctions périphériques indirectement essentielles à la vie des plantes telles que la communication intercellulaire, la défense, la régulation des cycles catalytiques.

Les deux principaux produits du métabolisme végétaux sont : (Peter *et al*, 2000)

- les métabolites primaires qui jouent un rôle essentiel dans la structure et le fonctionnement de la plante. Ceux-ci englobent des protéines, des lipides, des acides nucléiques et des hydrates de carbone immunomodulateurs ;

- les métabolites secondaires qui sont importants pour la survie et la propagation des plantes qui les produisent. Beaucoup fonctionnent comme signaux chimiques qui permettent à la plante de répondre aux contraintes de l'environnement. D'autres interviennent pour défendre leur producteur contre les herbivores, les pathogènes ou les compétiteurs. Certains assurent une protection contre les radiations solaires et d'autres encore facilitent la dispersion du pollen et des graines.

Les métabolites secondaires sont produits à différents endroits de la cellule et emmagasinés surtout dans les vacuoles. Ils sont souvent synthétisés dans une partie de la plante et stockés dans une autre. En outre, leur concentration dans la plante varie souvent dans des grandes proportions au cours d'une période de 24h (Peter *et al*, 2000 ; Badiaga, 2011).

Les métabolites secondaires sont présents dans toutes les plantes supérieures, et ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante dont plus de 200.000 structures ont été définies et sont d'une variété structurale extraordinaire mais sont produits en faible quantité. Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique.

I.5.2.CLASSIFICATION DES METABOLITES SECONDAIRES

Il y a trois classes principales de métabolites secondaires qui peuvent être subdivisés en plusieurs grandes familles (ces familles sont colorées en jaunes, dans la [figure 6](#) de la page 34, chez les plantes : les alcaloïdes, les terpénoïdes et les substances phénoliques (tanins, flavonoïdes, phénols, acides phénoliques, coumarines, lignanes, quinones) (Peter H R. *et al*, 2000). Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (Krief, 2003)

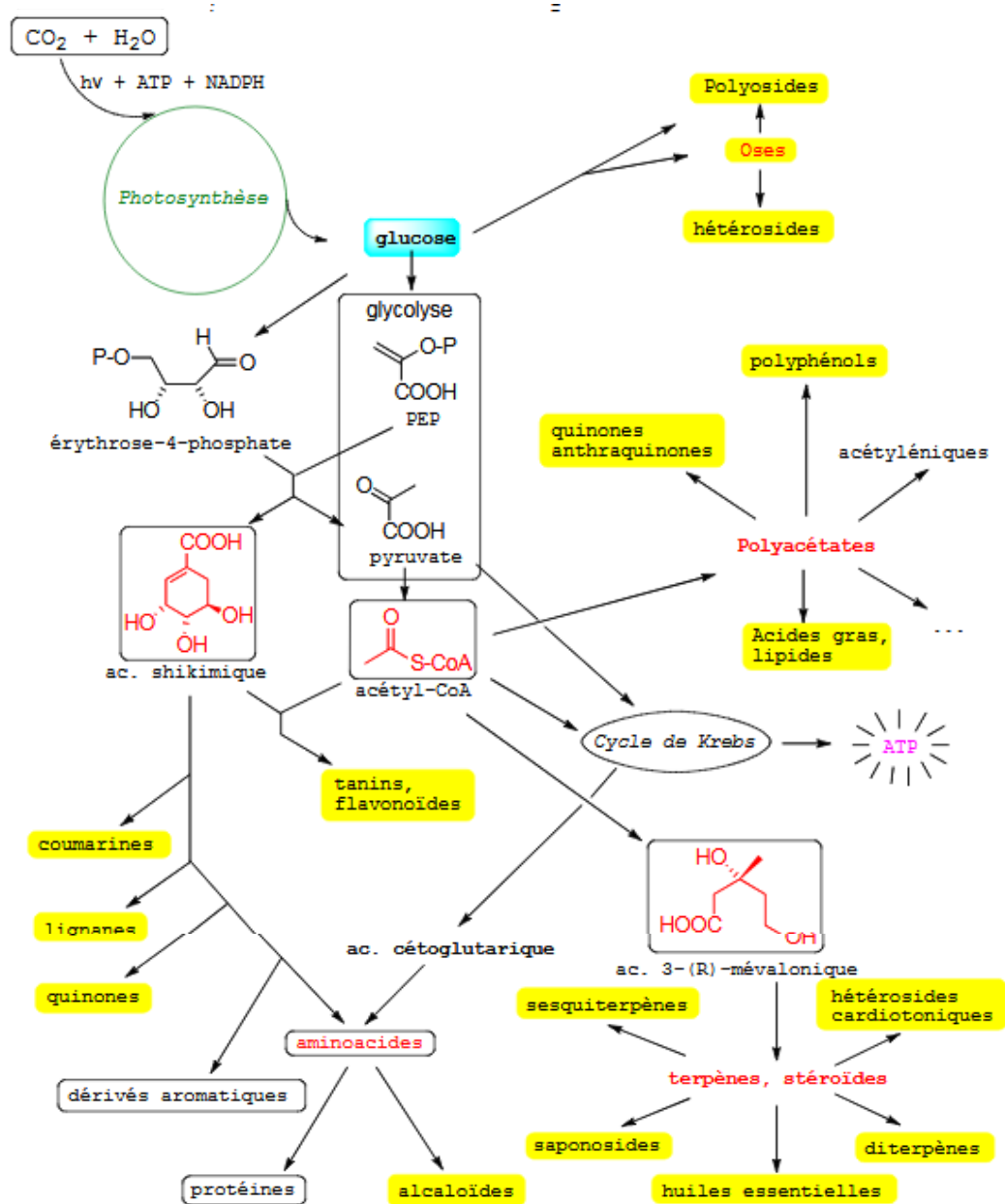


Figure 6 : Relations biogénétiques entre les principales classes de métabolites secondaires, sources de principes actifs (Vercauteren, 2011).

I.5.3.LES COMPOSES PHENOLIQUES

Les composés phénoliques constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. L'élément structural commun est la présence d'au moins un noyau aromatique lié à un groupement hydroxyle (libre ou engagé) (Macheix *et al.*, 2005). Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux voies biogénétiques différentes (Bruneton, 2009) : la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acide acétique (polyacétate).

I.5.3.1.Les tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variée, de saveur astringente ayant en commun la propriété de tanner la peau c'est-à-dire de se lier entre les fibres de collagène de la peau, conférant à cette dernière une résistance à l'eau, à la chaleur et à l'abrasion. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000Da (Paris et Hurabielle., 1981). Les tanins sont très répandus dans le règne végétal, mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les Fagacées, les rosacées. Ils peuvent exister dans divers organes: l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines. Un des tanins de base est l'acide gallique.

Ils précipitent (agglutiner, coaguler) les protéines et la gélatine ce qui est beaucoup plus rare. En outre, ils sont utilisés en cas d'empoisonnement par des alcaloïdes, car ils les précipitent et les rendent inoffensifs (sauf pour la morphine, la cocaïne et la nicotine, pas d'interaction). Mais si on force la dose, l'excès de tanin libère à nouveau la substance toxique et cause une deuxième inflammation. Ils emprisonnent aussi les sels des métaux lourds (plomb, mercure, mais pas efficace dans la dépose des amalgames). Les tanins ont des effets astringents (très proche d'assécher), très utiles quand il y a trop de sécrétions (les bronchites, les diarrhées, les leucorrhées, les plaies saigneuses, très grand antihémorragique antiseptique). Les plantes à tanins sont utilisées en tant que vulnéraire (blessure), pour les plaies ouvertes (pas pour des bleus, des coups) car elles permettent aux plaies de se refermer. Les effets secondaires des tanins, au minimum ils dessèchent et au maximum, ils peuvent entraîner des lésions de la muqueuse gastrique et intestinale mais aussi ils peuvent blesser les reins (période de disette). Ils gardent en eux les principes actifs des plantes. Les plantes riches en tanins auront une action plus lente, passeront moins vite dans la circulation générale et la barrière intestinale.

I.5.3.2. Les flavonoïdes

I.5.3.2.1. Définition

Ce sont des substances polyphénoliques responsables de la couleur variée des fleurs et des fruits, ils sont généralement répandus dans toutes les parties des végétaux supérieurs (Pietta, 2000; Ghedira, 2005).

Les flavonoides sont des dérivés du phenylpropane avec une composition de base C6-C3-C6 avec C6 qui représente un noyau benzénique. C'est une famille très vaste, comptant plus d'une douzaine de classes différentes les unes des autres par la variation et le degré d'oxydation du cycle C. (Figure 7a, page 37)

Au sens strict ce sont des composés de type benzo- γ -pyrone dont la substitution par un noyau benzénique se fait en position 2. Les composés présentant une substitution en position 3 sont désignés par le terme isoflavonoïdes (Bruneton, 1999 ; Erlund, 2004). (Figure 7, page 37)

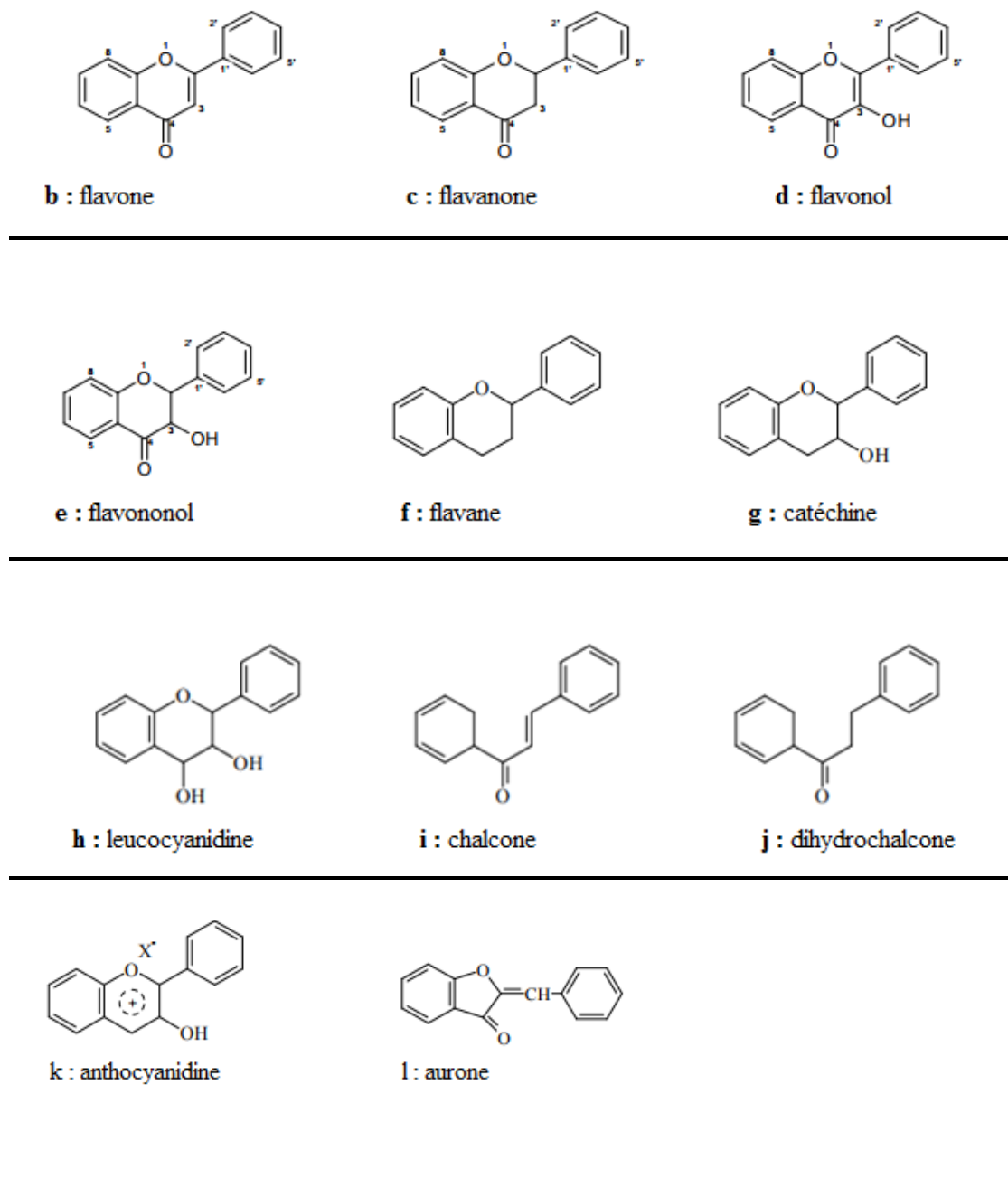


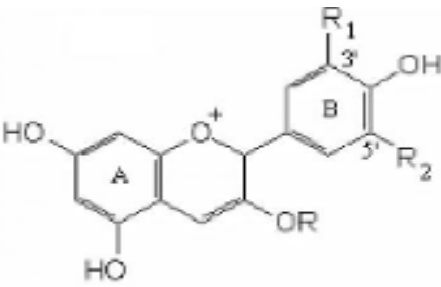
Figure7: Structures des flavonoïdes

I.5.3.2.2. Rôle des flavonoïdes

Ils entrent dans la composition de nombreux pigments végétaux et en particulier les pigments jaunes et orange (calendula) et aussi dans les pigments bleus (le bleuet, grand antispasmodique de la face et surtout des yeux). Les plantes qui contiennent des flavonoïdes sont souvent liées à la fonction antispasmodique.

I.5.3.2.3. Les anthocyanidines-anthocyanines

Les anthocyanidines-anthocyanines sont des polyphénols qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange, ce sont les flavonoides les plus colorés. Leurs structures de base sont caractérisées par un noyau "flavone" généralement glycosylé en position C3. Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment (Figure 8).

	Anthocyanidines R=H	R1	R2
	Malvidine	OCH3	OCH3
	Péonidine	OCH3	H
	Delphinidine	OH	OH
	Pétunidine	OCH3	OH

Si la forme est monoglucoside: R= glucose

Figure 8: Structure de quelques anthocyanidines

Le pH est un facteur important dans le changement de couleur des anthocyanes. La variation de structure de l'anthocyane en fonction du pH est une particularité de ces molécules. Les observations visuelles d'une solution aqueuse d'anthocyane montrent la forte coloration rouge d'une solution à pH très acide, la coloration décroît quand le pH augmente vers la neutralité. Une solution neutre d'anthocyane fraîchement préparée est bleue mais se décolore rapidement.

Une étude épidémiologique dans divers pays a montré que la consommation de vin rouge qui contient des quantités importantes de flavonoïdes, d'anthocyanes et de procyanidines pourrait être à l'origine d'une réduction du risque de mortalité due aux maladies cardiovasculaires.

A forte dose, les anthocyanes sont des poisons apparentés au cyanure. Ce sont des dérivés de l'acide cyanhydrique (produit de la combinaison de l'hydrogène avec le cyanogène). Des anthocyanes, à dose modeste, dans une plante donnera des vertus antiseptiques à celle-ci. On les trouve dans les fleurs bleues (bleuet, violette, mauve).

I.5.3.2.4. Les leucocyanidines

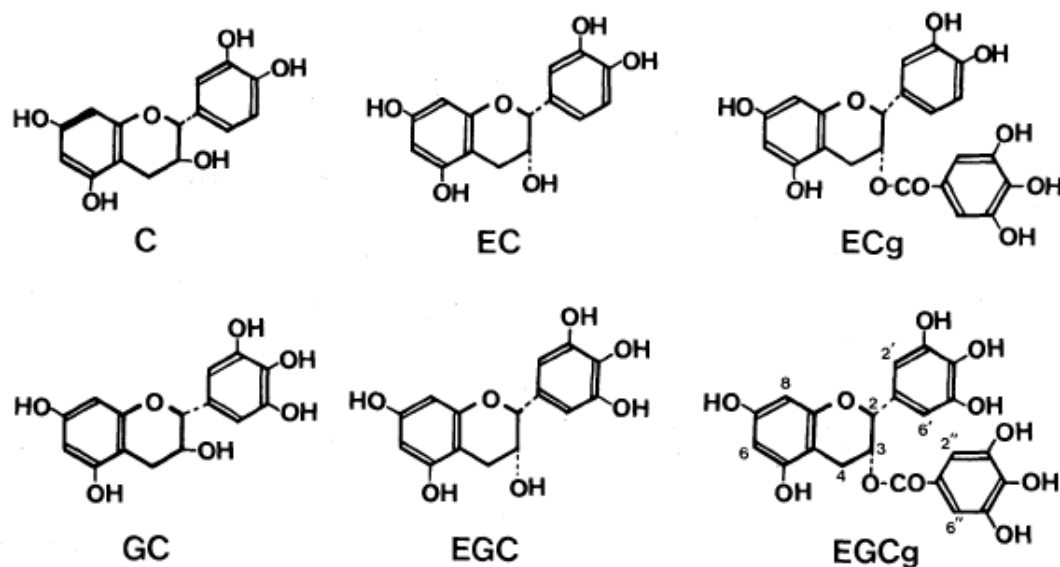
Les leucocyanidines (flavan-3,4-diols ou 2-phényl-3,4-dihydro-2H-chromène-3,4-diol) sont des polyphénols naturels appartenant à la classe de bioflavonoïdes. (Haslam, 1989 ; Ranganna, 1986). Les leucocyanidines sont constitués par un nombre variable d'unités flavines et ils donnent une anthroce après chauffage en milieu acide.

Les leucocyanidines sont utilisés dans le traitement des maladies vasculaires comme la fragilité capillaire, l'insuffisance veineuse chronique périphérique et la micro-angiopathie de la rétine. (Robert *et al.*, 1990).

I.5.3.2.5. Activités biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont couramment consommés sous forme de fruits, légumes et boissons tel que le vin et le thé. Ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes, vasculo-protectrices, anti-hépatotoxiques, anti-inflammatoires, anti-ulcéreuses et même anti-tumorales significatives (Wensen *et al.*, 2004 ; Youdim *et al.*, 2002 ; Asongalem. *et al.*, 2004 ; Middleton, 2000 ; David *et al.*, 1998 ; Villar *et al.*, 1987 ; Rice-Evans, 2001)

Des propriétés antibactériennes et antivirales des flavonoïdes vis-à-vis de différentes souches ont été mises en évidence. En effet, il a été constaté que les extraits du thé vert du Japon contiennent plusieurs polyphénols qui inhibent la croissance de *Streptococcus mutans*, une bactérie cariogène. Plusieurs substances phénoliques y ont été isolées (Figure 9, _____page 40). (Senji Sakanaka *et al.*, 1989).



C : catechin; EC : epicatechin; GC : galocatechin; EGC : epigallocatechin;

ECg : epicatechin gallate; EGCg : epigallocatechin gallate

Figure 9 : Structure des polyphénols à activité antibactérienne isolés du thé vert du Japon (Senji Sakanaka *et al*, 1989)

Des extraits de la famille des flavonoïdes qui manifestent *in vitro* des propriétés anti-HIV sont contenus dans une plante nommée scientifiquement *Monotes africanus*, on peut citer entre autres le 6,8-diprénylaromadendrine et le Bonaniol A (Figure 10) (Meragelman *et al.*, 2001).

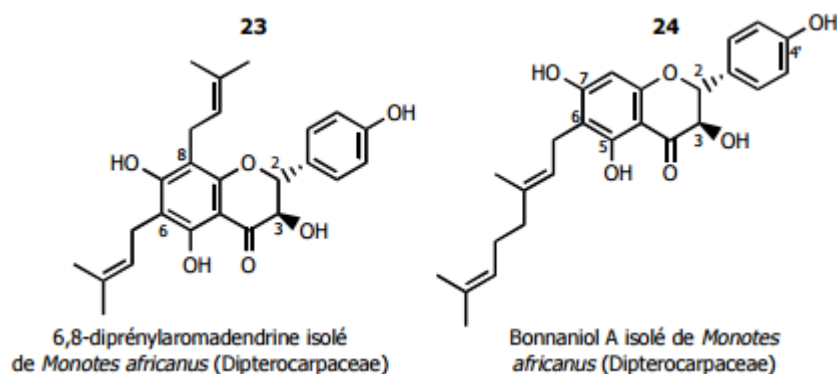
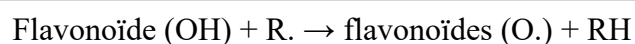


Figure 10: Exemples de flavonoïdes isolés de l'extrait organique de *Monotes africanus* (Meragelman *et al.*, 2001)

Les flavonoïdes atténuent le pouvoir infectieux ou affectent la réplication intracellulaire d'autres virus tels que le virus respiratoire syncytial (VRS), l'herpès simplex virus (HSV) et les adénovirus (Serkedjieva, 1998 ; Gonçalves, 2001). Ce sont des inhibiteurs enzymatiques à l'égard de l'aldose réductase, de la phospholipase A2, et des enzymes de l'inflammation: la cyclooxygénase et la lipooxygénase (Varma *et al.*, 1976, Fernández *et al.*, 2005, Gil *et al.* 1994 ; Kim *et al.*, 2001 ; Laughton *et al.*, 1991 ; Havsteen, 2002 ; Sadik *et al.*, 2003 ; Redrejo-Rodriguez *et al.*, 2004)

La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur capacité à piéger les radicaux libres selon la réaction suivante: (Rice-Evans *et al.*, 1996 ; Bors *et al.*, 1997 ; Cao *et al.*, 1997 ; Korkina *et al.*, 1997 ; Harbone *et al.*, 2000 ; Montoro *et al.*, 2005 ; Burda *et al.*, 2001 ; Catapano *et al.*, 1997 ; Hanasaki *et al.*, 1994)



Les radicaux libres apparaissent sous plusieurs formes, telles que:

- l'anoxie : qui engendre la production de l'anion superoxyde (O_2^-),
- l'inflammation : qui correspond à la production d'anions superoxydes (O_2^-) avec la NADPH oxydase membranaire des leucocytes activés (Catapano *et al.*, 1997),
- l'auto-oxydation des lipides : c'est au cours du stress oxydant que les espèces radicalaires, libres de tout contrôle, vont attaquer des cibles bioactives telles que les protéines, altérant ainsi les récepteurs cellulaires et les enzymes, les acides nucléiques (favorisant la survenue des mutations délétères à l'origine de divers cancers) et les lipides.

