

Table des matières

Table des matières

Introduction générale	1
1 ^{ère} Partie : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
I-PRESENTATION D'<i>Abrahamia deflexa</i>	4
I-1-FAMILLE DES ANACARDIACEAE	4
I-1-1-Caractéristiques botaniques des Anacardiaceae	4
I-1-2-Distribution géographique	4
I-1-3-Utilisations médicinales et effets biologiques	5
I-1-4-Principaux métabolites secondaires	5
I-2- <i>Abrahamia deflexa</i>	6
I-2-1-Caractérisations botaniques	6
I-2-2-Position systématique	6
I-2-3-Distribution géographique	7
II-INFECTIIONS FONGIQUES HUMAINES	7
II-1-CANDIDOSES	7
II-2-GENRE <i>Candida</i>	8
II-3- <i>Candida albicans</i>	8
II-4-TRAITEMENTS DES INFECTIIONS FONGIQUES	9
II-4-1- Molécules antifongiques synthétique	9
II-4-2- Molécules antifongiques semi-synthétiques	9
II-4-3- Molécules antifongiques d'origine naturelle	9
III-PALUDISME	11
III-1-EPIDEMIOLOGIE	11
III-2-REPARTITION GEOGRAPHIQUE	11
III-3-PARASITES DU GENRE <i>Plasmodium</i>	11
III-3-1-Classification	11
III-3-2-Cycle de reproduction de <i>Plasmodium</i>	12
III-4-VECTEUR	13
III-5-MANIFESTATIONS CLINIQUES DES ACCES PALUSTRES A <i>P.</i> <i>falciparum</i>	13
IV-LUTTE CONTRE LE PALUDISME	14
V-TRAITEMENT DU PALUDISME	15
2 ^{ème} Partie : MATERIELS ET METHODES	
I-MATERIEL VEGETAL	16

Table des matières

I-1-SELECTION DE LA PLANTE.....	16
I-2-COLLECTE DE LA PLANTE.....	17
I-3-PREPARATION DE L'ECHANTILLON DE LA PLANTE.....	17
II-MATERIELS ET METHODES DE LA PARTIE CHIMIQUE.....	17
II-1-MATERIELS DE LABORATOIRE.....	17
II-2-METHODES.....	18
II-2-1-Screening phytochimique.....	18
II-2-2-Extraction.....	20
II-2-3-Méthode chromatographique analytique.....	20
II-2-4-Méthode chromatographique préparative.....	22
II-2-4-1-Chromatographie sur couche mince préparative.....	22
II-2-4-2-Chromatographie d'adsorption sur colonne ouverte.....	22
II-2-5-Précipitation des proanthocyanidols.....	23
III-MATERIELS ET METHODES POUR L'ETUDE BIOLOGIQUE.....	24
III-1-MATERIELS.....	24
III-2-METHODE D'EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE.....	24
III-3-EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIPLASMODIAL.....	27
III-4-TEST DE TOXICITE AIGUË.....	28
3 ^{ème} Partie : RESULTATS ET DISCUSSIONS	
I-CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE.....	30
II-EXTRACTION.....	31
III-FRACTIONNEMENT BIOGUIDE.....	33
III-1-FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT HEXANIQUE ES Hex.....	34
III-2-FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT ACETATE ES Ac.....	36
III-3-PRECIPITATION DES PROANTHOCYANIDOLS.....	40
III-4-FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT BUTANOLIQUE F Bu.....	41
IV-TEST DE TOXICITE AIGUË DE L'EXTRAIT ES Ac.....	43
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	47
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	49
ANNEXES	

GLOSSAIRE

Antifongique : médicament capable de traiter les mycoses, c'est-à-dire les infections provoquées par des champignons microscopiques.

Asexué : se dit d'une espèce qui peut se reproduire sans l'existence d'individus de sexes distincts.

Asthénie : fatigue physique du patient, affaiblissement de l'organisme.

Candidose : infection fongique

Fébricule : petite fièvre, fièvre hectique légère.

Forme hyphale : correspond à la morphologie de *Candida albicans* qui devient pathogène sous l'induction de facteurs environnementaux.

Hématocrite : désigne le pourcentage relatif du volume des cellules circulant du sang par rapport au volume total du sang.

Hémolyse : lyse des hématies.

Hépatomégalie : augmentation du volume du foie.

Hyphe : appareil végétatif des champignons.

Intertrigo : inflammation de la peau se développant au niveau des plis, surtout chez les personnes grasses.

Leucémie : cancer des cellules de la moelle osseuse. Synonyme : leucose, leucocythémie.

Onyxis : inflammation chronique du derme unguéal.

Parasitémie : quantité de parasite dans le sang humain ou animal (*Plasmodium falciparum* ou autre *Plasmodium* paludique, dans le cas du paludisme par exemple). Elle est utilisée pour le diagnostic d'une maladie parasitaire.

Périonyxis : inflammation chronique des replis cutanés latéraux de l'ongle

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

Splénomégalie : augmentation du volume de la rate.

Sybr-green I : soude spécifique à l'ADN viable double brin. En se combinant avec l'ADN intracellulaire, elle a rendu le complexe sybr-green I-ADN fluorescent, ce qui permet ce dosage de l'ADN, et la parasitémie par voie de conséquence.

Liste des acronymes

Listes des acronymes

°C : Degré Celsius

µg : Microgramme

µl : Microlitre

ADN : Acide désoxyribonucléique

CC : Colonne ouverte

CCM : Chromatographie sur couche mince

CLSI : Clinical Laboratory Standard Institute

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNARP: Centre National d'Application de Recherches Pharmaceutiques

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DO: Densité optique

ES Ac : Extrait acétate d'éthyle

ES Bu : Extrait butanolique

ES Hex : Extrait hexanique

IC₅₀. : Concentration Inhibitrice de 50% des parasites ou microbes *in vitro*.

ICM : Incomplet media

nm : Nanomètre

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PSB : Plante Séchée et Broyée

SLGG : Sabouraud liquide, acide glutamique, glucose.

SSGG: Sabouraud solide, acide glutamique, glucose.

UV : Ultrat-violet

V/V: Volume par volume

F Bu : Filtrat butanolique

Liste des figures

Listes des figures

Figure 1: Distribution géographique des Anacardiaceae	5
Figure 2: Rameaux feuillés et herbier d' <i>Abrahamia deflexa</i>	6
Figure 3: Répartition mondiale du paludisme	11
Figure 4 : Cycle de développement de <i>P. falciparum</i>	12
Figure 5 : Moustique vecteur du paludisme	13
Figure 6 : Schéma d'extraction de la plante étudiée	31
Figure 7 : Schéma de fractionnement de l'extrait hexanique.....	35
Figure 8 : CCM des sous fractions issues de A9 observée à 254 nm.....	37
Figure 9 : CCM des quatre sous fractions issues de A10 observée sous UV à 254 nm.....	38
Figure 10 : Fractionnement de l'extrait ES Ac et purification de A8, A9 et A10.....	38
Figure 11 : Elimination des tanins par précipitation de l'extrait butanolique ES Bu....	39
Figure 12 : Schéma de fractionnement du filtrat butanolique F Bu	40
Figure 13 : Photos des souris au cours du test de toxicité.....	43

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1 : Détection des familles chimiques.....	19
Tableau 2 : Remplissage des puits pour la technique de microdilution.....	26
Tableau 3: Classe de toxicité.....	29
Tableau 4 : Résultats du criblage phytochimique de l'extrait éthanolique d' <i>Abrahamia deflexa</i>	30
Tableau 5 : Résultats des tests <i>in vitro</i> sur <i>C. albicans</i> et <i>P. falciparum</i> des extraits éthanoliques... ..	32
Tableau 6 : Résultats des tests <i>in vitro</i> sur <i>C. albicans</i> et <i>P. falciparum</i> des extraits obtenus à partir du partage liquide-liquide.....	32
Tableau 7 : Résultats des tests d'activités biologiques <i>in vitro</i> sur <i>C. albicans</i> et <i>P. falciparum</i> des fractions issues du fractionnement de ES Hex	34
Tableau 8 : Résultats des tests <i>in vitro</i> sur <i>C. albicans</i> et <i>P. falciparum</i> des fractions issues du fractionnement de ES Ac	36
Tableau 9 : Résultats des tests <i>in vitro</i> sur <i>C. albicans</i> et <i>P. falciparum</i> des fractions issues du fractionnement de ES Ac	36
Tableau 10 : Résultats des tests d'activité antiplasmodiale des sous fractions issues de A9... ..	37
Tableau 11 : Résultats des tests d'activité antiplasmodiale des sous fractions issues de A10.....	38
Tableau 12 : Précipitation de ES Bu et résultats des tests <i>in vitro</i> sur <i>C. albicans</i> et <i>P. falciparum</i>	39
Tableau 13 : Résultats des tests <i>in vitro</i> contre <i>C. albicans</i> et <i>P. falciparum</i> des fractions issues du fractionnement de F Bu	40
Tableau 14 : Préparation des solutions à injecter par souris à chaque lot.....	42
Tableau 15 : Résultats obtenus après administration de doses croissantes de l'extrait brut ES Ac.....	42

INTRODUCTION GENERALE

Madagascar dispose d'une grande diversité floristique à laquelle s'ajoute une tradition séculaire d'utilisation traditionnelle des plantes. L'estimation du nombre total de taxons des plantes vasculaires de Madagascar varie de 10 000 à 12 000 espèces selon les auteurs et le taux d'endémicité est supérieur à 80 % (Koechlin *et al.*, 1974 ; Rajeriarison, 1996). Jusqu'à aujourd'hui, l'usage populaire des plantes reste d'une grande importance.

La majorité des populations ont recours à des plantes médicinales pour se soigner, par manque d'accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne mais aussi parce que ces plantes ont souvent une réelle efficacité. Actuellement, le savoir des tradipraticiens est de moins en moins transmis et tend à disparaître. Par conséquent, l'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie s'emploient à recenser, partout dans le monde, des plantes réputées actives et dont il appartient à la recherche moderne de préciser les propriétés et valider les usages (Pelt, 2001). La recherche de nouvelles molécules ne se limite plus à sélectionner des plantes potentiellement actives mais s'oriente vers l'étude des plantes d'une région donnée et la valorisation de la chimiotaxonomie dans le cadre de la bio-prospection pour permettre d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouveaux principes actifs.

Les végétaux représentent une source de diversité moléculaire (Rahman *et al.*, 2005 ; Steven *et al.*, 2008). Ils ont élaboré au long de leur évolution des stratégies de défense en réponse aux stress environnementaux auxquels ils sont exposés. Les arbres en particulier qui, dans certains cas vivent plusieurs centaines d'années, ont acquis des moyens de résister aux agents responsables de la biodégradation (Nemli *et al.*, 2006). Ces agents biologiques sont de diverses origines, et les champignons lignivores dégradant du bois et les champignons phytopathogènes en font partie. Ainsi, les arbres ont développé la capacité de produire des métabolites secondaires antifongiques pour pouvoir se défendre contre ces champignons (Bednarek et Osbourn, 2009).

La découverte des médicaments à base de plantes médicinales fournit des pistes nouvelles et importantes vis-à-vis des cibles pharmacologiques variées, qui incluent le cancer, le virus VIH du SIDA, les maladies neurodégénératives, les maladies fongiques et la malaria. Les drogues dérivées des plantes médicinales par synthèse chimique, peuvent servir comme de nouveaux médicaments. Les médicaments à base de plantes sont encore largement utilisés et ont une importance considérable dans le commerce international.

Pour Madagascar, le climat tropical chaud et humide constitue un facteur favorisant au développement des maladies fongiques. Behets et ses collaborateurs ont rapporté une

Introduction générale

incidence de la candidose de 28,5% au cours d'une étude sur 1066 femmes (Behets *et al.*, 2001).

L'incidence croissante des infections fongiques, notamment avec l'émergence de nouveaux agents pathogènes est une caractéristique préoccupante de l'évolution de la pathologie infectieuse (Delaunay *et al.*, 2006). Alors que les mycoses deviennent de plus en plus fréquentes, le nombre important de rechutes reflète l'inefficacité de certains traitements antifongiques (Cardinale, 2001 ; Rai *et al.*, 2003 ; Njoroge et Bussmann, 2007).

Parmi les mycoses, la candidose provoquée par la forme pathogène de *Candida albicans* ainsi que la malaria constituent un problème majeur de santé publique (Fridkin et Jarvis, 1996 ; Pfaller et Diekma, 2007). Elles sont responsables d'infections chez les êtres humains et se caractérisent par une morbidité et une mortalité très importantes surtout chez les patients immunodéprimés et les diabétiques (Tiraboschi *et al.*, 2000). Ces problèmes justifient l'importance et l'urgence de la recherche de nouvelles substances fongitoxiques et/ou antiplasmodiales.

Les maladies infectieuses constituent l'une des grandes priorités du programme gouvernemental à Madagascar en matière de santé publique.

Ce travail, fruit de la collaboration entre le Centre National d'Application de Recherches Pharmaceutiques et de la Faculté des sciences Parcours Biochimie, Biodiversité et Santé de l'Université d'Antananarivo, s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules naturelles utilisables dans la formulation de médicaments indiqués dans la lutte contre les maladies fongiques et parasitaires. Cette étude est consacrée à l'étude pharmacologique et phytochimique d'*Abrahamia deflexa*, Anacardiaceae (Perrier de la Bathie, 1946), récoltée dans la partie nord de Madagascar.

Cette étude a pour objectifs de :

- Rechercher par bioguidage les substances naturelles dotées d'une activité antifongique et/ou antiplasmodiale dans les rameaux feuillés d'*Abrahamia deflexa* ;
- Localiser les principes actifs *in vitro* sur *Candida albicans* et/ou sur *Plasmodium falciparum*

Ce mémoire comporte trois parties outre l'introduction et la conclusion générale :

- La première partie aura trait à la synthèse bibliographique contenant l'état de connaissances botaniques, phytochimiques et biologiques de la plante.
- La deuxième partie sera consacrée aux matériels utilisés et aux méthodes adoptées.
- La troisième partie présentera les résultats et discussions.

Introduction générale

Enfin, une conclusion et des perspectives termineront le travail.

1^{ère} Partie :

Synthèse bibliographique

I-PRESENTATION DE *Abrahamia deflexa*

I-1-FAMILLE DES ANACARDIACEAE

Les Anacardiaceae sont une petite famille de Dicotylédones composée de 600 espèces réparties en 70 genres, bien que certains auteurs répertorient 80 espèces (Hormaza et Wunsh, 2011 ; Pell *et al.*, 2011). La majorité des espèces de cette famille sont d'origine tropicale (Watson et Dallwitz, 1992).

A Madagascar, cette famille comprend 8 genres dont *Camposperma*, *Gluta*, *Abrahamia*, *Micronychia*, *Sorindeia*, *Faguetia*, *Operculicarya* et *Poupartia* (Mabberley, 2000 ; Schatz, 2001).

I-1-1-*Caractéristiques botaniques des Anacardiaceae*

Les Anacardiaceae sont des arbres et des arbustes parfois arbustes samenteux, herbacées grimpantes, ou des lianes à canaux résineux et claires. La sève laiteuse est souvent toxique, causant par contact une dermatite sévère. Elles ont des feuilles alternes, rarement opposées (*Abrahamia*, *Belpharocarya*, *Bouea*), non stipulées, souvent pennées, parfois simple (*Cotinus*, *Anacardium*, *Mangifera*) ; des fleurs actinomorphes et bisexuées, parfois unisexuées, petites et discrètes, en panicules axillaires ou terminales, en épis, en grappes, en fascicules ou solitaires ; des sépales connés à la base mais libre au-dessus ; des pétales rarement absents et libres. Les pétales sont plus grands que les sépales et sont imbriqués. 5 à 10 ou plus d'étamines sont insérées à l'extérieur du disque et sont en nombre égal aux pétales ou deux fois plus grand (Perrier de la Bathie, 1946 ; Letouzey, 1972) avec un réceptacle charnu (disque) ; des staminodes sont présents dans les fleurs femelles. Avec un ovaire supère en général, comprenant 1 ou 3 à 5 carpelles unis, rarement libre avec 1 à 5 locules contenant chacun un ovule, le fruit est indéhiscent et drupacé (Heywood *et al.*, 2007).

I-1-2-*Distribution géographique*

Les Anacardiaceae se distribuent dans les hémisphères Est et Ouest (figure 1 page 5), sa représentation est plus ou moins égale en Amérique du Sud, en Afrique et en Asie. Nombreux de ces genres sont originaires d'Amérique du Nord et d'Eurasie (*Rhus*, *Pistacia* et *Cotinus*). Cette famille s'est diversifiée dans plusieurs pays comme en Europe centrale, Amérique du Sud, Malaisie, Afrique du Sud, Indochine et à Madagascar.

Dans les deux régions tempérées et tropicales des deux hémisphères se présente le genre le plus grand, *Rhus*, avec 200 espèces ; *Semecarpis*, avec 60 espèces, qui se distribue en Indo-Malaisienne (Heywood *et al.*, 2007 ; Takhtajan, 2009 ; Pell *et al.*, 2011).

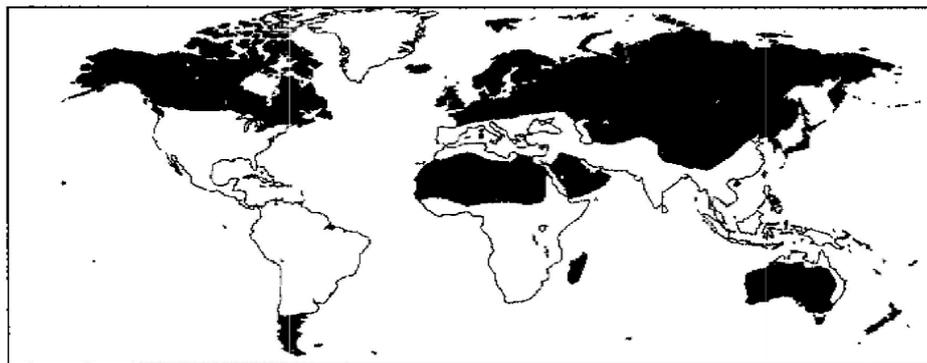


Figure 1 : Distribution géographique des Anacardiaceae (Heywood *et al.*, 2007)

I-1-3-Utilisations médicinales et effets biologiques

La famille des Anacardiaceae sont connues depuis longtemps pour leurs propriétés médicinales (Pell *et al.*, 2011). Elles sont utilisées pour traiter la fièvre (*Buchanania*, *Comocladia*), l'hépatite (*Haemotostaphis*), les troubles gastro-intestinaux (*Anacardium*, *Antrocaryon*, *Heeria*, *Lannea*, *Ozoroa*, *Pseudospondia*, *Schinus*, *Sorindeia*), les maladies respiratoires (*Astronium*), les maladies cutanées et/ou des blessures (*Buchanania*, *Lannea*, *Metopium*, *Ozoroa*, *Schinus*, *Sclerocarya*, *Searsia*, *Sorindeia*, *Trichoscypha*), les maladies vénériennes (*Buchanania*, *Lannea*) (Morton, 1981 ; Burkill, 1985 ; Mitchell, 2004). *Spondias* et *Rhus* sont largement utilisés par les populations indigènes pour traiter les maux, les rhumes et les fractures.

I-1-4-Principaux métabolites secondaires

Les métabolites secondaires au sein des espèces de la famille des Anacardiaceae se rencontrent dans toutes les parties de la plante, mais sa distribution varie différemment d'une plante à l'autre et varie aussi selon leurs rôles (Aguilar – Ortigoza et Sosa, 2004).

Les produits émis par les plantes, en très faible quantité, ont une grande variété structurale. Ils marquent originellement un genre, une famille ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique.

Plusieurs études ont porté sur l'activité biologique des composés phénoliques (Corthout *et al.*, 1994), des esters (Corthout *et al.*, 1992 ; Galvez *et al.*, 1992), et des tanins (Corthout *et al.*, 1991 ; Galvez *et al.*, 1991 ; Viana *et al.*, 1997). D'autres ont porté sur les composés toxiques tels que ceux causant une dermatite suite à un contact (Mitchell, 1990 ; Rivero-Cruz *et al.*, 1997 ; Drewes *et al.*, 1998), et ceux responsables des allergies à partir de noix (Jansen *et al.*, 1992 ; Fernandez *et al.*, 1995).

Certains composés isolés d'Anacardiaceae se sont révélés avoir une fonction défensive. Ils agissent notamment comme antimicrobiens (Saxena *et al.*, 1994) et antifongiques et/ou insecticides (Chen et Wiemer, 1984 ; Cojocarú *et al.*, 1986).

I-2- *Abrahamia deflexa*

I-2-1- Caractéristiques botaniques

Abrahamia deflexa est un petit arbre ne dépassant pas 12 m de haut, à exsudation blanche. Elle est caractérisée par :

- des feuilles simples, alternes et sans stipules ; avec de limbe glabre et membraneux, de couleur vert noirâtre au-dessus et brun rougeâtre en dessous, de forme oblong ou ovale (2,8-8,6 x 1-2,5 cm), peu atténuées vers la base très obtuse, obtuses ou émarginées au sommet ; aux nervures secondaires immergées et peu visibles sur les deux faces ; avec pétiole grêle de 8-18 mm ;

- des inflorescences en panicules terminales plus ou moins longuement pédonculées et parsemées de quelques rares poils ferrugineux ;

- des fleurs courtement pédicellées et petites avec 5 sépales parsemées de quelques poils à l'extérieur et 5 pétales. La fleur mâle est à 5 étamines extradisquales ; avec des anthères dorsifixes et introrses, à déhiscence longitudinale, et à un disque entourant un ovaire rudimentaire. La fleur femelle est également pentamères avec 5 staminodes et ovaire supère, style court et trifide, uniloculaire, contenant une ovule. Le fruit a une forme ovale ou oblongue (2 x 1-1,5 cm), glabre, avec de nombreux canaux résinifères, contenant une graine ovale aiguë.



Figure 2 : Rameaux feuillés et herbier d'*Abrahamia deflexa*. Sources :

http://www.botanywebsite.com/flora_of_madagascar/index.php?page=Abrahamia_deflexa_picture_leaves1

http://science.mnhn.fr/institution/mnhn/collection/p/item/00780372?lang=fr_FR

I-2-2- Position systématique

Selon la classification de Cronquist (1988), la famille des Anacardiaceae appartient à :

Règne: PLANTAE

Sous règne : TRACHEOBIONTA

Division : MAGNOLIOPHYTA

Classe : MAGNOLIOPSIDA

Sous classe : ROSIDAE

Ordre : SAPINDALES

Famille : ANACARDIACEAE

Genre : *Abrahamia*

Espèce : *deflexa*

Synonyme : *Protorhus*

Nom vernaculaire : Hazombarorana, hazombaroa, sohy.

