



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

DOMAINE : SCIENCES ET TECHNOLOGIES

MENTION : BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE



**MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER II**

PARCOURS : BIOCHIMIE, BIODIVERSITE ET SANTE

**ETUDES CHIMIQUE ET TOXICOLOGIQUE DES
PRINCIPES ANTIMICROBIENS EXTRAITS DES
ECORCES DE TIGE DE *Cnestis glabra* (CONNARACEAE)**

Présenté et soutenu publiquement par :

RAZANATSEHENO Andriantsihoarana Jonathan

le 14 Avril 2017

Devant la commission du jury composée de :

Président : Professeur RANDRIANARIVO Hanitra Ranjàna

Rapporteur : Professeur JEANNODA Victor

Examineurs : Docteur RAMAROSON Roseline

Docteur RAZAFIARIMANGA Zara

TABLE DES MATIERES		Page
REMERCIEMENTS		i
LISTE DES ABREVIATIONS		ii
GLOSSAIRE		iii
LISTE DES TABLEAUX		iv
LISTE DES FIGURES		v
INTRODUCTION GENERALE		1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE		5
I- DESCRIPTION BOTANIQUE DU MATERIEL D'ETUDE.....		5
I.1. Description du genre <i>Cnestis</i>.....		5
I.2. Description de l'espèce <i>Cnestis glabra</i> Lam.		5
<i>I.2.1. Position systématique</i>		5
<i>I.2.2. Description botanique</i>		6
<i>I.2.3. Distribution géographique</i>		6
II- USAGES TRADITIONNELS DES ESPECES DE <i>Cnestis</i>		9
III- METABOLITES SECONDAIRES DU GENRE <i>Cnestis</i>		10
IV- PROPRIETES BIOLOGIQUES ET TOXIQUES		10
<u>PREMIERE PARTIE : ETUDE CHIMIQUE</u>		
INTRODUCTION		12
I- MATERIELS ET METHODES		12
I.1. Matériels		12
<i>I.1.1. Matériel végétal</i>		12
<i>I.1.2. Date et lieu de récolte</i>		12
<i>I.1.3. Mode de conservation</i>		12
<i>I.1.4. Produits chimiques</i>		12
I.2. Méthodes.....		13
<i>I.2.1. Méthodes d'extraction</i>.....		13
I.2.1.1. Extraction à froid.....		13
I.2.1.2. Extraction à chaud		13
<i>I.2.2. Méthodes de purification</i>		13
I.2.2.1. Précipitation par l'éthanol 50%.....		13
<i>I.2.2.1.1. Principe</i>		13
<i>I.2.2.1.2. Mode opératoire</i>		14

Table des matières

I.2.2.2. Fractionnement par le n-butanol	14
I.2.2.2.1. Principe	14
I.2.2.2.2. Mode opératoire	14
I.2.2.3. Filtration sur charbon actif	14
I.2.2.3.1. Mode opératoire	15
I.2.3. Méthode de concentration.....	15
I.2.4. Calcul de rendement.....	16
I.2.5. Méthodes d'analyse	16
I.2.5.1. Chromatographie sur couche mince	16
I.2.5.1.1. Principe	16
I.2.5.1.2. Mode opératoire	16
a) Dépôt des échantillons	16
b) Développement de la plaque.....	17
c) Révélation du chromatogramme	17
I.2.5.2. Détection des acides aminés par le test à la ninhydrine	17
I.2.5.3. Méthodes d'analyse phytochimique.....	18
I.2.5.3.1. Préparation des extraits	18
a) Extrait aqueux	18
b) Extrait chloroformique.....	18
c) Extrait hydroéthanolique	18
d) Extrait éthanolique	18
e) Extrait acide	19
I.2.5.3.2. Détection des familles chimiques	19
a) Détection des alcaloïdes	19
✚ Test de MAYER.....	19
✚ Test de WAGNER	19
✚ Test de DRAGENDORFF.....	19
b) Détection des flavonoïdes et des leucoanthocyanes	19
✚ Les flavonoïdes : Test de WILLSTÄTTER (test à la cyanidine). 20	
✚ Les leucoanthocyanes : Test de BATE-SMITH	20
c) Détection des stéroïdes, triterpènes et stérols insaturés.....	20
✚ Test de LIEBERMANN – BURCHARD.....	20
✚ Test de SALKOWSKI.....	21

Table des matières

d) Détection des saponosides	21
✚ <i>Test de mousse</i>	21
e) Détection des tanins et autres polyphénols	21
✚ <i>Test à la gélatine</i>	21
✚ <i>Test à la gélatine salée</i>	21
✚ <i>Test au chlorure ferrique</i>	21
f) Détection des désoxyoses (Test de KELLER-KILIANI).....	22
g) Détection des anthraquinones (Test de BORNTRAGER).....	22
h) Détection des iridoïdes	22
i) Détection des coumarines	23
II- RESULTATS	24
II.1. Préparation des extraits	24
II.1.1. Extraction	24
II.1.2. Purification	25
II.1.2.1. Précipitation par l'éthanol 50%	25
II.1.2.2. Fractionnement par le n-butanol.....	25
II.1.2.1. Filtration sur charbon actif.....	26
II.1.3. Rendements	27
II.1.4. Analyse des extraits	28
II.1.4.1. Chromatographie sur couche mince	28
II.1.4.2. Détection des acides aminés par le test à la ninhydrine.....	29
II.1.4.3. Criblage phytochimique.....	29
II.1.4.4. Caractérisation physico-chimique.....	31
III-DISCUSSION ET CONCLUSION	32
<u>DEUXIEME PARTIE</u> : ETUDE TOXICOLOGIQUE	
INTRODUCTION	34
I-MATERIELS ET METHODES	34
I.1. Matériels	34
I.1.1. Les matériels utilisés en microbiologie	34
I.1.1.1. Les germes utilisés	34
I.1.1.2. Les milieux de culture	35
I.1.1.2.1. Les milieux solides.....	35
I.1.1.2.2. Les milieux liquides	35

Table des matières

I.1.1.3. Les disques pour les tests d'antibiogramme	36
I.1.2. Les animaux d'expérimentation	36
I.1.2.1. Les animaux à sang chaud : Les souris	36
I.1.2.2. Les animaux à sang froid	36
I.1.2.2.1. Les larves de moustique	36
I.1.2.2.2. Les alevins de poisson	36
I.1.3. Les plantes d'expérimentation	36
I.2. Méthodes	37
I.2.1. Méthodes d'étude des effets sur les microorganismes	37
I.2.1.1. Méthode de stérilisation	37
I.2.1.2. Détermination de l'activité antimicrobienne des extraits	38
I.2.1.2.1. Principe	38
I.2.1.2.2. Mode opératoire	38
I.2.1.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	39
I.2.1.3.1. Méthode de dilution en milieu liquide sur microplaque	39
a) Repiquage des souches à tester	39
b) Préparation de l'inoculum	39
c) Préparation de la gamme de concentrations de l'extrait à tester.....	40
d) Inoculation	40
I.2.1.4. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) ou fongicide (CMF)	40
I.2.2. Test d'activité antioxydante	41
I.2.2.1. Principe	41
I.2.2.2. Mode opératoire	41
I.2.3. Méthodes d'étude des effets sur les animaux à sang chaud	42
I.2.3.1. Test sur souris	42
I.2.3.1.1. Les voies d'administration	42
I.2.3.1.2. Estimation de la toxicité aiguë	42
I.2.3.1.3. Détermination de la DL ₅₀ (24 h)	42
I.2.4. méthodes d'étude des effets sur les animaux à sang froid.....	43
I.2.4.1. Estimation de la concentration létale 50% (24 h)	43
I.2.4.1.1. Définition	43
I.2.4.1.2. Détermination de la CL ₅₀ (24 h).....	43

Table des matières

I.2.4.2. Test sur les larves de moustique	44
I.2.4.2.1. Principe	44
I.2.4.2.2. Mode opératoire	44
I.2.4.3. Test sur les alevins de poisson	44
I.2.4.3.1. Principe	44
I.2.4.3.2. Mode opératoire	44
I.2.5. Méthodes d'étude des effets sur les végétaux	44
I.2.5.1. Etude des effets sur la germination des graines	45
I.2.5.1.1. Principe	45
I.2.5.1.2. Mode opératoire	45
I.2.5.2. Etude des effets sur la croissance des jeunes plantules	45
I.2.5.2.1. Principe	45
I.2.5.2.2. Mode opératoire	45
a) Trempage	45
b) Germination	45
II-RESULTATS	47
II.1. Effets sur les microorganismes	47
II.1.1. Spectre d'activité antimicrobienne des extraits bruts	47
II.1.2. Spectre d'activité antimicrobienne des extraits purifiés	49
II.1.3. Détermination de la CMI	51
II.1.4. Détermination de la CMB et CMF	52
II.2. Test d'activité antioxydante	52
II.3. Effets sur les animaux à sang chaud : les souris	53
II.3.1. Test par voie intrapéritonéale	53
II.3.1.1. Description des symptômes d'intoxication	53
II.3.1.2. Détermination de la DL50 (24 h)	54
II.3.2. Test par gavage	56
II.4. Effets sur les animaux à sang froid	56
II.4.1. Test sur les larves de moustique	56
II.4.2. Effets sur les alevins de poisson	56
II.5. EFFETS SUR LES VEGETAUX	57
II.5.1. Effets sur la germination des graines	57
II.5.2. Effets sur la croissance des jeunes plantules	58
III-DISCUSSION ET CONCLUSIONS	62

Table des matières

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	66
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	67
REFERENCES WEBOGRAPHIQUES	73
ANNEXES	
RESUME	

REMERCIEMENTS

Je voudrais adresser mes sincères remerciements :

A Monsieur le Professeur JEANNODA Victor, pour son encadrement, ses conseils et son aide dans la réalisation et la finition de ce mémoire, malgré ses nombreuses responsabilités ;

A Madame le Professeur RAKOTO Danielle Aurore Doll, pour son aide précieuse dans la réalisation de ce manuscrit malgré ses multiples responsabilités ;

A Monsieur le Professeur RANDRIANARIVO Hanitra Ranjàna, pour m'avoir accueilli dans son Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales (LABASM) et je tiens également à le remercier pour ses précieux conseils durant le déroulement de mon stage et pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire malgré ses nombreuses tâches ;

A Madame le Docteur RAMAROSON Roseline et Madame le Docteur RAZAFIARIMANGA Zara qui ont eu l'amabilité d'apporter leurs compétences dans le jugement de ce travail, malgré leurs nombreuses obligations ;

A Monsieur le Docteur RANDRIAMAMPIANINA Lovarintsoa ainsi que l'équipe de Toxicologie du LABASM de l'aide technique que vous avez fournie tout au long de ce travail ;

A mes parents et ma grande sœur, sans vous, tout cela n'aurait pas été possible. Merci de m'avoir permis d'aller loin dans mes études et de m'avoir soutenu moralement et financièrement tout au long de ces années ;

A tous mes proches et mes amis, pour votre soutien et vos conseils.

Enfin, à ceux qui, de près ou de loin, ont apporté leur aide dans l'élaboration de ce mémoire.

Merci

LISTE DES ABREVIATIONS

ATTC : American Type Culture Collection

B/A/E : n-butanol/acide acétique/eau distillée

B/D/E/M/A : n-butanol/dichlorométhane/eau/méthanol/acide acétique

CCM : chromatographie sur couche mince

CL₅₀ : dose létale 50%

CMB : concentration minimale bactéricide

CMF : concentration minimale fongicide

CMI : concentration minimale inhibitrice

DL₀ : dose létale 0%

DL₁₀₀ : dose létale 100%

DL₅₀ : dose létale 50%

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

ip : Intrapéritonéale

IPM : Institut Pasteur de Madagascar

LABASM : Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales

MBFA : Mention de Biochimie Fondamentale et Appliquée

MH : Mueller-Hinton

min : minutes

p/p/p/p/p : poids/ poids/ poids/ poids/ poids

p/v : poids par volume

GLOSSAIRE

Antioxydant : qui empêche l'oxydation de certaines substances chimiques

Astringent : qui provoque la contraction des tissus et des vaisseaux sanguins et qui stimule la coagulation du sang

Conjonctivite : inflammation de la conjonctive de l'œil

Contorsion abdominale : étirement de l'animal avec des torsions du corps

Convulsion clonique : alternance de contractions et de relâchements des muscles, répétée à courts intervalles

Cyme : groupe de fleurs sur des pédoncules rameux partant du même point et arrivant à une même hauteur

Enophtalmie : enfoncement anormal du globe oculaire dans l'orbite

Epicotyle : partie de la jeune plantule en germination située au-dessus de l'insertion du ou des cotylédons

Hermaphrodite : être vivant qui possède les organes reproducteurs des deux sexes/bisexuel

Hyperhémie : désigne l'accroissement du flux sanguin vers un organe ou tissu de l'organisme

Hypocotyle : partie de la tige située entre sa base et les premiers cotylédons de la plante

Liliopsida : (ou Monocotylédones) plantes Angiospermes à fleurs et à feuilles aux nervures parallèles, dont les graines n'ont qu'un seul cotylédon

Magnoliopsida : (ou Dicotylédones) plantes Angiospermes issues de la germination d'une graine disposant de deux cotylédons

Pyorrhée : écoulement de pus

Rodenticide : produit chimique ou biologique qui détruit les espèces de rongeurs nuisibles

Sarmenteux : qui possède des tiges flexibles et grimpantes

Sédatif : qui agit contre la douleur

Spasmes : contractions involontaires des muscles

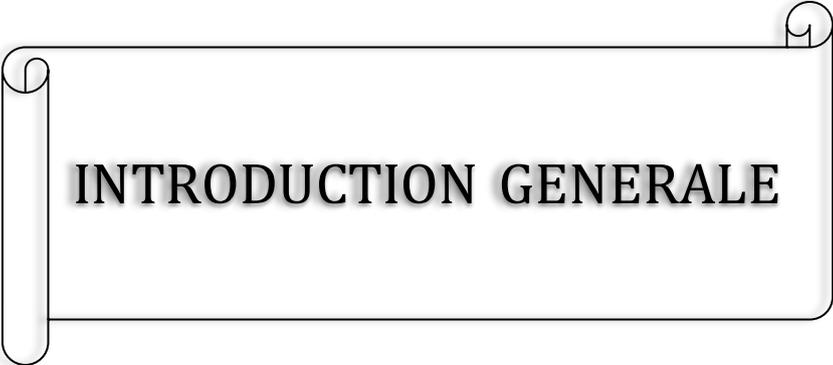
Vermifuge : remède qui a la propriété d'expulser les vers intestinaux

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau n° 1 : Caractéristiques des différents extraits bruts obtenus	25
Tableau n° 2 : Résultats du criblage phytochimique de la poudre végétale, de l'extrait brut EB ₁ et de l'extrait purifié E ₃	30
Tableau n° 3 : Liste des germes utilisés et leurs caractéristiques	35
Tableau n° 4 : Les graines utilisées pour les tests sur les végétaux	37
Tableau n° 5 : Normes utilisées pour la lecture des résultats des tests d'antibiogramme ..	39
Tableau n° 6 : Résultats des tests d'activité antimicrobienne des extraits bruts	48
Tableau n° 7 : Activité des extraits purifiés sur les germes testés	49
Tableau n° 8 : CMI de EB ₁ par la méthode de dilution en milieu liquide	51
Tableau n° 9 : Concentrations minimales bactéricide/fongicide de EB ₁ sur <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Candida albicans</i>	52
Tableau n° 10 : Résultats de la détermination de la DL ₅₀ (24 h) de EB ₁ sur souris.....	54
Tableau n° 11 : Données utilisées pour déterminer la DL ₅₀ (24 h) par la méthode graphique des totaux cumulatifs	55
Tableau n° 12 : Effets de différentes concentrations de EB ₁ sur les alevins de carpe	56
Tableau n° 13 : Effets de EB ₁ à 1 mg/ml sur la germination de graines de Liliopsida et Magnoliopsida	57

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1 : <i>Cnestis glabra</i>	7
Figure 2 : Répartition géographique de <i>Cnestis glabra</i>	8
Figure 3 : Schéma du dispositif pour la filtration sur une couche de charbon actif ...	15
Figure 4 : Schéma récapitulatif de l'extraction et des différentes étapes de purification des principes actifs des écorces de tige de <i>Cnestis glabra</i>	27
Figure 5 : Chromatogramme des différents extraits obtenus au cours de l'extraction et de la purification des principes toxiques de <i>Cnestis glabra</i>	28
Figure 6 : Réaction de réduction du DPPH	41
Figure 7 : Exemples montrant l'activité antimicrobienne des différents extraits : cas de <i>Staphylococcus aureus</i> (A) et (E), <i>Candida albicans</i> (B) et (D), <i>Bacillus cereus</i> (C).....	50
Figure 8 : Détermination de la CMI (mg/ml) de EB ₁ par la méthode de dilution en milieu liquide sur microplaque sur <i>Staphylococcus aureus</i> (A) et <i>Candida albicans</i> (B)	51
Figure 9 : Pouvoir antioxydant à l'aide du test au DPPH	53
Figure 10 : Détermination de la DL ₅₀ (24 h) par la méthode graphique de REED et MUENCH (1938)	55
Figure 11 : Schéma récapitulatif des différentes étapes des expériences sur la croissance des jeunes plantules.....	58
Figure 12 : Croissance des hypocotyles de maïs en présence de EB ₁ à différentes concentrations	59
Figure 13 : Croissance des épicotyles de maïs en présence de EB ₁ à différentes concentrations	59
Figure 14 : Croissance des hypocotyles de petit pois en présence de EB ₁ à différentes concentrations	60
Figure 15 : Croissance des épicotyles de petit pois en présence de EB ₁ à différentes concentrations	60



INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Depuis toujours, l'homme se sert des plantes de diverses façons : comme sources de nourriture, de vêtements, de matériaux de construction mais également comme remèdes. Les plantes constituent la base de la médecine traditionnelle et même de nos jours, bien que la médecine moderne se soit bien développée presque partout dans le monde, une proportion non négligeable de la population dans les pays en développement se tourne encore vers les tradipraticiens, les plantes médicinales et les médicaments à base de plantes pour résoudre leurs problèmes de santé (OMS, 1998).

A titre d'illustration, on peut citer :

- la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*), de la famille des Apocynaceae, qui est réputée pour être un vermifuge, un antipaludéen mais qui possède aussi la capacité de soigner les piqûres de guêpe et de désinfecter les plaies (SAIN et SHARMA, 2013) ;

- les feuilles de goyave (*Psidium guajava*), de la famille des Myrtaceae, connues à Madagascar pour leurs propriétés antidiarrhéiques (LEFEVRE, 2008) ;

- en Afrique du Sud, l'infusion des feuilles de sornet (*Bidens pilosa*), de la famille des Asteraceae, connue pour être un remède contre la dysenterie et la diarrhée (RABE et STADEN, 1997) ;

- toujours en Afrique du Sud, la décoction des tubercules de *Dioscorea sylvatica*, une igname sauvage appartenant à la famille des Dioscoreaceae, utilisée pour soigner les coupures et désinfecter les plaies (RABE et STADEN, 1997) ;

- dans la province de Settat, au Maroc, la décoction de la tige feuillée d'*Artemisia absinthium* (Asteraceae), instillée en gouttes dans les oreilles, sert à soigner l'otite. L'infusion de ses fleurs séchées possède des propriétés digestives et vermifuges (TAHRI et coll., 2012).

Certains des remèdes naturels sont même devenus des classiques de la pharmacopée moderne comme la « morphine », extraite du pavot (*Papaver somniferum*), qui constitue toujours le principal remède contre la douleur (BRUNETON, 1993).

Introduction générale

Toutefois, les vertus des plantes ne se limitent pas aux traitements de maladies mais elles possèdent également d'autres applications :

- en recherche fondamentale et appliquée, de nombreuses substances végétales ont été isolées et identifiées grâce aux différentes techniques mises au point dans les laboratoires (RIVERA, 2006 ; ANDRIAMIALIHARISOA, 2011 ; MICHEL, 2011). Par la suite, ces toxines peuvent être utilisées à diverses fins. Par exemple, elles peuvent servir dans la lutte contre des animaux nuisibles avec l'élaboration d'insecticides, d'herbicides ou de rodenticides. On peut évoquer par exemple le « tongolomboalavo » (*Rhodocodon madagascariensis*), appartenant à la famille des Hyacinthaceae qui semble être un redoutable raticide (RAKOTOBE, 2009 ; RAZANATSEHENO, 2012).

- dans de nombreuses sociétés, les plantes médicinales ont un rôle de soins préventifs, d'entretien du corps voire d'embellissement. Ces usages peuvent faire l'objet de valorisations industrielles (cosmétique). A titre d'exemple, l'huile de ricin (*Ricinus communis*, Euphorbiaceae), en dépit de sa toxicité, était utilisée pour les soins du visage et comme démaquillant (DUMEIGNIL, 2012).

Cependant, malgré tous les bienfaits que procurent les plantes, les substances qu'elles renferment peuvent se révéler toxiques pour l'organisme suivant la dose et la nature des toxines présentes dans la plante. De ce fait, des études biologiques et toxicologiques sont nécessaires avant de les utiliser à des fins médicales ou autres.

Madagascar possède une très grande variété d'espèces végétales dont la grande majorité est endémique de la Grande île. Avec l'expansion des disciplines scientifiques telles que la biochimie, la physiologie et la pharmacologie, de nombreuses études ont déjà été menées sur un grand nombre d'espèces végétales appartenant à diverses familles endémiques et ceci afin de découvrir de nouvelles molécules actives ou toxiques. C'est dans ce contexte que le Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales (LABASM), de la Mention Biochimie Fondamentale et Appliquée (MBFA) de la Faculté des Sciences (Université d'Antananarivo), a orienté ses travaux de recherche vers l'isolement, l'étude chimique et biologique ainsi que la valorisation des principes toxiques des plantes malgaches. Plusieurs plantes y ont déjà fait l'objet d'investigations. A titre d'illustration, on peut citer :

Introduction générale

- *Cnestis glabra* et *Cnestis polyphylla*, famille des Connaraceae (JEANNODA, 1986) ;
- *Olax lanceolata*, famille des Olacaceae (RAHELINAINAMANDIMBY, 2003) ;
- *Uapaca thouarsii*, famille des Euphorbiaceae (RANDRIANANDRASANA, 2004) ;
- *Pittosporum senacia*, famille des Pittosporaceae (RAZAFINTSALAMA, 2006) ;
- *Crotalaria trichotoma* Bojer (RAZAFINORO, 2015), *Crotalaria aculeata* (RANDRIAMANANTSOA, 2015), famille des Fabaceae ;
- *Abrahamia deflexa*, famille des Anacardiaceae (HANITRINIAINA, 2015) ;
- *Albizia greveana* (RAHELARISATA, 2014), *Albizia polyphylla* (JAOFENO, 2016), *Albizia boivinii* (RATSIMIEBO, 2016), famille des Fabaceae.