Les flavonoïdes inactivent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif. Ils sont capables de chélater les ions métalliques (largués à partir de leurs protéines de fixation ou de transport) qui peuvent renforcer ces effets délétères par la production des radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$). En tant qu'anti-oxydants, ils inhibent l'angiogenèse, la prolifération cellulaire et affectent le potentiel invasif et métastatique des cellules tumorales (Rice-Evans *et al.*, 1996).

I.5.4.LES TERPENOÏDES ET LES STEROÏDES

a) Les terpénoïdes sont des substances généralement lipophiles, formés par la réunion d'unités pyrophosphates isopenténoides à cinq carbones provenant de la voie de l'acide mévalonique (Judd et al., 2002 ; Hopkins, 2003). Leur grande diversité trouve son origine dans le nombre d'unités de base qui composent la chaîne ainsi que dans les divers modes d'assemblage (Figure 11). La famille des terpènes comprend des hormones, des pigments caroténoides, des stérols, des dérivés de stérols ainsi qu'une grande partie des huiles essentielles qui confèrent aux plantes leur parfum ou leur goût (Hopkins, 2003).

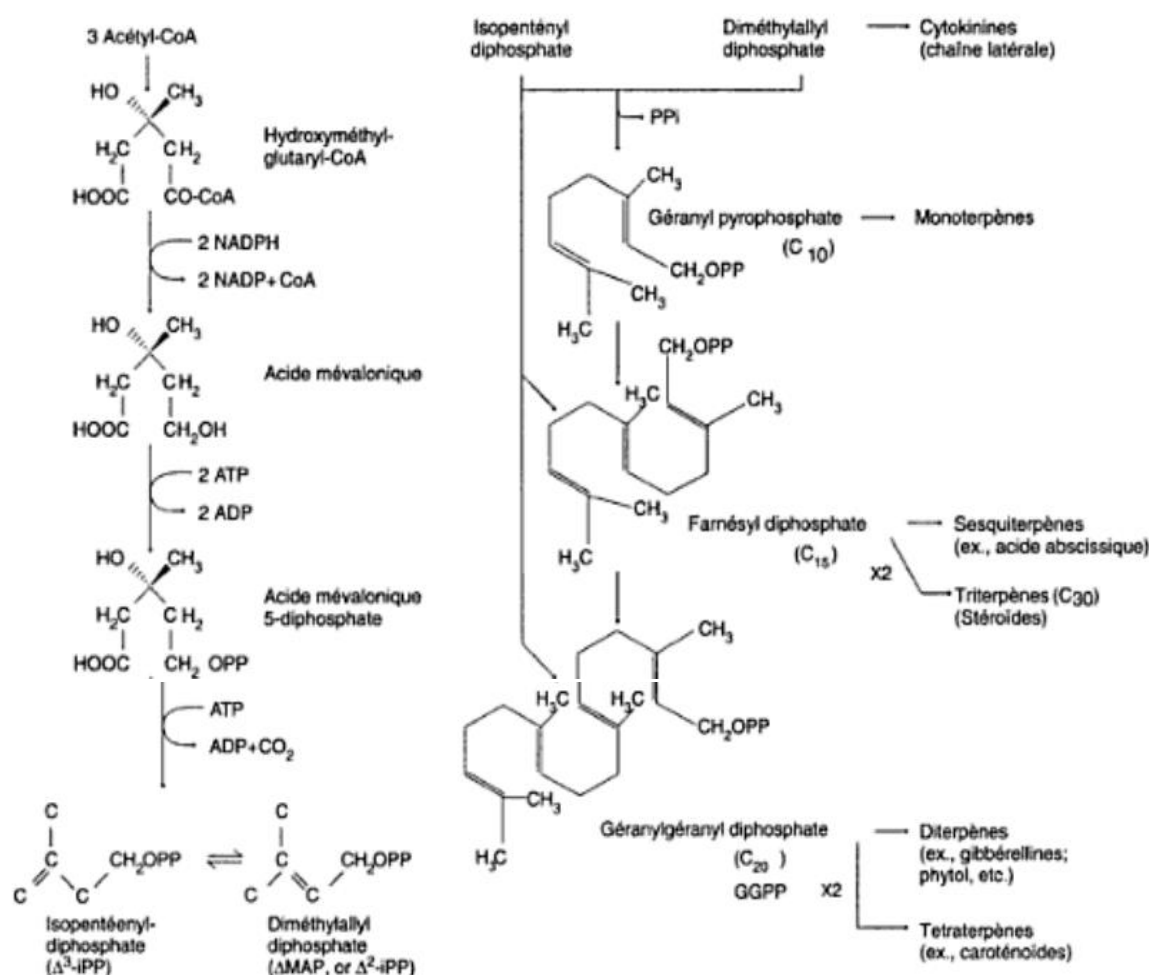


Figure11: Voie de l'acide mévalonique et synthèse des terpénoïdes (Hopkins, 2003)

b) Les saponosides constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux. Ils sont caractérisés par leurs propriétés tensioactives car ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes (Bruneton, 2009). Ils sont principalement produits par les plantes mais aussi par les organismes marins. Structuralement, les saponines peuvent être classés en deux groupes selon la nature de la génine: les saponines à génines triterpéniques tétracycliques ou pentacycliques (figure 12), de loin les plus nombreux existant chez les angiospermes dicotylédones et chez certains animaux marins et celles à génines stéroïdiques (figure 13, page 44), presque exclusivement présentes chez les angiospermes monocotylédones (Bruneton, 2009).

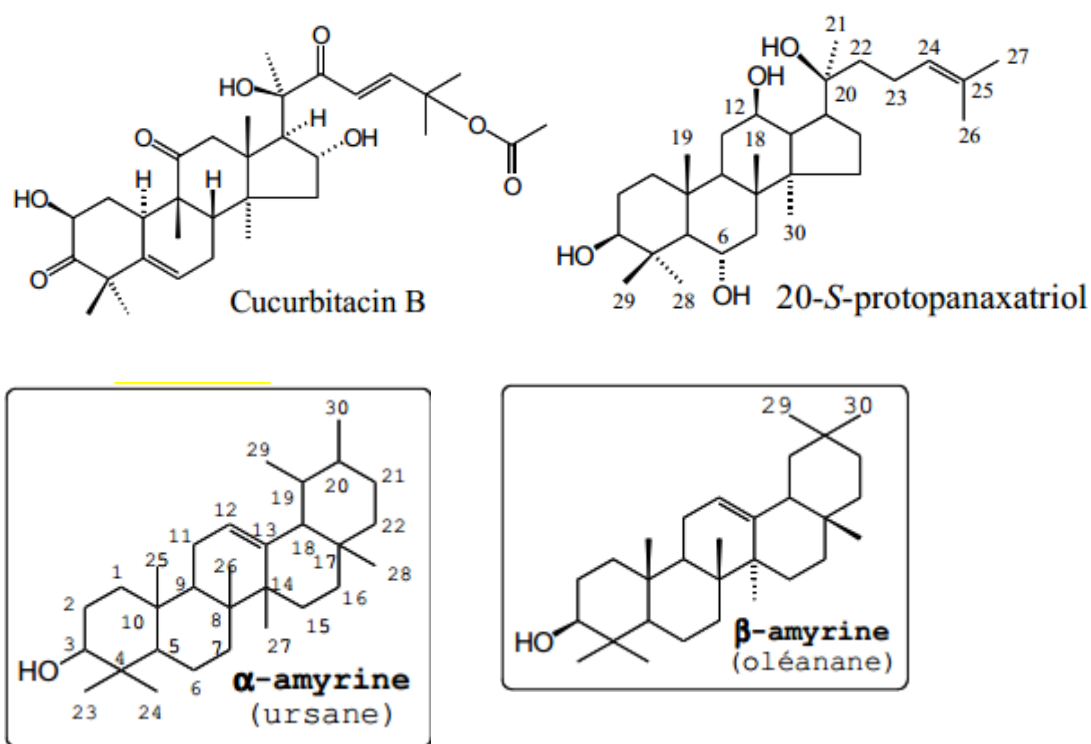


Figure 12: Structure des saponosides triterpéniques tétracycliques (en haut) et pentacycliques (en bas) (Vercauteren, 2011)

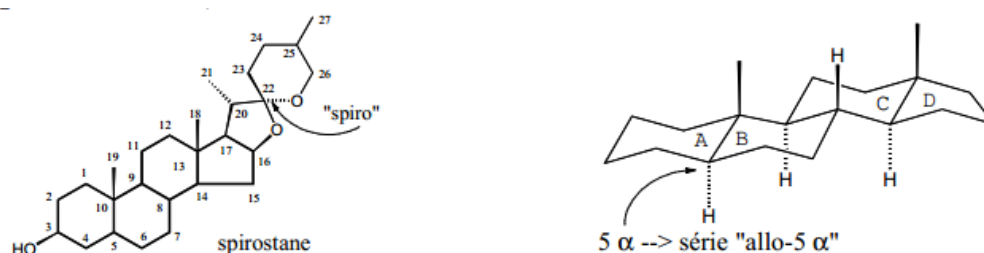


Figure 13 : Structure des saponosides stéroïdiques (Vercauteren, 2011)

Les saponosides possèdent des propriétés biologiques et pharmacologiques diverses. On peut citer entre autres des activités antimicrobiennes, molluscicides, anti-inflammatoires, antifongiques, antiparasitaires, cytotoxiques, antitumorales, immunostimulantes et immunomodulatrices. Depuis quelques années, des recherches sur des saponines mentionnent également des activités antiapoptotiques sur différents types de cellules telles que: Jurkat (lymphocytes T humains leucémiques), teratocarcinome F9, hépatocytes humains, SK-HEP-1, macrophages des tissus périphériques (Park *et al.*, 2011).

I.5.5.LES ALCALOÏDES (Zenk *et al.*, 2007 ; Roberts et Wink, 1998)

Ce sont des molécules à bases azotées, le plus souvent hétérocycliques, très majoritairement d'origine végétale. Les alcaloïdes constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec près de 10 000 à 12 000 différentes structures.

Parmi les alcaloïdes, on distingue des substances toxiques (comme la stychnine ou l'aconitine), des molécules employées dans la médecine pour leurs propriétés analgésiques (comme la morphine ([figure 14](#), page 45) et la codéine), dans le cadre de protocole de sédation (anesthésie, atropine ([figure14](#))) souvent accompagnés des hypnotiques, ou comme agents antipaludéens (quinine ([figure14](#)), chloroquinine) ou agents anticancéreux (taxol ([figure14](#)), vinblastine, vincristine).

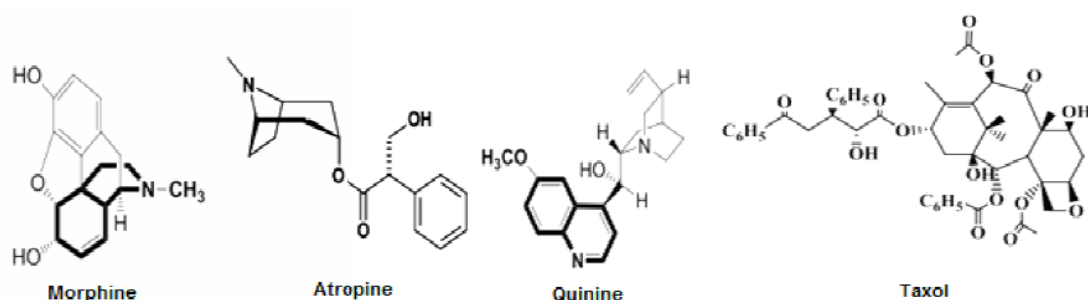


Figure 14 : Structures de quelques Alcaloïdes

I.5.6.FONCTION DES METABOLITES SECONDAIRES

I.5.6.1.Fonctions pour la plante

a)La coopération avec les animaux

Certains métabolites secondaires interviennent comme des moyens de signalisation et d'interaction entre les plantes et les animaux disséminateurs ou pollinisateurs (Exemple dans les mécanismes d'attraction des animaux : monoterpènes parfumées, anthocyanes de couleur ou de caroténoïdes dans les fleurs). D'autres, participent à la dispersion des graines et des insectes pollinisateurs par l'intermédiaire de couleurs et d'odeurs.

b) Lutte contre la compétition avec d'autres plantes

Ils participent à des réponses allélopathiques telle la compétition entre les plantes pour la germination et croissance au moyen de toxicité, qui empêchent la croissance des autres plantes compétitrices.

c) Protection de l'attaque des pathogènes ou des herbivores

Il y a plus de 100ans, Ernst Stahl a montré expérimentalement que les métabolites secondaires servent de composés de défense contre les escargots et autres herbivores (Wink, 2003)

I.5.6.2. Rôle pour l'Homme

Des intérêts multiples des métabolites secondaires sont mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. Ces composés sont aussi illustrés en thérapeutique (Bahorun, 1997).

a) **En médecine** les métabolites secondaires font la base des remèdes pour l'Homme:

- en urologie, dermatologie, gastrites aiguës, toux, ulcères d'estomac, laxatifs, sommeil et désordres nerveux ;
- pour les systèmes cardiovasculaires, ex : Flavoc, un médicament constitué par la flavone non substituée en combinaison avec la rutine et isoquercétine, est utile dans le traitement de l'athérosclérose ;
- comme drogues immunostimulantes, antispasmodiques et anti-inflammatoire provenant de *Melaleuca alternifolia* et *Echinacea angustifolia*. (Svoboda et Hampson, 1999 ; Pedneault *et al.*, 2001 ; Amjad Hossain, 2005) ;
- contre le diabète (*Azadirachta indica*) (Amjad Hossain, 2005) ;
- dans les maladies du stress, ces métabolites ont une activité antioxydante, tels le thé noir, le thé vert et le cacao sont riches en composés phénoliques, parmi lesquels theaflavine, le resveratrol, le gallate et epigallocatechine procyanidine (Lee *et al.*, 2003).
- Comme ayant des activités antibactériennes, antifongiques, antivirales et antiparasitaires. Depuis des périodes très anciennes les substances naturelles ont joué un rôle important dans la découverte de nouveaux agents thérapeutiques tels la quinine "Cinchona" obtenue à partir du quinquina qui a été avec succès employée pour traiter la malaria.

b) **En Agriculture**, les huiles de l'arbre d'*Azadirachta indica* ont des utilisations dans le contrôle de divers insectes et nématodes (vers parasites).

c) **En alimentation**, les épices et les herbes aromatiques contenant divers métabolites sont responsables des plaisirs de la table, considérés comme condiments et aromates, et utilisés comme suppléments diététiques (Mohammedi, 2006).

d) **En cosmétique**, les produits de beauté, les parfums, les articles de toilette et les produits d'hygiène (Mohammedi, 2006).

I.6.LE STRESS OXYDATIF ET LES PLANTES

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants (Pincemail *et al.*, 1999).

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan. L'efficacité des médicaments tels que les antioxydants, les polyphénols et surtout les flavonoïdes a été démontrée. Ce sont des antioxydants puissants susceptibles d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules (Van acker *et al.*, 1995 ; Iserin, 2001).

Le stress oxydatif est impliqué dans un large spectre de maladies qui ont un impact énorme sur la santé des populations. Des essences ligneuses extraites de *Spondias mangifera*, *Garcinia kola*, *Manniophyton fulvum*, *Persea americana*, *Psidium guajava*, *Theobroma cacao*, *Citrus spp.* (Sallé *et al.*, 1998 ; Dibong *et al.*, 2011) sont largement utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement d'un large spectre de maladies liées au stress oxydatif (Evans, 2005 ; Dibong *et al.*, 2009)

I.6.1.GENERALITES SUR L'OXYDATION ET LES ANTIOXYDANTS

L'oxydation est le phénomène qui fait rouiller les métaux, qui fait flétrir les légumes et les fruits, rancir les graisses. Il modifie le goût et la couleur des aliments. L'organisme humain subit également le phénomène d'oxydation, mais un énorme système de défense est en permanence en place, avec des systèmes enzymatiques et/ou des systèmes dégénératifs de complexe mettant en jeu par exemple l'acide ascorbique (vit C) ou le glutathion pour lutter contre les altérations.

Les antioxydants sont définis comme «toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat» (Pastre et Priymenko, 2007 ; Halliwell *et al.*, 1987). Ils piègent les radicaux libres en inhibant les réactions à l'intérieur des cellules provoquées par les molécules de dioxygène et de peroxyde, aussi appelées espèces oxygénées radicalaires (EOR) et espèces azotées radicalaires (Benbrook, 2005).

Les antioxydants sont largement présents dans nos aliments, soit sous forme naturelle, soit sous forme d'additifs utilisés dans l'industrie agroalimentaire (Tanguy *et al.*, 2009). Ce sont des composés qui peuvent inhiber ou retarder les dommages oxydatifs et protègent contre de nombreuses maladies (Akshatha *et al.*, 2015). Ce sont des molécules capables d'interagir avec les radicaux libres en empêchant la propagation des réactions en chaîne d'oxydation (Charles, 2013). Les principaux antioxydants sont: la vitamine C et E, les caroténoïdes, les polyphénols et les enzymes endogènes (superoxyde dismutase et la catalase). Chez les individus en bonne santé, il existe un équilibre entre le système de défense antioxydant naturel et les espèces réactives de l'oxygène (R.O.S) produites par le corps. Lorsque cet équilibre est perturbé, les R.O.S peuvent causer des lésions cellulaires et induire des dommages oxydatifs au niveau des protéines, lipides, ADN et ARN (Park, 2011).

I.6.2. CONSEQUENCES DU STRESS OXYDATIF CHEZ L'HOMME

Les R.O.S produits lors du stress oxydant, vont oxyder les acides gras polyinsaturés, présents dans les lipides membranaires, c'est ainsi qu'une altération de leur fonctionnalité aura lieu (modification de leur perméabilité, de leur fluidité, perte d'activité d'enzymes, de récepteurs...). De même, l'oxydation des cardiolipines de la mitochondrie est un facteur déterminant dans le déclenchement de l'apoptose des cellules (Nakagawa, 2004). Les lipoprotéines telles que les LDL, riches en cholestérol et en phospholipides sont également des cibles privilégiées de la peroxydation lipidique. Elles sont fortement incriminées dans l'athérogenèse. De nombreuses autres pathologies, comme les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), le diabète, les cancers et les maladies inflammatoires sont associées à la peroxydation des lipides.

CHAPITRE II :

ETUDE CHIMIQUE

II.1.INTRODUCTION

A part l'étude systématique de la plante effectuée par Leroy et Lescot (1996) ainsi que l'étude chimique des écorces de la tige effectuée par Langlois (2000), aucune étude approfondie n'a été faite jusqu'à nos études préliminaires (Rasolofonantenaina, 2012) sur les feuilles d'*Astrotrichilia parvifolia* (Meliaceae). Ainsi, dans le cadre de l'étude chimique des principes actifs de cette plante, nous avons établi un plan de recherche axé sur les points suivants :

- extraction à chaud des principes actifs au soxhlet à partir de la poudre de feuilles ;
- fractionnement et purification de l'extrait brut par des techniques de chromatographie permettant d'obtenir un extrait suffisamment purifié ;
- caractérisation physico-chimique de substances actives et détermination de leur nature chimique.

II.2.MATERIELS ET METHODES

II.2.1.COLLECTE ET PREPARATION DU MATERIEL

Les feuilles d'*Astrotrichilia parvifolia* ont été récoltées à Andranomena dans la commune d'Ambatolaona située à 50km d'Antananarivo (Coordonnées géographiques S : 18°59'03,8" ; E : 047°56'03,6" ; Alt : 902m). La collecte a été effectuée aux mois d'Avril 2011, période où la plante a été au stade végétatif. La détermination botanique a été réalisée au FOFIFA Ambatobe, service des eaux et forêts de Madagascar où un échantillon d'herbier a été déposé sous les références 20-R-.10.

Les feuilles de plantes sont étalées dans une chambre bien sèche jusqu'à leur séchage effectif. Elles sont ensuite broyées à l'aide d'un broyeur électrique. Les poudres obtenues sont conservées à température ambiante dans des flacons sombres.

II.2.2.LES PRODUITS CHIMIQUES

Dans notre laboratoire, les produits chimiques, c'est-à-dire les réactifs et solvants utilisés sont de qualité pour analyse et de marque MERCK ou PROLABO. Les supports chromatographiques utilisés sont :

- des plaques de gel de silice (MERCK) 60F254, d'épaisseur 0,2 mm, étalé sur une feuille en plastique de dimensions 20x20cm, immédiatement utilisables ;
- un gel réticulé de dextrane (Sephadex® LH-20).

II.2.3.EXTRACTION

II.2.3.1.Extraction à chaud au Soxhlet (Sukhdev et al., 2008)

L'extraction consiste à l'épuisement d'un ou de plusieurs principes actifs contenus dans notre matériel végétal par des solvants de polarité croissante. Ainsi, la poudre est dépigmentée par l'utilisation de l'hexane. Les produits moyennement polaires sont ainsi attirés par l'acétate d'éthyle. Les composés les plus polaires sont extraits par le méthanol. Les extraits obtenus sont séchés sous vide.

II.2.3.2.Préparation des extraits pour la détermination des familles chimiques

Les extraits sont préparés :

- soit à partir de la poudre de feuilles,
- soit à partir du résidu d'évaporation à sec de la solution à analyser.

II.2.3.2.1.Extrait acide

Dans un tube à essai, 2ml d'acide chlorhydrique (HCl) 2N sont ajoutés à 500mg de poudre de feuilles ou de résidu sec. Le mélange est laissé macérer à +4°C pendant 12h puis filtré. Le filtrat obtenu constitue l'extrait acide servant à détecter les alcaloïdes

II.2.3.2.2.Extrait hydroéthanolique

La poudre ou le résidu sec (500mg) est mis en suspension dans 10ml de mélange hydroéthanolique 75%. Après macération pendant une nuit, une filtration conduit à l'obtention d'un extrait hydroéthanolique permettant la détection des flavonoïdes et des leucoanthocyanes.

