



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

INSTITUT D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
D'ANTSIRABE VAKINANKARATRA



DEPARTEMENT GENIE INDUSTRIEL

Mémoire de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du :

Diplôme de MASTER EN GENIE DES PROCEDES CHIMIQUES ET INDUSTRIELS

**Etude phytochimique du *Mangifera*
Indica L. et de son
activité antibactérienne**

Présenté par : RAZANADRAKOTO Herimanana Nalitiana Mendrika

Date de soutenance : 31 Janvier 2022



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

INSTITUT D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
D'ANTSIRABE VAKINANKARATRA



DEPARTEMENT GENIE INDUSTRIEL

Mémoire de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du :

Diplôme de MASTER EN GENIE DES PROCEDES CHIMIQUES ET INDUSTRIELS



**Etude phytochimique du *Mangifera*
Indica L. et
de son activité antibactérienne**

Présenté par : RAZANADRAKOTO Herimanana Nalitiana Mendrika

Membres du jury

Président : M.RANDRIANA Nambinina Richard Fortuné, Professeur

Rapporteur : Mme. ROBIJAONA Rahelivololoniaina Baholy, Professeur titulaire

Examineurs : Mme. RAMANAMBE RAVELOMANANTSOA Nicole, Professeur Titulaire

M. RAKOTOMAMONJY Pierre, Maître de Conférences

M. RAJOELINIRINA Vézulah, Enseignant Chercheur

Date de soutenance : 31 Janvier 2022

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, louange à Dieu, Jésus, le Tout-Puissant qui m'a donné la santé, le courage, la patience pour terminer ce mémoire et qui donne un sens digne, correct, irréprochable à mon existence.

Nous exprimons nos sincères remerciements à M. RAJAONARISON Eddie Franck, Directeur de l'Institut d'Enseignement Supérieur d'Antsirabe Vakinankaratra.

Nos sincères remerciements s'adressent également à M. RAVONISON Elie Rijatiana Hervé Chef de la Mention Génie Industriel à l'IES-AV.

Nous exprimons nos remerciements et nos vives reconnaissances au professeur RANDRIANA Nambinina Richard Fortuné, Enseignant chercheur et chef de département de Génie des procédés Chimiques et Industriels à l'Ecole Supérieure Polytechnique d'Antananarivo (ESPA) d'accepter la présidence de notre soutenance.

Nous remercions :

- Madame RAMANAMBE RAVELOMANANTSOA Nicole, Professeur Titulaire ;
- Monsieur RAKOTOMAMONJY Pierre, Maître de Conférences ;
- Monsieur RAJOELINIRINA Vézulah ; Assistant ;

pour avoir accepté d'être les examinateurs de cette soutenance.

Nous exprimons notre profonde gratitude à Madame ROBIJAONA Rahelivololoniaina Baholy Professeur Titulaire Agrégé du CAMES, pour son encadrement et sa persévérance sans relâche durant ces quelques mois. Merci d'avoir été une oreille attentive et d'avoir partagé votre expérience avec nous.

Nous remercions :

Professeur ANDRIANARISON Ravalison Edouard pour nous avoir fait confiance en nous acceptant dans son Laboratoire et de nous avoir ainsi permis de travailler dans un environnement dynamique, avec des instruments performants.

Monsieur RAZAFIMANDEFITRA André pour l'aide, les conseils et les encouragements qu'il n'a cessé de prodiguer tout au long de ce travail.

Nous remercions chaleureusement Dr ANDRIAMBELOSON Herivony Onja qui nous a accueillis dans son laboratoire au CNRE avec la bonne humeur, la gentillesse et qui nous a aidés techniquement et matériellement.

Il nous est agréable d'adresser nos remerciements à l'ensemble du personnel Enseignant du Département Génies des Procédés Chimiques et industriels ainsi que les personnels du laboratoire du Département Génies Chimiques qui ont contribué dans notre formation.

Mes derniers remerciements vont aux personnes sans lesquelles je n'aurais pas pu dépasser les obstacles de la vie : à ma famille en particulier mes parents et ma grande sœur qui m'a toujours soutenu, m'a toujours encouragée, d'avoir cru en moi tout au long de mon parcours, mes mots ne suffiront jamais pour les remercier et à l'encontre de toute personne qui a participé à la réalisation de ce travail. Que toute ma famille trouve ici l'expression de mes plus vifs remerciements pour leur soutien permanent et leur encouragement.

SOMMAIRE

GLOSSAIRES

LISTE DES ABREVIATIONS

NOMENCLATURE DES TABLEAUX ET FIGURES

NOTATIONS ET UNITES

LISTE DES ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION GÉNÉRALE

PREMIERE PARTIE : ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre I. Généralités sur le manguier

Chapitre II. Les métabolites secondaires

Chapitre III. Généralités sur la chromatographie

Chapitre IV. Généralités sur les activités antibactériennes

DEUXIEME PARTIE : ETUDES EXPERIMENTALES

Chapitre V. Extraction hydroéthanolique

Chapitre VI. Criblage phytochimique

Chapitre VII. Evaluation des activités antibactériennes des extraits

Chapitre VIII. Partage liquide-liquide

Chapitre IX. Fractionnement sur colonne ouverte

CONCLUSION

GLOSSAIRE

Antibiotique	: substance dont l'action consiste à inhiber ou à tuer les germes étrangers à l'organisme.
Antiseptique	: substance qui tue ou prévient la croissance des bactéries, champignons et des virus (micro-organismes) sur les surfaces externes ou internes du corps.
Bactéricide	: se dit d'un produit qui tue les bactéries
Bactériostatique	: se dit d'un produit qui va permettre de stopper la multiplication des bactéries.
Diurétique	: substance qui augmente l'excrétion urinaire.
Odontalgique	: douleur des dents
Phytochimie	: chimie de la plante

LISTE DES ABREVIATIONS

ATCC	: American Type Culture Collection
AcOEt	: Acétate d'éthyle
CCM	: Chromatographie sur Couche Mince
cm	: Centimètre
CMB	: Concentration Minimale Bactéricide
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
CNRE	: Centre National de Recherches sur l'Environnement
DCM	: Dichlorométhane
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
ESPA	: Ecole Supérieur Polytechnique d'Antananarivo
EtOH	: Ethanol
FeCl ₃	: Chlorure ferrique
HCl	: Acide chlorhydrique
H ₂ SO ₄	: Acide sulfurique
MeOH	: Méthanol
MH	: Muller-Hinton
mL	: millilitre
mm	: millimètre
nm	: nanomètre
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
Rf	: Rapport frontal
UFC	: Unité Formant Colonie
UV	: Ultraviolet
v/v	: volume par volume
var.	: variété

LISTE DES FIGURES

Figure I.01 : Fruit du manguier	4
Figure I.02 : Feuilles de manguier	5
Figure I.03 : Fleur du manguier	6
Figure I.04 : Noyau du manguier	6
Figure I.05 : Racine du manguier	7
Figure I.06 : Zones de production intense du manguier.....	11
Figure II.01 : Structure chimique du Strychnine.....	14
Figure II.02: Schéma de skytanthine et paravallarine	15
Figure II.03 : Schéma de cathionine et méscaline.....	15
Figure II.04 : Structure chimique du groupe phénol	16
Figure II.05 : Différents types d'acides phénoliques	18
Figure II.06 : Différente classe de flavonoïde.....	19
Figure II.07 : Structure chimique du coumarine et dérivés.....	20
Figure II.08 : Structures chimiques des unités monomériques constitutives des tanins condensés	21
Figure II.09 : Structure chimique de l'Isoprène	23
Figure III.01 : Les principaux éléments d'une séparation CCM.....	27
Figure III.02 : Schéma d'un CCM	30
Figure III.03 : Exemple de système de chromatographie flash.....	32
Figure IV.01 : Microdillution successive en milieu liquide.....	35
Figure IV.02 : Methode E-test.....	36
Figure IV.03 : AntibioGramme automatisé ou automate	38
Figure IV.04: Schéma d'un antibiogramme	39
Figure V.01 : Photo d'un rotavapor	41
Figure V.02 : Macération hydro-ethanolique des feuilles et écorce de <i>Mangifera indica</i>	42
Figure V.03 : Processus d'extraction hydroalcoolique des écorces de tiges et des feuilles	44
Figure VII.01 : Photo d'une balance de précision.....	52
Figure VII.02 : Photo d'un bain ultrason	53
Figure VII.03 : Photo d'une étuve.....	53
Figure VIII.01 : extraction liquide-liquide à l'aide d'une ampoule à décantier.....	61
Figure VIII.02 : Schéma du fractionnement.....	62
Figure VIII.03 :Partage liquide-liquide des extraits bruts des feuilles de <i>Magifera Indica L.</i>	63
Figure VIII.04 : Résultats de la CMI en milieu liquide.....	69
Figure VIII.05 : Résultats de la CMB	70
Figure IX.01 : Séparation sur colonne chromatographique	75
Figure IX.02 : Echantillon collécté dans des tubes à essai.....	75
Figure IX.03 : Profils chromatographiques en CCM des fractions 1 à 47 sous UV 254 nm.	76
Figure IX.04 : Profils chromatographiques en CCM des fractions à 1 à 47 sous UV 365 nm.....	76
Figure IX.05 : Profils chromatographiques en CCM des fractions à 49 à 103 sous UV 254 nm.....	77
Figure IX.06 : Profils chromatographiques en CCM des fractions à 49 à 103 sous UV 265 nm.....	77
Figure IX.07 : Sous-fractions recueillies dans des tubes à essai	79
Figure IX.08: Zone d'inhibition des différentes sous-fractions	80

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.01 : Caractéristiques des groupes de mangue.....	8
Tableau I.02 : Les dix premiers pays producteurs de mangue	10
Tableau III.01 : Classification des techniques chromatographiques selon les phases mobiles et selon les mécanismes de séparation.....	26
Tableau III.02 : Diamètre de la colonne en fonction de la masse de la silice	33
Tableau IV.01 : Quelques bactéries et maladies causées	34
Tableau V.01 : Tableau montrant le rendement des extractions éthanoliques	45
Tableau VI.01 : Protocole du criblage phytochimique	48
Tableau VI.02 : Récapitulation des résultats du criblage phytochimique des feuilles et écorces de mangues étudiées.....	50
Tableau VII.01 : Espèce bactérienne testée.....	54
Tableau VII.02 : Sensibilité aux différents extraits.....	56
Tableau VII.03 : Résultats des tests antibactériens des extraits de feuilles et écorces de <i>Mangifera Indica L.</i> à 100mg/ml.	57
Tableau VII.04 : Résultats des tests antibactériens des extraits de feuilles et écorces de <i>Mangifera Indica L.</i> à 200mg/ml.	58
Tableau VIII.01 : Volume des solvants et les masses initiales des extraits à partager.....	61
Tableau VIII.02 : Masse de l'extrait obtenu après partage liquide-liquide.....	63
Tableau VIII.03 : Rendement de l'extrait obtenu après partage liquide-liquide.....	64
Tableau VIII.04 : Résultat des tests antibactériens des fractions des feuilles de <i>Mangifera Indica L. Var Gasy</i>	65
Tableau VIII.05 : Résultat des tests antibactériens des fractions des feuilles de <i>Mangifera Indica L. Var vato</i>	66
Tableau VIII.06 : Résultat des tests antibactériens des fractions des feuilles de <i>Mangifera Indica L. Var Esy</i>	66
Tableau IX.01 : Système d'élution pour la séparation en chromatographie sur colonne.....	71
Tableau IX.02 : Les caractéristiques des produits isolés par fractionnement sur colonne ouverte de la fraction AcOEt.....	79
Tableau IX.03 : Résultats de l'activité antibactérienne des sous-fractions	80

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Protocol du sreenning phytochimique des extraits bruts

INTRODUCTION GENERALE

L'Organisation mondiale de la santé a estimé que 80 % des personnes dans le monde dépendent des médicaments à base de plantes pour se soigner. Pour de nombreuses communautés des pays en développement, comme Madagascar, les produits pharmaceutiques antibactériens ne sont pas accessibles à la majorité des gens qui en ont besoin à cause de leur cherté ou par l'éloignement géographique. Or les infections bactériennes sont l'une des principales causes de problèmes de santé, des handicaps physiques et de mortalité dans le monde.

Pour ces raisons, la recherche de produits végétaux aux propriétés antibactériennes s'est intensifiée ces dernières années. En effet, l'usage d'extraits de plante contenant des constituants bioactifs est devenu une approche très importante dans la médecine. De nombreuses plantes médicinales dans le monde contiennent des composés à activité antibactérienne y compris le manguier. Bien que l'utilisation de ces plantes médicinales ait augmenté, leur qualité, leur sécurité et leur efficacité sont de sérieuses préoccupations dans les pays industrialisés que dans les pays en développement.

Le manguier, cinquième production fruitière mondiale, un des arbres fruitiers les plus répandus à Madagascar, est une des plantes ayant une propriété antibactérienne. Sa production constitue une activité importante pour le pays et apporte à l'économie nationale un revenu monétaire satisfaisant, elles contribuent également à améliorer l'alimentation de la population locale. De par la nature solide de l'arbre, le faible coût de maintenance et sa production abondante, il constitue l'une des solutions durables pour lutter contre la déforestation. L'intérêt porté à cet arbre est dû en partie à son fruit. Cependant, la valorisation des autres parties de l'arbre comme les feuilles, l'écorce est encore peu ou mal exploitée.

C'est dans ces contextes que la présente étude a été menée et vise à élucider les principales familles chimiques du *Mangifera Indica L.* ainsi qu'à déterminer l'activité antibactérienne des extraits issus des feuilles et des écorces de quatre variétés.

Ce mémoire est subdivisé en deux parties : la première partie présente les généralités sur la plante à étudier, le métabolite secondaire, la chromatographie ainsi que l'activité antibactérienne. La deuxième partie intitulée « étude expérimentale » comporte l'extraction hydroéthanolique des feuilles et écorces du *Mangifera Indica L.*, le criblage phytochimique, le fractionnement sur colonne ouverte de l'extrait « acétate d'éthyle de feuille du *Mangifera Indica L. var Vato* ainsi que les tests antibactériens effectués sur les différents extraits.

**PARTIE I : Etudes
bibliographiques**

Chapitre I. Généralité sur le manguiier

I.1. Origine et histoire du manguiier

Le manguiier est un arbre originaire de la région indo-birmane. La mangue est le fruit le plus ancien de l'Inde et son histoire est liée très intimement à la religion hindoue. Lors des manifestations hindoues et presque toutes les cérémonies, des guirlandes de feuilles de manguiier sont utilisées en décoration.

La culture du manguiier s'est rapidement étendue dans les pays voisins et de façon intensive dans le Sud-est asiatique dès le IV^e ou V^e siècle avant Jésus Christ.

Le manguiier est introduit dans l'archipel des Philippines par des missionnaires et les pirates entre 1400 et 1450.

Avant la colonisation, les Africains ont joué un rôle important dans la dissémination du manguiier dans toute l'Afrique intertropicale. Il est introduit à Madagascar au X^e siècle par les Arabes et les Indiens.

Les navigateurs portugais ont propagé le manguiier jusqu'au Brésil, d'où il s'est répandu vers l'Amérique du Sud puis du Nord. Il n'a été introduit en Australie qu'au cours du XIX^e siècle. Quelques implantations ont eu lieu en Europe du XVII^e au XIX^e siècle, mais sans réelle réussite.

Il est maintenant présent dans tous les pays tropicaux et est cultivé avec une intensité croissante dans certains pays dont l'Amérique centrale et l'Amérique du Sud, Hawaï et toute la zone des Caraïbes, en Asie du sud-est, aux Philippines, en Australie, en Afrique de l'Est et du Sud, en Egypte et en Israël.

I.2. Nomenclature

Au 16^e siècle, le nom « mangas » a été utilisé par Garcia da Orta (1563) dans son « Colloquies on simples and drugs of India » pour décrire le manguiier. C'est de ce nom que sont dérivés les termes anglais et le nom botanique. C'est Bontius (1658) qui invente le nom *Mangifera* signifiant arbre portant des mangues. *Mangifera indica* L. signifie littéralement « plante indienne portant des mangues ». (Goulhot., 1996)

I.3. Classification et description botanique du manguier

I.3.1. Classification

Le manguier, un arbre fruitier des régions tropicales - à saison bien marquée - dont le nom scientifique est « *Mangifera Indica L.* » produit les mangues et est décrit en classification systématique suivant la taxonomie suivante :

Règne	: Plantae
Sous-règne	: Viridaeplantae
Division	: Mangoliophyta
Classe	: Mangoliopsida
Sous-classe	: Mangoliidae
Ordre	: Sapindales
Famille	: Anacardiaceae
Genre	: Mangifera
Espèce	: Mangifera indica L,

Il est à noter que la famille « Anacardiacées » regroupe de nombreuses espèces comme l'anacardier produisant les noix de cajou. Le manguier est issu de *Mangifera indica* et est appelé sous différent nom vernaculaire à travers le monde, à Madagascar c'est sous le nom de « Manga » qu'il est désigné.

L'appellation de la mangue est différente d'un pays à l'autre : en France c'est sous le nom de Mangue qu'il est appelé, au Comore (maore) : manga, mango (anglais) ; manako, meneke (archipel d'Hawaii), mangobaum en Allemagne, mangueira (Portugal), pohon mangga (Indonésie).

I.3.2. Description botanique

Le manguier (*Mangifera indica L.*) est un arbre tropical à fort développement (10 à 30 m de haut). Elle est décrite selon les caractéristiques suivantes :

I.3.2.1. Fruits

Le manguier est une drupe, ou fruit à noyau, contenant une grosse graine unique entourée d'une pulpe charnue et d'une peau fine et coriace. La graine aplatie est protégée par un tégument lignifié. Il produit de gros fruits de forme ovale qui sont rouges et jaune orangé à maturité, bien que certains cultivars soient verts ou jaunes.

Les fruits du manguier peuvent être fermes, mais sont le plus souvent juteux. Leur grosseur varie énormément : 50 g à plus de 2 kg. La peau ou épicarpe est assez mince, mais coriace. Les mangues des bonnes variétés dégagent à maturité, une odeur agréable, la chair est sucrée, très légèrement acidulée, la saveur varie suivant la variété.



Figure I.01 : Fruit du manguier

Source : Vannière, 2013

Le manguier commence à porter des fruits quatre à six ans après la plantation et continue à produire des fruits pendant environ 40 ans. Les arbres de plus de 10 ans ont tendance à porter des fruits alternés ou bisannuels, produisant des fruits tous les deux ans.

I.3.2.2. Feuilles

Le manguier porte des feuilles entières et persistantes. Les feuilles, oblongues et lancéolées, atteignent 15 à 40 centimètres. Les feuilles à bords lisses des manguiers sont rougeâtres lorsqu'elles sont jeunes, devenant vert foncé et brillants lorsqu'elles murissent. Elles sont rainurées sur la face supérieure. Au début de leur vie, elles jouent un rôle inhibiteur sur le développement du bourgeon apical et des subapicaux. Elles tombent et se renouvèlent tout au long du cycle végétatif, laissant une couronne abondante et permanente.



Figure I.02 : Feuilles du manguier

Source : fr.dreamstime.com

I.3.2.3. Fleurs

L'arbre produit de petites fleurs blanc rosé, jaunâtres ou rougeâtres. Ces fleurs sont petites (6 mm environ), et sont groupées 3 par 3 sur de courts pédicelles. Les fleurs prennent naissance par centaines sur des panicules d'une trentaine de centimètres de long. Elles sont odorantes et mellifères. Elles sont constituées de fleurs mâles et de fleurs hermaphrodites. Habituellement ce sont les fleurs mâles que l'on trouve en plus grandes quantités. Chez le manguier la pollinisation est essentiellement croisée, car les organes mâles et femelles ne sont pas matures en même temps, et elle est assurée par de petits insectes comme les thrips, les aphides et les mouches. Le pourcentage de fleurs fécondées varie de 3 à 35 % bien que la production de pollen soit très abondante. On observe chez le manguier, une alternance de production : soit régulière, forte récolte tous les deux ans, soit un espacement plus grand entre les fortes récoltes. Il s'agit d'un phénomène lié à la variété, ou à des conditions climatiques défavorables. (Nakasone et Paul., 1998)



Figure I.03 : Fleur du manguier

Source : Wikipédia

I.3.2.4. Noyau

Le noyau central est plat, assez grand, plus ou moins renflé au milieu. Le noyau est protégé par une coque lignifiée ou endocarpe. L'endocarpe est plus ou moins garni de fibres extérieures qui peuvent pénétrer dans la chair ; celles-ci sont plus ou moins nombreuses, dures et résistantes suivant les variétés. Cet endocarpe contient la semence qui comprend 2 cotylédons, souvent plusieurs dans les amandes polyembryonnées, généralement oblongues, parfois réniformes. Les cotylédons peuvent remplir et gonfler l'endocarpe ou n'occuper qu'une partie de la cavité. La semence est prête à germer dès que le fruit est mûr, sans période de dormance.



Figure I.04 : Noyau du manguier

Source : blume, 2014

I.3.2.5. Ecorce

L'écorce est épaisse et rugueuse et présente des petites fissures. L'épaisseur de l'écorce peut atteindre 20 cm. La couleur est habituellement gris foncé, presque noir. Elle exsude une résine.

I.3.2.6. Racine

Le développement d'une racine pivotante caractérise le système racinaire du manguier. Après la germination, la radicule s'allonge rapidement pour former un pivot qui ne donne au départ que quelques ramifications, assurant l'ancrage de l'arbre dans le sol. Ce pivot, s'il ne rencontre pas d'obstacle, continue à s'enfoncer profondément dans le sol. D'autres racines verticales se forment à partir des racines de surface, se situent vers 1,20 m de profondeur avec un rayon de 1,80 m. (Laroussilhe., 1980)



Figure I.05 : Racine du manguier

Source : fr.dreamstime.com

I.4. Diversité du manguiier, Ecologie et répartition

I.4.1. Diversité

Un millier de types ou variétés a été répertorié, sachant qu'un même type ou variété peut être dénommé de plusieurs façons selon les pays. Il comprendrait 1000 variétés présentes sur divers continents. Nous citerons ci-après quelques variétés présentes dans le monde ainsi que les variétés existant à Madagascar.

I.4.1.1. Variété

Il existe aujourd'hui de par le monde certainement plus de mille variétés différentes. Originellement, on distingue deux grandes familles de manguiers, aux caractéristiques bien spécifiques et en fonction de la zone de production : la sous-région indienne ou l'Asie tropicale. Le tableau suivant (tableau I.01) explicite leurs caractéristiques.

Tableau I.01 : Caractéristiques des groupes de mangue

Critères	Indienne	Asie tropicale
Zone de diversification	Inde, Pakistan	Birmanie, Malaisie, Philippines
Graine	Monoembryonnée	Polyembryonnée
Forme	Arrondie à ovoïde	Allongée à section cylindrique ou aplatie
Couleur de l'épiderme	Jaune à orange parfois taché de pourpre	Vert à vert jaunâtre, pourpre absent
Goût	Prononcé	Moins prononcé
Remarque	Sensible à l'antracnose	Résistant à l'antracnose

Source : (FruiTrop, 2009)

Les variétés actuellement les plus répandues et les plus appréciées dans le monde (au niveau coloration externe, esthétique, goût) sont les suivantes :

- Kent : de forme ovoïde, ayant une couleur de base jaune verdâtre,
- Keitt : Ses fruits sont de forme ovale, la peau a une couleur jaune avec des taches rouges très visibles

Néanmoins ces variétés ont des défauts qui ne sont pas toujours pris en cause (calibre, sensibilité à des maladies (anthracnose, bactériose...), et d'autres variétés pourraient venir compléter la liste de variétés intéressantes dont la variété Kensington, la variété Sensation).