Deux espèces de ce genre sont présentes en Afrique du Sud et 20 espèces à Madagascar (Watson *et al.*, 1992).

I-2-3-Distribution géographique

Abrahamia deflexa est une espèce des formations forestières sèches du Nord et de l'Ouest de Madagascar, rencontrée depuis Antsiranana jusqu'à Toliary (Rabesa *et al.*, 1993).

Cette plante a été récoltée au mois de Juin 2008 dans la région de DIANA.

II-INFECTIIONS FONGIQUES HUMAINES

II-1-CANDIDOSES

Les candidoses sont les infections opportunistes les plus fréquentes. Elles sont dues aux champignons du genre *Candida* dont le pouvoir pathogène ne s'exprime qu'en présence d'un environnement hostile ou de facteurs favorisants locaux ou généraux. En réponse à ces facteurs, *Candida* passe par le phénomène du dimorphisme qui correspond à la transition de la forme ovoïde en forme hyphale (Sudbery *et al.*, 2004 ; Brown, 2002) et devient pathogène.

Les candidoses peuvent être classées en deux groupes au niveau clinique selon la forme d'apparition de la maladie : les candidoses superficielles et les candidoses profondes.

II-1-1-Candidoses superficielles

L'adhérence aux cellules épithéliales, la multiplication des levures et leur capacité de filamentation sont à l'origine de lésions cutané-muqueuses inflammatoires.

Les candidoses des muqueuses comprennent les oropharyngées, les candidoses buccales et digestives puis les candidoses génitales. Elles apparaissent notamment en cas de diminution aiguë ou chronique du système immunitaire.

Parmi les candidoses cutanées et unguéales figurent les intertrigos favorisés par l'obésité, le diabète et le manque d'hygiène puis l'onyxis et périonyxis qui atteignent préférentiellement les ongles des doigts et des orteils.

La candidose cutanéomuqueuse chronique est une affection rare qui touche le plus souvent les jeunes enfants avec une atteinte à *C. albicans* préexistante ou récidivante de la peau, des ongles et des muqueuses.

II-1-2-Candidoses profondes

Les candidoses profondes sont de deux types : les candidoses systémiques et les candidoses hépatospléniques ou candidoses disséminées chroniques.

Les candidoses systémiques apparaissent sous forme de manifestations cutanées considérées comme des métastases et/ou oculaires comme de nodules rétinien blanchâtres ou jaunâtres et duveteux.

Les candidoses hépatospléniques sont une forme particulière de candidose systémique évoluant sur le mode chronique. Elle s'observe chez des patients ayant une leucémie aiguë dont la maladie est en rémission après une chimiothérapie.

(Source : campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/candidoses/site/html/5_3.html)

II-2-GENRE *Candida*

Le genre *Candida* compte un peu moins de 200 espèces et regroupe des levures non pigmentées, non capsulées, à bourgeonnement multilatérale, produisant des filaments sauf pour *C. glabrata*. La plupart des espèces du genre *Candida* sont responsable de mycoses superficielles. Ces levures se multiplient à des températures comprises entre 20°C et 40°C et se développent à un pH compris entre 3 et 8 (Calderone, 2002 ; Pfaller et Diekema, 2007).

II-3-*Candida albicans*

Candida albicans est une levure monocellulaire habitant naturellement dans notre tube digestif, entourée de millions d'autres microorganismes. Tous ces microorganismes nous aident à digérer notre nourriture. Sans eux nous ne pourrions pas vivre. Cependant quand les conditions lui deviennent favorables, *C. albicans* peut prendre une forme fongique et développer de longs filaments qui s'incruster dans la paroi intestinale. Sous cette forme, *C. albicans* devient nuisible à la santé.

La forme fongique enfonce ses hyphes dans les parois des intestins jusqu'à atteindre le réseau sanguin d'où elle extrait le sucre qui devrait alimenter les cellules. Ces intrusions dans les parois des organes digestifs ouvrent en outre des microfissures qui laissent passer des particules alimentaires partiellement digérées, pouvant provoquer des réactions allergiques à

des aliments de plus en plus nombreux et variés. A un stade extrême, certaines personnes deviennent allergiques à tout.

C. albicans diffuse dans le sang des dizaines de toxines différentes qui affaiblissent le système immunitaire. Elle peut être retrouvée sous deux formes : forme commensale et forme de mycélium ou filamenteuse ou bien hyphale. Alors que la forme commensale reste non-invasive, la forme hyphale est pathogène et est capable de pénétrer les muqueuses en provoquant des maladies. Ce dimorphisme peut être induit par un grand nombre de stimuli dont le pH, la température et la composition du milieu (Sudbery *et al.*, 2004).

Candida albicans peut être responsable de deux (2) types de mycoses :

- les mycoses superficielles (ayant pour cible la peau et les muqueuses) ;
- les mycoses profondes (provoquant une infection entérique parfois asymptomatique).

II-4-TRAITEMENT DES INFECTIONS FONGIQUES

Les antifongiques sont des médicaments conçus pour traiter les maladies causées par certains champignons ou au moins pour réduire leur prolifération. Ils peuvent être fongicides ou fongistatiques. Ceux utilisés actuellement pour le traitement des mycoses agissent principalement par une altération de la membrane cellulaire, par une inhibition de la synthèse d'ADN et de l'ergostérol et finalement par une inhibition de la synthèse des glycanes de la paroi cellulaire.

Les composés antifongiques utilisés actuellement peuvent être divisés en trois groupes : les antifongiques synthétiques, semi-synthétiques et d'origine naturelle.

II-4-1-Antifongiques synthétiques

Les molécules antifongiques synthétiques regroupent les allylamines [inhibiteurs de la squalène époxydase (Odds *et al.*, 2003)] , les azolés [inhibiteurs puissants de l'enzyme C14- α -déméthylase du cytochrome P450 (White *et al.*, 1998), responsable de la conversion du lanostérol en ergostérol] et les pyrimidines.

II-4-2-Molécules antifongiques semi-synthétiques

La classe des molécules antifongiques semi-synthétiques date des années 1970 avec la découverte de l'échinocandine B, isolée d'une culture d'*Aspergillus* sp. Les échinocandines sont des lipopeptides inhibiteurs de la synthèse de la paroi fongique.

II-4-3-Molécules antifongiques d'origine naturelle

II-4-3-1-Macrolides polyènes

Les polyènes sont fongicides et possèdent le plus large spectre d'activité antifongique par rapport aux autres agents disponibles (Georgopapadakou et Walsh, 1996).

II-4-3-2-Benzofuranes

La classe des benzofuranes est composée d'une seule molécule, la griséofulvine, isolée en 1939 de *Penicillium griseofulvum*. Son mécanisme d'action exact est encore mal connu.

II-4-3-3-Nikkomycines

Les nikkomycines sont des inhibiteurs compétitifs des enzymes de synthèse de la chitine fongique et isolées à partir de *Streptomyces tendra* (Vecht-Lifshitz *et al.*, 1992).

II-4-3-4-Sordarine

La sordarine fut isolée d'une souche de *Streptomyces* sp. (Hauser et Sigg, 1971). Elle inhibe une cible mise en jeu dans la production de protéines fongiques, appelée facteur 2 de translation et ou d'élongation (Domínguez et Martín, 1998).

Les métabolites secondaires dotés d'une activité antifongique sont de quatre classes dont les terpènes et terpénoïdes, les saponines, les composés phénoliques et les alcaloïdes.

II-4-3-5-Terpènes et terpénoïdes

Un grand nombre de terpènes isolés à partir des végétaux se sont révélés actifs contre de nombreux champignons humanopathogènes. Leurs cibles principales sont supposées être les membranes cellulaires du fait du pouvoir hautement lipophile de la plupart de ces composés et que leur toxicité soit causée par une altération de la pression osmotique (Cox *et al.*, 2000 ; Inoue *et al.*, 2004).

II-4-3-6-Saponines

Les saponines ont la propriété de former des complexes avec le cholestérol (Francis *et al.*, 2002), mais également avec l'ergostérol (Biacs et Gruiz, 1982). A ce titre, elles sont fongicides en provoquant une perte de l'intégrité de la membrane cellulaire et une augmentation de la perméabilité ionique (Gruiz et Biacs, 1989).

II-4-3-7-Composés phénoliques

Réputés pour les propriétés antioxydants de certains d'entre eux, en particulier les tanins, les composés phénoliques sont également antifongiques en particulier à l'égard des champignons phytopathogènes, et peuvent être pour cette raison considérés comme des métabolites responsables de la défense naturelle des végétaux vis-à-vis des champignons (Arreola-Cortés *et al.*, 2007).

II-4-3-8-Alcaloïdes

La plupart des alcaloïdes antifongiques sont hautement conjugués formant un système aromatique plan et pouvant contenir un ammonium quaternaire (Clark et Hufford, 1992).

III-GENERALITES SUR LE PALUDISME

Le paludisme ou malaria est une maladie potentiellement mortelle due à un parasite (hématozoaire) du genre *Plasmodium* transmis à l'homme par la piqûre d'un moustique, du genre *Anopheles*, une anophèle femelle infectée.

III-1-EPIDEMIOLOGIE

Selon les estimations de l'OMS, en 2016, 216 millions de cas de paludisme dans 91 pays, et 445 000 de décès ont été enregistrés. En 2016, 90% des cas de paludisme et 91% de décès dus à cette maladie sont survenus dans la région Africaine. Cette maladie parasitaire tue un enfant toute les trente secondes en Afrique et est responsable de 1 à 3 millions de décès par an dans le monde (WHO, 2005).

III-2-REPARTITION GEOGRAPHIQUE

Le paludisme est une affection cosmopolite. Cependant, c'est une endémie majeure dans les zones tropicales chaudes et humides de l'Afrique, d'Amérique et d'Asie (Gentillini, 1993). La figure 3 représente la cartographie de la distribution globale du paludisme dans le monde en 2006 selon l'OMS.

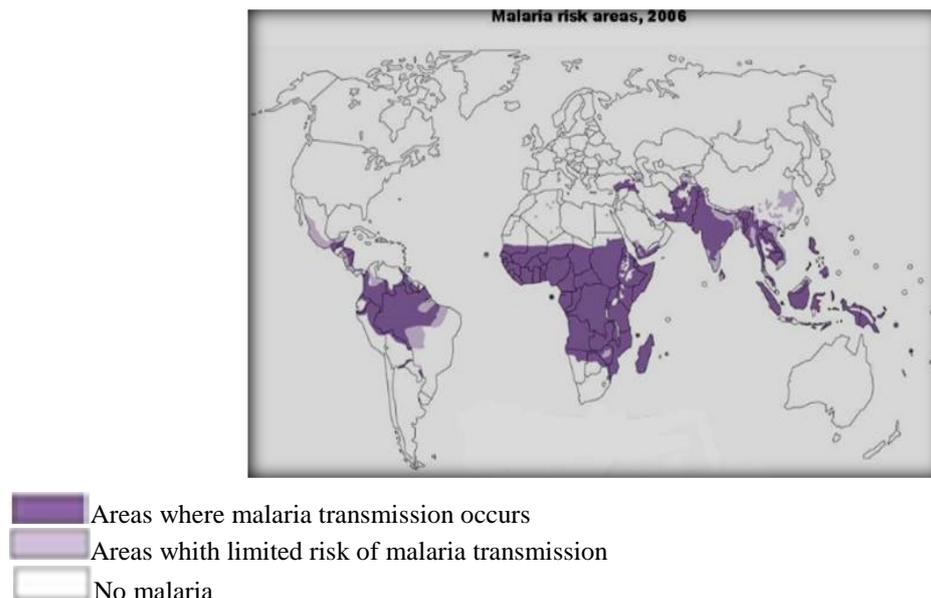


Figure 3 : Répartition mondiale du Paludisme (Source : WHO, 2006)

III-3-PARASITES DU GENRE *Plasmodium*

III-3-1-Classification

Selon la dernière classification de Levine (1988) amendée par Cox (1991), le genre *Plasmodium* appartient à l'embranchement des Apicomplexa (Sporozoaires), à la classe des Haemosporida, à l'ordre des Haemosporida et à la famille des Plasmodiidae. Ils sont des parasites des hématies et sont parfois nommés hématozoaires.

Il existe plus de 140 espèces de *Plasmodium*, touchant diverses espèces animales. Seulement cinq de ces espèces sont retrouvées en pathologie humaine, il s'agit de *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*. (Mendis *et al.*, 2001). *P. falciparum* est celui qui est le plus largement répandu sur le continent Africain et est responsable de la plupart des cas mortels dans le monde. *P. vivax* est le parasite prédominant hors d'Afrique.

III-3-2-Cycle de reproduction du *Plasmodium*

Le cycle de reproduction du *Plasmodium* présenté sur la figure 4 est complexe et comporte deux phases : une phase asexuée, se déroulant chez l'homme, et une phase sexuée, débutant chez l'homme et qui se termine chez le moustique (*Anopheles*).

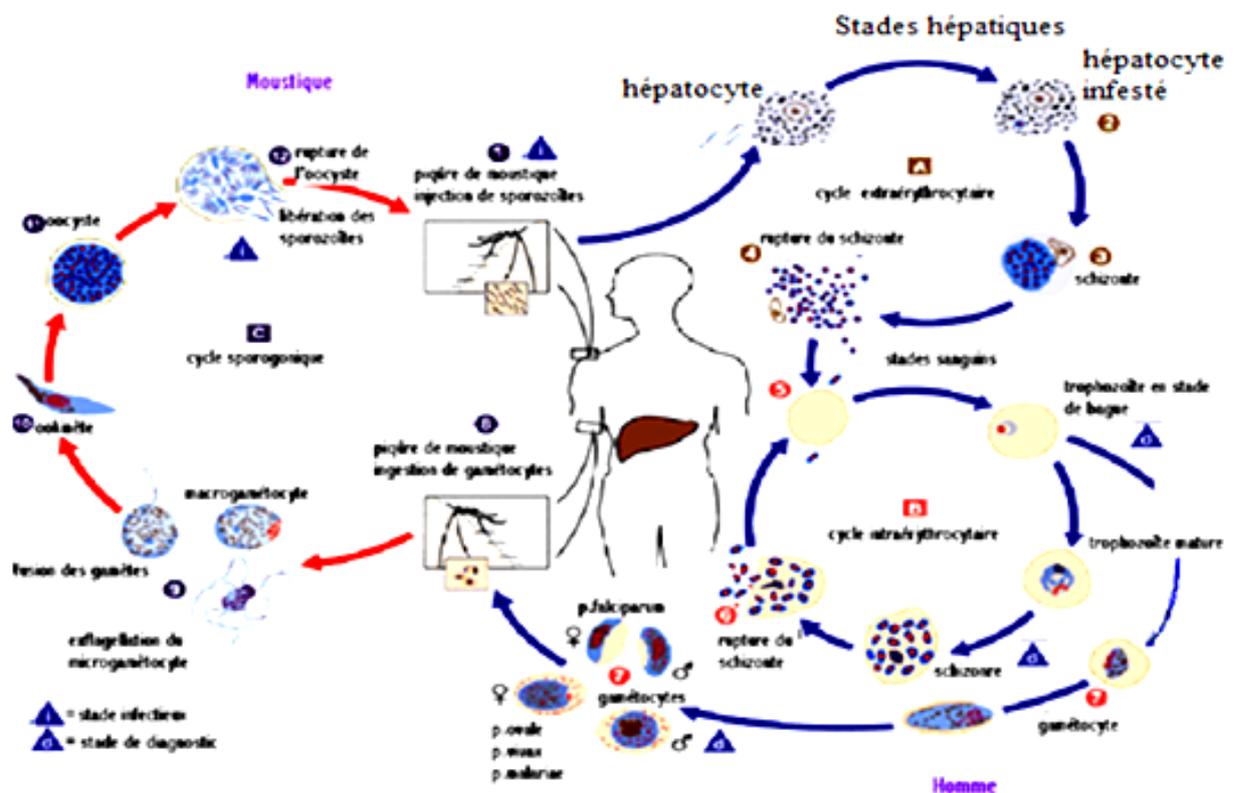


Figure 4 : Cycle de développement de *P. falciparum*

Source : http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ccdr-rmtc/04vol1130/30s1/page9_f.html

Dans le cas de *P. falciparum*, seul le début du cycle se déroule dans le sang périphérique : la phase de division du schizonte érythrocytaire se produit dans les organes profonds. Le développement de tous les parasites est synchrone chez un même sujet et ce cycle érythrocytaire dure 48 heures, d'où le nom de fièvre tierce maligne qui lui était donné bien avant que ne fut découvert le parasite. L'éclatement des globules rouges correspond à l'épisode fébrile qui caractérise le paroxysme de l'accès. Après plusieurs cycles asexués de *P. falciparum*, le malade, s'il a survécu, guérit spontanément. Après neuf à onze jours,

apparaissent dans le sang des formes sexuées non pathogènes, les gamétocytes mâles et femelles. Ces gamétocytes n'évoluent pas chez l'homme et ne peuvent poursuivre leur évolution que lorsqu'ils sont ingérés par des *Anopheles*, assurant ainsi la pérennisation de l'espèce.

III-4-VECTEUR

III-4-1-Classification

Règne : ANIMAL
Embranchement : ARTHROPODES
Classe : INSECTES
Sous-classe : MANDIBULATES
Ordre : DIPTERES
Famille : CULICIDAE
Sous famille : ANOPHELINEAE
Genre : *Anopheles*



Figure 5 : Moustique vecteur du paludisme

Source : (<http://www.pasteur.fr>). .

Plus de 450 espèces d'*Anopheles* ont été à ce jour décrites mais seulement une soixantaine sont des espèces vectrices responsables de la transmission du parasite à l'homme (source : <http://www.pasteur.fr>).

III-4-2-Les principales espèces

Les principaux vecteurs du paludisme sont :

- En Afrique : *Anopheles gambiae*, *A. arabiensis*, *A. funestus*, *A. nili* et *A. moucheti*.
- En Amérique : *A. darlingi*, *A. albimanus*, *A. pseudopunctipennis* et *A. quadrimaculatus*.
- En Asie : *A. stephensi*, *A. farauti*, *A. sinensis*, *A. tellessarus* et *A. minimus*.

III-5-MANIFESTATIONS CLINIQUES DES ACCES PALUSTRES A *P.*

falciparum

Deux types ont été trouvés : le paludisme simple ou non compliqué et le paludisme grave

III-5-1-Paludisme non compliqué (PNC)

Il est caractérisé par l'absence de critère de paludisme grave (OMS, 2000). Le patient est capable de tolérer une médication antipaludique par voie orale et peut ainsi être traité en ambulatoire. Bien traité, le décès est exceptionnel et résulte alors du passage à la forme sévère.

En fonction de la symptomatologie, les différentes formes cliniques du PNC sont :

- **Formes communes** : La symptomatologie correspond à une fièvre non spécifique d'allure isolée.

- **Accès de reviviscence précoce ou tardive** : Ces accès s'observent avec l'acquisition d'un certain degré d'immunité et correspondent aux accès schizogoniques toutes les 48 heures (*P. falciparum*, *P. ovale* ou *P. vivax*) ou 72 heures (*P. malariae*).

- **Paludisme viscéral évolutif (PVE)** : Le PVE concerne plutôt l'enfant qui peine, au cours des années, à acquérir sa prémunité. La splénomégalie en est le signe majeur associé à une hépatomégalie. Les signes généraux (fébricule intermittente, asthénie, amaigrissement etc) et d'hémolyse (pâleur, ictère) sont très variables, allant d'une forme quasi symptomatique à une forme pouvant en imposer pour une leucémie. La densité parasitaire est en règle faible nécessitant de répéter les gouttes épaisses.

III-5-2- Paludisme grave

Il est fréquent chez l'enfant de moins de 5 ans et le sujet non-immunisé dans les zones de transmission stable et dans toutes les classes d'âge dans les zones de paludisme instable et intermédiaire. Le paludisme sévère nécessite une hospitalisation avec une prise en charge rapide et un traitement par voie parentérale.

IV-LUTTE CONTRE LE PALUDISME

Les stratégies de lutte antipaludique jusqu'ici utilisées ont été confrontées à de nombreuses difficultés telles la résistance des vecteurs aux insecticides et surtout la résistance des parasites aux antipaludiques. Ces résistances s'intensifient de plus en plus et réduisent considérablement l'efficacité de la lutte anti-vectorielle et de celle antiplasmodiale.

IV-1-LUTTE ANTI-VECTORIELLE

Elle est basée sur la démositification qui consiste à mener une action contre les formes adultes et les formes larvaires.

L'activité principale de lutte contre les adultes est la pulvérisation intra-domiciliaire d'insecticide à effet rémanent. Cette méthode peut être efficace pour réduire la durée de vie des moustiques sensibles au produit utilisé.

La lutte antilarvaire se fait par la gestion environnementale. Elle est peu efficace pour réduire et très coûteuse, les larvicides chimiques sont aussi très polluants.

L'utilisation des supports imprégnés d'insecticide, de produits répulsifs et de grillages sur les portes et les fenêtres, sont un autre moyen de lutte contre les vecteurs.

IV-2-LUTTE ANTIPARASITAIRE

Cette lutte est basée sur l'utilisation de médicaments qui ont une action sur les différentes formes du cycle parasitaire chez l'homme (schizonticides, gamétocytocides). Ceci

revient au traitement du paludisme dont le choix dépend avant tout de la gravité clinique de la maladie, d'où l'importance d'un diagnostic précoce et précis.

V-TRAITEMENT DU PALUDISME

Le traitement du paludisme dépend de la nature de l'espèce plasmodiale en cause et de la sévérité de la maladie.

Les antimalariques sont classés en fonction des stades parasitaires sur lesquels ils agissent. Plusieurs types ont été trouvés comme :

- Les schizonticides, actifs sur les formes endo-érythrocytaires du cycle schizogonique,
- Les gamétocytocides, inhibent la transformation des gamétocytes et bloquent la transmission de l'espèce plasmodiale. Ils sont partiellement actifs sur les parasites intra-hépatiques.