II.2.3.2.3.Extrait aqueux

Dans un tube à essai, 500mg de poudre ou de résidu sec sont délayés dans 10ml d'ED. Le mélange est porté à ébullition pendant 30min puis mis à macérer à +4°C pendant 12h. L'extrait aqueux obtenu après filtration est utilisé pour détecter les iridoïdes, les saponosides, les tanins et polyphénols, les désoxyoses ainsi que les quinones.

II.2.3.2.4.Extrait chloroformique

La poudre ou le résidu sec (500mg) est mélangé(e) avec 3ml de chloroforme. Le tube est hermétiquement fermé et la suspension est laissée macérer à +4°C pendant au moins 12h. L'extrait chloroformique est obtenu après filtration de la suspension. Cet extrait est utilisé pour détecter les stéroïdes et les triterpènes.

II.2.4.FRACTIONNEMENT ET PURIFICATION PARTIELLE PAR CHROMATOGRAPHIE

Les molécules chimiques contenues dans l'extrait méthanolique (MeOH) obtenu précédemment sont fractionnées par chromatographie d'exclusion. Les fractions obtenues sont soumises à un test antibiogramme et d'homogénéité en chromatographie sur couche mince (CCM, voir technique plus bas) et à un criblage des familles chimiques.

II.2.4.1.Historique de la chromatographie

La chromatographie (du grec *chroma*: couleur et *graphein*: écrire) a été inventée par le botaniste Mikhail Tswett au début du XXème siècle. Une colonne de CaCO₃ a permis de séparer des pigments végétaux (chlorophylles et xanthophylles). Par adjonction de solvants, des bandes colorées ont été obtenues et se sont déplacées le long de la colonne à des vitesses propres. Les biochimistes Martin et Synge (Prix Nobel de chimie en 1952) ont, par la suite, beaucoup participé au développement de la chromatographie moderne (comme la publication de la chromatographie de partage sur gel de silice en 1941, l'invention de la chromatographie de partage sur papier en 1944, la mise au point de la chromatographie en phase gazeuse pour séparer des mélanges d'acides et d'amines en 1948, ...).

II.2.4.2.Définition

La chromatographie est une technique dans laquelle les constituants d'un mélange se séparent en fonction des vitesses auxquelles ils sont entraînés à travers une phase stationnaire par une phase mobile.

La phase stationnaire est une phase qui reste en place, soit dans une colonne, soit sur une surface plane.

La phase mobile est une phase qui se déplace sur ou à travers la phase stationnaire, entraînant l'analyte avec elle.

L'élution est un processus au cours duquel les analytes sont entraînés à travers la phase stationnaire par le mouvement de la phase mobile.

Un chromatogramme est le graphique d'une fonction de la concentration de l'analyte en fonction du temps (ou volume) d'élution.

II.2.4.3. Chromatographie sur colonne ouverte à basse pression **(Chromatographie d'exclusion)**

La colonne utilisée est remplie d'un gel réticulé de dextrane (Sephadex® LH-20).

Le Sephadex LH20 est un gel de séparation qui possède des propriétés lipophiles et hydrophiles. Le caractère lipophile de ce gel réticulé de dextrane dérive de la présence des groupements isopropyles obtenus par hydroxypropylation du Sephadex G-25. Son caractère hydrophile est dû aux nombreuses fonctions hydroxyles existantes. En raison de cette nature, le Sephadex LH-20 gonfle non seulement dans les solvants de faible et moyenne polarité mais également dans les solvants très polaires. A ces deux propriétés s'ajoute la récupération presque totale des échantillons au cours des expériences de séparation. Selon la nature des composés à séparer ainsi que celle de l'éluant utilisé, différents mécanismes sont susceptibles d'intervenir en même temps tout au long du processus de séparation : (Henke, 1995)

- Séparation par perméation selon la taille

Les substances sont éluées par ordre décroissant par rapport à leur taille. Les solvants les plus utilisés sont le méthanol (MeOH) associé ou non au dichlorométhane (DCM) ou au chloroforme.

- Séparation par adsorption

Le Sephadex LH-20 présente une affinité pour les substances aromatiques et cycliques. Les effets d'adsorption réversibles peuvent être observés. Ils peuvent donc être mis à profit pour obtenir la séparation de ces composés en utilisant généralement le méthanol.

- Séparation par partition

Lorsqu'on utilise un éluant composé de deux solvants organiques de polarités différentes, le Séphadex retient spécifiquement le solvant polaire provoquant ainsi une différence nette entre les deux phases. Ce phénomène permet la séparation par partition de composés de polarité différente étant donné que les composés plus polaires sont retenus par la phase stationnaire.

Le mélange à séparer (à raison de 5% du volume total de la colonne) est introduit sous forme liquide et l'élution est assez rapide sans pression extérieure. Les substances sont éluées par ordre décroissant par rapport à leur poids moléculaire. Les molécules de très grande taille sont exclues du garnissage et éluent en premier, et les molécules de plus petite taille pénètrent dans les pores à des degrés divers en fonction de leur taille, les molécules les plus petites diffusant le plus en profondeur dans la structure des pores et éluant en dernier. Le solvant utilisé est le DCM/MeOH (50/50).

II.2.4.4. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique. Si l'analyse, réalisée avec divers solvants et différents adsorbants, révèle la présence d'une seule tache, on peut alors considérer que cet échantillon est probablement pur. De plus, étant donné que la chromatographie sur couche mince indique le nombre de composants d'un mélange, on peut l'employer pour suivre la progression d'une réaction ou d'une colonne et de définir le système de solvants le mieux adapté à la purification à effectuer. (Stahl, 1967 ; Wagner *et al.*, 1996)

Cette méthode repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire (SiO₂ 60 F254 MERCK) fixée sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. (Ikan *et al.*, 1964 ; Hoerhammer *et al.*, 1964)

Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile.

Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile, l'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption.

Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires.

L'éluant est formé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants. Un éluant qui entraîne tous les composants de l'échantillon est trop polaire ; celui qui empêche leur migration ne l'est pas suffisamment.

L'échantillon est mis en solution (2 à 5%) dans un solvant volatil, qui n'est pas forcément le même que l'éluant. La solution est déposée en un point de la plaque situé à environ 1 cm de la partie inférieure. Il est important que le diamètre de la tâche produite au moment du dépôt soit faible ; idéalement, il ne devrait pas dépasser 3mm. Ce sont généralement les dépôts les moins étalés qui permettent les meilleures séparations. Pour augmenter la quantité déposée, il est toujours préférable d'effectuer plusieurs dépôts au même point, en séchant rapidement entre chaque application plutôt que de déposer en une seule fois un grand volume d'échantillon qui produirait une tâche plus large.

L'échantillon est déposé à l'aide d'un tube capillaire en appuyant légèrement et brièvement l'extrémité de la pipette sur la couche d'adsorbant en prenant soin de ne pas le détériorer. On vérifie l'identité des composants présumés d'un échantillon, en procédant à un dépôt séparé d'une solution de chacun d'eux puis à celui de leur mélange. Ces solutions témoins permettent de comparer la migration de chaque composé avec celle de l'échantillon à analyser.

La plaque est placée en position verticale dans une cuve et le solvant qui en recouvre le fond monte par capillarité. Le niveau de liquide est ajusté à environ 0,5cm du fond de la cuve, puis on introduit la plaque. Pendant le développement du chromatogramme, la cuve doit demeurer fermée et ne pas être déplacée.

Lorsque la position du front du solvant arrive à environ 1cm de l'extrémité supérieure, la plaque est retirée de la cuve, le niveau atteint par le solvant est marqué par un trait fin, puis la plaque est séchée à l'air libre ou à l'aide d'un séchoir.

Lorsque les composants de l'échantillon analysés sont colorés, leur séparation est facilement observée sur la plaque ; dans le cas contraire, on doit rendre les tâches visibles par un procédé de révélation. Les tâches sont ensuite cerclées au crayon. Les méthodes de révélation sont les radiations UV et révélateurs chimiques.

Pour notre cas, les chromatogrammes sont analysés en lumière visible et sous UV (254 et 356 nm), avant et après révélation par la vanilline sulfurique (révélateur universel). Une solution de 10g de vanilline dans 100ml d'éthanol et 1ml d'acide sulfurique est vaporisée sur la plaque CCM, puis celle-ci est chauffée à 110°C pendant quelques minutes jusqu'à apparition des tâches.

Par cette technique on peut connaître le R_f (Référence frontale) de chaque composé, qui est le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile (front du solvant) et qui peut donc être compris entre 0 et 1.

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par le constituant considéré}}{\text{distance parcourue par le front du solvant}}$$

II.2.5.CRIBLAGE CHIMIQUE

Le criblage chimique est une méthode utilisée pour la détection des molécules chimiques présentes dans le matériel végétal. La première étape dans l'analyse de la composition chimique d'une plante consiste à déterminer les principales classes de métabolites secondaires qu'elle a élaborés au cours de son évolution. Cette information est essentielle pour la sélection de la méthode d'extraction et des différentes méthodes chromatographiques à appliquer.

Le criblage phytochimique est une analyse chimique qualitative basée sur des réactions de coloration ou de précipitation, plus ou moins spécifiques à chaque classe de principes actifs.

II.2.5.1.Caractérisation des saponosides

Dans un tube à essai, 2ml d'extrait aqueux (voir § II.2.3.2.3., page 50) sont agités vigoureusement pendant au moins 5min. L'apparition d'une mousse d'environ 1cm, persistant pendant au moins 30min indique la présence de saponosides.

II.2.5.2.Caractérisation des alcaloïdes

2ml d'extrait acide (voir § II.2.3.2.1., page 50) sont chauffés légèrement au bain marie. Après ajout de quelques gouttes de réactif de Dragendorff (voir composition en **annexe I**), la présence d'alcaloïdes se manifeste par le développement d'un trouble ou l'apparition d'un précipité dans le tube.

II.2.5.3.Les flavonoïdes et les leucoanthocyanes

II.2.5.3.1.Flavonoïdes : Test de WILSTATER (test à la cyanidine)

La solution hydroéthanolique (voir § II.2.3.2., page 52) est additionnée de 0,5ml de HCl 12,07N et deux tournures de magnésium. Dans une autre solution hydroéthanolique, l'opération précédente est répétée, puis 1ml d'eau distillée et 1ml d'alcool isoamylique sont ajoutés au mélange.

Au bout de 10min, le virage de la coloration au rouge dans le premier tube marque la présence de flavones, tandis qu'un changement de la coloration au rouge pourpre ou rouge violacé dans le second tube indique la présence de flavonols ou flavonones.

II.2.5.3.2.Leucoanthocyanes (test de Bate-Smith)

L'extrait aqueux (voir § II.2.3.3., page 52), de volume égal à 2ml, est additionné de 0,5ml de HCl 12N. Le tout est chauffé dans un bain-marie bouillant pendant 30min. Une réaction positive correspond à l'apparition d'une couleur rouge après refroidissement.

II.2.5.4.Caractérisation des tanins et polyphenols

Dans un tube à essai, quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique (FeCl_3)

1% sont ajoutées à 2ml d'extrait aqueux :

- l'apparition d'une coloration sombre indique la présence de tanins galliques.
- l'apparition d'une coloration vert-noirâtre montre la présence de tanins catéchiques.

II.2.5.5.Caractérisation des stéroïdes et triterpènes

La méthode employée est celle de Liebermann-Burchard.

L'extrait chloroformique (voir § II.2.3.4., page 52) est additionné d'une solution d'anhydride acétique (V/V). 1 à 2ml de la solution obtenue est (sont) transféré(s) dans un tube à essai, puis à l'aide d'une pipette on verse délicatement sur la paroi du tube environ 2ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré.

La réaction est positive lorsqu'il apparaît à l'interface des deux phases un anneau rouge brun ou violet et la présence de stéroïdes se manifeste par la coloration verte de la phase supérieure.

II.2.5.6.Les hétérosides

L'extrait utilisé est obtenu de la façon suivante : dans un tube à essai, 0,5g de poudre végétale et 2ml d'anhydride acétique sont mélangés. Après chauffage au bain-marie bouillant sous agitation pendant 2min, la solution est filtrée.

De l'acide sulfurique 36N (1ml) est ajouté délicatement au filtrat à l'aide d'une pipette de manière à obtenir deux couches. Le résultat est positif si une coloration rouge-brun se développe à l'interface.

II.2.5.7.Les anthraquinones (test de Bornsträger)

L'extrait aqueux (0,5ml) est mélangé à 1ml de benzène. Le mélange est laissé au repos. Après la décantation, 0,5ml d'ammoniaque 25% est ajouté dans le tube contenant le mélange.

La coloration rouge de la phase alcaline indique la présence d'anthraquinone.

II.2.5.8.Les désoxyoses (test de keller-kiliani)

A l'extrait aqueux, de volume égal à 0,5ml, sont ajoutés successivement 0,5ml d'acide acétique glacial et 0,5ml de chlorure ferrique 10% en solution aqueuse.

De l'acide sulfurique 36N (0,5ml) est ensuite versé le long de la paroi du tube incliné.

Une réaction positive est caractérisée par la formation d'un anneau pourpre à l'interface.

II.2.5.9.Les iridoïdes

Quelques gouttes de HCl 2N sont ajoutées à 0,5ml de l'extrait aqueux. Le mélange est chauffé dans un bain-marie bouillant pendant 30min.

Un résultat positif se traduit par la formation d'un précipité ou d'une coloration vert-foncé ou bleu-foncé.

II.3.RESULTATS

II.3.1.RENDEMENTS D'EXTRACTION

100g de poudre de feuille ont été extraits jusqu'à épuisement des molécules au soxhlet à la température d'ébullition des solvants d'extraction (C₆H₁₂ : 68-69°C; AcOEt: 64,9°C; MeOH : 64,9°C). Une dépigmentation a été réalisée par le C₆H₁₂. Ensuite, le marc épuisé du C₆H₁₂ a été extrait avec l'AcOEt. Enfin, une dernière extraction sur la poudre épuisée de l'AcOEt a été réalisée par le MeOH. Après filtration, chaque solution extractive a été évaporée à sec sous pression réduite. Les résultats obtenus à partir de différents solvants d'extraction sont récapitulés dans le tableau 3.

Tableau 3:Aspects et rendement des extraits obtenus selon le solvant d'extraction

Solvants	caractéristiques	Résultats
C₆H₁₂	Couleur et aspect	Vert, pâteux
	Rendement (%)	1,24
AcOEt	Couleur et aspect	Vert, pâteux
	Rendement (%)	7,54
MeOH	Couleur et aspect	Grenat, pâteux
	Rendement (%)	11,39

L'extrait MeOH (l'extrait le plus actif) a été purifié. Les résultats de la CCM ont permis de mettre au point ces techniques de purification.

II.3.2.FAMILLES CHIMIQUES DETECTEES DANS LES EXTRAITS MEOH ET ACOET

Les résultats des criblages phytochimiques sont représentés dans le tableau ci-dessous afin de montrer la nature des principes et de comparer le contenu des extraits.

Tableau 4: Résultats du criblage phytochimique sur la poudre de feuille et sur les extraits AcOEt et MeOH.

FAMILLE CHIMIQUE	TEST	RESULTAT		
		Poudre de feuille	AcOEt	MeOH
Saponine	Indice de mousse	++	-	+
Alcaloïdes	Dragendorff	-	-	-
Flavonoides	Shibata	++	+	++
Leucoanthocyanes	Bate-Smith	++	-	++
Tanins	Chlorure ferrique	++	+	++
Polyphénols		++	+	++
Stéroïdes	Liebermann- Burchard	-	-	-
Triterpènes		++	++	++
Hétérosides	Anhydride acétique	-	-	-
Anthraquinones	Bornträger	-	-	-
Desoxyoses	Keller-Kiliani	-	-	-
Iridoides		-	-	-

(-) : Réaction négative; (+) : Réaction positive ; (++) : Réaction fortement positive

Les extraits AcOEt et MeOH de feuille d'*Astrotrichilia parvifolia* contiennent des saponines, des flavonoïdes, des triterpènes, des polyphenols, des tanins et des leucoanthocyanes.

II.3.3.RESULTATS DU FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT MEOH OBTENU AU SOXHLET

L'extrait MeOH de feuille (400mg) dilué dans 1ml de DCM/MeOH (50/50) obtenu au soxhlet a été soumis à une chromatographie sur colonne de gel Sephadex® LH-20 en utilisant un gradient d'élution DCM/MeOH (50/50) en (V/V) avec un débit d'environ 0,2 ml/min/cm². Le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions ont été effectués sur la base d'analyses par CCM (§ II.2.4.1.2., page 53), et le système de solvant de migration utilisé est le Butanol/Acide acétique/Eau (6/2/2) en (V/V/V). Ainsi, le fractionnement permet d'obtenir 5 fractions: (F1 à F5). Ces dernières ont été révélées par le degré d'homogénéité des éluats (figure 16, page 62)

D'après le test antibiogramme des 5 fractions sur *Staphylococcus aureus* selon la méthode décrite dans le paragraphe III.2.1.4 de la page 69, seule la dernière fraction est active sur le germe test (voir § III.3.1.2, page 76).

Tableau 16 : Résultats du criblage phytochimique des fractions F1 à F5.

Familles chimiques Fractions	Saponines	Tanins	Flavonoïdes	Leucoanthocyanes
F1	-	+	-	-
F2	+	+	-	-
F3	-	-	-	+
F4	-	-	+	+
F5	-	-	+	-

D'après le tableau ci-dessus, le criblage phytochimique a révélé des tanins dans F1, des tanins et des saponosides dans F2, des leucoanthocyanes dans F3, des flavonoides et des leucoanthocyanes dans F4 et des flavonoïdes dans F5. Le schéma d'isolement et les produits isolés sont présentés dans la figure 15, page 61.

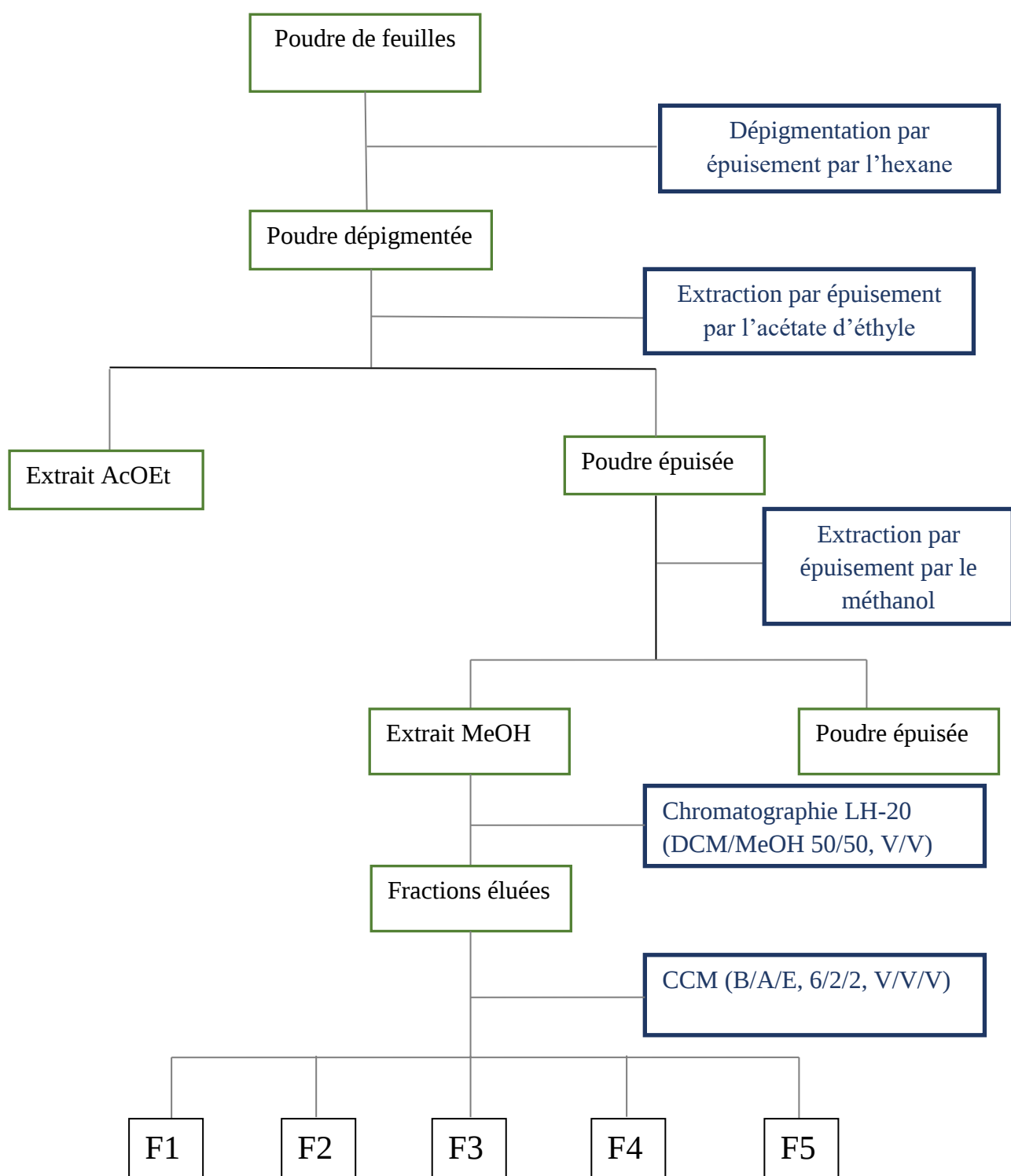


Figure 15: Procédé d'obtention de la fraction F5 à partir de l'extrait brut MeOH de feuille obtenu au soxhlet à chaud.

II.3.4.DEGRE D'HOMOGENEITE DES FRACTIONS

Le chromatogramme de la figure 16 montre l'évolution de l'homogénéité des différents extraits obtenus par fractionnement. La plaque CCM a été développée dans du B/A/E 60/20/20 (P/P/P) et révélée par la vanilline sulfurique.