I.4.1.2. Variété à Madagascar

Nous ne citerons ici que les variétés qui existent à Madagascar. La population de manguiers à Madagascar se caractérise par une grande diversité variétale. En effet, il a été recensé trente-neuf (39) variétés différentes de manguiers dont certaines pourraient être propres à des terroirs ou milieux agro-écologiques bien déterminés. (A.LEFÉBVRE., 1973)

Couvrant une superficie de 6,20 ha, la collection regroupe :

- Six variétés locales : Be, Diégo (Fruits petits, ovales, de couleur jaune orangé et rouge), Grosse Station Tsararano, Hiesy (fruits moyennement grands, de forme ovale et de couleur jaune et vert), Lava, Vato.
- Trente-trois variétés importées : Adams, Alphonse, Amélie, améliorée du Cameroun, Bewerley, Brook's, Cambodiana, Carambao, Cogshall, Dabsha Drahnet, Davis Haden, Divine, Dixon, Early Gold, Eldon, Fascell, Francis, Haden, Irwin, Julie, Keitt, Kent, Miam i Late, Pahieri, Palmer, Pêche, Ruby, Sabot, Sensation, Smith, Springfels, Valencia, Zill.

I.4.2. Ecologie

La température conditionne le développement et la croissance du manguiers. Le manguiers est un arbre assez résistant, cependant il supporte difficilement des températures inférieures à 5 °C, sa température de développement optimale est entre 23 et 27 °C, mais il peut résister à des fortes chaleurs (supérieurs à 45 °C) lorsqu'il est ombragé par des haies. Les mangues sont cultivées dans les climats tropicaux et tempérés chauds.

Le manguiers pousse dans des régions où la pluviométrie annuelle varie de façon très importante. Ses exigences en eau concernent le volume reçu et aussi sa répartition durant l'année. On estime entre 700 et 800 mm par an le volume d'eau nécessaire pour assurer une production destinée à la commercialisation. Dans les zones recevant moins de 750 mm par an, les vergers devront être irrigués. La pluie pendant la floraison provoque la chute des fleurs.

Le manguiers est peu exigeant en termes de sol, devrait être assez profond, au-delà de deux mètres. Un sol aéré et bien drainé favorise un bon enracinement et, par conséquent, une production satisfaisante. Le manguiers se développe bien dans les sols ferrallitiques, il demande surtout des sols sains, sablolimoneux, pH compris entre 5,5 et 7,5.

La production de mangue varie fortement selon la zone de culture, du verger ou de l'itinéraire technique. Selon les références, les rendements varient entre deux tonnes par hectare et 30 tonnes par hectare (Crane, 2008 ; Menzel et Le Lagade, 2017).

I.4.3. Répartition

I.4.3.1. Dans le monde

On trouve le manguier partout dans les régions tropicales du monde où il est utilisé comme plante horticole et médicinale. L'Inde est le plus gros producteur, avec 71 % de la récolte mondiale de mangues. Cinquante pourcent des mangues du monde poussent en Inde. Ils produisent environ dix-neuf-millions de tonnes par an sur une production mondiale totale. La Chine arrive en deuxième position suivie de la Thaïlande, puis le Mexique, l'Indonésie se trouve en cinquième position, vient ensuite le Pakistan, le Brésil, l'Égypte, Bangladesh et le Soudan en dixième position.

Le tableau suivant expose les dix premiers pays producteurs du monde avec leur production annuelle en millions de tonnes.

Tableau I.02 : Les dix premiers pays producteurs de mangue

Pays producteur	Production (en millions de tonnes)
Inde	18,8
Chine	9,4
Thaïlande	3,4
Mexique	2,2
Indonésie	2,2
Pakistan	1,6
Brésil	1,4
Égypte	1,3
Bangladesh	1,2
Soudan	1,1

Source : FAO, 2016

En Afrique, la Côte d'Ivoire est le premier pays africain exportateur de mangue et le Troisième fournisseur du marché européen.

Actuellement, l'aire de culture du manguier est restreinte aux zones tropicales et sub-tropicales du globe, situées entre la latitude 30 ° S est 35-37° N du sud de l'Espagne.

La figure suivante indique les zones de production intense du manguier.

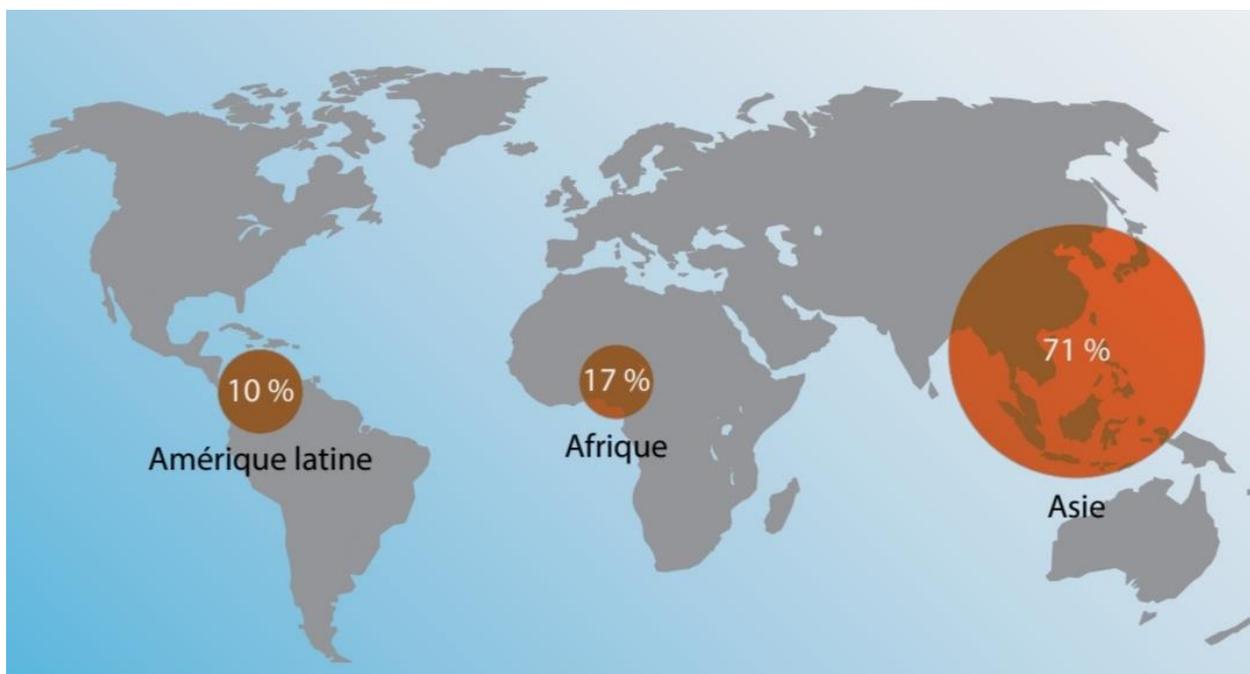


Figure I.06 : Zones de production intense du manguier

Source : (FAO, CIRAD, 2016)

I.4.3.2. A Madagascar

Le manguier se rencontre un peu partout à Madagascar jusque vers 1600 m, où il supporte bien les basses températures. La production tourne autour de 210 000 tonnes. Les provinces du Nord-ouest et l'île de Nosy be sont les stations favorites où il y s'est naturalisé et devient magnifique. Au moins cinquante pourcent (50 %) de la production proviennent des Régions de Boeny, Sofiaet Diana. Dans la région centrale, on trouve de nombreux vergers de manguier ou malgré la sécheresse et l'extrême pauvreté du sol, qui font les arbres chétifs, on récolte des fruits chaque année.

I.5. Utilisation traditionnelle et vertus thérapeutiques

L'usage des plantes médicinales subsiste dans les régions rurales où l'automédication représente un aspect très important des soins primaires. La *Mangifera indica* L. est une plante horticole et médicinale courante, utilisée traditionnellement pour traiter diverses infections.

Bien que la partie de la plante la plus couramment utilisée soit le fruit, le manguier a une variété d'utilisations traditionnelles qui utilisent les racines, la peau, l'écorce de tige, les feuilles, les fleurs et les noyaux de graines. Ces parties contiennent généralement de plus grandes quantités de composés bioactifs, y compris la mangiférine, que le fruit.

I.5.1. Fruit

Les fruits du manguier sont des fruits exotiques riches en vitamine C (44mg/100g), vitamine essentielle à l'organisme, et sont bons source de fibres. Ils sont utilisés pour les problèmes ophtalmiques. Il semblerait donc qu'une augmentation de la consommation de fruits tels que la mangue permettrait de limiter les risques d'avitaminose A, pigment qui intervient dans la vision des couleurs. Ainsi les fruits du manguier préviennent la dégénérescence des photorécepteurs et donc la DMLA qui touche les personnes âgées. Ils contribuent notamment aux défenses de l'organisme.

Les fruits du manguier constituent non seulement une source de revenus, mais ils contribuent également à améliorer l'alimentation de la population.

Les mangues contiennent également du cuivre (0,100 mg/100g) qui stimule la production des hématies, globules rouges fixant l'oxygène. D'autres minéraux essentiels comme le magnésium et le calcium sont apportés.

Les mangues contiennent des antioxydants, qui luttent contre les radicaux libres et le vieillissement cellulaire. Les substances contenues dans la mangue préviennent aussi l'apparition de cancer.

I.5.2. Feuille

En médecine traditionnelle, on faisait bouillir les feuilles de mangues et on utilisait l'eau pour traiter ou prévenir de nombreuses affections et d'autres maladies. En effet, les feuilles de manguier bouillies régularisent la pression sanguine et renforcent les vaisseaux sanguins.

Au 19^{ème} siècle, Descourtiz préconisait l'usage des feuilles comme odontalgique. Ses feuilles sont connues, notamment au Sénégal, comme renfermant des propriétés antiseptiques. En effet les feuilles de manguier sont utilisées dans le traitement des brûlures, plaies, abcès et autres infections dont les humains et les animaux en souffrent dans un certain nombre d'enquêtes ethnobotanique (Nadan Herbal Pharmacy, 1972-2003 ; Duc, 1997 ; Bukenya & Kamoga, 2003 ; Tabuti et al., 2003).

Les feuilles de manguier ont été utilisées par les Chinois de l'Antiquité pour traiter l'asthme et le diabète. Les feuilles sont chargées de composés actifs qui font de ces feuilles un excellent remède. De plus, elles peuvent aider à éliminer les toxines de l'organisme et peuvent même protéger contre les allergies. Les feuilles sont également utilisées pour traiter la fièvre, la toux et surtout les diarrhées, simples ou associées à des vomissements.

L'intérêt du manguier dans les problèmes gastro-intestinaux se révèle très important étant donné la gravité et la fréquence de ces troubles dans les pays en voie de développement.

I.5.3. Noyau

Le noyau de mangue a des vertus assez intéressantes spécialement pour lutter contre les vers intestinaux. En effet, selon Descourtiz, il préconisait l'usage de l'amande comme anthelminthique et anti syphilitique. La décoction des noyaux passait pour être vermifuge, anti-diarrhéique et anti-hémorroïdaire. Le beurre de mangue extrait du noyau est un produit très riche en acides gras dotés de propriétés nutritives exceptionnelles.

I.5.4. Ecorce

Parmi les plantes utilisées de façon courante lors de pathologies diverses, on retrouve le manguier dont l'écorce de tige est utilisée en décoction pour traiter les maux de ventre associés aux règles. L'écorce de manguier est également utilisée par la population en macération en cas de troubles hépatiques.

L'écorce et les feuilles sont utilisées fréquemment dans tout le pays pour traiter les problèmes de bouche : inflammation, infections, plaies... (Patel., 1988 et Srinivasan., 1982). Ils sont également employés lors d'affections gastro-intestinales (diarrhées, gastrite, dysenterie, digestion difficile) et sont considérés efficaces contre les bronchites, les rhumes, la toux et l'asthme (Longuefosse., 1995). L'écorce de manguier est également utilisée pour éliminer les mauvaises odeurs et/ou démangeaisons vaginales ainsi que de réduire les pertes vaginales.

I.5.5. Racine

Les décoctions de racines sont utilisées traditionnellement pour traiter la malaria (Chabra - 1987). La racine de manguier est utilisée par les tradipraticiens pour arrêter les saignements, elles renforcent le phénomène de la coagulation.

I.5.6. Bois

Le bois du manguier, dont la teinte se rapproche du noyer, est utilisé en ébénisterie.

Chapitre II. METABOLITES SECONDAIRES

Les métabolites secondaires sont des molécules qui, par exclusion, n'appartiennent pas aux métabolismes primaires. Ce sont des composés chimiques synthétisés par les plantes.

On peut classer les métabolites secondaires en plusieurs grands groupes : parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpènes et stéroïdes et les composés azotés, dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine. Quelques exemples représentatifs sont présentés ci-après.

II.1. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques d'origine végétale, azotée, à caractère alcalin. Ils possèdent des structures hétérocycliques et se retrouvent dans environ 20 % de toutes les espèces de plantes.

Leurs structures moléculaires sont complexes, douées des propriétés physiologiques prononcées même à faible dose. Ils constituent un des groupes de métabolites secondaires contenant plus de 10 000 à 12 000 structures.

On distingue les différents types suivants :

- Les alcaloïdes vrais dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocycle et doué, à faible dose, de propriétés pharmacologiques marquées. Exemple : la strychnine dérivée du tryptophane

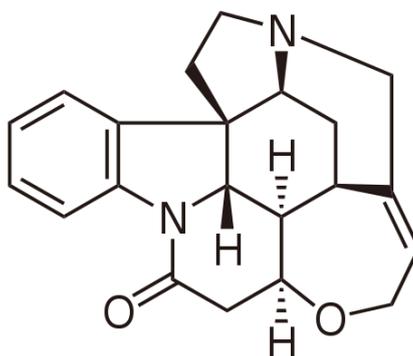
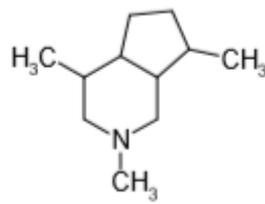


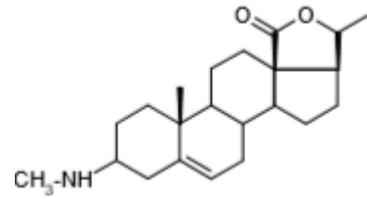
Figure II.01 : Structure du Strychnine

Source : Antoine Gravot ; 2009

- Les pseudoalcaloïdes : présentent les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés, ex : alcaloïdes terpéniques et alcaloïdes stéroïdiques



Skytanthine

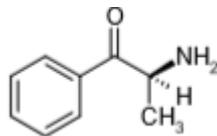


Paravallarine

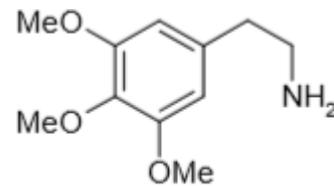
Figure II.02 : schéma de skytanthine et paravallarine

Source : Sahraoui W

- Les proto-alcaloïdes : sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique, mais ils sont élaborés à partir d'acides aminés, ex : sérotonine, mescaline...



(-)-cathionine



Mescaline

Figure II.03 : schéma de cathionine et mescaline

Source : Sahraoui W

Les alcaloïdes présentent des activités pharmacologiques très intéressantes et très variées :

Sur le système nerveux central : Dépresseur (morphine et scopolamine), stimulant (caféine, strychnine)

Sur le système nerveux autonome : sympathomimétique (éphédrine), sympatholytique (yohimbine et certains alcaloïdes de l'ergot de seigle), parasymphatomimétique (ésérine, pilocarpine), parasymphatomolytique (atropine et hyoscyamine), ganglioplégique (spartéine, nicotine)

Au niveau vasculaire : hypertenseurs (éphédrine, hydrastine), hypotenseur (yohimbine), la vincamine améliore la circulation cérébrale.

Autres actions : Curarisant et anesthésiques locaux (cocaïne), antifibrillants (quinidine), antitumoraux (vinblastine, ellipticine), antipaludiques (quinine), amoebicides (émétines). Ils agissent à faibles doses et présentent une forte toxicité parfois même à très faible dose (aconitine).

II.2. Les composés phénoliques

De nombreuses plantes médicinales contiennent de grandes quantités d'antioxydant. Cette activité est principalement due à la présence de composés phénoliques. Les polyphénols sont des alcools aromatiques qui proviennent des végétaux. Ils sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les phénols simples, déchets du métabolisme végétal, sont assemblés en polyphénols comme la lignine. Les composés phénoliques définissent un ensemble de substances que l'on a appelées pendant longtemps les matières tanniques, d'une façon générale et imprécise parce qu'on ne connaissait pas, avec suffisamment de précision, la nature de ces substances. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction, éther, ester, hétéroside. Les principales familles de composés phénoliques sont : les acides-phénols, les flavonoïdes, les coumarines, les anthocyanes, et les tanins. (Bruneton et al, 1987 ; 1999), (CIRAD, 2005 ; Suja et al., 2005 ; Lucrecia et Nazareno, 2006 ; Pereira et al., 2006).

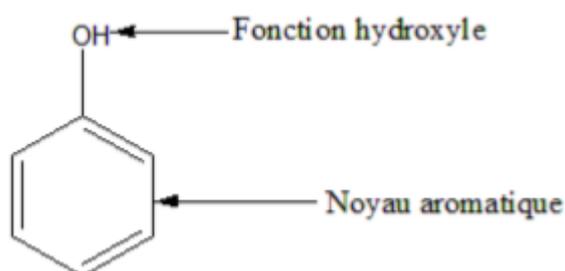


Figure II.04 : Structure chimique du groupe phénol

Source : J. Vercauteren ; 2011-2012

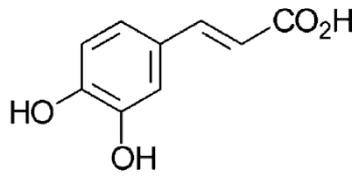
Leurs nombreuses propriétés pharmacologiques in vitro sont généralement liées à leur affinité pour les protéines et à leurs propriétés antioxydantes

Des études épidémiologiques récentes montrent qu'une alimentation riche en polyphénols est corrélée à un faible risque de développer des maladies cardiovasculaires et des cancers, ce qui suggère une activité antioxydante in vivo pour les polyphénols. En effet les composés phénoliques sont des molécules susceptibles de complexer certains ions, en particulier le fer et le cuivre, qui induisent des oxydations d'acides gras.

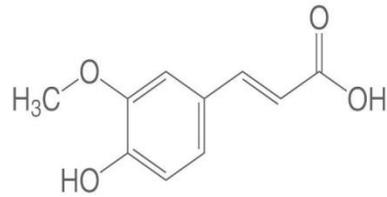
II.2.1. Les acides phénoliques ou phénols simples

Les acides phénoliques sont largement répandus chez les plantes. Ils dérivent principalement de l'acide benzoïque comme l'acide gallique ou de l'acide cinnamique comme l'acide caféique. Ils se trouvent souvent sous la forme de glycosides ou d'esters.

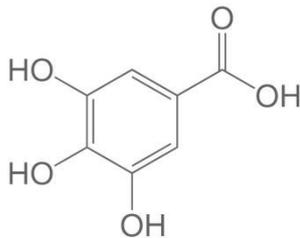
Ils sont considérés comme substances phytochimiques avec des effets probiotiques, antioxydant, de chélation et antiinflammatoire. De toxicité très faible, ils sont considérés comme non toxiques.



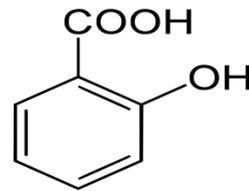
Acide caféique



Acide férulique



Acide gallique



Acide salicylique

Figure II.05 : Différents types d'acides phénoliques

(Source : J. Vercauteren ; 2011-2012)

II.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques ou aromatiques responsables des colorations jaunes et orange de nombreuses fleurs, de fruits et parfois de feuilles jeunes sénescents. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux.

Ce sont des composés présentant une grande diversité de structure et s'organisant toujours autour d'un squelette 2-phénylchromone, dérivant biosynthétiquement du 1,3-diphénylpropane (C6-C3-C6), la chaîne en C3 étant souvent fermée en un hétérocycle oxygéné hexa- ou pentagonal.

En se basant sur leur squelette, les flavonoïdes au sens large se répartissent en plusieurs classes : anthocyanes, flavonols, isoflavonols, flavones, isoflavones, flavanes, isoflavanes, flavanols, isoflavanols, flavanones, isoflavanones et auronnes.

Ils présentent un pouvoir antioxydant en captant des espèces réactives oxygénées et des radicaux libres provoquant la diminution de stress oxydant.

Les flavonoïdes ont un important champ d'action thérapeutique, avec de nombreuses vertus médicinales : propriétés anti-inflammatoires et antivirales, effets protecteurs sur le foie, propriétés antimicrobiennes, antiulcéreuses, antispasmodiques et antidiarrhéiques.