Les infections à *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae* restent les seules indications actuelles de la chloroquine.

Les accès non compliqués à *P. falciparum* relèvent d'un traitement (par associations médicamenteuses) par voie orale avec :

- en première ligne : artéméther + luméfantrine, atovaquone + proguanil, artéminol + piperaquine ;
- en deuxième ligne : quinine, méfloquine et ;
- en troisième ligne : halofantrine.

Le traitement de choix des formes graves de paludisme à *P. falciparum* (et à *P. knowlesi*) repose sur la quinine administrée en perfusion intraveineuse sur 4 heures ou en cas de résistance ou de contre-indication à la quinine sur l'administration intramusculaire d'artésunate.

2^{ème} Partie :

Matériels et Méthodes

I-MATERIEL VEGETAL

I-1-SELECTION DE LA PLANTE

La réussite d'une étude phytochimique dépend en grande partie de la sélection de la plante. Quelques critères permettant d'orienter ce choix sont pris en considération :

- L'endémicité ;
- L'observation de la plante dans son milieu naturel ;
- Les aspects botaniques et chimiotaxonomiques ;
- Les travaux scientifiques antérieurs.

I-1-1-L'endémicité

Les études phytochimiques antérieures sur les espèces endémiques sont généralement rares. La probabilité d'obtenir de nouvelles molécules bioactives serait forte.

I-1-2-L'observation de la plante dans son milieu naturel

Dans un climat chaud et humide, une plante devra faire face aux attaques par de nombreux micro-organismes et insectes. L'observation d'une plante apparaissant comme saine peut laisser penser qu'elle ait développé de métabolites secondaires lui permettant de se défendre face à ces agressions (Bennett et Wallsgrove, 1994 ; Spiteller, 2008). Elle peut être une source inestimable de nouvelles molécules fongitoxiques.

I-1-3-Les aspects botaniques et chimiotaxonomiques

La connaissance des plantes choisies au travers des enquêtes ethnobotaniques peut être enrichie par la connaissance botanique des espèces citées. D'après la chimiotaxonomie, si une plante possède un potentiel thérapeutique intéressant grâce aux substances qu'elle synthétise, une espèce appartenant au même genre ou à la même famille aura plus de chances de produire des molécules de mêmes familles chimiques qui pourraient avoir une activité biologique similaire. *Abrahamia ditimena* a présenté un certain nombre d'activités biologiques intéressantes : antibactérienne (Rabodomalala, 2008), antifongique (Hanitriniaina, 2015), antioxydante et antianaphylactique (Rabeharioelina, 2017). Choisir une autre espèce du genre *Abrahamia* augmenterait la chance d'isoler au moins une molécule bioactive de même famille chimique.

I-1-4-Travaux scientifiques antérieurs

Les critères précédemment évoqués ont permis d'établir une liste préliminaire de plantes potentiellement intéressantes. Dans le but de découvrir de nouvelles molécules bioactives, il est plus judicieux de s'intéresser aux espèces peu voire non étudiées. Dans tous les cas, une recherche bibliographique approfondie devra précéder le début du processus d'extraction. Aucune étude chimique et biologique approfondie n'a été publiée jusqu'à ce

jour.

Sur la base de ces critères a été choisie une plante endémique de Madagascar, *Abrahamia deflexa* (Anacardiaceae).

I-2-COLLECTE DE LA PLANTE

La plante a été récoltée au mois d'Avril 2012 dans la forêt sèche dégradée d'Ampasimena, Fokontany d'Ambolobozoke, Commune d'Andrafiabe, District Antsiranana II, dans le nord de Madagascar sur la base de la prédétermination sur terrain. La détermination définitive a été réalisée par Dr Stephan RAKOTONANDRASANA, chercheur au Département d'Ethnobotanique et de Botanique du CNARP. Un spécimen d'herbier a été déposé au Centre d'herbier CNARP Antananarivo Madagascar, sous la référence Rakotonandrasana *et al.* 1026.

I-3-PREPARATION DE L'ECHANTILLON DE LA PLANTE

Les rameaux feuillés de la plante collectée ont été étalés dans la chambre d'un séchoir électrique et séchés avec de l'air chaud à une température constante de 55°C jusqu'à leur séchage effectif. Ils sont ensuite mis dans des sacs en plastique poreux et conservés à une température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité. Selon le besoin, la quantité nécessaire est broyée avec un broyeur mécanique WILLEY MILL modèle 2.

II-MATERIELS ET METHODES DE LA PARTIE CHIMIQUE

II-1-MATERIELS D'ETUDE

- Appareils : broyeur mécanique de marque WILLEY MILL, model n°2, Arthur Thomasoo PHILADELPHIA, USA ; balance de précision (METTLER PM300), balance (KERN PM 600), évaporateur rotatif R-3000 et congélateur.
- Verrerie : ampoule à décanter de 1 l, schott en verre frité, tubes à essai, bécher, éprouvettes graduées, Erlen Meyer de 3 l, Erlen meyer rodé de 100 ml, Erlen à vide de 2,5 l, ballons à fond rond de 1 l et de 100 ml, pipettes en verre et tubes capillaires.
- Appareil chromatographique : colonne en verre de 4 cm x 75 cm, cuve en verre sous forme d'un parallélépipède rectangle à fond plat muni d'un couvercle en verre, plaques chromatographiques de silice en phase normale Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck) sur un support en aluminium, plaques de verre couvertes de silice 150 A Whatman (Schleicher et Schuell) contenant un indicateur de fluorescence F₂₅₄ d'une épaisseur de 1 mm sur support en verre.
- Matériel de révélation : pulvérisateur en verre, appareil émettant de la lumière UV à 254 nm et à 366 nm, sèche-cheveux, pistolet chauffante de marque Stinel 3484 200 W.

- Révélateurs chimiques : réactif de Godin, réactif de Liebermann et Burchard, solution éthanolique à 5% de FeCl₃, vapeur d'ammoniac.
- Solvants utilisés : hexane, dichlorométhane, chloroforme, chloroforme, acétate d'éthyle, méthanol, butanol, eau.
- Autres : pinces en bois, blouse, portoirs, spatule, valets, hotte, sable de Fontainebleau.

II-2-METHODES

II-2-1-Screening phytochimique (voir annexe 1)

La première étape d'une étude phytochimique consiste généralement à déterminer les principales classes de métabolites secondaires élaborés par la plante au cours de son évolution. Les informations recueillies seront ensuite confrontées aux données bibliographiques collectées sur la famille et le genre de l'espèce étudiée. Elles sont essentielles pour la sélection de la méthode d'extraction et des procédés d'isolement à appliquer puis permettent aussi d'indiquer les classes des principes actifs pouvant être rencontrées dans la plante.

Le criblage phytochimique est une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration ou de précipitation spécifiques à chaque classe de substances naturelles. Il est effectué sur un extrait hydroéthanolique afin de déceler les principales familles chimiques présentes dans la plante (Houghton et Raman, 1998 ; Fong et Farnsworth, 1977). La connaissance de différentes classes de métabolites secondaires présentes dans la plante permet d'orienter le choix du mode d'extraction à adopter et des révélateurs à utiliser.

Les réactions de caractérisation sont résumées dans le tableau 1 page 19 et détaillées dans l'annexe 1.

Pour préparer l'extrait à analyser, 50 g de poudre de rameaux feuillés ont été chauffés au reflux pendant 1 h. Après filtration et évaporation sous pression réduite, 3,96 g d'extrait alcoolique ont été obtenus et soumis aux différents tests de caractérisation phytochimique.

Matériels et méthodes

Tableau 1 : Détection des familles chimiques

Réactions de Caractérisation	Réactifs Spécifiques	Résultats attendus	Familles chimiques détectées
WAGNER MAYER DRAGENDORFF	HgCl ₃ /IK I ₂ /IK (NO ₃) ₃ /BI/IK	Précipitation Précipitation Précipitation	Alcaloïdes
BORNTRAGER	Filtrat extrait 2 x au benzène + NH ₄ OH à 20 %	Coloration de la phase alcaline rouge	Anthraquinones
Indice de mousse	Eau distillée	Mousse > 3 cm	Saponines
SALKOWSKI	H ₂ SO ₄ concentré (2 N)	Coloration de l'anneau de séparation rouge	Stérol insaturé
LIEBERMAN N BURCHARD	Anhydride acétique, H ₂ SO ₄ concentré (2 N)	Coloration : -rouge pourpre -violet ou bleu vert	-triterpènes -stéroïdes
KEDDE	(NO ₂) ₃ C ₆ H ₂ O ₄ H	Coloration rouge	Stéroïde lactoniques
KELLER-KILIANI	FeCl ₃ , acide acétique glacial	Anneau de séparation de couleur rouge pourpre	Désoxy-2-sucres
WILLSTÄTTER	HCl, tournure de magnésium	Coloration rouge	Flavones
		Coloration rouge pourpre	Flavonols
		Coloration rouge violacé	Flavanones, Flavanonols
WILLSTÄTTER MODIFIÉE	HCl, tournure de magnésium + Alcool Isoamylique	Coloration rouge pourpre	Flavonols
		Coloration rouge	Flavones
BATESMITH	HCl concentré -à chaud -à froid	Coloration : -rouge violacée - rouge	Leucoanthocyanes Anthocyanes

Réactions de Caractérisation	Réactifs Spécifiques	Résultats attendus	Familles chimiques détectées
	KOH 10%	fluorescence au cours d'une observation sous UV à 366 nm	Coumarines
	HCl 12% aqueux	Précipitation noire	Iridoïdes
	Gélatine 1%	Précipitation	Tanins
	Gélatine salée	Précipitation	Polyphénols
	FeCl ₃	Coloration noir bleuâtre	Tanins hydrolysables (galliques)
	FeCl ₃	Coloration bleu-vert	Tanins condensés (catéchiques)

II-2-2-Extraction

Afin d'éviter le risque de dégradation ou de transformation des métabolites secondaires sous l'effet de la chaleur, la macération à température ambiante a été adoptée.

Elle consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs.

La plante séchée et broyée a été extraite suivant le processus décrit sur la figure 6 page 31. La poudre de la plante a été mise en contact avec de l'éthanol à 90% à raison de 1,350 l pour 300 g de drogue. Au bout de 24 h, le mélange hétérogène est filtré sur papier filtre et le résidu est de nouveau extrait deux fois dans les mêmes conditions. Les filtrats sont évaporés sous pression réduite à une température ne dépassant pas 60°C. Les extraits éthanoliques secs ainsi obtenus ont été testés sur *Candida albicans* et *Plasmodium falciparum*, ceux qui ont montré peu de coloration chlorophyllienne ont été rassemblés. Ils ont été repris avec de l'eau distillée à 40°C et soumis à un partage liquide-liquide successivement avec l'hexane pour un dégraissage puis avec l'acétate d'éthyle et le n-butanol donnant respectivement les extraits hexanique (**ES Hex**), à l'acétate d'éthyle (**ES Ac**) et butanolique (**ES Bu**). L'extrait aqueux résiduel est appelé **ES Aq**. Les extraits obtenus sont évaporés à sec sous pression réduite.

II-2-3-Méthode chromatographique analytique : chromatographie sur couche mince (Ikan *et al.*, 1964; Stahl, 1967; Wagner et Plant, 1996)

Cette méthode est mise à profit pour visualiser la séparation des molécules d'un extrait

au cours de son fractionnement sur colonne et pour évaluer le degré de pureté ou la complexité des fractions obtenues.

Principe

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose sur des phénomènes d'adsorption, d'interaction et de polarité. Un mélange de composés est placé sur un support solide ou phase stationnaire (plaque d'aluminium ou de verre recouverte de couche de gel de silice, silicagel 60, d'une épaisseur de 0,2 mm avec un indicateur de fluorescence F₂₅₄). Celui-ci est plongé dans l'éluant approprié (phase mobile) qui, par capillarité, se déplace le long de la phase stationnaire. La phase mobile entraîne les molécules selon leur polarité. La plaque CCM est observée sous lumière UV à 254 nm et à 366 nm avant et, dans certains cas, après révélation par des réactifs spécifiques.

L'utilisation de différents réactifs permet de rassembler judicieusement les fractions récoltées en fonction de leur profil chromatographique. Les réactifs employés pour le présent travail sont :

- **Réactif de Godin** (Godin, 1954) (Réactif polyvalent)

Un mélange de volumes égaux d'une solution d'acide perchlorique à 3% et une solution éthanolique de vanilline 1% est préparé. Les plaques de silice sont aspergées successivement avec ce réactif, puis avec une solution éthanolique d'acide sulfurique à 10%. Elles sont ensuite chauffées à 100°C jusqu'à l'apparition de taches colorées à la lumière visible.

- **Réactif à la vanilline sulfurique** (Révélateur polyvalent)

Une solution composée de 1 g de vanilline, 2 ml d'acide sulfurique et de 100 ml d'éthanol à 95% q.s.p est préparée. Après pulvérisation, la plaque de CCM est chauffée à 110°C pendant environ 5 minutes. Plusieurs colorations apparaissent en fonction du type de composés.

- **Réactif de Liebermann et Burchard** (Réactif des stérols, stéroïdes et triterpènes)

Une solution de 5 ml d'anhydride acétique, 5 ml d'acide sulfurique concentré et q.s.p. 50 ml d'éthanol à 95% est préparée à basse température et juste avant emploi. Après pulvérisation, la plaque de CCM est chauffée à 110°C pendant 10 minutes. Les composés appartenant aux familles chimiques ciblées révélés présentent une fluorescence à 366 nm.

- **Réactif au FeCl₃ alcoolique (spécifique des polyphénols)**

Cinq grammes de FeCl₃ sont solubilisés dans 100 ml d'éthanol à 95%.

Après pulvérisation avec la solution éthanolique, la plaque est observée à la lumière visible.

II-2-4-Méthode chromatographique préparative

II-2-4-1-Chromatographie sur couche mince préparative

La chromatographie sur couche mince préparative a été une méthode utilisée pour l'isolement des substances naturelles. La séparation peut être effectuée rapidement et la quantité du composé isolé peut être suffisante pour la détermination de sa structure chimique (Gibbons, 2012).

Dans notre étude, des plaques en verre d'une dimension de 20 cm x 20 cm, contenant une couche de gel de silice 150 A Whatman (Schleicher et Schuell) d'une épaisseur de 1 mm avec un indicateur de fluorescence sont utilisées. L'échantillon (40 à 50 mg) à séparer est solubilisé dans un petit volume de MeOH. La solution obtenue est ensuite déposée sur la plaque à l'aide d'un capillaire. La plaque est développée dans une cuve saturée de vapeur d'éluant et contenant un volume approprié d'un système d'éluant. La plaque est ensuite séchée à température ambiante. Les taches des constituants sont visualisées sous lumière UV 254 et 366 nm. La silice est récupérée à l'aide d'une spatule sur laquelle est fixé le produit ciblé. Cette dernière est ensuite dispersée dans une petite quantité de MeOH pendant quelques minutes pour extraire le produit de la silice, puis filtrée. Une telle opération est répétée trois à quatre fois. Après filtration et évaporation à sec du filtrat sous pression réduite, du produit isolé est obtenu.

II-2-4-2- Chromatographie d'adsorption sur colonne ouverte (CC)

(Hostettmann *et al.*, 1998)

L'adsorption est la fixation des molécules dissoutes par une phase stationnaire due à l'établissement de liaisons secondaires de surface entre l'adsorbant et la molécule adsorbée.

Principe

Une colonne en verre équipée d'un verre fritté et d'un robinet est utilisée. La colonne en position verticale est remplie d'une phase stationnaire qui est de la silice. Lorsqu'il n'y a pas de fritté de verre dans le bas de la colonne, du coton hydrophile est placé au fond de la colonne pour servir de filtre afin d'éviter les pertes de phase stationnaire. Un mélange de composés est placé en haut de la colonne. L'éluant, qui peut être un solvant unique ou un mélange de différents solvants, entre par une extrémité et sort par l'autre. Selon la nature de l'éluant et du contenu de la colonne, certaines molécules sont plus facilement éluées que d'autres et la séparation des composés du mélange est ainsi permise.

Mode opératoire

Lors des chromatographies sur colonnes ouvertes, plusieurs types de phases stationnaires peuvent être utilisés dans des colonnes en verre. Pour la chromatographie

d'adsorption, la phase stationnaire utilisée est la silice 60 (63-200 μm , Merck) en phase normale préalablement activée pendant deux heures à l'étuve à 110 °C. La taille et le diamètre de la colonne sont déterminés en fonction de la masse et du degré de pureté de l'échantillon à fractionner. La silice est mise en suspension dans le premier éluant puis coulé dans la colonne. La quantité de silice utilisée est généralement 30 à 50 fois supérieure à la quantité de l'échantillon à déposer. Le premier mélange de solvant est ensuite élué sur la colonne jusqu'à ce que la silice soit tassée et stabilisée. L'extrait à fractionner est dissout dans le premier mélange de solvants puis déposé au sommet de la colonne remplie de la phase stationnaire sous forme liquide à l'aide d'un capillaire. L'extrait à fractionner peut aussi être adsorbé sur une quantité de silice correspondant à environ 2 fois sa masse et le dépôt de l'extrait a lieu sous forme solide. Ajoutant du sable de Fontainebleau pour éviter les perturbations du dépôt de l'extrait lors de l'addition de l'éluant. L'élution des composés par différents mélanges de solvants successifs est alors réalisée en veillant à ne jamais laisser la colonne s'assécher. Les fractions sont alors récoltées dans des tubes à essai. Le suivi de l'élution des composés se fait sur CCM. Les fractions ayant les mêmes profils chromatographiques sur CCM sont rassemblées et les fractions groupées sont soumises à des tests biologiques afin de localiser les principes actifs.

II-2-5-Précipitation des proanthocyanidols

Cette méthode simple, rapide et reproductible est destinée à éliminer le maximum des tanins de l'extrait éthanolique, en particulier les tanins les plus polaires, c'est-à-dire de haut degré de polymérisation. Ces derniers sont les plus difficiles à séparer des flavonoïdes par les méthodes chromatographiques.

Principe

Cette technique permettant d'éliminer les proanthocyanidols (tanins) de l'extrait éthanolique est basée sur la propriété qu'ont les tanins d'être solubles dans le méthanol (MeOH) et insolubles dans le chloroforme CHCl_3 (Saucier *et al.*, 2001).

Mode opératoire

L'extrait est dissous dans du MeOH (8 ml de MeOH pour 300 mg d'extrait). Une quantité suffisante de CHCl_3 est ajoutée progressivement afin d'obtenir une solution à 8% de MeOH. Immédiatement, une précipitation des tanins sont observées. Le mélange est ensuite placé à 4°C pendant 4 h. Après filtration, la solution obtenue est évaporée. Le précipité est séché à l'air libre à l'abri de la lumière.

Une réaction de WILLSTÄTTER MODIFIÉE est appliquée sur le filtrat pour vérifier la présence de flavonoïdes.

III-MATERIELS ET METHODES POUR L'ETUDE BIOLOGIQUE

III-1-MATERIELS

- Solvant de dissolution des extraits à tester : eau distillée, diméthylsulfoxyde DMSO/H₂O (V/V) ;
- Microplaques stériles à 96 puits à fond plat et à fond rond avec couvercle ;
- Instruments de mesure : balance KERN 600 mg, balance SARTORUIS 120 g ;
- Appareils : vortex marque HEIDOLPH, agitateur magnétique ;
- Etuve de culture microbiologique MEMMERT 2000 W, 35°C ;
- Bec bunsen ;
- Photomètre de lecture de microplaque marque DYNEX TECHNOLOGIE ;
- Verreries : tube à essai, bécher, flacon d'Erlen meyer, pipettes, seringue pour filtration ;
- Filtres Millipore 0,45 µm.
- Les tests sont réalisés avec une souche répertoriée de *Candida albicans* provenant de l'American Type Culture Collection ATCC 10231 conservé sur un milieu dénommé SSGG (Annexe 3) contenant pour un volume final de 1 litre, 10 g de peptone bactériologique, 5 g de glucose et 0,15 g d'acide glutamique et 17 g d'agar bactériologique. Le SSGG est en fait un milieu de Sabouraud modifié par une méthode dite de « carbon starvation » pour induire la transition vers la morphologie hyphale. (Brown *et al.*, 2002). Par ailleurs, il est utilisé aussi pour le contrôle sur boîte de Pétri de la pureté du germe test.
- L'essai proprement dit est effectué dans un milieu de culture liquide de Sabouraud (Annexe 2) appauvri en glucose et comportant une source secondaire de carbone, dénommé SLGG (Annexe 3) et contenant pour un volume final de 1 litre, 10 g de peptone bactériologique, 5 g de glucose et 0,15 g d'acide glutamique.

III-2- METHODE D'EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE

Principe

La méthode de microdilution en milieu liquide est utilisée pour étudier l'activité antifongique des extraits et des composés purs. Elle s'est inspirée du protocole de référence décrit par le Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) et portant la référence M27-A3 (Rex *et al.*, 2008). Cette méthode est plus sensible que celle de la diffusion sur milieu solide utilisant un disque de cellulose (Scorzoni *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'appréciation de la croissance du germe-test se fait par spectrophotométrie (Kirk *et al.*, 1998 ; Do *et al.*, 2002).

La technique consiste à faire croître dans les puits d'une microplaque une quantité connue du germe-test dans un milieu de culture liquide et en présence d'une série de concentrations du produit à tester. Un témoin sans produit est préparé. La croissance des germes se traduit par la turbidité du milieu qui peut être mesuré à la longueur d'ondes 525 nm.

Chaque test est réalisé en triple pour permettre le traitement statistique des résultats.

Mode opératoire

- Préparation des matériels à utiliser

Avant toute manipulation, tous les matériels doivent être stérilisés à l'autoclave de marque Sano clav, type LaM-4-20-MCS-J, capacité 20 l, pendant environ 2 h, pour éviter les contaminations. Chaque manipulation est effectuée autour de la flamme d'un bec Bunsen.

- Préparation de l'inoculum

L'inoculum est le germe à tester qui est introduit dans le milieu d'essai.

Le germe-test est d'abord isolé sur le milieu solide SSGG (Annexe 3). Cinq colonies bien isolées sont prélevées et transférées dans 20 ml de milieu SLGG (Annexe 3), et la suspension est mise à incuber à 35°C pendant 48 h.

Avant l'utilisation, la préculture est préalablement diluée à 10^{-1} . Chaque inoculum utilisé pour effectuer le test est préparé de la même manière pour standardiser la taille.