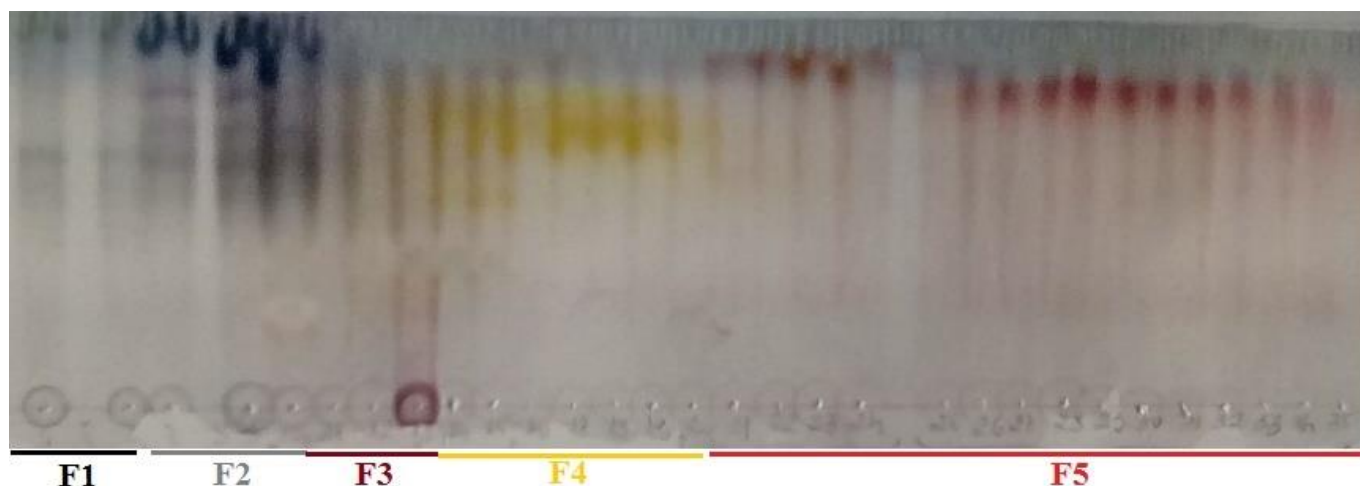


Figure 16: Chromatogramme révélé à la vanilline sulfurique des fractions obtenues après fractionnement sur chromatographie sur gel de Sephadex LH-20.

II.4.CONCLUSION

L'étude chimique réalisée sur les feuilles d'*Astrotrichilia parvifolia* a permis d'apporter des informations sur les principes actifs de cette plante malgache utilisée dans la médecine traditionnelle. Parmi les trois extraits brut obtenus (C_6H_{12} , AcoEt, MeOH) après les extractions par épuisement à chaud au soxhlet, l'extrait MeOH (l'extrait le plus actif) a été purifié. Ainsi, l'analyse des constituants à partir des fractions bien définies de l'extrait MeOH par CCM a conduit à l'isolement de 5 fractions et la dernière fraction (F5) est la fraction active. Le rendement de purification de la fraction F5 à partir de la poudre de feuille est de 0,06%. Si le criblage phytochimique de l'extrait brut MeOH montre la présence de saponine, de flavonoïde, de triterpène, de polyphenol, de tanin et de leucoanthocyane, celui de la fraction F5 ne montre que la présence de flavonoïde. Les autres molécules auraient donc été éliminées par les étapes de purification. En résumé, les feuilles contiennent des principes actifs appartenant à la famille des flavonoides.

CHAPITRE III :

ETUDE BIOLOGIQUE

III.1.INTRODUCTION

Au cours de l'étude chimique portant sur les feuilles d'*Astrotrichilia parvifolia*, un extrait purifié (F8) a été obtenu à partir de l'extrait brut MeOH. Les familles chimiques des principes actifs ont pu être déterminées. Dans cette deuxième partie, nous avons testé les extraits MeOH sur des animaux à sang chaud, les extraits MeOH et AcOEt sur des bactéries. Ainsi, nous avons approfondi les résultats obtenus lors des études préliminaires :

- sur les bactéries en déterminant les CMI, CMB, CMB/CMI des extraits (MeOH et AcOEt) et de la fraction F8 en étendant les tests sur d'autres bactéries ;
- sur les animaux à sang chaud, en observant la toxicité aiguë des extraits MeOH ainsi que son effet sur les trois fonctions physiologiques (cardiaque, hépatique et rénale).

Enfin, nous avons prospecté d'autres propriétés pharmacologiques, c'est-à-dire l'activité antioxydante des extraits MeOH et AcOEt de feuille.

III.2.MATERIELS ET METHODES

III.2.1.ETUDE DES ACTIVITES ANTIBACTERIENNES

III.2.1.1.Souches bactériennes

Huit souches pathogènes, fournies par le CNRE (Centre National de Recherche pour l'Environnement), ont été utilisées pour les tests d'activité antibactérienne (Tableau 5, page 65).

Tableau 5: Les souches utilisées

	Souches	Références
Gram (-)	<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048
	<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 23715
Gram (+)	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 6301
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615

III.2.1.2.Milieux de culture

Deux types de milieux de cultures ont été utilisés lors de cette étude :

- Le milieu de MÜELLER HINTON : un milieu solide et liquide de marque BIO-RAD. Il sert à cultiver des bactéries non exigeant.
- Le milieu gélosé COLUMBIA : un milieu solide d'isolement enrichi de marque BOKAR sur lequel les streptocoques se développent bien.

Leurs compositions sont données en annexe II.

III.2.1.3.Disques pour antibiogramme

Les disques utilisés sont constitués de papier filtre de 6mm de diamètre fournis par le laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences médicales.

III.2.1.4.Antibiotique de référence

La gentamycine (10µg/disque) a été choisi comme antibiotique de référence.

III.2.1.5. Test antibiogramme (Nielsen *et al.*, 2000 ; Pyun *et al.*, 2006 ; Ngameni *et al.*, 2009 et WHO Global Foodborne Infections, 2010, Duval et Soussy, 1991 ; Ferron, 1994 ; Sandeep *et al.*, 2010 ; Govindappa *et al.*, 2011 ; Linthoingambi *et al.*, 2013)

Cent grammes de poudre sèche de feuille ont été extraits suivant la méthode décrite dans le paragraphe II.2.3.1, page 52. Une concentration de 100mg/ml (correspondant à 1000µg/disque pour un dépôt de 10µl/disque, en effet, c'est la concentration d'extrait de plante le plus fréquemment employée lors des tests antibiogrammes) a été utilisée pour le test antibactérien.

III.2.1.6. Méthode de diffusion sur gélose (Test antibiogramme)

a. Principe

Le test consiste à déposer des disques imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries. L'antibiotique diffuse au sein de la gélose en créant une zone circulaire d'inhibition de croissance appelée halo d'inhibition. Dans cette zone, les concentrations de l'antibiotique diminuent du centre de dépôt vers la périphérie.

Le diamètre du halo d'inhibition varie en fonction du degré de sensibilité de la bactérie à l'antibiotique.

b. Mode opératoire

Inoculation du milieu

Deux millilitres de suspension de germes correspondant à 0,5Mac Farland (10⁸UFC/ml) ont été uniformément répandus à la surface de la gélose Columbia (pour les streptocoques) et de la gélose de Mueller-Hinton (pour les autres bactéries) puis laissés incuber pendant 15min à 37°C pour permettre l'imprégnation de la bactérie à la surface de la gélose. L'excès d'inoculum est ensuite aspiré.

Dépôt d'extrait

L'extrait à tester (1000µg/disque) et le témoin positif (la gentamycine à 10µg/disque), est déposé sur un disque d'antibiogramme de 6mm de diamètre. Les disques ainsi préparés sont placés, à l'aide d'une pince stérile, à la surface de la gélose de MÜELLER-HINTON ou de COLUMBIA préalablement ensemencée ci-dessus. La boîte est mise à incuber à 37°C pendant 24h. La lecture des résultats des tests d'antibiogramme est faite selon la référence dans le tableau 6 (Celikel *et al.*, 2008).

Tableau 6: Normes utilisées pour la lecture des résultats des tests antibiogrammes (Celikel *et al.*, 2008)

Diamètre du halo d'inhibition (x) en mm	Degré de sensibilité des germes	Résultat
x<8	Insensible	-
9<x<14	Sensible	+
15<x<19	Très sensible	++
x>20	Extrêmement sensible	++++

III.2.1.7. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

La CMI (qui empêche la croissance d'un microorganisme après 24heures d'incubation à 37°C dans un milieu de croissance non spécifique), et la CMB (qui est la plus faible concentration de la substance antimicrobienne, laissant subsister moins de 0,01% de survivants) de tous les extraits qui présentent des activités antibactériennes lors de l'antibiogramme en milieu solide sont effectuées sur les souches de bactéries sensibles. La méthode utilisée est celle décrite par Fawole (2009) et Kuete (2009) utilisant une microplaque de 96 puits.

- des cultures de 24h des germes les plus sensibles sont diluées dans le Bouillon Mueller Hinton (MHB) ;
- l'inoculum a été standardisé entre 0,5 et 1 Macfarland ;

- les extraits d'acétate d'éthyle et de méthanol ont été resolubilisés dans de l'eau distillée pour avoir une concentration égale à 30mg/ml, puis stérilisés par filtration (Sartorius Stedim Biotech) ;
- 100µl de chaque extrait testé ont été dilués avec 95µl du MHB puis répartis dans les microplaques à 96puits ; 5µl d'inoculum sont ensuite ajoutés dans chaque puits. Ces dilutions ont été réalisées de façon à avoir des concentrations finales des extraits comprises entre 0,03 et 15mg/ml ;
- un témoin négatif (100µl du MHB), absence de croissance et un témoin positif (95µl du MHB additionnés de 5µl d'inoculum), croissance normale ont été utilisés
- les plaques sont ensuite recouvertes de papier aluminium stérile, puis incubées à 37°C pendant 24h.

La CMI est évaluée par ajout de 40µl de solution de *p*-iodonitrotetrazolium chloride (INT) à une concentration de 0,2mg/ml dans chaque puits, après incubation à 37°C pendant 30min (Kuebe *et al.*, 2008). Le INT, un indicateur coloré de couleur jaune vire au violet lorsqu'il y a croissance bactérienne. En effet, la CMI correspond à la plus faible concentration d'extrait où aucun changement de coloration n'est observé.

Pour la détermination de la CMB, 5µl du contenu de chaque puits qui ne présente pas de trouble sont ensemencés en stries sur Mueller Hinton Agar (MHA). La CMB correspond à la plus faible concentration où aucune colonie bactérienne ne pousse après incubation à 37°C pendant 24h.

III.2.2.ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE : METHODE DE DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picryl-Hydrazyl)

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation (Gülçin, 2006). Le 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl est un radical libre pouvant être réduite en présence d'une molécule antioxydant (figure 17), le principe de la méthode est donc basé sur le transfert d'électrons se traduisant par une décoloration de la solution. Cette décoloration est estimée par la mesure de la densité optique à 517nm. (Blois, 1958 ; Shimada *et al.*,1992)

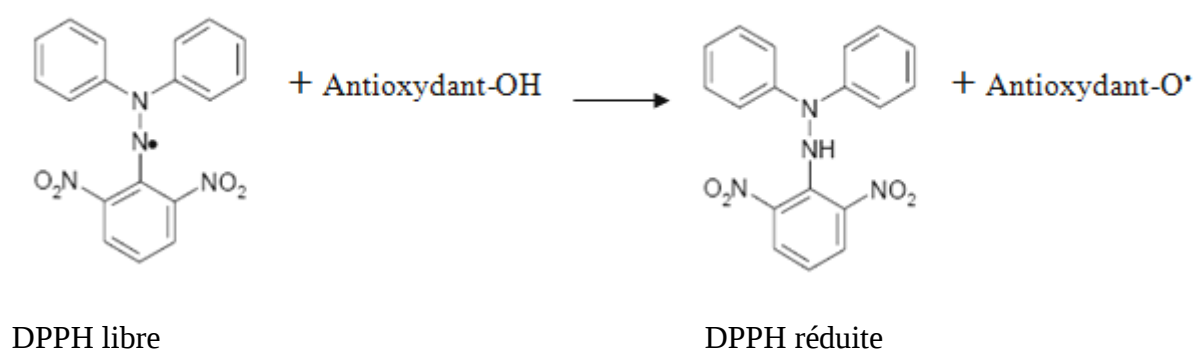


Figure 17:Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

Une microplaque a été utilisée pour ce test. 100µl de DPPH 0,004% ont été ajoutés aux extraits bruts méthanolique et acétate d'éthyle ainsi qu'aux antioxydants de références (vitamine C) de différentes concentrations (0 à 100µg/ml) et de volume égal à 100µl, chaque test est répété trois fois. Le mélange a été laissé à incuber pendant 30minutes à 30°C et à l'obscurité. L'absorbance était mesurée à 517nm. L'activité antioxydante qui exprime la capacité de piéger le radical libre est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol. Elle est donnée par la formule suivante : (Lee *et al.*,2001 ; Yoo *et al.*, 2008 ; Popovici *et al.*, 2009)

$$\text{Inhibition (\%)} = (\text{Abs control} - \text{Abs test} / \text{Abs control}) \times 100$$

Où Abs désigne l'absorbance à la longueur d'onde de 517nm. Les résultats ont été exprimés par la moyenne de 3 mesures $\pm$ écart type. La valeur de l'IC50 a été mesurée pour chaque extrait. Elle a été définie comme étant la concentration de l'extrait qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH.

III.2.3.ETUDE DE LA TOXICITE AIGÛE

La toxicité aiguë est la toxicité induite par l'administration d'une dose unique et massive d'un produit toxique. Pour cette étude, l'extrait MeOH de feuilles obtenu selon la méthode décrite dans le paragraphe II.2.3.1, page 50 a été utilisé.

III.2.3.1.Animaux d'expérimentations

Les souris blanches *Mus musculus*, var. albinos, sont utilisées pour les expériences. Leur race a été stabilisée à l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) et elles sont élevées à l'animalerie du Département de Biochimie fondamentale et appliquée de la Faculté des Sciences. Ce sont des souris mâles âgées de cinq semaines (âge de maturation sexuelle) et qui pèsent en moyenne 23 ± 2 g.

Des cobayes mâles appelés cochon d'Inde provenant de l'animalerie de l'IMRA sont aussi utilisés.

III.2.3.2.Voies d'administrations

Deux voies d'administration ont été utilisées pour évaluer la toxicité aiguë sur souris :

- Par voie intrapéritonéale (IP), les extraits sont injectés à un volume de 0,3ml par 25 ± 2 g de poids corporel.
- Par voie orale, les extraits sont donnés par gavage à l'aide d'une canule d'intubation avec une extrémité distale courbée à un taux de 0,25ml par 25 ± 2 g de poids corporel.

III.2.3.3. Détermination de la DL50 (24h)

Les 35souris mâles de $25 \pm 2g$ réparties en 7lots ont subi des injections intra-péritonéales. La DL50 ou la dose minimum qui donne 50% de mortalité a été obtenue grâce à la méthode de Reed et Muench (1938) :

a) **la méthode algébrique**, donnée par la formule :

$$\log DL50 = \log B + \frac{0,5 - N}{M - N} \log r$$

Où :

B = dose immédiatement inférieure à la DL50

N = mortalité provoquée par la dose immédiatement inférieure à la DL50 (en fraction décimale)

M = mortalité provoquée par la dose immédiatement supérieure à la DL50 (en fraction décimale)

r = raison de la progression géométrique

b) **la méthode graphique**, qui consiste à déterminer la dose correspondant au point d'intersection de la courbe des totaux cumulatifs des animaux qui ont survécu et celle des animaux qui ont succombé.

III.2.3.4. Etude des effets toxiques de l'extrait MeOH sur les organes

III.2.3.4.1. Sur Organe isolé : le cœur du cobaye

L'effet cardiaque de l'extrait sur la chronotropie et l'inotropie de l'atrium isolé du cobaye était évalué sur un appareil myographique (7006 Transducteur isotonique Ugobasile, 7082 préamplificateur Ugobasile et 7070 enregistreur Gemin).

Au cours de l'expérience, l'animal a été anesthésié par inhalation de chloroforme puis ex-sanguiné par coupure des artères carotides et des veines jugulaires. La cage thoracique a été ouverte par incision pour dégager le cœur. Le cœur a été pris et placé dans une boîte de Pétri contenant un milieu de survie aérée par du carbogène (95% O₂) et 5% de CO₂. Le milieu de survie est constitué par la solution physiologique de Krebs-Henseleit (la composition en mM est NaCl: 120; NaHCO₃: 25; KCl: 4,72; CaCl₂: 2,5; MgSO₄: 0,5; KH₂PO₄: 1,2-D-glucose: 11). Les deux atriums ont été pris ensemble en les séparant des ventricules et ensuite nettoyés en enlevant les mésentères.

L'organe a ensuite été suspendu dans un bain contenant la solution physiologique, maintenu à 37°C et aérée par du carbogène. Connecté au transducteur isotonique, une tension de 1g a été imposée aux oreillettes. Ces dernières ont été stimulées avec 10 à 9M d'isoprénaline pendant 5min puis lavées deux fois en renouvelant la solution physiologique.

Des concentrations croissantes de l'extrait brut de 50 à 400µg/mL ont été testées cumulativement. Les réponses des oreillettes ont été enregistrées 15s, 1, 3 et 5min après chaque injection. Le nombre de battements par minute et l'amplitude de la contraction ont été mesurés et le pourcentage de stimulation ou d'inhibition a été calculé. La valeur de référence d'enregistrement avant l'injection de l'extrait a été prise comme 100%.

III.2.3.4.2. Sur le système rénal, la fonction hépatique et pancréatique (*in vivo*) sur les souris

Cette étude a consisté en l'administration d'une dose sous-létale de l'extrait méthanolique pendant 30jours afin d'évaluer les paramètres biochimiques hépatiques, rénales et pancréatiques chez la souris.

Dix animaux étaient numérotés de 1 à 5 sur leur queue en utilisant deux couleurs pour distinguer le groupe d'animaux témoins du groupe de souris traitées. Les animaux ont été traités quotidiennement à une heure fixe le matin par gavage de 10ml/kg d'eau distillée pour les animaux témoins et 10ml/kg de l'extrait préparé dans de l'eau distillée pour les animaux traités. La dose d'extraits testés était de 52,38mg/kg de poids corporel. Cette dose correspondait au 1/10 de la DL100 par voie intrapéritonéale. Le traitement a duré 30 jours. Le 31ème jour, les animaux ont été anesthésiés par inhalation du chloroforme. Leur sang a été prélevé sur la veine rétro-orbitaire à l'aide d'une Pipette Pasteur en verre hépariné (héparine choay ® 5000 UI/mL, Sanofi-Aventis). Le plasma a ensuite été récupéré et les taux plasmatiques de L- γ -glutamyltransférase (γ GT), Alanine aminotransférase (ALAT) et l'Aspartate-aminotransférase (ASAT) pour explorer la fonction hépatique, créatinine et urée pour la fonction rénale et amylasémie pour la fonction pancréatique, ont été déterminés en utilisant un spectrophotomètre (MINDRAY BA 88A) et des réactifs BIOLABO.

- **Détermination des paramètres biochimiques (ASAT, ALAT, γ GT, créatinine, urée et amylase)** (Young, 2000 ; Fiedman et Young, 2001)

Une méthode spectrale basée sur la transformation de 2-oxoglutarate dans le L-glutamate en présence de la L-alanine a été utilisée pour quantifier le niveau d'ALAT tandis que la transformation de 2-oxoglutarate dans le L-glutamate en présence de la L-aspartate sert à doser celui de l'ASAT. Une méthode colorimétrique évaluant la transformation de la L- γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroamide en L- γ -glutamylglycylglycine en présence de la glycylglycine a été effectuée pour la détermination des γ GT. Un procédé colorimétrique évaluant la formation du complexe créatinine-picrate à partir de la créatinine et de l'acide picrique permettait la détermination de la créatininémie. Le dosage de l'urée est basé sur la mesure de l'ammoniac qui est le produit d'hydrolyse de l'urée en présence de l'eau et de l'uréase. L'amylase est dosée en utilisant la réaction de transformation de l'Ethylidène Paranitrophénol Glucose en présence de l' α -amylase et de l'eau en Ethylidène glucose et en Paranitrophénol Glucose.

Les taux plasmatiques moyens d'ALAT, d'ASAT, de γ GT, de créatinine, d'urée et d'amylase des animaux témoins ont été comparés statistiquement à ceux des animaux traités avec l'extrait en utilisant la méthode paramétrique «Student t». Une valeur de $p \leq 0,05$ est considérée comme une différence significative.

III.2.3.5. Analyses statistiques

Les analyses de variance ou ANOVA avec le logiciel Graphpad Prism 5, ont été utilisées pour l'analyse statistique. Les estimations statistiques ont été faites à l'intervalle de confiance de 95% (Schwartz, 1961).

III.3.RESULTATS

III.3.1.EFFET ANTIBACTERIEN DES EXTRAITS

III.3.1.1.Effets des extraits MeOH et AcOEt

Les extraits MeOH et AcOEt ont été soumis aux tests antibactériens par la méthode de diffusion sur disque. Les résultats sont décrits dans le tableau 7 suivant.

Tableau 7: Effet des extraits d'*Astrotrichilia parvifolia* sur les bactéries testées

Souches bactériennes		Diamètre de la zone d'inhibition (mm)		
		AcOEt (1000µg/disque)	MeOH (1000µg/disque)	Gentamycine (10µg/disque)
GRAM(-)	<i>Enterobacter aerogenes</i>	6	6	22±0,03
	<i>Enterobacter cloacae</i>	6	6	20±0,01
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	6	19±1,02
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	6	6	24±0,01
GRAM (+)	<i>Bacillus cereus</i>	13±0,01	14±0,15	26±0,40
	<i>Staphylococcus aureus</i>	12±0,64	14±0,01	24±1,04
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	9±1,25	10±0,20	26±0,25
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	11±0,01	12±0,10	26±1,06

D'après les résultats, à 1000µg/disque:

- Les extraits AcOEt et MeOH de feuille sont actifs à des degrés variables sur tous les germes GRAM(+) testés avec un maximum d'effet sur *Staphylococcus aureus* et sur *Bacillus cereus*. Sur les germes GRAM(-), l'extrait ne présente aucun effet.

A titre d'illustration, la Figure 19 montre l'effet des extraits MeOH et AcOEt sur *Staphylococcus aureus*.