Pour notre part, nous nous sommes intéressé aux principes actifs présents dans l'écorce des tiges de *Cnestis glabra* (famille des CONNARACEAE). Notre choix s'est porté sur cette plante pour les raisons suivantes :

- elle est endémique de Madagascar ;
- elle est abondante le long de la côte-Est de la Grande île facilitant ainsi sa récolte ;
- d'après la littérature, des études approfondies ont déjà été entreprises sur les racines et les graines de *Cnestis glabra*, à savoir l'isolement et la caractérisation d'une neurotoxine, initialement nommée « glabrine », puis identifiée comme étant un aminoacide dérivant de la méthionine : « la méthionine sulfoximine » (MSO). La MSO possède des propriétés convulsivantes et montre aussi une activité antimicrobienne sur des germes comme *Bacillus subtilis* et *Saccharomyces cerevisiae* (GERSHOFF et ELVEHJEM, 1951 ; JEANNODA et coll., 1984 ; JEANNODA et coll., 1985 ; JEANNODA, 1986) ;
- des études préliminaires effectuées sur des écorces de tige ont permis de montrer une toxicité sur souris et une activité sur des microorganismes pathogènes.

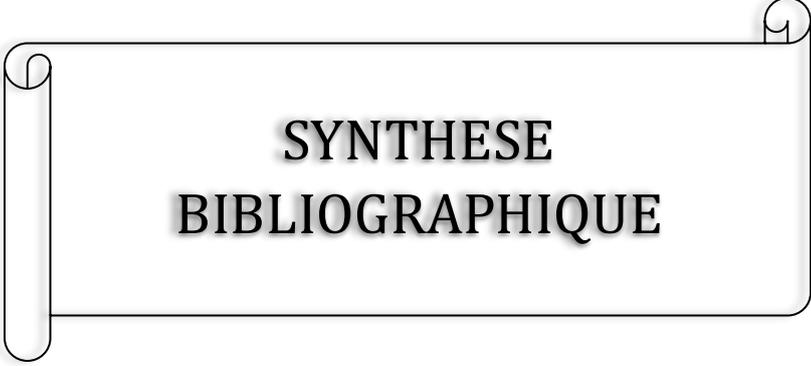
Les objectifs de ce travail étaient d'extraire et purifier les principes actifs de l'écorce de tige, et de les caractériser du point de vue physico-chimique et biologique.

Introduction générale

Le présent mémoire est divisé en deux grandes parties :

- l'étude chimique comprenant l'extraction, la purification et la caractérisation physico-chimique des principes toxiques des écorces de tige;
- l'étude toxicologique avec les tests d'activité sur divers organismes vivants.

Ces deux parties sont précédées d'une introduction générale, d'une synthèse bibliographique et suivies d'une conclusion générale accompagnée des perspectives d'avenir.



**SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE**

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Pour un meilleur cadrage des travaux effectués et pour une meilleure appréhension des résultats obtenus, nous donnerons dans cette partie des généralités sur le genre *Cnestis* et sur notre matériel d'étude, l'espèce *Cnestis glabra*. Ainsi, nous traiterons en particulier :

- la description botanique du genre *Cnestis*, *Cnestis glabra* et sa distribution géographique ;
- leurs usages traditionnels ;
- les métabolites secondaires qu'ils renferment ;
- leurs propriétés biologiques et toxiques.

I- DESCRIPTION BOTANIQUE DU MATERIEL D'ETUDE

I.1. DESCRIPTION DU GENRE *Cnestis*

(BAILLON, 1870)

Les *Cnestis* sont des arbustes ou des arbrisseaux rameux, souvent sarmenteux ; leurs feuilles sont alternes, imparipennées, sans stipules ; leurs fleurs sont disposées en grappes simples ou rameuses de cymes, tantôt axillaires et tantôt terminales, plus rarement groupées en assez grand nombre sur des rameaux ligneux particuliers, peu allongés.

I.2. DESCRIPTION DE L'ESPECE *Cnestis glabra* Lam.

I.2.1. POSITION SYSTEMATIQUE

D'après LAMARCK (1789) (WEB 1), la plante est classée comme suit :

REGNE : PLANTAE

EMBRANCHEMENT : SPERMATOPHYTA

SOUS-EMBRANCHEMENT : MAGNOLIOPHYTA

CLASSE : MAGNOLIOPSIDA

SOUS-CLASSE : DILLENIIDAE

ORDRE : DILLENIALES

FAMILLE : CONNARACEAE

Genre : *Cnestis*

Espèce : *glabra* Lam.

Noms vernaculaires : Voantsefaka, Vahisefaka, Sangasanganakolahy, Voasefaka, Sefana, Sefa.

I.2.2. DESCRIPTION BOTANIQUE

Cnestis glabra Lam. est une liane ou arbuste de petite taille. Sa tige cylindrique pouvant atteindre 4 cm de diamètre est finement striée et lenticellée. Les feuilles pétiolées, sans stipule, sont formées de 5 à 9 paires de folioles ; le rachis peut atteindre 25 cm de long. Le limbe des folioles latérales est étroitement obovale, aigu au sommet, arrondi à la base, de texture parcheminée et sub-coriace, glabre sur les deux faces. La foliole terminale est elliptique. Les pédicelles sont assez courts. La face inférieure des folioles est marquée par la nervure médiane nettement saillante, et par 6 à 10 paires de nervures secondaires très ascendantes (WEB 2).

Les fleurs petites sont disposées en grappes fasciculées. Le périanthe de la fleur est composé de 5 sépales tomenteux sur la face externe et glabres sur la face interne. La corolle est composée de 5 pétales blanchâtres à rougeâtres plus petits que les sépales et entoure 10 étamines et 5 carpelles couverts de poils (WEB 2).

Les fruits sont des follicules piriformes (en forme de poire) avec le reste du périanthe persistant à la base. La graine, une seule par follicule, est elliptique et noirâtre, ornée d'un arille à la base (Figure 1, p.7) (WEB 2).

I.2.3. DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE

La plante pousse dans les forêts humides de basse altitude surtout en lisière, longeant la côte-Est de Madagascar (Figure 2, p. 8).



a) Feuilles



b) Follicules



c) Graine mûre



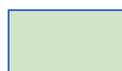
d) Pied

Figure 1 : *Cnestis glabra*

Source : auteur



Figure 2 : Répartition géographique de *Cnestis glabra* (WEB 3)



: aire de répartition de *Cnestis glabra*



: Zones de concentration de la plante

II- USAGES TRADITIONNELS DES ESPECES DE *Cnestis*

De nos jours, de nombreuses espèces de *Cnestis* sont encore mal connues tant du point de vue des utilisations que des propriétés chimiques et biologiques. Néanmoins, dans certains pays, ces plantes sont réputées pour traiter certaines maladies. A titre d'exemples, on peut citer :

❖ *Cnestis corniculata* que l'on retrouve dans les forêts humides en Guinée, Sierra Leone et Libéria. Les feuilles constituent un astringent puissant et sont employées comme remède interne contre la blennorragie (WEB 4) ;

❖ *Cnestis ferruginea* est largement utilisé en Afrique pour soigner diverses maladies comme la dysménorrhée (règles douloureuses) ou encore des infections oculaires, notamment la conjonctivite (ADIKO et coll., 2013). Elle sert aussi à traiter toutes formes de douleurs et est employée comme sédatif en cas de dépression. La poudre de l'écorce est frottée sur les gencives pour traiter la pyorrhée. La plante peut aussi agir comme stimulant d'appétit chez les personnes malades. Les racines sont utilisées pour traiter des problèmes de peau et sert aussi de remède contre la dysenterie et la gale. La pulpe des fruits est prise comme fortifiant et pour soigner les affections des bronches, particulièrement la coqueluche et la tuberculose. Les fruits amers de cette plante sont également connus pour nettoyer et blanchir les dents tout en laissant un goût rafraîchissant dans la bouche (PORTERES, 1974) ;

A part ces vertus dans le domaine médical, *Cnestis ferruginea* est aussi utilisée dans d'autres domaines. Dans la teinturerie par exemple, l'écorce de cette plante apporte une teinture rouge qui est utilisée pour teindre des vêtements. Les tiges servent également à la fabrication d'arcs des flèches employés pour la chasse ;

❖ *Cnestis glabra* est employée par les natifs des îles Mascareignes contre la fièvre et la tuberculose pulmonaire ou phtisie. Les poils des follicules sont considérés comme anthelminthiques (JEANNODA, 1986) ;

❖ *Cnestis palala* dont le décocté de jeunes feuilles, réchauffé et appliqué sur le corps, est utilisé pour traiter la fièvre pendant la grippe en Thaïlande et dans d'autres pays d'Asie et de Chine. Les racines sont utilisées pour le traitement de la malaria, des maux de ventre, des troubles urinaires et des morsures de serpent (DEJ-ADISAI et coll., 2015) ;

❖ *Cnestis polyphylla* est utilisé comme fortifiant ou pour soigner la rage et la dysenterie (JEANNODA, 1986).

A part leurs vertus dans le domaine de la médecine, certaines espèces sont connues pour leur toxicité. C'est le cas de *Cnestis glabra* et de *Cnestis palala* dont la décoction de racines et des graines sert à tuer les chiens errants (DEJ-ADISAI et coll., 2015). De même, les fruits de *Cnestis polyphylla* sont réputés pour être des pesticides ou rodenticides efficaces pour tuer les rats, les chiens errants et d'autres animaux nuisibles (JEANNODA, 1986).

III- METABOLITES SECONDAIRES DU GENRE *Cnestis*

Des études antérieures sur quelques espèces de *Cnestis* ont abouti à l'isolement et l'identification de diverses structures et familles chimiques. Comme exemples, on peut évoquer la détection :

- de glycosides, triterpénoïdes, sucres réducteurs, saponosides, composés phénoliques, α -aminoacides, carbohydrates, tanins, flavonoïdes et coumarines dans les feuilles et les racines de *Cnestis palala* (LAR, 2014) ;
- de saponosides, flavonoïdes, tanins, anthraquinones, terpénoïdes dans les feuilles de *Cnestis ferruginea* (ADIKO, 2013 ; ENEMOR et coll., 2015) ;
- de glycosides et d'une substance apparentée à une saponine acide dans la poudre des écorces de *Cnestis polyphylla* (JEANNODA, 1986) ;
- de tanins en grande quantité et d'alcaloïdes à l'état de traces dans les extraits de fleurs et de fruits de *Cnestis glabra* (JEANNODA, 1986) ;
- d'une neurotoxine : « la méthionine sulfoximine », inhibant la synthèse protéique dans les cellules, qui a été isolée des écorces de racines de *Cnestis glabra* (JEANNODA et coll., 1985).

IV- PROPRIETES BIOLOGIQUES ET TOXIQUES

❖ Effets sur les animaux

Des études antérieures ont permis de déceler des propriétés biologiques chez les *Cnestis*. A titre d'illustration :

- d'après YAKUBU et NURUDEEN (2014), l'extrait aqueux obtenu à partir des racines de *Cnestis ferruginea* a des effets sur quelques fonctions régulatrices du foie et des reins chez des rats mâles présentant des dysfonctionnements sexuels. Il

Synthèse bibliographique

s'agit d'une diminution des taux d'albumine sérique, de globulines et de conjugué de bilirubine ainsi que d'une réduction de l'activité de la phosphatase alcaline et de l'alanine aminotransférase au niveau du foie et des reins de ces animaux ;

- la toxicité sur des animaux dont le chien, le lapin, le cobaye et la souris a également été prouvée d'après des études toxicologiques effectuées sur des préparations d'écorces de bois de tige et de racines pulvérisées de *Cnestis polyphylla* (JEANNODA, 1986) ;

- à Madagascar, selon des enquêtes ethnobotaniques effectuées sur terrain, le décocté des racines de *Cnestis glabra* est bien connu et craint par les paysans à cause de sa toxicité. Ainsi, il est même interdit de nettoyer les racines de cette plante à proximité des villages de peur que les débris d'écorces n'empoisonnent les eaux et les animaux domestiques (JEANNODA, 1986).

❖ Effets sur les microorganismes

Mise à part la toxicité chez les animaux pluricellulaires, certaines espèces de *Cnestis* sont aussi douées d'activités antimicrobiennes. On peut citer :

- *Cnestis ferruginea* : les principes actifs obtenus par extraction aqueuse des écorces de tige présentent une activité antimicrobienne sur des bactéries GRAM positif telles que *Staphylococcus aureus* mais semblent être moins actifs vis-à-vis des bactéries GRAM négatif comme *Escherichia coli* et *Salmonella spp* (ENEMOR et coll., 2015) ;

- *Cnestis palala* : l'extrait éthanolique des feuilles et d'écorces semble être actif contre *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* (DEJ-ADISAI et coll., 2015) ;

- *Cnestis glabra* : la cnestine, isolée des graines, inhibe fortement la croissance d'une bactérie GRAM positif : *Bacillus subtilis*, et d'une levure : *Saccharomyces cerevisiae*. D'autres bactéries GRAM (+) comme *Bacillus cereus* ou *Bacillus mycoïdes* et des bactéries GRAM (-) telles que *Rhizobium lupinii* semblent être moins sensibles à la cnestine (JEANNODA, 1986).



**PREMIERE PARTIE :
ETUDE CHIMIQUE**

INTRODUCTION

Des tests préliminaires sur souris et sur des microorganismes pathogènes nous ont permis de mettre en évidence une activité toxique dans des extraits d'écorces de tige de *Cnestis glabra*, ce qui nous a amené à entreprendre une étude chimique consistant à :

- essayer de mettre au point un procédé d'extraction et de purification des principes toxiques à partir des écorces de tige ;
- étudier les propriétés physico-chimiques du ou des principe(s) actif(s) ;
- déterminer leur nature chimique.

I- MATERIELS ET METHODES

I.1. MATERIELS

I.1.1. MATERIEL VEGETAL

Toutes les informations concernant le matériel d'étude sont données dans la partie « synthèse bibliographique » (voir § I, p. 5).

I.1.2. DATE ET LIEU DE RECOLTE

Les tiges de *Cnestis glabra* ont été récoltées à Andasibe (GPS : S 18° 57' 12/E 048 24' 56 4'') et à Ambalatenina (GPS : S 19° 11' 42/E 048 54' 47 6'', 33m), au mois de Décembre 2015 (période de fructification de la plante).

I.1.3. MODE DE CONSERVATION

Les tiges récoltées ont été séchées à la température du laboratoire, à l'ombre, pendant quelques semaines. Les tiges séchées ont été écorcées, puis les écorces broyées jusqu'à pulvérisation. La poudre ainsi obtenue est conservée dans des bocaux à la température ambiante.

I.1.4. PRODUITS CHIMIQUES

Les produits chimiques utilisés dans toutes les manipulations sont de qualité « pour analyse » et de marques Merck, Prolabo et Scharlau.

Le support utilisé pour la chromatographie sur couche mince est le gel de silice Merck 60F₂₅₄ muni d'un indicateur de fluorescence, étalé sur des feuilles en plastique de 20 x 20 cm de dimensions (épaisseur de la couche : 0,2 mm).

I.2. METHODES

I.2.1. METHODES D'EXTRACTION

(RAKOTO, 2012)

I.2.1.1. Extraction à froid

Le matériel végétal réduit en poudre est délayé dans le solvant d'extraction (eau distillée ou mélange hydroéthanolique 75%), suivant le rapport 1/10 (p/v), c'est-à-dire 1 g de poudre mélangé à 10 ml de solvant. L'ensemble est soumis à une agitation magnétique pendant au moins 3 h à la température ambiante, puis laissé macérer pendant une nuit à + 4°C dans le réfrigérateur.

Le macérat ainsi obtenu est de nouveau agité pendant 30 min, puis filtré sur quatre épaisseurs de gaze. Le filtrat est ensuite centrifugé à 10000 tours/min pendant 15 min à la température ambiante (centrifugeuse Hettich, UNIVERSAL II). Le culot est éliminé et le surnageant recueilli, puis concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif (voir méthode de concentration au § I.2.3, p. 15).

I.2.1.2. Extraction à chaud

La poudre végétale est mise en suspension dans le solvant d'extraction (eau distillée ou éthanol absolu), selon le rapport 1/10 (p/v). Le mélange est chauffé à reflux sous agitation magnétique sur une plaque chauffante, à la température d'ébullition du solvant, pendant 3 h. Après refroidissement, le décocté est mis à macérer pendant une nuit à + 4°C.

La suite des opérations est identique à celle de l'extraction à froid.

I.2.2. METHODES DE PURIFICATION

I.2.2.1. Précipitation par l'éthanol 50%

I.2.2.1.1. Principe

La méthode est basée sur la diminution de la solubilité dans l'eau de certaines substances par ajout d'un solvant organique miscible et peu polaire tel que l'éthanol. Ceci engendre la précipitation de ces substances initialement solubles en milieu aqueux (MAHUZIER et HAMON, 1990).

I.2.2.1.2. Mode opératoire

Un volume bien déterminé d'éthanol absolu est ajouté goutte à goutte à l'extrait à traiter de même volume, soumis à une agitation magnétique continue. Le mélange est laissé reposer à + 4°C pendant 15 min. Le précipité ainsi apparu est éliminé par centrifugation à 10000 tours/min pendant 15 min (centrifugeuse Hettich, UNIVERSAL II), tandis que le surnageant est récupéré et l'éthanol est évaporé au moyen d'un évaporateur rotatif. La concentration se poursuit jusqu'au volume initial de l'extrait à traiter (MANDIMBISOLOFO et coll., 2013).

I.2.2.2. Fractionnement par le n-butanol

(BOREL et RANDOUX, 1987 ; MAHUZIER et HAMON, 1990)

I.2.2.2.1. Principe

Cette technique d'extraction liquide/liquide permet le fractionnement des substances selon leur solubilité relative vis-à-vis de deux solvants non miscibles, tels que l'eau et le n-butanol. Ainsi, tous les composants ayant plus d'affinité pour le butanol migrent vers la phase organique et ceux qui en possèdent plus pour l'eau migrent vers la phase aqueuse.

I.2.2.2.2. Mode opératoire

L'extrait à traiter et le n-butanol sont mélangés volume à volume dans une ampoule à décanter. L'ensemble est agité et laissé décanter jusqu'à séparation de deux phases bien distinctes : une phase supérieure butanolique et une phase inférieure aqueuse.

Ces deux phases sont recueillies séparément et la phase aqueuse subit encore 3 autres fractionnements successifs avec le n-butanol.

Les phases aqueuses et organiques sont rassemblées séparément débarrassées du solvant par évaporation après addition d'un grand volume d'eau distillée, puis la solution est ramenée au volume initial de l'extrait traité.

I.2.2.3. Filtration sur charbon actif

(JEANNODA, 1986 ; RAKOTO, 2012)

La technique utilisée est celle mise au point par JEANNODA (1986). Le charbon actif est un support chromatographique capable d'adsorber un grand nombre

de substances, en particulier les noyaux aromatiques. Cette méthode permet ainsi de décolorer totalement les extraits traités.

I.2.2.3.1. Mode opératoire

Le charbon actif est tassé dans un entonnoir en verre dont le fond est bouché avec des fibres de verre. L'entonnoir est ensuite adapté à une fiole à vide reliée à une pompe à vide (Figure 3). L'extrait à filtrer est déposé sur la couche de charbon légèrement humidifiée avec de l'eau distillée, puis une légère aspiration est appliquée grâce à une pompe à vide.

Quand le charbon actif arrive à saturation, c'est-à-dire lorsque le filtrat, normalement incolore, commence à se colorer, le charbon est renouvelé (3 fois au maximum) jusqu'à obtenir une solution complètement incolore. L'extrait ainsi recueilli est filtré sur papier filtre pour éliminer les fines particules de charbon avant d'être concentré par évaporation.

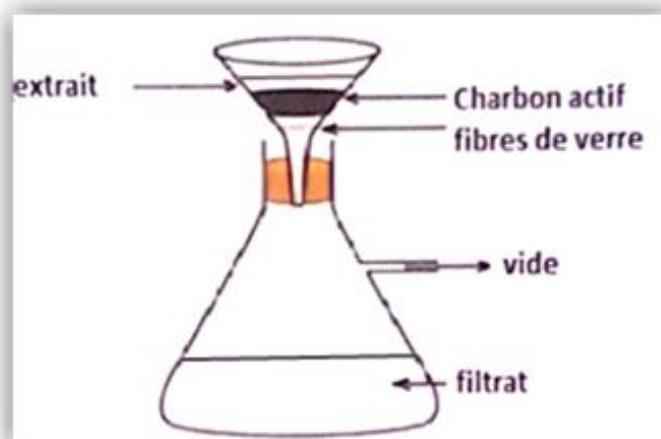


Figure 3 : Schéma du dispositif pour la filtration sur une couche de charbon actif

I.2.3. METHODE DE CONCENTRATION

Toutes les opérations d'évaporation de solvant et de réduction de volume des extraits sont réalisées à l'aide d'un évaporateur rotatif BUCHI (R110), à la température 45-50°C. La pression est réduite à l'aide d'une pompe à vide.