- Préparation de l'extrait à tester

Pour préparer la solution-mère notée SM, 5 mg de l'extrait à tester sont solubilisés dans 1 ml du mélange DMSO/H₂O (V/V). L'ensemble est agité au vortex puis stérilisé par filtration sur un filtre Millipore ayant un diamètre de pore de 0,45 µm.

- Remplissage et ensemencement des puits de la microplaque

La microplaque est composée de 96 puits, disposés sur 12 colonnes numérotées de 1 à 12 et 8 lignes notées de A à H.

- Les puits de la colonne 1 sont laissés vides (blanc pour le spectrophotomètre)
- La solution SM d'un extrait E1 est déposée dans les puits des lignes A, B, C et D sous un volume de 20 µl ;
- L'extrait est dilué de moitié en passant d'une colonne à une autre. Ainsi les puits de la colonne 2 et de la ligne A, B, C et D contiennent chacun 20 µl de l'extrait E1. Les puits de la colonne 3 et de la ligne A, B, C et D contiennent chacun 20 µl de l'extrait E1 dilué de moitié. Une dilution de moitié en cascade de SM est ainsi réalisée jusqu'à la colonne 11 ;

Matériels et méthodes

- Les puits des lignes E, F, G et H sont remplis de la même manière pour le test d'un autre extrait E2 ;
- Les puits de la colonne 12 recevront uniquement 20 µl du solvant de dilution de l'extrait ;
- Après une nuit de séchage de la plaque à l'étuve à 35°C, 100 µl de l'inoculum sont ajoutés dans chaque puits de la ligne A, B, C et E, F, G en partant de la colonne 2 vers la colonne 12. 100 µl de milieu de culture non ensemencé sont ajoutés dans chaque puits de la ligne D et H de la colonne 2 à 12.
- La culture ainsi préparée est mise en incubation à 35°C pendant 48 h.

Le remplissage des puits pour la technique de microdilution est rapporté dans le tableau 2.

Tableau 2 : Remplissage des puits pour la technique de microdilution

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

Légende : E1 : Extrait 1/I : inoculum/MNE : milieu non ensemencé/E2 : Extrait 2

Traitement des résultats (calcul de la CMI) :

La concentration minimale inhibitrice ou CMI est la plus petite concentration d'extrait capable de provoquer 100% d'inhibition du développement du germe-test dans le milieu.

Les densités optiques (DO) des turbidités des puits sont mesurées à l'aide d'un lecteur de microplaque. Chaque valeur de DO obtenue en triple est comparée à celle du témoin de culture.

La CMI est déterminée par la comparaison de la DO dans chaque milieu d'essai à celle du témoin de culture en utilisant le test de Student appliqué au faible effectif.

III-3-EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIPLASMODIALE

(Bennett *et al.*, 2004)

Principe

La souche de *Plasmodium falciparum* FCM29 utilisée est mise en contact avec des concentrations différentes d'extrait dans des puits d'une microplaque de 96 puits. La croissance intra-érythrocytaire du parasite est suivie en utilisant une sonde fluorescente, Sybr-Green I, spécifique à l'ADN double brin. La fluorescence émise par le complexe ADN-Sybr-Green I formé est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque à fluorescence (Flx 800, Biotek). Cette fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN.

Mode opératoire

La souche *Plasmodium falciparum* FCM29 maintenue en culture continue par la méthode de Trager et Jensen (1976) est utilisée.

Avant le test, la parasitémie est estimée par comptage visuel au microscope à partir d'un frottis sanguin, coloré au Diff-quick. Une dilution de la culture avec des hématies saines a été réalisée pour avoir un inoculum avec 1% de parasitémie et 2% d'hématocrite.

III-3-1-Préparation des extraits

Les fractions à tester sont dissoutes dans un premier temps dans 20 µl de DMSO, ensuite l'ICM (Incomplet media) est ajouté dans les préparations afin d'obtenir des solutions mères de concentration égale à 1 mg/ml. A partir des solutions mères, une dilution en cascade (coefficient de dilution = 1/2) avec l'ICM est réalisée (de 50 µg/ml à 0,39 µg/ml) puits par puits dans une microplaque de 96 puits.

III-3-2-Test

L'ICM (50 µl) est distribué dans les microplaques à 96 puits. Chaque extrait à tester (50 µl) est ensuite réparti dans chaque puits et 100 µl d'inoculum enrichi de 20% de sérum humain O⁺ y sont versés. Chaque test est effectué en triple.

Des antipaludiques de référence (la N quinine, la quinine et la chloroquine), un témoin positif et un témoin négatif ont été utilisés

- Témoin positif : 100 µl d'hématies saines additionnés de 100 µl d'inoculum (croissance des parasites).

- Témoin négatif : 200 µl d'hématies saines (pas de croissance des parasites).

Toutes les microplaques sont incubées à 37°C dans un incubateur contenant une cloche à bougie pendant 72 h.

Pour la lecture, une solution de Sybr-Green I est préparée en ajoutant dans 900 µl de DMSO 100 µl de Sybr-Green I. 50 µl de cette préparation sont ajoutés dans chaque puits. Après 1 heure d'incubation, la fluorescence émise par le complexe ADN-Sybr-Green I est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque à fluorescence (Flx 800, Biotek).

L'IC₅₀ (concentration d'extrait qui inhibe 50% de croissance des parasites) est calculée à partir de l'équation de la courbe obtenue en représentant les pourcentages d'inhibition de la croissance parasitaire en fonction des concentrations de l'extrait. Elle est dite active et intéressante si la valeur trouvée est inférieure à 20 µg/ml. Si cette valeur est supérieure à 20 µg/ml, elle est active mais pas intéressante. Celui-ci est non active si aucune valeur n'est trouvée. La chloroquine ayant une IC₅₀ égale à 0,0055 µg/ml est utilisée ici comme référence.

III-4-TEST DE TOXICITE AIGUE

La détermination de la toxicité aiguë est la première étape de toute étude pharmacodynamique ou programme de criblage des principes toxiques.

Principe

Le test de toxicité aiguë consiste à évaluer une substance chimique capable de tuer des animaux avec des quantités de plus en plus élevées sur une période donnée, s'effectuant d'une seule administration à forte dose du composé à tester. Il a pour objectif de déterminer les doses létales du produit sur souris dans 24 h. Cette méthode permet de déterminer :

- La dose létale 0 ou DL₀ : la plus grande dose qui n'entraîne pas d'effet ;
- La dose létale 50 ou DL₅₀ : la dose qui tue 50% des animaux ;
- La dose létale 100 ou DL₁₀₀ : correspondant à la plus petite dose qui tue 100% des animaux

Mode opératoire

III-4-1-Préparation des souris : quarante cinq souris femelles de race « SWISS » ont été utilisées, puis distribuées en 9 lots de 5 souris chacun. Chaque souris est marquée et pesée (environ 30 g).

III-4-2-Solutions des extraits à tester : un premier test a été préalablement effectué sur un effectif réduit de souris en tenant compte de la solubilité de l'extrait à tester, pour détecter l'intervalle de concentrations qui conviendrait. La différence fixée entre deux doses successives est de 50 mg/kg. Les solutions des extraits à tester sont de différentes doses : 450 mg/kg ; 400 mg/kg ; 350 mg/kg ; 300 mg/kg ; 250 mg/kg ; 200 mg/kg ; 150 mg/kg ; 100 mg/kg et 50 mg/kg.

III-4-3-Méthodes pour la détermination de la dose létale : deux méthodes sont choisies pour le test :

Matériels et méthodes

- la méthode algébrique de Behrens et Karber (Gilles, 1974) ;
- la méthode graphique de Reed et Muench (Aubert, 1982).
- Méthode de Behrens et Karber

La dose administrée étant exprimée en mg/kg de masse corporelle et le nombre de morts est croissant.

La DL_{50} est obtenue par la formule :

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

a : différence entre deux doses successives

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

m : nombre d'animaux utilisés par expérience

Cette méthode de calcul n'est applicable que :

a) si le nombre de mort est croissant au fur et à mesure que la dose en mg/kg ;

b) s'il y a au minimum 3 lots d'animaux :

- un lot correspondant à la plus forte dose DL_0 ne provoquant aucune mortalité ;
- un lot correspondant à la plus petite dose DL_{100} à laquelle tous les animaux ont succombés ;
- un lot intermédiaire entre les deux.

- Méthode de Reed et Muench

C'est une méthode graphique et la DL_{50} est déterminée par l'intersection de deux courbes de :

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

La classe de toxicité d'un produit, effectuée sur souris par voie orale ou gavage est donné par le tableau 3.

Tableau 3: Classe de toxicité (Hodge et Sterner, 1943).

<i>Classes de toxicité : Échelle de Hodge et Sterner</i>	
DL_{50}	Indice de toxicité
Jusqu'à 1 mg/kg	1 = extrêmement toxique
De 1 à 50 mg/kg	2 = hautement toxique
De 50 à 500 mg/kg	3 = modérément toxique
De 500 à 5 000 mg/kg	4 = légèrement toxique
De 5 000 à 15 000 mg/kg	5 = presque pas toxique
Plus de 15 000 mg/kg	6 = relativement inoffensif

3^{ème} Partie :

Résultats et Discussion

I-CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE

Dans cette optique, un criblage phytochimique est mené sur l'extrait éthanolique d'*Abrahamia deflexa*. Les résultats des différentes réactions de détection sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Résultats du criblage phytochimique de l'extrait éthanolique d'*Abrahamia deflexa*.

Principes actifs		Réaction de caractérisation	Observations
Alcaloïdes		Kr, I ₂ , HgCl ₂ , Bi(NO ₃) ₃	-
Anthraquinones			+
Iridoïdes		HCl dilué	-
Flavonoïdes	Flavone	HCl concentré, tournure de magnésium, alcool isoamylique	+
	Flavonol	HCl concentré, tournure de magnésium, alcool isoamylique	+
Leucoanthocyanes		HCl concentré	+
Saponosides		Eau distillée	-
Stéroïdes et triterpènes	Stérol insaturée	H ₂ SO ₄ concentré	+
	Triterpène	Anhydride acétique (H ₂ SO ₄) concentré	+
	Stéroïdes	Anhydride acétique concentré	+
Tanins et polyphénols	Tanin	Gélatine salée 1% (gélatine 1%+NaCl 10%)	+
	Polyphénol	Gélatine à 1%	+
	Pyrogallol		+
Coumarine			-

(+): présence ; (-): absence

Le criblage phytochimique révèle la présence dans l'extrait de classes de métabolites secondaires de différentes polarités : anthraquinones, flavonoïdes du type flavone et flavonol, leucoanthocyanes, stéroïdes et stérol insaturé, tanins du type pyrogallique et polyphénols.

II-EXTRACTION

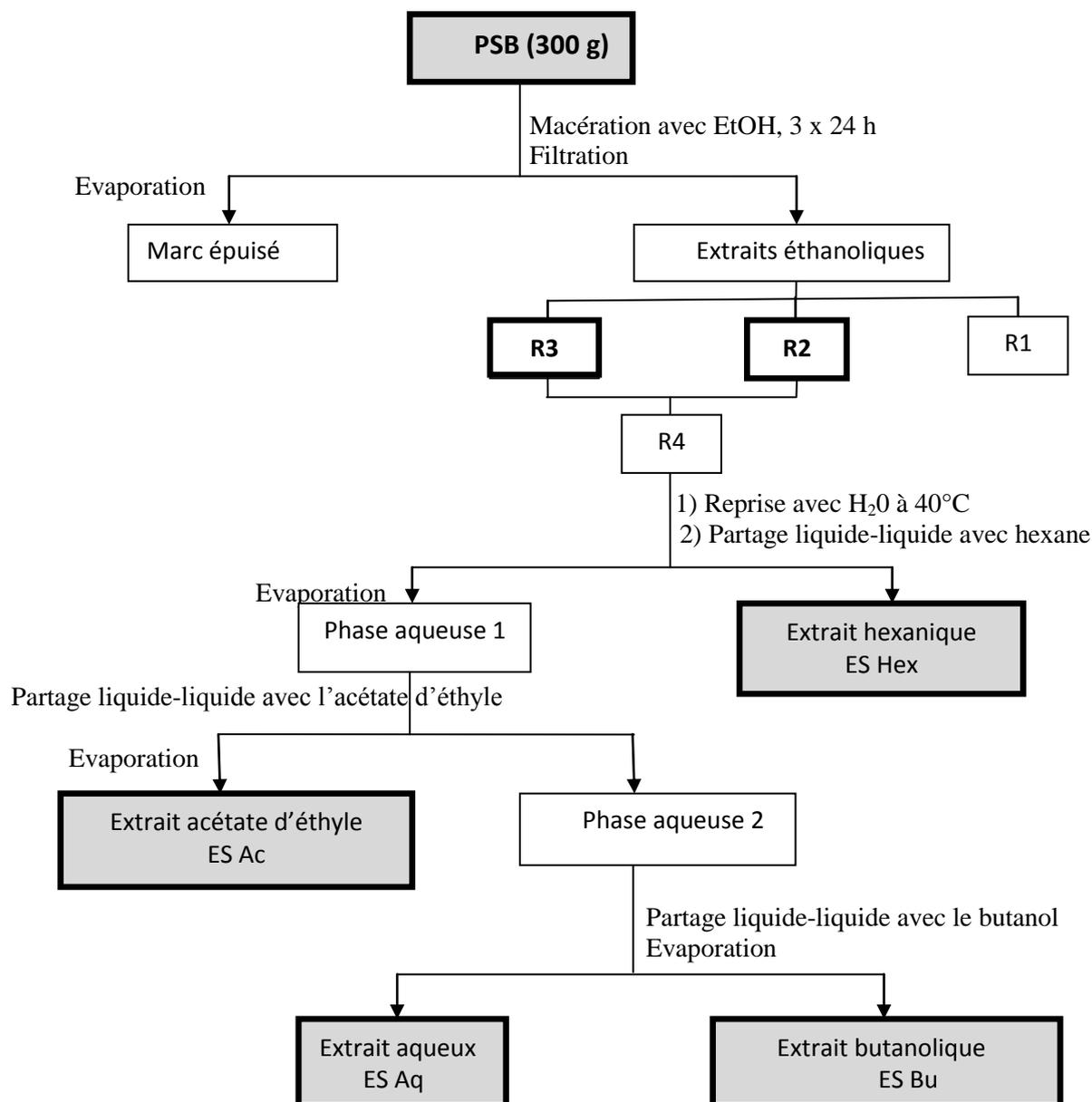


Figure 6 : Schéma d'extraction de la plante étudiée

Trois cent grammes de poudre de rameaux feuillés d'*Abrahamia deflexa* ont été extraites par macération successive à température ambiante dans l'éthanol pendant 24 h ; chaque fois conduisant à l'obtention de trois extraits éthanoliques notés respectivement R1, R2 et R3. Avant de procéder aux tests d'activité des trois extraits obtenus, un test d'activité antifongique d'une substance prise comme référence a été effectué, le fluconazole, un antifongique indiqué surtout dans le traitement de candidoses vaginales et périnéales aiguës et récidivantes. Il s'agit d'un antimycosique bistriazolé à usage systémique.

L'objectif est de valider le protocole expérimental et standardiser la taille de la suspension de germe-test utilisée à chaque essai.

Résultats et discussion

L'évaluation de l'activité antifongique du fluconazole contre *Candida albicans* par la méthode de microdilution en milieu liquide a conduit à une valeur de la CMI inférieure à 1,16 µg/mL (Annexe 4).

R1, R2 et R3 sont ensuite soumis à des tests préliminaires *in vitro* sur *Candida albicans* et *P. falciparum*. Les résultats sont présentés dans le tableau 5 ci-après et leur traitement est détaillé respectivement dans les annexes 5 et 6.

Tableau 5 : Résultats des tests *in vitro* sur *C. albicans* et *P. falciparum* des extraits éthanoliques

Extrait	Masse (g)	CMI (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	Rendement (%)
R1	14,8816	125	8,22	4,96
R2	7,5341	1000	13,27	2,64
R3	2,4103	1000	6,55	0,87

Une fraction (ou un produit) est dite active contre *P. falciparum* et *C. albicans* si sa concentration inhibitrice de 50% des parasites *in vitro* (IC₅₀) et sa concentration minimale inhibitrice (CMI) sont inférieures à 20 µg/ml.

L'extrait R1 présente une activité antifongique modérée (CMI = 125 µg/ml) et une activité antiplasmodiale intéressante (IC₅₀ = 8,22 µg/ml). Les extraits R2 et R3 sont dotés d'une activité antifongique faible (CMI = 1000 µg/ml) par contre ils sont actifs contre *P. falciparum* et l'activité antiplasmodiale de R3 est intéressante (IC₅₀ = 6,55 µg/ml).

Les extraits R2 et R3, peu de coloration chlorophyllienne, sont ensuite dissous dans de l'eau chaude et rassemblés donnant ainsi l'extrait R4 qui subit une extraction liquide-liquide par des solvants de polarité croissante : hexane, acétate d'éthyle et butanol donnant respectivement quatre extraits codés ES Hex, ES Ac, ES Bu et ES Aq. Ces extraits sont ensuite évalués *in vitro* sur *C. albicans* et *P. falciparum*. Les résultats sont consignés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Résultats des tests *in vitro* sur *C. albicans* et *P. falciparum* des extraits obtenus à partir du partage liquide-liquide

Extrait	Masse (g)	CMI (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	Rendement (%)
ES Hex	4,7569	< 2	14,11	77
ES Ac	1,7555	500	2,75	76,27
ES Bu	0,7425	< 2	15,82	57,28
ES Aq	1,5288	< 2	2,86	15,37

L'extrait hexanique ES Hex apolaire ou peu polaire est très actif contre *C. albicans* (CMI < 2 µg/ml) et dotée d'une activité antiplasmodiale intéressante sur *P. falciparum* (IC₅₀ = 14,11 µg/ml).

L'extrait à l'acétate d'éthyle ES Ac contenant les composés moyennement polaires présente une activité faible sur *C. albicans* (CMI = 500 µg/ml). Par contre il présente une activité antiplasmodiale forte (IC₅₀= 2,75 µg/ml).

L'extrait butanolique ES Bu polaire inhibe la croissance des deux germes-tests et ses activités biologiques sont presque identiques à celles de l'extrait ES Hex.

La phase aqueuse épuisée ES Aq, très polaire est dotée d'une activité antifongique importante sur *C. albicans* (CMI <2 µg/ml) et d'une activité antiplasmodiale notoire contre *P. falciparum* (IC₅₀= 2,86 µg/ml).

Au vu de ces résultats, les quatre extraits sont actifs *in vitro* sur les deux germes-tests et les composés actifs seraient de différentes polarités.

III-FRACTIONNEMENT BIOGUIDE

L'objectif de cette étude est de rechercher les composés biologiquement actifs. Dans le cadre de ce travail, les extraits obtenus sont soumis à un processus de fractionnement bioguidé. Les fractions présentant des profils chromatographiques identiques sur CCM sont réunies et sont ensuite testées *in vitro* sur *C. albicans* et *P. falciparum*. Les fractions qui se révèlent actives sont ensuite purifiées.

III-1-FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT HEXANIQUE ES Hex

L'extrait hexanique actif contre *C. albicans* et *P. falciparum* a subi une chromatographie sur colonne ouverte de silice normale utilisant un gradient d'éluant (voir figure 7 page 35).

Afin de localiser les principes actifs, l'activité de ces fractions est ensuite évaluée *in vitro* sur *C. albicans* et *P. falciparum* et les résultats sont résumés dans le tableau 7 page 35.

Les fractions H1 à H6 montrent une activité antifongique forte (CMI < 2 µg/ml) mais elles sont inactives sur *P. falciparum*. Disant qu'elles ont des composés en commun responsables de l'activité antifongique.

H7 et H8 possèdent une activité antifongique faible. Par contre elles sont actives sur *P. falciparum* et l'activité est nettement meilleure pour H8 (IC₅₀<0,39 µg/ml) en se référant à celle de H7 (IC₅₀= 17,72 µg/ml). Ces résultats conduisent à supposer que ces fractions ont des composés responsables de l'activité antiplasmodiale en commun et leur concentration est très importante dans la fraction H8.

Les fractions H9 et H10 sont très actives contre *C. albicans* avec une CMI< 2 µg/ml mais inactives sur *P. falciparum*.

Résultats et discussion

La fraction H11 présente une activité antifongique intéressante (CMI = 8 µg/ml) et une activité antiplasmodiale modérée (IC₅₀ = 15,75 µg/ml). Des molécules antifongiques et antiplasmodiales de faible concentration sont localisées dans ces trois fractions.

Les fractions H8, H14 à H16 sont dotées d'une activité antifongique faible mais présentent une activité antiplasmodiale intéressante surtout pour les fractions H8 et H14 (IC₅₀ < 0,39 µg/ml).

H17 et H18 montrent une activité antifongique forte sur *C. albicans* (CMI = 8 µg/ml). Elles ont des activités antiplasmodiales très différentes indiquant une différence flagrante de concentration des principes antiplasmodiaux dans les deux fractions H17 (IC₅₀ = 7,2 µg/ml) et H18 (IC₅₀ = 23,12 µg/ml) ou bien les molécules actives sont de structures différentes.

La fraction H19 est dotée d'une activité antiplasmodiale notoire (IC₅₀ = 1,51 µg/ml) mais son activité antifongique est modérée (CMI = 125 µg/ml) pourtant H18 et H19 sont deux fractions consécutives.

La fraction H20 possède à la fois une activité antifongique et antiplasmodiale forte. Elle pourrait contenir des composés à la fois actifs sur les deux germes-tests.

Tableau 7 : Résultats des tests d'activités biologiques *in vitro* sur *C. albicans* et *P. falciparum* des fractions issues du fractionnement de ES Hex

Fraction	Masse (mg)	CMI (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)
H1	182	< 2	NA
H2	119	< 2	NA
H3	238,4	< 2	NA
H4	34,6	< 2	40,82
H5	15,2	< 2	NA
H6	27,3	4	NA
H7	100,6	500	17,72
H8	82,4	250	< 0,39
H9	16,5	< 2	NA
H10	16,2	< 2	NA
H11	21,9	8	15,75
H12	38,8	500	NA
H13	76,6	< 2	49,57
H14	56,3	500	< 0,39
H15	33,2	> 1000	9,96
H16	106,3	250	11,13
H17	124,4	8	7,2
H18	130,4	8	23,12
H19	69,7	125	1,51
H20	56,1	< 2	3,97

NA : non actif

Le fractionnement de l'extrait hexanique a permis de repérer :

- les fractions qui contiennent des composés potentiellement actifs spécifiquement sur *C. albicans* (H1 à H6 et H9 à H10) ;
- les fractions constituées de molécules fortement actives à la fois sur les deux germes-tests (H17 et H20) ;
- les fractions ayant une activité antifongique modérée mais dotées d'une activité antiplasmodiale notoire (H8, H14 et H19).