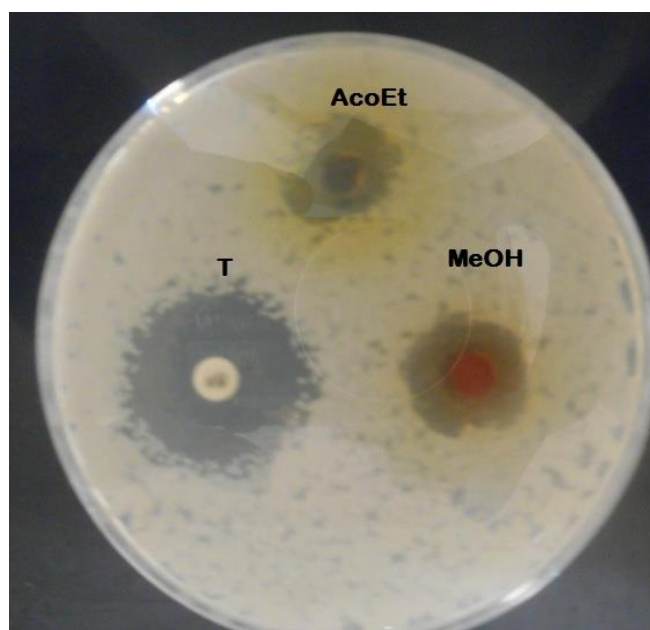


Figure 19: Effet des extraits AcOEt et MeOH d'*Astrotrichilia parvifolia* sur la croissance de *Staphylococcus aureus* en milieu solide (dépôt = 1000µg/disque ; T = témoin = gentamycine à 10µg/disque).

III.3.1.2.Effets des fractions issues du fractionnement de l'extrait MeOH

L'activité des fractions LH-20 (F1 à F5) de l'extrait MeOH a été étudiée sur *Staphylococcus aureus* à raison de 100µg/disque (concentration disponible, dix fois supérieure à celle de l'antibiotique de référence qui est la gentamycine à 10µg/disque).

Les résultats sont récapitulés dans le tableau 8 et montrés sur la Figure 20 (p. 77).

En effet, à 100µg/disque, parmi les 5 fractions obtenues, la dernière fraction était encore active sur *Staphylococcus aureus*.

Tableau 8 : Résultats des tests antibactériens des 5 fractions LH-20 (à 100µg/disque) obtenues à partir de l'extrait MeOH sur *Staphylococcus aureus*.

Fractions (100µg/disque)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm) sur <i>Staphylococcus aureus</i>
F1	6
F2	6
F3	6
F4	6
F5	9
GENTAMYCINE (10µg/disque)	24



Figure 20: Effets des 5 fractions LH-20 obtenues à partir de l'extrait MeOH sur la croissance de *Staphylococcus aureus* en milieu solide (dépôt : 100µg/disque ; T = témoin = gentamycine à 10 µg/disque).

III.3.1.3. CMI ET CMB des extraits

La recherche de la CMI et de la CMB sont établie sur *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* et *Bacillus cereus* (les souches les plus sensibles) selon le §III.2.1.7 (page 67). Les résultats en culture liquide (Figure 21, page 79) montrent que les concentrations croissantes en produit (30 ; 60 ; 120 ; 230 ; 470 ; 930 ; 1870 ; 3750 ; 7500 ; 15000µg/ml) entraînent un changement dose-dépendante de la coloration de *p*-iodonitrotetrazolium chloride induite par la croissance des souches. En effet, d'après les résultats présentés dans le tableau 9 de la page 79, les valeurs de la CMI sont comprises entre 230 et 470µg/ml pour les deux extraits bruts, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* étant respectivement la souche la plus sensible pour l'extrait MeOH et l'extrait AcOEt. En effet, selon le tableau ci-dessous, une substance :

- a une bonne activité antibactérienne si sa CMI <100 µg/ml.
- a une activité moyenne si sa CMI est comprise entre 100 et 500µg/ml : cas des extraits AcOEt et MeOH sur les trois souches.
- a une activité faible si sa CMI se trouve entre 500 à 1000µg/ml.
- est inactive pour une CMI > 1000µg/ml.

Tableau 17 : Activités des produits antibactériens selon Dalmarco *et al.* (2010)

Activité CMI (µg/ml)	BONNE	MOYENNE	FAIBLE	INACTIVE
CMI <100	+			
100<CMI< 500		+		
500<CMI< 1000			+	
CMI > 1000				+

Tableau 9: Concentration Minimale Inhibitrice ($\mu\text{g/ml}$) des extraits bruts sur les bactéries

	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	
	AcOEt	MeOH
<i>Bacillus cereus</i>	230	470
<i>Staphylococcus aureus</i>	470	230
<i>Streptococcus pyogenes</i>	470	470

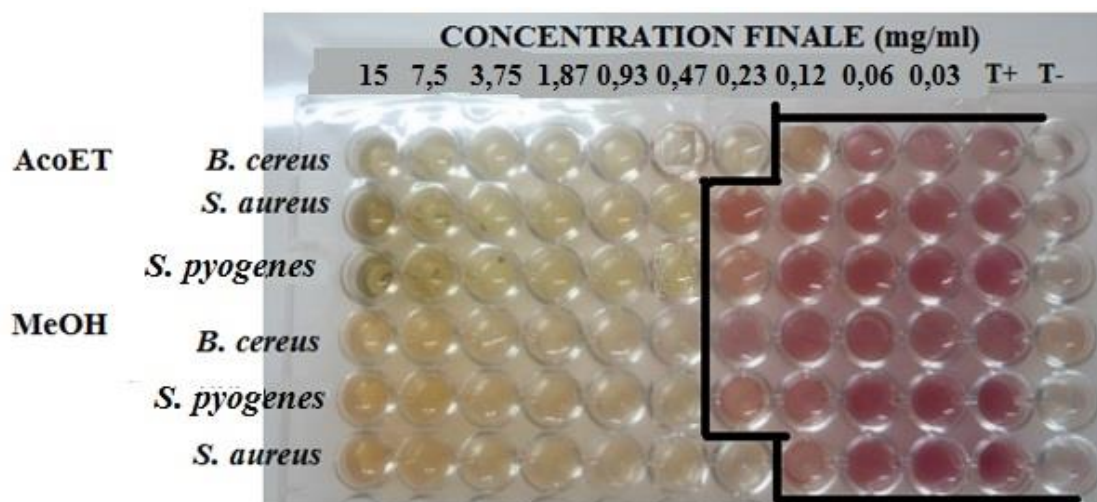


Figure 21: Variation de la coloration de la solution de *p*-iodonitrotetrazolium chloride induite par la croissance des bactéries (jaune=absence de croissance ; violet=croissance) en fonction de la concentration des extraits bruts sur les souches testées.

Les repiquages des cultures par stries sur gélose de la plus faible concentration d'extrait où aucun changement de coloration n'est observé, permettent de déterminer les valeurs de la CMB des extraits (tableau 10).

Tableau 10: Concentration Minimale Bactéricide ($\mu\text{g/ml}$) des extraits bruts sur les bactéries

	CMB ($\mu\text{g/ml}$)	
	AcOET	MeOH
<i>Bacillus cereus</i>	230	470
<i>Staphylococcus aureus</i>	470	230
<i>Streptococcus pyogenes</i>	930	930

D'après les résultats présentés dans le tableau ci-dessus:

- pour l'extrait AcOEt les CMB sont comprises entre 230 et 930 $\mu\text{g/ml}$ et *Bacillus cereus* étant la souche la plus sensible.
- pour l'extrait MeOH, les CMB sont aussi comprises entre 230 et 930 $\mu\text{g/ml}$ et *Staphylococcus aureus* est la souche la plus sensible

Le rapport CMB/CMI a été calculé, afin de déterminer si leur action contre la croissance des différentes souches testées est bactériostatique ou bactéricide. Les résultats sont montrés dans le tableau 11 de la page 81.

Tableau 11: Valeurs des rapports CMB/CMI des extraits AcOEt et MeOH

	AcOEt		MeOH	
	CMB/CMI	POUVOIR	CMB/CMI	POUVOIR
<i>Bacillus cereus</i>	1	bactéricide	1	Bactéricide
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	bactéricide	1	Bactéricide
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1,98	bactéricide	1,98	Bactéricide

Lorsque le rapport d'activité CMB/CMI d'une substance antimicrobienne est inférieur ou égal à quatre (≤ 4) la substance a un effet bactéricide. Par contre, si le rapport CMB/CMI est supérieur à quatre (> 4), l'effet est bactériostatique. (Marmonier, 1990 ; Djeussi *et al.*, 2013 ; Bouharb *et al.*, 2014 ; Chamandi *et al.*, 2015)

Les extraits AcOEt et MeOH ont donc des actions bactéricides contre *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes*

III.3.2.EFFET TOXIQUE DES EXTRAITS

III.3.2.1. Toxicité aiguë par voie orale

L'administration de l'extrait brut MeOH à une dose unique de 6 800mg/kg de poids (dose minimale qui donne 100% de mortalité) provoque les symptômes suivants :

- juste après l'administration, l'animal présente un état agressif ;
- 15min après l'administration, une hyperpnée ou plus précisément une augmentation de la fréquence respiratoire à 150cycles/min ;
- après 2h, l'animal respire difficilement, traîne ses pattes postérieures, présente de l'enophtalmie et de la piloérection, la mort survient au bout de 10h.

A la dose sub-létale de 2 300mg/kg de souris, les symptômes observés sont un état passif accompagné d'une hyperpnée. Les souris se remettent au bout de 8 à 9h, mais le rythme respiratoire est encore élevé.

A 523,80mg/kg, on observe des démangeaisons chez la souris. Vers la 5ème heure, l'animal montre une physiologie apparemment normale.

III.3.2.2.Toxicité aiguë par voie intra-péritonéale

L'injection d'une dose unique de 523,8mg/kg de poids selon la méthode décrite au paragraphe III.2.3, page 70 Provoque les symptômes suivants :

- Juste après l'injection, l'animal présente un état passif,
- 2h après l'injection, des convulsions cloniques de plus en plus fréquentes ont lieu,
- Après 5h, l'animal respire difficilement, traîne ses pattes postérieures, présente de l'enophtalmie et de la piloérection, la mort survient au bout de 10h.

L'étude de la toxicité aiguë a permis de calculer les valeurs de la DL_{50} en utilisant la méthode de calcul et la méthode graphique de REED et MUENCH (1938). Ainsi, sept doses en progression géométrique de raison 1,02 sont préparées. La première dose est la dose la plus forte donnant 0% de décès (465,12mg/kg) et la dernière dose est la dose la plus faible provoquant la mort des souris à 100% (523,8mg/kg). Les résultats expérimentaux sont résumés dans le tableau 12 ci-dessous et dans la [figure 22](#) (page 83). La valeur de la DL_{50} (24h) est ainsi estimée entre 472 et 484mg/kg.

Tableau 12: Résultats expérimentaux de la détermination de la DL_{50} (24 h) avec $r = 1,02$

Dose (mg/kg)	Nombre de souris		Totaux cumulatifs		% de mortalité
	Survivantes	Mortes	Survivantes	Mortes	
465,12	5	0	13	0	0
474,4224	2	3	8	3	60
483,910848	2	3	6	6	60
493,589065	2	3	4	9	60
503,460846	1	4	2	13	80
513,530063	1	4	1	17	80
523,800664	0	5	0	22	100

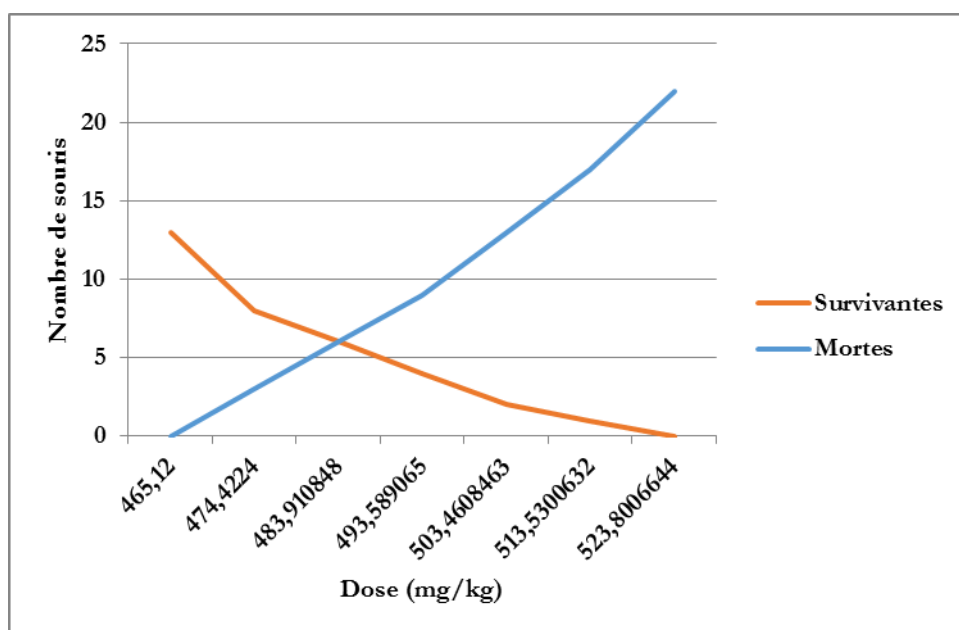


Figure 22 : Détermination graphique de la DL₅₀ (24 h) par la méthode graphique de Reed et Muench (1938)

III.3.2.3.Effets toxiques de l'extrait MeOH observé sur organe isolé (cobaye) et sur le rein, le foie et le pancréas (in vivo chez la souris)

III.3.2.3.1.Effet de l'extrait MeOH sur le cœur de cobaye

L'effet de l'extrait MeOH d'*Astrotrichilia parvifolia* sur la chronotropie et l'inotropie de l'atrium isolé de cobaye a été évalué en utilisant la méthode décrite dans le paragraphe III.2.3.4.1, page 72. Des concentrations croissantes de l'extrait de 50 à 400 µg/mL ont été testées sur les mêmes animaux. Aucun effet significatif n'a été enregistré ($P > 0,05$) (Figure 23, page 84).

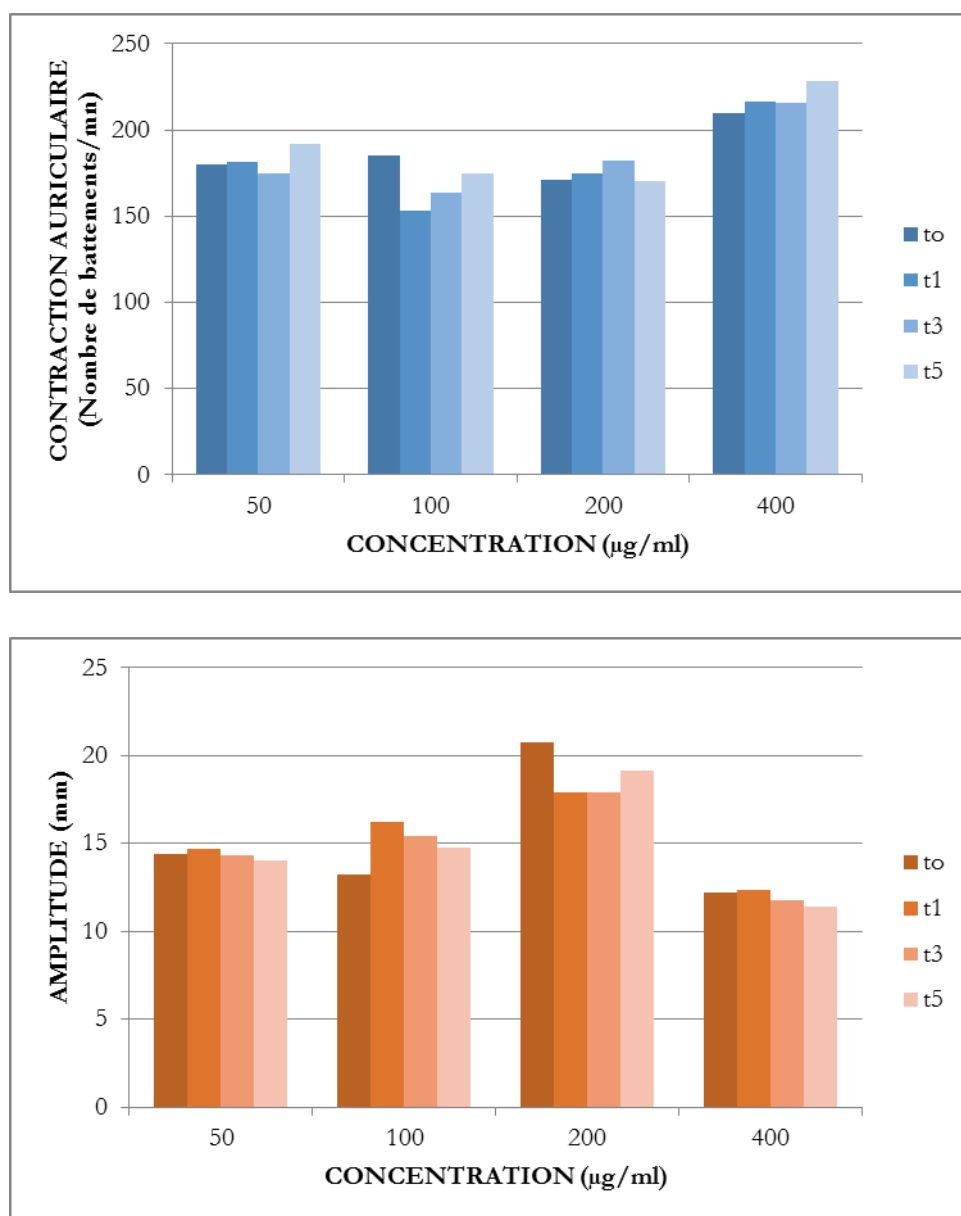


Figure 23: Effet de la concentration et du temps de contact de l'extrait brut d'*Astrotrichilia parvifolia* sur le nombre de battements par minute (en haut) et sur l'amplitude (en bas) de la contraction auriculaire isolée du cobaye (n = 3)

III.3.2.3.2.Effets de l'extrait MeOH sur le foie, le rein et le pancréas

a. Effet de l'extrait MeOH sur le poids des souris

Le gain hebdomadaire de poids des souris contrôles et des souris traitées avec de l'extrait brut MeOH selon le paragraphe III.2.3.4.2 de la page 72 pendant 30 jours a été présenté dans le tableau 10 ci-dessous. Le poids des animaux contrôle a augmenté, ce gain de poids était encore plus élevé chez les animaux traités.

Tableau 13: Variation du poids des souris traitées par voie orale à l'extrait brut MeOH (52,3 mg/kg) pendant 30 jours

EXTRAIT	POIDS		VARIATION (%)
	INITIAL	FINAL	
Contrôle	28,66 ± 2,62	31,83 ± 4,24	11,06
Extrait MeOH	33 ± 2,94	38 ± 5,71	15,15

• Effet de l'extrait MeOH sur les paramètres biochimiques

Les effets d'une intoxication subchronique par l'extrait brut MeOH (52,3mg/kg) sur la fonction hépatique, rénale et pancréatique ont été respectivement évalués par le taux de transaminases (ASAT et ALAT) et du gamma-GT, le taux de créatinine et de l'urée et le taux de l'amylase. Aucun changement significatif du taux des 6 paramètres biochimiques ($p > 0,05$) n'a été observé (tableau 14).

Tableau 14: Effets de l'extrait MeOH d'*Astrotrichilia parvifolia* (52,3 mg/kg) sur les fonctions rénales, hépatiques et pancréatiques

Fonctions	Paramètres biochimiques	Contrôle	Extrait MeOH
Hépatique	ASAT (UI/L)	338,93 ± 104,09	419,03 ± 221,65
	ALAT (UI/L)	137,33 ± 44,27	77,6 ± 49,92
	GAMMA-GT (UI/L)	13,33 ± 1,25	13,66 ± 4,99
Rénale	CREATININE (μmol/l)	35,66 ± 3,30	34,33 ± 3,62
	UREE (mmol/l)	4,3 ± 1,04	3,63 ± 1,75
Pancréatique	AMYLASE (UI/L)	1171,67 ± 13,021	1096,33 ± 173,12

III.3.3.ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES EXTRAITS

L'activité antioxydante des extraits AcOEt et MeOH de feuilles a été évaluée en utilisant le DPPH comme radical libre (Cf §III.2.2.page 69). Les résultats sont montrés dans le tableau 15et sur la Figure 24 de la page 87.

Les profils d'activité antioxydante obtenus révèlent que les extraits bruts d'*Astrotrichilia parvifolia* possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante. A des concentrations comprises entre 5 et 50µg/ml, le piégeage des radicaux libres varie de :

- 35,02 à 61,05% pour **AcOEt**
- 36,57 à 69,63% pour **MeOH**
- 63,48 à 117,06% pour **la vitamine C** qui est l'antioxydant standard.

Les concentrations inhibitrices 50% (IC50) des différents extraits ont été déterminées :

- **la vitamine C** montre une activité antiradicalaire très puissante avec une IC50 de l'ordre de 3,94µg/ml,
- les activités des extraits, varient de 19,79µg/ml pour l'extrait MeOH et de 24,44µg/ml pour l'extrait AcOEt.