La concentration des extraits à étudier est déterminée en utilisant la relation suivante :

$$\text{Concentration (mg/ml)} = \frac{\text{Poids du résidu d'évaporation à sec (mg)}}{\text{Volume de l'extrait de départ (ml)}}$$

I.2.4. CALCUL DE RENDEMENT

A l'issue de l'extraction et de chaque étape de purification, l'extrait obtenu est évaporé à sec, puis le résidu est pesé. Le rendement (en %), par rapport au poids du matériel végétal de départ ou de l'extrait de départ, est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Poids du résidu d'évaporation sec (g)}}{\text{Poids du matériel végétal ou de l'extrait de départ (g)}} \times 100$$

I.2.5. METHODES D'ANALYSE

I.2.5.1. Chromatographie sur couche mince

(RANDERATH, 1970 ; AUDIGIE et coll., 1989 ; MAHUZIER et HAMON, 1990)

I.2.5.1.1. Principe

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique d'analyse qui permet de séparer les constituants d'un mélange selon deux mécanismes fondamentaux : le partage et l'adsorption. Les substances à séparer migrent suivant une direction déterminée et leur vitesse de déplacement dépend à la fois de leur affinité pour la phase organique mobile d'une part et d'autre part, des forces d'adsorption dues au support qui représente la phase stationnaire.

I.2.5.1.2. Mode opératoire

a) Dépôt des échantillons

Les extraits à analyser sont déposés sur une plaque de gel de silice découpée aux dimensions voulues à l'aide d'un capillaire. Chaque dépôt large de 0,5 cm est situé

à 1,5 cm du bord inférieur de la plaque et à 0,5 cm des dépôts voisins. Les dépôts commencent et se terminent à 1,5 cm des bords latéraux de la plaque. Chaque dépôt est immédiatement séché à l'aide d'un séchoir à main.

b) Développement de la plaque

La plaque est placée en position verticale dans la cuve contenant le solvant de migration constitué par le système butanol/dichlorométhane/eau/méthanol/acide acétique (B/D/E/M/A 70/30/20/20/10, p/p/p/p/p) et dont l'atmosphère a été préalablement saturée par les vapeurs de ce dernier, puis le récipient est refermé. Le solvant migre par capillarité et lorsque son front arrive à environ 0,5 cm du bord supérieur de la plaque, cette dernière est retirée de la cuve, puis elle est séchée à l'aide d'un séchoir à main.

c) Révélation du chromatogramme

La révélation d'un chromatogramme est une technique qui permet de rendre visibles les substances incolores. Deux méthodes ont été adoptées :

✚ *Examen sous une lampe ultraviolette (UV)*

Afin de visualiser les différentes taches, la plaque est placée sous lumière UV à 254 nm et à 366 nm. Les produits qui absorbent les rayons UV apparaissent sous forme de taches sombres ou fluorescentes.

✚ *Réactions colorées*

Les substances présentes sont révélées par pulvérisation du réactif à la vanilline sulfurique (voir composition en Annexe I) sur la plaque. Les composés apparaissent sous formes de taches colorées qui peuvent être très claires, d'où la nécessité de chauffer la plaque à 100°C afin d'obtenir des taches plus foncées.

I.2.5.2. Détection des acides aminés par le test à la ninhydrine

(FIRDOUSE et ALAM, 2011 ; SAKTHIPRIYA et VIDHYA, 2015)

Trois à quatre gouttes de solution éthanolique de ninhydrine sont ajoutées dans un tube à essai contenant 1 ml d'extrait à tester. L'apparition d'une coloration bleu-violet indique la présence d'acides aminés dans l'extrait étudié.

Remarque : Si cette coloration n'apparaît pas immédiatement après addition de la solution de ninhydrine, le mélange est chauffé au bain-marie ou sur la flamme d'un bec Bunsen pendant quelques secondes.

I.2.5.3. Méthodes d'analyse phytochimique

Le screening ou criblage phytochimique permet de mettre en évidence les grands groupes chimiques présents dans un matériel végétal en se basant sur des tests de colorations caractéristiques ou de précipitation en présence de plusieurs types de réactifs.

La détection des familles chimiques est réalisée sur différents extraits préparés à partir de la poudre de matériel végétal ou du résidu d'évaporation à sec de l'extrait à étudier.

I.2.5.3.1. Préparation des extraits

Quatre types d'extraits sont préparés pour réaliser les tests.

a) Extrait aqueux

Le résidu d'évaporation à sec ou la poudre végétale (500 mg) est délayé dans 6 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition pendant 15 min. Une fois refroidi, le décocté est laissé macérer pendant une nuit à + 4°C, puis filtré. Le filtrat obtenu constitue l'extrait aqueux.

b) Extrait chloroformique

Le résidu d'évaporation à sec ou la poudre végétale (500 mg) est laissé macérer pendant une nuit à + 4°C dans 6 ml de chloroforme ou de dichlorométhane. Le mélange est ensuite filtré et le filtrat correspond à l'extrait chloroformique.

c) Extrait hydroéthanolique

Le résidu d'évaporation à sec ou la poudre végétale (500 mg) est mis à macérer dans un mélange hydroéthanolique 75% (6 ml), pendant une nuit à + 4°C. Le macérat obtenu est filtré et le filtrat recueilli constitue l'extrait hydroéthanolique.

d) Extrait éthanolique

Le résidu d'évaporation à sec ou la poudre végétale (500 mg) est laissé macérer dans 6 ml d'éthanol absolu, à + 4°C, durant une nuit. Le macérat est ensuite filtré et le filtrat obtenu constitue l'extrait éthanolique.

e) Extrait acide

Le résidu d'évaporation à sec ou la poudre végétale (500 mg) est mis à macérer pendant une nuit dans 6 ml d'acide chlorhydrique (HCl) 2N. La solution obtenue après filtration du macérat est l'extrait acide.

I.2.5.3.2. Détection des familles chimiques

(NOHARA, 1989 ; DOHOU et coll., 2003 ; FIRDOUSE et ALAM, 2011 ; BENMEHDI et coll., 2012 ; KHOLKHAL et coll., 2013)

a) Détection des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés azotés, basiques, d'origine naturelle et caractérisés par des activités physiologiques et pharmacologiques à faible dose.

Quatre tubes à essai contenant chacun 1 ml d'extrait acide sont nécessaires pour la manipulation : le premier sert de témoin et les autres sont utilisés pour les tests de MAYER, WAGNER et de DRAGENDORFF.

La composition des réactifs est donnée en Annexe II.

 *Test de MAYER*

Cinq gouttes de réactif de MAYER sont ajoutées dans le second tube. L'apparition d'une floculation ou d'un précipité indique la présence d'alcaloïdes.

 *Test de WAGNER*

Quatre à cinq gouttes de ce réactif sont introduites dans le troisième tube. La formation d'un précipité dans le tube montre la présence d'alcaloïdes.

 *Test de DRAGENDORFF*

Cinq gouttes de réactif de DRAGENDORFF sont ajoutées dans le quatrième tube à essai. L'apparition d'une floculation blanche indique la présence d'alcaloïdes.

Un test supplémentaire doit être effectué pour confirmer la présence d'alcaloïdes dans l'extrait à tester. Si le précipité formé dans chaque tube est soluble dans l'éthanol 80% de volume 0,5 ml, la présence d'alcaloïdes dans l'extrait est confirmée.

b) Détection des flavonoïdes et des leucoanthocyanes

Les flavonoïdes et les leucoanthocyanes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ils sont également connus pour leurs propriétés antioxydantes.

Etude chimique

L'extrait hydroéthanolique est répartie dans quatre tubes à essai (2 ml chacun). Le premier tube sert de témoin et les trois autres servent pour les tests de détection.

Les flavonoïdes : Test de WILLSTÄTTER (test à la cyanidine)

Les flavones, flavonols et flavonones sont mis en évidence à l'aide de la réaction à la cyanidine, par traitement avec du magnésium chlorhydrique.

Dans le second tube, 0,5 ml de HCl 12,07 N et deux tournures de magnésium sont ajoutés à 2 ml d'extrait à tester. Après 10 min, la coloration devient rouge pour les flavones, rouge pourpre pour les flavonols et rouge violacé pour les flavonones.

Dans le troisième tube, 1 ml d'eau distillée et 1 ml d'alcool isoamylique sont additionnés au mélange du tube 2. L'observation d'une coloration rouge à rouge violacé de la phase supérieure caractérise la présence des flavonoïdes.

Les leucoanthocyanes : Test de BATE-SMITH

De l'HCl 12,07 N, de volume 0,5 ml est versé dans le quatrième tube contenant 2 ml d'extrait hydroéthanolique, puis la solution est chauffée dans un bain-marie à 100°C pendant 30 min. L'apparition d'une coloration rouge après refroidissement montre la présence de leucoanthocyanes.

c) Détection des stéroïdes, triterpènes et stérols insaturés

Les composés terpéniques regroupent des molécules de faible poids moléculaire, volatiles. Ce sont les composants principaux des huiles essentielles et de molécules hautement polymérisées comme le caoutchouc.

La solution chloroformique est répartie dans trois tubes à essai (1 ml chacun) dont le premier sert de témoin.

Test de LIEBERMANN – BURCHARD

Deux à trois gouttes d'anhydride acétique sont introduites dans le deuxième tube contenant 1 ml d'extrait chloroformique. Après une légère agitation, quatre gouttes d'acide sulfurique (H₂SO₄) 36 N sont versées le long de la paroi du tube incliné.

Le changement de coloration est observé après 1 h. L'apparition d'un anneau rouge violacé montre la présence de triterpènes, tandis que le virage de la phase aqueuse au verdâtre est caractéristique des stéroïdes. Les deux phénomènes peuvent être observés simultanément.

 *Test de SALKOWSKI*

L'ajout de 1 ml de H₂SO₄ 36 N dans le troisième tube incliné contenant 1 ml d'extrait chloroformique, entraîne la formation d'un anneau rouge, violet ou mauve se formant à l'interface, si des stéroïdes insaturés sont présents.

d) Détection des saponosides

Les saponosides ou saponines sont des hétérosides naturels, doués de nombreuses activités qu'on retrouve chez de nombreux végétaux et dont la propriété physique la plus remarquable est leur capacité à mousser abondamment lorsqu'on les agite en solution.

 **Test de mousse**

Après agitation du tube à essai contenant 1 ml d'extrait aqueux pendant 30 secondes, il se forme une mousse alvéolée de 3 cm de hauteur. Lorsque cette mousse persiste pendant au moins 30 min, l'extrait contient des saponines.

e) Détection des tanins et autres polyphénols

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques hydrosolubles largement répandues dans le règne végétal. Ils sont caractérisés par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes (poids moléculaire élevé). Ces composés ont un rôle défensif pour la plante.

Quatre tubes à essai contenant chacun 1 ml d'extrait aqueux sont nécessaires pour les tests. Le premier tube servira de témoin, tandis que les trois autres serviront à détecter et à identifier les tanins et les composés phénoliques.

 *Test à la gélatine*

Quatre gouttes de gélatine 1% (p/v) sont ajoutées dans le deuxième tube. La présence de polyphénols se traduit par l'apparition d'un précipité blanc.

 *Test à la gélatine salée*

Quatre gouttes de gélatine salée (gélatine à 1% dans NaCl 10%) sont versées dans le troisième tube. La formation d'un précipité indique la présence de tanins condensés de type pyrogallique.

 *Test au chlorure ferrique*

Quatre gouttes d'une solution méthanolique de chlorure ferrique à 10% (p/v) sont additionnées dans le quatrième tube. La formation d'une coloration bleu-vert ou

vert-noir indique la présence des tanins condensés de type catéchol, alors que la coloration noire bleuâtre révèle la présence de tanins de type pyrogallo1.

Remarque : Une réaction négative à la gélatine salée accompagnée d'une coloration verte ou bleu-noir avec le chlorure ferrique signifie que d'autres types de composés phénoliques sont présents.

f) Détection des désoxyoses (Test de *KELLER-KILIANI*)

Les désoxyoses sont des sucres (oses) dont l'un des groupements hydroxyles a été substitué par un atome d'hydrogène.

Dans un tube à essai, 0,5 ml d'acide acétique glacial et 0,5 ml de chlorure ferrique 10% sont ajoutés successivement à 0,5 ml d'extrait aqueux. Après une légère agitation, 0,5 ml de H₂SO₄ 36 N est versé en inclinant le tube. L'observation d'un anneau pourpre à l'interface indique la présence de désoxyoses.

g) Détection des anthraquinones (Test de *BORNTRAGER*)

L'antraquinone appartient à la famille chimique des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Il entre principalement dans la composition de teintures et de pigments ainsi que dans la synthèse de colorants.

Dans une ampoule à décanter, 0,5 ml d'extrait aqueux est mélangé avec 1 ml de benzène, puis le tout est laissé au repos après une forte agitation. Deux phases apparaissent : une phase aqueuse (phase inférieure) et une phase benzénique (phase supérieure). Cette dernière est recueillie dans un tube à essai après décantation, puis cinq gouttes d'ammoniaque (NH₄OH) 25% y sont ajoutées. Après une légère agitation, un virage au rouge de la phase alcaline (phase supérieure) indique la présence d'antraquinones.

h) Détection des iridoïdes

Les iridoïdes sont des monoterpènes servant d'intermédiaires dans la biosynthèse des alcaloïdes. Pour les plantes, ils servent de moyen de défense contre les phytophages et contre les infections microbiennes. Les iridoïdes présentent une large variété de propriétés : cardiovasculaire, antihépatotoxique, hypoglycémiant, analgésique, antitumoral et antiviral.

Etude chimique

Un millilitre de HCl 12,07 N est ajouté à 1 ml d'extrait aqueux. Le mélange est porté au bain-marie pendant 30 min. La présence d'iridoïdes se traduit par un virage de la coloration au bleu après refroidissement.

i) Détection des coumarines

Les coumarines sont des composés souvent synthétisés en réponse à des attaques pathogènes (propriétés bactériostatiques). Il s'agit aussi de molécules aromatiques utilisées dans la composition de nombreux parfums et pour aromatiser des alcools.

Deux tubes contenant chacun 2 ml d'extrait éthanolique sont utilisés pour la détection des coumarines. Le premier tube sert de témoin tandis que le second est additionné de 0,5 ml de NaOH à 10%. Les 2 tubes sont ensuite chauffés jusqu'à ébullition, puis 4 ml d'eau distillée sont ajoutés dans chacun d'eux.

Le résultat est positif si le tube à essai dans lequel la solution alcaline a été ajoutée devient plus transparent que le tube témoin. De plus, après ajout de 2 ml de HCl 12,07 N au mélange du tube 2, un virage de couleur au jaune indique la présence de coumarines dans l'extrait.

II- RESULTATS

Toutes les méthodes d'extraction et de purification ont été réalisées à la température du laboratoire et toutes les opérations de concentration et d'évaporation de solvant effectuées à 45-50°C, sous pression réduite. Les extraits sont conservés à - 20°C au congélateur.

II.1. PREPARATION DES EXTRAITS

II.1.1. EXTRACTION

A partir de 20 g de poudre d'écorces de tige, quatre types d'extraits bruts ont été obtenus grâce aux quatre méthodes d'extraction (voir § I.2.1, p. 13). Il s'agit des extraits aqueux à froid et à chaud et des extraits hydroéthanolique 75% à froid et éthanolique absolu à chaud. Leur toxicité sur souris et leur activité antimicrobienne ont été testées respectivement selon les méthodes données au § I.2.3.1 (p. 42) et au § I.2.1 (p. 37).

Les caractéristiques des extraits sont récapitulées dans le tableau n° 1 (p. 25).

D'après ces résultats, tous les extraits bruts ont provoqué des symptômes d'intoxication chez les souris mais seul l'extrait brut aqueux à froid a entraîné la mort des souris. De plus, cet extrait a montré une activité antimicrobienne intéressante (voir résultats au § II.1.1, p. 47). L'extraction aqueuse à froid est donc la méthode retenue pour la suite de nos manipulations à cause de la forte activité de l'extrait et la valeur du rendement. En outre, l'eau distillée utilisée comme solvant est moins coûteux que l'éthanol.

Tableau n° 1 : Caractéristiques des différents extraits bruts obtenus

Extraits bruts Caractéristiques	Aqueux à froid	Aqueux à chaud	Hydroéthanolique 75% à froid	Ethanolique absolu à chaud
Couleur	Marron	Marron	Rouge	Rouge
Aspect	Trouble	Limpide	Limpide	Limpide
pH	5,5	3,5	3	3
Goût	Légèrement amer	Légèrement amer	Légèrement amer	Légèrement amer
Rendement (%)	8,3%	4,85%	6,9%	8,2%
Toxicité sur souris (dose injectée : 276 mg/kg)	Temps de survie : 8 h	Symptômes	Symptômes	Symptômes
Activité antimicrobienne	Oui	Oui	Oui	Oui

II.1.2. PURIFICATION

Le protocole de purification mis au point comporte des techniques basées sur les différences de propriétés physico-chimiques. Il est bioguidé par des tests d'activité antimicrobienne.

II.1.2.1. Précipitation par l'éthanol 50%

L'extrait brut aqueux à froid ou EB₁, de volume 10 ml, traité avec l'éthanol 50% selon la méthode décrite au § I.2.2.1 (p. 13), a donné un extrait de couleur marron clair, limpide qui n'était pas toxique sur souris mais qui a montré une activité antimicrobienne (voir résultats au § II.1.2, p.49).

Cette technique a constitué par conséquent la première étape de purification et l'extrait ainsi obtenu a été nommé E₁.

II.1.2.2. Fractionnement par le n-butanol

L'extrait E₁, de volume 50 ml, a subi trois partitions successives par 50 ml au n-butanol dans une ampoule à décanter (voir § I.2.2.2, p. 14). Une phase aqueuse, de couleur grenat, limpide, ainsi qu'une phase butanolique de couleur marron clair,

limpide ont été obtenues. Seule la phase butanolique a été retenue car elle a montré une activité sur les souches microbiennes testées. Elle a été dénommée E₂.

Ce procédé a donc constitué la deuxième étape de purification.

II.1.2.1. Filtration sur charbon actif

L'extrait E₂, de volume 50 ml, a été filtré sur une couche de charbon actif selon la méthode décrite au § I.2.2.3 (p. 14), le filtrat obtenu était incolore et actif sur les microorganismes.

Cette technique a constitué la troisième étape de purification et l'extrait obtenu a été appelé E₃.

Le procédé définitif d'extraction et de purification des principes toxiques est résumé sur la figure 4 (p. 27).

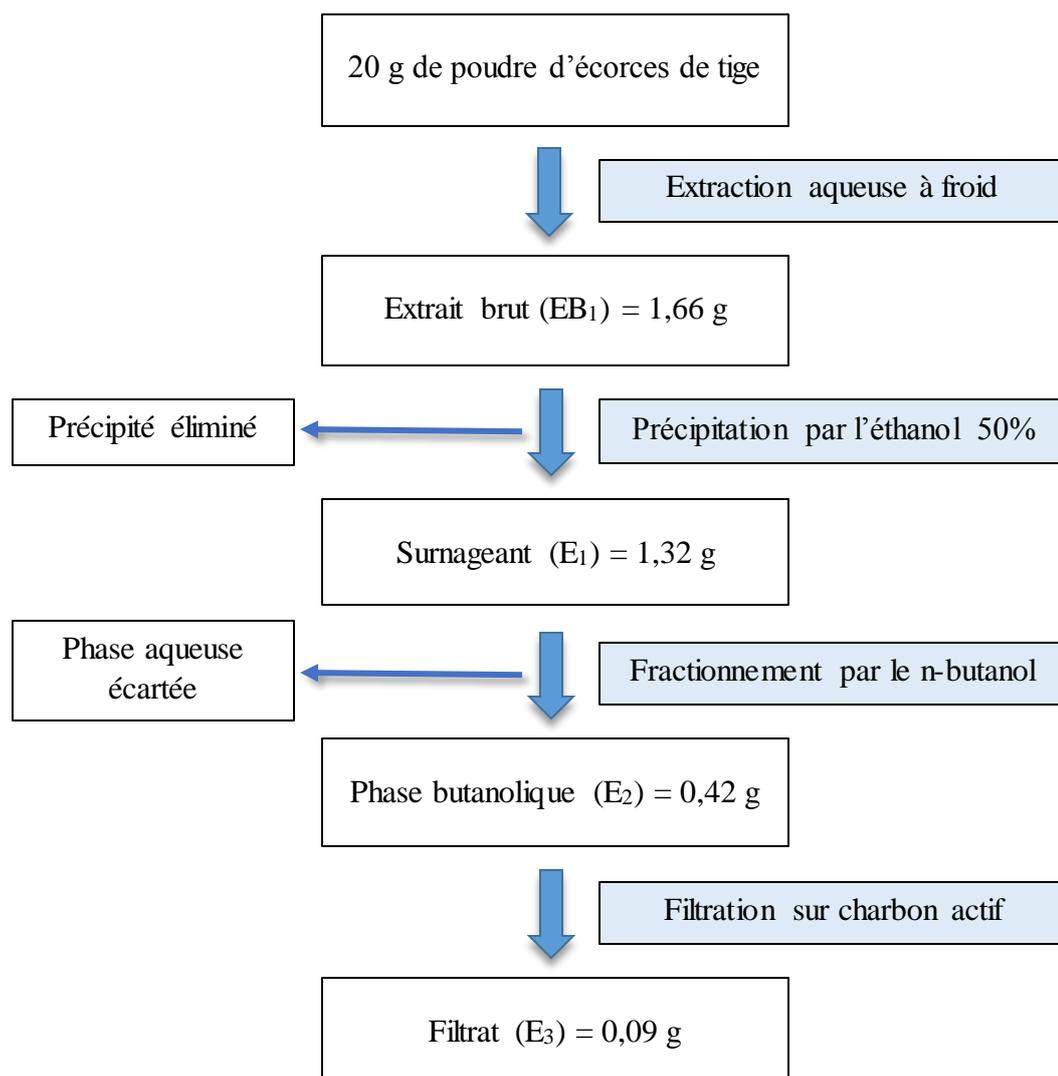


Figure 4 : Schéma récapitulatif de l'extraction et des différentes étapes de purification des principes actifs des écorces de tige de *Cnestis glabra*.

Les chiffres indiquent les poids des résidus d'évaporation à sec des extraits.