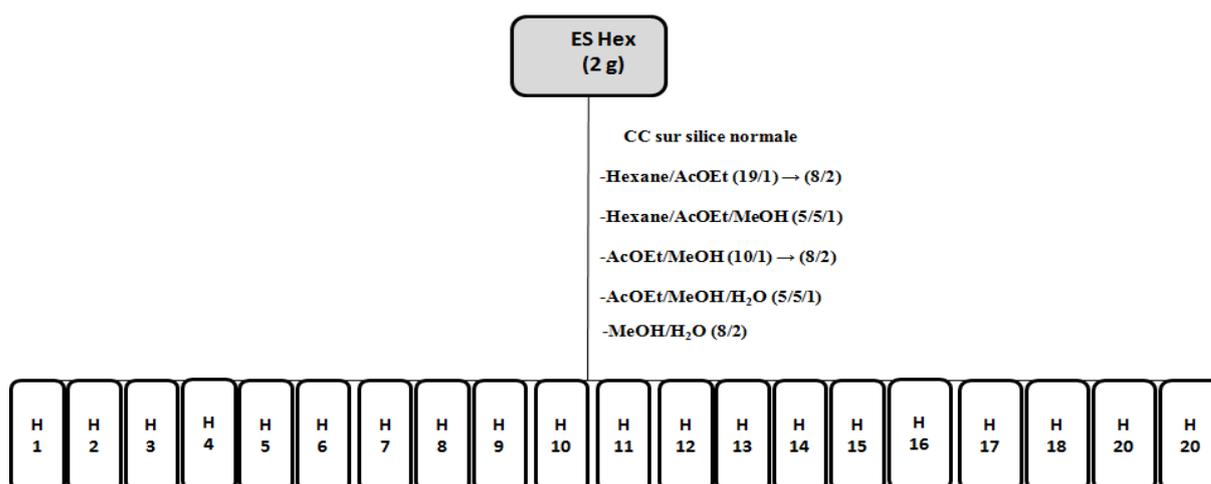


Figure 7 : Schéma de fractionnement de l'extrait hexanique

III-2-FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT ACETATE D'ETHYLE ES Ac

L'extrait acétate d'éthyle ES Ac, très actif sur *P. falciparum* ($IC_{50} = 2,75 \mu\text{g/ml}$) mais présentant une activité antifongique modérée sur *C. albicans* ($CMI = 500 \mu\text{g/ml}$) a subi une chromatographie sur colonne de silice normale, éluée successivement par un mélange Hex/AcOEt (de 50% Hex à 90% AcOEt) puis AcOEt/MeOH (de 90% AcOEt à 90% MeOH), enfin AcOEt/MeOH/H₂O (6/4/1) en mode isocratique. Vingt-deux fractions sont obtenues.

Chacune des fractions est évaluée *in vitro* sur *C. albicans* et sur *P. falciparum*. Les résultats sont résumés dans le tableau 8 page 37.

Les fractions A11 à A16 montrent une activité antifongique intéressante ($CMI < 8 \mu\text{g/ml}$) et une activité antiplasmodiale modérée sauf celle de la fraction A15 qui peut être qualifiée de forte ($IC_{50} = 4,96 \mu\text{g/ml}$).

Les fractions A3 et A4 possèdent une activité antifongique forte. Elles sont inactives sur *P. falciparum* et leur quantité est faible.

Résultats et discussion

Tableau 8 : Résultats des tests *in vitro* sur *C. albicans* et *P. falciparum* des fractions issues du fractionnement de ES Ac

Fraction	Masse (mg)	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
A1	3,8	500	NT
A2	13,4	125	NT
A3	23,7	4	NA
A4	64,9	< 2	33,91
A5	48,8	500	NA
A6	30	8	NT
A7	16	4	NT
A8	124,3	500	5,68
A9	43	16	NT
A10	92,4	125	NT
A11	38	< 2	9,04
A12	34,3	< 2	11,04
A13	109,8	< 2	24,29
A14	29,6	< 2	8,12
A15	64,7	8	4,96
A16	65,5	4	15,1
A17	12,2	NT	0,57
A18	40,3	NT	NT
A19	9,6	NT	NT
A20	23,7	NT	NT
A21	13,1	NT	NT
A22	16	NT	NT

NT : non testé

III-2-1-Purification de la fraction A8

La fraction A8, présentant une activité antiplasmodiale importante (IC₅₀= 5,68 $\mu\text{g/ml}$) et disponible en quantité suffisante (m = 124,3 mg), a été soumise à une chromatographie sur couche mince préparative de silice normale éluée avec le mélange AcOEt/MeOH/H₂O (100/13,5/10). Observée sous lumière UV 254 nm et 366 nm, cinq produits sont obtenus. Chacune des sous fractions est testée *in vitro* contre *P. falciparum* et les résultats sont consignés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Résultats des tests *in vitro* sur *P. falciparum* des sous fractions issues de A8

Sous fraction	Masse (mg)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
A81	4,6	NA
A82	4,8	41,82
A83	5,5	29,33
A84	10,6	31,96
A85	10,2	2,82

La sous fraction A85 montre une activité antiplasmodiale notoire tandis que les autres sous fractions sont inactives. Des principes antiplasmodiaux ayant une synergie d'action ou une molécule active à très forte concentration sont localisés dans la sous fraction A85.

III-2-2-Purification de la fraction A9

La fraction A9, possédant une activité antifongique intéressante (CMI = 16 µg/ml) et disponible en quantité faible (m = 40 mg), a subi une CCM préparative de silice éluée avec le mélange de solvants Hex/AcOEt/MeOH (5/5/1). Une telle opération a fourni, après observation sous lumière UV 254 nm et 366 nm, cinq sous fractions notées A91 à A95. La sous fraction A91 se présente sous forme monotache sous lumière UV à 254 nm.

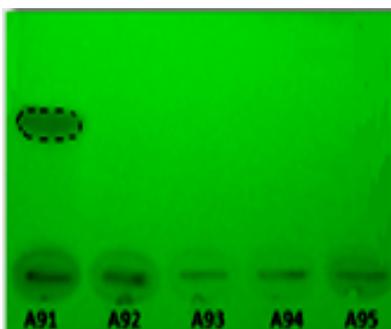


Figure 8 : CCM des sous fractions issues de A9 observée sous UV à 254 nm

Eluant : Hex/AcOEt/MeOH (5/5/1)

Tableau 10 : Résultats des tests d'activité antiplasmodiale des sous fractions issues de A9

Sous fraction	Masse (mg)	IC ₅₀ (µg/ml)
A91	6,3	24,62
A92	4	NA
A93	5,2	NA
A94	4,9	NA
A95	6,5	22,84

Les résultats des tests *in vitro* d'activité antiplasmodiale sur *P.falciparum* résumés dans le tableau 10 page 38 révèlent que les cinq sous fractions sont inactives.

III-2-3-Purification de la fraction A10

La fraction A10 montre une activité antifongique encourageante (CMI = 125 µg/ml) mais n'a pas été évaluée *in vitro* contre *P.falciparum*. Elle a subi une chromatographie préparative sur une couche de silice de 2 mm d'épaisseur (Merck 60 F₂₅₄) sur une plaque de verre. L'échantillon a été solubilisé dans du chloroforme puis déposé sur la couche de silice à l'aide d'un capillaire. La plaque a été développée dans une cuve saturée de vapeur de solvant contenant le mélange Hex/AcOEt/MeOH (10/15/2). Après révélation sous UV 254 nm

Résultats et discussion

et 366 nm quatre sous fractions codées A101 à A104 ont été obtenues. Elles sont testées *in vitro* sur *P. falciparum* et les résultats sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Résultats des tests d'activité antiplasmodiale des sous fractions issues de A10

Sous fraction	Masse (mg)	IC ₅₀ (µg/ml)
A101	16,1	2,42
A102	13,6	3,67
A103	4,9	46,23
A104	5,9	NA

Les sous fractions A101 et A102 montrent chacune une activité antiplasmodiale forte contre *P. falciparum*. Observée sous lumière UV à 254 nm, la plaque CCM de la sous fraction A101 présente deux taches d'intensité apparemment identique sur CCM.

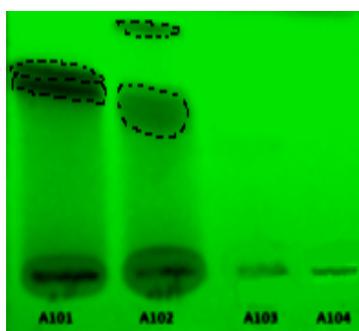


Figure 9 : CCM des quatre sous fractions issues de A10 observée sous UV à 254 nm

Au vu du profil chromatographique des deux sous fractions A101 et A102, elles contiennent apparemment un composé en commun.

Le schéma de fractionnement est présenté sur la figure 10.

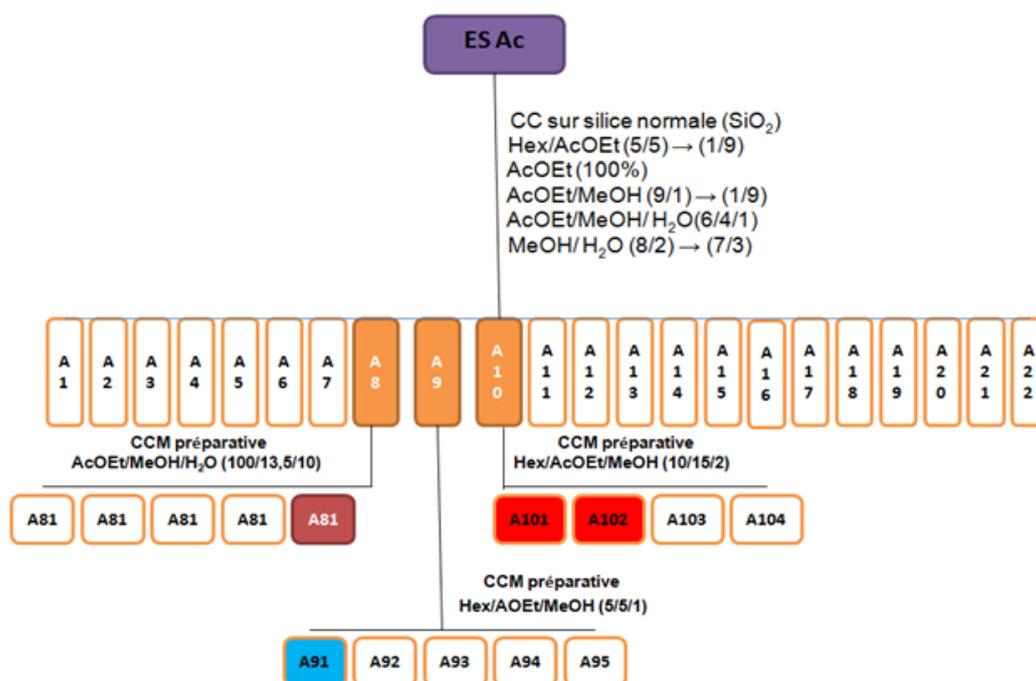


Figure 10 : Fractionnement de l'extrait ES Ac et purification de A8, A9 et A10.

III-3-PRECIPITATION DES PROANTHOCYANIDOLS

Les tests phytochimiques effectués sur l'extrait butanolique ES Bu ont révélé la présence des flavonoïdes et des tanins. Afin de faciliter le fractionnement et de réduire les réactions d'adsorption irréversibles des tanins les plus polaires au cours d'un fractionnement sur colonne ouverte de silice normale (Biabiany, 2011), une méthode simple et rapide a permis d'éliminer les proanthocyanidols de l'extrait butanolique.

La détanification par précipitation des tanins permet d'enrichir en flavonoïdes la solution obtenue, après filtration. La figure 11 résume cette précipitation.

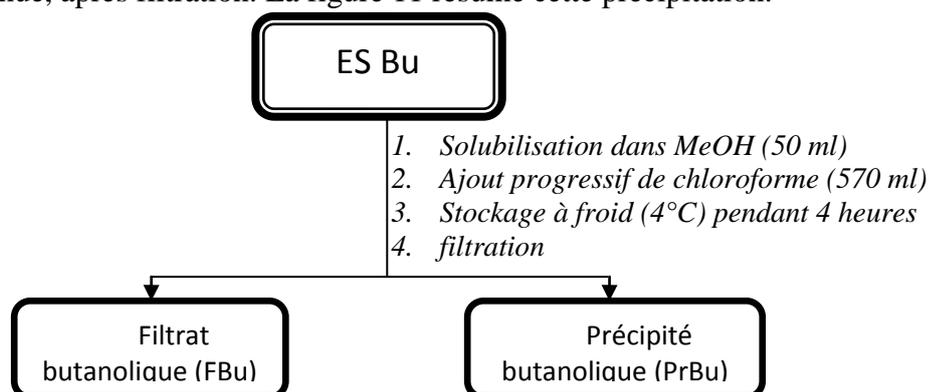


Figure 11 : Elimination des tanins par précipitation de l'extrait butanolique ES Bu

Le précipité est obtenu avec un rendement de 8,35%. Le filtrat et le précipité issus de la détanification ont été soumis à des tests d'activité antifongique et antiplasmodiale. Les résultats sont résumés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Précipitation de ES Bu et résultats des tests *in vitro* sur *C. albicans* et *P.falciparum*

Extrait	Masse (g)	CMI (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)
ES Bu	1,70	< 2	15,82
F Bu	1,118	125	4,39
Pr Bu	0,1419	16	6,84

La détanification a conduit à l'obtention d'un précipité et d'un filtrat très actifs contre *P. falciparum* par rapport à l'extrait de départ. La précipitation des tanins a amélioré l'activité antiplasmodiale des deux extraits, ce qui n'est pas le cas de l'activité antifongique.

III-4-FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT BUTANOLIQUE F Bu

Le filtrat F Bu a subi un fractionnement par chromatographie d'adsorption sur colonne ouverte de silice normale élué avec le mélange de solvant Hex/AcOEt/MeOH/H₂O en proportion variée suivant un gradient d'éluant.

Après un suivi sur CCM, 15 fractions notées B1 à B15 sont obtenues. Certaines d'entre elles sont soumises à des tests *in vitro* d'activité antifongique et antiplasmodiale. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 13 page 40.

Résultats et discussion

La fraction B4 présente une activité intéressante sur les deux germes-tests tandis que la fraction B6 montre une activité forte spécifiquement sur *C. albicans*.

Les fractions B9 à B12, disponibles chacune en petite quantité, possèdent une activité antiplasmodiale modérée.

Les fractions B12 à B15 présentent des activités antiplasmodiale et antifongique notoires avec une IC₅₀ comprise entre 0,94 µg/ml et 3,56 µg/ml et une CMI < 2 µg/ml. L'activité antiplasmodiale augmente en fonction de la polarité. Des principes antiplasmodiaux et/ou antifongiques sont localisés dans ces quatre fractions.

La lecture des résultats des tests biologiques amène à supposer que les molécules actives sur *P. falciparum* sont de différentes polarités et la concentration en principes antiplasmodiaux augmente en fonction de la polarité.

Tableau 13 : Résultats des tests *in vitro* contre *C. albicans* et *P. falciparum* des fractions issues du fractionnement de F Bu

Fraction	Masse (mg)	CMI (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)
B1	98,7	250	47,64
B2	57,6	NT	12,01
B3	32,2	NT	7
B4	97,9	<2	7,23
B5	215,3	31,3	28,74
B6	176,6	<2	49,6
B7	92,6	NT	NA
B8	48,6	NT	NA
B9	37,5	NT	7,10
B10	21,8	NT	12,09
B11	55,2	NT	8,53
B12	18,8	< 2	6,20
B13	21,4	4	3,56
B14	11,8	< 2	1,02
B15	19,2	< 2	0,94

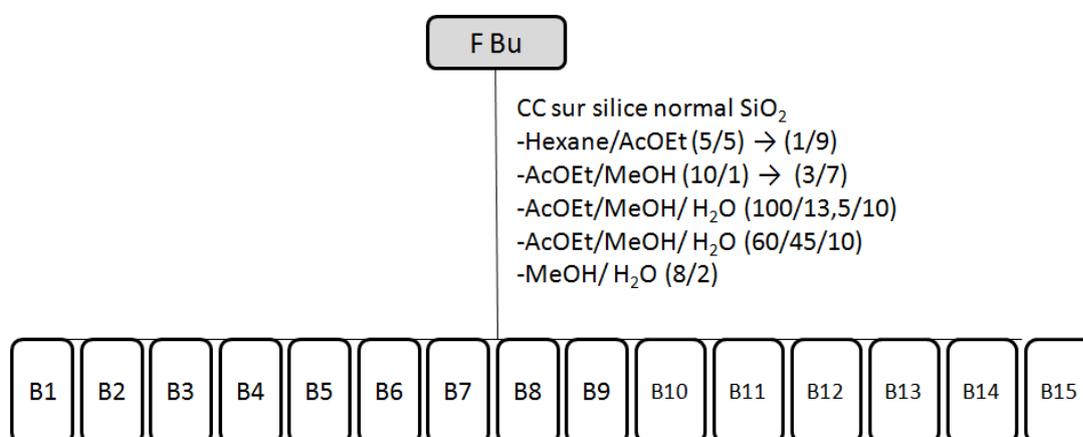


Figure 12 : Le schéma de fractionnement du filtrat butanolique F Bu

Parmi les autres espèces appartenant à la famille des Anacardiaceae déjà étudiées au CNARP, les extraits ou les produits issus des rameaux feuillés d'*Abrahamia deflexa* (les valeurs des CMI varient de inférieure à 2 à 1000 µg/ml), d'*Abrahamia thouvenotii* (Lahadson, 2016) et celle de *Sclerocarya birrea* (Ratsimbazafy, 2018), ayant chacune une CMI inférieure à 1 à 500 µg/ml, présentent des activités antifongiques intéressantes et leurs activités sont presque semblables.

Par comparaison aux autres familles, ces trois espèces sont très toxiques par rapport aux Piperaceae sp, Rubiaceae sp, Clusiaceae sp, Fabaceae sp et Lauraceae sp (Scorzoni *et al.*, 2007).

Par ailleurs, *Abrahamia deflexa* est dotée du pouvoir antiplasmodial intéressant (les valeurs des IC₅₀ varient de inférieure à 0,39 à 17,72 µg/ml). Son activité est presque identique à ceux de *Cryptocarya dealbata baker* et *Cryptocarya rigidifolia van der werff* (IC₅₀ varié de 0,39 à 24,76 µg/ml), (Randriamialinoro, 2016). Mais elles sont très toxique par rapport aux variétés de *Piper hostmannianum* Guyanaises (Portet, 2007).

IV-TEST DE TOXICITE AIGUE DE L'EXTRAIT ES Ac

Le test de toxicité aiguë consiste à évaluer la mortalité provoquée par l'administration en une seule fois de doses croissantes de l'extrait brut codé ES Ac à des lots de souris « SWISS ». Chaque animal d'un même lot reçoit une dose identique.

Un test préliminaire de toxicité aiguë effectué avec les extraits R1, ES Hex, ES Ac, ES Bu et ES Aq à la dose de 250 mg/kg et administrés par voie intraperitonéale sur 5 souris par extrait, a révélé que l'extrait acétate d'éthyle ES Ac est le seul extrait ayant provoqué une mortalité de 100%. Le test de toxicité aiguë approfondi sera ainsi effectué avec cet extrait.

Les solutions à injecter à chaque lot sont préparées comme présenté dans le tableau 14 page 42 (en tenant compte du poids moyen des souris de chaque lot).

IV-1-ADMINISTRATION DE LA SOLUTION

La solution notée **D1** est injectée chez la souris du **lot 1** à raison de 0,5 ml par animal par voie intrapéritonéale (Lautier, 1998). Les souris des lots 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9 recevront aussi respectivement 0,5 ml des solutions D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, et D9.

L'heure d'administration des solutions des extraits à tester ainsi que les symptômes présentés par les souris et le nombre de mortalité sont notés.

Résultats et discussion

Tableau 14 : Préparation des solutions à injecter sur des souris à chaque lot

Solution	Solution injectable à préparer (mg/ml)	Masse de l'extrait à tester (mg)	Solvant de dissolution de l'extrait à tester	Destiné à l'administration pour la dose à
D1	25,56	102	4 ml DMSO/H ₂ O (V/V)	450 mg/kg
D2	21,76	87	4 ml DMSO/H ₂ O (V/V)	400 mg/kg
D3	18	72	4 ml DMSO/H ₂ O (V/V)	350 mg/kg
D4	17,36	69	4 ml DMSO/H ₂ O (V/V)	300 mg/kg
D5	15,8	63	4 ml DMSO/H ₂ O (V/V)	250 mg/kg
D6	11,34	33,6	4 ml DMSO/H ₂ O (V/V)	200 mg/kg
D7	8,4	24	4 ml DMSO/H ₂ O (V/V)	150 mg/kg
D8	6	10,7	4 ml DMSO/H ₂ O (V/V)	100 mg/kg
D9	2,68	10,7	4 ml DMSO/H ₂ O (V/V)	50 mg/kg

Les résultats obtenus après l'administration des doses sont présentés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Résultats obtenus après administration de doses croissantes de l'extrait brut ES Ac

Lot N°	Nombre de souris	Poids moyen (g)	Dose administrée (mg/kg)	Taux de mortalité après 24 heures (%)
1	5	28,4	450	100
2	5	27,2	400	100
3	5	24,8	350	100
4	5	30	300	100
5	5	31,6	250	100
6	5	28,4	200	100
7	5	28	150	100
8	5	30	100	100
9	5	23,8	50	0

Les résultats obtenus sont observés sur les figures ci-après :



Figure 13 : Symptômes observés au cours du test de toxicité

A gauche, la patte postérieure droite est paralysée ; à droite, placée sur le dos, la souris n'arrive plus à se remettre sur ses pattes.