Tableau 15 : Activité antioxydante des extraits MeOH et AcOEt d'*Astrotrichilia parvifolia*

Concentration (µg/ml)	Pourcentage d'inhibition		
	vitamine C	AcOEt	MeOH
0	0	0	0
5	63,48	35,02	36,57
10	67,04	36,91	39,46
15	68	38,84	40,59
20	69,4	40,9	50,53
25	71,48	52,94	55,1
30	81,72	55,01	58,59
35	97,42	56,26	58,9
40	101,56	56,94	60,55
45	110,54	60,2	61,63
50	117,06	61,05	69,63

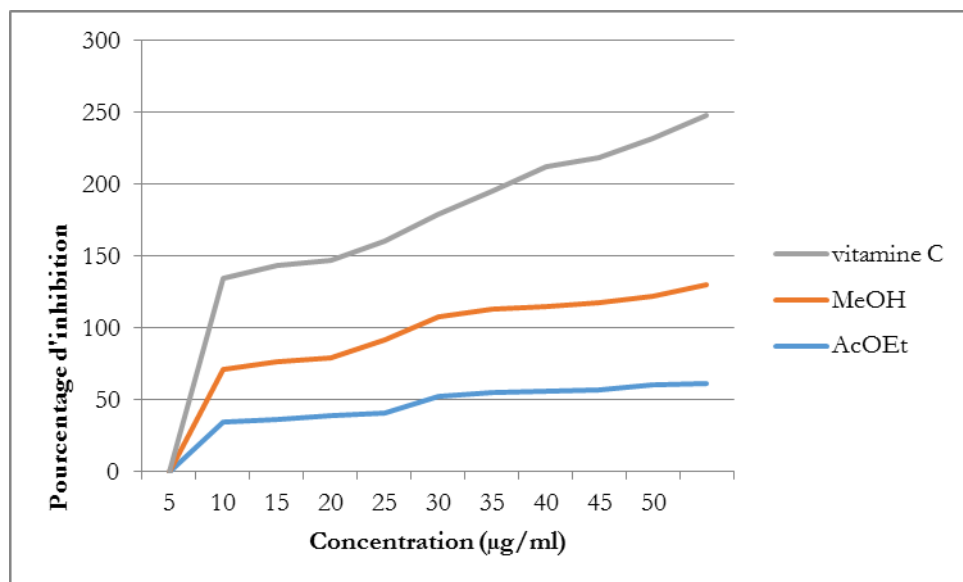


Figure 24 : Inhibition du DPPH en fonction des concentrations des extraits d'*Astrotrichilia parvifolia* et de la vitamine C.

III.4.CONCLUSION

Les expériences réalisées sur divers organismes ont permis de connaître certaines propriétés biologiques des extraits bruts (MeOH et AcOEt) et de l'extrait purifié (F5).

Une activité antibactérienne la plus élevée de l'extrait AcOEt (à 1000µg/disque) et de l'extrait MeOH (à 1000µg/disque) a été observée contre *Bacillus cereus*, puis contre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* et enfin *Streptococcus pneumoniae*. A 100µg/disque, la fraction F5 était encore active sur *Staphylococcus aureus*. Par contre l'activité de l'antibiotique de référence qui est la gentamycine à 10µg/disque est largement supérieure à ceux des extraits bruts. On note une résistance des bactéries GRAM(-) à ces derniers. Les valeurs de la CMI des extraits bruts sur *Bacillus cereus*, sur *Staphylococcus aureus* et sur *Streptococcus pyogenes* (les souches les plus sensibles) se situent entre 230 et 470 µg/ml.

L'extrait brut MeOH est actif sur souris avec une DL50 (24h) estimée entre 472 et 484mg/kg. Aucun effet significatif sur la fonction cardiaque (de 50 à 400µg/mL), hépatique, rénale, et pancréatique (à 52,3mg/kg, une dose quotidienne qui correspond au 1/10 de la DL100 par voie intrapéritonéale) n'a été observé avec cet extrait.

In vitro, Les extraits MeOH et AcOEt de feuille ont montré une activité antioxydante, avec respectivement une IC50 de 19,79µg/ml et 24,44µg/ml. Les extraits testés se sont avérés moins actifs que l'antioxydant standard, la vitamine C dont l'IC50 est de 3,94µg/ml.

DISCUSSION GENERALE

D'après les enquêtes ethnobotaniques réalisées sur le terrain, l'espèce *Astrotrichilia parvifolia* (feuilles) est utilisée dans la commune d'Ambatolaona pour soigner les plaies infectées et pour calmer la douleur au niveau des dents cariées.

Des tests préliminaires que nous avons effectués au LABASM (Rasolofonantenaina, 2012) ont montré qu'à une concentration de 800µg/disque, l'extrait brut aqueux de feuilles de la plante était plus actif vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (bactérie GRAM(+)) infectant les plaies) que *Streptococcus sanguis* (bactérie cariogène GRAM(+)) et *Enterococcus faecalis* (bactérie GRAM(+)) impliqué dans l'infection nosocomiale). Par contre, aucune activité n'a été observée sur *Salmonella typhimurium* (bactérie GRAM(-)), *Escherichia coli* (bactérie GRAM(-)) et *Candida albicans* (levure). Ces activités antibactériennes ont été largement confirmées par les études approfondies de différents extraits bruts de feuilles que nous avons menées sur *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* (bactérie GRAM(+)) responsable de l'intoxication alimentaire), *Streptococcus pneumoniae* (bactérie GRAM(+)) agent de la pneumonie lobaire aigüe, de suppuration et de septicémie surtout de la sphère ORL et sur *Streptococcus pyogenes* (qui fait partie des bactéries GRAM(+)) responsable des infections bénignes comme l'angine ou l'impétigo). **Ces résultats montrent que les extraits de feuilles d'*Astrotrichilia parvifolia* ont des activités antibactériennes, ce qui justifie le bienfondé scientifique de son utilisation empirique.**

Dans cette étude, l'activité la plus élevée de l'extrait AcOEt et de l'extrait MeOH a été observée contre *Bacillus cereus*, puis contre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* et enfin *Streptococcus pneumoniae*. A une concentration de 1000µg/disque, les extraits sont moins actifs que la gentamycine à 10µg/disque. Les bactéries GRAM(-) testées étaient résistantes aux mêmes extraits, cet effet pourrait être dû à leurs enveloppes cellulaires, qui servent de barrière à la pénétration des principes actifs. (Jodi A. et al., 2010; Soetan et al., 2006).

Les valeurs de la CMI se situent entre 230 et 470 µg/ml. Il est important de noter que jusqu'ici, il n'y a pas de consensus sur le niveau acceptable d'inhibition des produits naturels (Benko et al., 2010). Si on se réfère aux valeurs attribuées par Dalmarco et al. (2010), les deux extraits d'*Astrotrichilia parvifolia* ont des activités moyennes sur les germes tests.

Par contre, d'après l'échelle établie par Aligianis *et al.* en 2001, les extraits avec des CMI inférieurs à 500µg/ml ont d'excellentes activités. Comparée aux autres plantes appartenant à la famille des Méliacées, l'activité de l'extrait MeOH d'*Astrotrichilia parvifolia* est plus élevée que celle de *Xylocarpus granatum* contre *Streptococcus pyogenes* (CMI >1000 µg/ml) (Limsuwan and Voravuthikunchai, 2013). Cependant, l'extrait MeOH de *Melia azedarach* possède une activité plus élevée avec sa valeur respective de la CMI à 22,4 µg/ml et à 42,4 µg/ml contre *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*. Par rapport aux autres plantes antibactériennes étudiées au LABASM, les extraits d'*Astrotrichilia parvifolia* ont des activités moindres que les extraits MeOH de feuille de *Crotalaria bernieri* baill. sur *B. cereus* (CMI=97µg/ml) et sur *S. aureus* (CMI=195µg/ml) (Andriamampianina *et al.*, 2016). Pourtant, sur *B. cereus*, *Astrotrichilia parvifolia* est plus actif que les extraits bruts de *Ravenala madagascariensis* (CMI= 6,25 – 12,5mg/ml) (Rakotonandrasana, 2010) et *Dombeya macrantha* (CMI=3,12mg/ml) (Marina, 2015).

Les rapports d'activité (CMB/CMI) de nos extraits bruts se trouvent entre 1 et 1,98. Selon Marmonier (1988), tous nos extraits ont des activités bactéricides à l'égard des germes testés.

D'après les résultats du criblage phytochimique, nos extraits bruts contiennent des composés phénoliques (flavonoïdes, leucoanthocyanes, tanins et autres polyphénols), des saponines et des triterpènes. Les flavonoïdes et les leucoanthocyanes sont des agents antimicrobiens connus ayant plusieurs mécanismes d'action comme l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques, l'inhibition de la fonction membranaire du cytoplasme et du métabolisme énergétique (Tsuchiya *et al.*, 1996). Les tanins sont des agents antimicrobiens qui pourraient inhiber la croissance du microorganisme en précipitant les protéines et les privant ainsi de protéines nutritionnelles nécessaires à leur croissance et à leur développement (Haslam 1996). Les saponines sont aussi dotées d'activités antimicrobiennes (Eskandar *et al.*, 2015). Les triterpénoides extraites de *Cabralea canjerana* (Méliacées) sont capables d'inhiber l'activité de *Mycobacterium tuberculosis* (Leitao *et al.*, 2008). Cependant, la fraction semi-purifiée F5 qui est la seule fraction active ne contiendrait que des flavonoïdes. D'où, **les flavonoïdes seraient les familles chimiques responsables des activités antibactériennes.**

Les résultats des enquêtes que nous avons réalisées ont aussi révélé qu'*Astrotrichilia parvifolia*, en plus de son utilisation dans le traitement des plaies et dans le soulagement de la douleur au niveau des dents cariées, est également employée comme fortifiant ou tonifiant. Selon Goetz (2004), une substance à propriété fortifiante a souvent un pouvoir antioxydant. Ainsi, des tests réalisés sur les extraits MeOH et AcOEt de feuille ont montré une activité antioxydante. Avec une IC₅₀ de 19,79µg/ml, l'extrait MeOH a été le plus actif suivi de ceux de l'extrait AcOEt (IC₅₀= 24,44µg/ml). Cependant, les extraits testés se sont avérés moins actifs que l'antioxydant standard, la vitamine C dont l'IC₅₀ est de 3,94µg/ml. Les fruits de *Garcinia mangostana*, de *Citrus sinensis*, de *Vitis vinifera*, et de *Carica papaya* ont des IC₅₀ comprises entre 11,18 et 32,80µg/ml. Or, ces plantes sont considérées comme ayant des activités antioxydantes modérées (Surinrut et al., 2005). Par conséquent, **les extraits MeOH et AcOEt peuvent être classés parmi les extraits ayant des pouvoirs antioxydants moyens.**

La toxicité de l'extrait MeOH a été évaluée dans le but de fixer une marge de sécurité de l'utilisation traditionnelle de la plante. Sur souris, par voie orale, à moins de 523,8mg/kg de poids, l'extrait MeOH provoque un état agressif chez l'animal, mais une physiologie apparemment normale apparaît 1h après l'administration. Ce n'est qu'à une dose beaucoup plus élevée, de l'ordre de 6800mg/kg de poids que l'extrait MeOH provoque la mort. Plusieurs symptômes ont été révélés, dont principalement l'augmentation de la fréquence respiratoire, le traînement des pattes postérieures, l'enophtalmie et la piloérection. L'apparition d'une piloérection pourrait être due à une atteinte du système nerveux autonome, tandis que le traînement des pattes suggère une défaillance au niveau du système nerveux central. En outre, l'augmentation de la fréquence respiratoire pourrait être due à un effet au niveau du système cardiovasculaire et du système respiratoire et/ou nerveux. Tous ces symptômes conduisent à la mort de l'animal. Par voie intra-péritonéale, la DL₅₀ est estimée entre 472 et 484mg/kg. Cette valeur permet de classer notre plante comme faiblement toxique. En effet, d'après Ramade, 1979 le seuil des substances très toxiques est de 25mg/kg.

Comparé à des plantes médicinales déjà étudiées au LABASM, notamment l'extrait purifié d'amande d'*Adansonia rubrostipa* (plante à multiples usages nutritionnels, thérapeutiques et socio-économiques) (Ansufidine, 2014), l'extrait de feuilles de *Gambeya boiviniana* (le décocté de feuilles est utilisé pour guérir l'enfant à sujet des crises convulsives) (Rasoatahiana, 2005) dont les DL50 (24h) sont respectivement estimées entre 128,82mg/kg et 134,44mg/kg, 324,64mg/kg et 327,89mg/kg, 118,15mg/kg et 122,39mg/kg, l'extrait MeOH d'*Astrotrichilia parvifolia* est moins toxique. Cependant, il est plus toxique que l'extrait de feuilles de *Chassalia bojeriana* (plante utilisée, en décoction, pour traiter des maladies du foie et aussi pour le traitement de la goutte) (Randriamampianina, 2008), l'extrait de feuilles de *Schefflera longipedicellata* (plante utilisée contre les empoisonnements par les venins d'insectes, d'araignées, de scorpions ou de serpents)(Rasoloharijaona, 2008) dont les DL50 (24h) sont respectivement comprise entre 1,82 g/kg et 1,96 g/kg, 1,54 et 1,56 g/kg.

Bien qu'on ne puisse pas toujours extrapoler sur l'homme les résultats obtenus sur souris, les fortes concentrations et la voie d'administration utilisées rassurent sur l'innocuité du filtrat de feuille d'*Astrotrichilia parvifolia* utilisé pour soigner les plaies infectées et pour calmer la douleur au niveau des dents cariées. Etant donné que nos extraits sont actifs contre plusieurs germes pathogènes, son utilisation interne pour traiter des infections comme la toux, l'angine et l'infection gastro-intestinale pourrait être envisagée. De plus, l'extrait MeOH n'a aucun effet significatif sur la fonction cardiaque (de 50 à 400µg/mL), hépatique, rénale, et pancréatique (à 52,3mg/kg, une dose quotidienne qui correspond au 1/10 de la DL100 par voie intrapéritonéale). Ce qui suggère qu'à ces doses, notre extrait n'agit pas sur l'activité cardiaque, sur la fonction glomérulaire des reins, sur les hépatocytes et sur le pancréas. (Beaudeau *et al.*, 2011 ; Maxwell *et al.*, 2009 ; André-fouet *et al.*, 1999).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les résultats de nos travaux constituent des données pharmacologiques et chimiques sur la feuille d'*Astrotrichilia parvifolia*. Elles nous ont permis au terme de ce travail de :

- démontrer le bien fondé des utilisations empiriques de la plante,
- mettre en évidence d'autres propriétés pharmacologiques (activité antibactérienne et antioxydante). La faible toxicité des extraits permet d'envisager d'autres buts thérapeutiques,
- découvrir la nature chimique des principes antibactériens des feuilles de la plante.

Dans le futur, nous envisageons,

- de rassembler des fractions suffisantes pour pouvoir les tester à des concentrations requises à des tests antibiogrammes dans le but de comparer sa toxicité par rapport à celle des autres extraits de plante déjà étudiée,
- de déterminer la CMI et la CMB des 5 fractions,
- de doser les polyphénols totaux contenus dans les feuilles de la plante puisque la majorité des propriétés antioxydantes des plantes leur sont attribuées,
- de déterminer l'activité antioxydante et la toxicité de la fraction F5,
- de purifier la fraction F5,
- de déterminer la structure des molécules pures,
- d'étudier leur mécanisme d'action,
- d'étendre l'étude antibactérienne sur d'autres germes afin de déterminer le spectre d'activité de la plante,
- d'approfondir l'étude toxicologique afin d'améliorer l'usage en thérapie humaine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Adam F., Adam J.C., Hasselot N.** Intoxication par ingestion de ditakh (Sénégal). Med. Trop., 1991, 51: 455-458.
2. **Ahmad I., Mehmood Z., Mohammad F.** Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. Journal of ethnopharmacology, 1998, 62, 183–193.
3. **Akshatha S., Anbarasu K., and Vijayalashim G.** Resveratrol content and antioxidant properties of underutilized fruits. Food Science Technology, 2015, 52: 383-390.
4. **Alain G.** Plantes medicinales : plus de 900 tonnes exportées. Revue de presse, 2012.
5. **Aligianis N., Kalpoutzakis E., Mitaku S., Chinou I.B.J.** Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species. Agric Food Chem., 2001, 49 (9): 4168-41770.
6. **Alliwell H.B., Gutteridge J.M.** Free Radicals in Biology and Medicine. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 1993.
7. **Almagboul A.Z.; Bashir A.K.; Farouk A.; Salih A.K.M.** Antimicrobial activity of certain Sudanese plants used in folkloric medicine. Screening for antibacterial activity. Fitoterapia, 1985,56, 331-337.
8. **Amjad Hossain M.** Neem seed oil: Bangladesh. Examples of the Development of Pharmaceutical Products from Medicinal Plants. Bangladesh Council of Scientific and Industrial Research (BCSIR), 2005, 10: 59-63.
9. **André-Fouet X., Beaune J., Bozio A.** Cardiologie. Lyon : Presses universitaires, 1999, 728p.
10. **Andriamampianina H. L., Rakoto D. A. D., Petit T., Ramanankierana H., Randrianarivo H. R., Jeannoda V. L.** Antimicrobial activity of extracts from *Crotalaria bernieri* Baill.(Fabaceae). African Journal of Microbiology Research, 2016, 10 (31): 1229-1239.
11. **Ansufidine D.** Etudes chimique et toxicologique des extraits d'amande de graine d'*Adansonia rubrostipa*, une Bombacée endémique de Madagascar (Mémoire de DEA: Biochimie). Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2014 ; 67p.
12. **Arnason T., Hebda R.J., and Johns T.** Use of plants for food and medicine by Native Peoples of eastern Canada. Can. J. Bot., 1981, 59: 2189-2325.
13. **Asongalem E. A., Foyet H. S., Ngogang J., Folefoc G. N., Dimo T. and Kamtschouing P.** Analgesic and antiinflammatory activities of *Erigeron floribundus*. J. Ethnopharmacol., 2004, 91(2-3): 301-308.

14. **Badiaga M.** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith., une plante médicinale Africaine récoltée au Mali. Thèse de Doctorat. Mali : Université de Bamako, 2011.
15. **Bahorun T.** Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne .une source d’approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research council Mauritis, 1997, 83-94.
16. **Baillon H.** Histoire des plantes. Volume 5. Paris: Librairie hachette & compagnie, 1874.
17. **Baker J. T., Borris R.P., Carte B., Cordell G. A., Soejarto D. D., Gragg G.M., Gupta M.P., Iwu M.M., Madulid D.R. and Tyler V.E.** Natural products drug discovery and development: new perspectives on international collaboration. J. Nat. Prod., 1995, 58: 1325-1357.
18. **Balandrin M. F., Kinnghorn A. D., Farnsworth N. R.** Plant-derived natural products in drug discovery and development an overview in human medicinal agents from plants. San Francisco: American chemical society, 1993: 2-12.
19. **Beaudeux J.L., Durand G.** Biochimie médicale. Paris: Lavoisier, 2011, 54-300.
20. **BENBROOK M.** Accroître la teneur antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques. Ed. The organic center, 2005: 6-8.
21. **Benko I. A.M.; Crovella S.** Ethnobotanical bioprospection of candidates for potential antimicrobial drugs from Brazilian plants. Current Protein and Peptide Science, 2010, 11(3), 189-194.
22. **Berche P.** Une histoire de microbes. Mont rouge: John Libbey Euro text, 2007, 300p.
23. **Billing J., Sherman P. W.** Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot. Quaterly Review of Biology, 1998, 73 (1): 3-49.
24. **Blois M.S.** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 1958, 26: 1199–1200.
25. **Bors W., Michel C., Stettmaier K.** Antioxidant effects of flavonoids. Biofactors, 1997, 6: 399-402.
26. **Boua B. B., Mamrybekova-Bekro J. A., Kouame B. A., Bekro Y. A.** Criblage phytochimique et potentiel érectile de *Turraea heterophylla* de Côte d’Ivoire. Journal of Applied Biosciences, 2013, 68: 5394 – 5403.

27. **Bouharb H., El Badaoui K., Zair T., El amri J., Chakir S., Alaoui T.** Sélection de quelques plantes médicinales du Zerhoun (Maroc centrale) pour l'activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*. J. Appl. Biosci., 2014, 78: 6685-6693.
28. **Boullard B.** Plante médicinales du monde : réalités et croyances. Paris : ESTEM, 2001.
29. **Boustié J., Caubet A., Paris M.** Atlas des intoxications d'origine végétale. In : Encyclo. Med. Chir., Elsevier SAS Paris : Editions scientifiques et techniques. Toxicologie. Pathologie professionnelle, 2002, 29 p.
30. **Boutamina N. E.** Les fondateurs de la pharmacologie : A.I.M Al-Ghafiki - A.M.A. Ibn-Al-Baïtar - A.H. Al Dinawari - M.I.Z. Ar-Razi [Rhazès] - A.H. Ibn-Sina [Avicenne]. Paris : Books on demand, 2014, 201p.
31. **Boyd, E. M., Michael, D., and Abel, M.** "The Acute Toxicity of Barium Sulfate Administered Intragastrically". Can. Med. Assoc. J., 94 (16): 849-853.
32. **Brossat J.Y., Le Deaut J.Y., Ralamboranto L., Andriantsimahavandy A., Solar S., Gueguen A., Coulanges P.** Etude des propriétés immunostimulantes d'un extrait isolé à partir de l'*Aloe vahombe*: Protection de la fraction F1 contre des infections par *Listeria monocytogenes*, *Yersinia pestis*, *Candida albicans* et *Plasmodium berghei*. Arch.Inst.Pasteur / Mcar, 1987, 48 (1): 11-34.
33. **Bruneton J.** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. Paris : Lavoisier, 1993, 278-279.
34. **Bruneton J.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème éd. Paris : Lavoisier, 1999, 1120 p.
35. **Bruneton J.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4ème éd. Paris : Lavoisier, 2009, 1241 p.
36. **Burda S., Oleszek W.** Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. J. Agric. Food. Chem., 2001, 49: 2774-2779.
37. **Burkill H. M.** The useful plants of west tropical Africa. (Families EJ) Royal Botanical Gardens Kew, 1994, 90–94.
38. **Cao G., Sofic E., Prior R. L.** Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. Free Radic. Biol. Med., 1997, 22: 749-760.
39. **Carson C. F., Riley T. V.** Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. J. Appl. Bacteriol., 1995, 78 : 264–269.