II.1.3. RENDEMENTS

Au terme des étapes de purification, les rendements par rapport à EB₁ et la poudre d'écorces de tige ont été déterminés en appliquant la formule décrite au § I.2.4 (p. 16) :

- A partir de 1,66 g d'EB₁, nous avons obtenu 0,09 g d'extrait E₃, ce qui équivaut à un rendement de purification de l'ordre de 5,42%.

- A partir de 20 g de poudre d'écorces de tige, nous avons obtenu 0,09 g d'extrait E₃, le rendement en toxines (rendement par rapport au matériel végétal de départ) correspond donc à 0,45%.

II.1.4. ANALYSE DES EXTRAITS

II.1.4.1. Chromatographie sur couche mince

L'évolution de l'homogénéité des extraits des différents extraits issus de chaque étape de purification a été appréciée par CCM (voir § I.2.5.1, p. 16) dans le système de solvants butanol/dichlorométhane/eau/méthanol/acide acétique (B/D/E/M/A 70/30/20/20/10, p/p/p/p/p). Le chromatogramme a d'abord été observé sous lumière UV à 254 nm puis 366 nm, ensuite révélé à l'aide du réactif à la vanilline sulfurique. Les résultats sont présentés sur la figure 5.

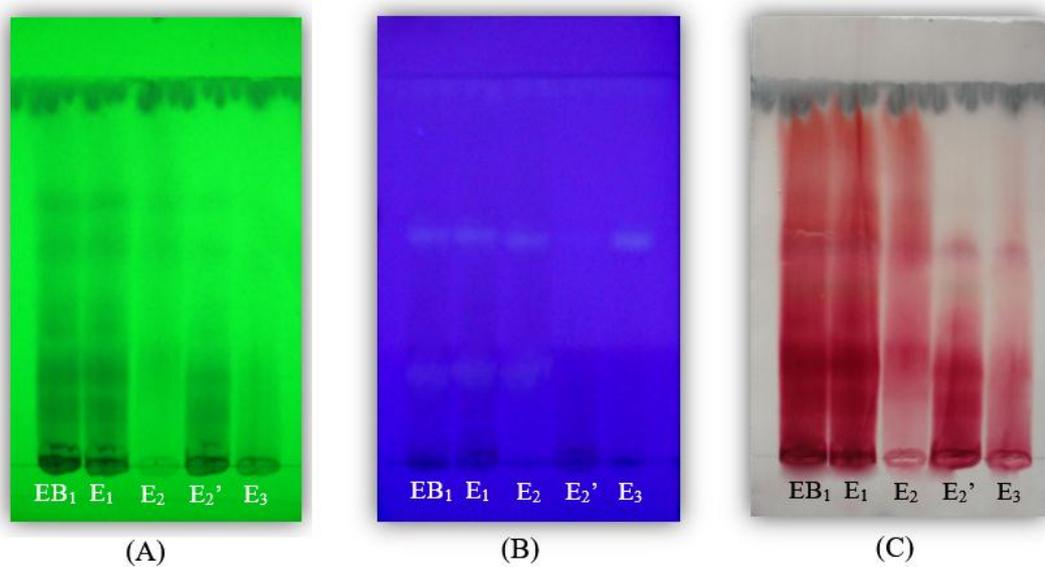


Figure 5 : Chromatogramme des différents extraits obtenus au cours de l'extraction et de la purification des principes toxiques de *Cnestis glabra*

EB₁ : extrait brut aqueux à froid

E₁ : surnageant issu de la précipitation par l'éthanol 50%

E₂ : phase butanolique du traitement par le n-butanol

E₂' : phase aqueuse du traitement par le n-butanol

E₃ : Filtrat obtenu par traitement sur charbon actif

(A) : Observation sous UV 254 nm ; **(B)** : Observation sous UV 366 nm ;

(C) : Révélation par le réactif à la vanilline sulfurique.

D'après ces figures, EB₁ et E₁ présente 7 bandes majeures, E₂ compte 4 bandes tandis que l'extrait purifié E₃ n'en comporte plus que 2. La purification a donc permis d'éliminer 5 bandes majeures.

II.1.4.2. Détection des acides aminés par le test à la ninhydrine

Selon la méthode décrite au § I.2.5.2 (p. 17), quelques gouttes de solution de ninhydrine ont été ajoutées à EB₁ de couleur marron clair. Aucun changement de coloration n'a été noté, même après avoir chauffé le mélange au bain-marie. Par conséquent, on peut en déduire que EB₁ ne contient pas d'acides aminés.

II.1.4.3. Criblage phytochimique

Un criblage phytochimique de EB₁ et E₃ a été effectué afin de déterminer la nature chimique des principes actifs (voir § I.2.5.3, p. 18).

Les résultats sont donnés dans le tableau n° 2 (p. 30).

D'après ces résultats, EB₁ contient des flavonoïdes, des leucoanthocyanes, des tanins, des stéroïdes et des triterpènes tandis qu'E₃ ne renferme plus que des leucoanthocyanes, des flavonoïdes et des triterpènes. Les tanins, les polyphénols et les stéroïdes ont donc été éliminés au cours de la purification.

Tableau n° 2 : Résultats du criblage phytochimique de la poudre végétale, de l'extrait brut EB₁ et de l'extrait purifié E₃

Famille chimique	Extrait utilisé	Réaction	Résultats		
			Poudre végétale	EB ₁	E ₃
Alcaloïdes	Extrait acide	MAYER	-	-	-
		WAGNER	-	-	-
		DRAGENDORFF	-	-	-
Flavonoïdes	Extrait hydroéthanolique	WILLSTÄTTER	+	+	+
Leucoanthocyanes	Extrait hydroéthanolique	BATE-SMITH	+	+	+
Tanins et polyphénols	Extrait aqueux	Gélatine 1%	+	+	-
		Gélatine salée	+	+	-
		Chlorure ferrique	+	+	-
Stéroïdes	Extrait chloroformique	LIEBERMANN-BURCHARD	+	+	-
Triterpènes	Extrait chloroformique	LIEBERMANN-BURCHARD	+	+	+
Stérols insaturés	Extrait chloroformique	SALKOWSKI	-	-	-
Iridoïdes	Extrait aqueux		-	-	-
Désoxyoses	Extrait aqueux	KELLER-KILIANI	-	-	-
Saponines	Extrait aqueux	Test de mousse	-	-	-
Anthraquinones	Extrait aqueux	BORNTRAGER	-	-	-
Coumarines	Extrait éthanolique		-	-	-

+ : Réaction positive (Présence) - : Réaction négative (Absence)

II.1.4.4. Caractérisation physico-chimique

Certaines propriétés physico-chimiques des principes actifs des écorces de tige de *Cnestis glabra* ont pu être déterminées au cours de leur extraction et purification. D'après nos résultats, il semble que les écorces de tige renfermeraient deux types de principes distincts :

+ principes antimicrobiens :

- ils ont un goût légèrement amer ;
- l'élimination du précipité apparu lors des opérations de congélation et de décongélation répétées n'affectent en aucun cas les principes actifs présents dans la plante ;
- ils sont solubles dans les solvants polaires tels que l'eau, l'éthanol et le n-butanol ;
- ils sont thermostables car ils résistent à des températures élevées (96°C) ;

+ principes toxiques sur souris :

- ils ont un goût légèrement amer ;
- les opérations de congélation et de décongélation répétées ne les affectent pas ;
- ils ne résistent pas à des températures élevées (96°C) ;
- ils sont précipitables par l'éthanol 50% ;
- ils sont solubles dans l'eau et peu solubles dans les solvants organiques comme le n-butanol.

III-DISCUSSION ET CONCLUSION

Cette étude chimique a permis de mettre en évidence une activité antimicrobienne et une toxicité sur souris dans l'écorce de tige de *Cnestis glabra*.

Quatre méthodes ont été testées pour extraire les principes actifs à partir de la poudre d'écorces de tige séchées : extraction aqueuse à froid, extraction aqueuse à chaud, extraction hydroéthanolique 75% à froid et extraction à l'éthanol absolu à chaud. L'extraction aqueuse à froid a été choisie pour la suite des manipulations du fait que l'extrait brut issu de cette méthode a présenté le meilleur rendement et est toxique sur souris. De plus, il a montré une activité intéressante sur des microorganismes pathogènes.

Partant de l'extrait brut aqueux à froid (EB₁), trois étapes ont été réalisées pour une purification bioguidée en microbiologie : il s'agit d'une précipitation par l'éthanol 50%, d'un fractionnement par le n-butanol et d'une filtration sur charbon actif. Ces étapes ont abouti à un extrait partiellement purifié noté E₃ qui n'était plus toxique sur souris mais possédait toujours une activité antimicrobienne. Les rendements étaient de 5,42% par rapport à EB₁ et de 0,45% par rapport au poids du matériel végétal de départ. Cette dernière valeur est certes assez basse mais ce rendement reste supérieur à celui de l'extrait d'écorces de racines de *Rourea orientalis*, une autre plante appartenant à la famille des CONNARACEAE, qui était de 0,28% (RAKOTORANOROMALALA, 1984).

Les méthodes utilisées lors des extractions et de purification ont révélé quelques propriétés physico-chimiques des principes actifs responsables de l'activité antimicrobienne dans l'écorce de tige de *Cnestis glabra*. En effet, ces principes étaient solubles dans des solvants polaires tels que l'eau, l'éthanol et le solvant organique n-butanol. L'élimination du précipité apparue lors des opérations de congélation et de décongélation répétées n'avait aucun effet sur l'activité antimicrobienne et antioxydante des extraits. Enfin, les principes actifs sur les microorganismes résistaient à des températures élevées (96°C) ce qui signifie qu'ils sont thermostables.

D'après le criblage phytochimique, EB₁ contenait des tanins, des polyphénols, des leucoanthocyanes, des flavonoïdes, des stéroïdes et des triterpènes. La plupart de ces composés ont été trouvés dans d'autres plantes du genre *Cnestis* déjà étudiées

Etude chimique

auparavant. Comme exemples, la présence de tanins en grande quantité et de flavonoïdes a été détectée dans les tiges de *Cnestis ferruginea* (ENEMOR et coll., 2015). De même, les feuilles et les racines de *Cnestis palala* renfermaient des triterpénoïdes, des composés phénoliques, des tanins et des flavonoïdes (LAR, 2014). Au terme de la purification, les tanins, les polyphénols et les stéroïdes ont été éliminés et l'extrait E₃ ne contenait plus que trois familles chimiques qui étaient les flavonoïdes, les leucoanthocyanes et les triterpènes.

D'autre part, il s'avère que EB₁ a donné une réaction négative au test à la ninhydrine, ce qui implique qu'il ne contiendrait pas d'acides aminés. Par conséquent, on peut écarter la possibilité que les principes responsables de la toxicité chez les souris soient des acides aminés ni même qu'il s'agisse de la méthionine sulfoximine, une neurotoxine qui est un aminoacide isolé à partir des écorces de racines et des graines de *Cnestis glabra* (JEANNODA et coll., 1985). D'un autre côté, cette réaction négative avec le test à la ninhydrine peut également être expliquée par « l'effet terroir » : en effet, une plante se trouvant dans un territoire donné n'aura pas forcément la même composition chimique que celle récoltée dans un autre environnement (WEB 5).

En résumé, l'écorce de *Cnestis glabra* renferme, d'une part des composés montrant une activité antimicrobienne qui pourraient être des triterpènes, des flavonoïdes, des leucoanthocyanes, d'autre part, des composés toxiques sur souris qui pourraient être des tanins, des polyphénols ou des stéroïdes.



**DEUXIEME PARTIE :
ETUDE TOXICOLOGIQUE**

INTRODUCTION

Les principes antimicrobiens de l'écorce de tige de *Cnestis glabra* ont été partiellement purifiés au cours de l'étude chimique et leurs caractéristiques physico-chimiques ont été déterminées. Toutefois, avant de pouvoir les exploiter du point de vue thérapeutique ou cosmétique, etc., il est nécessaire d'entreprendre une étude toxicologique afin d'évaluer les risques éventuels liés à leurs utilisations, pour l'organisme et les écosystèmes.

Dans cette deuxième partie, nous avons étudié l'activité antimicrobienne des extraits et nous avons cherché d'autres activités de EB₁. Ainsi, nous avons évalué :

- les effets des différents extraits bruts (EB₁, EB₂, EB₃ et EB₄) et des extraits purifiés (E₁, E₂ et E₃) sur les microorganismes : germes pathogènes.
- l'activité antioxydante de EB₁ ;
- la toxicité de EB₁ sur les animaux à sang chaud : souris ;
- les effets de EB₁ sur les animaux à sang froid : alevins de poisson et larves de moustique ;
- l'activité de EB₁ sur les végétaux : germination des graines et croissance des jeunes plantules.

I-MATERIELS ET METHODES

I.1. MATERIELS

I.1.1. LES MATERIELS UTILISES EN MICROBIOLOGIE

I.1.1.1. Les germes utilisés

Pour cette étude, 9 souches bactériennes (5 Gram (+) et 4 Gram (-)) et une levure (voir tableau n° 3, p. 35), disponibles au laboratoire de Microbiologie de la Mention Biochimie Fondamentale et Appliquée, ont été utilisées.

Tableau n° 3 : Liste des germes utilisés et leurs caractéristiques

Classe	Type	Nom des germes utilisés	Morphologie	Références
Bactéries	Gram (+)	<i>Bacillus cereus</i>	Bacille	ATCC 14579
		<i>Clostridium perfringens</i>	Bacille	ATCC 13124
		<i>Staphylococcus aureus</i>	Coque	ATCC 25923
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Coque	ATCC 6305
	Gram (-)	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Coque	ATCC 19615
		<i>Enterobacter aerogenes</i>	Bacille	ATCC 13048
		<i>Enterobacter cloacae</i>	Bacille	ATCC 13047
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacille	ATCC 10145
		<i>Yersinia enterocolitica</i>	Bacille	ATCC 23715
Levure		<i>Candida albicans</i>	Colonie crémeuse	ATCC 10231

ATCC : American Type Culture Collection

I.1.1.2. Les milieux de culture

Les milieux solides et liquides utilisés pour l'étude des effets sur les microorganismes sont de qualité pour analyse.

I.1.1.2.1. Les milieux solides

- le milieu de MUELLER-HINTON AGAR (MHA) de marque Scharlau : un milieu gélosé (solide) employé pour l'étude de la sensibilité des bactéries vis-à-vis des extraits testés ;

- le milieu solide de SABOURAUD utilisé pour les tests de sensibilité des levures aux principes actifs.

I.1.1.2.2. Les milieux liquides

- le milieu liquide Nutrient Broth utilisé pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des bactéries ;

- le milieu liquide de SABOURAUD employé pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des levures.

La composition de ces milieux est détaillée en Annexe III.

I.1.1.3. Les disques pour les tests d'antibiogramme

Des disques de 6 mm de diamètre découpés dans du papier Whatman n°1 ont été utilisés pour les tests.

I.1.2. LES ANIMAUX D'EXPERIMENTATION

I.1.2.1. Les animaux à sang chaud : Les souris

Les souris utilisées dans nos expériences proviennent de l'animalerie de la Mention Biochimie Fondamentale et Appliquée, Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo. Ce sont des souris femelles (*Mus musculus*) de souche OF-1, pesant 25 ± 2 g et stabilisées à l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) depuis plusieurs années.

I.1.2.2. Les animaux à sang froid

I.1.2.2.1. Les larves de moustique

Les larves du moustique *Culex quinquefasciatus* au troisième stade de développement (taille = 5 mm) ont été capturées le jour du test dans les eaux stagnantes des alentours du campus universitaire d'Ankatso.

I.1.2.2.2. Les alevins de poisson

Les alevins du poisson *Cyprinus carpio* (carpe) ont été choisis pour les tests. Ils ont été fournis par une petite ferme d'élevage située à Ambohimangakely (Antananarivo). Ces alevins mesurent en moyenne 2 cm. Les tests ont été effectués après 24 h d'adaptation dans un aquarium bien aéré.

I.1.3. LES PLANTES D'EXPERIMENTATION

Afin d'étudier les effets des extraits sur la germination et la croissance des jeunes plantules, des graines provenant de diverses plantes potagères (Liliopsida et Magnoliopsida) ont été utilisées. Elles sont indiquées dans le tableau n° 4 (p. 37).

Tableau n° 4 : Les graines utilisées pour les tests sur les végétaux

CLASSE	FAMILLE	Nom scientifique	Nom usuel
MAGNOLIOPSIDA	APIACEAE	<i>Daucus carotta</i>	Carotte
	ASTERACEAE	<i>Lactuca sativa</i>	Laitue
	BRASSICACEAE	<i>Brassica chinensis</i>	Ramirebaka
		<i>Brassica oleraceae</i>	Anantsonga
		<i>Raphanus sativus</i>	Radis blanc
	CUCURBITACEAE	<i>Cucumis sp.</i>	Concombre
		<i>Cucurbita pepo</i>	Courgette
	FABACEAE	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Haricot blanc
		<i>Pisum sativum</i>	Petit pois
	PAPILIONACEAE	<i>Glycine max</i>	Soja
SOLANACEAE	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Tomate	
LILIOPSIDA	POACEAE	<i>Oryza sativa</i>	Riz
		<i>Zea mays</i>	Mais

I.2. METHODES

I.2.1. METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES MICROORGANISMES

I.2.1.1. Méthode de stérilisation

Avant les manipulations, tous les matériels utilisés, incluant les milieux de culture, les disques d'antibiogramme, les cônes des micropipettes ainsi que les verreries sont stérilisés à l'autoclave, à 121°C, pendant une heure, sous une pression de 2 bars.

Les manipulations sont effectuées dans une zone d'une vingtaine de centimètres de rayon autour d'une flamme de bec Bunsen. La paille et les mains du manipulateur sont lavées soigneusement avec du savon puis avec de l'alcool à 70° pour éviter les contaminations.

I.2.1.2. Détermination de l'activité antimicrobienne des extraits

(VANDEPITTE et coll., 2003 ; MOROH et coll., 2008)

L'activité antimicrobienne est déterminée selon la méthode de diffusion en milieu solide ou méthode des disques.

I.2.1.2.1. Principe

Un antibiotique déposé à la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec une bactérie ou une levure diffuse au sein de la gélose, créant ainsi une zone circulaire d'inhibition appelée « halo d'inhibition », dont le diamètre varie selon le degré de sensibilité du microorganisme vis-à-vis de l'antibiotique.

I.2.1.2.2. Mode opératoire

Le test se déroule en trois étapes :

✚ Première étape : Repiquage des souches

Les souches pures à étudier sont prélevées à partir d'une culture sur gélose-pente à l'aide d'une anse stérile, puis ensemencées en stries sur de la gélose préalablement coulée dans des boîtes de Petri. Le tout est incubé à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 h pour les bactéries et à 25°C pendant 24 h pour la levure, afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à préparer l'inoculum.

✚ Deuxième étape : Préparation de l'inoculum et des disques d'antibiogramme

Une ansée de colonie isolée est prélevée et mise en suspension dans 2 ml de solution de NaCl 9‰ de manière à obtenir approximativement 10^8 cellules/ml. Ensuite, 1 ml de chaque suspension est dilué dans 9 ml de sérum physiologique (NaCl 9‰). La turbidité mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre est ajustée jusqu'à obtenir une densité optique (DO) égale à 0,125 à la longueur d'ondes $\lambda = 600$ nm, équivalent à la concentration 10^6 cellules/ml (0,5 à 1 McFarland).

L'inoculum ainsi préparé est coulé dans des boîtes de Petri contenant le milieu gélosé selon la technique d'inondation, puis laissé incubé pendant 15 min, à 37°C pour les bactéries et à 25°C pour la levure afin de permettre l'adhérence des germes à la surface du milieu. L'excès d'inoculum est ensuite aspiré à l'aide d'une micropipette stérile.

Enfin, 10 µl de l'extrait à tester sont déposés sur chaque disque. Les disques chargés sont mis à sécher sous une hotte, puis déposés sur la gélose ensemencée. Le tout est incubé à 37°C (25°C pour la levure) pendant 24 h.

 **Troisième étape : Observation des résultats**

Après l'incubation, les diamètres des halos d'inhibition sont mesurés. Les résultats sont exprimés selon les normes présentées dans le tableau n° 5 ci-dessous (PONCE et coll., 2003).

Tableau n° 5 : Normes utilisées pour la lecture des résultats des tests d'antibiogramme

Diamètre du halo d'inhibition (X)	Degré de sensibilité du germe	Expression des résultats
$X \leq 8$ mm	Insensible ou résistant	-
$9 \text{ mm} \leq X \leq 14$ mm	Sensible	+
$15 \text{ mm} \leq X \leq 19$ mm	Très sensible	++
$X \geq 20$ mm	Extrêmement sensible	+++

I.2.1.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

(FAWOLE et coll., 2009 ; KUETE et coll., 2009)

La concentration minimale inhibitrice ou CMI est la plus faible concentration d'antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 h.

I.2.1.3.1. Méthode de dilution en milieu liquide sur microplaque

a) Repiquage des souches à tester

Les bactéries sont repiquées par la méthode des stries dans des boîtes de Petri, sur du milieu gélosé de MUELLER-HINTON et les levures sur du milieu gélosé de SABOURAUD. Les cultures sont incubées à l'étuve (37°C pour les bactéries et 25°C pour la levure) pendant 24 h afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées.

b) Préparation de l'inoculum

Après 24 h d'incubation, une colonie isolée des souches à tester est prélevée à l'aide d'une anse stérile puis mise en suspension dans du bouillon nutritif de MUELLER-HINTON BROTH (MHB) dans le cas des bactéries et dans du milieu de

SABOURAUD pour les levures. La suspension ainsi obtenue est ensuite standardisée à une valeur comprise entre 0,5 et 1 McFarland c'est-à-dire 10^6 cellules/ml (voir § I.2.1.2.2, p. 38).

c) Préparation de la gamme de concentrations de l'extrait à tester

A partir d'une concentration de 100 mg/ml, l'extrait est d'abord stérilisé par filtration sur filtre Millipore (diamètre des pores : 0,20 μm), puis dilué en cascade dans de l'eau distillée stérile de manière à obtenir différentes concentrations.

d) Inoculation

Pour cette étape, une microplaque à 96 puits est utilisée pour chaque souche à tester. Deux témoins sont prévus :

- Un témoin positif (croissance normale des germes) : 95 μl de MHB additionnés de 5 μl d'inoculum pour les bactéries et 95 μl de milieu de SABOURAUD additionnés de 5 μl d'inoculum pour la levure ;
- Un témoin négatif (absence de croissance des germes) : 100 μl de MHB pour les bactéries et 100 μl de milieu de SABOURAUD pour la levure.