IV-2- DESCRIPTION DES SYMPTOMES D'INTOXICATION

L'injection de l'extrait ES Ac par voie intrapéritonéale provoque les symptômes suivants :

- Une diminution de l'activité motrice est observée immédiatement après administration des doses très élevées 450 mg/kg et 400 mg/kg ;
- A partir de 10 à 20 minutes, les doses 450 mg/kg à 100 mg/kg entraînent aussi la diminution de l'activité motrice de l'animal ;
- 12 heures après l'injection, une paralysie des pattes postérieures est observée pour les doses 450 mg/kg et 400 mg/kg ;
- 24 heures après l'administration des doses 450 mg/kg à 100 mg/kg, leurs pattes postérieures restent encore paralysées.
- Après 24 heures, l'administration des doses 450 mg/kg à 100 mg/kg provoque la mortalité de toutes les souris.
- La dose 50 mg/kg ne provoque aucune mortalité.

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

Selon Sandberg (1990), ces signes observés seraient imputables à une dépression du système nerveux central. L'extrait ES Ac contiendrait un principe qui agirait comme un curarisant.

La DL_{50} n'a pas pu être déterminée parce que les valeurs intermédiaires requises pour sa détermination n'ont pas pu être déterminées et l'extrait dont nous disposions n'était plus suffisant à cet effet.

Conclusion

et

Perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le paludisme ainsi que les maladies fongiques posent encore des problèmes de santé publique et figurent parmi les priorités du gouvernement malagasy. L'étude phytochimique bioguidée des rameaux feuillés d'*Abrahamia deflexa* s'inscrit dans la dynamique de recherche de nouvelles molécules antifongiques et/ou antiplasmodiales issues de plantes endémiques de Madagascar.

Le criblage phytochimique effectué sur l'extrait éthanolique a révélé la présence de classe de métabolites secondaires de différentes polarités tels que les composés polyphénoliques, les tanins, les anthraquinones, les flavonoïdes, les leucoanthocyanes, les stéroïdes, et le stérol insaturé, qui sont des familles chimiques caractéristiques des Anacardiaceae.

Le partage liquide-liquide de l'extrait éthanolique par des solvants organiques de polarité croissante conduit à l'obtention de quatre extraits actifs contre *P. falciparum* et *C. albicans* plus particulièrement l'extrait ES Aq présente simultanément une activité antiplasmodiale et une activité antifongique notoire.

Les extraits et les fractions sont évalués *in vitro* sur les deux souches *C. albicans* sous forme hyphale et *P. falciparum*.

Le fractionnement de l'extrait ES Hex a fourni huit fractions dotées d'une activité antifongique importante avec une CMI < 2 µg/ml mais non actives contre *P. falciparum* puis deux fractions de très forte activité spécifiquement antiplasmodiale avec une IC₅₀ < 0,39 µg/ml.

Le fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle ES Ac conduit à l'obtention de cinq fractions potentiellement intéressantes pour leur propriété antifongique (CMI < 2 µg/ml), et de la fraction A17 très active contre *P. falciparum* (IC₅₀ = 0,59 µg/ml).

Les fractions A8, A9 et A10 ont subi une CCM préparative et fourni cinq sous fractions pour chacune des fractions A8 et A9 notées respectivement A81 à A85 et A91 à A95 ainsi que quatre sous fractions pour celle de A10 notées A101 à A104.

A85, A101 et A102 sont très actifs contre *P. falciparum*. A91 apparait comme monotache sur CCM.

La détanication de l'extrait butanolique a permis d'améliorer l'activité antiplasmodiale du précipité et du filtrat par rapport à celle de l'extrait mère. Les fractions B12 à B15 issues du fractionnement du filtrat F Bu montrent une activité antiplasmodiale et

Conclusion et perspectives

antifongique très forte avec une IC_{50} comprise entre 0,94 $\mu\text{g/ml}$ et 3,56 $\mu\text{g/ml}$ et une CMI < 2 $\mu\text{g/ml}$.

Ce travail a permis de localiser les fractions contenant les principes antifongiques et/ou antiplasmodiaux.

Le test de toxicité aiguë de l'extrait acétate d'éthyle ES Ac effectué sur des souris « SWISS » a montré que cet extrait contient un principe qui agirait comme un curarisant.

A la suite de cette étude, l'isolement, la détermination de structure et la caractérisation biologique des molécules pures isolées ainsi que la détermination de la DL_{50} de l'extrait à l'acétate d'éthyle feront l'objet des travaux en perspective.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- 1. Aguilar-Ortigoza C.J. et Sosa V., 2004.** The evolution of toxic phenolic compounds in a group of Anacardiaceae genera. *Taxon*, 53 : 357-364.
- 2. Arreola-Cortés A., Soriano-Bello E.L., Lozoya-Gloria E., Barriga-Guzman A., Garcia- Pineda E., 2007.** The effect of acetylation of capsidiol phytoalexin on fungitoxic activity. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* , (40), 69-73.
- 3. Aubert M.F.A., 1982.** Une méthode simple de calcul des titres des suspensions virales, vaccinales ou séroneutralisantes: la méthode graphique. *Rev.sci.tech.off.int.Epiz*, 1(3) : 823-833.
- 4. Bednarek P., Osbourn A., 2009.** Plant-microbe interactions: Chemical diversity in plant defense. *Science*, 324 : 746-748.
- 5. Behets F., Andriamiadana J., Rasamilalao D., Ratsimbazafy N., Randrianasolo D., Dallabetta G., 2001.** Sexually transmitted infections, associated socio-demographic and behavioural factors in women seeking primary care suggest Madagascar's vulnerability to rapid HIV spread. *Trop. Med. Int. Health*, 6 : 202-211.
- 6. Bennett R. et Wallsgrove R., 1994.** Secondary Metabolites in Plant Defense-Mechanisms. *New Phytol*, 127 (4) : 617 – 633.
- 7. Bennett N., Paguio M., Gligorijevic B., Seudieu C., Kosar A.D., Davidson E., Roepe P.D., 2004.** Novel, Rapid, and Inexpensive Cell-Based Quantification of Antimalarial Drug Efficacy. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 48(5) : 1807-1810.
- 8. Biacs P.A., Gruiz K., 1982.** Effect of saponins and sterols on the membrane composition of *Trichoderma viride*. *Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids*.
- 9. Brown A.J.P., 2002.** Expression of growthform-specificfactorsduringmorphogenesis in *Candida albicans*,i, R.A Calderone(ed), *Candida and candidiasis*. ASM Press,Washington, D.C., 87-93.
- 10. Burkill H.M., 1985.** Useful plants of West Tropical Africa. Families A – D. Royal Botanic Gardens, ed., Kew, London. Volume 1, 1-960.
- 11. Calderone R.A., 2002.** *Candida and candidiasis* ASM Press Washington, 355-364.
- 12. Cardinale V., 2001.** Les candidoses vaginales récidivantes à *Candida albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 9 : 499-511.
- 13. Chen T.K. et Wiemer D.F., 1984.** A volatile leafcutter ant repellent from *Astronium graveolens*. *Naturwissenschaften*, 71 : 97-98.
- 14. Clark A.M. et Hufford C.D., 1992.** Chapter 2 Antifungal alkaloids. *Antifungal Alkaloids*, 42 : 117-150.

15. Cojocar M., Droby S., Glotter E., Goldman A., Gottlieb H.E., Jacoby B. *et al.*, 1986. 5-(12-Heptadecenyl)-resorcinol, the major component of the antifungal activity in the peel of mango fruit. *Phytochemistry*, 25 : 1093-1095.
16. Corthout J., Pieters L.A., Claeys M., Geerts S., Vanden B.D. et Vlietinck A.J., 1994. Antibacterial and molluscicidal phenolic acids from *Spondias mombin*. *Planta Medica*, 60 : 460-463.
17. Corthout J., Pieters L.A., Claeys M., Vanden B.D.A. et Vlietinck A.J., 1991. Antiviral ellagitannins from *Spondias mombin*. *Phytochemistry*, 30 : 1129-1130.
18. Corthout J., Pieters L.A., Claeys M., Vanden B.D.A. et Vlietinck A.J., 1992. Antiviral caffeoyl esters from *Spondias mombin*. *Phytochemistry*, 31 : 1979-1981.
19. Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G., 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88 : 170-175.
20. Cox E., 1991. *EG 1991. Systematics of parasitic Protozoa*. J. I : 55-80.
21. Cronquist A., 1988. The evolution and classification of the flowering plant. 2nd edition. The New York Botanical Garden.
22. Delaunay V., Agnès A. et Richard L., 2006. *Cahiers québécois de démographie*, 35 (1) : 27-49.
23. Do M.R., Silva M., Costa R.A., Miranda T.B., De Fernandes F.L., Costa C.R., De Paula C.R., 2002. *Evaluation of test and macrodilution broth method for antifungal susceptibility testing of CANDIDA SP strains isolated from oral cavities of aids patients*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 44 (3) : 121-125.
24. Domínguez J.M., Martín J.J., 1998. Identification of elongation factor 2 as the essential protein targeted by sordarins in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42 : 2279-2283.
25. Drewes S.E., Horn M.M. et Mabaso N.J., 1998. *Loxostylis alata* and *Smodingium argutum* - a case of phytochemical bedfellows? *South African Journal of Botany*, 64 : 128-129.
26. Fernandez C., Fiandor A., Martineez-Garate A. et Martinez Q.J., 1995. Allergy to pistachio: crossreactivity between pistachio nut and other Anacardiaceae. *Clinical and Experimental Allergy*, 25 : 1254-1259.
27. Fong et Farnsworth, 1977, *Phytochemical Screening*, Department of Pharmacognosy and Pharmacology, *Review, University of Illinois, Chicago*, 16, ISS2, 159-304.

- 28. Francis G., Kerem Z., Makkar H.P.S., Becker K., 2002.** The biological action of saponins in animal systems: A review. *British Journal of Nutrition*, 88 : 587-605.
- 29. Fridkin S.K. and Jarvis W.R., 1996.** Epidemiology of nosocomial fungal infections.
- 30. Galvez J., Zarzuelo A., Busson R., Cobbaert C. et de Witte P., 1992.** (-)-Epicatechiin-3-galloyl ester : a secretagogue compound from the bark of *Sclerocarya birrea*. *Planta Medica*, 58 : 174-175.
- 31. Galvez J., Zarzuelo A., Crespo M.E., Utrilla M.P., Jimenez J., Spiessens C. et al., 1991.** Antidiarrhoeic activity of *Sclerocarya birrea* bark extract and its active tannin constituent in rats. *Phytotherapy Research*, 5 : 276-278.
- 32. Gentilini M., 1993.** Maladies Parasitaires : *Le Paludisme*. In : Médecine Tropicale. Flammarion Médecine Sciences, Paris, 91-122.
- 33. Georgopapadakou N.H., Walsh T.J., 1996.** Antifungal agents: Chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40 : 279-291.
- 34. Giannini M.J.S., 2007.** Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeast *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. *Revista de Ciências Farmacéuticas Básicas Aplicadas*, 28(1) : 25-34.
- 35. Gibbons S., 2012.** An Introduction to Planar Chromatography and Its Application to Natural Products Isolation. In Sarker S.D. et Nahar L. *Natural Products Isolation*. Springer, ed., New York. 3ème édition. 129 p.
- 36. Gilles H.J., 1974.** Calcul des index de toxicité aiguë par la méthode de régression linéaire. Comparaison à la méthode de Karber et Behrens. *Eur J Toxicol Environ Hyg*, 7(2) : 77-84.
- 37. Godin P., 1954.** A new spray reagent for paper chromatography of polyols and cetoses nature, 13 : 174 p.
- 38. Gruiz K., Biacs P.A., 1989.** Membrane lipid composition of *Trichoderma* strains and their sensitivity to saponin and polyene antibiotics. *Biological Role of Plant Lipids*.
- 39. Hanitriniaina V., 2015.** Mémoire pour l'obtention du diplôme d'étude approfondie : Etudes chimique et antifongique d'*Abrahamia deflexa* (ANACARDIACEAE). Faculté des Sciences. Université d'Antananarivo.
- 40. Hauser D., Sigg H.P., 1971.** Isolation and decomposition of sordarin. *Helvetica Chimica Acta* 54 : 1178-1190.
- 41. Heywood V.H., Brummitt R.K., Culham A. et Seberg O., 2007.** Flowering plants families of the World. Richmond Hill, ed., Ontario, Canada: Firefly Books. 51 p.
- 42. Hodge H.C., Sterner J.H., 1943.** Determination of substances acute toxicity by LDB50B. *Amer. Industrial Hyg. Assoc*, 10 : 93 p.

- 43. Hormaza J.I. et Wunsch A., 2011.** Pistacia. In Kole C. Wild Crop Relatives : Genomic and Breeding Resources Temperate Fruits. Springer – Verlag, ed., Berlin. 119 p.
- 44. Hostettmann K., Marston A., Hostettmann M., 1998.** Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Product Isolation. Springer Verlag Edt.
- 45. Houghton P.J. and Raman A., 1998.** Laboratory Hand book for Fractionation of Natural Extracts. *Chapman et Hall, London*, 1st ed.100-107.
- 46. Ikan R., Kashman J., Bergmann E.D., 1964,** Thin-layer chromatography of tetra- and pentacyclic triterpenes. *Journal of chromatography* 14 : 275-279.
- 47. Inoue Y., Shiraishi A., Hada T., Hirose K., Hamashima H., Shimada J., 2004.** The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*, (237) : 325-331.
- 48. Jansen A., de Raadt J.L., Van Toorenenbergen A.W. et Van Wijk R.G., 1992.** Allergy to pistachio nuts. *Allergy Proceedings*, 13 : 255-258.
- 49. Kirk W., Patrick, Mcatee R.K., Revankar S.G., Fothergill A.W., Mccarthy D.I., Rinaldi M.G., Patterson T.F., 1998.** Comparative Evaluation of National Committee for Clinical Laboratory Standards Broth Macrodilution and Agar Dilution Screening Methods for Testing Fluconazole Susceptibility of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (5) : 1330–1332.
- 50. Koechlin K., Guillaum J.L. et Morat P.H., 1974.** Flore et végétation de Madagascar. *Cramer J. Vaduz*.
- 51. Lahadson S.F., 2016.** Etude phytochimique et évaluation de l'activité antifongique des rameaux feuillés d'*Abrahamia thouvenotii* (ANACARDIACEAE). Mémoire pour l'obtention du Diplôme de MASTER en Chimie. Parcours chimie biologique. Université d'Antananarivo : 52-53.
- 52. Lautier J., 1998.** Manuel de travaux pratiques en pharmacodynamie. *Université de Montpellier Analyses biologiques et biochimiques 2ème année*.74 p.
- 53. Letouzey R., 1972.** Manuel de botanique forestière. Afrique tropicale. Tome 2 B. Paris. 461 p.
- 54. Levine N.D., 1988.** *The Protozoan Phylum Apicomplexa*. CRC Press Boca Raton, Fla.
- 55. Mabberley D.J., 2000.** The plant book. A portable dictionary of the plants. 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge. 858 p.
- 56. Mendis K., Sina B.J., Marchesini P., Carter R., 2001.** *The neglected burden of Plasmodium vivax malaria*. *Am J Trop Med Hyg* 64 : 97-106.

- 57. Mitchell J.D., 1990.** The poisonous Anacardiaceae genera of the world. *Advances in Economic Botany*, 8 : 103-129.
- 58. Mitchell J.D., 2004.** Anacardiaceae. In Smith N., Mori S., Henderson A.A., Stevenson D.W., et Heald S.V. *Flowering plants of the Neotropics*. Princeton University Press, ed., Princeton, NJ. 1-616.
- 59. Morton J.F., 1981.** Atlas of medicinal plants of Middle America – Bahamas to Yucatan. C.Thomas, ed., Springfield. 1-1420.
- 60. Nemli G., Gezer E.D., Yildiz S., Temiz A., Aydin A., 2006.** Evaluation of the mechanical, physical properties and decay resistance of particleboard made from particles impregnated with *Pinus brutia* bark extractives. *Bioresource Technology* 97 : 2059-2064.
- 61. Njoroge G.N., Bussmann R.W., 2007.** Ethnotherapeutic management of skin diseases among the Kikuyus of Central Kenya. *J Ethnopharmacol*, 111 : 303-307.
- 62. Pell S.K., Mitchell J.D., Miller A.J. et Lobova T.A., 2011.** Anacardiaceae. In Kubitzki k. *The Families and Genera of Vascular Plants. Flowering Plants - Eudicots, Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae*. Springer-Verlag, ed., Berlin. 7-50.
- 63. Pelt J.M., 2001.** Les nouveaux actifs naturels. Marabout. Paris
- 64. Perrier de la Bathie H., 1946.** Flore de Madagascar et de Comores Famille 114.
- 65. Perrier de la Bathie H., 1946.** Flore de Madagascar et de Comores Famille 178- Anacardiaceae. *Museum de l'Histoire Naturelle*, Paris. 85 p.
- 66. Pfaller M.A. and Diekema D.J., 2007.** Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007. 20 : 133-163.
- 67. Portet B., 2007.** Recherche bioguidée de molécules antipaludiques d'une plante guyanaise *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. Thèse doctorat en Chimie-Biologie-Santé. Faculté de pharmacie. Université Toulouse III – Paul Sabatier : 69-133.
- 68. Rabeharioelina M.L., 2017.** Mémoire pour l'obtention du diplôme de master II : Etude phytochimique et évaluation *in vitro* de l'activité antifongique, antioxydante et antianaphylactique d'*Abrahamia deflexa* (ANACARDIACEAE). Faculté des Sciences. Université d'Antananarivo.
- 69. Rabesa Z. ; Rakotobe E. et al., 1993.** Pharmacopées d'Ambongo et du Boina. Antananarivo, 727 p.
- 70. Rabodomalala V.M.I., 2008.** Mémoire pour l'obtention de diplôme d'étude approfondie : contribution à l'étude chimique et antibactérienne de *Protorhus ditimena* (ANACARDIACEAE). Faculté des Sciences. Université d'Antananarivo.

Références bibliographiques

71. **Rahman R.N.Z.R.A., Baharum S.N., Basri M. et al., 2005.** High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas sp.* strain S5. *Anal. Biochem.* 341 : 267–274.
72. **Rai M.K., Deshmukh S.D., Ingle A.P. and Gade A.K., 2003.** Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, 1-12
73. **Rajeriarison C., 1996.** Aperçu bibliographique sur l'origine et les affinités de la flore malgache. In Biogéographie de Madagascar. *Lourenço W.R. Ed. ORSTOM.* Paris : 195-203.
74. **Randriamialinoro F., 2016.** Etudes chimique et biologique de deux *Cryptocarya* endémiques de Madagascar : *Cryptocarya dealbata baker* et *Cryptocarya rigidifolia van der werff* (LAURACEAE). Thèse doctorat en Chimie. Faculté des sciences, domaine sciences et technologies. Université d'Antananarivo : 118-121.
75. **Ratsimbazafy A.V., 2018.** Etude phytochimique bioguidée de *Sclerocarya birrea subsp caffra* (A. Rich) Hochst. (ANACARDIACEAE). Mémoire pour l'obtention du Diplôme de Master II en Chimie, Parcours chimie biologie. Université d'Antananarivo : 41-44.
76. **Rex J.H., Barbara D., Alexander D., Andes, Beth A.S., Steven D.B., Vishni C., Mahmoud A.G., Ana E.I.G., Cynthia C., Knapp, Luis O.Z., Michael A., Pfaller, Daniel J., Sheehan, Thomas J.W., 2008.** CLSI Reference Method for Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts ; approved. Standard-third edition. CLSI document M27-A3. Clinical and laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania. USA. 19087-1898
77. **Rivero C.J.F., Chavez D., Hernandez B., Anaya A.L. et Mata R., 1997.** Separation and characterization of *Metopium brownie* urushiol components. *Phytochemistry*, 45 : 1003-1008.
78. **Sandberg F., Ratsimbason M., Andriantsoa M., 1990.** Criblage pharmacologique de plantes médicinales ; .Vienne : *organisation des nations unies pour le développement industriel.* 28 p.
79. **Saucier, Mirabel M., Davioud F., Longieras A., Glories Y., Agric J., 2001.** *Food Chem.* 49 : 5732.
80. **Saxena G., McCutcheon A.R., Farmer S., Towers G.H.N. et Hancock R.E.W., 1994.** Antimicrobial constituents of *Rhus glabra*. *Journal of Ethnopharmacology*, 42 : 95-99.
81. **Schatz G.E., 2001.** Flore générique des arbres de Madagascar. *Royal Botanic Garden et Missouri Botanical Garden.* 516 : 45-46.
82. **Scorzoni L., Benaducci T., Almeida A.M.F., Silva D.H.S., Bolzani V.S., Mendes-Giannini M.J.S., 2007.** Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida spp* and *Cryptococcus sp.* *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 28, n.1, p.25-34.

Références bibliographiques

- 83. Scorzoni L., Benaducci T., Almeida A.M.F., Silva D.H.S., Bolzani V.S., Mendes S.P., 2008.** Chemical defence strategies of higher fungi *Chemistry*, 14 (30) : 9100 – 9110.
- 84. Stahl E., 1967,** *Dünnschicht-chromatographie, Ein Laboratoriumshandbuch, zweite Auflage*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- 85. Steven A., Oxley J. and Fleming W.G., 2008.** Mentoring for NHS doctors: perceived benefits across the personal-professional interface. *J. R. Soc. Med.*, 101 : 552-557.
- 86. Sudbery P., Gow N. and Berman J., 2004.** The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.*, 12 (7) : 317-324.
- 87. Takhtajan A., 2009.** *Flowering Plants*, Springer, ed., Netherlands, 2^{ème} edition. p. 1-750.
Thèse de doctorat en Pharmacie de l'Université Henri Poincaré- Nancy 1, 154 p.
- 88. Tiraboschi I.N., Bennett J.E., Kauffman C.A., Rex J.H., Girmenia C., Sobel J.D., and Menichetti F., 2000.** Deep *Candida* infections in the neutropenic and non-neutropenic host: an ISHAM symposium. *Med. Mycol.*, 38(1) : 199-204.
- 89. Trager W., Jensen J.B., 1976.** Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193 : 673-675.
- 90. Vecht L.S.E., Sasson Y., Braun S., 1992.** Nikkomycin production in pellets of *Streptomyces tendae*. *Journal of Applied Bacteriology*, 72 : 195-200.
- 91. Viana G.S.B., Bandeira M.A.M., Moura L.C., Souza-Filho M.V.P., Matos F.J.A. et Ribeiro R.A., 1997.** Analgesic and anti-inflammatory effects of the tannin fraction from *Myracrodruon urundeuva* Fr. *All. Phytotherapy Research*, 11 : 118-122.
- 92. Wagner, Plant S.B., 1996,** *Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*. Von, 2.ed., Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- 93. Watson L. and Dallwitz M.J., 1992.** The families of flowering plants : descriptions, illustrations, identification and information retrieval. Version 14. December 2000.
- 94. WHO, 2005.** *World malaria report 2005 (WHO)*.
- 95. WHO, 2006.** *The role of Laboratory diagnosis to support malaria case management focus on the use of rapid diagnostic test in areas of high transmission*. Report of a WHO technical Consultation. 25-26 Octobre 2004, 40 p.