40. **Catapano A. L.** Antioxidant effect of flavonoids. *Angiology*, 1997, 48, 39-44.
41. **Cathebras P.** « Le recours aux médecines parallèles observé depuis l'hôpital ». In : **Benoist J.** *Soigner au pluriel. Essais sur le pluralisme médical*. Paris : Karthala, 1996, 315-330.
42. **Celikel N., Kavas G.** Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech J. Food Sci.*, 2008, 26(3): 174-181.
43. **Chamandi G., Olama Z., Holail H.** Antimicrobial effect of Propolis from different geographic origins in Lebanon. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 2015, 4(4): 328-342.
44. **Champagne D.E., Koul D.E., Isman M.B., Scudder G.G.E., Towers G.H.N.** Biological activity of limonoids from the Rutales. *Phytochemistry*, 1992, 31: 377-394.
45. **Charles Denys J.** Antioxidant proprieties of spices herbs and other sources. Library of Congress Control Number 201246741, 2013, 3-39.
46. **Dalmarco J.B., Dalmarco E.M., Koelzer J., Pizzolatti M.G. and Fröde T.S.** Isolation and identification of bioactive compounds responsible for the anti-bacterial efficacy of *Lotus corniculatus* var. São Gabriel. *International Journal of Green Pharmacy*, 2010, 4: 108-114.
47. **Daniel P. R.** La Médecine chinoise par les herbes. Suisse: Edition Olizane, 1993.
48. **David W. J., Pethrick R. A., Pelzer L. E., Guardia T., Juarez A. O., Guerreiro E.** Acute and chronic anti-inflammatory effects of plant flavonoids. *Farmaco*, 1998, 53 (6): 421-424.
49. **Deans S. G. and Svoboda K. P.** Biotechnology and bioactivity of culinary and medicinal plants. *Ag. Biotech. News and Information*, 1990, 2: 211-216.
50. **Deans S. G. and Svoboda K. P.** The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorna*) volatile oil. *Flavour and Fragrance. J.*, 1990, 5: 187-190.
51. **Debray M.** Médecine et Pharmacopée traditionnelles à Madagascar. *Etudes Médicales*, 1975, 1: 69-85.
52. **Debray M., Jacquemin H., Razafindrambao R.** Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar. Travaux et documents de l'ORSTOM n°8. Paris: ORSTOM, 1971, 150 p.
53. **Debray M., Jacquemin H., Razafindrambao R., Reed R. L. J. and Muench H.** "Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Points." *Am. J. Hyg.*, 1938, 2: 493.
54. **Delaveau, P., Michelle L., François M., Caroline, Abbé R. S.** Secrets et vertus des plantes médicinales. Paris: Reader's Diges, 1985.

55. **Desprès C.** Soigner par la nature à la Réunion : l'usage des plantes médicinales comme recours thérapeutique dans la prise en charge du cancer, *Anthropologie & Santé* n°2 [en ligne : <http://anthropologiesante.revues.org/710>], 2011.
56. **Diallo D.** Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them: *Glinus oppositifolius* (Aizoaceae), *Diospyros abyssinica* (Ebenaceae), *Entada africana* (Mimosaceae), *Trichilia emetica* (Meliaceae). (Thèse de doctorat), Lausanne, 2000, 148-176.
57. **Dibong S.D., Engone Obiang N.L., Ndongo Din, Priso R.J., Taffouo V., Fankem H., Sallé G., Missoup A.D., Boussim I.J., Amougou A.** An assessment on the uses of Loranthaceae in ethnopharmacology in Cameroon: A case study made in Logbessou, North of Douala. *J. Med. Pl. Res.*, 2009, 3(8): 592-595.
58. **Dibong S.D., Mony R., Ladoh C.F., Boussim I.J., Amougou A.** Parasitism evolution of Loranthaceae in the Ndogbong chiefdom's orchard (Douala, Cameroon). *Int. J. Plt. An. Env. Sci.*, 2011, 1 (3): 2231-4490.
59. **Djeussi D.E., Noumedem J.A.K., Seukep J.A., Fankam A.G., Voukeng I.K., Tankeo S.B., Nkuete A.H.L., Kuete V.** Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram bacteria. *BMC Complement. Altern. Med.*, 2013, 13(164): 1-8.
60. **Duke J.A.** Handbook of Medicinal Herbs. Boca Roton, FL: CRC Press, 1985.
61. **Duke J.A.** Medicinal plants and the pharmaceutical industry. In new Crops. New York: Janick J. and Simon J.E.; John Wiley and Sons. Inc., 1993: 664-669.
62. **Duval J. et Soussy C. J.** Antibiothérapie, 4ème éd. Paris: Masson, 1991, 188p.
63. **Eloff J.N.** Which extract should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 1998, 60: 1-8.
64. **Ermel K.E., Pahlich E. et Schmutterer H.** Azadirachtin content of neem kernels from different geographical locations, and its dependence on temperature, relative humidity and light. *Proc. 3rd Int. Neem Conf. Nairobi, Kenya*, 1986, 171-184.
65. **Eskandar M., Somayeh H.** Saponin: Properties, methods of Evaluation and Applications. *Science domain int.*, 2015, 5(3): 207-220.
66. **Essawi T., Srour M.J.** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Ethnopharmacol.*, 2000, 70(3): 343-349.

67. **Evans J.** Mistletoe: Good for more than free kisses. *Journal of American Botanical Council*, 2005, 68: 50-59.
68. **Fawole O.A., Finnie J.F., Van S. J.** Antimicrobial activity and mutagenic effects of twelve traditional medicinal plants used to treat ailments related to the gastro- intestinal tract in South Africa. *South Africa Journal of Botany*, 2009, 75: 356-362.
69. **Fernández M., Caballero J., Helguera A. M., Castro E. A. and. Gouzález M. P.** Quantitative structure-activity relationship to predict differential inhibition of aldose reductase by flavonoid compounds. *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, 13 (9): 3269-3277.
70. **Ferron A.** Bactériologie médicale. 15ème éd. Paris : C et R, 1994; 472p.
71. **Fiedman et Young.** Effects of disease on Clinical Laboratory Tests. 4th ed. AACC Press, 2001.
72. **Flesh F., Krencker E.** Intoxications par les végétaux. *Encyclo. Med. Chir.*(Editions scientifiques et techniques, Elsevier SAS Paris), 2003, 11p.
73. **Fong E.H.S., Tin-Wa M., Farnsworth N.R., Dobberstein R.H.** Phytochemical screening methods. *Rev. Department of pharmacognosy and pharmacology. College of pharmacy. University of Illinois*, 1977: 73-126.
74. **Ghedira K.** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 2005, 4 : 162-169.
75. **Gil B., Sanz M. J., Ferrándiz M. C., Terencio M., Bustos G., Paya M., Gunasegaran R. and Alcaraz M.J.** Effects of flavonoids on Naja Naja and human recombinant synovial phospholipases A2 and inflammatory responses in mice. *Life Sci.*, 1994, 54 (20), 333-338.
76. **Girre L.** Les plantes et les médicaments. France : Delachaux et Niestlé, 2006, 253p.
77. **Goetz P.** Les plantes immunostimulantes adjuvantes de la thérapeutiqueantitumorale. *Phytothérapie*, 2004, 6 : 180-182.
78. **Gómez - Caravaca A. M., Gómez - Romero M., Arráez - Román D., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A.** Advances in the analysis of phenolic compound in products derived from bees. *Journal of Pharmacology and Biomedicine Analysis*, 2006, 41: 1220- 1234.
79. **Goossens H., Guillemot D., Ferech M., Schlemmer B., Costers M., Van Breda M., Baker L. J., Cars O., Davey P. G.** National campaigns to improve antibiotic use. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2006, 62 (5): 373-379.

80. **Gonçalves L. S., Leitão S. G., Delle Monache F.** *In vitro* antiviral effect of flavonoid-rich extracts of *Vitex polygama* (Verbenaceae) against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. *Phytomedicine*, 2001, 8 (6), 477-480.
81. **Govindappa M., Bharath N., Shruthi H.B., Sadananda T.S., Sharanappa P.** Antimicrobial, antioxidant and *in vitro* antiinflammatory activity and phytochemical screening of *Crotalaria pallid* Aiton. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2011, 5(21): 2359-2371.
82. **Gülçin İ.** Antioxidant and antiradical activities of l-carnitine. *Life Sci.*, 2006, 78: 803–811.
83. **Gurib-Fakim A.** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 2006, 27: 1-93.
84. **Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Arnoma O.L.** The deoxyribose method: A simple test tube assay for the determination of rate constant for reaction of hydroxyl radical. *Anal Biochem.* , 1987, 1: 215-219.
85. **Hanasaki Y., Ogawa S., Fukui S.** The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med*, 1994, 16: 845-850.
86. **Harbone J. B., Williams C. A.** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 2000, 55: 481- 504.
87. **Harinantenaina L., Brodie P. J., Callmander M. W., Randrianaivo R., rakotonandrasana S., Rasamison V. E., Rakotobe E., Ringston D. G.** Astrotricoumarin, an antiproliferative 4'-hydroxy-2',3'-dihydroprenylated methylcoumarin from an *Astrotrichilia* sp. from the Madagascar Dry Forest. *Nat. Prod. Commun.*, 2011, 6(9): 1259–1262.
88. **Harvey A.L.** *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2007 (11), 480p.
89. **Haslam E.** *Plant Polyphenols*. Cambridge University Press, 1989, 14-15.
90. **Haslam E.** Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J Nat Prod.*, 1996, 59: 205–215.
91. **Havsteen B. H.** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therap.*, 2002, 96, 67-202.
92. **Henke H.** Preparative gel chromatography on sephadex LH-20. Heidelberg: Huthig, *Chromatography methods*, 1995.
93. **Hodgson E. and Cunny H.** *Toxicity Testing: A Textbook of Modern Toxicology*. New Jersey: Hoboken, 2010, 4: 409-456.

94. **Hoerhammer L., Wagner H., Hein K.** Silica gel-thin layer chromatography of flavonoids. *Journal of chromatography*, 1964, 13: 235-237.
95. **Holetz F. B., Pessini G. L., Sanches N. R., Cortez D.A.G., Nakamura C. V., Filho B.P.D.** Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2002, 97: 1027-1031.
96. **Hopkins W. G.** *Physiologie végétale*. 1^{ère} ed. Bruxelles : De Boeck & Larcier s. a., 2003.
97. **Ikan R., Kashman J., Bergmann E. D.** Thin-layer chromatography of tetra- and pentacyclic triterpenes. *Journal of chromatography*, 1964, 14: 275-279.
98. **Ikram M.; Inamul H.** Screening of medicinal plants for antimicrobial activities. *Fitoterapia*, 1984, 55: 62-64.
99. **Iserin P.** *Larousse des plantes medicinales: Identification, préparation, soins*. Ed. Larousse, 2001, 10p.
100. **Iwu M.W., Duncan A.R., Okunji C.O.** New antimicrobials of plant origin. In: **Janick J.** *Perspectives on new crops and new uses*. USA: ASHS Press Alexandria, 1999, 457–462.
101. **Jean J. M., Annie. F., Chrystian. J. L.** Les composés phénoliques des végétaux, 2005:203- 204.
102. **Jeau, J. M., Annie. F., Chrystian. J. L.** Les composés phénoliques des végétaux, 2005, 203- 204.
103. **Jodi A. Lindsay, Julia M.-L., Stephen H. G., Timothy D.** *Antibiotic Resistance Protocols*. Second edition. Libgen librarian, 2010, 222–236.
104. **Jorgensen L.V., Madsen H.L., Thomsen M.K., Dragsted L.O., Skibsted L.H.** Regulation of phenolic antioxidants from phenoxyl radicals: An ESR and electrochemical study of antioxidant hierarchy. *Free Radic. Res.*, 1999; 30:207-220.
105. **Judd W. S., Campbell C. S., Kellogg E. A., Stevens P.** *Botanique systématique: Une perspective phylogénétique*. 2e éd. Paris : De Boeck Supérieur, 2002.
106. **Junaid S. A., Olabode A. O., Onwuliri F. C., Okwori A. E. J. and Agina S. E.** The antimicrobial properties of *Ocimum gratissimum* extracts on some selected bacterial gastrointestinal isolates. *African Journal of Biotechnology*, 2006, 5(22): 2315 – 2321.
107. **Kassel D.** *Des hommes et des plantes*, In : *Histoire de la pharmacie*, 2003.

108. **Kim H. P., Pham H. T., Ziboh V. A.** Flavonoids differentially inhibit guinea pig epidermal cytosolic phospholipase A2. *Prostag, Leukotr Ess Fatty Acids*, 2001, 65 (5-6): 281-286.
109. **Konno K., Miura M., Toriyama M., Motohashi S., Sawamura R., Watanabe W., Yoshida H., Kato M., Yamamoto R., Yasukawa K., & Kurokawa M.** Antiviral activity of diarylheptanoid stereoisomers against respiratory syncytial virus *in vitro* and *in vivo*. *J. Nat. Med.*, 2013, 67: 773-781.
110. **Kordali S., Cakir A., Drum M.** Antifungal activity of the leave of three Pistacies from Turkey. *Fitoterapia*. 2003, 74: 164–167.
111. **Korkina L. G., Afanas'ev I. B.** Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol.*, 1997, 38: 151-163.
112. **Krief, S.** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal. (thèse de doctorat). Muséum national d'histoire naturelle, 2003,32p.
113. **Kubmarawa D., Ajoko G. A., Enwerem N. M. & Okorie D. A.** Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of 50 medicinal plants of Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 2007, 6(14): 1690-1696.
114. **Kuete V., Fozing D.C., Kapche W.F.G.D., Mbaveng A.T., Kuate J.R., Ngadjui B.T., Abega Z.B.M.** Antimicrobial activity of the methanolic extract and compounds from *Morus mesozygia* stem bark. *Journal ethnopharmacologie*, 2009, 124(3): 551-555.
115. **Langlois A.** The chemical investigation of four medicinal plants. (Master : Chemistry). University of Natal, 2000, 56-65.
116. **Lapointe G.** Notions de Toxicologie: Commission de la santé et de la sécurité du travail, 2004, 2: 16-20.
117. **Laughton M. J., Evans P. J., Moroney M. A.** Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol*, 1991, 42 (9): 1673-1681.
118. **Leblanc G. A.** Acute toxicity: A Textbook of Modern Toxicology. New Jersey: Hoboken, 2010, 4: 125-126.
119. **Lee D. S., Kim N. S., Lee S. H.** 2, 2-Diphenyl-1- picrylhydrazyl Hydrate, a Stable Free Radical, Isan α -Glucosidase Inhibitor. *Journal of Biological & pharmaceutical bulletin*, 2001; 24 (6): 727-728.

120. **Lee K.W., Kim Y. J., Lee H. J. et Lee C. Y.** Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51: 7292-7295.
121. **Leitao G., Abrus L. F., Costa N. F., Leitao S. G.** Preparative isolation of Antimycobacterial shoreic acid from *Cabralea canjerana* by high speed counters current chromatography. *Natural product communication*, 2008, 3(12): 1941-2166.
122. **Leroy, J. F. & Lescot M.** Taxons nouveaux de Trichiliaeae (Meliaceae-Melioideae) de Madagascar. [*Bull. Mus. Natl. Hist. Nat., B, Adansonia, sér. 4*](#) , 1996, 18: 3–34.
123. **Lewis K.** In search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps. *Journal of molecular Microbiology and technology*, 2001, 3 (2): 247-254.
124. **Lewis K., Ausubel F.M.** Prospects for plant-derived antibacterials. *Nature Biotechnology*, 2006, 24 (12): 1504-1507.
125. **Limsuwan S., Voravuthikunchai S.P.** Anti-*Streptococcus pyogenes* activity of selected medicinal plant extracts used in Thai Traditional Medicine. *Trop. J. Pharm. Res.*, 2013, 12: 535–540.
126. **Lin J., Opoku A.R., Geheeb-Keller M., Hutchings A.D., Terblanche S.E., Jager A.K., van Staden J.** Preliminary screening of some traditional Zulu medicinal plants for anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 1999, 68: 267–274.
127. **Linthoingambi W., Mutum S.S.** Antimicrobial activities of different solvent extracts of *Tithonia diversifolia* (Hemsely) A. Gray. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2013, 3(5): 50-54.
128. **Loubaki B.C., Ouattara A.S., Ouattara C.A.T., Ouédraogo/Traoré R., Traoré A.S.** Activités antimicrobiennes des extraits aqueux totaux de *Detarium microcarpum* [Cesalpinaceae (Guill. et Perr.)] sur huit espèces bactériennes impliquées dans certaines maladies au Burkina Faso. *Rev. CAMES - Sciences et Médecine*, 1999, 01 : 66-73.
129. **Lu F. C.** *Toxicologie : Données générales, procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque*. Paris : MASSON, 1992, 360p.
130. **Macheix J. J., Fleuriet A., Jay-Allemand C.** Les composés phénoliques des végétaux: Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Presses Polytechniques et Universitaires Romandes*, 2005.

131. **MacKinnon S., Durst T., Arnason J.T., Angerhofer C. Pezzuto J. Sanchez-Vindas P. E., Poveda L. J., Gbeassor M.** Antimalarial activity of tropical Meliaceae extracts and gedunin derivatives. *Journal of Natural Products*, 1997, 60: 336-341.
132. **Mada environnement.** Plantes médicinales [en ligne]. Disponible sur : http://www.mada-environnement.org/index.php?option=com_content&view=article&id=72&Itemid=99 [2011].
133. **Marina A.** Etudes chimique et toxicologique des extraits de feuilles de *Dombeya macrantha*, une malvacée endémique de Madagascar (Mémoire de DEA : Biochimie). Faculté des Sciences : Université d'Antananarivo, 2015.
134. **Marini-Bettolo G.B., Nicoletti S.P.M.** Plant screening by chemical and chromatographic procedure under field conditions. *J. Chromatogr.*, 1981, 218: 113-217.
135. **Marmonier, A. A.** Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. In : *Bactériologie Médicale, technique usuelles*. 3ème éd. Paris : Doin, 1990, 227-236.
136. **Maxwell P. H., Pradel S., Rouprêt M.** Néphrologie. Bruxelles : De Boeck, 2009, 57-66.
137. **Mbaye D. D., Seck M., Sy G. Y., Faye J. M., Sarr A., Faye Bir. , Faye Bab.** Activite antiinflammatoire de la graine de *carapa procera* (Meliaceae). *Sciences Struct.* 1, 2013.
138. **Mela C.** Presence of substances having antibiotic action in the higher plants. *Fitoterapia*, 1950, 21: 98-99.
139. **Middleton E. J., Kandaswami C., Theoharides T. C.** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*, 2000, 52: 673-751.
140. **Mishra A., Neema M., Poonam N., Priyanka P.** Antibacterial effects of crude extract of *Azadirachta indica* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Sci. Environ. Technol.*, 2013; 2: 989–993.
141. **Mohammedi Z.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. (Thèse de doctorat). Tlemcen : Faculté des sciences, 2006.
142. **Molassiotis A., Fernandez-ortega P., Pud D., Ozden G., Scott J.A., Pantelli V.** « Use of complementary and alternative medicine in cancer patients : a European survey », *Annals of Oncology*, 2005, 16 (4) : 655-663.

143. **Montoro P., Braca A., Pizza C., De Tomamasi N.** Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chem*, 2005, 92: 349-355.
144. **Moreno P.R.H., Agripino D.G., Lima M.E.L., da Silva M.R., Meda C., da Silva Bolzani V., Cordeiro I., Young M.C.M.** Screening of Brazilian plants for antimicrobial and DNA damaging activities. In: *Atlantic Rain Forest. Ecological Station Juréia-Itatins. Biota Neotrop*, 2004.
145. **Muanda N. F., Koné D., Dicko A., Soulimani R., Younos C.** Phytochemical composition and antioxidant capacity of three Malian Medicinal plant parts Méliaceae, 2009.
146. **Mulholland D.A., Nair J.J., Taylor D.A.H.** Astrotrichilin, a limonoid from *Astrotrichilia asterotricha*. *Phytochemistry*, 1996, 42: 1239–1241.
147. **Mulholland D.A., Randrianarivelosia M., Lavaud C., Nuzillard J.M., Schwikkard S.L.** Limonoid derivatives from *Astrotrichilia voamatata*. *Phytochemistry*, 2000, 53: 115–118.
148. **Mulholland D.A., Schwikkard S.L., Randrianarivelosia M.** Limonoid from *Astrotrichilia voamatata*. *Phytochemistry*, 1999, 52: 705–707.
149. **Murphy R.** Implementation of strategies to control antimicrobial resistance. *Chest*, 2001, 119 (2): 405S-411S.
150. **Nakagawa Y.** Initiation of apoptotic signal by the peroxidation of cardiolipin of mitochondria. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1011: 177-184.
151. **Nakatani M., Abdelgael S.A.M., Kurawaki J., Okamura H., Iwagawa T., Doe M.** Antifeedant rings B and D opened limonoids from *Khaya senegalensis*. *J. Nat. Prod*, 2001, 65: 1261–1265.
152. **Natalie W., Philippe B., Pierre-Michel F., Mathieu G., David K.** L’huile de carapa (*Carapa spp.*, Meliaceae) en Afrique de l’Ouest : utilisations et implications dans la conservation des peuplements naturels. *Fruits*, 2009, 65 : 343–354.
153. **Ngameni B., Kuete V., Simo I.K., Mbaveng A.T., Awoussong P.K., Patnam R.R., Ngadjui B.T.** Antibacterial and antifungal activities of the crude extract and compounds from *Dorstenia turbinata* (Moraceae). *S. Afr. J. Bot.*, 2009, 75: 256-261.