Dans les puits restants, 100 μl de l'extrait sont additionnés de 95 μl de MHB pour les bactéries et 95 μl de milieu de SABOURAUD pour la levure. 5 μl de suspension microbienne y sont ensuite introduits à l'aide d'une micropipette.

Les plaques sont recouvertes de papier aluminium préalablement stérilisé par autoclavage°, puis incubées pendant 24 h à 37°C pour les bactéries et à 25°C pour la levure.

Après 30 min d'incubation des germes-tests, 40 μl d'une solution à 0,2 mg/ml de *p*-iodonitrotetrazolium chloride (INT), un indicateur coloré jaune, sont ajoutés dans chaque puits. L'INT vire au violet lorsqu'il y a croissance microbienne. La CMI correspond à la plus faible concentration d'extrait où aucun changement de coloration n'est observé (KUETE et coll., 2009).

I.2.1.4. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) ou fongicide (CMF)

La CMB ou la CMF est la concentration de l'antimicrobien qui laisse au plus 0,01% de germes survivants.

Pour sa détermination, 5 µl de chacun des puits qui ne présentaient pas de trouble (puits non colorés en violet) sont ensemencés en stries sur du milieu de MUELLER-HINTON AGAR (MHA) pour les bactéries et sur du milieu gélosé de SABOURAUD pour les levures. La CMB ou la CMF correspond à la plus faible concentration où aucune colonie microbienne ne pousse après incubation pendant 24 h à 37°C pour les bactéries et 25°C pour la levure.

Le rapport CMB/CMI ou CMF/CMI est calculé afin de connaître la nature de l'action des extraits sur les souches testées. L'extrait a un effet bactéricide ou fongicide si le rapport CMB/CMI ou CMF/CMI est inférieur ou égal à quatre et il a un effet bactériostatique ou fongistatique si ce rapport est supérieur à quatre (MARMONIER, 1990).

I.2.2. Test d'activité antioxydante

(BRILLANT et coll., 2006 ; ATHAMENA et coll., 2010 ; BIDIE et coll., 2011 ; RAMANANTSOA, 2014 ; TOUAIBIA et CHAOUCH, 2015)

I.2.2.1. Principe

L'étude des propriétés antioxydantes a été réalisée en utilisant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), un radical libre qui présente une couleur violet sombre. Une fois le DPPH piégé par des substances antioxydantes, il est réduit en 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine de couleur jaune (figure 6). Le virage de coloration et son intensité dépendent de la nature, la concentration et la puissance de la substance antiradicalaire.

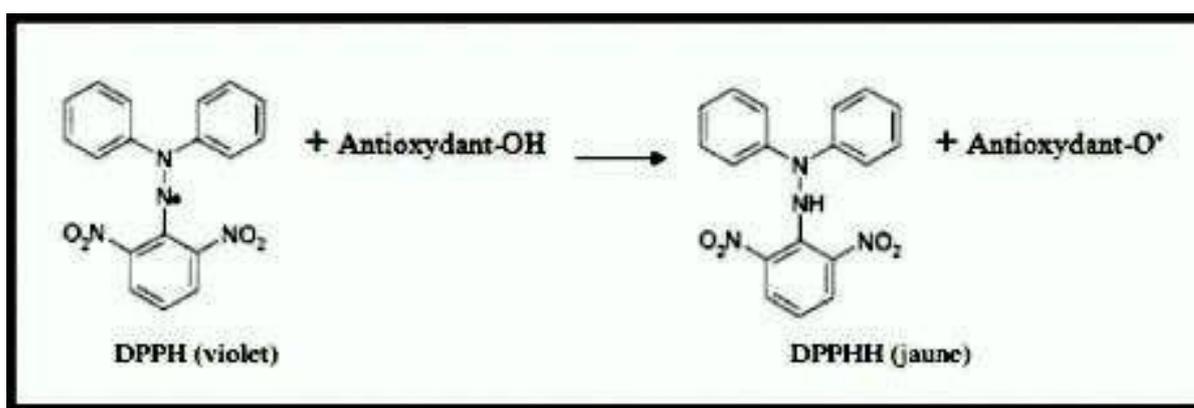


Figure 6 : Réaction de réduction du DPPH

I.2.2.2. Mode opératoire

L'extrait à tester est d'abord laissé migrer en CCM (voir § I.2.5.1, p. 16) dans le système butanol/acide acétique/eau distillée ou B/A/E (60/20/20, p/p/p). Une

solution méthanolique de DPPH à 2 mg/ml est ensuite pulvérisée sur la plaque et le changement de coloration est observé après 5 min. Le test est positif pour un composé lorsque la couleur de la tache correspondante devient jaune.

I.2.3. METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG CHAUD

I.2.3.1. Test sur souris

I.2.3.1.1. Les voies d'administration

(OGWAL-OKENG et coll., 2003 ; ADLY et coll., 2015)

La vitesse de pénétration et d'absorption des extraits chez un organisme animal et les effets de ceux-ci varient en fonction des voies d'administration. Deux voies d'administration, la voie orale (*per os*) et la voie intrapéritonéale (ip), ont été testées sur souris.

Voie orale (gavage)

L'extrait à tester est injecté avec précaution au fond de l'estomac de l'animal à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille à bout arrondi.

Voie intrapéritonéale

L'extrait est injecté dans la partie abdominale gauche ou droite de la souris. Pour bien le répartir, l'abdomen de l'animal est légèrement frotté après l'injection.

I.2.3.1.2. Estimation de la toxicité aiguë

La toxicité aiguë est évaluée par injection de l'extrait à tester par voie ip, à raison de 0,3 ml pour 25 g de souris et par voie orale (gavage) à raison de 0,3 ml pour 25 g de souris. Deux lots de trois souris femelles, pesant 25 ± 2 g sont nécessaires pour le test. Un des lots recevant du sérum physiologique servira de témoin. L'observation s'effectue pendant 24 h et les symptômes qui apparaissent sont immédiatement notés.

I.2.3.1.3. Détermination de la DL₅₀ (24 h)

La DL₅₀ ou dose létale 50 % (24 h) est la dose d'une substance, exprimée par unité de poids d'extrait par kilo d'animal testé, qui provoque la mort de la moitié des animaux testés pendant 24 h. Différentes doses en progression géométrique de raison *r* sont administrées par voie ip. La DL₅₀ peut être estimée par la méthode de REED et MUENCH (1938) :

- soit par la formule suivante :

$$\log DL_{50} (24 \text{ h}) = \log B + \frac{0,5 - N}{M - N} \log r$$

Avec :

- B : dose immédiatement inférieure à la DL_{50} ;
- N : mortalité causée par la dose B en fraction décimale ;
- M : mortalité causée par la dose immédiatement supérieure à la DL_{50} (en fraction décimale) ;
- r : raison de la progression géométrique.

- soit par la méthode graphique des totaux cumulatifs :

La valeur de la DL_{50} est déterminée à partir de l'intersection de la courbe des totaux cumulatifs des survivants et de la courbe des totaux cumulatifs des morts en fonction des doses injectées.

I.2.4. METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG FROID

I.2.4.1. Estimation de la concentration létale 50% (24 h)

I.2.4.1.1. Définition

La concentration létale 50% ou CL_{50} (24 h) est la concentration d'une substance qui tue 50% des animaux testés en 24 h.

I.2.4.1.2. Détermination de la CL_{50} (24 h)

La CL_{50} (24 h) est déterminée en évaluant le pourcentage de décès en fonction de la concentration (C), d'après la méthode de régression linéaire (BOYD, 1966) de la relation :

$$\% \text{mortalité} = f(\log C)$$

L'équation de la droite de régression est de la forme :

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

avec :

- Y : pourcentage de mortalité ;
- A : constante ;
- B : coefficient de régression ;
- C : concentration.

I.2.4.2. Test sur les larves de moustique

(OMS, 1970 ; AOUINTY et coll., 2006)

I.2.4.2.1. Principe

Cette technique consiste à évaluer la résistance des animaux aquatiques vis-à-vis de l'intoxication de leur milieu par l'extrait à étudier.

I.2.4.2.2. Mode opératoire

Des larves de *Culex quinquefasciatus* au troisième stade de développement (taille = 5 mm) sont réparties en lots de cinq et déposées dans 200 ml d'extrait à tester à 2 mg/ml. Au bout de 24 h, la mortalité larvaire se traduit :

- soit par l'immobilité complète des larves ;
- soit par leur incapacité à remonter en surface ou à plonger lorsqu'on agite le milieu.

I.2.4.3. Test sur les alevins de poisson

I.2.4.3.1. Principe

Il s'agit de tests toxicologiques qui consistent à observer les effets directs des substances se trouvant dans l'eau sur des animaux aquatiques.

I.2.4.3.2. Mode opératoire

Sept lots de cinq alevins sont répartis dans des cristallisoirs contenant différentes concentrations de l'extrait à tester en progression géométrique de raison r (volume final = 200ml). Les animaux morts sont comptabilisés au bout de 24 h.

I.2.5. METHODES D'ETUDE DES EFFETS SUR LES VEGETAUX

Avant toute utilisation, les graines doivent être désinfectées par immersion dans de l'eau de javel à 5% pendant 1 min, puis lavées abondamment avec de l'eau de robinet.

I.2.5.1. Etude des effets sur la germination des graines

(GARCIA et coll., 2006 ; RAKOTO, 2012 ; RANDRIANARIVO, 2015)

I.2.5.1.1. Principe

Cette méthode repose sur l'évaluation des effets de l'extrait à étudier sur le pouvoir germinatif de graines appartenant à différentes familles de plantes potagères Magnoliopsida et Liliopsida.

I.2.5.1.2. Mode opératoire

Les graines des différentes espèces végétales utilisées sont trempées dans l'extrait à tester de concentration 1 mg/ml à l'obscurité pendant 48 h. Après ce délai, elles sont transférées sur du coton hydrophile imbibé d'eau de robinet. Les graines ayant germé sont comptées après 72 h.

I.2.5.2. Etude des effets sur la croissance des jeunes plantules

I.2.5.2.1. Principe

Cette technique repose sur l'observation des effets de l'extrait à tester à différentes concentrations sur le développement des hypocotyles et des épicotyles des jeunes plantules.

I.2.5.2.2. Mode opératoire

Une espèce représentant les Liliopsida (maïs) et une autre représentant les Magnoliopsida (petit pois) servent de matériels d'étude.

a) Trempage

Les graines de chaque plante-test sont trempées, à l'obscurité, dans de l'eau de robinet pendant 48 h jusqu'à leur germination.

b) Germination

Après trempage, les graines sont réparties en 7 lots de 30 graines : un premier lot servant de témoin positif est mis à germer sur du coton imbibé d'eau de robinet et un second servant de témoin négatif est transféré sur du coton imbibé d'un herbicide de référence : le glyphosate à 7,2 mg/ml. Les cinq derniers lots sont transvasés sur du coton imbibé d'extrait à tester à différentes concentrations.

Durant deux semaines, tous les deux jours, les jeunes plantules sont arrosées avec de l'eau de robinet et la longueur de leurs hypocotyles et épicotyles est mesurée.

Etude toxicologique

Les données obtenues sont ensuite analysées au moyen du logiciel statistique STATITCF (MSDOS 6.21) en utilisant le test ANOVA suivi de celui de Newman-Keuls à 5% d'intervalle de confiance. Pour cela, deux facteurs sont testés successivement : le nombre de jours d'expérimentation et la concentration de l'extrait à tester.

II-RESULTATS

Etant donné que la purification a été bioguidée par des tests sur des microorganismes, nous avons d'abord approfondi l'étude de l'activité antimicrobienne. Ensuite, nous avons recherché d'autres activités pour EB₁.

II.1. EFFETS SUR LES MICROORGANISMES

II.1.1. SPECTRE D'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES EXTRAITS BRUTS

L'activité des extraits bruts issus de différentes méthodes d'extraction a été testée, à 100 mg/ml, sur 9 souches bactériennes (5 Gram (+) et 4 Gram (-)) et sur une levure selon la méthode de diffusion en milieu solide (voir § I.2.1.2, p. 38).

Les résultats sont présentés dans le tableau n° 6 (p. 48).

D'après ces résultats, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes* et *Candida albicans* ont montré une sensibilité vis-à-vis de tous les extraits bruts. *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae* étaient sensibles à EB₁, EB₃ et EB₄. Ensuite, les extraits EB₃ et EB₄ ont exercé une légère activité sur deux bactéries : *Enterobacter cloacae* et *Streptococcus pyogenes*. Enfin, *Pseudomonas aeruginosa* et *Yersinia enterocolitica* semblaient insensibles vis-à-vis de tous les extraits bruts.

Tableau n° 6 : Résultats des tests d'activité antimicrobienne des extraits bruts

TYPE	GERMES	DIAMETRE DES HALOS (mm)				EXPRESSION DES RESULTATS			
		EB ₁	EB ₂	EB ₃	EB ₄	EB ₁	EB ₂	EB ₃	EB ₄
Gram (+)	<i>Bacillus cereus</i>	13,5	9,5	11,5	11,5	+	+	+	+
	<i>Clostridium perfringens</i>	9	6,5	9	9	+	-	+	+
	<i>Staphylococcus aureus</i>	9,5	8	9	9,5	+	-	+	+
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	10	7	10	9	+	-	+	+
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	8	8	10	10,5	-	-	+	+
Gram (-)	<i>Enterobacter aerogenes</i>	9	9	9,5	9	+	+	+	+
	<i>Enterobacter cloacae</i>	8	8	10	10,5	-	-	+	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	6	8	8	-	-	-	-
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	6	6	6	6	-	-	-	-
	<i>Candida albicans</i>	14	14	15	15,5	+	+	++	++

EB₁ : extrait aqueux à froid, EB₂ : extrait aqueux à chaud, EB₃ : extrait hydroéthanolique à froid, EB₄ : extrait éthanolique absolu à chaud, ++ : très sensible, + : sensible, - : insensible.

II.1.2. SPECTRE D'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES EXTRAITS PURIFIES

Les différents extraits obtenus au cours des étapes de la purification de EB₁ ont été testés sur 3 germes-tests choisis parmi les plus sensibles : *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*.

Les résultats sont détaillés dans le tableau n° 7.

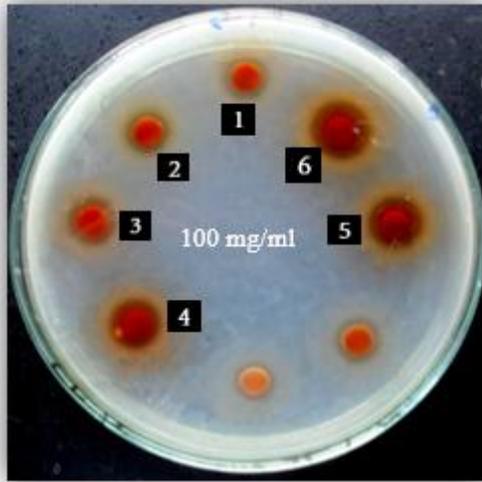
Tableau n° 7 : Activité des extraits purifiés sur les germes testés

	GERMES	EXTRAIT PURIFIE	DIAMETRE DES HALOS (mm)	EXPRESSION DES RESULTATS
GRAM (+)	<i>Bacillus cereus</i>	E ₁	11	+
		E ₂	11	+
		E ₃	15	++
	<i>Staphylococcus aureus</i>	E ₁	9	+
		E ₂	11	+
		E ₃	12	+
Levure	<i>Candida albicans</i>	E ₁	11	+
		E ₂	14	++
		E ₃	15,5	++

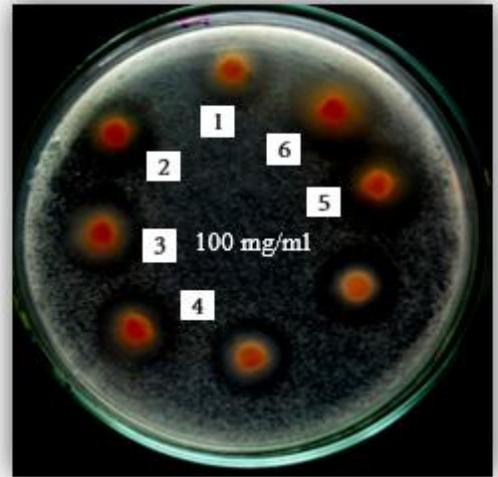
E₁ : surnageant éthanol 50%, **E₂** : phase butanolique, **E₃** : filtrat charbon actif, ++ : très sensible, + : sensible

Ces résultats montrent que toutes les souches testées étaient sensibles aux extraits E₁, E₂ et E₃. Cependant, il semble que *Candida albicans* était la plus sensible d'entre elles avec un halo d'inhibition de 15,5 mm de diamètre vis-à-vis de E₃, suivie de *Bacillus cereus* (diamètre du halo :15 mm) et enfin *Staphylococcus aureus* (12 mm).

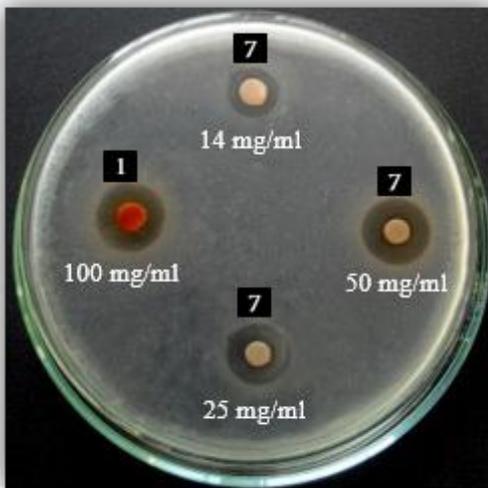
La figure 7 (p. 50) montre les résultats des tests d'activité antimicrobienne des différents extraits bruts et extraits purifiés sur *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Candida albicans*.



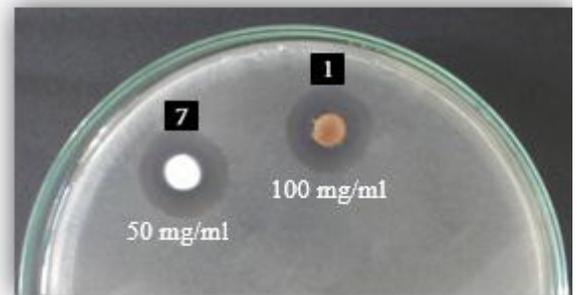
(A)



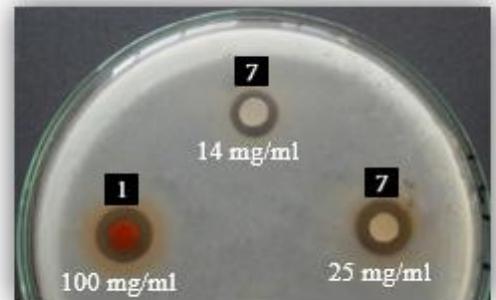
(B)



(C)



(D)



(E)

Figure 7 : Exemples montrant l'activité antimicrobienne des différents extraits : cas de *Staphylococcus aureus* (A) et (E), *Candida albicans* (B) et (D), *Bacillus cereus* (C)

- | | |
|----------------------------|---------------------------|
| 1. Extrait EB ₁ | 5. Extrait E ₁ |
| 2. Extrait EB ₂ | 6. Extrait E ₂ |
| 3. Extrait EB ₃ | 7. Extrait E ₃ |
| 4. Extrait EB ₄ | |

II.1.3. DETERMINATION DE LA CMI

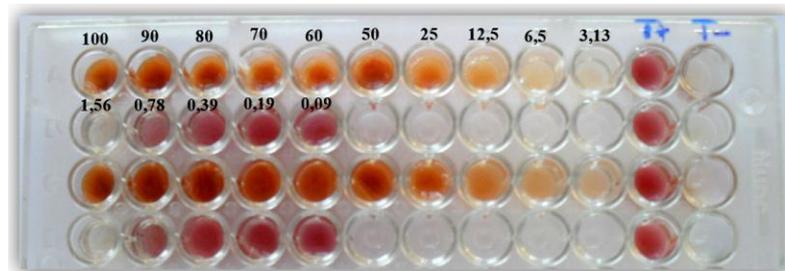
La CMI a été évaluée pour EB₁ sur les germes les plus sensibles suivants : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pneumoniae* (Gram +) et *Candida albicans* (levure) en utilisant la méthode de dilution en milieu liquide (voir § I.2.1.3.1, p. 39).

Les résultats sont présentés dans le tableau n° 8 et sur la figure 8 ci-dessous.

Tableau n° 8 : CMI de EB₁ par la méthode de dilution en milieu liquide

Souches	CMI (mg/ml) de EB ₁
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,13
<i>Bacillus cereus</i>	3,13
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	$1,56 \leq \text{CMI} \leq 3,13$
<i>Candida albicans</i>	3,13

D'après les résultats obtenus, la CMI était de 3,13 mg/ml sur *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Candida albicans*. Elle est située entre 1,56 et 3,13 mg/ml sur *Streptococcus pneumoniae*.



(A)



(B)

Figure 8 : Détermination de la CMI (mg/ml) de EB₁ par la méthode de dilution en milieu liquide sur microplaque sur *Staphylococcus aureus* (A) et *Candida albicans* (B)

II.1.4. DETERMINATION DE LA CMB ET CMF

Les concentrations minimales bactéricide et fongicide ont été déterminées sur *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* par ensemencement en stries sur milieu solide des suspensions microbiennes (voir § I.2.1.4, p. 40) correspondant aux concentrations de EB₁ supérieures ou égales à la CMI.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau n° 9.