On attribue aux flavonoïdes des propriétés d'augmentation de la résistance capillaire et de diminution de la perméabilité membranaire. Un des plus actifs des flavonoïdes est la quercétine

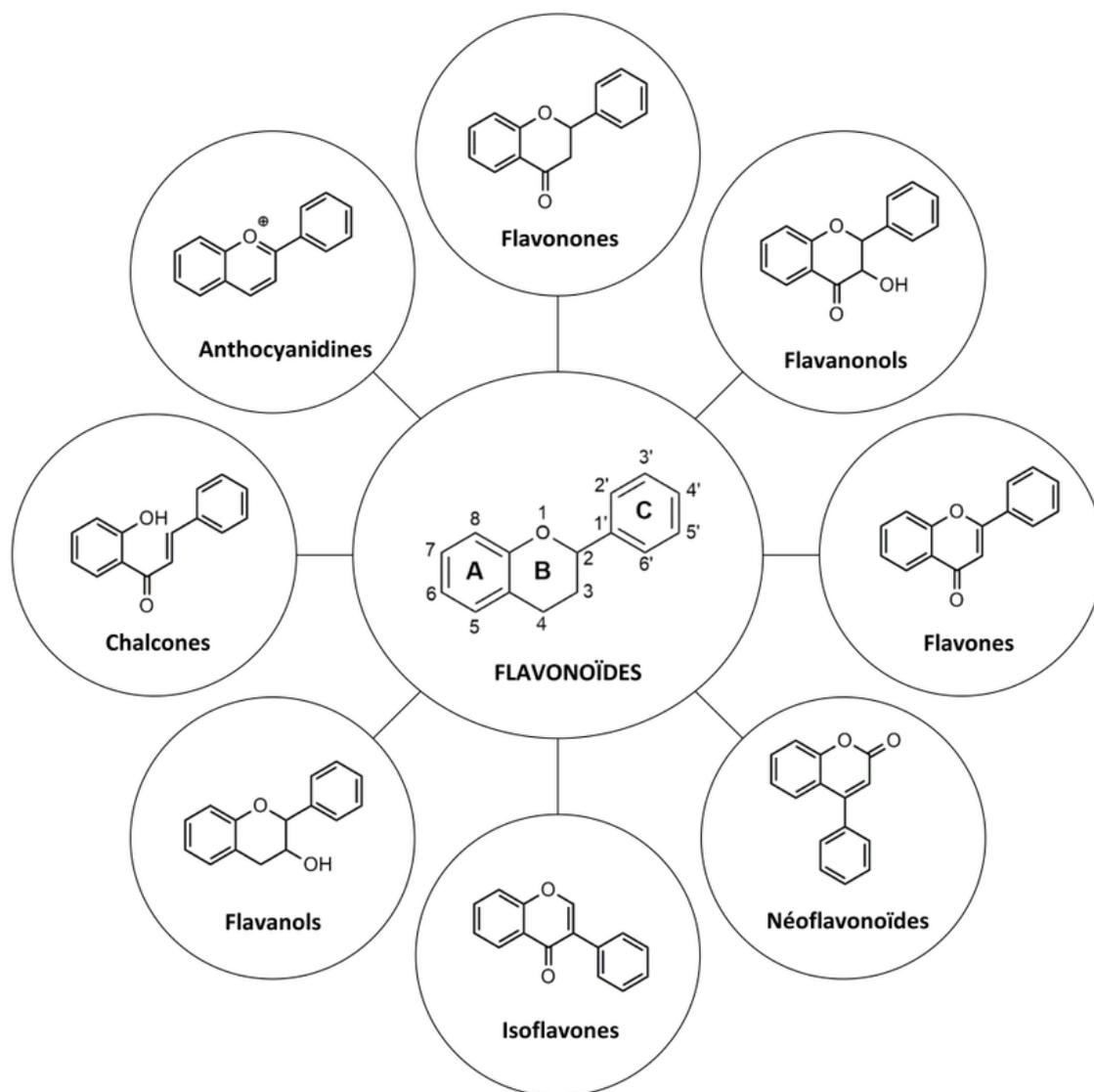


Figure II.06 : différente classe de flavonoïde

Source : Rousserie, 2019

II.2.3. Les coumarines

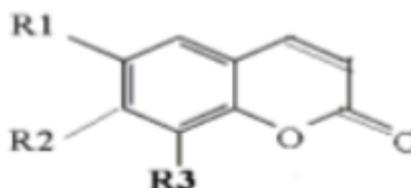
Les coumarines tirent leur nom de (coumarou) nom vernaculaire de la fève tonka (Willd., Fabaceae) d'où fut isolée, en 1820, la coumarine. Les coumarines sont des substances naturelles organiques aromatiques. Ce sont des substances possédant un ou plusieurs groupements phénoliques étherifiés ou non. L'origine de formation biologique des coumarines est la cyclisation ou plus exactement la lactonisation des acides cinnamiques en coumarines. Les coumarines sont fréquemment hydroxylées en position 7 et ces hydroxyles peuvent être méthylés ou engagés dans une liaison hétérosidique.

On les divise en :

- Coumarines simples : plus répandues dans le règne végétal possèdent des substitutions (OH ou OCH₃) en 6 et 7

Coumarines complexes où un noyau furanne ou pyranne est associé au noyau benzo a pyrone.

On distingue : les furocoumarines (ou furanocoumarines), les pyranocoumarines.



R₁ = R₃ =H, R₂ = OH : Ombelliférone

R₁ = R₂ =OH, R₃ =H: Esculétol

R₁ = OCH₃, R₂ = R₃ =OH : Fraxétol

R₁ =OCH₃, R₂ =OH, R₃ =H : Scopolétol

Figure II.07 : coumarine et dérivés

Source : (Wang et Mazza, 2002)

L'intérêt pharmacologique des drogues à coumarines est limité. L'esculoside est présenté comme étant veinotrope et vasculoprotecteur, parfois qualifié de facteur vitaminique P [Bruneton, 1987].

Certains furocoumarines sont photosensibles, et de ce fait ont comme indication thérapeutique le traitement du psoriasis et celui du vitiligo. La coumarine a été utilisée pour ses propriétés : Anti-œdémateuses, Anti-inflammatoire, immunostimulant.

II.2.4. Les tanins

Les tanins sont des composés phénoliques solubles dans l'eau et les solvants polaires. Historiquement, ils servaient à tanner la peau et permettaient de transformer la peau fraîche en matériaux imputrescibles tels que le cuir. Biogénétiquement, ils proviennent du métabolisme des flavonoïdes. Ils jouent le rôle d'armes chimiques défensives contre certains parasites.

Les tanins sont subdivisés en deux classes différentes, largement distribuées chez les végétaux supérieurs : Tanins hydrolysables et Tanins condensés ou non hydrolysables.

Les tanins hydrolysables sont des esters de glucose (ou de molécules apparentées) et d'acides phénoliques qui après hydrolyse acide donnent :

- Soit de l'acide gallique, on parle alors de tanins galliques
- Soit de l'acide éllagique, on parle alors de tanins éllagiques

Tanins condensés ou les proanthocyanidines se distinguent par leur nombre d'unités monomériques et le type de liaison les reliant entre elles. Ils présentent des liaisons C-C non hydrolysables entre les unités. Ce sont des polymères de flavan-3-ols appelés aussi tanins catéchiques.

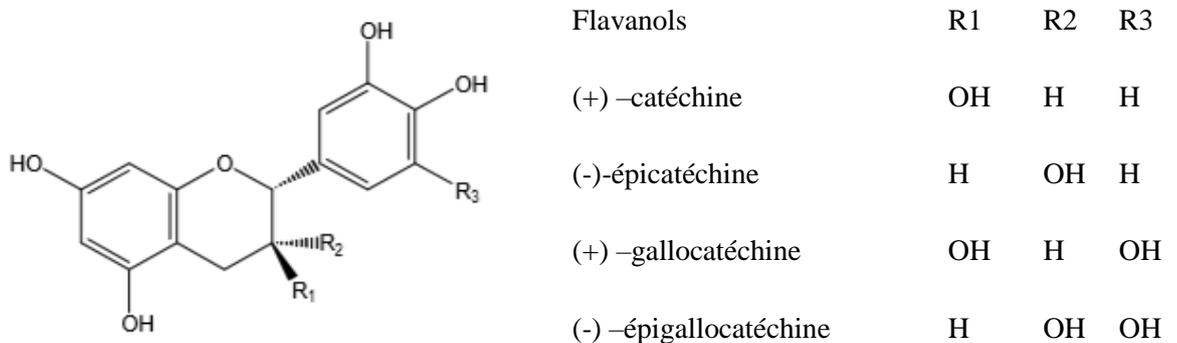


Figure II.08 : Structures chimiques des unités monomériques constitutives des tanins condensés

Source : LEPICIER Clotilde 2012

Les tanins sont des antiseptiques très connus. De plus, leur affinité pour les protéines leur confère un effet antidiarrhéiques. Les tanins sont également très connus sur leur effet antioxydant dû à leur noyau phénol, et ont aussi des effets antimicrobiens sur différents bactéries, virus et champignons.

II.2.5. Les anthocyanes

Les dérivés anthocyaniques (du grec *auto* : fleur et *kyanos* : bleu) ont un rôle de chromophores et sont ainsi en partie responsables des couleurs orange ($\lambda=480-490$ nm), rouge ($\lambda=490-500$ nm), violettes ($\lambda=560-580$ nm) et bleues ($\lambda=580-595$ nm) des fruits et des fleurs

Ce sont des composés phénoliques sensibles à plusieurs facteurs physicochimiques tels que le pH, la température et les lumières. Leurs instabilités en solution aqueuse présentent un inconvénient pour une utilisation en tant que colorants dans l'industrie.

Il existe trois catégories de pigment anthocyaniques, le chromophore flavylium étant commun aux trois. On distingue :

- Les 3 -déoxyanthocyanidines
- Les anthocyanidines
- Les anthocyanes

II.3. Les terpénoïdes et les stéroïdes

Les terpénoïdes sont des métabolites secondaires synthétisés par les plantes, organismes marins, les champignons et même les animaux.

Issus des mêmes précurseurs, et formés à partir de l'assemblage d'unités à 5 carbones ramifiées, communément appelée Isoprène, dérivées du 2 -méthylbutadiène (polymères de l'isoprène), les terpénoïdes et les stéroïdes constituent probablement la plus large classe de composés secondaires

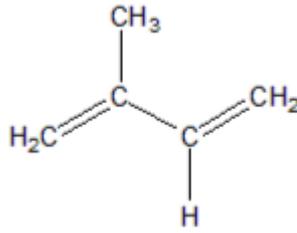


Figure II.09 : Isoprène

Source : J. Vercauteren ; 2011-2012

Les terpénoïdes sont les constituants majoritaires des huiles essentielles. Plusieurs d'entre eux sont exploités dans le domaine d'aromathérapie et par les industries pharmaceutiques pour leurs nombreuses vertus thérapeutiques.

Le nombre d'unités isopréniques définit les différentes classes de terpènes :

- monoterpènes (C10),
- sesquiterpènes (C15),
- diterpènes (C20),
- sesterterpènes (C25),
- triterpènes (C30) et
- tétraterpènes (C40).

Chapitre III. GÉNÉRALITÉS SUR LA CHROMATOGRAPHIE

La chromatographie est utilisée dans divers domaines, tels que la chimie fine, la parfumerie, l'œnologie, l'industrie pétrolière, la biologie, l'industrie des matières plastiques, etc.

III.1. Définition

C'est une technique d'analyse qualitative et quantitative dans laquelle l'échantillon contenant une ou plusieurs substances est entraîné par un courant de phase mobile, qui peut être liquide, gaz ou fluide supercritique, le long d'une phase stationnaire, qui peut être du papier, de la gélatine, de la silice, un polymère, de la silice greffée, etc. Chaque substance se déplace à une vitesse donnée, dépendante de ses caractéristiques (polaire, non polaire, ionique, etc., et de celles des deux phases.

III.2. Principe

Le principe de base de la chromatographie repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles. En chromatographie, l'une, dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile, se déplace au contact de la première. Si plusieurs composés sont présents, ils se trouvent entraînés à des vitesses différentes, provoquant leur séparation. Ce procédé hydrodynamique a donné naissance à une méthode analytique instrumentale qui a un très grand domaine d'applicabilité et par suite se trouve très répandue.

III.3. Les différents types de chromatographie et leurs applications

III.3.1. Suivant la nature de la phase mobile

Suivant la nature de la phase mobile, on distingue :

- La chromatographie sur couche mince (CCM ou Thin Layer Chromatography en anglais) : la phase mobile est composée de solvant pur ou d'un mélange de solvants
- La chromatographie en phase gazeuse (CPG ou Gaz Chromatography en anglais) également appelée CPV (chromatographie en phase vapeur) : la phase mobile est un gaz, dit gaz vecteur, et les solutés sont introduits sur la colonne directement s'il s'agit d'un échantillon gazeux ou après volatilisation dans la chambre d'injection chauffée s'il s'agit d'un échantillon liquide (éventuellement après dilution ou dissolution dans un solvant adéquat).

- La chromatographie en phase liquide (CPL ou Liquid Chromatography en anglais) : la phase mobile est constituée d'un solvant pur ou le plus souvent d'un mélange plus ou moins complexe de solvants de grande pureté ; elle est introduite sur la colonne à débit constant par un système de pompage.
- La chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP ou High Performance Liquid Chromatography en anglais)
- La chromatographie en phase supercritique (CPS ou Supercritical Fluid Chromatography en anglais) : la phase mobile est un fluide supercritique, c'est-à-dire porté au-delà des coordonnées en pression et température du point critique, point à partir duquel il n'existe plus de frontière définie entre les états liquide et gazeux.

III.3.2. Suivant l'état physique de la phase stationnaire

On distingue :

- La chromatographie liquide/solide (CLS)
- La chromatographie liquide/liquide (CLL)
- La chromatographie gaz/solide (CGS)
- La chromatographie gaz/liquide (CGL)

Le tableau suivant présente la classification des techniques chromatographiques selon l'état physique de la phase stationnaire, mentionné ci-dessus, qui est généralement des solides poreux et selon les mécanismes de séparation.

Tableau III.01 : Classification des techniques chromatographiques selon les phases stationnaires et selon les mécanismes de séparation

Chromatographie en phase gazeuse		
Phase mobile/Phase stationnaire	type	phase stationnaire
gaz/solide (CGS)	Adsorption	solide poreuse
gaz/liquide (CGL)	partage (partition)	dans les colonnes remplies, solide poreux inerte enrobé de liquide
		dans les colonnes capillaires, paroi interne de la colonne qui sert de support
Chromatographie en phase liquide		
Phase mobile/Phase stationnaire	type	phase stationnaire
liquide/solide (CLS)	Adsorption	solide poreuse polaire
	échange d'ions	solide à la surface duquel se trouvent des sites ioniques qui permettent à l'aide d'un solvant approprié l'échange d'ions présents dans la phase mobile
	exclusion stérique (filtration sur gel, perméation de gel)	solide dont la dimension des pores permet la séparation des espèces selon leur taille
liquide/liquide (CLL)	partage phase normale	solide poreux inerte enrobé de liquide (de moins en moins utilisée)
	partage phase inversée	solide poreux sur lequel sont greffées des chaînes hydrocarbonées non-polaires

III.4. Chromatographie sur couche mince

III.4.1. Définition

Une CCM est une technique d'analyse qui s'appuie sur les différences d'affinités de substances chimiques entre une phase stationnaire, la plaque, et une phase mobile, l'éluant.

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont :

- La cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.
- La phase stationnaire : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant (comme l'alumine, le kieselguhr et la cellulose) est fixée sur une plaque de verre (ou d'aluminium, ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique) à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre de Paris) l'amidon ou un polymère organique.
- L'échantillon : environ un microlitre (μL) de solution diluée (2 à 5 %) du mélange à analyser, déposé en un point de repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.
- L'éluant : composé de solvant pur ou d'un mélange de solvants : il migre lentement le long de la plaque en entraînant les substances constituant l'échantillon analysé.

La figure suivante représente les principaux éléments d'une séparation CCM.

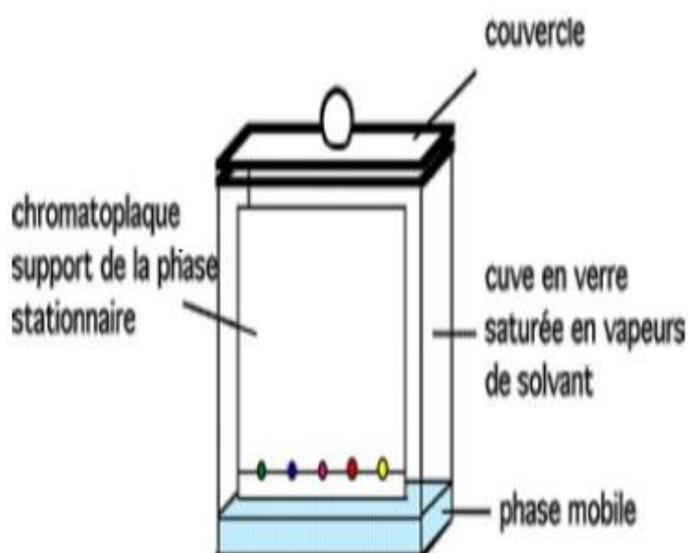


Figure III.01 : Les principaux éléments d'une séparation CCM

Source : maxicours.com

III.4.2. Principe

La chromatographie sur couche mince est une technique de chromatographie en phase liquide et s'effectue généralement sur une fine couche de silice (phase stationnaire) déposée sur un support.

L'échantillon, mis en solution, est déposé en un point repère de la plaque. Une fois que la plaque, sur laquelle l'échantillon est déposé, est introduite dans la cuve chromatographique, le solvant qui se déplace par capillarité fait migrer les composants de l'échantillon à des vitesses variables selon leur solubilité. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile.

Dans les CCM en phase normale, les substances moins polaires migrent plus rapidement que les composants polaires. Par contre, dans les CCM à phase inverse, ce sont les substances polaires qui migrent en premier puis suivent les substances peu polaires.

III.4.3. Application de la CCM

III.4.3.1. Déposition des échantillons

Pour effectuer une telle séparation, une petite quantité de la ou des solutions à analyser est déposée sur le bord d'une bande de papier de chromatographie (ou plaque CCM) à l'aide d'un capillaire (pipette Pasteur par exemple ou micropipette) à environ 1 cm du bord.

Cet échantillon est adsorbé par le papier ; ce qui signifie que les molécules interagissent avec ce dernier et qu'elles auront tendance à rester au même endroit.

III.4.3.2. Développement de la plaque

Le papier (ou plaque CCM) est ensuite placé dans un récipient fermé (généralement dans une cuve chromatographique) contenant le solvant (éluant : phase mobile). Le niveau de l'éluant devant être en dessous du produit déposé. Pendant que le solvant (éluant) monte le long du papier (plaque) par capillarité, il rencontre l'échantillon et l'entraîne. IL est à noter que la cuve contenant l'éluant est préalablement saturée en vapeurs d'éluant. Cette saturation a pour but non seulement de limiter et d'homogénéiser l'évaporation du système éluant de migration des constituants du mélange mais également, cela permet d'éviter les phénomènes de bord.

Les différentes substances constituant l'échantillon migrent à différentes vitesses selon qu'elles interagissent plus ou moins fortement avec le papier.

Une fois l'opération terminée, généralement quand le front de solvant (éluant) est presque arrivé en haut de la plaque, la plaque est retirée de la cuve et on laisse évaporer le solvant soit à l'air libre soit à l'aide d'un séchoir. Le résultat est appelé chromatogramme.

III.4.3.3. Révélation

Il y a plusieurs façons d'identifier les endroits où se trouvent les produits ainsi séparés :

- si les produits sont colorés (absorbent dans le visible), la plaque de chromatographie est lue directement.
- Si les produits sont fluorescents, les taches sont observées à la lumière UV, sous deux longueurs d'onde 254 nm et 366 nm.
- L'utilisation d'un révélateur (comme la vanilline sulfurique ou l'anisaldéhyde) qui réagira chimiquement avec les produits (en les transformant) et dont le résultat sera des taches apparentes.

III.4.3.4. Paramètre du CCM

Chaque substance est caractérisée par sa mobilité appelée rapport frontal (R_f). Le calcul du R_f est d'une importance capitale pour pouvoir interpréter les résultats d'une chromatographie. Le R_f se calcule par la formule suivante :

$$R_f = \frac{X}{Y}$$

La valeur de la R_f est comprise entre 0 et 1.

Soit X : distance parcourue par le composé (mesurée au centre de la tache par rapport à la ligne de dépôt)

Soit Y : distance parcourue par le front du solvant

X et Y sont exprimés dans la même unité.

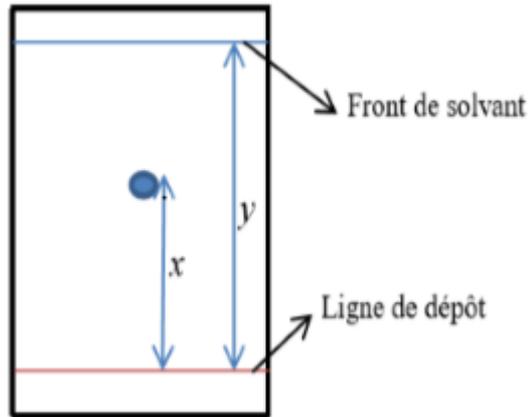


Figure III.02 : Schéma d'un CCM

Source : Pr Peyrat, 2012

Le rapport frontal rend compte de la manière dont l'espèce considérée a migré. Pour une espèce donnée, le rapport frontal dépend de la nature de l'éluant et de la nature de la phase fixe.

III.5. La chromatographie de partage

La chromatographie de partage (ou chromatographie liquide-liquide) met en jeu un mécanisme de partition entre solvants que constituent respectivement par la phase stationnaire et la phase mobile. La phase stationnaire peut être constituée par un film liquide (non miscible avec la phase mobile bien sûr) imprégné sur un support rigide (silice) ou fixé par liaison covalente (phases greffées). C'est ce second type qui est utilisé actuellement.

Le greffage est réalisé par établissement de ponts siloxane (Si-O-Si) :



Selon la nature des radicaux R, on distinguera :

- les phases greffées polaires (-diol, -cyanopropyl, aminopropyl,...)
- les phases greffées apolaires (-alkyl, -phényl, ...)

Les premières sont utilisées avec des solvants peu polaires et permettent de réaliser de la chromatographie en phase normale ou directe.

Les secondes s'emploient avec des solvants polaires et l'on a alors de la chromatographie en phase inverse ou réverse.

En première approximation, l'ordre d'élution des composés est inversé entre les deux modes, les composés polaires étant élués en premier dans les systèmes en phase réverse.

Remarque :

Les deux solvants sont caractérisés par leur différence de polarité et leur non-miscibilité. Généralement le solvant fixe est polaire : très souvent, ce sera l'eau. Le solvant mobile non polaire est souvent un mélange plus ou moins apolaire. Le choix de la phase mobile est important et ce choix se fait en fonction des molécules à séparer.

III.6. La chromatographie sur colonne ouverte

Cette chromatographie est basée sur le même principe que la CCM, sauf que la silice est placée dans une colonne et non sur une plaque. Le but est toutefois différent : La chromatographie sur colonne sert à séparer des produits organiques d'un mélange, soit à purifier un produit de réaction c'est une méthode importante pour la séparation d'un produit contenant des impuretés difficiles à enlever par distillation ou cristallisation. Il existe deux types de chromatographie sur colonne :

- Chromatographie par gravité : elle utilise des particules de silice de 70 à 200 μm et le solvant s'écoule au goutte-à-goutte. Cette technique est désuète car elle demande une plus grande quantité de silice et de solvant.
- Chromatographie éclair (« flash ») : elle utilise des particules de silice de 35 à 70 μm et le solvant s'écoule sous pression d'air comprimé (c'est la plus moderne des deux). un exemple est illustré par la figure ci-dessous



Figure III. 03 : Exemple de système de chromatographie flash

Source : Tiên Do, 2016

Les diverses substances introduites au sommet de la colonne de gel de silice sont plus ou moins retenues à la surface du support, suivant leur polarité. Elles sont donc plus ou moins facilement entraînées par le solvant qui migre dans la colonne. Le plus apolaire passera en premier et ainsi de suite.

Plusieurs choix sont à faire en fonction de la quantité du produit et de l'aspect de la CCM :

- Diamètre de la colonne
- Hauteur de silice

Le tableau suivant présente la masse de la silice, le diamètre de la colonne à utiliser ainsi que la hauteur de la silice en fonction de la masse du produit

Tableau III.02 : Diamètre de la colonne en fonction de la masse de la silice

Masse du produit	Masse de la silice	Diamètre de la colonne à utiliser	Hauteur de la silice
15 - 500 mg	15 g	30 mm	45 mm
500 mg – 1 g	30 g	40 mm	50 mm
$1\text{ g} < m \leq 15\text{g}$	Varie en fonction de la masse du produit	70 mm	55 mm

Source : maxicours.com

- Choix de l'éluant

L'éluant est formé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants. La polarité de l'éluant peut rester la même tout au long de la chromatographie (élution isocratique) ou aller en augmentant (gradient de solvant).