154. **Nielsen E.M., Engberg J., Fussing V., Petersen L., Brogren C.H., On S.L.** Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000; 38: 3800–3810.
155. **Nijveldt R. J., van Nood E., van Hoorn D.E.C., Boelens P.G, Van Norren K.and Van Leeuwen P.A.** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nut.*, 2001, 74 (4): 418-425.
156. **Normak H. B., Normak S.** Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 2002, 252 (2): 91-106.
157. **OCDE.** Résumé des considérations du rapport des groupes d'experts de l'OCDE sur la toxicologie à court et à long terme. Paris : OCDE, 1979, 1(4) : 1-15.
158. **OMS.** Résistance aux antimicrobiens. Aide-mémoire N°194 Mai 2015
159. **Osborn E. N.** On the occurrence of antibacterial substances in green plants. *Britain Journal of Experimental Pathology*, 1943, 24: 227.
160. **Paritala V., Chiruvella K. K., Thammineni C., Ghanta R. G., Mohammed A.** Phytochemicals and antimicrobial potentials of mahogany family, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2015(25): 61-83.
161. **Park S., Yang S., Ahn D., Heon Y.J and Kim D.K.** Antioxidative Phenolic Compounds from the Whole Plant of *Juncus diastrophanthus*. *Journal Korean Society for Applied Biological. Chemistry*, 2011, 54: 685-692.
162. **Pastre J., Priymenko N.** Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue Méd. Vét.*, 2007, (4) :187p.
163. **Paul G., Kamel G.** Phytothérapie anti-infectieuse. Springer : Paris, (s.d.).
164. **Pedneault K., Léonhart S., Angers P., Gosselin A., Ramputh A., Arnason J. T. et Dorais M.** Influence de la Culture Hydroponique de Quelques Plantes Médicinales sur la Croissance et la Concentration en Composés Secondaires des Organes Végétaux. Texte de conférence - 5ème Colloque sur les produits naturels d'origine végétale. Canada : Université Laval, 2001, 2p.
165. **Pernet R. et Meyer G.** Pharmacopée de Madagascar. Publication de l'Institut de recherches scientifiques de Madagascar, 1957, 86 p.
166. **Peter H. R., Ray F. E., Susan E. E., Jules B., Charles-Marie E.** Biologie végétale. Paris : De Boeck Université, 2000.
167. **Pietta P.G.** Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 2000, 63: 1035-1042.

168. **Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O.** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, 1999, 4(5) : 133- 138.
169. **Ponce A.G., Fritz R., del Valle C. and Roura S.I.** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 2003, 36: 679-684.
170. **Popovici C., Saykova I., Tylkowski B.** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 2009, 4 : 25-39.
171. **Puri H.S.** *Neem: The Divine Tree Azadirachta indica*. CRC press: Amazon France, 2003.
172. **Pyun M.S., Shin S.** Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine*, 2006, 13(6): 394-400.
173. **Quetin-Leclercq J.** Le voyage insolite de la plante au médicament. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 2002, 57 (2) : 11-20.
174. **Rabesa Zafera A.** *Pharmacopée d'Alaoatra*. CIDST. Antananarivo : Imprimerie Tatsinanana, 1986, 288 p.
175. **Raharimanana M.** Etudes biologique et chimique d'extraits d'écorce de *Mystroxyton aethiopicum* (CELASTRACEAE). (Mémoire de DEA : Biochimie). Université d'Antananarivo : Faculté des Sciences, 2015.
176. **Rakoto-Ramiarantsoa H.** Chair de la terre, œil de l'eau: paysanneries et recompositions de campagnes en Imerina, Madagascar. Paris : Editions de l'ORSTOM, 1995, 370p.
177. **Ralamboranto L.** Isolement, identification structurale et études des propriétés immunostimulantes d'un extrait polysaccharidique d'une Liliacée malgache : l'*Aloe vahombe*. (Thèse d'ETAT). Université de Madagascar, 1988.
178. **Ralamboranto L., Rakotovao L.H., Le Deaut J.Y., Chassoux D., Salomon J.C., Fournet B., Montreuil J., Rakotonirina A.P.J., Dulat C., Coulanges P.** Etudes des propriétés immuno-modulatrices d'un extrait isolé et partiellement purifié à partir de l'*Aloe vahombe*. Etudes des propriétés antitumorales et contribution à l'étude de la nature chimique du principe actif. *Arch.Inst.Pasteur/Mcar*, 1982; 83, 50 (1): 227-256.

179. **Ralamboranto L., Rakotovo L.H., Le Deaut J.Y., Chassoux D., Salomon J.C., Fournet B., Montreuil J., Rakotonirina A.P.J., Dulat C., Coulanges P.** Etudes des propriétés immuno-modulatrices d'un extrait isolé et partiellement purifié à partir de l'*Aloe vahombe*. Etudes des propriétés antitumorales et contribution à l'étude de la nature chimique du principe actif. Arch.Inst.Pasteur/Mcar, 1982/83, 50 (2): 27-256.
180. **Ramade E.** Ecotoxicologie. Paris: Masson, 1979; 228 p.
181. **Randriamampianina L. J.** Etudes chimique et biologique des extraits de feuilles d'une plante médicinale malgache *chassalia bojeriana* (RUBIACEES). [Mémoire de DEA: Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2008 ;62 p.
182. **Randrianarison N.** Etudes chimique et toxicologique des principes antimicrobiens des graines de *Crotalaria micans* Link (FABACEAE) (Mémoire de DEA : Biochimie). Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2017; 52 p.
183. **Ranganna S.** "Handbook of analysis and quality control for fruit and vegetable products". New Delhi: Tata McGraw-Hill, 1986.
184. **Rasoanaivo P.** Une banque de données sur les plantes médicinales de Madagascar. *Info-Essences*, 2000, 15 : 5-6.
185. **Rasoatahina V.** Etude chimique et toxicologique des principes toxiques de *Gambeya boiviniana* (SAPOTACEAE). [Mémoire de DEA: Biochimie]. Antananarivo; Université d'Antananarivo, 2005; 75 p.
186. **Rasolofonantenaina R.** Etudes chimique et biologique des extraits de feuilles d'*Astrotrichilia parvifolia* (MELIACEAE). (Mémoire de DEA : Biochimie). Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2012 ; 57 p.
187. **Rasoloharijaona F. Y.** Etudes chimique et toxicologique d'une plante médicinale malgache, *Schefflera longipedicellata* (ARALIACEAE). (Mémoire de DEA: Biochimie). Antananarivo; Université d'Antananarivo, 2008 ; 57 p.
188. **Ravelomanana-Razafintsalama.** Etudes chimique et biologique d'une plante médicinale malgache *Dilobeia thouarsii* (Proteaceae). (Thèse de Doctorat). Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2012.
189. **Redrejo-Rodriguez M., Tejeda-Cano A., Del Carmen Pinto M., Macias Pedro.** Lipxygenase inhibition by flavonoids: semiempirical study of the structure–activity relation. J Mol Struct: THEOCHEM, 2004, 674 (1-3): 121-124.

190. **Reichl F. X.** Guide pratique de toxicologie. 2ème Ed. Bruxelles:DeBoeck et Larcier, 2004, p16.
191. Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (Raisin). « Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2012 ». Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire, 2013. 181 p.
192. **Rice-Evans C. A., Miller N. J.** Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans*, 1996, 24: 790-795.
193. **Robert L., Godeau G.M, Gavignet-Jeannin G., Groult N., Six C., Robert A.M.** Path. Biol., 1990, 38: 608.
194. **Roberts M. F., Wink M.** Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. New York: Plenum Press, 1998.
195. **Roger C.** Impact des pesticides chimiques et biologiques sur la survie et l'efficacité de prédation de *Coleomegilla maculata* lengi Timberlake (Coleoptera : Coccinellidae). Mémoire de maîtrise en biologie. Montréal : Université du Québec, 1992, 76 p.
196. **Rybak M. J.** Resistance to antimicrobial agents: an update. *Pharmacotherapy*, 2004, 24 (12): 203S-215S.
197. **Sadik C. D., Sies H., Schewe T.,** Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure–activity relations and mode of action. *Biochem Pharmacol*, 2003, 65 (5): 773-781.
198. **Sallé G, Tuquet C, Raynal-Roques A.** Biologie des Phanérogames parasites. C. R. Soc, 1998.
199. **Sandeep K., Shrivastava B., and Khajuria R.K.** Antimicrobial activity of *Crotalaria Burhia* Buch.-Ham. Root. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 2010, 1(4): 481-484.
200. **Sawamura R., Shimizu T., Sun Y., Yasukawa K., Miura M., Toriyama M., Motohashi S., Watanabe W., Konno K., & Kurokawa M.** *In vitro* and *in vivo* anti-influenza virus activity of diarylheptanoids isolated from *Alpinia officinarum*. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 2010, 21:33–41.
201. **Scalon Cunha L.C., Andrade e Silva M.L., Cardoso Furtado N.A., Vinhólis A.H., Gomes Martins C.H., da Silva Filho A.A., Cunha W.R.Z., Naturforsch C.** Antibacterial activity of triterpene acids and semi-synthetic derivatives against oral pathogens. 2007, 62(9-10): 668-672.

202. **Schmitz O.** *Les médecines en parallèles*. Paris : Karthala, Collection Médecines du monde, 2006.
203. **Schwartz D.** Méthode statistique à l'usage des médecins et des biologistes. Médecine Sciences Flammarion, 3ème édition, 1969: 41-56.
204. **Sen A., Batra A.** Evaluation of antimicrobial activity of different solvent extracts of medicinal plant: *Melia Azedarach*. L. Int. J. Curr. Pharm. Res., 2012; 4: 67–73.
205. **Senji Sakanaka, Mujo Kim, Makoto Taniguchi & Takehiko Yamamoto.** Antibacterial Substances in Japanese Green Tea Extract against *Streptococcus mutans*, a Cariogenic Bacterium. Agricultural and Biological Chemistry, 1989, 53(9): 2307-2311.
206. **Serkedjieva J., Ivancheva S.** Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. J Ethnopharmacol, 1998; 64 (1): 59-68.
207. **Sharif M.D.M., Banik G.R.** Status and Utilization of Medicinal Plants in Rangamati of Bangladesh. Res. J. Agric. Biol. Sci., 2006, 2(6): 268-273.
208. **Shimada, K.; Fujikawa, K.; Yahara, K.; Nakamura, T.** Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. J. Agric. Food Chem. 1992, 40: 945–948.
209. **Silva N. C. C., Fernandes Júnior A.** **Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity.** The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 2010, 16: 402 – 413.
210. **Soetan K.O., Oyekunle M.A., Aiyelaagbe O.O., Fafunso M.A.** Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of *Sorghum Bicolor* L. Moench. Afr. J. Biotechnol., 2006; 5: 2405-2407.
211. **Solar S., Zeller H., Rasolofonirina N., Coulanges P., Ralamboranto L., Andriantsimahavandy A., Rakotovo L.H., Le Deaut J.Y.** Mise en évidence et étude des propriétés immunostimulantes et antitumorales d'un extrait isolé et partiellement purifié à partir de l'*Aloe vahombe*. Arch.Inst.Pasteur /Mcar, 1980, 47(1) : 9-39.
212. **Srinivasan D., Perumalsamy L., Nathan S., Sures T.** Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. Journal of Ethnopharmacol. 2001; 94: 217–222.
213. **Stahl E.** Dünnschicht-chromatographie, Ein Laboratoriumshandbuch, zweite Auflage. Heidelberg, New York: Springer-Verlag Berlin, 1967.

214. **Sukhdev S., Handa S., Preet S., Khanuja G., Longo D., Dutt R.** “Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants”. International center for science and high technology Review, 2008.
215. **Svoboda K. P., Hampson J.B.** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW, 1999.
216. **Tanguy M.** Antioxydants Première partie : Les antioxydants dans l'alimentation. Médecine, 2009, 5 (6): 256-260.
217. **Taylor D.A.H.** In: Barton Sir, D., Ollis, W.D. (Eds.), Advances in Medicinal Phytochemistry. London: John Libbey, 1986, p179.
218. **Tegos G., Termitz F.R., Lomovskaya O., Lewis K.** Multidrug Pump Inhibitors Uncover Remarkable Activity of Plant Antimicrobials. Antimicrobial agents and Chemotherapy, 2002, 46 (10): 3133-3141.
219. **Timbo B.** Etude phytochimique des activités biologiques de *Trichilia emetica* VAHL (Meliaceae). (Thèse de Doctorat). Université de bamako, 2003.
220. **Timbrell J.** Principles of biochemical toxicology. Taylor et Francis, 2000;3: 1-390.
221. **Trevan J.** The error of determination of toxicity. Proc R Soc.; 1927101B: 483–514.
222. **Tsuchiya H., Sato M., Miyazaki T., Fujiwara S., Tanigaki S., Ohyama M., Tanaka T., Iinuma M.** Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Ethnopharmacol., 1996; 50: 27–34.
223. **Van acker S., Tromp M., Haenen G.R.M.M., Van Der Vijgh W., Bast A.** Flavonoids as scavengers of nitric oxide Radical. Biochem. Biophys. Res. Co., 1995; 214 (3):755-759.
224. **Varma D., Kinoshita J. H.** Inhibition of lens aldose reductase by flavonoids. Their possible role in the prevention of diabetic cataracts. Biochem Pharmacol., 1976, 25 (22): 2505-2513.
225. **Vercauteren J.** Plan, formules et illustrations du cours de Pharmacognosie. 2^{ème} cycle des études de Pharmacie. Montpellier I, 2001.
226. **Verma A., Joshi P., Arya A.** Screening of eight plants extracts for their antimicrobial properties. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci., 2013, 2: 315–320.

227. **Verpoorte R., Van der Heijden R. Ten Hoopen H. J. G., Memelink J.** Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnol. Lett.*, 1999; 21: 467-479.
228. **Villar A., Gasco M. A., Alcaraz M. J.** Some aspects of the inhibitory activity of hypolaetin-8-glucoside in acute inflammation. *J Pharm Pharmacol.*, 1987, 39 (7): 502-507.
229. **Vinay K. S., Dinesh K. S.** Pharmacological Effects of Garlic (*Allium sativum* L.). *ARBS*, 2008, 10: 6-26.
230. **Wagner, S. B.** Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas. Von, 2è ed. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1996.
231. **Weber N., Birnbaum P., Forget P., Gueye M., Kenfack D.** L'huile de carapa (*Carapa spp.*, Meliaceae) en Afrique de l'Ouest : utilisations et implications dans la conservation des peuplements naturels. *Fruits*, 2010, 65(6) : 343 – 354.
232. **Wensen L., Struttui J., Shih C.M., Lin H., Liang Y.C.** Concentration-dependent differential effects of quercetin on rat aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.*, 2004, 496 (1-3): 41-48.
233. **WHO.** Global Foodborne Infections. "Laboratory Protocol: Susceptibility testing of Enterobacteriaceae using disk diffusion". Karlskrona Denmark, 2010.
234. **WHO.** National policy on Traditional Medicine and Regulation of Herbal Medicines. Report of a WHO a global survey, Geneva, May 2005.
235. **William G. H., Charles-Marie E.** Physiologie végétale, 1^{re} éd. Bruxelles : De Boeck, 2003.
236. **Wink M.** Biochemistry of Plant Secondary Metabolism; Annual Plant Reviews. Ed: WILEY-BLACKWELL, 2010; p: 1-23.
237. **WHO:** Traditional medicine. Growing needs and potential, WHO policy Perspectives on Medicines, pp.1-6, WHO, Geneva 2002.
238. **Xiao F.S.** Plantes médicinales chinoises introduites dans la pharmacopée française. Sciences pharmaceutiques, 2013.
239. **Yoo, M. K., Lee, H. C. Lee, H., Moon, B.K., Lee Y. C.** Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*, 2008, 106: 929-936.
240. **Youdim K. A., McDonald J., Kalt W., Joseph J. A.** Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults (small star, filled). *J. Nutr. Biochem.*, 2002, 13 (5): 282-288.

Références bibliographiques

241. **Young D.S.** Effects of drugs on clinical laboratory tests. 5th ed. AACC Press, 2000.
242. **Zenk M. H., Juenger M.** Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry*, 2007, 68 (22-24): 2757-2772.

ANNEXES

ANNEXE I

Composition des réactifs généraux pour les alcaloïdes

•Réactif de MAYER

- Chlorure de mercure.....1,36g
- Iodure de potassium.....5g
- Eau distillée.....qsp 100ml

•Réactif de WAGNER

- Iodure de potassium.....2g
- Iode.....1,27g
- Eau distillée.....qsp 100ml

•Réactif de DRAGENDORFF

Il s'agit d'un mélange (v/v) de deux solutions, A et B.

Solution A :

- Nitrate de bismuth.....1,7g
- Acide tartrique concentré.....20g
- Eau distillée.....qsp 100ml

Solution B :

- Iodure de potassium.....10g
- Eau distillée qsp.....40ml

Le mélange est ensuite additionné de 10g d'acide tartrique et son volume est ramené à 100ml

par de l'eau distillée.

ANNEXE II

Composition du milieu de MUELLER-HINTON

Formule-type (g/l)

- Extrait de viande.....	3
- Peptone.....	5
-Peptone tryptique de caséine.....	10
-Chlorure de sodium.....	5
-Glucose.....	2
-Agar.....	10
-Eau distillée.....	q.s.q.1000 ml

pH 7,3 ± 0,1 à 25°C

Composition du milieu gélosé COLUMBIA

Formule-type (g/l)

- Polypeptone.....	17
-Peptone pancréatique de cœur.....	3
-Amidon de maïs.....	1
-Chlorure de sodium.....	5
-Extrait de levure.....	3
-Agar.....	13,5
-Eau distillée.....	q.s.q.1000 ml

pH 7,3 ± 0,2 à 25°C

ANNEXE III

Composition du réactif à la vanilline sulfurique

- Vanilline..... 0, 5g
- Acide sulfurique (H₂SO₄) 36N..... 100ml

ANNEXE IV

Composition du PBS (Phosphate Buffered Saline)

- Phosphate disodique.....0,39g
- Phosphate monosodique.....1,34g
- Chlorure de sodium.....8,5g
- Eau distillée.....q.s.p 1000ml

ANNEXE V

Publications scientifiques

•Communication orale

Rasolofonantenaina R. Etudes chimique et biologique de l'extrait de feuilles d'*Astrotrichilia parvifolia*(Meliaceae). Une plante médicinale antimicrobienne endémique de Madagascar.Journées jeunes chercheurs Antananarivo, Décembre 2015.

Rasolofonantenaina R.Antimicrobial and antioxidant activities of *Astrotrichilia parvifolia* leaf extract (Meliaceae). Santé – Valorisation des Ressources Naturelles et Ingénierie. Doctoriales 2017.

•Communication affichée

Rasolofonantenaina R., Ralamboranto L. Etude des activités antibactériennes et antioxydantes des extraits de feuille d'*Astrotrichilia parvifolia* (J.-F. Leroy &Lescot) (Meliaceae), une plante médicinale malgache. Santé – Valorisation des Ressources Naturelles et Ingénierie. Doctoriales 2017.

•Articles dans les revues internationales

Rasolofonantenaina R., Rasolomampianina R., Andriambeloson H. O., Randriamampianina L. J., Ralamboranto L., Jeannoda V. L. Antibacterial Activity of *Astrotrichilia parvifolia* (J.-F. Leroy & Lescot) Leaf Extracts (Meliaceae). IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS), 2018, 13 (1): 19-24.

Nom : RASOLOFONANTENAINA-RAMIANDRISOA

Prenom : Rojovola

**Titre de la thèse : Etudes phytochimique et biologique des extraits de feuille
d'*Astrotrichilia parvifolia* (Méliacées), une plante médicinale malgache**

ABSTRACT

The leaves of *Astrotrichilia parvifolia*, an endemic Meliaceae from Madagascar, are used in traditional Malagasy, especially to treat infected wounds and to soothe toothaches.

Methanolic (MeOH) and ethyl acetate (AcOEt) extracts, obtained by Soxhlet extraction, were used for antibacterial, antioxidant and toxicity tests. Phytochemical screening of the extracts revealed the presence of flavonoids, triterpenes, leucoanthocyanins, tannins and polyphenols.

Antibacterial properties against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes* and against *Streptococcus pneumoniae* using disk diffusion (at 1000 µg / disc) and micro-dilution methods (MIC values are between 230 and 470 µg / ml) has recorded in leaf extractsof*Astrotrichilia parvifolia*.

In mice, the MeOH extract was weakly toxic by oral and intraperitoneal routes. The LD50 (24h) was between 472 and 484 mg/kg of mice by intraperitoneal route. No significant effects on cardiac (50 to 400 µg / mL), hepatic, renal, and pancreatic functions (at 52.3 mg / kg) were recorded.

In vitro, MeOH (IC 50 = 19,79µg / ml) and AcOEt (IC50 = 24,44 µg / ml) extracts showed amoderate antioxidant power.

Tests with partially purified products demonstrated that flavonoids are responsible for the antibacterial properties.

Keywords: Meliaceae, *Astrotrichilia parvifolia*, methanolic extract, flavonoïds, medicinal plant, antibacterial, antioxidant.

Supervisor : Professeur RALAMBORANTO Laurence

Nom : RASOLOFONANTENAINA-RAMIANDRISOA

Prenom : Rojovola

Titre de la thèse : Etudes phytochimique et biologique des extraits de feuille d'*Astrotrichilia parvifolia* (Méliacées), une plante médicinale malgache

RESUME

Les feuilles d'*Astrotrichilia parvifolia*, une Méliacées endémique de Madagascar, sont utilisées en thérapeutique traditionnelle malgache, notamment pour soigner les plaies infectées et pour calmer la douleur au niveau des dents.

Les extraits méthanolique (MeOH) et acétate d'éthyle (AcOEt), obtenus grâce à l'extraction par épuisement au soxhlet, ont été utilisés pour les tests antibactériens, antioxydants et de toxicité. Un criblage phytochimique réalisé sur les extraits a révélé la présence des flavonoïdes, des triterpènes, des leucoanthocyanes, des tanins et des polyphénols.

Des propriétés antibactériennes contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes* et contre *Streptococcus pneumoniae* en utilisant des méthodes de diffusion sur disque (à 1000 µg/disque) et de micro-dilution (la CMI se situe entre 230 et 470 µg/ml) ont été enregistrées sur les extraits de feuilles d'*Astrotrichilia parvifolia*. Sur souris, une faible toxicité par voie orale et par voie intrapéritonéale a été mise en évidence. La DL₅₀ (24h) par voie intrapéritonéale se situe entre 472 et 484 mg/kg de souris. L'extrait MeOH n'a aucun effet significatif sur la fonction cardiaque (de 50 à 400 µg/mL), hépatique, rénale, et pancréatique (à 52,3 mg/kg).

In vitro, les extraits MeOH (IC₅₀ = 19,79 µg/ml) et AcOEt (IC₅₀ = 24,44 µg/ml) de feuille ont des pouvoirs antioxydants.

Des tests avec des produits partiellement purifiés ont permis de démontrer que les flavonoïdes sont responsables des propriétés antibactériennes.

Mots clés: Méliacées, *Astrotrichilia parvifolia*, extrait méthanolique, flavonoïdes, plante médicinale, propriétés antibactériennes, pouvoirs antioxydants.

Directeurs de thèse : Professeur RALAMBORANTO Laurence