Tableau n° 9 : Concentrations minimales bactéricide/fongicide de EB₁ sur *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*

Souches	CMB ou CMF (mg/ml) de EB ₁
<i>Staphylococcus aureus</i>	60
<i>Candida albicans</i>	3,13

D'après ces résultats, la CMB de *Staphylococcus aureus* était très éloignée de celle de sa CMI qui était de 3,13 mg/ml, tandis que la CMF de *Candida albicans* était la même que sa CMI c'est à dire 3,13 mg/ml.

Ainsi, les rapports CMB/CMI et CMF/CMI (voir § I.2.1.4, p. 40) sont respectivement de « 19,17 » pour *Staphylococcus aureus* et de « 1 » pour *Candida albicans*. On peut donc en déduire que EB₁ a une action bactériostatique sur *Staphylococcus aureus* (CMB/CMI > 4) et qu'il exerce une action fongicide sur *Candida albicans* (CMF/CMI < 4).

II.2. TEST D'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

Le pouvoir antioxydant de EB₁ a été évalué à l'aide du test au DPPH (voir § I.2.2, p. 41). Le résultat est présenté sur la figure 9 (p. 53).



Figure 9 : Pouvoir antioxydant à l'aide du test au DPPH

T : Témoin positif = Vitamine C

EB₁ : extrait brut aqueux à froid

D'après ce résultat, l'extrait E₁ présente une activité antioxydante. En effet, le virage de la couleur violet sombre en jaune peut être expliqué par le passage du radical DPPH de sa forme oxydée à sa forme réduite stable, sous l'effet de molécules antioxydantes contenues dans l'extrait.

II.3. EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG CHAUD : LES SOURIS

II.3.1. TEST PAR VOIE INTRAPERITONEALE

II.3.1.1. Description des symptômes d'intoxication

L'injection de EB₁ par voie ip à la dose létale 276,96 mg/kg provoque les symptômes suivants :

- Immédiatement après l'injection, les souris sont plus ou moins agitées et présentent toutes des contorsions abdominales ;
- Au bout de la 10^{ème} minute, une diminution de l'activité motrice accompagnée d'un traînement des pattes postérieures est notée ;
- 20 min après, les souris se tassent dans un coin de la cage et une hyperhémie au niveau des oreilles apparaît également ;
- Au bout de 30 min, une piloérection est observée chez les souris testées ;
- Après une heure, une série de petites convulsions cloniques et de spasmes apparaît ;

Etude toxicologique

- Entre 2 et 3 h après l'injection, les souris commencent à présenter des difficultés à respirer et également une enophtalmie ;
- A partir de la 4^{ème} heure, les déplacements se font rares (hypoactivité) et une ataxie est notée ;
- Après 6 h, les souris sont totalement immobiles ;
- La mort survient à partir de 8 h de temps suite à des convulsions plus ou moins intenses.

L'injection de EB₁ à la dose sub-létale 95,96 mg/kg provoque quelques-uns des symptômes décrits ci-dessus tels que la contorsion abdominale, le traînement des pattes postérieures, l'hyperhémie et l'hypoactivité. Les souris reprennent leur état normal à partir de la 16^{ème} heure.

II.3.1.2. Détermination de la DL₅₀ (24 h)

Cinq doses de EB₁, en progression géométrique de raison 1,3, sont administrées à 5 lots de 5 souris, en utilisant la méthode décrite au § I.2.3.1.3 (p. 42). Ces doses varient entre la DL₀ = 95,96 mg/kg et la DL₁₀₀ = 276,92 mg/kg. Les résultats sont présentés dans le tableau n° 10.

Tableau n° 10 : Résultats de la détermination de la DL₅₀ (24 h) de EB₁ sur souris

Dose en mg/kg de souris	Nombre de décès après							Nombre de souris		Taux de mortalité
	2h	8h	10h	12h	14h	16h	22h	mortes	survivantes	
95,96	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0%
126,05	1	0	0	0	0	0	0	1	4	20%
163,86	0	0	1	0	1	0	1	3	2	60%
213,02	0	0	2	1	0	1	0	4	1	80%
276,92	0	1	2	2	0	0	0	5	0	100%

• **Données** :

B ou dose immédiatement inférieure à la DL₅₀ = 126,05 mg/kg

N ou mortalité causée par la dose B en fraction décimale = 20% soit 0,2

M ou mortalité causée par la dose immédiatement supérieure à la DL₅₀ (en fraction décimale) = 60% soit 0,6

r ou raison de la progression géométrique = 1,3

Ainsi, d'après la formule de REED et MUENCH (1938) (voir § I.2.3.1.3, p. 42),

$$\log DL_{50} (24 \text{ h}) = \log 126,05 + \frac{0,5 - 0,2}{0,6 - 0,2} \log 1,3$$

La DL_{50} (24 h) est évaluée à **153,46 mg/kg**.

• Les données utilisées pour déterminer la DL_{50} (24 h) par la méthode graphique sont présentées dans le tableau n° 11 et sur la figure 10 ci-dessous.

Tableau n° 11 : Données utilisées pour déterminer la DL_{50} (24 h) par la méthode graphique des totaux cumulatifs

Dose en mg/kg de souris	Nombre de souris			Totaux cumulatifs des souris survivantes	Totaux cumulatifs des souris mortes
	testées	mortes	survivantes		
95,96	5	0	5	12	0
126,05	5	1	4	7	1
163,86	5	3	2	3	4
213,02	5	4	1	1	8
276,92	5	5	0	0	13

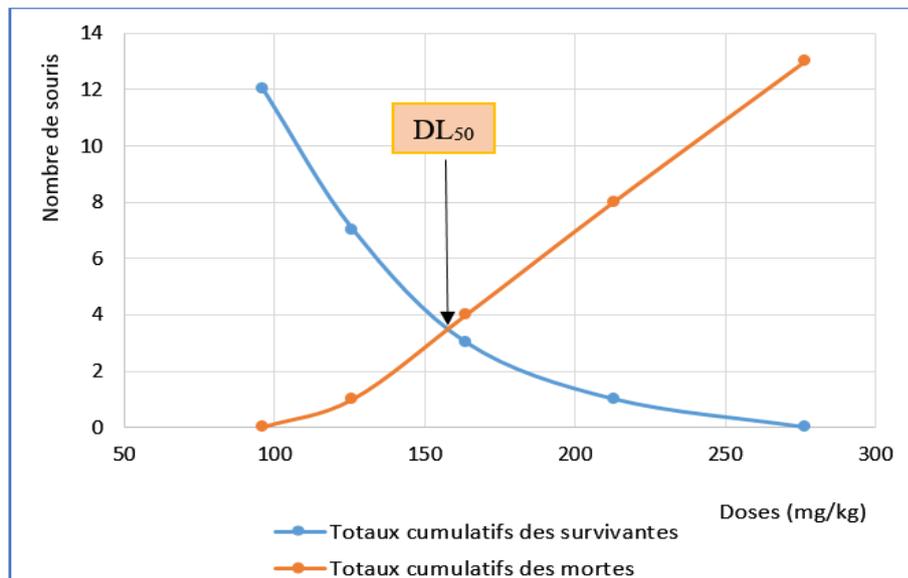


Figure 10 : Détermination de la DL_{50} (24 h) par la méthode graphique de REED et MUENCH (1938)

Ainsi, la valeur de la DL₅₀ obtenue par projection à partir de l'intersection des deux courbes est estimée à **154 mg/kg**.

II.3.2. TEST PAR GAVAGE

L'administration de EB₁ par voie orale à la dose de 1200 mg/kg (4 fois la DL₁₀₀ par voie ip) n'a provoqué aucun symptôme 24 h après l'injection.

II.4. EFFETS SUR LES ANIMAUX A SANG FROID

II.4.1. TEST SUR LES LARVES DE MOUSTIQUE

Testé à la concentration de 2 mg/ml (voir § I.2.4.2, p. 44), EB₁ n'a montré aucun effet sur les larves de moustique car aucune mortalité ni morbidité n'a été constatée au bout de 24 h.

II.4.2. EFFETS SUR LES ALEVINS DE POISSON

Sept concentrations de EB₁ allant de 6,21 µg/ml à 11 µg/ml en progression géométrique de raison 1,1 ont été testées sur sept lots de cinq alevins de carpe. Les résultats sont présentés dans le tableau n° 12.

Tableau n° 12 : Effets de différentes concentrations de EB₁ sur les alevins de carpe

Concentration (C) en µg/ml	Nombre d'animaux testés	log C	Nombre de morts	Nombre de survivants	Pourcentage de mortalité
6,21	5	0,79	0	5	0%
6,83	5	0,83	1	4	20%
7,51	5	0,87	1	4	20%
8,26	5	0,92	2	3	40%
9,09	5	0,96	3	2	60%
10	5	1	4	1	80%
11	5	1,04	5	0	100%

Les résultats obtenus montrent que les alevins de poisson étaient sensibles à EB₁.

L'équation de la droite de régression linéaire est :

$$Y = - 310,69 + 389,21 \log C$$

où Y : pourcentage de mortalité

C : concentration

avec un coefficient de corrélation $r = 0,98$

D'où la valeur de la CL_{50} (24 h) sur les alevins de poisson est estimée à **8,45 $\mu\text{g/ml}$** .

II.5. EFFETS SUR LES VEGETAUX

Les effets de EB_1 sur les végétaux ont été étudiés en 2 étapes : effets sur le pouvoir germinatif des graines et effets sur la croissance des jeunes plantules de plantes potagères.

II.5.1. EFFETS SUR LA GERMINATION DES GRAINES

Cette expérience a été réalisée selon la méthode décrite au § I.2.5.1 (p. 45), en utilisant EB_1 à la dose unique de 1 mg/ml.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau n° 13.

Tableau n° 13 : Effets de EB_1 à 1 mg/ml sur la germination de graines de Liliopsida et Magnoliopsida

FAMILLE	Nom scientifique	Nom usuel	Taux de germination	Taux d'inhibition
APIACEAE	<i>Daucus carotta</i>	Carotte	65%	35%
ASTERACEAE	<i>Lactuca sativa</i>	Laitue	100%	0%
BRASSICACEAE	<i>Brassica chinensis</i>	Ramirebaka	55%	45%
	<i>Brassica oleraceae</i>	Anantsonga	80%	20%
	<i>Raphanus sativus</i>	Radis blanc	100%	0%
CUCURBITACEAE	<i>Cucumis sp.</i>	Concombre	10%	90%
	<i>Cucurbita pepo</i>	Courgette	20%	80%
FABACEAE	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Haricot blanc	100%	0%
	<i>Pisum sativum</i>	Petit pois	100%	0%
PAPILIONACEAE	<i>Glycine max</i>	Soja	100%	0%
SOLANACEAE	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Tomate	80%	20%
POACEAE	<i>Oryza sativa</i>	Riz	60%	40%
	<i>Zea maÿs</i>	Maïs	100%	0%

D'après ce tableau, l'effet de EB₁ sur la germination variait en fonction de la graine testée (de 0 à 90%). Aucune activité n'a été notée sur la laitue, le radis blanc, le haricot blanc, le petit pois, le soja et le maïs alors que des taux d'inhibition élevés sont observés sur la courgette et le concombre (CUCURBITACEAE), respectivement 80% et 90%.

II.5.2. EFFETS SUR LA CROISSANCE DES JEUNES PLANTULES

Un représentant des Liliopsida (maïs) et un représentant des Magnoliopsida (petit pois) ont été choisis afin d'évaluer les effets de EB₁ sur la croissance des épicotyles et hypocotyles des jeunes plantules selon les conditions expérimentales décrites au § I.2.5.2 (p. 45).

Les conditions et les différentes étapes sont résumées sur la figure 11.

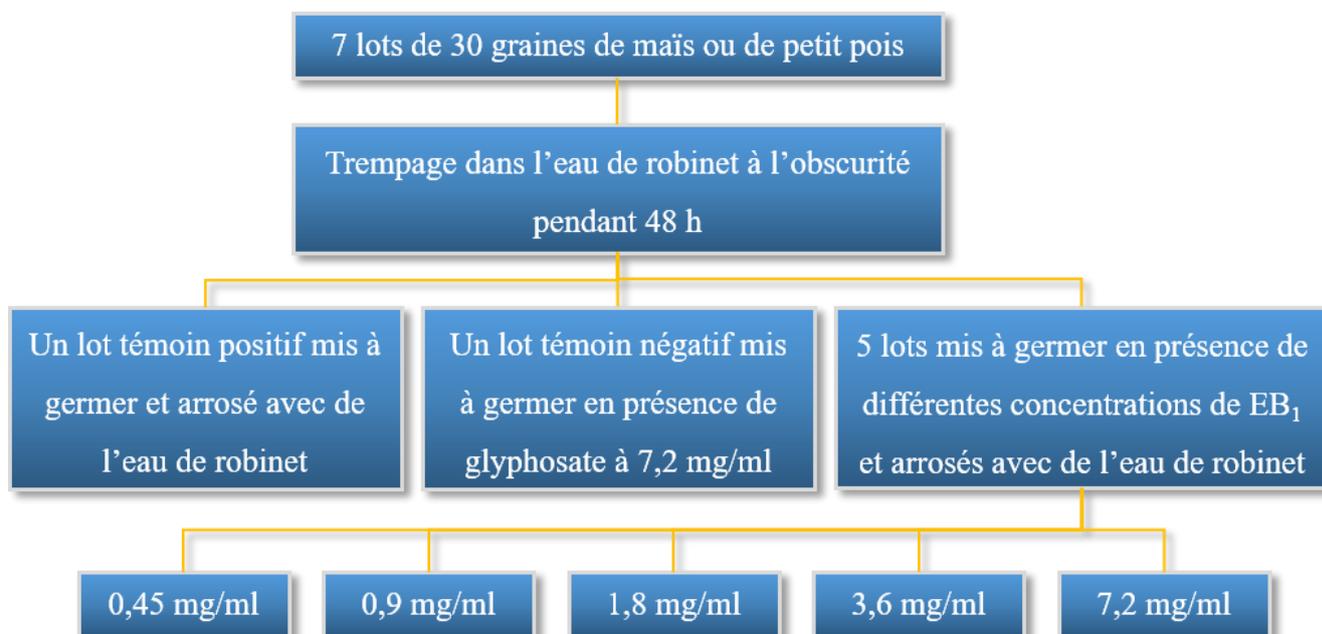


Figure 11 : Schéma récapitulatif des différentes étapes des expériences sur la croissance des jeunes plantules

Les résultats de ce test sont représentés sur les figures 12, 13, 14 et 15 (p. 59 à 60).

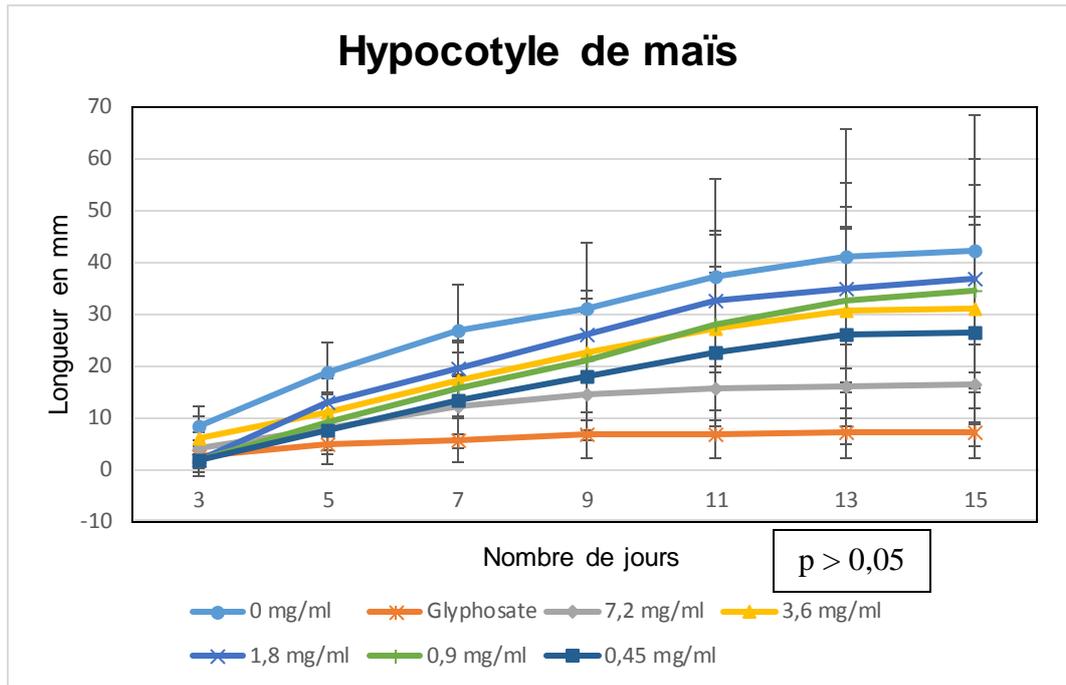


Figure 12 : Croissance des hypocotyles de maïs en présence de EB₁ à différentes concentrations

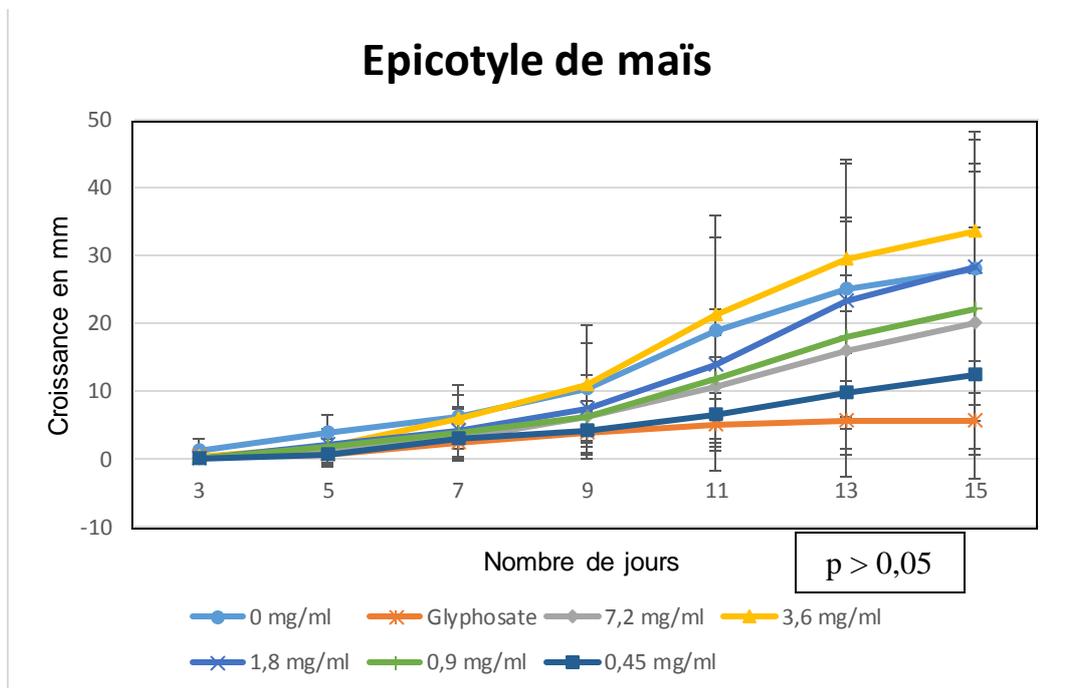


Figure 13 : Croissance des épicotyles de maïs en présence de EB₁ à différentes concentrations

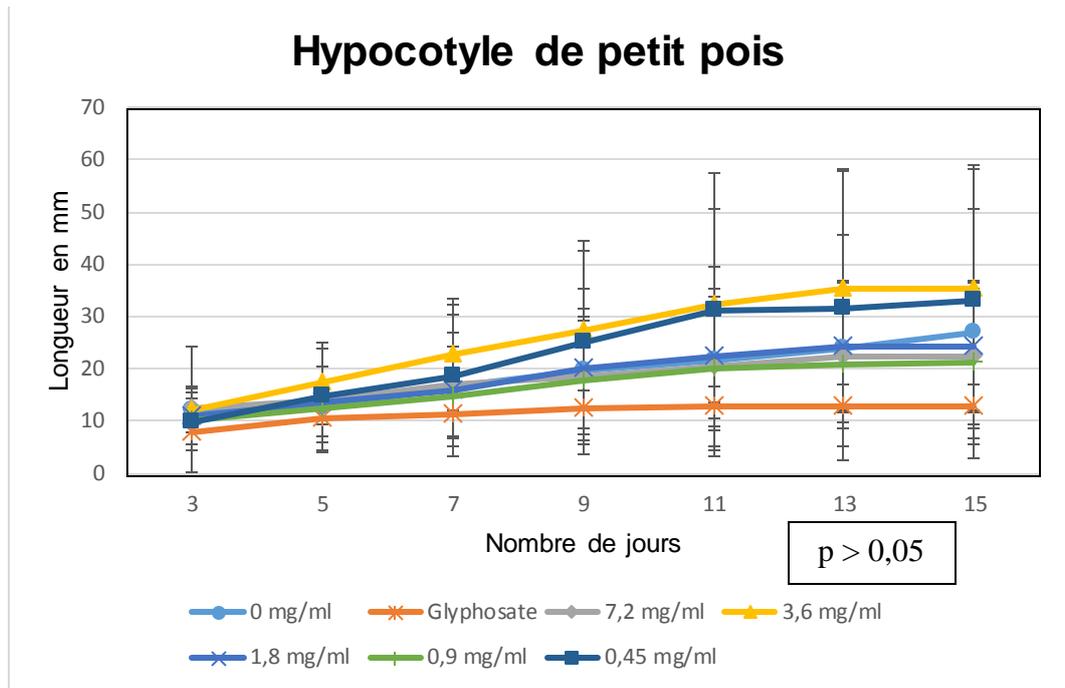


Figure 14 : Croissance des hypocotyles de petit pois en présence de EB₁ à différentes concentrations

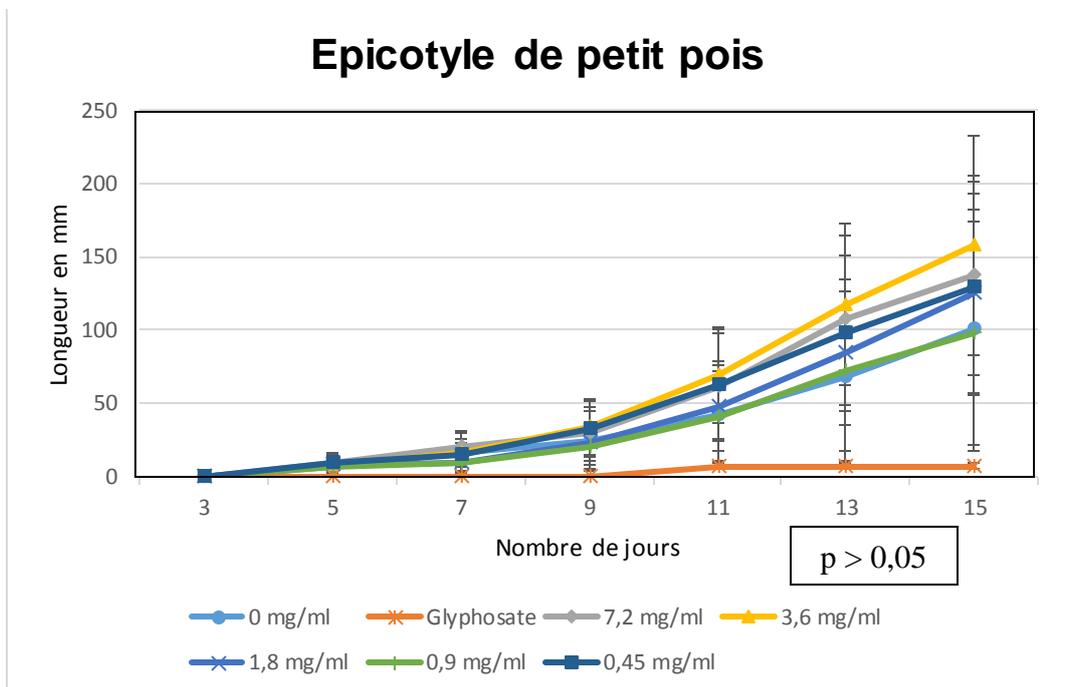


Figure 15 : Croissance des épicotyles de petit pois en présence de EB₁ à différentes concentrations

D'après les figures 12 et 13, l'extrait EB₁ a exercé un effet inhibiteur sur la croissance des hypocotyles et épicotyles des jeunes plantules de maïs sauf à la

Etude toxicologique

concentration de 3,6 mg/ml où une légère stimulation de la croissance des épicotyles a été notée.