Chapitre IV. Généralité sur les activités antibactériennes

IV.1. Bactéries pathogènes

Ce sont des bactéries qui sont responsables de maladies. Elles sont classées en bactéries Gram-négatifs, Gram-positifs et bactéries alcool-résistantes (BAAR). Le tableau IV.01 donne la liste de quelques bactéries et les maladies dont elles sont responsables

Tableau IV.01 : Quelques bactéries et maladies causées

Groupe de bactéries,	Maladies causées
Bactéries Gram-positifs	
Bacillus cereus Staphylococcus aureus Streptococcus hémolytique Streptococcus pneumoniae	toxi-infections; infections oculaires et respiratoires Furoncles, pneumonie Angine, infection cutanée, rhumatisme Pneumonie communautaire
Bactérie Gram négatif	
Vibrio cholerae Escherichia coli Haemophilus influenzae type b Meningite Neisserias aerugionosa Salmonella typhimurium Pseudomonas aerugionosa Proteus mirabilis	Choléra, Infection urinaire, diarrhées infectieuses pneumonie Blennorragie Fièvre typhoïde Infections urinaires Dirrhées infectieuse (gastro-entérites)
Bactéries acido-alcool-résistantes	
Mycobacterium leprae Mycobacterium arium Mycobacterium tuberculosis	Lèpre Pneumonie Tuberculose

IV.2. Différentes méthodes de détermination de la sensibilité aux Antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques peut être déterminée au laboratoire de bactériologie selon différentes techniques. On distingue principalement des techniques en milieu liquide ou en milieu solide permettant la mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI) aux antibiotiques de la bactérie ou son évaluation indirecte par la mesure des Diamètres d'inhibition.

IV.2.1. Méthodes de détermination de la CMI

IV.2.1.1 CMI par microdilution manuelle en milieu liquide

La microdilution manuelle en milieu liquide est la technique de référence pour déterminer la CMI aux antibiotiques des souches bactériennes. Cette technique repose sur la mise en culture d'un inoculum bactérien standardisé (1 A 5.10⁵ UFC/ml) en présence de séries de dilutions d'antibiotiques de raison 2. Les plaques de microdilution contiennent 96 puits et permettent de tester 8 concentrations croissantes d'antibiotiques différentes. Après 18 à 24 heures d'incubation, la lecture des résultats se fait par une évaluation visuelle de la turbidité des différents puits de la microplaque. Ainsi, cette technique fournit des résultats quantitatifs. La CMI correspond à la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe toute croissance visible de la bactérie, c'est-à-dire qu'aucun trouble n'est visible dans le puits correspondant à cette valeur. La microdilution manuelle permet d'obtenir des valeurs précises de CMI. Cependant C'est une technique longue à réaliser et qui comporte de nombreux risques d'erreurs, c'est pourquoi elle n'est mise en œuvre que dans certains laboratoires experts.

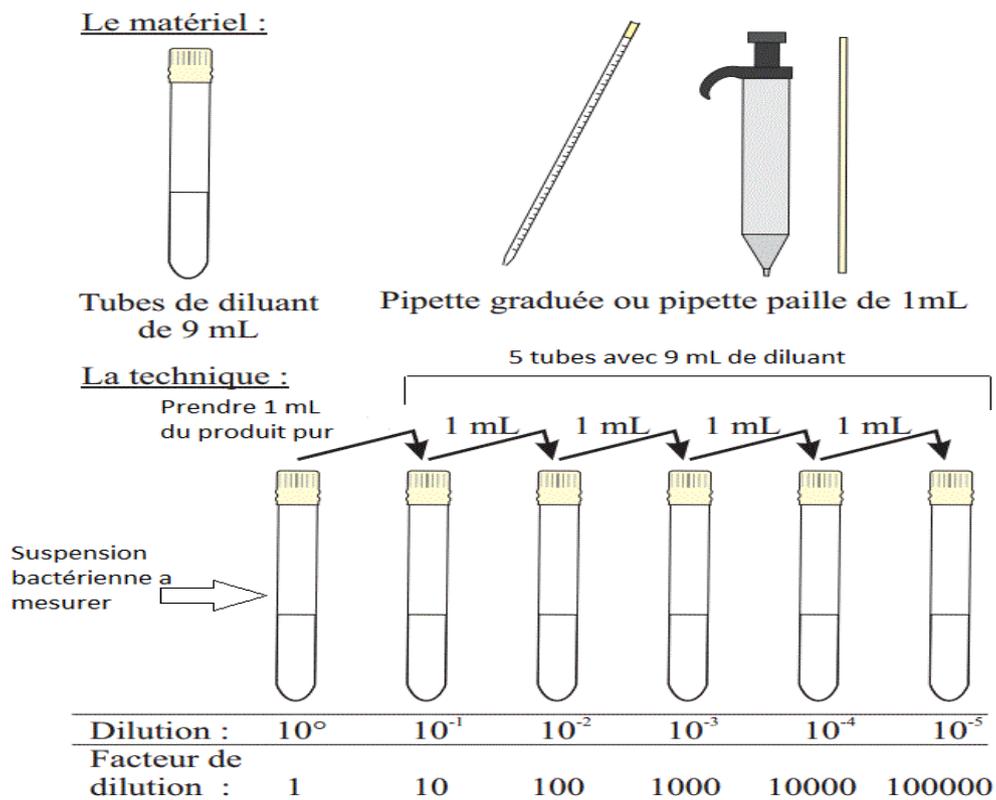


Figure IV.01 : Microdilution successive en milieu liquide

Source : sciencedirect.com

IV.2.1.2 CMI en milieu gélosé par méthode Etest

Le Etest est une technique de diffusion d'un gradient de concentration d'un antibiotique donné en milieu gélosé qui fournit des valeurs de CMI vis-à-vis d'une souche bactérienne. Cette méthode de détermination de la sensibilité antimicrobienne a été approuvée pour différents antibiotiques vis-à-vis de nombreuses espèces bactériennes. Elle consiste en l'application d'une bandelette de nitrocellulose imprégnée de concentrations croissantes d'un antibiotique sur un inoculum bactérien standardisé. Après 24 heures d'incubation, la CMI se lit à l'intersection entre la bandelette et la zone d'ellipse d'inhibition de la culture. Cette technique est réalisable au quotidien au laboratoire de bactériologie. Elle trouve son intérêt lorsque l'adaptation du traitement du patient nécessite une valeur « précise » de CMI.

Le Etest est une technique moins contraignante à réaliser que la technique de microdilution manuelle permettant un contrôle visuel de l'inoculum bactérien. Au maximum quatre antibiotiques sont testés simultanément par cette technique sur une même gélose.



Figure IV.027 : Méthode E-test

Source : biomerieux.fr

IV.2.2. La technique d'antibiogramme

L'antibiogramme consiste en la détermination de la sensibilité d'une bactérie aux antibiotiques, permet de connaître l'antibiotique le plus efficace contre un pathogène donné. Il peut s'effectuer par des méthodes en milieu liquide ou solide.

IV.2.2.1 Antibiogramme par dilution en milieu liquide : l'automate

La détermination de la sensibilité antimicrobienne par dilution en milieu liquide automatisée répond à des exigences de la biologie actuelle : productivité et assurance qualité entre autres. Cette technique de microdilution semi-automatisée est basée sur l'utilisation de galeries contenant des concentrations croissantes de plusieurs antibiotiques.

Après incubation en présence d'un inoculum bactérien standardisé, la lecture se fait par turbidimétrie. Des galeries ont été établies par les fournisseurs en fonction du germe testé. Les panels d'antibiotiques mis en place répondent aux recommandations établies par les comités d'experts.

Par ailleurs, la dilution automatisée en milieu liquide permet d'obtenir des valeurs chiffrées de CMI. Certains systèmes automatisés mesurent des CMI vraies ce qui permet de se rapprocher de la technique de référence tandis que d'autres automates calculent les CMI à partir d'un algorithme appliqué à la croissance.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques par les systèmes semi-automatisés répond à des évolutions nécessaires face à une charge de travail croissante et des attentes en termes de traçabilité et de reproductibilité. Ces systèmes constituent un gain de temps pour le laboratoire notamment par leur simplicité d'utilisation. Par ailleurs, la lecture des valeurs de CMI est automatisée ce qui évite la subjectivité d'un opérateur. Il n'est pas possible de contrôler l'inoculum bactérien avec cette méthode lorsque celui-ci est mal calibré ou plurimicrobien, ce qui peut entraîner des erreurs dans les phénotypes de résistance. Egalement, il n'est pas possible de visualiser certains antagonismes ou synergies spécifiques à certains mécanismes de résistance. Ainsi, le profil de résistance obtenu à l'aide de ces systèmes semi-automatisés d'antibiogramme doit faire l'objet d'une analyse biologique attentive et être contrôlé par la méthode des disques en cas de phénotype de résistance inattendu.

Enfin, les panels d'antibiotiques testés ont été établis par les fournisseurs selon les recommandations des comités d'experts et sont fixes. Il n'est pas possible avec ces systèmes semi-automatisés d'ajouter un antibiotique donné à la galerie initiale pour tester sa sensibilité vis-à-vis de la bactérie identifiée. Il faudra pour cela faire appel à la méthode des disques ou aux bandelettes Etest pour compléter l'antibiogramme « standard ».



Figure IV.03 : Antibiogramme automatisé ou automate

Source : Wikipédia

IV.2.2.2 Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé ou méthode des disques

La technique de diffusion en milieu gélosé, plus couramment appelée la méthode des disques, est une technique manuelle. Un milieu défini (milieu Mueller-Hinton) et un inoculum standardisé sont nécessaires à la réalisation de cette technique. Chaque disque d'antibiotique contient une concentration fixe et il est possible de déposer jusqu'à seize disques par gélose Mueller Hinton. Durant la phase d'incubation, il s'établit un gradient d'antibiotique décroissant autour du disque en présence de la culture bactérienne. Il apparaît ainsi une zone d'inhibition de la culture autour du disque, ce qui permet de mesurer des diamètres d'inhibition pour chaque antibiotique testé. La mesure des diamètres d'inhibition permet de déterminer le caractère sensible, intermédiaire ou résistant de la souche bactérienne vis-à-vis de la molécule.

La technique des disques fournit des données qualitatives avec la catégorisation des souches mais ne permet pas d'obtenir la CMI d'un antibiotique vis-à-vis d'une bactérie donnée. Pour certaines molécules et/ou certaines espèces bactériennes en particulier, cette technique ne peut être appliquée pour déterminer la sensibilité antimicrobienne et une autre méthode devra être mise en œuvre. C'est le cas par exemple de la détermination de la sensibilité des bacilles à Gram négatif vis-à-vis de la colistine.

La méthode des disques présente néanmoins des avantages. En effet, c'est une technique simple, qui nécessite peu de matériel et qui permet de tester simultanément jusqu'à seize antibiotiques par gélose Mueller-Hinton. Le coût associé à cette méthode est faible. Cette méthode reste une technique manuelle et l'automatisation des différentes étapes n'est pas encore très développée. La méthode des disques est largement utilisée au sein des laboratoires de bactériologie pour déterminer les phénotypes de résistance aux antibiotiques des souches isolées de prélèvements d'intérêts.

L'antibiogramme peut être interprété sous trois catégories cliniques à savoir :

- SENSIBLE (S) : Les souches S étant celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est acceptable. On doit s'attendre à un effet thérapeutique dans le cas d'un traitement à dose habituelle par voie générale.
- RESISTANT (R) : Les souches R étant celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique. On ne peut s'attendre à un effet thérapeutique quel que soit le traitement.
- INTERMEDIAIRE (I) : Les souches I étant celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. Elles forment un ensemble hétérogène pour lequel la seule valeur de la CMI n'est pas prédictive.

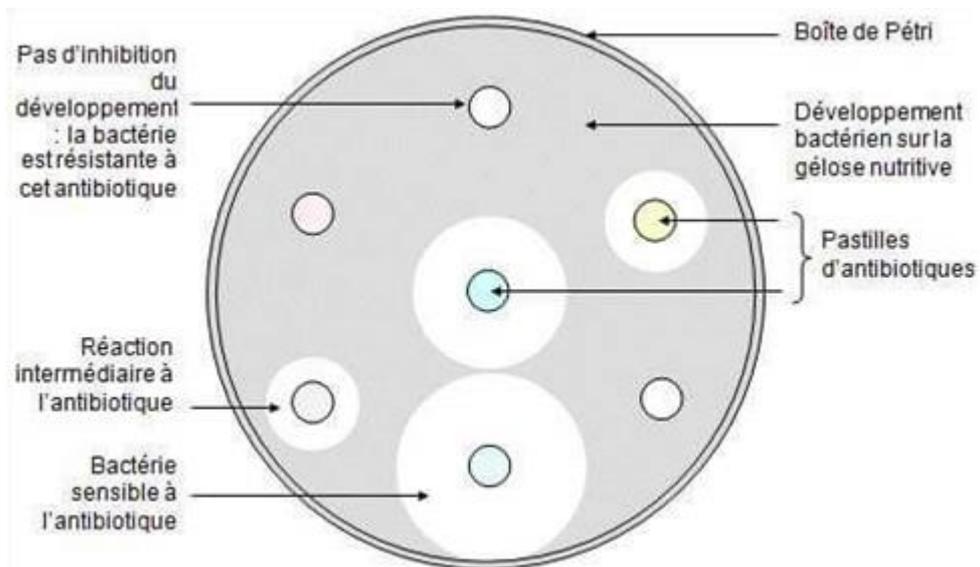


Figure IV.04 : Schéma d'un antibiogramme

Source : smalis.fr

IV.3. La Concentration Minimale Inhibitrice et la Concentration Minimale Bactéricide

IV.3.1. Concentration Minimale Inhibitrice

La CMI est la plus faible concentration d'antibiotique qui inhibe la croissance bactérienne. Elle est définie comme la plus faible concentration inhibitrice de l'extrait par laquelle les microorganismes ne montrent pas une turbidité. S'il n'y a eu aucune croissance (les bactéries sont tuées) ceci représente la CMB (Concentration Minimale Bactéricide). L'antibiogramme est une application de la détermination de la concentration minimale inhibitrice ou CMI par une méthode de diffusion.

IV.3.2. Concentration Minimal Bactéricide

La concentration Minimal Bactéricide rend compte de l'effet bactéricide des antibiotiques. C'est la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle l'effet bactéricide souhaité est de 99,9 %. A propos de la CMB, 99,9 % de microorganismes sont détruits et il ne reste que 0,01 % de microorganisme survivant de l'inoculum de départ soit au maximum 1 bactérie pour 10000 bactériesensemencées.

IV.3.3. Détermination du pouvoir bactéricide ou bactériostatique

L'activité antibiotique des extraits peut être appréciée en tenant compte du rapport CMB/CMI. Ainsi l'effet est dit :

- bactéricide quand le rapport est compris entre 1 à 2.
- Bactériostatique quand le rapport est compris entre 4 à 16.

Partie II : Etudes expérimentales

Chapitre V. Extraction hydroéthanolique

V.1. Matériel

V.1.1. Collecte et identification des plantes

Les matériels végétaux sont constitués par les feuilles et les écorces des tiges. Les échantillons de plantes ont été collectés à Ambatolahimaro (située dans la partie ouest de Madagascar, dans la Commune rurale de Mandoto, District de Mandoto, Région Vakinankaratra), à proximité du village d'Antanetilehibe (S19 ° 31'16'' ; E46 ° 46'22'5'') à 837 m d'altitude. Les feuilles et écorces des tiges propres ont été collectées et emportées au Laboratoire pour y être traitées.

L'identification des variétés de mangues a été faite principalement à partir de la forme du fruit, étant donné que chaque variété de mangue a une forme spécifique, avec le concours du technicien agricole.

V.1.2. Matériels techniques

- solvant
- Büchner
- Erlenmeyer
- Le rotavapor : utilisé pour éliminer le solvant et récupérer l'extrait



Figure V.01 : Photo d'un rotavapor

Source : Auteur

- Balance de précision
- Spatule
- Verrerie (bêcher, pipette)

V.2. Mode opératoire

V.2.1. Préparation des matériels végétaux

Les écorces et feuilles fraîchement récoltées ont été lavées, découpées en petits morceaux. Puis séchées à l'abri de la poussière et du soleil à la température du laboratoire (25 ° à 30 °) pendant 14 jours avant d'être réduites en poudre fine à l'aide d'un mortier métallique au Laboratoire de Chimie organique de l'ESPA de Madagascar.

V.2.2. Extraction hydro éthanolique

Une extraction a été effectuée à savoir l'extrait hydro-éthanolique par macération. Les extractions ont été faites à raison de 100 g de matériel végétal pour 500 mL de solvant pendant 48 heures (24h*2) afin d'assurer le maximum épuisement du matériel végétal. Après cela le mélange a été filtré sous vide à l'aide d'un filtre Buchner en utilisant un papier Whatman pour séparer le filtrat liquide du marc puis évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif (BUCHI, Suisse) sous pression réduite à 45 °C pour que le métabolite naturel extrait ne dégrade pas. Les solvants utilisés sont l'eau distillée et l'éthanol 90 °.



Figure V.02 : Macération hydro-éthanolique des feuilles et écorce de *Mangifera Indica L.*

Source : Auteur

Les extraits ont été pesés pour déterminer le rendement d'extraction (R). Elles sont conditionnées dans des pots en verres ambrés, fermés hermétiquement. Le rendement d'extraction (R) a été calculé par la formule

$$r_i = \frac{m_i}{m_f} * 100$$

ri : rendement de l'extraction de la partie de la plante i extraite

mi : masse de l'extrait obtenu après l'extraction i

mf : masse initiale de la poudre de matériel végétal à extraire

Les extraits obtenus ont servi dans la suite pour réaliser les criblages phytochimiques, les divers tests et analyses biologiques.

Il est à noter que pour les feuilles, l'addition sous agitation de m_x de charbon initialement activé à l'étuve à 110 °C est nécessaire pour éliminer les chlorophylles par adsorption afin d'obtenir des extraits éthanoliques limpides.

Le processus peut se schématiser de la façon suivante :

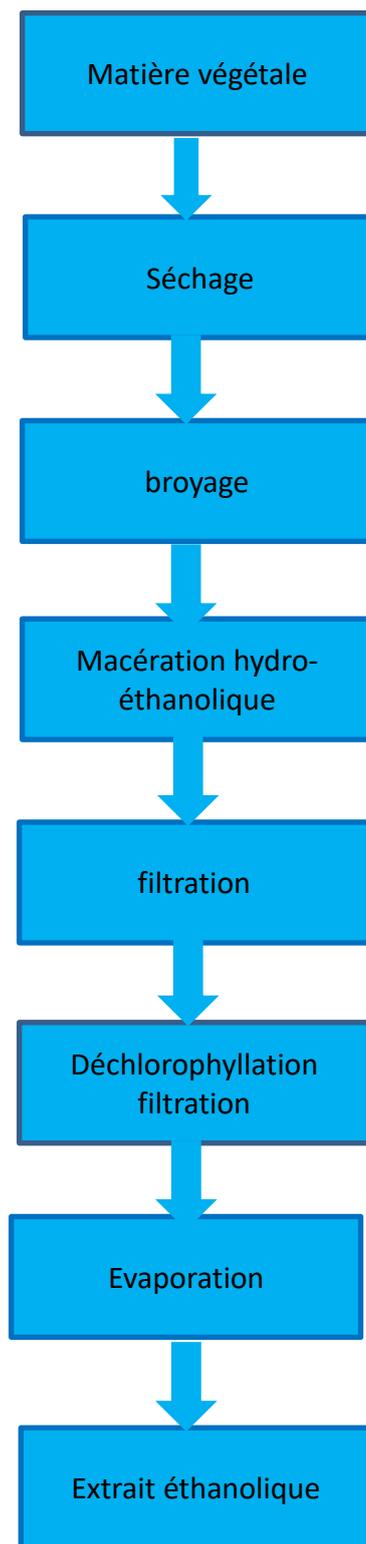


Figure V.03 : Processus d'extraction hydroalcoolique des écorces de tiges et des feuilles

Source : Auteur

V.3. Résultats de l'extraction éthanolique

Les volumes du solvant utilisé, les masses de charbon actif pour la déchlorophyllisation, les quantités de la poudre végétale à extraire utilisées, les masses des extraits bruts obtenus ainsi que les rendements d'extraction sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau V.01 : Tableau montrant le rendement des extractions éthanoliques

Partie de la plante étudiée	Notation des extraits	Volume EtOH V (ml)	Masse charbons actifs x (g)	Masse initial de drogues mi (g)	Extrait brut Mf (g)	Rendement de l'extraction ri (%)
Feuilles						
Feuille de M.Gasy	FG	500	70	100	11,086	11,086
Feuille de M.Esy	FE	450	60	100	11,977	11,977
Feuille de M. Vato	FV	500	60	100	9,031	9,031
Feuille de M. Diego	FD	600	60	100	14,018	14,018
Ecorce						
Ecorce de M.Gasy	EG	450	-	100	8,893	8,893
Ecorce de M.Esy	EE	400	-	100	13,831	13,831
Ecorce de M. Vato	EV	500	-	100	11,040	11,040
Ecorce de M. Diego	ED	600	-	100	16,286	16,286

Source : Auteur

Pour les écorces, nous ne les avons pas traitées avec des charbons actifs étant donné qu'ils sont dépourvus de chlorophylle.

V.4. Discussion

D'après le tableau ci-dessus (tableau V.01), les rendements sont variables selon les extraits. Cependant, nous pouvons constater que les écorces sont les plus riches en substances chimiques des deux parties de la plante étudiée, en particulier la variété Diego, avec un rendement d'extraction de 16,286 %. Ce rendement peut être dû au rapport solide/liquide puisque lors de cette extraction le volume de solvant était important par rapport aux autres, car plus le volume est grand plus le degré de contact avec la drogue et les solvants d'extraction est aussi grand. Ce qui va augmenter la capacité de pénétration des solvants dans la drogue permettant ainsi au solvant d'extraction d'entrer en contact avec un grand nombre de composés.

Les résultats obtenus démontrent formellement l'influence du volume de solvant d'extraction.

Chapitre VI. Criblage phytochimique

Afin de vérifier la présence des métabolites secondaires, une analyse qualitative des extraits éthanoliques des feuilles et des extraits éthanoliques des écorces ont été effectués.

VI.1. Matériels

Les matériels utilisés lors du criblage phytochimique sont les suivants

- Tube à essai
- Portoir pour tube à essai
- Papier filtre
- Extraits bruts des feuilles et des écorces
- Spatule
- Poudre végétale (feuille et écorce)
- Réactif (tableau VI.01)
- Solvant

VI.2. Méthodes

La caractérisation des différents groupes chimiques a été réalisée en utilisant les réactions de coloration et/ou de précipitation sur les extraits mis en présence de réactifs spécifiques en se référant au technique décrit dans le tableau ci-dessous et au annexe1.