Webbographies : - <http://biodiversity.uno.edu/delta/>

- http://science.mnhn.fr/institution/mnhn/collection/p/item/00780372?lang=fr_FR
- http://www.botanywebsite.com/flora_of_madagascar/index.php?page=Abrahamia_deflexa_picture_leaves1
- <http://www.pasteur.fr>
- http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ccdr-rmtc/04vol130/30s1/page9_f.html

Annexes

ANNEXE 1 : Criblage phytochimique

Préparation des extraits bruts

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

SCREENING DES TANINS ET POLYPHENOLS.

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

T1 : témoin de culture

T2 : additionner 4 gouttes de gélatine à 1%.

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

T4 : additionner 4 gouttes de FeCl₃ 10% dans méthanol

SCREENING DES FLAVONOIDES ET LEUCOANTHOCYANES

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

T1 : témoin

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

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

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

TEST D'ALCALOIDES

Le screening est effectué en 3 étapes:

Macération

Test préliminaire

Test de confirmation

Annexes

1-macération chlorhydrique

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

Faire le test : T1 sert de témoin

T2 ajouter 5 gouttes de réactif de Wagner

T3 ajouter 5 gouttes de réactif de Mayer

T4 ajouter 5 gouttes de réactif de Dragendorff

L'apparition de précipité indique que le test est positif

2-Test préliminaire

Prendre 2 g de poudre, faire macérer dans une solution hydroalcoolique 80% (éthanol/eau : 80/20). Evaporer l'alcool jusqu'à obtention d'un résidu de consistance sirupeuse, puis y ajouter 10 ml de solution HCN 2 N et agiter à l'aide d'une baguette de verre tout en chauffant dans un bain marie bouillant pendant 3 à 5 mn, refroidir la solution jusqu'à température ambiante. Additionner 0,5 g de NaCl. Agiter et filtrer. Laver le précipité avec un volume suffisant de HCl 2 N.

Diviser le filtrat en 4 et faire le test comme en 1

TEST DE SAPONOSIDES

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

SCREENING DE STEROIDES ET TRITERPENES

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

T1 : témoin ;

T2 : additionner 4gouttes de l'anhydre acétique et 4 gouttes de H₂SO₄ concentré et observer la coloration. (TEST DE LIEBERMAN-BURCHARD) ;

T3 : incliner le tube à 45°, ajouter 1 ml de H₂SO₄ concentré .observer l'anneau de séparation (TEST DE SALKOWSKI) ;

T4 : ajouter quelques gouttes de solution méthanolique de FeCl₃ 10% et quelques gouttes d'acide acétique glacial (TEST DE KELLER-KILIANI).

Annexes

SCREENING D'IRIDOIDES

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

ANNEXE 2 : Préparation de milieu Sabouraud :

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

ANNEXE 3 : Composition des milieux de culture

Milieu SLGG

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

MILIEU SSGG

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

ANNEXE 4 : TEST D'ACTIVITE DU FLUCONAZOLE, L'ANTIFONGIQUE DE REFERENCE

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

Annexes

La sensibilité du germe-test à une gamme de concentrations de fluconazole allant de 593 µg/mL à 0 µg/mL a été évaluée *in vitro* et en utilisant la méthode de microdilution en milieu liquide sur une plaque de microtitration.

Les différents puits ont été remplis selon le protocole montré dans le tableau ci-dessous.

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

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

- Les puits des lignes A, B et C allant de la colonne 2 à la colonne 11 contiennent les cultures de *Candida albicans* en présence d'une concentration décroissante de fluconazole ; les tests sont ainsi effectués en triple.
- Dans les puits de la ligne D sont consignées les différentes concentrations de fluconazole dans un milieu de culture non ensemencé.
- Le puits au point D12 ne contient **ni** de fluconazole **ni** de germe-test ; elle fournira la densité optique propre du milieu de culture utilisé.
- Les puits A12, D12 et C12 sont les témoins de culture

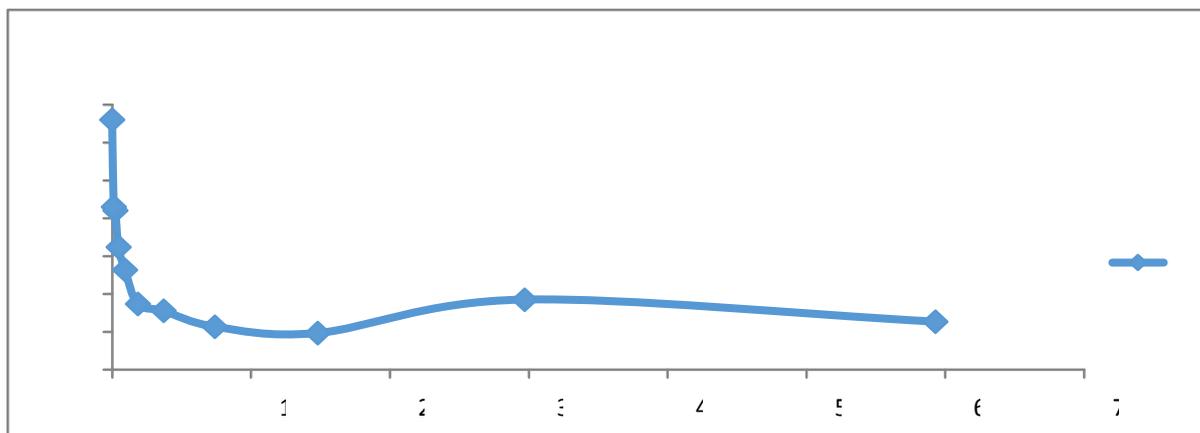
Tableau: Résultats en termes de densité optique ; activité antifongique du fluconazole-

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

Annexes

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

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



Courbe de variation de DO₅₂₅ en fonction de la concentration de fluconazole

- La valeur moyenne de DO₅₂₅ se rapportant aux témoins de culture est ici de **0,132** ; toutes les valeurs de DO se rapportant aux puits affectés au test et qui sont **inférieures** à 0,132 indiquent une **activité antifongique** ;
- L'étape suivante du traitement des résultats consiste à calculer si cette différence par rapport aux témoins de croissance est significative ou non ;
- Pour ce faire le test de Student est utilisé et appliqué aux petits échantillons.

Les résultats sont donnés dans le tableau ci-dessous.

Tableau: Résultat du test d'activité antifongique du fluconazole

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

Annexes

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

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

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

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

Annexes

ANNEXE 5 : TRAITEMENT DES RESULTATS

Activité antifongique AAF de l'extrait B6 de ST1026

Lecture du 30.06.17

Germe test : *Candida albicans* ATCC 10231 forme hyphale

Préculture dans le milieu SLGG

Durée de la préculture : 48 h à 35°C

Incubation pour le test: 48 h à 35°C

Ensemencement du milieu d'essai: Inoc. Dilué à 10⁻¹

Methode: microdilution en milieu liquide en plaque de microtitration à 96 puits

Gamme de concentration étudiée:

1000 à 0 µg/ml

Milieu d'essai : 100 µl de milieu SLGG par puit

Extrait déposé dans les puits à raison de 20 µl/puit et mis à sécher pendant 1 nuit à 37°C

DO. Corrigée du témoin de culture = 0,076

Le remplissage des puits a été effectué comme suit

			Concentration de l'extrait dans le milieu d'essai (en µg/ml)											
			Pt 1000	Pt 500	Pt 250	Pt 125	Pt 62,5	Pt 31,3	Pt 16	Pt 8	Pt 4	Pt 2	Pt 0	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E	B6 + Cand.albi. "H"	<i>Blanc</i>	1000	500	250,0	125,0	62,5	31	16	8	4	2,0	0,00	
F		<i>Blanc</i>	1000	500	250,0	125,0	62,5	31	16	8	4	2,0	0,00	
G		<i>Blanc</i>	1000	500	250,0	125,0	62,5	31	16	8	4	2,0	0,00	
H	B6	<i>Blanc</i>	1000	500	250,0	125,0	62,5	31	16	8	4	2,0	0,00	

Annexes

RESULTATS DU TEST EN TERME DE DENSITE OPTIQUE LUE A 525 nm

		Concentration de l'extrait dans le milieu d'essai (en µg/ml)												
			Pt 1000	Pt 500	Pt 250	Pt 125	Pt 62,5	Pt 31,3	Pt 16	Pt 8	Pt 4	Pt 2	Pt 0	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E	B6 + Cand.albi. "H"	Blanc	0,177	0,156	0,153	0,073	0,140	0,151	0,147	0,140	0,167	0,155	0,157	
F		Blanc	0,174	0,136	0,139	0,150	0,158	0,147	0,130	0,132	0,168	0,149	0,138	
G		Blanc	0,162	0,162	0,194	0,165	0,162	0,146	0,158	0,084	0,167	0,165	0,161	
		Moy.	0,171	0,151	0,162	0,129	0,153	0,148	0,145	0,119	0,167	0,156	0,152	
H	B6	Blanc	0,096	0,083	0,075	0,07	0,071	0,067	0,070	0,071	0,107	0,068	0,064	

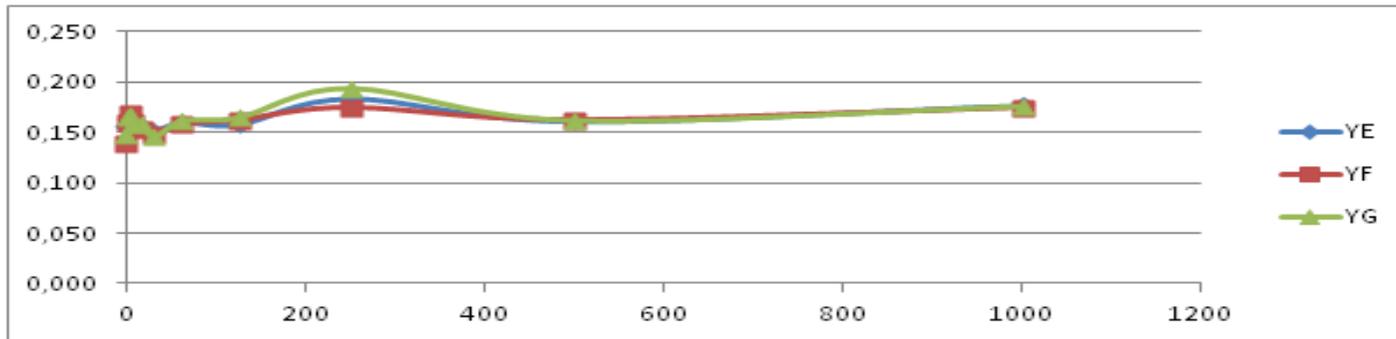
avec correction

		Concentration de l'extrait dans le milieu d'essai (en µg/ml)												
			Pt 1000	Pt 500	Pt 250	Pt 125	Pt 62,5	Pt 31,3	Pt 16	Pt 8	Pt 4	Pt 2	Pt 0	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E	B6 + Cand.albi. "H"	Blanc	0,177	0,161	0,184	0,158	0,160	0,151	0,156	0,158	0,167	0,163	0,140	
F		Blanc	0,174	0,162	0,174	0,162	0,158	0,147	0,153	0,160	0,168	0,160	0,138	
G		Blanc	0,176	0,162	0,194	0,165	0,162	0,146	0,158	0,159	0,167	0,165	0,141	
		Moy.	0,176	0,162	0,184	0,162	0,160	0,148	0,156	0,159	0,167	0,163	0,140	
H	B6	Blanc	0,096	0,083	0,075	0,070	0,071	0,067	0,070	0,071	0,070	0,068	0,064	

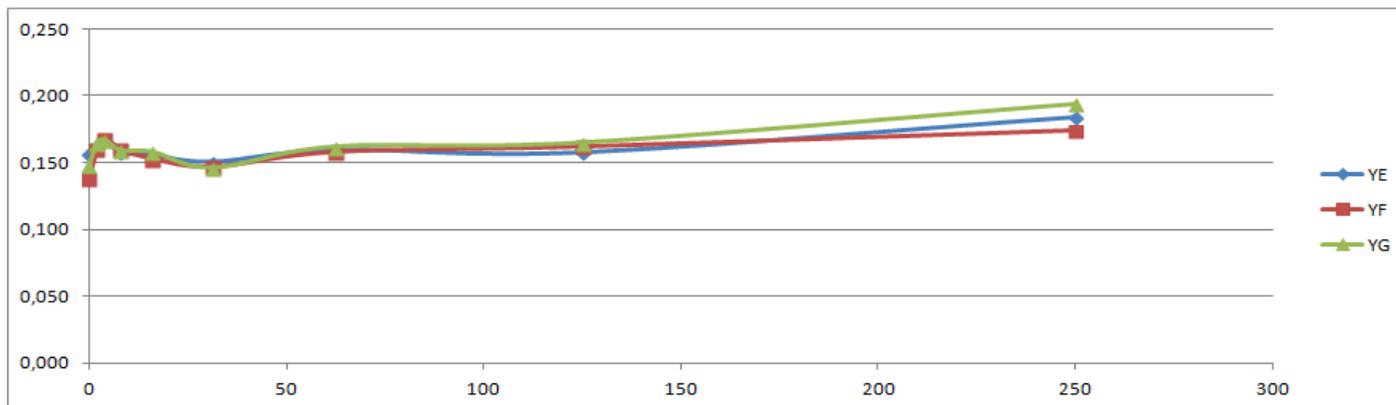
Annexes

QUALITE DU TEST

X	1000	500	250	125,0	62,5	31	16	8	4	2	0
YE	0,177	0,161	0,184	0,158	0,160	0,151	0,156	0,158	0,167	0,163	0,157
YF	0,174	0,162	0,174	0,162	0,158	0,147	0,153	0,160	0,168	0,160	0,138
YG	0,176	0,162	0,194	0,165	0,162	0,146	0,158	0,159	0,167	0,165	0,148



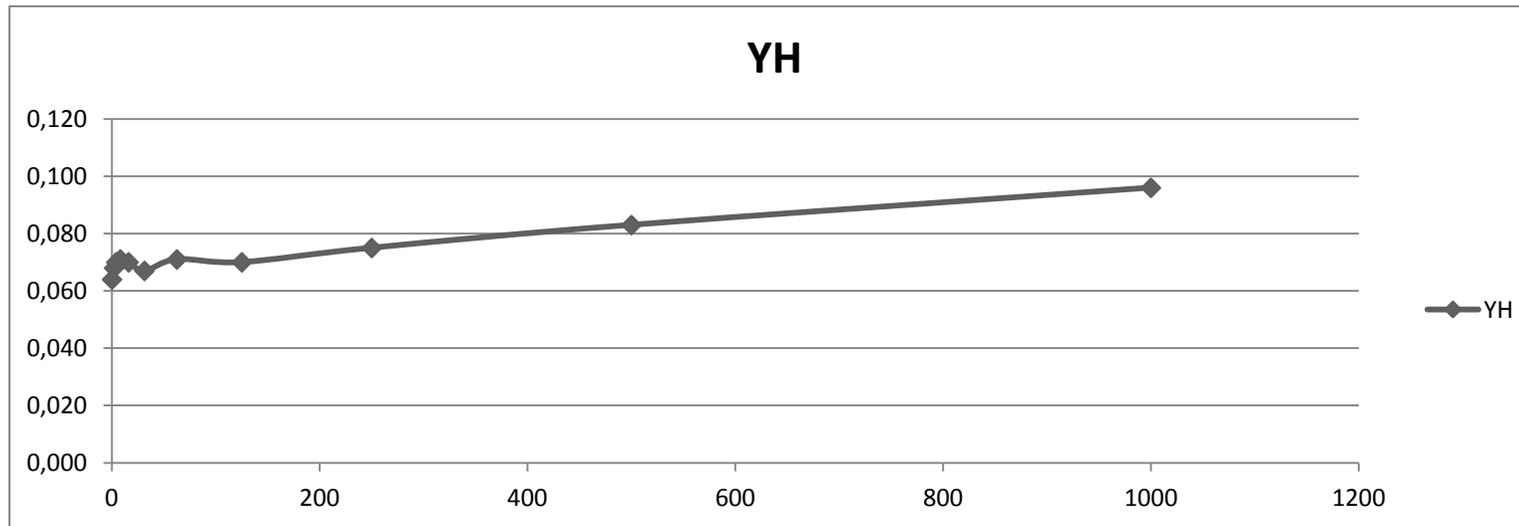
X	250	125,0	62,5	31	16	8	4	2	0
YE	0,184	0,158	0,160	0,151	0,156	0,158	0,167	0,163	0,157
YF	0,174	0,162	0,158	0,147	0,153	0,160	0,168	0,160	0,138
YG	0,194	0,165	0,162	0,146	0,158	0,159	0,167	0,165	0,148



Annexes

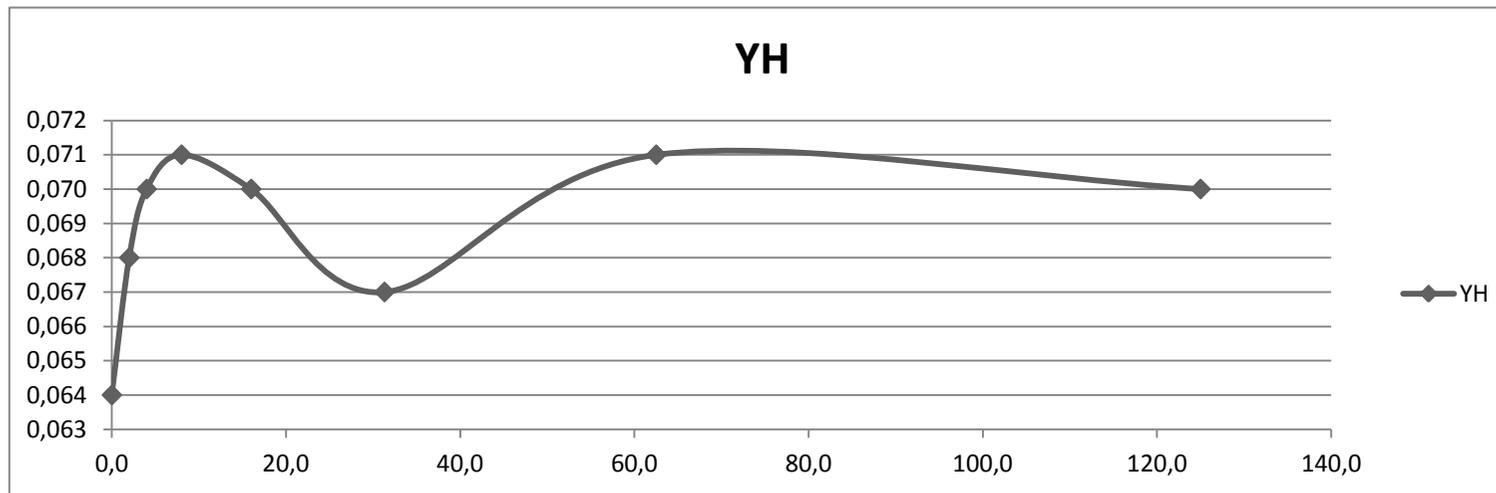
Ligne H

X	1000	500	250	125,0	62,5	31	16	8	4	2	0
YH	0,096	0,083	0,075	0,07	0,071	0,067	0,070	0,071	0,070	0,068	0,064



X	125,0	62,5	31	16	8	4	2	0
YH	0,070	0,071	0,067	0,070	0,071	0,070	0,068	0,064

Annexes



		Concentration de l'extrait dans le milieu d'essai (en µg/ml)											
		Pt 1000	Pt 500	Pt 250	Pt 125	Pt 62,5	Pt 31,3	Pt 16	Pt 8	Pt 4	Pt 2	Pt 0	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E	B6 + Cand.albi. "H"	<i>Blanc</i>	0,177	0,161	0,184	0,158	0,160	0,151	0,156	0,158	0,167	0,163	0,140
F		<i>Blanc</i>	0,174	0,162	0,174	0,162	0,158	0,147	0,153	0,160	0,168	0,160	0,138
G		<i>Blanc</i>	0,176	0,162	0,194	0,165	0,162	0,146	0,158	0,159	0,167	0,165	0,141
		Moy.	0,176	0,162	0,184	0,162	0,160	0,148	0,156	0,159	0,167	0,163	0,140
H	B6	<i>Blanc</i>	0,096	0,083	0,075	0,070	0,071	0,067	0,070	0,071	0,070	0,068	0,064

Annexes

Variation des valeurs de DO en fonction de la concentration de l'extrait dans le milieu d'essai

X	1000	500	250	125,0	62,5	31	16	8	4	2	0
Y	0,080	0,079	0,109	0,092	0,089	0,081	0,086	0,088	0,097	0,095	0,076

Evaluation de la CMI (par le test de Student)

Pt 1000

	A	B
	Pt. 1000	Pt. 0µg/ml
1	0,081	0,076
2	0,078	0,074
3	0,080	0,077
val.moyenne	0,080	0,076

Pt.1000	(x-mA)	(x-mA) ²
0	0,001	1,778E-06
	-0,002	2,778E-06
	0,000	1,111E-07
Somme		4,667E-06

Pt.0µg/ml	(x-mB)	(x-mB) ²
	0,000	1,1111E-07
	-0,002	2,7778E-06
	0,001	1,7778E-06
Somme		4,6667E-06

La valeur de t calculée est **supérieure** à celle lue dans le table

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

Pt 500

pour ddl=4	s ² =	0,0000
α=0,05	Dénom de t=	4722
t=2,776	t=	3,207

	A	B
	Pt. 500	Pt. 0µg/ml
1	0,078	0,076
2	0,079	0,074
3	0,079	0,077
val.moyenne	0,079	0,076