D'après la figure 14, un léger effet inhibiteur a été observé à 0,9 mg/ml, 1,8 mg/ml et 7,2 mg/ml de EB₁ sur la croissance des hypocotyles de petits pois. D'autre part, une stimulation de cette croissance a été enregistrée pour les concentrations de 0,45 mg/ml et 3,6 mg/ml de EB₁ par rapport au témoin arrosé avec de l'eau de robinet.

D'après la figure 15, toutes les concentrations de EB₁ ont provoqué une légère stimulation sur la croissance des épicotyles de petit pois ($p > 0,05$).

III-DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les résultats obtenus lors de l'étude toxicologique montrent que les extraits des écorces de tige de *Cnestis glabra* étaient actifs sur différents organismes.

Chez les microorganismes, tous les extraits bruts (100 mg/ml) ont montré une activité sur les germes testés. Parmi eux, l'extrait aqueux à froid (EB₁), l'extrait hydroéthanolique à froid (EB₃) ainsi que l'extrait éthanolique absolu à chaud (EB₄) semblent posséder un large spectre d'activité car ils étaient presque tous actifs sur les bactéries GRAM (+) (*Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes*) et sur certaines bactéries GRAM (-) (*Enterobacter aerogenes* et *Enterobacter cloacae*) mais également sur une levure (*Candida albicans*). Par contre, l'extrait aqueux à chaud (EB₂) semblait être inactif sur la plupart des souches. Ceci peut être dû à une altération ou à l'élimination des substances actives par la chaleur (96°C) lors de l'extraction à chaud.

L'étude des effets des extraits purifiés E₁, E₂, E₃ sur 3 germes les plus sensibles (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*) a montré que leur degré de sensibilité augmentait au fur et à mesure que l'on avançait dans la purification. *Bacillus cereus* et *Candida albicans* paraissaient être les plus sensibles, surtout envers l'extrait E₃ issu de la filtration sur charbon actif (50 mg/ml). Cette augmentation de sensibilité indique que de nombreux contaminants ont probablement été éliminés lors des étapes de purification.

D'après les résultats du criblage phytochimique, les extraits contenaient des triterpènes, des flavonoïdes et des leucoanthocyanes. Or, ces composés sont connus pour leurs propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (ANDRIANARISON et coll., 2015 ; MALOUEKI et coll., 2015). Ils pourraient donc être à l'origine de l'activité antimicrobienne.

La CMI de EB₁ a été déterminée sur trois bactéries GRAM (+) (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Streptococcus pneumoniae*) et une levure (*Candida albicans*). Elle a été estimée à 3,13 mg/ml sur *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Candida albicans* tandis qu'elle était comprise entre 1,56 et 3,13 mg/ml pour *Streptococcus pneumoniae*. Par comparaison, ces valeurs sont plus élevées que les

CMI de l'extrait éthanolique des écorces de tige de *Cnestis palala* qui ont été estimées à 250 µg/ml sur *Staphylococcus aureus* et à 1 mg/ml sur *Candida albicans* (DEJADISAI et coll., 2015). Vis-à-vis de *Streptococcus pneumoniae*, la CMI de EB₁ est 20 fois plus élevée que celle de l'extrait éthanolique des feuilles d'*Annona senegalensis* (ANNONACEAE) qui est de 0,156 mg/ml (TRAORE et coll., 2012). Par contre, EB₁ est plus performant sur *Staphylococcus aureus* que l'extrait brut des graines de *Podocarpus madagascariensis* (PODOCARPACEAE) qui a une CMI de 7,5 mg/ml (RAKOTO, 2012) et il est aussi plus actif sur *Bacillus cereus* que l'extrait brut des graines de *Ravenala madagascariensis* (STRELIZIACEAE) dont la CMI est comprise entre 6,25 et 12,5 mg/ml (RAKOTO, 2012).

En ce qui concerne la CMB et la CMF de EB₁, elle a été déterminée sur deux germes : *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*. Les valeurs de CMB et de CMF sur ces deux souches ont été respectivement évaluées à 60 mg/ml et 3,13 mg/ml. Ainsi, selon MARMONIER (1990), EB₁ exerce une action bactériostatique sur *Staphylococcus aureus* du fait que les valeurs de CMI et de CMB sont très éloignées (CMB/CMI > 4) et une action fongicide sur *Candida albicans* (CMF/CMI < 4). A titre de comparaison, la CMF de EB₁ vis-à-vis de *Candida albicans* est légèrement inférieure à celle de l'extrait éthanolique des feuilles de *Byrsocarpus coccineus* (CONNARACEAE) qui est de 4 mg/ml (HOEKOU et coll., 2012). Quant à la CMB de EB₁ sur *Staphylococcus aureus*, elle est nettement supérieure à la CMB de l'extrait méthanolique des graines d'*Albizia bernieri* (FABACEAE) qui est de 500 µg/ml (RANDRIAMAMPIANINA, 2016).

La CMI, la CMB et la CMF de l'extrait purifié E₃ n'ont pas pu être déterminées du fait que la quantité obtenue lors de la filtration sur charbon actif n'était pas suffisante.

Le résultat du test antioxydant montre que l'EB₁ des écorces de tige possède des molécules douées d'activité antioxydante car un virage au jaune du DPPH a été constaté. A titre de comparaison, d'autres plantes de la famille des Connaraceae renferment également des métabolites secondaires responsables de cette activité antioxydante telles que les flavonoïdes extraits des racines de *Byrsocarpus coccineus* (DOSSEH et coll., 2015) et des feuilles de *Rourea induta* (KALEGARI et coll., 2012), les composés phénoliques (polyphénols) isolés des feuilles, des écorces de tige et des racines de *Cnestis ferruginea* (AKHARAIYI et coll., 2012 ; TUO et coll., 2015).

Chez la souris, l'injection de EB₁ par voie ip a provoqué des symptômes tels que le traînement des pattes postérieures, l'apparition d'une hyperhémie au niveau des oreilles, une enophtalmie accompagnée de difficultés à respirer et une succession de petites convulsions cloniques et de spasmes. Ces signes portent à croire que l'extrait agirait au niveau des systèmes nerveux (neurotoxines), vasculaire et respiratoire. Par contre, l'administration de EB₁ par voie orale n'a provoqué aucun symptôme. Ceci peut être dû par la neutralisation des principes toxiques par des mécanismes intervenant au niveau du tube digestif, tels que la digestion enzymatique par exemple (BRUNETON, 1993).

La DL₅₀ (24 h) par voie ip a été estimée à 153,46 mg/kg. Cette valeur permet donc de classer nos toxines parmi les substances très toxiques selon NENE BI et coll. (2008). En comparaison, elle est légèrement inférieure à celle de l'extrait brut aqueux des bulbes de *Rhodocodon madagascariensis* Baker (HYACINTHACEAE) qui a été évaluée entre 170,6 mg/kg et 183 mg/kg (RAKOTOBE, 2009). Par rapport à d'autres familles de végétaux, EB₁ est nettement plus toxique que l'extrait purifié des feuilles de *Xylopi humblotiana* (ANNONACEAE) dont la DL₅₀ était estimée entre 1,325 g/kg et 1,327 g/kg (RASOLONDRAIBE, 2007) et encore plus toxique que l'extrait aqueux des écorces de tige de *Mitragyna inermis* (RUBIACEAE) dont la DL₅₀ était de 810,75 mg/ml (OUEDRAGO et coll., 2001). Par contre, il semblerait que EB₁ présente une toxicité proche de celle de l'extrait aqueux des feuilles de *Byrsocarpus coccineus* Schum (CONNARACEAE) dont la valeur de la DL₅₀ (24 h) était de 158,4 mg/kg (ADEYEMI et coll., 2010).

Concernant les animaux à sang froid, EB₁ s'est avéré toxique sur les alevins de carpe (ichtyotoxique) avec une CL₅₀ estimée à 8,45 µg/ml. D'après cette valeur, l'extrait est légèrement plus toxique que les extraits méthanoliques de graines de certaines espèces d'*Albizia* (FABACEAE) comme *Albizia aurisparsa* et *Albizia greveana* dont les CL₅₀ étaient respectivement de 15 µg/ml et 10 µg/ml. Néanmoins, il semblerait que EB₁ soit moins toxique que d'autres espèces comme *Albizia androyensis* et *Albizia tulearensis*, avec respectivement comme CL₅₀ 3,85 µg/ml et 2,28 µg/ml (RANDRIAMAMPIANINA, 2016).

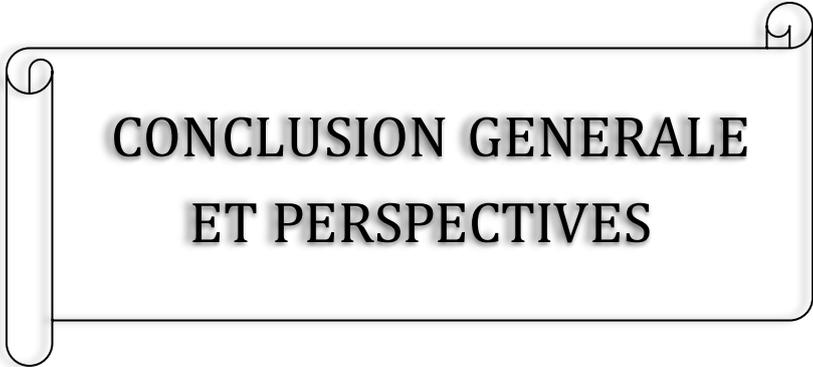
Par ailleurs, EB₁ n'a provoqué aucun effet en 24 h sur les larves de moustique *Culex quinquefasciatus* jusqu'à la concentration de 2 mg/ml. En effet, au-delà de 2mg/ml, les extraits sont considérés comme non toxiques (RANDRIANARIVO,

2015). Les larves testées étaient donc résistantes à EB₁. Par conséquent, l'utilisation de l'extrait d'écorces de tige de *Cnestis glabra* en tant que larvicide n'est pas envisageable car elle exige une forte concentration, ce qui pourrait provoquer des effets néfastes à l'égard des autres organismes vivant dans l'écosystème.

Chez les végétaux, une inhibition à des taux variables de la germination des graines traitées avec 1 mg/ml de EB₁ a été constatée. Cette inhibition pourrait être liée à la présence de molécules actives capables d'empêcher la germination des graines. En effet, d'après REGNAULT-ROGER et coll. (2008), la germination des graines est un processus biochimique et physiologique où dès le premier contact de la graine avec un stimulus exogène tel que l'eau, une enzyme amylase est synthétisée et sécrétée afin de dégrader l'amidon en vue de fournir à l'embryon l'énergie nécessaire à la germination. Ainsi, l'inhibition pourrait provenir de la destruction de l'embryon ou de l'inactivation par l'extrait des enzymes indispensables à la germination dont l'amylase (CHERIF et coll., 2016).

Concernant les jeunes plantules, d'une part, un effet inhibiteur a été observé sur la croissance des hypocotyles et des épicotyles de maïs ainsi qu'avec quelques concentrations de EB₁ sur des hypocotyles de petits pois. Cette inhibition pourrait être due à l'effet des principes toxiques sur le phénomène d'adsorption qui conduit au manque de nutriments nécessaires au développement de la plante (KEFELI et KALEVITCH, 2005). Des études plus poussées permettront d'obtenir plus d'explications sur ce comportement. D'autre part, un léger effet stimulateur de EB₁ a été perçu sur la croissance des épicotyles de petit pois.

En conclusion, les écorces de tige de *Cnestis glabra* renfermeraient des principes doués d'activité antimicrobienne, antioxydante et toxique sur divers organismes vivants. En effet, d'une part, ces principes ont inhibé la croissance des microorganismes en particulier des bactéries GRAM (+) et des levures et d'autre part, ces composés se sont révélés toxiques sur souris, les alevins de carpe et certains végétaux. Toutefois, aucune activité n'a été signalée chez les larves de moustique.



**CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES**

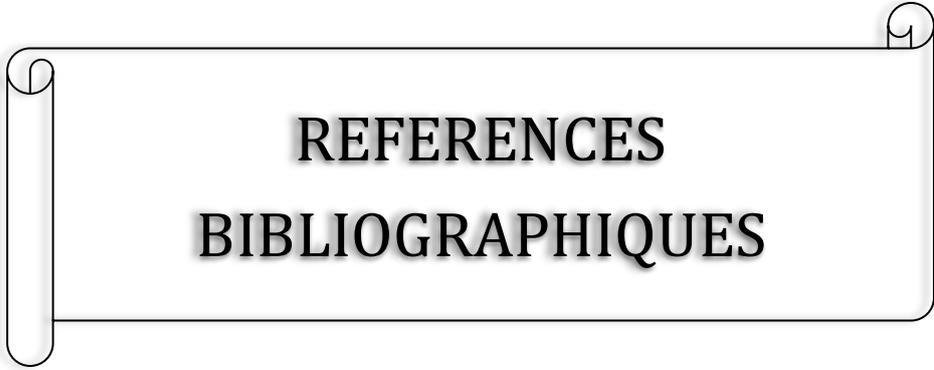
Conclusion générale et perspectives

Pour conclure, les résultats des travaux effectués sur l'écorce de tige de *Cnestis glabra* ont permis :

- de mettre au point un procédé d'extraction des principes antimicrobiens et une méthode de purification bioguidée par des tests d'activité antimicrobienne ;
- de mettre en évidence une activité toxique de l'écorce de tige de cette plante sur divers organismes animaux et végétaux à partir de EB₁ ;
- d'obtenir des informations sur les propriétés physico-chimiques et biologiques des principes actifs.

Dans l'avenir, nous envisageons :

- d'améliorer le procédé d'extraction et de purification, afin d'obtenir un meilleur rendement en principes actifs ;
- d'isoler les principes actifs pour mieux étudier leurs propriétés physico-chimiques, leur structure et leur nature chimique ;
- de pousser les travaux sur l'activité antioxydante ;
- d'approfondir l'étude des propriétés toxicologiques sur d'autres animaux, végétaux et microorganismes ;
- d'étudier les mécanismes d'action des principes actifs de l'écorce de tige de *Cnestis glabra*.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ADEYEMI O., AKINDELE A.J. and NWUMEH K.I. Acute and subchronic toxicological assessment of *Byrsocarpus coccineus* Schum. and Thom. (Connaraceae) aqueous leaf extract. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, **2010** ; 3 (2) : 1-11.
2. ADIKO N.M., OKPEKON A.T., BONY F.N., KOFFI K.K.V., KABLAN B.J., ASSI Y.J., AKE-ASSI L. and CHAMPY P. Criblage phytochimique de plantes utilisées en ophtalmologie traditionnelle, répertoriées sur les marchés d'Abidjan. *J. Sci. Pharm. Biol.*, **2013** ; 14 (1) : 10-21.
3. ADLY F., MOUSSAID M., ELAMRANI A.A., BERAHAL C., MOUSSAID H., BOURHIM N. and LOUTFI M. Etude chimique de l'extrait aqueux d'*Allium subvillosum* (Alliaceae) et l'évaluation de sa toxicité chez les souris. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, **2015** ; 9 (1) : 534-541.
4. AKHARAIYI F.C., BOBOYE B. and ADETUYI F.C. Antibacterial, phytochemical and antioxidant properties of *Cnestis ferruginea* DC (CONNARACEAE) extracts. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, **2012** ; 2 (2), 592–609.
5. ANDRIAMIALIHARISOA R.F. Métabolites secondaires particuliers des feuilles de cinq populations de *Mascarocoffea* et des endophytes des feuilles de *Coffea sp* A315. [Mémoire de DEA : Biotechnologie et Microbiologie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2011** ; 68p.
6. ANDRIANARISON E.R., ANDRIANAIVORAVELONA O.J., RAKOTOSAONA R., RANAIVOSON N.A., ANDRIANARISON R.J., ANDRIANAIVO L. and ANDRIANARY P.A. Screening phytochimique et activité antioxydante de fruits de « rotra » ou *Eugenia jambolana* Lam. consommés par les habitants des Hautes Terres de Madagascar. *Mada-Hary*, **2015** ; 4 : 1-12.
7. AOUINTY B., OUFARA S., MELLOUKI F. and MAHARI S. Evaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles du ricin (*Ricinus communis* L.) et du bois de thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.) sur les larves de quatre moustiques culicidés : *Culex pipiens* (Linné) et *Anopheles maculipennis* (Meigen). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2006** ; 10 (2) : 67-71.
8. ATHAMENA S., CHALGHEM I., KASSAH-LAOUAR A., LAROUI S. and KHEBRI S. Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese Science Journal*, **2010** ; 11 (1) : 69-81.
9. AUDIGIE C., DUPONT G. and ZONZAIN F. Principes des méthodes d'analyses biochimiques T2. Paris : Doin Editeur, **1989** ; 2 : 190p.
10. BAILLON H. Histoire des plantes T2. Paris : Edition HACHETTE, **1870** ; 512p.

Références bibliographiques

11. BENMEHDI H., HASNAOUI O., BENALI O. and SALHI F. Phytochemical investigation of leaves and fruits extracts of *Chamaerops humilis* L. *J. Mater. Environ. Sci.* **2012** ; 3 (2) : 320-327.
12. BIDIE A., N'GUESSAN B., YAPO A.F. N'GUESSAN J.D. and DJAMAN A.J. Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature*, **2011** ; 8 (1) : 1-11.
13. BOREL J. and RANDOUX A. Méthodes chromatographiques. In : KAMOUN P. Appareils et méthodes en Biochimie, 3^{ème} Edition Paris : Médecine sciences Flammarion, **1987** ; 129-192.
14. BOYD E.M., MICHAEL D. and ABEL M. The acute toxicity of barium sulfate administrated intragastrically. *Can. Med. Assoc. J.*, **1966** ; 94 (16) : 849-853.
15. BRILLANT S., PIERIBATTESTI J.C. and MARODON C. Présentation de deux plantes aromatiques et médicinales de La Réunion à fort potentiel de développement : ambaville et fleur jaune. *Ethnopharmacologia*, **2006** ; (37) : 59-66.
16. BRUNETON J. Pharmacognosie et phytochimie, plante médicinale. 2^{ème} Edition Paris : France : Lavoisier Editeur, **1993** ; 915p.
17. CHERIF R., KEMASSI A., BOUAL Z., BOUZIANE N., BENBRAHIM F., HADJSEYD A., GHARIB T., OULD A., SAKEUR M.L. and HADJ M.D.O. Activités biologiques des extraits aqueux de *Pergularia tomentosa* L. (ASCLEPIADACEAE). *Lebanese Science Journal*, **2016** ; 17 (1) : 27-37.
18. DEJ-ADISAI S., TINPUN K., WATTANAPIROMSAKUL C. and KEAWPRADUB N. Bio-activities and phytochemical investigation of *Cnestis palala* (LOUR.) MERR. *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, **2015** ; 12 (3) : 27-37.
19. DOHOU N., YAMNI K., TAHROUCH S., HASSANI L.M.I, BADO A. and GMIRA N. Screening phytochimique d'une espèce endémique ibéro-marocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **2003** ; 142 : 61-78.
20. DOSSEH K., AGBONON A. and GBEASSOR M. Antioxidant and toxicological studies of ethanolic root extract of *Byrsocarpus coccineus*. *Journal of Medicinal Plants Research*, **2015** ; 9 (36) : 940-949.
21. DUMEIGNIL F. Propriétés et utilisation de l'huile de ricin. *OCL*, **2012** ; 19 (1) : 10-15.
22. ENEMOR E.C., AKAGHA T.N., NGWOKE K.G., GUGU T.H, OLI A.N, EZE C.O., UGWU B.C., EJIKEUGWU P.C. and UGWU M.C. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of ethanolic stem extracts of *Cnestis ferruginea* on multidrug resistant bacteria isolated from raw retail meat solid in Awka, Nigeria. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **2015** ; 7 (11) : 1044-1049.