Tableau VI.01 : Protocole du criblage phytochimique

Classes des produits naturels	Tests et réactifs	Observations attendues		Signification
Alcaloïdes	<ul style="list-style-type: none"> - Réactifs de Mayer - Réactifs de Wagner - Réactifs de Dragendorff 	précipité blanc précipité rouge orangé précipité orange		Présence d'alcaloïdes
Flavonoïdes et leucoanthocyanes	Test de Wilstater	Coloration	Rouge	Présence de flavones
	HCl conc+tournures de Mg		Rouge pourpre	Présence de flavonols
			Rouge violacée	Présence de flavanones et flavanols
	Test de BatsMith	Coloration rouge		Présence de leucoanthocyanes
	<ul style="list-style-type: none"> - HCl conc à chaud - HCl + solution d'ammoniaque à 25 % 	Virage de couleur de rose-rouge au bleu violacé		Présence des anthocyanes
tanins et polyphénols	Gélatine 1 %	Précipité		Présence de polyphénols
	Gélatine salée	Précipité		Présence de tanins
	FeCl ₃ dans MeOH	Coloration	brun verdâtre	Présence de tanins condensés (catechiques ou flavanols-3 condensés et leucoanthocyanes ou flavanediols3-4)
			bleue noire	Présence de tanins galliques et ellagiques (tanins hydrolysables)
réaction négative à la gélatine salée+ FeCl ₃	verte ou bleue noire		présence d'autres types de composés phénoliques	
Quinones	solution aqueuse d'ammoniaque NH ₄ OH à 20 %	coloration rouge-orangé ou rouge violacé		Présence de quinones

Stéroïdes et terpénoïdes	Test de Liebermann Burchard	Coloration	Pourpre	Présence de triterpénoïdes
	Anhydride acétique+H ₂ SO ₄ conc		Violet ou bleu vert	Présence de stéroïdes
	Test de Salkowski	Anneau de séparation en rouge		Présence de stérols insaturés
	H ₂ SO ₄ conc			
	Test de Badjet Kedde	Coloration rouge		Présence de stéroïdes lactoniques
	Acide picrique			
	Test de Keller-Killiani	Anneau de séparation en rouge pourpre		Présence de desoxy-2-sucres
	FeCl ₃ 10%+acide acétique glacial			
Iridoïde	<ul style="list-style-type: none"> - HCl dilué suivi de chauffage - En présence de glycérol 	Précipité noir		Présence d'iridoïde
Saponines	Eau + agitation pendant 30s	Mousse persistante après 10 mn		Présence de saponines
Coumarine	Réaction de fluorescence (NaOH, U.V 366nm)	Fluorescence		Présence de coumarine
Composés Cyanogénétiques	Eau/chloroforme	Bandelette de papier Whatmann coloré en rouge		Présence de polysaccharides

Source : Auteur

VI.3. Résultat du screening phytochimique

Le criblage phytochimique d'extrait brut a révélé la présence de flavonoïde, leucoanthocyanes, tanins hydrolysable, tanins, polyphénols, coumarines, triterpènes, des stérols insaturés et des composés cyanogénétiques.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau ci-dessous.

Légende :

+++ = quantités très élevées/abondantes

++ = quantités élevées/moyen

+ = faible quantité/faible

- = non détectable/absent

(-) : Test négatif ; (+) : Faible présence ; (++) : présence moyenne ; (+++) : Présence abondante

Tableau VI.02 : Récapitulation des résultats du criblage phytochimique des feuilles et écorces de mangues étudiées

		FG	FE	FV	FD	EG	EE	EV	ED
Alcaloïdes		-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoïdes et leucoanthocyanes	Flavonoïdes	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
	Anthocyanes	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leucoanthocyanes	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
tanins polyphénols et polyphénols	Polyphénols	++	++	++	+	+++	+++	+++	+++
	Tanins	++	++	+	++	+++	++	++	++
	Tanins hydrolysables	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Tanins condensés	-	-	-	-	-	-	-	-
	Autre type de composés phénoliques	-	-	-	-	-	-	-	-
Quinones		-	-	-	-	-	-	-	-
Stéroïdes terpénoïdes et terpénoïdes	Triterpenes	-	-	-	-	+	+	-	-
	Steroides	+	-	+	+	-	-	+	+
	Stéroïls insaturés	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++
	Stéroïdes lactoniques	-	-	-	-	-	-	-	-
	Desoxy -2 -sucre	-	-	-	-	-	-	-	-
Iridoïdes		-	-	-	-	-	-	-	-
Saponines		-	-	-	-	-	-	-	-
Coumarine		+++	+++	+	++	+++	+++	++	++
Composés Cyanogénétique		+	+	+	+++	+	+	++	++

Source : Auteur

VI.4. Discussion

D'après ces résultats, nous pouvons constater que parmi les grandes classes de métabolites secondaires, la famille des alcaloïdes, saponines, quinones, anthocyanes et iridoïdes ne figurent pas dans les extraits de feuille et d'écorce de tige de *Mangifera Indica L.*

Les résultats obtenus de ce screening phytochimique ont montré que le niveau de polyphénols est plus élevé dans les écorces des tiges que dans les feuilles. Les extraits renferment tous des leucoanthocyanes et des coumarines. Présents en grande quantité, les tanins sont également très représentatifs des différentes parties (feuille, écorce). Ils se trouvent sous forme de tanins hydrolysables (les feuilles de la mangue de la variété gasy en contiennent plus que celle des feuilles des autres variétés étudiées). Les feuilles et écorces de manguier sont également source de flavonoïde. Nous avons détecté une faible présence des triterpènes dans les écorces de mangues de la variété gasy et esy. Cependant, les écorces des tiges des variétés vato et Diégo contiennent des stéroïdes.

L'extrait de feuilles de la variété Diego renferme particulièrement des quantités très élevées des substances toxiques comme les composés cyanogénétiques. Les autres extraits de feuilles et d'écorce de tige en contiennent également, mais de faible quantité.

Les classes phytochimiques détectées dans les extraits bruts éthanoliques des feuilles avaient également été détectées dans les extraits bruts éthanoliques des écorces des tiges

Ces métabolites identifiés ont des rôles très importants pour la vie de chaque espèce surtout dans la pigmentation des fleurs et des fruits, la protection contre les herbivores, contre les radiations U.V. La présence de certains de ces composés dans les organes aériens, révélés en amont (par l'étude phytochimique et par les tests de caractérisation), est en faveur de ces rôles. De plus des propriétés biologiques à savoir les propriétés anti-hépatotoxiques, antiallergiques, antioxydantes, anti-inflammatoires, antivirales, anti-tumorales, anticancéreuses et antimicrobiennes leur sont attribuées.

VI.5. Conclusion partielle

Le criblage phytochimique fait apparaître de très nombreux composés appartenant à diverses classes. Ce sont les tanins qui sont les plus représentés. Elles peuvent être considérées comme les principes actifs caractéristiques du manguier. A la lumière de ces résultats on dit que l'extrait éthanolique (feuilles et écorce) de *Mangifera Indica L.* contient des agents ayant des propriétés biologiques.

Chapitre VII. Evaluation de l'activité anti bactérienne des extraits

Des analyses ont été réalisées dans le Laboratoire Microbiologie sur l'Environnement du Centre National de Recherches sur l'Environnement pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits des feuilles et des extraits des écorces de *Mangifera Indica L.* Les extraits utilisés pour les tests biologiques ont été préparés selon le protocole décrit dans le chapitre V.

VII. 1. MATERIEL

- Balance de précision : pour peser les extraits avant de les dissoudre dans le DMSO



Figure VII.01 : Photo d'une balance de précision

Source : Auteur

- Boite de pétri
- Pipette pasteur
- Tubes à essai
- Poire
- Gélose MH
- Bec bunzen
- Bécher

- Bain ultrason : pour dissoudre les extraits



Figure VII.02 : Photo d'un bain ultrason

Source : Auteur

- Etuve



Figure VII.03 : Photo d'une étuve

Source : Auteur

VII. 3. Méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne

Dans notre étude des milieux gélosés Mueller Hinton ont été utilisés pour les tests antibactériens des extraits éthanoliques des feuilles et des écorces de tiges.

VII.2.1. Principe

L'activité antibactérienne est évaluée par la méthode d'antibiogramme qui permet de déterminer la sensibilité des différentes espèces bactériennes vis-à-vis de l'extrait donné. La méthode de l'antibiogramme consiste à utiliser des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé convenable, déjà solidifié et inoculé de la souche microbienne testée. Des disques en papier buvard de 6 mm de diamètre, préalablement imprégnés de quantités connues d'extraits (20µl), sont alors placés en surface de la gélose. Généralement, les microorganismes seront classés sensibles, intermédiaires ou résistants, selon le diamètre de la zone d'inhibition (Wilkinson, 2006).

VII.2.2. Mode opératoire

VII.2.2.1. Choix des souches

Les protocoles de réalisation des tests restent identiques dans tous les tests effectués, les tests ont été faits sur les extraits bruts (extrait éthanolique), les fractions obtenues après partage, les sous-fractions regroupées, plus précisément celles de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Mangifera indica* L. (EFD).

Les organismes bactériens standards de l'ATCC ont été obtenus auprès du département de microbiologie au Laboratoire Microbiologie sur l'Environnement du Centre National de Recherches sur l'Environnement à Antananarivo

L'activité antibactérienne a été évaluée sur les cinq souches bactériennes de référence. Deux de gram positif, il s'agit de *Staphylococcus aureus* ATCC11632, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6301, et trois de gram négatif, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8714, *Salmonella enteridis*, *Escherichia coli*

Tableau VII.01 : Espèce bactérienne testée

Espèces à Gram positif	Espèces à Gram négatif :
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 11632	<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8714
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6301	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Salmonella enteridis</i>

Source : Auteur

Ces espèces bactériennes ont été choisies parce qu'elles représentent les microorganismes à Gram positif et à Gram négatif les plus fréquemment rencontrés, responsables d'infections bactériennes et résistantes aux antibiotiques. La revivification des différentes espèces bactériennes est faite sur gélose nutritive.

Un contrôle de qualité a été effectué par la réalisation d'un antibiogramme des souches bactériennes testées vis-à-vis d'un certain nombre d'antibiotiques. Cette opération a pour but de contrôler l'activité des disques d'antibiotiques utilisés et de vérifier la qualité de la manipulation effectuée.

VII.2.2.2. Préparation des extraits

Les extraits à tester ont été préparés à 100 mg/mL. Pour cela, 100 mg d'extrait ont été dissouts dans 1 mL de diméthylsulfoxyde (DMSO). Une concentration de 200mg/ml a été également préparée pour l'extrait hydro- éthanolique. L'extrait est agité au vortex pendant 15 minutes, pour les extraits difficiles à dissoudre le bain ultrason a été utilisé. La solution ainsi obtenue a été utilisée pour la réalisation des tests antibactériens.

VII.2.2.3. Milieu de culture

Le milieu Müller Hinton a été utilisé.

VII.2.2.4. Préparation du milieu

Homogénéiser la poudre contenue dans le flacon. Mettre 35 grammes de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau fraîchement distillée. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 15 minutes. Répartir dans des tubes ou dans des flacons stériles. Au moment de l'emploi, faire fondre le milieu au bain-marie bouillant et répartir en boîtes de Pétri rondes l'intégralité du flacon ou des tubes. L'épaisseur de la couche de gélose doit être de 4 mm. Sécher les boîtes 30 min à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le volume de Mueller Hinton permettant d'obtenir exactement une épaisseur de 4 mm est de 25 ml pour une boîte de 90 mm, de 60 ml pour une boîte carrée de 120 mm, de 70 ml pour une boîte ronde de 150 mm.

- Inoculum bactérien

L'inoculum testé provient d'une culture fraîche de 18 à 24h. Ensuite, 4 à 5 colonies bactériennes bien isolées sont mises en suspension dans un bouillon nutritif (ou en eau physiologique à 0,9 % NaCl). Puis cette suspension est ajustée au standard Mc Farland 0,5 à l'aide d'un spectrophotomètre, correspondant à une densité optique DO entre 0,08 à 0,1 lue à 625 nm, ce qui correspond à une suspension contenant environ 108 UFC/ml (CA-SFM, 2013). Cet inoculum sert à ensemercer les boîtes en expérimentation. L'ensemencement doit se faire dans les 15mn qui suivent la préparation de l'inoculum.

- Ensemencement

La surface de la gélose est ainsi inondée avec 1 à 2 ml d'inoculum. Le surplus par la suite est aspiré à la pipette munie de poire. Les boîtes sont séchées pendant 15 minutes à 37 ° C.

- Application des disques d'antibiotiques.

Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90 mm de diamètre. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm, centre à centre.

Les disques d'antibiotiques sont déposés aseptiquement à l'aide d'une pince stérile sur la surface de milieuensemencé.

Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une pince bactériologique stérile pour s'assurer de son application. Ensuite, nos boîtes ont été placées à l'étuve pour une incubation de 24 heures à 37 °C± 1.

- Lecture

La sensibilité des organismes testés a été déterminée en mesurant les diamètres de la zone d'inhibition et comparée aux valeurs critiques selon les diamètres d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible.

La sensibilité aux différents extraits est organisée selon le diamètre des zones d'inhibition comme suit : Sensible, Intermédiaire, ou Résistance (Ammari et al., 2005).

Tableau VII.02 : Sensibilité aux différents extraits

Diamètre	Sensibilité aux différents extraits	
Moins de 6 mm	(-)	non sensible
9-14 mm	(+)	Sensible
15-19 mm	(++)	très sensible
plus que 20 mm	(+++)	extrêmement sensible

Source : Moreira et al., 2005

VII. 4. Résultats des tests microbiologiques

L'activité antibactérienne contre les microorganismes analysés dans la présente étude a été évaluée qualitativement et quantitativement en fonction de la présence ou l'absence de zones d'inhibition, le diamètre de la zone et la concentration minimale inhibitrice (CMI), par rapport aux antibiotiques de référence.

- Résultats des tests antibactériens des extraits éthanoliques

L'étude d'activité antibactérienne a été réalisée avec des extraits bruts et dont nous verrons les résultats dans le tableau suivant. Au regard des résultats de l'antibiogramme, il ressort de cela que l'action des antibiotiques révèle des réponses variables pour les souches testées ; soit des germes de Gram+ ou Gram -.

Tableau VII.03 : Résultats des tests antibactériens des extraits de feuilles et écorces de *Magifera Indica L* à 100mg/ml.

Germes-tests	Diamètre des halos d'inhibition (mm)										
	EXTRAITS :								ANTIBIOTIQUES DE REFERENCE		
	FG	EG	FE	EE	FV	EV	FD	ED	NA30	SXT25	FA10
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC11632	6	6	6	6	6	6	6	6	-	16	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6301	10	6	10	6	10	6	8	6	-	-	24
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8714	6	6	6	6	6	6	6	6	17	-	-
<i>Salmonella enteridis</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	18	-	-
<i>Escherichia coli</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	16	-	-

Source : Auteur

Tableau VII.04 : Résultats des tests antibactériens des extraits de feuilles et écorces de *Magifera Indica L* à 200mg/ml.

Germes-tests	Diamètre des halos d'inhibition (mm)										
	EXTRAITS :								ANTIBIOTIQUES DE REFERENCE		
	FG	EG	FE	EE	FV	EV	FD	ED	NA30	SXT25	FA10
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC11632	6	6	6	6	6	6	6	6	-	16	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6301	12	6	10	6	11	6	9	6	-	-	24
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8714	6	6	6	6	6	6	6	6	17	-	-
<i>Salmonella enteridis</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	18	-	-
<i>Escherichia coli</i>	9	9	9	6	8,5	6	9	6	16	-	-

Source : Auteur

VII. 5. Discussion

Les résultats de l'antibiogramme ont mis en lumière une inégale sensibilité des cinq souches pathogènes vis-à-vis des extraits hydroéthanoliques.

En utilisant la méthode de diffusion sur gélose, à 100mg/ml, l'extrait hydro-éthanolique des feuilles s'est avéré actif sur la souche *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6301 avec un diamètre d'inhibition 10 mm tandis que, les extraits des écorces de tige se sont montrés inactifs.

En augmentant la concentration à 200mg/ml, l'extrait à l'éthanol des feuilles de FG a montré l'activité antibactérienne la plus élevée sur la souche *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6301, -

suivi de l'extrait éthanolique de FV puis l'extrait FE avec zones d'inhibition allant de 10 à 12 mm, le reste des résultats sont présentés dans le tableau VII.04.

D'après tous ces résultats, en comparant les feuilles et les écorces, nous pouvons en conclure que ce sont les feuilles qui sont les plus dotées de pouvoir antibactérien.

Ces résultats sont intéressants, car nous traitons avec un extrait éthanolique et non un produit pur ; par conséquent, l'activité antibactérienne peut être due à des composés différents et liés à la présence de métabolites bioactifs.

VII. 6. Conclusion partielle

L'activité antibactérienne des extraits de feuilles et écorce de *Mangifera Indica L* ont été évaluées sur les cinq souches bactériennes. Les résultats ont révélé que les bactéries Gram+ plus précisément *Streptococcus pneumoniae ATCC 6301*, étaient plus sensibles aux extraits de feuilles que les Gram- . Cependant, les extraits des écorces de tige se sont montrés inactifs. En nous basant sur les résultats obtenus, nous pouvons donc conclure que les feuilles de *Mangifera indica L*. ont plusieurs principes actifs tels que des composés antibactériens.

Chapitre VIII. Partage liquide-liquide de l'extrait hydro-éthanolique des feuilles

Le partage liquide-liquide repose sur le transfert de solutés entre deux phases liquides non miscibles, inertes vis-à-vis des solutés et ayant des masses volumiques différentes. Les extraits FV, FE et FG ont subi un partage liquide-liquide étant donné que la souche bactérienne est sensible vis-à-vis de ces extraits.

VIII. 1. Matériels

- Les solvants : les solvants utilisés dans notre étude, par ordre de polarité croissante, sont : l'hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le butanol.
- Ampoule à décanter : Pour effectuer une extraction liquide liquide afin de séparer par décantation deux liquides non miscibles.
- Le rotavapor : utilisé pour éliminer le solvant et récupérer l'extrait
- Balance de précision
- Spatule
- Verrerie (bécher, pipette)
- Pot en verre ambré

VIII. 2. Principe

Il consiste à extraire un ou plusieurs composés (les solutés) d'un milieu liquide (la solution) dans un solvant non miscible dans lequel les solutés sont solubles.

VIII. 3. Mode opératoire

Une solution d'éthanol-eau (50/50) (V/V) a subi une série successive de partage liquide/liquide avec des solvants organiques : l'hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le butanol. Le principe étant basé sur la non-miscibilité, la polarité différente des solvants et peut être réalisée de différentes manières. La plus simple étant de mélanger les deux phases dans une ampoule à décanter, remuer vigoureusement puis laisser décanter. Lorsque les phases sont complètement séparées, la phase inférieure est évacuée par le robinet situé dans la partie inférieure, puis la phase supérieure (Figure VIII.01). À chaque partage, les solutions sont rassemblées, concentrées sous pression réduite et séchées pour donner les fractions. L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus clair s'interprétant par l'épuisement en métabolites secondaires du matériel végétal traité. Un lyophilisateur a été utilisé pour obtenir des extraits aqueux secs. Les masses des différentes fractions sont obtenues après séchage et énumérées dans le tableau VIII.01 ci-dessous.

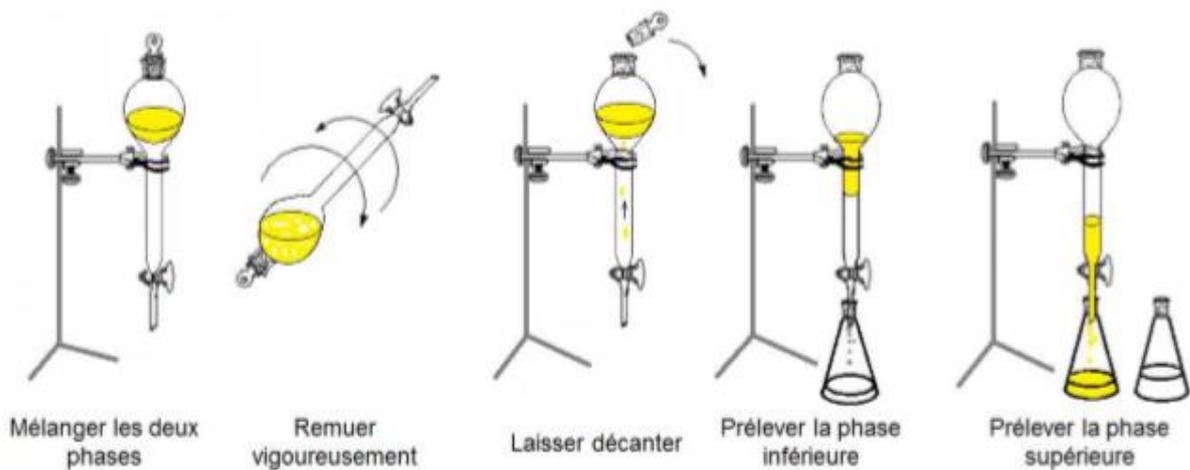


Figure VIII.01 : Extraction liquide-liquide à l'aide d'une ampoule à décanter.

Source : Tiên Do, 2016

Tableau VIII.01 : Volume des solvants et les masses initiales des extraits à partager

Extrait	Masse initiale de l'extrait (g)	Volume Hexane V (ml)	Volume DCM V (ml)	Volume Acetate d'éthyle V (ml)	Volume Butanol V (ml)
Extrait FG	6.635	700	300	400	200
Extrait FV	7.487	700	300	400	200
Extrait FE	6.715	700	300	400	200

Source : Auteur

Les masses des fractions sèches ainsi obtenues sont utilisées pour calculer leurs rendements selon la formule suivante :

$$R = \frac{m}{M} * 100$$

Où R : rendement

m : masse de la fraction sèche obtenue

M : masse de l'extrait initiale

Le partage liquide-liquide est résumé sur la figure VIII.02

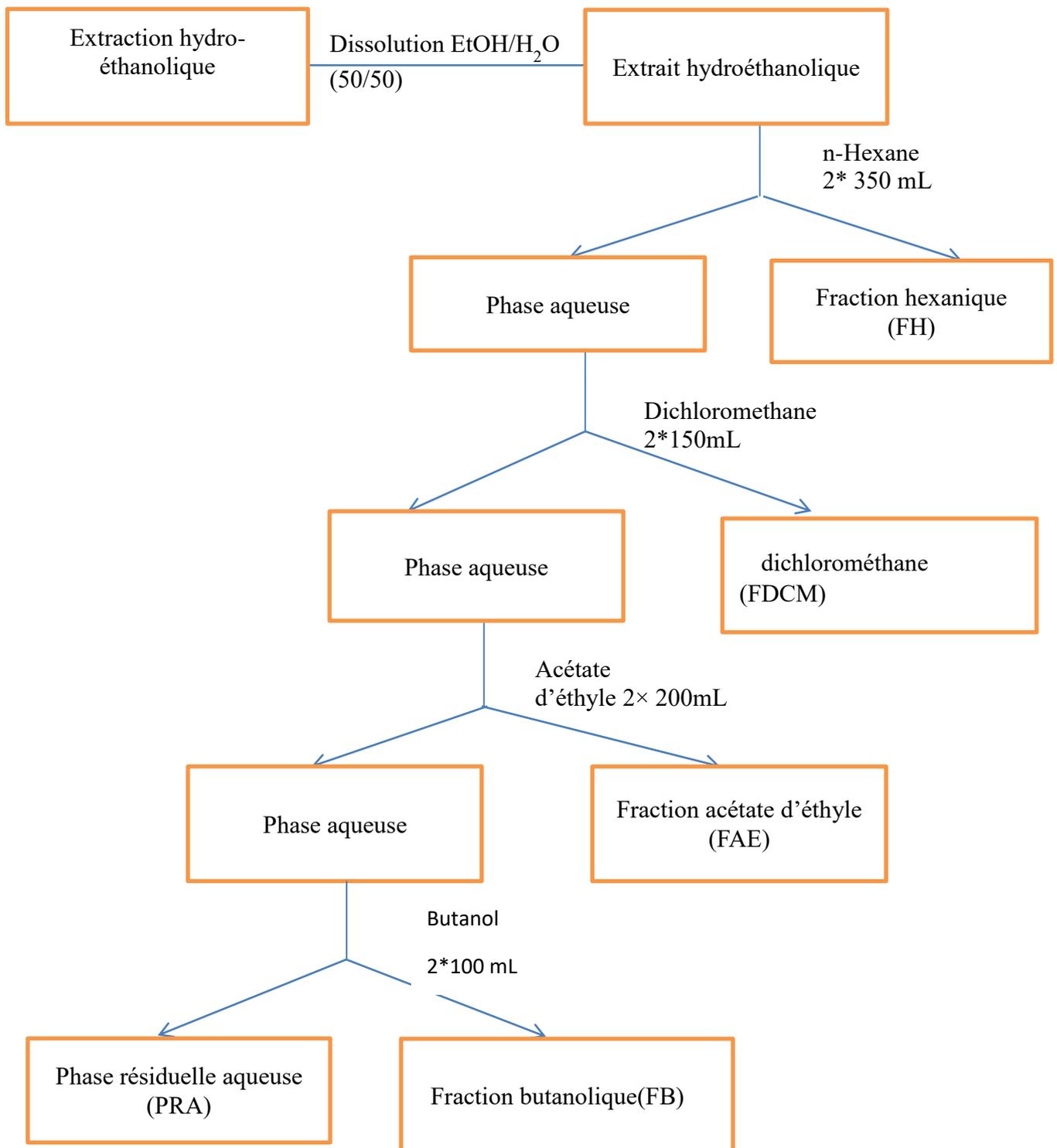


Figure VIII.02 : Schéma du fractionnement

Source : Auteur

VIII. 4. Résultats et discussion

La figure suivante présente le partage liquide liquide des extraits bruts des feuilles de *Magifera Indica L.*



FigureVIII. 03 : Partage liquide-liquide des extraits bruts des feuilles de *Magifera Indica L.*

Source : Auteur

Le partage liquide liquide des feuilles (FV, FG, FE) nous a permis d'obtenir 5 fractions chacun.