Pt. 500	(x-mA)	(x-mA) ²
	-0,001	4,444E-07
	0,000	1,111E-07
	0,000	1,111E-07
Somme		6,667E-07

Pt.0µg/ml	(x-mB)	(x-mB) ²
	0,000	1,1111E-07
	-0,002	2,7778E-06
	0,001	1,7778E-06
Somme		4,6667E-06

Annexes

pour ddl=4	0,0000
	0
$\alpha=0,05$	0,0009
	Dénom de t= 4281
t=2,776	t= 3,182

La valeur de t calculée est **supérieure** à celle lue dans le table

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

Pt 250

	A		B	
	Pt. 250		Pt. 0µg/ml	
1	0,109		0,076	
2	0,099		0,074	
3	0,119		0,077	
val.moy enne	0,109		0,076	

Pt. 250	(x-mA)	(x-mA) ²
	0,000	0
	-0,010	0,0001
	0,010	0,0001
Somme		0,0002

Pt.0µ g/ml	(x-mB)	(x-mB) ²
	0,000	1,1111E-07
	-0,002	2,7778E-06
	0,001	1,7778E-06
Somme		4,6667E-06

La valeur de t calculée est **supérieure** à celle lue dans le table

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

pour ddl=4	0,0000
	5
$\alpha=0,05$	0,0058
	Dénom de t= 4047
t=2,776	t= 5,707

Pt 125

	A		B	
	Pt. 125		Pt. 0µg/ml	
1	0,088		0,076	
2	0,092		0,074	
3	0,095		0,077	
val. Moyenne	0,092		0,076	

Pt. 125	(x-mA)	(x-mA) ²
	-0,004	1,344E-05
	0,000	1,111E-07
	0,003	1,111E-05
Somme		2,467 E-05

Pt.0µ g/ml	(x-mB)	(x-mB) ²
	0,000	1,1111E-07
	-0,002	2,7778E-06
	0,001	1,7778E-06
Somme		4,6667 E-06

Annexes

pour ddl=4	$s^2=$	0,0000 1
$\alpha=0,05$	Dénom de t=	0,0022 1108
t=2,776	t=	7,236

La valeur de t calculée est **supérieure** à celle lue dans le table

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

Pt 62,5

	A		B	
	Pt. 62,5		Pt. 0µg/ml	
1	0,089		0,076	
2	0,087		0,074	
3	0,091		0,077	
val. Moyenne	0,089		0,076	

Pt. 62,5	(x-mA)	(x-mA) ²
	0,000	0
	-0,002	4E-06
	0,002	4E-06
Somme		8E-06

Pt.0µ g/ml	(x-mB)	(x-mB) ²
	0,000	1,1111E-07
	-0,002	2,7778E-06
	0,001	1,7778E-06
Somme		4,6667E-06

pour ddl=4	$s^2=$	0,0000 0
$\alpha=0,05$	Dénom de t=	0,0014 5297
t=2,776	t=	9,177

La valeur de t calculée est **supérieure** à celle lue dans le table

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

Pt 31,3

	A		B	
	Pt. 31,3		Pt. 0µg/ml	
1	0,084		0,076	
2	0,080		0,074	
3	0,079		0,077	
Val. Moyenne	0,081		0,076	

Pt. 31,3	(x-mA)	(x-mA) ²
	0,003	9E-06
	-0,001	0,000001
	-0,002	4E-06
Somme		0,000014

Pt.0µ g/ml	(x-mB)	(x-mB) ²
	0,000	1,1111E-07
	-0,002	2,7778E-06
	0,001	1,7778E-06
Somme		4,6667E-06

Annexes

pour ddl=4		s ² =	0,0000 0
α=0,05		Dénom de t=	0,0017 6383
t=2,776		t=	3,024

La valeur de t calculée est **supérieure** à celle lue dans le table

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

Pt 16

	A		B	
	Pt. 16		Pt. 0μg/ml	
1	0,086		0,076	
2	0,083		0,074	
3	0,088		0,077	
val. Moyenne	0,086		0,076	

Pt. 16	(x-mA)	(x-mA) ²
	0,000	1,111 E-07
	-0,003	7,111 E-06
	0,002	5,444 E-06
Somme		1,267 E-05

Pt.0μ g/ml	(x-mB)	(x-mB) ²
	0,000	1,111E -07
	-0,002	2,7778E -06
	0,001	1,7778E -06
Somme e		4,6667E -06

La valeur de t calculée est **supérieure** à celle lue dans le table

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

pour ddl=4		s ² =	0,0000 0
α=0,05		Dénom de t=	0,0016 9967
t=2,776		t=	5,883

Pt 8

	A		B	
	Pt. 8		Pt. 0μg/ml	
1	0,087		0,076	
2	0,089		0,074	
3	0,088		0,077	
val. Moyenne	0,088		0,076	

Pt. 8	(x-mA)	(x-mA) ²
	-0,001	0,000 001
	0,001	0,000 001
	0,000	0
Somme		0,000 002

Pt.0μ g/ml	(x-mB)	(x-mB) ²
	0,000	1,111E -07
	-0,002	2,7778E -06
	0,001	1,7778E -06
Somme e		4,6667E -06

Annexes

pour ddl=4	$s^2=$	0,0000 0
$\alpha=0,05$	Dénom de t=	0,0010 5409
$t=2,776$	t=	11,700

La valeur de t calculée est **supérieure** à celle lue dans le table

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

Pt 4

	A		B	
	Pt. 4		Pt. 0µg/ml	
1	0,097		0,076	
2	0,098		0,074	
3	0,097		0,077	
val. moyenne	0,097		0,076	

Pt. 4	(x-mA)	(x- mA) ²
	0,000	1,111 E-07
	0,001	4,444 E-07
	0,000	1,111 E-07
Somme		6,667 E-07

Pt.0µ g/ml	(x-mB)	(x-mB) ²
	0,000	1,1111E -07
	-0,002	2,7778E -06
	0,001	1,7778E -06
Somme e		4,6667E -06

pour ddl=4	$s^2=$	0,0000 0
$\alpha=0,05$	Dénom de t=	0,0009 4281
$t=2,776$	t=	22,981

La valeur de t calculée est **supérieure** à celle lue dans le table

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

Pt 2

	A		B	
	Pt. 2		Pt. 0µg/ml	
1	0,095		0,076	
2	0,092		0,074	
3	0,097		0,077	
val. moyenne	0,095		0,076	

Pt. 2	(x-mA)	(x- mA) ²
	0,000	1,111 E-07
	-0,003	7,111 E-06
	0,002	5,444 E-06
Somme		1,267 E-05

Pt.0µ g/ml	(x-mB)	(x-mB) ²
	0,000	1,1111E -07
	-0,002	2,7778E -06
	0,001	1,7778E -06
Somme e		4,6667E -06

Annexes

pour ddl=4
$\alpha=0,05$
t=2,776

$s^2=$	0,0000
	0
Dénom de t=	0,0016
	9967
t=	11,179

La valeur de t calculée est **supérieure** à celle lue dans le table

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

Tableau récapitulatif

Ident.extrait	Int. Conc.. Testées($\mu\text{g/ml}$)		Activité			Conc.($-\mu\text{g/ml}$)		Comp. / Témoin	
	min.	max.	Inactif	Actif					
Extrait: B6	0	1000		<i>Actif</i>		1000	S		
<i>Candida albicans</i>				<i>Actif</i>		500	S		
				<i>Actif</i>		250	S		
				<i>Actif</i>		125	S		
				<i>Actif</i>		62,5	S		
				<i>Actif</i>		31,3	S		
				<i>Actif</i>		16	S		
				<i>Actif</i>		8	S		
				<i>Actif</i>		4	S		
				<i>Actif</i>		2	S		

CMI < 2 $\mu\text{g/ml}$

ANNEXE 6 : Fluorimétrie et test antiplasmodial

a) La fluorimétrie

C'est une méthode d'analyse physico-chimique, appelée aussi spectrofluorimétrie, dans laquelle l'échantillon, exposé à des radiations de longueur d'onde déterminée, les absorbe et réémet des radiations de même longueur d'onde ou de longueur d'onde supérieure.

Lors de cette analyse, la lumière réémise est utilisée pour déterminer la qualité et la quantité de la substance qui est à l'origine de la fluorescence elle-même.

b) Appareillage

Dans les appareils les plus couramment utilisés, la source lumineuse poly-chromatique passe par un filtre de telle sorte qu'on n'utilise qu'une lumière de longueur d'onde déterminée. Cette dernière traverse alors l'échantillon et la fluorescence qui en résulte et récupérée grâce à un nouveau monochromateur qui permettra de mesurer la longueur d'onde d'émission de l'échantillon.

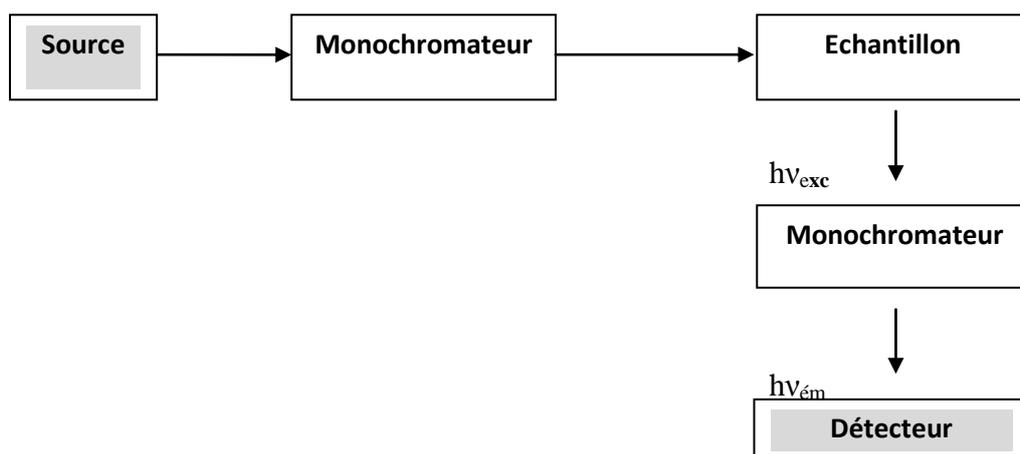


Figure : Schéma simplifié d'un spectrofluorimètre

Application au test antipaludéen

a) Principe

Le syber-Green est un fluorescent ultrasensible, spécifique des ADN viables ou ds-DNA (double-standed DNA) en solution. Il est possible de quantifier ces derniers pour une concentration de l'ordre de 25 pg/ μ L avec un spectrofluorimétrie utilisant les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de la fluorescéine, respectivement à 485 nm et 528 nm. La quantification de l'ADN plasmodiale viable par cette sonde permet la comparaison de la croissance d'une culture sans contact avec le produit étudié, avec une culture mise en contact avec le produit testé.

Annexes

b) Test antiplasmodial par fluorimétrie

- Le milieu de culture

Le milieu de culture des souches de *Plasmodium falciparum* de type FCM29 est constitué de RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO), 25 mM NaHCO₃, 2 mM glutamine, et 1 M HEPES (Sigma, St. Louis, MO).

-Entretien quotidien de la culture

A 10 ml de sérum humain AB+ activé, ajouter 90 ml de RPMI pour constituer RPSH 10%. Amener cette dernière à environ 37°C.

Ouvrir le flacon de culture contenant la suspension parasitaire.

Pipetter le surnageant avec une pipette Pasteur préalablement passée à travers la flamme provenant du bec Bunsen.

Ajouter 7,5 ml de RPSH 10%. Bien mélanger, élever 150 µl de la solution ainsi obtenue et la mettre dans un tube Eppendorf pour le frottis sanguin.

Souffler le contenu du flacon de culture avec le mélange gazeux (CO₂, O₂, N₂) de proportion respective (5%, 5%, 90%). La refermer rapidement et la mettre à 37°C.

-Réalisation du frottis sanguin

Prendre le tube Eppendorf contenant les 150 µl de suspension parasitaire précédemment préparée. Le centrifuger et pipetter le surnageant. Déposer alors une goutte du culot sur la lame à frottis. Effectuer le frottis et le fixer avec du MeOH, puis procéder à la coloration et enfin à la lecture au microscope.

Procéder au comptage des globules rouges parasités dans cinq champs de vision pour déterminer la parasitémie.

- Réalisation du test

Chaque extrait à tester va subir une série de dilution dans un tube Eppendorf pour avoir une concentration finale de 50 µg/ml dans 250 µl. Dans une microplaque de 96 cupules à fond rond, on répartit en duplicate, les différents extraits ainsi dilués à raison de 10 µl/cupule. On y ajoute ensuite 240 µl de globules rouges infectées de *P. falciparum* à 1% de parasitémie. La quinine sert de témoin positif. Des cupules remplies de globules rouges non parasités servent de témoin négatif. Mettre alors la microplaque dans une atmosphère constituée par un mélange gazeux (CO₂, O₂, N₂) de proportion respective (5%, 5%, 90%), à une température de 37°C, pendant 48 heures.

Passé ce délai, on prélève 150 µl de chaque cupule pour les mettre dans une nouvelle microplaque de 96 cupules à fond plat. Ajouter ensuite 50 µl du mélange fluorescent constitué

Annexes

par le Syber-Green (Molecular Probes, Inc., Eugène, OR), 10 mM de Tris-HCl, 1 mM d'EDTA, pH=7,5 (TE buffer), et 2% de Triton X-100 (9002-93-1, SIGMA, Missouri USA).

On met la microplaque ainsi préparée dans l'obscurité pendant 5 à 30 mn ; on effectue ensuite la lecture avec le microfluorimètre (FLx 800, Bio-Tek Instruments, Inc, Winooski, VT) de longueur d'onde d'excitation à 485/20 nm et d'émission à 528/20 nm.

- Méthode de calcul du pourcentage d'inhibition

Après que le microfluorimètre ait effectué la lecture et qu'il ait donné les valeurs enregistrées en RFU, on calcule d'abord les valeurs moyennes obtenues pour chaque extrait :

CTL1 : milieu de culture RPSH 20%

BLK : Extrait dilué + globules rouges saines

SMP : les extraits dilués additionnés de globules rouges parasités

Ensuite on calcule le pourcentage de viabilité de l'ADN, c'est-à-dire la capacité de l'ADN qui ait survécu malgré l'ajout des extraits, à vivre après l'avoir remis dans ses conditions de vie optimales. On l'obtient selon :

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{SMP - BLK}{CTL1 - BLK} \times 100$$

Enfin, on calcule le pourcentage d'inhibition de la croissance des parasites par la formule :

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \% \text{ de viabilité}$$

$$\text{tel que } 0 \leq \% \text{ inhibition} \leq 100$$

Exemple : Résultats obtenus avec les extraits H14, A17 et B15.

Les valeurs observées dans le tableau ci-après sont les valeurs obtenues après les calculs précédemment expliqués.

	Moyenne BLK	Moyenne CTL1	Moyenne SMP	% viabilité	% inhibition
ST1026-H14	12268.5	12536	12280.5	4.54	< 0,39
ST1026-A17	11344	11943.5	11776.5	26.04	0,57
ST1026-B15	11983.5	12258	12302.5	42.86	0,94

Author : RASOANAIVO Falisoa Mbolatiana
Address : Lot II K 43 Mahatony Soavimasoandro
Email : falisoambolatianar@gmail.com

Title : Contribution to the phytochemical study and biological characterization of antifungal and/or antiplasmodial compounds derived from *Abrahamia deflexa*

ABSTRACT: This work deals with the search for new antifungal and antiplasmodial molecules from leafy twigs of an endemic plant of Madagascar, *Abrahamia deflexa* (Anacardiaceae).

Phytochemical screening performed on a hydroethanolic extract revealed the presence in the plant of: steroids, triterpenes, flavonoids, anthraquinones, tannins and polyphenols. The extracts and fractions are evaluated *in vitro* against *Candida albicans* and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*.

The sequential maceration at room temperature of the plant powder in ethanol provided three extracts R1, R2 and R3. Extracts R2 and R3 showing little chlorophyllic staining were pooled to give R4. The latter then underwent a liquid-liquid partition by solvents of increasing polarity and led to the production of four extracts: hexane extract ES Hex, ethyl acetate extract ES Ac, butanolic extract ES Bu and the exhausted aqueous extract ES Aq. In addition to the ES Ac extract, these extracts have a known antifungal activity (MIC < 2 µg/ml). Extracts ES Ac (IC₅₀= 2.75 µg/ml) and ES Aq (IC₅₀= 2.86 µg/ml) show a very strong antiplasmodial activity.

Acute toxicity testing of the ES Ac extract in SWISS mice revealed signs that would be attributable to central nervous system depression, so that the ES Ac extract would contain a principle that would act as a curarisant.

The bioguide fractionation of the ES Hex extract yielded 20 fractions of which eleven are potentially interesting: nine for their antifungal properties (MIC < 2 µg/ml) and two for their antiplasmodial properties (IC₅₀ < 0.39 µg/ml). Two fractions H17 and H20 have a high activity on both test germs.

Preparative thin-layer chromatography of the fraction A8 resulting from fractionation by normal silica open column adsorption chromatography of the ES Ac extract provided inter alia the A85 fraction showing a known antiplasmodial activity (IC₅₀= 2.82 µg/ml). The subfractions A101 (IC₅₀= 2.42 µg/ml) and A102 (IC₅₀= 3.67 µg/ml) from fraction A10 have a strong antiplasmodial activity.

Precipitation of the tannins of the ES Bu extract (IC₅₀= 15.37 µg/ml) significantly improved the antiplasmodial activity of the precipitate (IC₅₀ = 6.84 µg/ml) and the filtrate (IC₅₀= 6.84 µg/ml) obtained.

Fractionation by open-column adsorption chromatography of the butanolic filtrate yielded five potentially active fractions against the two test organisms: B4 (MIC < 2 µg/ml, IC₅₀= 7.23 µg/ml), B12 (MIC < 2 µg/ml, IC₅₀ = 6.20 µg/ml), B13 (MIC = 4 µg/ml, IC₅₀= 3.56 µg/ml), B14 (MIC < 2 µg/ml, IC₅₀= 1.02 µg/ml) and B15 (MIC < 2 µg/ml, IC₅₀= 0.94 µg/ml).

Key words: *Abrahamia deflexa*, *Candida albicans*, antifungal, *Plasmodium falciparum*, antiplasmodial.

Advisors : Doctor RAVELONJATO Bernard Anselme
Professor RANDRIANARIVO Hanitra Ranjàna

Auteur : RASOANAIVO Falisoa Mbolatiana
Adresse : Lot II K 43 Mahatony Soavimasoandro
Email : falisoambolatianar@gmail.com

Titre : Contribution à l'étude phytochimique et à la caractérisation biologique des composés antifongiques et/ou antiplasmodiaux issus d'*Abrahamia deflexa*

RESUME : Ce travail a trait à la recherche de nouvelles molécules antifongiques et antiplasmodiales issues de rameaux feuillés d'une plante endémique de Madagascar, *Abrahamia deflexa* (Anacardiaceae). Le criblage phytochimique effectué sur un extrait hydroéthanolique a révélé la présence dans la plante de : stéroïdes, triterpènes, flavonoides, anthraquinones, tanins et polyphénols. Les extraits et les fractions sont évalués *in vitro* contre *Candida albicans* et *Plasmodium falciparum* chloroquino-résistant.

La macération successive à température ambiante de la poudre de plante dans l'éthanol a fourni trois extraits R1, R2 et R3. Les extraits R2 et R3 montrant peu de coloration chlorophyllienne ont été rassemblés pour donner R4. Ce dernier a subi ensuite un partage liquide-liquide par des solvants de polarité croissante et a conduit à l'obtention de quatre extraits : l'extrait hexanique ES Hex, l'extrait acétate d'éthyle ES Ac, l'extrait butanolique ES Bu et l'extrait aqueux épuisé ES Aq. Outre l'extrait ES Ac, ces extraits présentent une activité antifongique notoire (CMI < 2 µg/ml). Les extraits ES Ac (IC₅₀= 2,75 µg/ml) et ES Aq (IC₅₀=2,86 µg/ml) montrent pour leur part une très forte activité antiplasmodiale.

Le test de toxicité aiguë de l'extrait ES Ac sur des souris «SWISS» a permis d'observer des signes qui seraient imputables à une dépression du système nerveux central, ainsi l'extrait ES Ac contiendrait un principe qui agirait comme un curarisant.

Le fractionnement bioguidé de l'extrait ES Hex a fourni 20 fractions dont onze sont potentiellement intéressantes : neuf pour leurs propriétés antifongiques (CMI < 2 µg/ml) et deux pour leurs propriétés antiplasmodiales (IC₅₀ < 0,39 µg/ml). Deux fractions H17 et H20 sont dotées d'une forte activité à la fois sur les deux germe-tests.

La chromatographie sur couche mince préparative de la fraction A8 issue du fractionnement par chromatographie d'adsorption sur colonne ouverte de silice normale de l'extrait ES Ac a fourni entre autres la sous fraction A85 montrant une activité antiplasmodiale notoire (IC₅₀= 2,82 µg/ml). Les sous fractions A101 (IC₅₀= 2,42 µg/ml) et A102 (IC₅₀= 3,67 µg/ml) issues de la fraction A10 sont dotées d'une activité antiplasmodiale forte.

La précipitation des tanins de l'extrait ES Bu (IC₅₀= 15,37 µg/ml) a amélioré d'une manière significative l'activité antiplasmodiale du précipité (IC₅₀= 6,84 µg/ml) et du filtrat (IC₅₀= 6,84 µg/ml) obtenus.

Le fractionnement par chromatographie d'adsorption sur colonne ouverte du filtrat butanolique a fourni cinq fractions potentiellement actives contre les deux germes-tests : B4 (CMI < 2 µg/ml ; IC₅₀= 7,23 µg/ml), B12 (CMI < 2 µg/ml ; IC₅₀= 6,20 µg/ml), B13 (CMI = 4 µg/ml ; IC₅₀= 3,56 µg/ml), B14 (CMI < 2 µg/ml ; IC₅₀= 1,02 µg/ml) et B15 (CMI < 2 µg/ml ; IC₅₀= 0,94 µg/ml).

Mots clés : *Abrahamia deflexa*, *Candida albicans*, antifongique, *Plasmodium falciparum*, antiplasmodiale.

Encadreurs : Docteur RAVELONJATO Bernard Anselme
Professeur RANDRIANARIVO Hanitra Ranjàna