Références bibliographiques

23. FAWOLE O.A., FINNIE J.F. and STADEN J.V. Antimicrobial activity and mutagenic effects of twelve traditional medicinal plants used to treat ailments related to the gastro-intestinal tract in South Africa. *South African Journal of Botany*, **2009** ; 75 : 356-362.
24. FIRDOUSE S. and ALAM P. Phytochemical investigation of extract of *Amorphophallus campanulatus* tubers. *International Journal of Phytomedicine*, **2011** ; 3 : 32-35.
25. GARCIA J., BARKER D.G. and JOURNET E.P. Seed storage and germination. *Medicago truncatula* handbook, **2006** ; 1-9.
26. GERSHOFF S.N. and ELVEHJEM C.A. Studies of the biological effects of methionine sulfoximine. *Journal of Biological Chemistry*, **1951** ; 569-574.
27. HANITRINIAINA V. Etude chimique et antifongique d'*Abrahamia deflexa* (ANACARDIACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2015** ; 57p.
28. HOEKOU Y.P., BATAWILA K., GBOGBO K.A., KAROU D.S., AMEYAPOH Y. and SOUZA C. Evaluation des propriétés antimicrobiennes de quatre plantes de la flore togolaise utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement des diarrhées infantiles. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **2012** ; 6 (6) : 3089-3097.
29. JAOFENO J.A. Etude chimique et toxicologique des extraits d'écorce de tige d'*Albizia polyphylla*, une Fabacée endémique de Madagascar. [Mémoire de MASTER : Biochimie, Biodiversité et Santé]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2016** ; 65p.
30. JEANNODA V. Etudes chimiques, biologique et toxicologique du principe convulsivant des Connaracées de Madagascar. [Thèse de Doctorat d'Etat : Sciences]. Strasbourg : Université Louis Pasteur de Strasbourg, **1986** ; 201p.
31. JEANNODA V.L.R., CREPPY E.E. and DIRHEIMER G. Isolation and partial characterization of glabrin, a neurotoxin from *Cnestis glabra* (Connaraceae) root barks. *Biochimie*, **1984** ; 66 : 557-562.
32. JEANNODA V.L.R., VALISOLALAO J., CREPPY E.E. and DIRHEIMER G. Identification of the toxic principle of *Cnestis glabra* as methionine sulfoximine. *Phytochemistry*, **1985** ; 24 (4) : 854-855.
33. KALEGARI M., DALLARMI M.M., PHYLIPSEN A.F., DIAS J.F.G., ZANIN S.M.W., LIMA C.P. and GOMES O.M. Antibacterial, allelopathic and antioxidant activity of compounds from *Rourea induta* Planch. (Connaraceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **2012** ; 2 (9) : 61-66.
34. KEFELI V.I. and KALEVICH M.E. A review of the monograph « natural growth inhibitors and phytohormones in plants and environment ». *Ekologija*, **2005** ; 54-55.

Références bibliographiques

35. KHOLKHAL F., LAZOUNI H.A., BENDAHOU M., BOUBLENTA I., CHABANE S.D. and CHAOUCH T. Etude phytochimique et évaluation de l'activité anti-oxydante de *Thymus ciliatus ssp. coloratus*. *Afrique Science*, **2013** ; 9 (1) : 151-158.
36. KUETE V., FOZING D.D., KAPCHE W.F.G.D., MBAVENG A.T., KUIATE J.R., NGADJUI B.T. and ABEGA Z.B.M. Antimicrobial activity of the methanolic extract and compounds from *Morus mesozygia* stem bark. *Journal of Ethnopharmacology* **2009**, 124 (3) : 551-5.
37. LAR M.S.M. Phytochemical analysis of *Cnestis palala* (Lour.) Merr. and its antimicrobial activity. *Universities Research Journal*, **2014** ; 6 (1) : 162-171.
38. LEFEVRE G. Les discours sur la médecine traditionnelle à Madagascar. *Revue des Sciences Sociales « Ethique et santé »*, **2008** ; 39 : 46-59.
39. MAHUZIER G. and HAMON M. Abrégé de chimie analytique T2. Méthodes de séparation. Paris : Masson, **1990** ; 262p.
40. MALOUEKI U., KUNYIMA K.P., MBOMBA I.D., DANI N.A., LUKUKA N.J., MPIANA K.N., NGBOLUA K.S.P., NDIMBO N.B., MBOMBA C.D. and MUSUYU M. Activités antioxydante et plasmodiale d'extraits de *Massularia acuminata* (Rubiaceae). *Phytothérapie*, **2015** ; 1-5.
41. MANDIMBISOLOFO V.N., RAHERIMANDIMBY M. and RAMAMONJISOA D. Extraction des molécules actives contenues dans les feuilles de *Scenecio faujasioïdes* (Asteraceae). *Journal International de Santé au Travail*, **2013** ; 1 : 41-51.
42. MARMONIER A.A. Introduction aux techniques d'étude des antibiotique, In : Bactériologie médicale, techniques usuelles 3^{ème} Edition Paris : Doin, **1990** ; 227-236.
43. MICHEL T. Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*). [Thèse de Doctorat : Alimentation et Nutrition]. Orléans : Université d'Orléans, **2011** ; 271p.
44. MOROH J.A., BACHI C., DJE K., LOUKOU Y.G. and GUEDE-GUINA F. Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (Rubiaceae) sur la croissance *in-vitro* des souches d'*Escherichia coli*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, **2008** ; 77 : 44-61.
45. NENE BI S.A., TRAORE F., ZAHOUI O.S. and SORO T.Y. Composition chimique d'un extrait aqueux de *Bridelia ferruginea* benth. (Euphorbiacea) et étude de ses effets toxicologique et pharmacologique chez les mammifères. *Afrique Science*, **2008** ; 4 (2) : 287-305.

Références bibliographiques

46. NOHARA T. Analysis of steroid and another biologically significant steroid. San Diego : Nes.W.D. et Parish E.J. Editeurs, **1989** ; 119-132.
47. OGWAL-OKENG J.W., OBUA C. and ANOKBONGO W.W. Acute toxicity effects of the methanolic extract of *Fagara zanthoxyloides* (Lam. root) bark. *African Health Sciences*, **2003** ; 3 (3) : 124-126.
48. OMS. Résistance aux insecticides et lutte antivectorielle. 17^{ème} rapport du comité OMS d'experts des insecticides. Série de rapports techniques n°443. Genève, **1970** ; 306p.
49. OMS. ZHANG X. Réglementation des médicaments à base de plantes. Genève ; **1998** ; 1-59.
50. OUEDRAGO Y., NACOULMA O., GUISSOU I.P. and GUINA G.F. Evaluation *in vivo* et *in vitro* de la toxicité des extraits aqueux d'écorces de tige et de racines de *Mitragyna inermis* (Willd).O.Ktz (Rubiaceae). *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, **2001** ; 11 : 13-29.
51. PONCE A.G., FRITZ R., DEL VALLE C. and ROURA S.I. Antimicrobial activity of essential oil on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, **2003** ; 36 : 679-684.
52. PORTERES R. Un curieux élément culturel arabico-islamique et néo-africain : les baguettes végétales mâchées servant de frotte-dents. *Journal d'Agriculture Tropicale et de botanique appliquée*, **1974** ; 21 (4) : 112-149.
53. RABE T. and STADEN J.V. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. *Journal of Ethnopharmacology*, **1997** ; 56 : 81-87
54. RAHELARISATA V.A. Purification et caractérisation partielle des principes toxiques de graines d'*Albizia greveana*. [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2014** ; 66p.
55. RAHELINAINAMANDIMBY L. Etude chimique et biologique d'extraits toxiques de *Olax lanceolata* (OLACACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2003** ; 66p.
56. RAKOTO D.A.D. Etude de plantes toxiques malgaches. [HDR en Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2012** ; 149p.
57. RAKOTOBÉ-R.L. Etude chimique et toxicologique de deux plantes toxiques malgaches : *Discorea antaly* Jum. & Perr. (DIOSCOREACEAE) et *Rhodocodon madagascariensis* Baker (HYACINTHACEAE). [Thèse de Doctorat : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2009** ; 205p.
58. RAKOTO-RANOROMALALA D.A.D. Purification et caractérisation partielle du principe toxique de *Rourea orientalis* (Conmaraceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo. **1984** ; 59p.

Références bibliographiques

59. RAMANANTSOA N.J.P. Extraction, isolement et identification des principes actifs de *Vernonia trinervis*. [Rapport de stage de MASTER : Chimie Organique]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2014** ; 15p.
60. RANDEKATH K. Chromatographie sur couche mince, techniques et applications en chimie organique. Paris : Dunod, **1970** ; 178p.
61. RANDRIAMAMPIANINA L.J. Potentialités d'*Albizia bernieri*, une Fabacée endémique de Madagascar, dans la lutte contre les organismes nuisibles. [Thèse de Doctorat : Biodiversité et Santé]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2016** ; 265p.
62. RANDRIAMANANTSOA L.A. Etude chimique et biologique des fractions lipidique et non lipidique des graines de *Crotalaria aculeata* (FABACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2015** ; 61p.
63. RANDRIANANDRASANA J. Etude chimique et toxicologique des extraits toxiques d'écorces de tige de *Uapaca thouarsii* (EUPHORBIACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2004** ; 69p.
64. RANDRIANARIVO H.R. Potentialités des plantes toxiques malgaches dans la lutte contre les organismes nuisibles. [HDR en Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2015** ; 106p.
65. RASOLONDRABE O.N. Etude chimique et toxicologique des extraits toxiques de feuilles de *Xylopija humblotiana* (ANNONACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2007** ; 67p.
66. RATSIMIEBO M.E. Etudes chimiques et toxicologiques des extraits de feuilles d'*Albizia boivinii*, une Fabacée endémique de Madagascar. [Mémoire de MASTER : Biochimie, Biodiversité et Santé]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2016** ; 58p.
67. RAZAFINORO N. Etude chimique et toxicologique des extraits de feuilles de *Crotalaria trichotoma* Bojer récoltées à Iaroka. [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2015** ; 72p.
68. RAZAFINTSALAMA V.E. Etude chimique et toxicologique des extraits de feuilles de *Pittosporum senacia* (PITTOSPORACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2006** ; 68p.
69. RAZANATSEHENO M. Lutte antimurine : mise au point d'appâts empoisonnés à partir de plantes toxiques. [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, **2012** ; 91p.
70. REED L. and MUENCH H.A. Simple method of estimating fifty per cent points. *Am. J. Hyg.*, **1938** ; 27 : 293.

Références bibliographiques

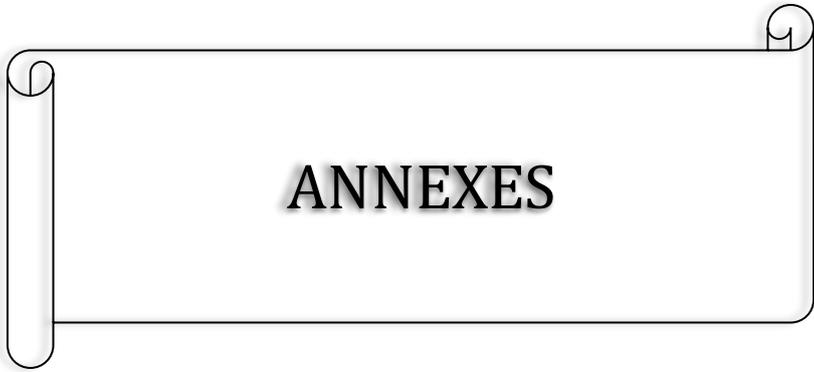
71. REGNAULT-ROGER C., PHILOGENE B.J. and VICENT C. Bio-pesticides d'origine végétale. Paris : Edition TEC & DOC, **2008** ; 51-60.
72. RIVERA L.L. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe. [Thèse de Doctorat : Sciences et Agroressources]. Toulouse : Institut national polytechnique de Toulouse, **2006** ; 331p.
73. SAIN M. and SHARMA V. *Catharanthus roseus* (An anti-cancerous drug yielding plant) – A review of potential therapeutic properties. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, **2013** ; 1 (6) : 139-142.
74. SAKTHIPRIYA P. and VIDHYA R. Phytochemical and *in-vitro* thrombolytic activity of *Pergularia deamia* (Forsk.) stem. *World Journal of Pharmaceutical Research*, **2015** ; 4 (5) : 1325-1337.
75. TAHRI N., EL BASTI A., ZIDANE L., ROCHDI A. and DOUIRA A. Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la province de Settat (Maroc). *Journal of Forestry Faculty*, **2012** ; 12 (2) : 192-208.
76. TOUAIBIA M. and CHAOUCH F.Z. Propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de *Mystus nivellei* Batt et Trab. obtenus *in situ* et *in vitro*. *Phytothérapie*, **2015** ; 1-7.
77. TRAORE Y., OUATTARA K., YEO D., DOUMBIA I. and COULIBALY A. Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers. (ANNONACEAE). *Journal of Applied Biosciences*, **2012** ; 58 : 4234-4242.
78. TUO K., BEOUROU S., TOURE A.O., OUATTARA K., MEITE S., AKO A.A.B., YAO S.S., KOFFI D., COULIBAY B., COULIBALY A. and DJAMAN A.J. Antioxidant activities and estimation of the phenols and flavonoids content in the extracts of medicinal plants used to treat malaria in Ivory Coast. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **2015** ; 4 (1) : 862-874.
79. VANDEPITTE J., VERHAEGEN J., ENGBAEK K., ROHNER P., PIOT P. and HEUCK. C.C., In : Basic laboratory procedures in clinical bacteriology, 2^{ème} Edition Geneva : WHO, **2003** ; 167p.
80. YAKUBU M.T.Y. and NURUDEEN Q.O. Toxicological effects of aqueous extract of *Cnestis ferruginea* (Vahl ex DC) root in paroxetine-induced sexually impaired male rats. *Journal of Investigation Biochemistry*, **2014** ; 3 (2) : 39-43.

REFERENCES WEBOGRAPHIQUES

1. <http://eol.org/pages/4387/names?all=1>
2. www.mi-aime-a-ou.com/cnestis_glabra.php
3. Tropicos.org Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/Name/8400126>

Références bibliographiques

4. tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Cnestis+corniculata
5. www.lemauricien.com/article/plantes-medicinales-les-remedes-mere-nature



ANNEXES

ANNEXE I

Composition du réactif à la vanilline sulfurique

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

ANNEXE II

Composition des réactifs généraux pour les alcaloïdes

- **Réactif de MAYER**

- Chlorure de mercure 0,36 g
- Iodure de potassium 5 g
- Eau distillée qsp 100 ml

- **Réactif de WAGNER**

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

- **Réactif de DRAGENDORFF**

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

Solution A :

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

Solution B :

- Iodure de potassium 10 g
- Eau distillée 40 g

Le mélange est ensuite additionné de 10 g d'acide tartrique et dont le volume est ramené à 100 ml par l'eau distillée.

ANNEXE III

Composition des milieux de culture

- ✚ *Bouillon nutritif de MUELLER-HINTON (formule-type g/l) :*
 - Extrait de viande 2 g
 - Peptone 17,5 g
 - Amidon 1,5 g
 - pH = 7,3 ± 0,2 à 25°C
- ✚ *Milieu gélosé de MUELLER-HINTON (formule-type g/l) :*
 - Bouillon nutritif de MUELLER-HINTON..... 21 g
 - Agar 15 g
- ✚ *Milieu liquide Nutrient Broth (formule-type g/ml) :*
 - Peptone 5 g
 - Chlorure de sodium 5 g
 - Extrait de viande 1 g
 - Extrait de levure 2 g
- ✚ *Milieu gélosé de SABOURAUD (formule-type g/l)*
 - Peptone 10 g
 - Glucose 20 g
 - Agar 15 g
 - pH = 6
- ✚ *Milieu liquide de SABOURAUD (formule-type g/l)*
 - Hydrolysate trypsique de caséine 5 g
 - Peptone pepsique de viande 5 g
 - Glucose 20 g
 - pH = 5,7 ± 0,2

Préparation à partir des milieux déshydratés

- ✚ *Préparation du milieu gélosé de MUELLER-HINTON et du milieu gélosé de SABOURAUD*

Dissoudre 36g de milieu déshydraté dans de l'eau distillée en agitant continuellement puis ajuster à 1 l.

Chauffer le milieu jusqu'à dissolution totale sur une plaque chauffante, toujours en remuant avec un agitateur magnétique.

Stériliser à l'autoclave à 121°C à 2 bars pendant 15 min.

Annexes

Préparation du milieu Nutrient Broth

Dissoudre 13 g de milieu déshydraté dans de l'eau distillée en agitant continuellement puis ajuster à 1 l.

Chauffer le milieu jusqu'à dissolution totale sur une plaque chauffante, toujours en remuant avec un agitateur magnétique.

Stériliser à l'autoclave à 121°C à 2 bars pendant 15 min.

Préparation du milieu liquide de SABOURAUD

Dissoudre 30 g de poudre dans 1 l d'eau distillée. Mélanger soigneusement. Répartir et stériliser 15 min à 121°C à l'autoclave.

Name : RAZANATSEHENO
First name : Andriantsihoarana Jonathan
Title : Chemical and toxicological studies of antimicrobial principles of *Cnestis glabra* stem bark extracts (CONNARACEAE).

ABSTRACT

Antimicrobial and toxic activities were found in *Cnestis glabra* stem bark extracts.

The cold aqueous crude extract (EB₁) was purified according to a procedure bioguided by antimicrobial activity tests including precipitation by ethanol 50%, n-butanol partition and finally filtration through. A partially purified E₃ extract was obtained. The purification yield was 5.42% and yield of toxins was 0.45%.

Antimicrobial principles have a bitter taste. They are thermostable and soluble in solvents such as water, ethanol and n-butanol.

According to the qualitative phytochemical screening, they could be flavonoids, leucoanthocyanins and triterpenes.

EB₁ and E₃ are very active on microorganisms especially on GRAM (+) bacteria and the yeast *Candida albicans*. The MIC of EB₁ is 3.13 mg/ml against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Candida albicans* while the MIC is between 1.56 and 3.13 mg/ml against *Streptococcus pneumoniae*. The MBC is 60 mg/ml against *Staphylococcus aureus* and the MFC is 3.13 mg/ml against *Candida albicans*. Given the MBC/MIC and MFC/MIC ratios, EB₁ would be bacteriostatic on *Staphylococcus aureus* and fungicidal on *Candida albicans*.

EB₁ has antioxydant properties according to DPPH test.

Administered intraperitoneally, EB₁ induced symptoms in mice suggesting an action on the nervous (neurotoxins), vascular and respiratory systems. The LD₅₀ (24 h) was estimated to be 153.46 mg/kg, by intraperitoneal route. The oral administration of EB₁ caused no symptoms in mice.

EB₁ is also toxic on royal carp (LC₅₀ 24 h = 8.45 µg/ml), but has no activity on mosquito larvae.

EB₁ inhibits the germination of various vegetable seeds and the seedling growth of maize (Liliopsida), a slight stimulation was observed on pea epicotyl. (Magnoliopsida).

Keywords: *Cnestis glabra*, Connaraceae, stem bark, MIC, MBC, MFC, antimicrobial, antioxidant, LD₅₀, toxicity, inhibition, germination.

Advisor: Professor JEANNODA Victor

Nom : RAZANATSEHENO

Prénoms : Andriantsihoarana Jonathan

Titre du mémoire : Etudes chimique et toxicologique des principes antimicrobiens extraits des écorces de tige de *Cnestis glabra* (CONNARACEAE).

RESUME

Une activité antimicrobienne et toxique a été mise en évidence dans les extraits d'écorce de tige de *Cnestis glabra*.

L'extrait brut aqueux à froid (EB₁) a subi une purification bioguidée par des tests d'activité antimicrobienne comportant une précipitation par l'éthanol 50%, puis un fractionnement par le n-butanol et enfin une filtration sur charbon actif, et permettant l'obtention d'un extrait E₃, partiellement purifié. Le rendement de purification est de 5,42% et le rendement en toxines est de 0,45%.

Les principes antimicrobiens ont un goût amer. Ils sont thermostables et solubles dans les solvants tels que l'eau, l'éthanol et le n-butanol.

D'après les résultats du criblage phytochimique, ils pourraient être des flavonoïdes, des leucoanthocyanes et des triterpènes.

EB₁ et E₃ sont très actifs sur les microorganismes, en particulier sur des bactéries GRAM (+) et la levure *Candida albicans*. La CMI de EB₁ est de 3,13 mg/ml vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Candida albicans* tandis que la CMI est comprise entre 1,56 et 3,13 mg/ml vis-à-vis de *Streptococcus pneumoniae*. La CMB est de 60 mg/ml sur *Staphylococcus aureus* et la CMF est de 3,13 mg/ml sur *Candida albicans*. Compte tenu des rapports CMB/CMI et CMF/CMI, EB₁ serait bactériostatique sur *Staphylococcus aureus* et fongicide sur *Candida albicans*.

EB₁ possède des propriétés antioxydantes selon le test au DPPH.

Chez les souris, EB₁ a provoqué, par voie intrapéritonéale, des symptômes qui laissent penser une action sur les systèmes nerveux (neurotoxines), vasculaire et respiratoire. La DL₅₀ (24h) a été estimée à 153,46 mg/kg, par voie intrapéritonéale. L'administration de EB₁ par voie orale n'a provoqué aucun symptôme chez les souris testées.

EB₁ est également toxique sur les alevins de carpe (CL₅₀ 24 h = 8,45 µg/ml), mais n'a pas d'activité sur les larves de moustique.

EB₁ inhibe la germination de diverses graines de plantes potagères et la croissance des jeunes plantules de maïs (Liliopsida), et une légère stimulation a été observée sur celles des épicotyles de petits pois (Magnoliopsida).

Mots clés : *Cnestis glabra*, Connaraceae, écorce de tige, CMI, CMB, CMF, antimicrobien, antioxydant, DL₅₀, toxicité, inhibition, germination.

Encadreur : Professeur JEANNODA Victor