Les masses de chaque fraction obtenue après partage liquide- liquide sont présentées dans le tableau suivant

Tableau VIII.02 : Masse de l'extrait obtenu après partage liquide-liquide

Extrait partagé	mi Hexane (g)	DCM (g)	ACETATE (g)	BUTANOL (g)	Aqueuse (g)
Extrait FG	0, 298	0,689	2,166	1,502	0,855
Extrait FV	0,381	0,923	2,320	1,322	0,766
Extrait FE	0, 697	0,572	2,426	1,202	0,520

Source : Auteur

Tableau VIII.03 : Rendement de l'extrait obtenu après partage liquide-liquide

Extrait	Rendement de l'extraction à Hexane ri (%)	Rendement de l'extraction au DCM ri (%)	Rendement de l'extraction à l'Acétate d'éthyle ri (%)	Rendement de l'extraction Au Butanol ri (%)	Rendement de l'extrait aqueux ri (%)
Extrait FG	4,491	10,384	32,645	22,637	12,88
Extrait FV	5,088	12,328	30,927	17,657	10,231
Extrait FE	10,379	8,518	36,188	17,900	7,743

Source : Auteur

VIII. 5. Discussions

Les fractions hexanique et dichlorométhanique ont un faible rendement. En se référant aux extraits hexaniques, nous pouvons conclure que les feuilles de *Mangifera indica* quelque soit leur variété sont pauvres en matières grasses.

D'après ces résultats, la fraction majoritaire est la fraction Acétate d'éthyle. Les métabolites secondaires présents dans les feuilles de *Mangifera Indica* des trois variétés étudiées sont pour la plupart moyennement polaires. En effet, nos résultats démontrent que les rendements d'extraction aux solvants moyennement polaires sont très élevés par rapport à ceux des solvants apolaires et polaires.

La différence de rendement entre les extraits d'acétate d'éthyle par rapport aux extraits d'hexane peut être due au fait que les composés végétaux tels que les composés phénoliques sont souvent extraits en plus grandes quantités dans des solvants plus polaires que dans des solvants moins polaires.

VIII. 6. Tests biologiques des fractions obtenues

VIII.6.1. Matériels et méthodes

Des tests antibactériens ont été effectués sur les fractions obtenues par partage liquide-liquide. Les protocoles de réalisation des tests restent identiques à ceux des extraits bruts (extraits hydro éthanoliques).

L'antibiogramme a pour but de prédire la sensibilité d'un microorganisme vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques. Cette sensibilité est exprimée par l'apparition de zones d'inhibition autour de ces disques. Nous avons utilisé une concentration 100 mg/ml pour tester l'efficacité de nos extraits contre les bactéries pathogènes (*Streptococcus pneumoniae* ATCC 6301, *Escherichia coli*). Les tableaux suivants expriment les résultats obtenus

Tableau VIII.04 : Résultat des tests antibactériens des fractions des feuilles de *Mangifera indica* Var Gasy

Germes-tests	Diamètre des halos d'inhibition (mm)							
	EXTRAITS :					ANTIBIOTIQUES DE REFERENCE		
	FH	FDCM	FAE	FB	FA	NA30	SXT25	FA10
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6301	6	6	11	6	6	-	-	24
<i>Escherichia coli</i>	6	6	6	6	6	16	-	-

Source : Auteur

FH : Fraction Hexanique

FDCM : Fraction dichloromethane

FAE : Fraction à l'acétate d'éthyle

FB : Fraction Butanolique

FA : Fraction aqueuse

Tableau VIII.05 : Résultat des tests antibactériens des fractions des feuilles de *Mangifera indica* Var vato

Germes-tests	Diamètre des halos d'inhibition (mm)							
	EXTRAITS :					ANTIBIOTIQUES DE REFERENCE		
	FH	FDCM	FAE	FB	FA	NA30	SXT25	FA10
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6301	6, 5	7,5	12	6	6	-	-	24
<i>Escherichia coli</i>	6	7	6	6	6	16	-	-

Source : Auteur

Tableau VIII.06 : Résultat des tests antibactériens des fractions des feuilles de *Mangifera indica* Var Esy

Germes-tests	Diamètre des halos d'inhibition (mm)							
	EXTRAITS :					ANTIBIOTIQUES DE REFERENCE		
	FH	FDCM	FAE	FB	FA	NA30	SXT25	FA10
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6301	6	6	10	6	6	-	-	24
<i>Escherichia coli</i>	6	6	6	6	6	16	-	-

Source : Auteur

VIII.6.2. Résultats et discussion

Parmi les extraits testés, les extraits acétate d'éthyle des feuilles des trois variétés ont exercé une activité sur l'agent bactérien à gram (+) testés, dont *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6301 alors que les extraits hexanique, DCM, butanolique et aqueux n'ont montré qu'une petite activité vis-à-vis de cette bactérie avec un diamètre d'inhibition moindre voir aucun.

Nous avons remarqué que tous les extraits ont exercés des activités légèrement moins importantes à absente pour la bactérie Gram (-) qui est l'*Escherichia coli*.

Nous remarquons également que, à la concentration étudiée, la fraction acétate d'éthyle (FAE) de la variété vato montre un pourcentage d'inhibition supérieure aux autres fractions acétate d'éthyle des deux autres variétés, 12 mm a été enregistré comme diamètre d'inhibition vis-à-vis du *S. pneumoniae* pour la variété vato, 11 mm pour le FG et 10 mm pour le FE.

L'extrait qui inhibe le mieux la croissance bactérienne, qui se traduit par une zone d'inhibition le plus élevée, a été choisi pour la suite de notre étude (pour la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice et de la Concentration Minimale Bactéricide ainsi que pour une chromatographie sur colonne ouverte).

VIII. 7. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice en milieu liquide

Afin de mieux évaluer l'activité antibactérienne une étude plus poussée a été menée par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) de l'extrait de feuille de *Mangifera indica L.var Vato* contre la souche bactérienne *Streptococcus pneumoniae ATCC 6301* selon la méthode de micro-dilution.

VIII.7.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI

La concentration minimale inhibitrice est la plus faible concentration des extraits qui inhibe les bactéries testées. La méthode de micro-dilution en milieu liquide a été utilisée pour déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des différents extraits (Carlson et al., 1995). Tous les tests ont été effectués dans le bouillon Mueller Hinton.

- Mode opératoire

La CMI est déterminée par l'évaluation de la turbidité des tubes avec une concentration constamment croissante en agent antibactérien.

Une préparation d'une gamme d'antibiotique (X) de concentrations décroissantes par dilutions successives de raison 1/2 à partir d'une solution mère de l'extrait a été réalisée. Puis une série avec le même volume du milieu de culture liquide a été ajoutée. Ensuite, la même quantité de germes a été ajoutée dans chaque tube (inoculum). Les tubes ainsi préparés ont été incubés à 37 °C pendant 18 heures.

La lecture est effectuée à l'œil nu et la CMI est la plus faible concentration de l'extrait à laquelle aucun trouble n'est observé (Eloff., 1998 ; EUCAST., 2003).

VIII.7.2. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide

La CMB est déterminée à partir de la CMI. Un prélèvement à l'anse calibrée de 10 mL a été réalisé dans chacun des tubes ne présentant aucune croissance visible à l'œil. Chaque prélèvement a été déposé en strie sur gélose. Les souches, dont la concentration finale a été ajustée à 5×10^5 UFC/ml sont ajoutées dans chaque gélose. La lecture est faite après une incubation à 37 °C pendant 24 heures. La plus petite concentration qui ne laisse que 0,01 % de bactéries survivantes après un temps d'exposition à l'antibiotique de 12 à 18 heures correspond à la CMB (Michel Briand., 1986).

VIII. 8. Résultats et discussions de la Concentration Minimale Inhibitrice et Concentration minimale Bactéricide

VIII.8.1. Résultats de la Concentration Minimale Inhibitrice

La détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'extrait AEFV est effectuée par la méthode des dilutions en milieu liquide (microdilution). C'est une technique quantitative qui permet de déterminer l'intervalle de concentrations qui inhibent effectivement la croissance bactérienne. Le résultat obtenu est représenté dans la figure ci-dessous :

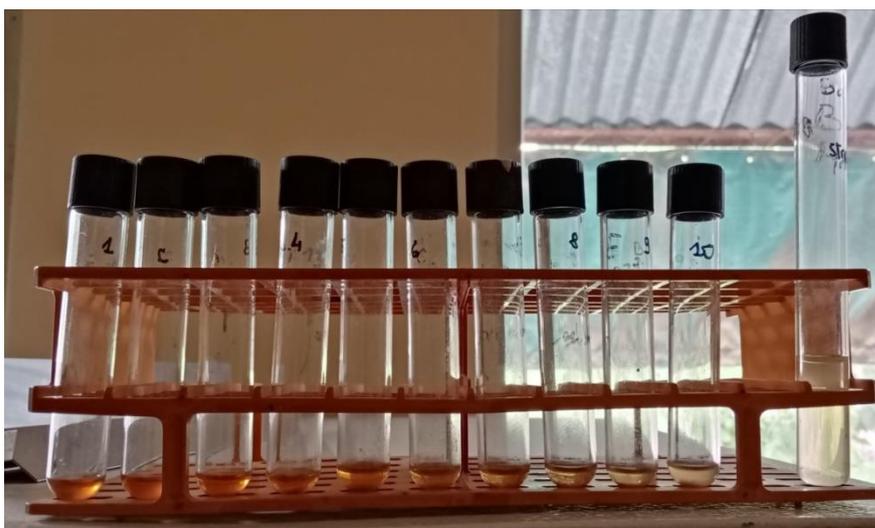


Figure VIII.04 : Résultats de la CMI en milieu liquide

Source : Auteur

Au bout de 18 heures, le tube n° 10 présente un trouble, c'est que la bactérie s'est multipliée et que la concentration n'est pas assez importante. Les tubes n° 1 à 9 sont limpides, les milieux transparents sont les preuves que les cultures n'ont pas poussées. Le tube n° 9 claire nous donne donc la CMI une CMI qui se traduit par une solution limpide et qui ne présente pas de trouble.

VIII.8.2. Résultat de la Concentration Minimale Bactéricide

Tous les tubes qui ont une concentration supérieure ou égale à la CMI (tube n° 1 à 9) ont été repiqués sur gélose MH en stries à l'aide d'une anse calibrée (même volume que pour la numérotation de départ). Au bout de 18 heures, les colonies présentes sur chaque strie sont comptées. La figure suivante illustre le résultat obtenu

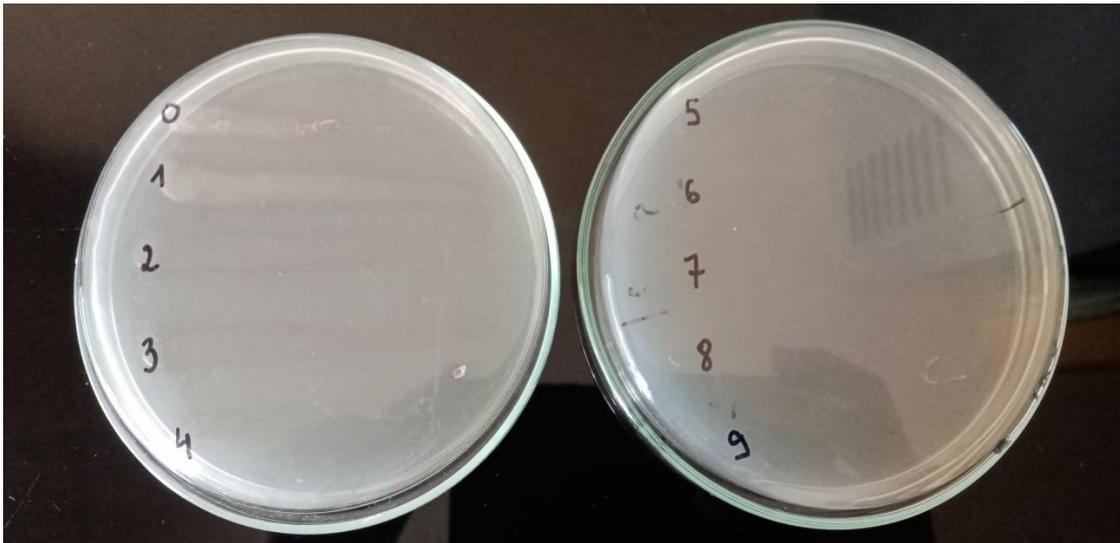


Figure VIII.05 : Résultat de la CMB

Source : Auteur

D'après la figure ci-dessus aucune colonie n'a été détectée sur les stries, pour 10 000 bactéries ensemencées, avec les concentrations des extraits dans le tube n° 1 à 9. La CMB est donnée par le tube n° 9, la valeur de la CMB est donc similaire à celle de la CMI.

VIII.8.3. Discussion

Les paramètres antibactériens, à savoir la (CMI), la (CMB) et le rapport CMB/CMI ont été déterminés avec les extraits de l'acétate d'éthyle des feuilles de manguiers de la variété vato. Plus la concentration nécessaire est élevée et plus la CMI est forte et moins le germe est sensible. Comme $CMB=CMI$, la valeur du rapport $CMB/CMI=1$. L'extrait a donc un pouvoir bactéricide sur le *Streptococcus pneumoniae*. La plus petite valeur à laquelle, l'action inhibitrice de l'extrait commence à s'exercer est 0,195 mg/ml ($CMI=CMB=0,195$ mg/ml). Cette valeur est obtenue avec la souche bactérienne « *Streptococcus pneumoniae* ».

VIII.9. Conclusion partielle

Un partage liquide-liquide sur les extraits éthanoliques des feuilles a été fait par ordre de polarité croissante. Cinq fractions pour chaque extrait de feuilles brutes ont été collectées. Le test antibactérien sur les fractions obtenues a été réalisé et a montré que l'extrait de l'acétate d'éthyle des feuilles de *Mangifera indica* Var vato possède une forte inhibition, avec un diamètre d'inhibition 12 mm, vis-à-vis de la souche *Streptococcus pneumoniae*.

La fraction acétate d'éthyle possède des propriétés bactéricides sur les souches bactériennes étudiées (le *Streptococcus pneumoniae*) avec des CMI et CMB égales à 0,195 mg/ml.

Chapitre IX. Fractionnement sur colonne ouverte à basse pression (CC)

IX.1. Polarité du système d'éluant

Le choix de l'éluant est essentiel. Il n'est pas toujours fourni avec un mode opératoire, mais il est important de savoir le choisir. L'éluant est souvent un savant mélange de plusieurs (2 ou 3) solvants dans des proportions bien établies. Le choix dépend de la polarité.

- Mis au point du système éluant

Le système éluant doit permettre un bon développement dans la migration des substances éluées et permettre une bonne résolution de l'analyse chromatographique. De ce fait l'éluant par gradient d'éluant ou variation de la polarité a été choisie afin d'avoir une bonne séparation des substances éluées. Le gradient séquentiel de dichlorométhane – acétate d'éthyle puis d'acétate d'éthyle – méthanol a été utilisé dans la forme pure et en mélange (tableau IX.01).

Tableau IX.01 : Système d'éluant pour la séparation en chromatographie sur colonne

Ordre	Système de solvant	Proportion (v/v)	Volume (mL)
1	DCM/Acétate d'éthyle	50/50	100
2	DCM/Acétate d'éthyle	30/70	90
3	DCM/Acétate d'éthyle	10/90	90
4	Acétate d'éthyle pur	00/100	90
5	Acétate d'éthyle/MeOH	90/10	90
6	Acétate d'éthyle/MeOH	70/30	90
7	Acétate d'éthyle/MeOH	50/50	90
8	Acétate d'éthyle/MeOH	30/70	90
9	Acétate d'éthyle/MeOH	10/90	90
10	MeOH pur	00/100	90

Source : Auteur

IX.2. Chromatographie liquide sur colonne

Pour le fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle des feuilles, la chromatographie liquide sur colonne a été choisie. Il s'agit d'une technique de purification basée sur la séparation des constituants d'un mélange de substance en fonction de leur polarité c'est-à-dire par leur groupement fonctionnel.

IX.2.1. Matériels utilisés

- Colonne en verre
- Coton
- spatule
- Verrerie (bécher)
- Rotavapor
- Bain mari
- Pot en verre ambré
- Balance de précision

IX.2.2. Mode opératoire

IX.2.2.1. Préparation

L'extrait utilisé dans cette étude est l'extrait acétate d'éthyle obtenu après partage et ayant présenté un diamètre d'inhibition des bactéries le plus élevées par rapport aux autres fractions. La méthode de fractionnement utilisé est la méthode de chromatographie sur colonne, avec une colonne de hauteur de 50 cm et d'un diamètre de 2,5 cm. La colonne a été bien rincée à l'acétone et a été complètement séchée avant l'utilisation. Du coton imbibé de solvant d'élution dit tampon d'ouate a été inséré au fond de la colonne pour maintenir le gel de silice dans la colonne. Trente grammes de gel de silice mélangé avec 100 ml de mélange de DCM et d'acétate d'éthyle ont ensuite été agités pour former une solution de type gel. Puis le mélange a été introduit dans la colonne à environs 2/3 de ce dernier. Notre extrait est solide, une imprégnation sur silice a été donc faite en mélangeant le produit en solution avec ~ 5 x sa masse de silice. Évaporer à sec et additionner ce solide sur le haut de la colonne avant de mettre le sable. L'extrait a été placé au-dessus du lit de gel de silice tassé. Du sable rincé avec le solvant a été ajouté au-dessus de l'extrait à 1 cm de hauteur.

IX.2.2.2. Exécution de la chromatographie sur colonne

Le fractionnement a ensuite été effectué avec une phase mobile constituée de gradient séquentiel de dichlorométhane – acétate d'éthyle (30 : 0 à 70 : 100) puis d'acétate d'éthyle – méthanol (95 : 0 à 5 : 100) autrement dit un gradient d'éluant utilisant des solvants apolaire au solvant polaire dans des proportions variables. Le niveau de solvant à 6 cm au-dessus de l'extrait a été maintenu pour éviter le dessèchement de la colonne. Le débit a été ajusté à 1 ml/min et 40 ml de solvant a été collecté pour chaque fraction.

IX.2.2.3. Collecte de l'échantillon de chromatographie sur colonne

La fraction semi-polaire de l'échantillon serait portée par l'acétate d'éthyle et la fraction polaire serait portée par l'éluant méthanol jusqu'au bas de la colonne. Ensuite, l'échantillon a été collecté tous les 3 ml dans des tubes à essai.

La CCM (Chromatographie sur couche mince) est effectuée à chaque échantillonnage pour voir les changements dans le composé de l'échantillon. Le test a été fait en utilisant la lumière UV pour voir les changements.

IX.2.2.4. Analyse par CCM des fractions obtenues

Dans cette partie de l'étude, la chromatographie sur couche mince nous a permis de suivre les migrations des substances. Tous les échantillons qui avaient été collectés ont été ensuite testés par CCM (gel de silice F254), qui montrerait le taux de mouvement des composés présents dans l'échantillon.

Des plaques d'aluminium à gel de silice nous ont permis d'effectuer la CCM de nos extraits étant donné qu'il faut faire des essais sur CCM avec différents éluants pour avoir une bonne séparation entre les produits, tout en recherchant un $R_f \sim 0.3$ pour le produit le moins polaire. Les plaques ont été coupées de telle manière qu'il avait une longueur et une largeur de 20 cm et 10 cm, respectivement. Les dépôts des fractions éluées de la colonne chromatographique ont été intercalés de 2 à 2. Le dépôt sur plaque CCM terminée a été saturé dans une solution de système d'éluant préalablement déterminé. Après migration, les taches de substances sont révélées aux UV 254 nm puis à 365 nm et par pulvérisation avec de la H_2SO_4 et après séchage à 100 °C dans une étuve pendant 10 min. Nous avons procédé à plusieurs essais de mise au point de système de solvant qui pourraient convenir à nos extraits. Le système qui a permis une bonne élution est le AcOEt/MeOH/eau (8 ; 1,5 ; 0,5), le système étant le même pour les deux plaques.

IX.2.2.5. Combinaison des échantillons en fractions

Le test utilisant la CCM était les données justificatives requises dans la combinaison des échantillons en fractions.

Les fractions avec les mêmes valeurs Rf ou presque égales ont été regroupées en une seule fraction et concentrées à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le poids sec des fractions a été mesuré.

Le calcul de la valeur Rf (Rapport frontal) est donné par l'équation suivante :

$$Rf = \frac{X}{Y}$$

Avec X est *distance parcourue par la tache du composé élué* et Y est la distance parcourue par le front de solvant. La valeur Rf est comprise entre 0 et 0,999.

IX.2.3. Résultats chromatographie sur colonne

L'observation dont les échantillons ont été élués de manière à produire des différences de couleur dans les colonnes est présentée par sur la figure IX.01.



Figure IX.01 : Séparation sur colonne chromatographique

Source : Auteur

Les figures suivantes représentent tous les échantillons qui ont été collectés dans les tubes à essai.

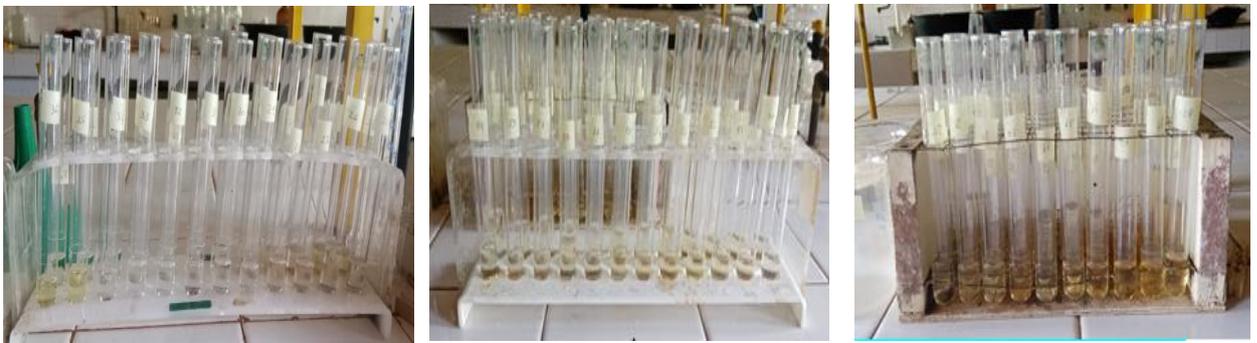


Figure IX.02 : Echantillon collecté dans des tubes à essai

Source : Auteur

Les profils chromatographiques des résultats sont donnés ci-dessous avec les regroupements choisis :

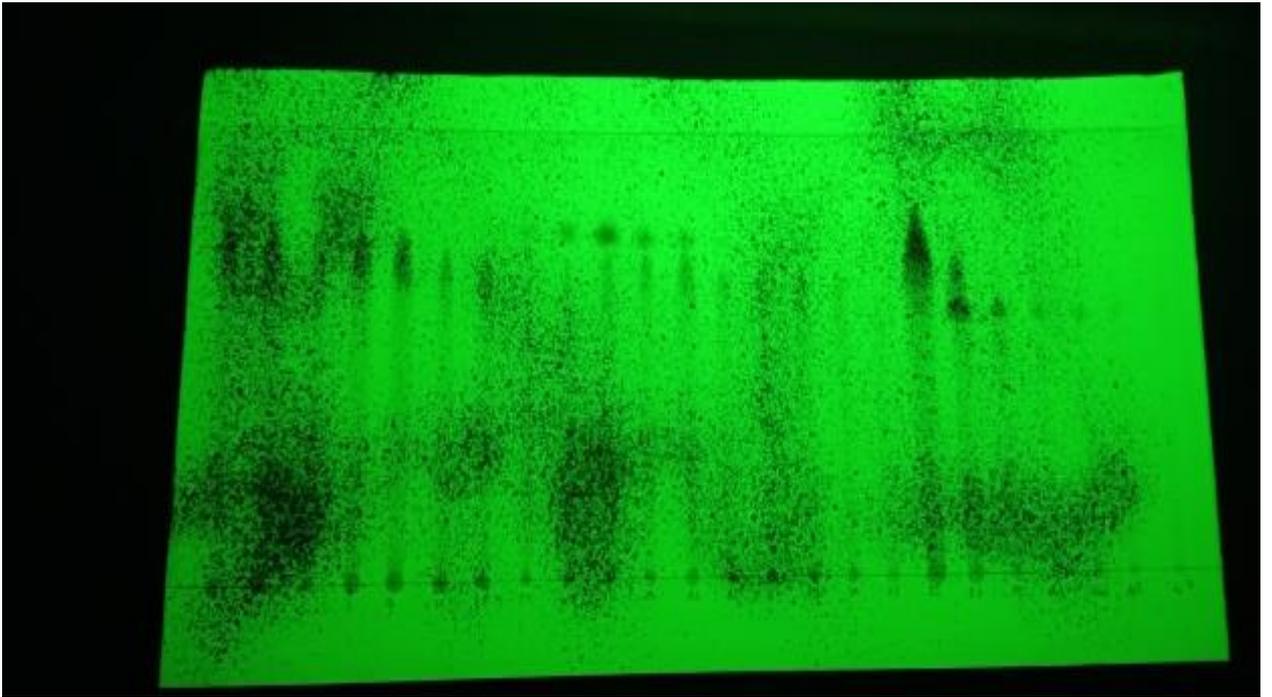


Figure IX.03 : Profils chromatographiques en CCM des fractions 1 à 47 sous UV 254 nm.

Source :Auteur

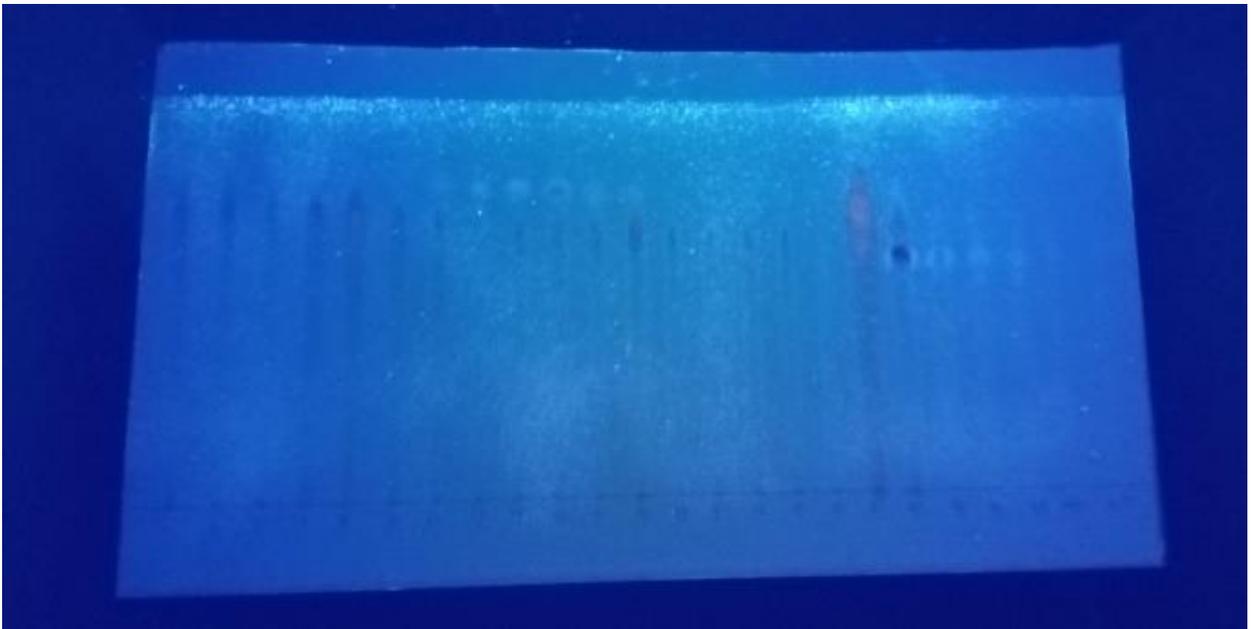


Figure IX.04 : Profils chromatographiques en CCM des fractions à 1 à 47 sous UV 365 nm.

Source : Auteur

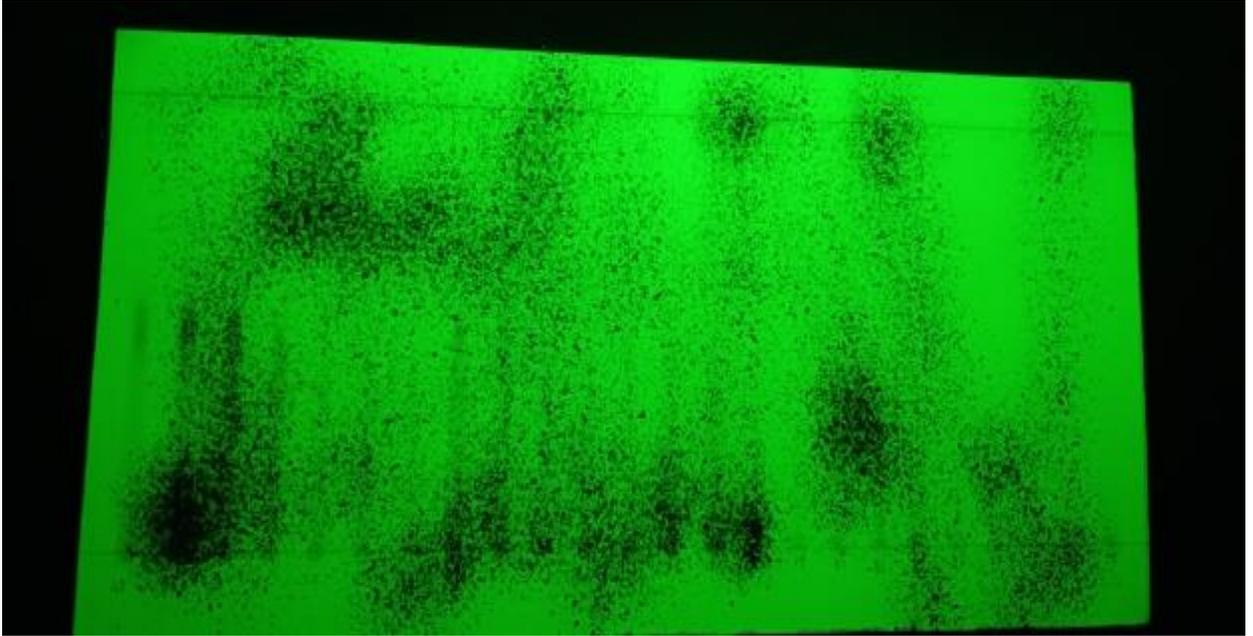


Figure IX.05 : Profils chromatographiques en CCM des fractions à 49 à 103 sous UV 254 nm

Source : Auteur

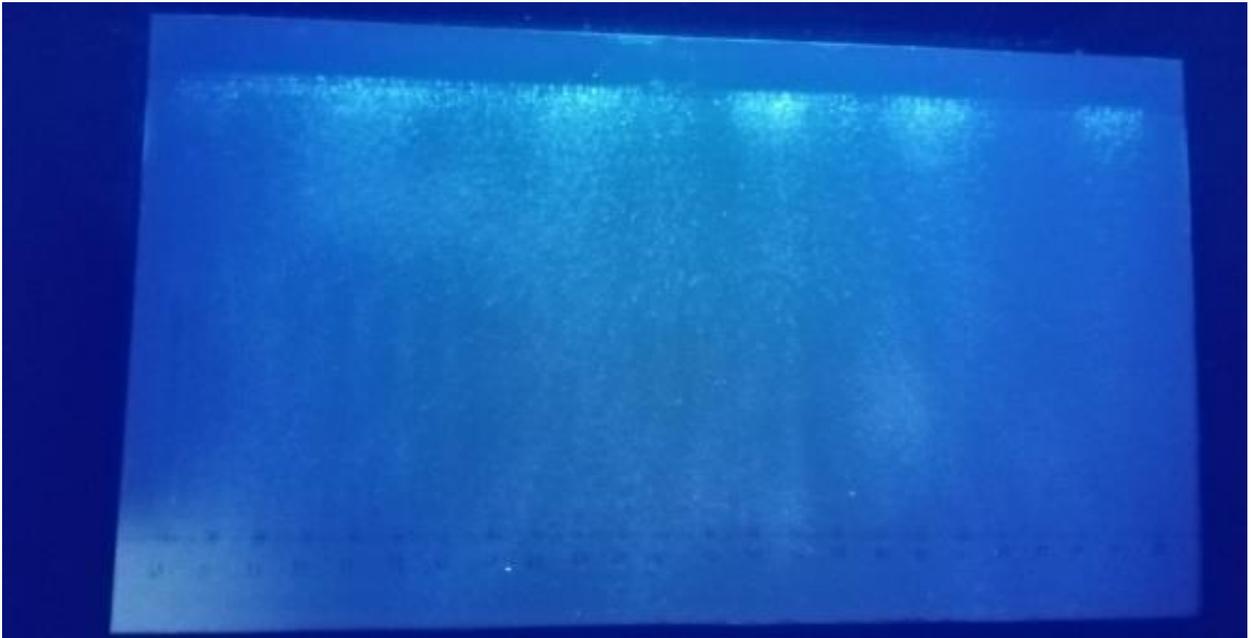


Figure IX.06 : Profils chromatographiques en CCM des fractions à 49 à 103 sous UV 265 nm

Source : Auteur

En se basant sur le mode de calcul du Rf de l'équation $Rf = X/Y$ et en se référant aux chromatographiques des fractions visualisées sous UV 254 et UV 365, les valeurs Rf (Rapport frontal) pour les échantillons testés sur CCM ont été obtenus comme indiqué dans le tableau IX.02. Les échantillons avec des valeurs Rf plus ou moins égaux et présentant les mêmes profils chromatographiques sur CCM ont été rassemblés en une fraction. D'après les résultats de la CCM, les échantillons d'extrait ont été combinés dans chacune des fractions suivantes.

- Les échantillons 1 à 13 ont été combinés en une seule fraction nommée Fraction 1
- Les échantillons 15 à 23 ont été collectés en une seule fraction nommée Fraction 2
- Les échantillons 25 à 33 ont été collectés en une seule fraction nommée Fraction 3
- Échantillon 35 dans une fraction unique nommée Fraction 4
- Échantillon 37 dans une fraction unique nommée Fraction 5
- Les échantillons 39 à 45 ont été combinés en une seule fraction nommée Fraction 6
- Les échantillons 49 à 55 ont été combinés en une seule fraction nommée Fraction 7
- Les échantillons 57 à 61 ont été combinés en une seule fraction nommée Fraction 8
- Les échantillons 63 à 77 ont été combinés en une seule fraction nommée Fraction 9
- Les échantillons 83 à 95 ont été combinés en une seule fraction nommée Fraction 10
- Les échantillons 96 à 103 ont été combinés en une seule fraction nommée Fraction 11

Ainsi, la fraction des combinaisons d'échantillons ci-dessus peut être vue sur la figure X.07 sous-fractions notées F1 à F13 ont été obtenues en se référant à ses profils CCM.

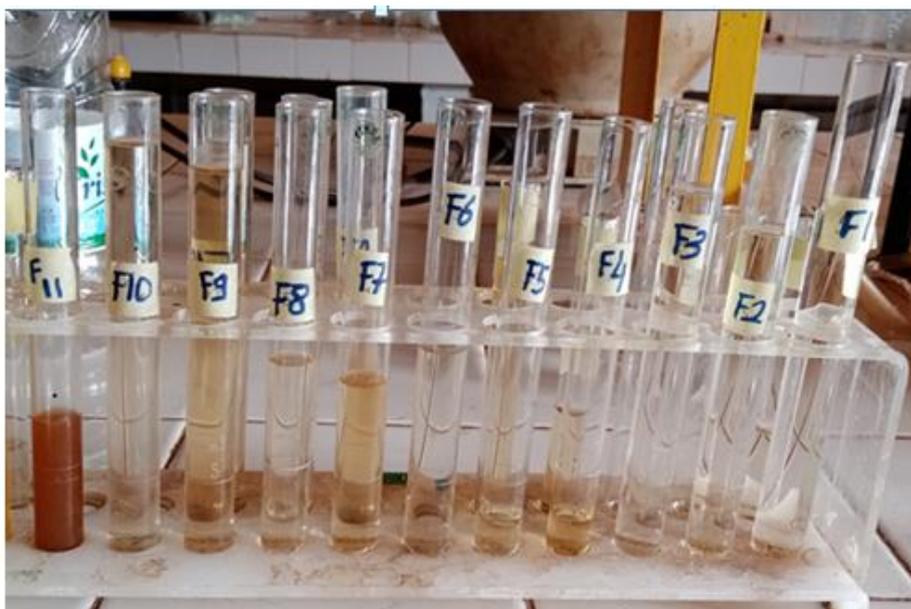


Figure IX.07 : Sous-fractions recueillies dans des tubes à essai

Source : Auteur

Les caractéristiques des produits isolés de l'extrait d'acétate d'éthyle sont consignées dans le tableau suivant :

Tableau IX.02 : Les caractéristiques des produits isolés par fractionnement sur colonne ouverte de la fraction AcOEt

Fractions rassemblées	Notation	R _f	Caractéristiques	Masse	Rendement (%)
1 à 13	F1	0,75	Poudre jaune orangé	0,149	14,9
15 à 23	F2	0,7	Poudre jaune clair	0,163	16,3
25 à 33	F3	0,65	Poudre jaune	0,081	8,1
35	F4	0,9	Poudre jaune	0,064	6,4
37	F5	0,6	Poudre jaune	0,036	3,6
39 à 45	F6	0,58	Poudre jaune	0,028	2,8
49 à 55	F7	0,55	Poudre orange	0,043	4,3
57 à 61	F8	0,50	Poudre jaune orangé	0,021	2,1
63 à 77	F9	0,47	Poudre marron	0,081	8,1
77 à 95	F10	0,4	Poudre marron	0,030	3,0
96 à 103	F11	0,30	Poudre marron foncé	0,121	12,1

Source : Auteur

IX.2.4. Discussion

D'après les rendements des sous-fractions obtenues sur colonne ouverte de la fraction AcOEt, la sous-fraction F1, F2 et F11 sont les plus abondantes des fractions éluées. Les sous-fractions F8 et F10 présentent des faibles rendements avec 2,1 % et 3 % respectivement. La somme des fractions éluées a atteint un rendement de 81,7 %, avec une masse initiale 1g de la fraction AcOEt de *Mandifera Indica var Vato*

IX.3. Tests antibactériens avec les sous fractions.

IX.3.1. Matériel et méthode

Les protocoles de réalisation des tests restent identiques dans tous les tests effectués

IX.3.2. Résultats

La figure suivante illustre les zones d'inhibition des différents sous fractions

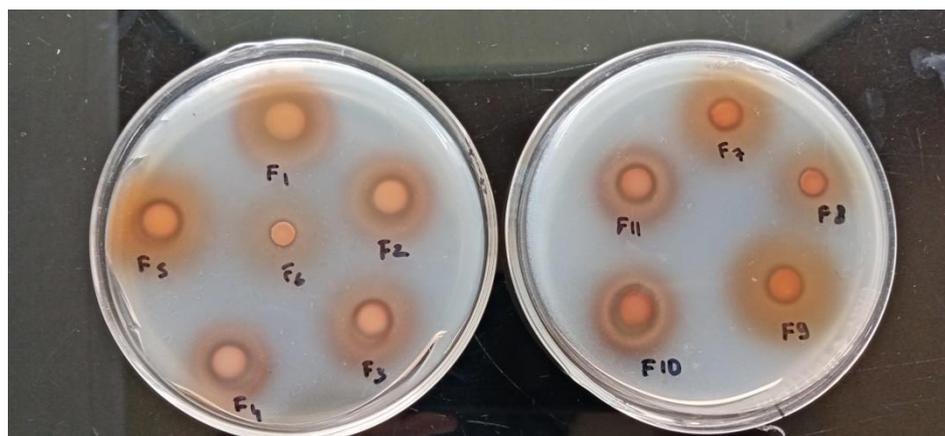


Figure IX.07 : Zones d'inhibition des différentes sous-fractions

Source : Auteur

Le tableau ci-dessous regroupe les valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition des sous-fractions de la plante étudiée.

Tableau IX.03 : Résultats de l'activité antibactérienne des sous-fractions

Fraction	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11
Diamètre des halos d'inhibition	13	11	10	10,5	11	6,5	9	8	9	14	10,5

Source : Auteur

IX.3.3. Discussions

Les résultats révèlent que les plus hauts niveaux d'activités marqués ont été enregistrés par les deux fractions F1 et F10 contre la bactérie Gram (+) *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6301 avec un diamètre d'inhibition de l'ordre de 13 mm et 14 mm. Selon l'échelle donnée par Moreira et al. (2005), la bactérie *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6301 est sensible (+) aux sous-fractions F1, F2, F3, F4, F5, F10, F11.

De grands nombres de plantes médicinales ont été étudiés dans le monde entier pour isoler les composés bioactifs. Notre résultat s'est avéré intéressant en raison des composés avec des valeurs médicinales significatives qui ont été détectés après la chromatographie sur colonne de la fraction acétate d'éthyle. Les autres sous-fractions peuvent avoir des propriétés bioactive en fonction de la nature des constituants chimiques obtenus et les propriétés médicinales ciblées.

IX.4. Conclusion partielle

La fraction AcOEt (1 g) a été soumise à un fractionnement par une chromatographie sur colonne ouverte de gel de silice, utilisant les gradients d'éluant DCM/AcOEt (50/50 à 100 %) et AcOEt/MeOH (0 % à 100 %). Les fractions présentant les mêmes profils chromatographiques sur CCM ont été rassemblées et qui a finalement été fractionné en onze sous fractions. Les résultats des tests antibactériens sur ces sous-fractions a révélé une activité intéressante de F1 et F10 vis-à-vis de la bactérie *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6301.

Conclusion

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable de remèdes traditionnels et efficaces grâce à leurs différents principes actifs. En effet les plantes utilisées en médecine comme agents antimicrobiens, antioxydants depuis l'Antiquité pourraient constituer une solution prometteuse pour les espèces résistantes aux médicaments. La plante *Mangifera Indica L.* fait partie de ses plantes et c'est ce qui nous a motivés à effectuer des travaux de recherche sur sa composition chimique et ses activités biologiques.

Les métabolites secondaires inclus dans les matériels végétaux (*Mangifera Indica L.*) ont été extraits par macération hydroéthanolique. A l'issue de criblage phytochimique, la présence de plusieurs familles chimiques a été mise en évidence. Les tests biologiques ont été faits pour évaluer les activités antibactériennes des extraits de feuilles et écorces.

Les tests biologiques effectués sur les extraits nous ont permis de savoir que les principes actifs de la plante se trouvent dans les feuilles et sont extraits par Acétate d'éthyle. Cet extrait présente une forte activité vis-à-vis des souches bactériennes : *Streptococcus pneumoniae ATCC 6301*. Cependant, les extraits des écorces de tige se sont montrés inactifs. La fraction acétate d'éthyle possède des propriétés bactéricides sur les souches bactériennes étudiées (le *Streptococcus pneumoniae*) avec des CMI et CMB égales à 0,195 mg/ml.

La fraction AcOEt soumise à un fractionnement par une chromatographie sur colonne ouverte de gel de silice, utilisant les gradients d'éluant DCM/AcOEt et AcOEt/MeOH a permis de recueillir onze sous-fractions présentant les mêmes profils chromatographiques sur CCM. Les tests biologiques réalisés sur ces sous-fractions regroupées ont révélé que les substances actives se concentrent dans les fractions F1 et F10.

L'étude phytochimique du manguier aboutit à la constatation que les extraits de feuilles sont dotés d'activités pharmacologiques variées et offrent une alternative à l'utilisation d'antibiotiques dans le contrôle et le traitement des maladies. De plus, les feuilles de manguier sont facilement disponibles, bon marché à la source, la méthode d'extraction est simple, les phytochimiques des plantes sont facilement biodégradables.

De ce fait, une étude plus approfondie sera nécessaire. La possible poursuite des travaux de recherche à effectuer sont les travaux d'isolement et d'identification structurale par spectrométrie de masse et RMN des substances responsables d'activité antibactérienne. De plus, il est souhaitable de faire une étude dans le domaine toxicologique de chaque extrait active afin de

pouvoir la mettre à la disposition de la population avec des posologies précises ou d'injecter leurs extraits bien dosés dans des formes galéniques convenables.

Références bibliographiques

- Christina Goulhot. Le manguier: intérêt pour la phytothérapie. Sciences pharmaceutiques. 1996.
- Kambu K., Tana L., Luki N., Cimanga K., Makuba W. - 1989 Evaluation de l'activité antimicrobienne de quelques préparations traditionnelles antidiarrhéiques utilisées dans la ville de Kinshasa - Zaire Bull. Med. Trad. Pharm., 3(1), 15-24
- Keil H., Wasserman D., Dawson C.R. - 1946 Mango dermatitis and its relationship to poison ivy hypersensitivity Ann. Allergy,4,268-281
- Kent-Jones -1976 Modern Cereal Chemistry {6th ed.) Food Trade press Ltd, London - 557-560
- Kerharo J. - 1969 Sur deux anacardiacées alimentaires introduites au Sénégal Afr. Med., 8 (71), 513-517
- Khan M.A., Khan M.N.I. - 1988 Amino acid and sugar constituents of flowers of *Mangifera indica* Pakistan J. Sei. Ind. Res., 31 (12), 833
- Sharma S.K., Ali M. - 1992 Amine acid and carbohydrate composition of stem bark of some cultivars of *Mangifera indica* J. Indian Chem. Soc., 69(12), 891-892
- Sharma S.K. et Ali M. - 1993 (a) Chemical constituents of stem bark of *Mangifera indica* cultivar Dusehri Indian Drugs, 30(9), 446-449
- Sharma S.K., Ali M. - 1993 (b) Sesquiterpenic constituents of the stem bark of *Mangifera indica* cultivar Chausa. Indian J. Nat. Prod., 9(2), 3-5
- Khan M.A., Khan M.N.I. - 1989 Alkyl gallates of blossoms of *Mangifera indica* Fitoterapia, 60, 284
- Diallo A., 2005, Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guincense* Willd., Thèse de doctorat de Pharmacie, Bamako, Mali
- CIRAD – CITE – GREF, 17 au 22 juin 1996, Plantes Aromatiques et Médicinales à Madagascar Séminaire tenu au CITE
- Rambelison V. H. V., Rasoanaivo L. H., Wadouachi A., Rivoarison Randrianasolo R., Krebs H. C., Raharisolalao A., 2014 Two new Xanthenes from *Garcinia chapelierii*:

Chapexanthone A; chapexanthone B *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2 (5): 98-105.

Rambelason V. H. V. ,Rasoanaivo L. H. , Wadouachi A., Raharisololalao A., 2014 A new triterpene and stigmaterol from *Anthostema madagascariense* (Euphorbiaceae) *International Journal of Chemical Studies* 1(5) : 42-48.

Mathabe M.C., Hussein A.A., Nikolova R.V., Basson A.E., Meyer J.J.M., Lall M., 2008. Antibacterial activity and cytotoxicity of terpenoids isolated from *Spirostachys africana*. *J. Ethnopharmacol.* 116, 194-197.

A. Gravot, «Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux,» support de cours sur le métabolisme secondaire, 2009.

P. J. Vercauteren, Plan, formules et illustrations du cours de pharmacognosie, Université de Montpellier 1, 2011-2012.

Mavar M.H., Brick D., Marie D.E.P., Quetin-Leclercq J., 2004. In vivo anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *J. Ethnopharmacol.* 92(2/3), 209-214.

Le Grand A. - 1989 Les phytothérapies anti-infectieuses de la forêt - savane, Senegal (Afrique occidentale) III: Un résumé des substances phytochimiques et l'activité antimicrobienne de 43 espèces *Journal of Ethnopharmacology*, 25, 315-338

C. C. N'gaman Kohué, B. Yves-Alain, J. A. Mamyrbékova-Békro, B. Anoubilé et G. B. Stéphane, «Sur la Composition en Métabolites Secondaires et L'activité Anti-Oxydante D'extraits Bruts de *Gmelina arborea* Roxb. (Verbanaceae) de Côte d'Ivoire, Afrique de l'Ouest: Analyse par Chromatographie en Couche Mince,» *European Journal of Scientific Research* , vol. 36, n° 12, pp. 161-171, 2009.

Thi Kieu Tiên Do. Évaluation des performances de la chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC) dans l'analyse (qualitative et quantitative) des métabolites secondaires dans les extraits naturels. Autre. Université Côte d'Azur, 2016. Français. NNT: 2016AZUR4096. tel01469641V

J. F. RAKOTOARIVELO, «CONTRIBUTION A L'ETUDE PHYTOCHIMIQUE D'*HELICHRYSUM CHERMEZONII* (ASTERACEAE),» Université d'Antananarivo, Ecole

Normale Supérieure: Mémoire de recherche en vue d'obtenir le Certificat d'Aptitude Pédagogique de l'Ecole Normale en Physique-Chimie, 2010.

M. ARCHAMBAUD et D. CLAVE, Fiche technique-Bactériologie, Toulouse: Laboratoire de Bactériologie Hygiène, 2007.

F. JEHL, M. CHOMARAT, M. WEBER et A. GERARD, De l'antibiogramme à la prescription, BIOMERIEUX, 2003.

Zheng Min-shi, Lu Zhong-yi - 1990 Antiviral effect of mangiferin and isomangiferin on herpes simplex virus Chinese Medical Journal, 103(2), 160-165

Zhu-XM, Song-JX, Huang-ZZ, Wu-YM, Yu-MJ - 1993 Antiviral activity of mangiferin against herpes simplex virus type 2 in vitro Acta Pharmacol. Sin., 14(5), 452-454

ANNEXE 1 : Protocol du screening phytochimique des extraits bruts

C'est un ensemble de tests permettant de déterminer qualitativement et semi-quantitativement les familles chimiques des métabolites secondaires présents dans un extrait de plante ou dans la plante. En cela, il constitue une première approche dans l'étude chimique d'un extrait végétal ou du végétal.

Le principe de tests de criblage est de faire réagir les composés d'une famille chimique avec des réactifs spécifiques qui provoquent l'apparition de précipitation ou de coloration indiquant leur présence dans l'extrait végétal ou le végétal.

2-1- Protocole expérimental de criblage phytochimique

2-1-1- Criblage des alcaloïdes

On prend environ 5g de drogue végétale dont on macérera dans de l'acide chlorhydrique à 12% pendant 15 mn.

Après macération, on procède à une filtration sur coton et le filtrat ainsi obtenu sera divisé dans quatre tubes à essais. Le premier tube servira de témoin. Dans les autres tubes, on y ajoutera 5 gouttes de réactifs utilisés :

- Tube n°1 : témoin
- Tube n°2 : Réactif de Wagner (résultat attendu : précipité rouge orangé)
- Tube n°3 : Réactif de Mayer (résultat attendu : précipité blanc)
- Tube n°4 : Réactif de Dragendorff (résultat attendu : précipité orange)

2-1-2- Criblage des flavonoïdes

200 mg d'extrait organique sont dissouts dans 10 mL d'éthanol à 80%. Après filtration, 1 mL de cette solution hydroéthanolique est additionné de 0,5 mL de HCl concentré et de quelques grains de tournures de magnésium. Après 10 mn, l'apparition d'une coloration rouge indique la présence de flavonoïdes.

2-1-3- Criblage d'anthocyanes

A 2 mL de solution éthanolique d'extrait, on ajoute 2 mL de solution d'acide chlorhydrique à 25%. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacé par addition de solution d'ammoniaque à 25% indique la présence d'anthocyanes.

2-1-4- Criblage des leucoanthocyanes

A 2 mL de solution éthanolique d'extrait sont additionnés 2 mL de HCl concentré. Le mélange est placé au bain-marie bouillant pendant une vingtaine de minutes. L'apparition d'une coloration rouge démontre la présence de leucoanthocyanes.

2-1-5- Criblage des tanins et autres composés phénoliques

L'extrait organique de masse 100mg est dissout dans 25mL d'eau distillée bouillante puis additionnée de quatre gouttes de solution aqueuse de NaCl à 10% (m/v). La solution ainsi obtenue est filtrée sur papier Whatman. Le filtrat refroidi est alors réparti dans quatre tubes à essai, le 4ème tube servant de témoin.

- Tube n°1 : addition de cinq gouttes de gélatine à 1% (m/v). L'apparition d'un précipité éventuel indique la présence de polyphénols.

- Tube n°2 : addition de cinq gouttes de gélatine salée (mélange volume à volume (50/50 v/v) de gélatine à 1% et de solution NaCl à 10%). L'apparition d'une précipitation par la gélatine salée signifie la présence de tanins.

- Tube n°3 : addition de cinq gouttes de FeCl₃ dilué à 1% dans le méthanol.

- La présence de tanins galliques et éllagiques (tanins hydrolysables) est indiquée par l'apparition d'une coloration bleu noir.
- La présence de tanins catéchiques (tanins condensés) s'observe par l'apparition d'une coloration brun verdâtre.
- Une réaction négative à la gélatine salée accompagnée d'une coloration verte ou bleue noire avec FeCl₃, est due à la présence d'autres types de composés phénoliques.

La présence des phénols et des flavanes est déterminée par la réaction avec la vanilline sulfurique. A 26mL de solution d'extrait MeOH est additionnée 1mL d'une solution hydroéthanolique à 2% de vanilline (m/v) et 12% de HCl. L'apparition d'une coloration rouge indique une réaction positive.

2-1-6- Criblage des coumarines

Le test de détection des coumarines est basé sur leur propriété à présenter une fluorescence nette aux rayons UV. A 200 mg d'extrait éthanolique, on ajoute 10 mL d'eau distillée. Après dissolution et filtration, à 5 mL du filtrat est additionnée goutte à goutte une solution aqueuse de soude à 20 %, puis on la chauffe au bain-marie bouillant pendant quelques minutes. Le mélange est ensuite observé sous rayonnement UV 365 nm : une fluorescence nette (jaune, vert, bleu, orange) indique la présence des coumarines (méthode indicative et non une identification).

2-1-7- Criblage des triterpènes et stéroïdes.

Prendre 500mg de l'extrait hydroalcoolique dépigmenté ou d'extrait organique et y ajouter 20 mL de dichlorométhane puis agiter pendant 5 à 10 mn. Laisser décanter puis sécher la solution avec Na₂SO₄ anhydre. Filtrer et répartir le filtrat dans 5 tubes à essai propres et secs ; le tube n°5 servira de témoin. [22]

- Test de Liebermann Burchard : Dans le premier tube, additionner 4 gouttes d'anhydride acétique et 4 gouttes d'acide sulfurique concentré. La présence des composés chimiques est indiquée par la coloration observée suivante :

- Pourpre : présence de triterpènes ;
- Violet ou bleu vert : présence de stéroïdes.

- Test de Salkowski : Incliner le tube à 45° puis ajouter 1mL d'acide sulfurique concentré. Après 30 mn, la présence de stérols insaturés est indiquée par l'apparition d'un anneau de séparation des phases de couleur rouge.

- Test de Badjet Kedde : Additionner quelques grains d'acide picrique à la solution. L'observation d'une coloration rouge dénote la présence de stéroïdes lactoniques.

- Test de Keller-Killiani : Incliner le tube de 45° et additionner quelques gouttes de FeCl₃ à 10% dans le méthanol et quelques gouttes d'acide acétique glacial. La présence d'un anneau de séparation de phase de couleur rouge pourpre indique la présence de désoxy-2-sucres.

2-1-8- Criblage des quinones

200 mg d'extrait organique sont dissouts dans de l'eau distillée, puis filtrés. Le filtrat est extrait deux fois au benzène.

A 10 mL d'extrait benzénique sont ajoutés 5 mL de solution aqueuse d'ammoniaque NH_4OH à 20 %, puis le mélange est agité. Après décantation, une coloration rouge-orangé ou rougeviolacé de la phase ammoniacale indique un test positif.

2-1-9- Criblage des saponines

Une masse de 2 g de matériel végétal sec ou son équivalent en extrait brut est agité vigoureusement pendant 30 secondes avec 20mL d'eau distillée dans un tube à essai. Le tube est ensuite disposé verticalement. Après 10 mn de repos, une hauteur de la mousse persistante, supérieure ou égale à 3 cm, indique la présence de saponines.

2-1-10- Criblage des composés cyanogénétiques

3 g de poudre végétale sont introduites au fond d'un tube à essai avec 1 mL d'eau. A la plante humectée sont ajoutés 1,5 mL de chloroforme. Le tube est bouché en coinçant une bandelette de papier Whatmann imprégné de solution aqueuse de picrate de sodium (5 g de carbonate de sodium + 100 mL d'eau + 0,5 g d'acide picrique). Le tube à essai fermé est laissé au bain-marie à 35°C pendant une nuit (environ 12 h). Le papier coloré prend une teinte rouge en cas de libération de HCN par la plante (c'est-à-dire que les hétérosides cyanogènes sont présents).

2-1-11- Criblage des iridoïdes

Réaction avec HCl dilué suivi de chauffage : à 1 ml de solution limpide d'extrait hydroéthanolique est ajouté 0,5 ml de HCl 12% aqueux. Le mélange est ensuite chauffé au bain-marie à 80°C pendant 2 à 3 minutes.

Réaction en présence de glycérol : le réactif est constitué d'un mélange à volume égal d'éthanol 80%, de glycérol et de HCl 12% aqueux préparé juste avant le test. A 1 ml de solution limpide d'extrait hydroéthanolique est ajouté 0,5ml de ce réactif. Le mélange est ensuite chauffé au bain-marie à 80°C pendant 2 à 3 minutes.

Pour chaque réaction, l'apparition de précipité noir après chauffage indique la présence des iridoïdes.

TABLES DES MATIERES

REMERCIEMENTS	i
SOMMAIRE	ii
GLOSSAIRE.....	iii
LISTE DES ABREVIATIONS	iv
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES ANNEXES.....	vii
INTRODUCTION GENERALE	1
PARTIE I : Etudes bibliographiques	
Chapitre I. Généralité sur le Manguier	2
I.1. Origine et histoire du manguier.....	2
I.2. Nomenclature	2
I.3. Classification et description botanique du manguier.....	3
I.3.1. Classification.....	3
I.3.2. Description botanique	3
I.3.2.1. Fruit	3
I.3.2.2. Feuilles	4
I.3.2.3. Fleur	5
I.3.2.4. Noyau	6
I.3.2.5. Ecorce.....	7
I.3.2.6. Racine.....	7
I.4. Diversité du manguier, Ecologie et répartition.....	8
I.3.1. Diversité	8
I.3.1.1. Variété	8
I.3.1.2. Variété à Madagascar :	9
I.3.2. Ecologie.....	9
I.3.3. Répartition.....	10
I.3.3.1. Dans le monde	10
I.3.3.2. A Madagascar.....	11
I.5. Utilisation traditionnelles et vertus thérapeutiques	11
I.4.1. Fruit.....	12
I.4.2. Feuille.....	12
I.4.3. Noyau	13

I.4.4.	Ecorce.....	13
I.4.5.	Racine.....	13
I.4.6.	Bois	13
Chapitre II.	METABOLITES SECONDAIRES.....	14
II.1.	Les alcaloïdes	14
II.2.	Les composés phénoliques	16
II.2.1.	Les acides phénoliques ou phénols simples	17
II.2.2.	Les flavonoïdes	18
II.2.3.	Les coumarines.....	20
II.2.4.	Les tanins.....	21
II.2.5.	Les anthocyanes	22
II.3.	Les terpénoïdes et les stéroïdes	22
Chapitre III.	GÉNÉRALITÉS SUR LA CHROMATOGRAPHIE.....	24
III.1.	Définition	24
III.2.	Principe	24
III.3.	Les différents types de chromatographie et leurs applications.....	24
III.3.1.	Suivant la nature de la phase mobile	24
III.3.2.	Suivant l'état physique de la phase stationnaire	25
III.4.	CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE.....	27
III.4.1.	Définition	27
III.4.2.	principe.....	28
III.4.3.	Application de la CCM	28
III.4.3.1.	Déposition des échantillons.....	28
III.4.3.2.	Développement de la plaque	28
III.4.3.3.	Révélation.....	29
III.4.3.4.	Paramètre du CCM.....	29
III.5.	La chromatographie de partage	31
III.6.	La chromatographie sur colonne ouverte	32
Chapitre IV.	Généralité sur les activités antibactériennes.....	34
IV.1.	Bactéries pathogènes	34
IV.2.	Différentes méthodes de détermination de la sensibilité aux Antibiotiques	34
IV.2.1.	Méthodes de détermination de la CMI.....	35
IV.2.2.1	CMI par microdilution manuelle en milieu liquide.....	35
IV.2.2.2	CMI en milieu gélosé par méthode Etest®	36

IV.2.2.	La technique d'antibiogramme.....	36
IV.2.2.1	Antibiogramme par dilution en milieu liquide : l'automate.....	37
IV.2.2.2	Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé ou méthode des disques.....	38
IV.3.	La Concentration Minimale Inhibitrice et la Concentration Minimale Bactéricide.....	40
IV.3.1.	Concentration Minimale Inhibitrice.....	40
IV.3.2.	Concentration Minimal Bactéricide.....	40
IV.3.3.	Détermination du pouvoir bactéricide ou bactériostatique.....	40
Partie II : Etudes expérimentales		
Chapitre V.	Extraction hydroéthanolique.....	41
V.1.	Matériels.....	41
V.1.1.	Collecte et identification des plantes.....	41
V.1.2.	Matériels techniques.....	41
V.2.	Mode opératoire.....	42
V.2.1.	Préparation des matériels végétaux.....	42
V.2.2.	Extraction hydro éthanolique.....	42
V.3.	Résultats de l'extraction éthanolique.....	45
V.4.	Discussion.....	46
Chapitre VI.	Criblage phytochimique.....	47
VI.1.	Matériels.....	47
VI.2.	Méthodes.....	47
VI.3.	Résultat du screening phytochimique.....	49
VI.4.	Discussion.....	51
VI.5.	Conclusion partielle.....	51
Chapitre VII.	Evaluation de l'activité anti bactérienne des extraits.....	52
VII. 1.	Matériels.....	52
VII. 2.	Méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne.....	54
VII.2.1.	Principe.....	54
VII.2.2.	Mode opératoire.....	54
VII.2.2.1.	Choix des souches.....	54
VII.2.2.2.	Préparation des extraits.....	55
VII.2.2.3.	Milieu de culture.....	55
VII.2.2.4.	Préparation du milieu.....	55
VII. 3.	Résultats des tests microbiologiques.....	57
VII. 4.	Discussion.....	58

VII. 5.	Conclusion partielle.....	59
Chapitre VIII.	Partage liquide-liquide de l'extrait hydro-éthanolique des feuilles.....	60
VIII. 1.	Matériels.....	60
VIII. 2.	Principe	60
VIII. 3.	Mode opératoire	60
VIII. 4.	Résultats et discussion.....	63
VIII. 5.	Discussions.....	64
VIII. 6.	Tests biologiques des fractions obtenues	65
VIII.6.1.	Matériels et méthodes.....	65
VIII.6.2.	Résultats et discussion	67
VIII. 7.	Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice en milieu liquide :	68
VIII.7.1.	Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI.....	68
VIII.7.2.	Détermination de la Concentration Minimal Bactéricide.....	68
VIII. 8.	Résultats et discussions de la Concentration Minimale Inhibitrice et Concentration minimale Bactéricide.....	69
VIII.8.1.	Résultats de la Concentration Minimale Inhibitrice	69
VIII.8.2.	Résultat de la Concentration Minimal Bactéricide.....	69
VIII.8.3.	Discussion	70
VIII.9.	Conclusion partielle	70
Chapitre IX.	Fractionnement sur colonne ouverte à basse pression (CC).....	71
IX.1.	Polarité du système d'éluant	71
IX.2.	Chromatographie liquide sur colonne	72
IX.2.1.	Matériels utilisés	72
IX.2.2.	Mode opératoire	72
IX.2.2.1.	Préparation	72
IX.2.2.2.	Exécution de la chromatographie sur colonne	73
IX.2.2.3.	Collecte de l'échantillon de chromatographie sur colonne	73
IX.2.2.4.	Analyse par CCM des fractions obtenues	73
IX.2.2.5.	Combinaison des échantillons en fractions	74
IX.2.3.	Résultats chromatographie sur colonne.....	75
IX.2.4.	Discussion	80
IX.3.	Tests antibactériens avec les sous fractions.....	80
IX.3.1.	Matériel et méthode.....	80
IX.3.2.	Résultats	80

IX.3.3. Discussions.....	81
IX.4. Conclusion partielle	81
CONCLUSION ET PERSPECTIVE	82
Références bibliographiques.....	84
ANNEXE I.....	I

AUTEUR : RAZANADRAKOTO Herimanana Nalitiana Mendrika

(nalitiana.mendrika@gmail.com/0340463331)

NOMBRE DE PAGES : 87

NOMBRE DE TABLEAUX : 21

NOMBRES DE FIGURES : 41

NOMBRE DES ANNEXES : 6



RESUME :

Les travaux présentés dans ce mémoire contribuent à l'étude phytochimique et de l'activité antibactérienne de *Mangifera Indica L.* connue dans la thérapie traditionnelle à Madagascar. Les extraits ont été obtenus par macération hydroéthanolique des feuilles et des écorces des tiges. Des tests in vitro de leurs activités antibactériennes ont été réalisés sur des souches de bactéries bien choisies. Ainsi, les extraits brutes de feuilles obtenus à partir de différentes variétés de mangues récoltées se sont révélés actifs sur l'agent pathogène avec des diamètres d'inhibition 10mm.

Des extractions liquide liquide avec des solvants, classés par ordre de polarité croissante ont été menée sur les extraits des feuilles qui s'est révélées actives. Les extraits ainsi obtenus ont été soumis à un test antibactérien. L'extrait d'acétate d'éthyle ayant un diamètre d'inhibition le plus élevé a été passé dans une Chromatographie sur colonne et ce dernier nous a permis d'obtenir deux fractions actives F1 et F11 vis-à-vis du *Streptococcus pneumoniae ATCC 6301*. Ces travaux permettent de postuler que les feuilles de *Mangifera Indica L.* sont une source prometteuse de composés antibactériens.

Mots clés : *Mangifera indica L.*, activité antibactérienne, extrait de feuille, *Streptococcus pneumoniae ATCC 6301*, extrait

ABSTRACT :

The work presented in this thesis contributes to the phytochemical study and the antibacterial activity of *Mangifera Indica L.*, which is well known in traditional therapy in Madagascar. The extracts were obtained by hydroethanolic maceration of the leaves and stem bark. In vitro tests of their antibacterial activities have been carried out on well-chosen strains of bacteria. Thus, leaf extracts obtained from different varieties of harvested mangoes were found to be active on the pathogen with inhibition diameters of 10mm. Liquid liquid extractions with solvents, classified in order of increasing polarity were carried out on the extracts of the leaves which proved to be active. The extracts thus obtained were subjected to an antibacterial test. The ethyl acetate with the highest inhibition diameter was passed through column chromatography and the latter allowed us to obtain two active fractions F1 and F11 against *Streptococcus pneumoniae ATCC 6301*. These This work allows us to postulate that the leaves of *Mangifera Indica L.* are a promising source of antimicrobial compounds.

Key words : *Mangifera indica L.*, antibacterial activity, phytochemical screening, leaf extract, *Streptococcus pneumoniae ATCC 6301*

FINTINA :

Ny asa fikarohana izay natao dia mifototra amin'ny fandalinana ny fiasan'ny singa azo avy amin'ny ravina sy hodinkazon'ny manga amin'ny fiadiana amin'ny otrik'aretina. Ny manga zay efa fampiasa tokoa amin'ny fitsaboana nentimpaharazana. Ireo singa azo ireo dia nalaina avy tamin'ny karazana manga, ny mikiraoba nanaovana ny fanandramana kosa dia mikiraoba efa voafantina tsara. Rehefa natao ny fanandramana dia hita fa mandevona ny mikiraoba ny singa azo avy tamin'ny ravina. Mikiraoba izay antsoina hoe « *Streptococcus pneumoniae ATCC* ». Ny singa izay nahitana fa afaka mandevona ny mikiraoba dia nampandalovina « chromatographie sur colonne » ary nahazoana ampahany roa, singa, izay mandevona kokoa ny mikiraoba noho ny teo aloha. Izany rehetra izany ahafahana milaza fa manana singa afaka mamono ny mikiraoba ny ravina manga.

Teny fototra : maga, mikiraoba, singa azo avy amin'ny ravina, *Streptococcus pneumoniae ATCC 6301*

Encadreur : Professeur ROBIJAONA Rahelivololoniaina Baholy (holyrobi@gmail.com)