



RAPPORT SCIENTIFIQUE DU 01 SEPTEMBRE 2013 AU 30 JUIN 2014

Par ANDRIANANTENAINA Rigobert

Adresse :

- Laboratoire de Biochimie appliquée aux Sciences Médicales
Département de Biochimie fondamentale et Appliquée de la Faculté des Sciences
(Université d'Antananarivo)

- Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement
Centre National de Recherches sur l'Environnement
Fiadanana Antananarivo BP 1739

Tél : (+261) 33 29 748 91,
mail : andrigobert1@hotmail.fr

Projet « Contribution à l'étude d'*Ocotea auriculiformis* Kost., en vue de sa valorisation dans le domaine des insecticides »

Financé par Projet FSP PARRUR-SCAC

Directeur de thèse : Pr RALAMBORANTO Laurence

Sommaire

Sommaire -----	2
Remerciement -----	3
I-INTRODUCTION -----	4
II-MATERIEL -----	5
II-1-Matériel végétal -----	5
II-2-Matériel biologique -----	6
III- METHODES -----	6
III-1-Séchage et conservation -----	6
III-2-Extraction de l'huile essentielle -----	6
III-3-Caractérisation physico-chimique de l'huile essentielle -----	6
III-4-Identification des différents constituants de l'huile essentielle -----	7
III-5-Test d'activité antimicrobienne -----	8
III-6- Etude de la toxicité aiguë -----	9
III-7-Antioxydant -----	12
IV- RESULTAT -----	12
IV-1-Rendement en huile essentielle -----	12
IV-3-Caractérisation physico-chimique -----	12
IV-4-Identification des constituants chimiques -----	13
IV-5-Test d'activité antimicrobienne -----	14
IV-6-Détermination de la toxicité générale aiguë -----	15
IV-7-Antioxydant -----	16
V-DISCUSSION ET CONCLUSION -----	17
VI-PERSPECTIVES -----	18
VII-BIBLIOGRAPHIE -----	18

Remerciement

Mes plus vifs remerciements s'adressent :

-Monsieur le Responsable du projet ainsi que toute l'équipe du projet FSP PARRUR -SCAC, de m'avoir financé pour la réalisation de se travaux.

- Madame le Directeur du LABASM (Laboratoire de Biochimie appliquée aux Sciences Médicales) ;

- Madame le Directeur du CNRE du Centre National de Recherches pour l'Environnement (CNRE).

De m'avoir accepté comme stagiaire au sein de leur institution

- Madame le Directeur de thèse, de m'avoir dirigée pour la réalisation de ce travail.

Ce travail n'aurait pu être fait sans l'appui et les conseils de nombreuses personnes.

Nous tenons à témoigner toute notre gratitude à

- Monsieur le Chef de Département « Ecosystèmes terrestres » du CNRE

- Monsieur le Chef du Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement du CNRE, ainsi qu'au Responsable de l'Unité « Extraction et Analyse des Produits Naturels »,

Pour vos accueils et aides précieuses dans la réalisation de ce travail

I-INTRODUCTION

Depuis l'antiquité, les vertus thérapeutiques des huiles essentielles sont connues et utilisées, notamment en Asie où ces produits naturels constituent la base de la médecine traditionnelle. Plusieurs recherches scientifiques le confirment : certaines peuvent être analgésiques, calmantes, cicatrisantes, alors que d'autres sont bactéricides, fongicides, virucides, antiparasitaires ou immunostimulantes (TURBIDE, 2010). En conséquence, en pharmacie, les huiles essentielles sont majoritairement destinées à l'aromatisation des formes médicamenteuses et à la production d'antiseptiques (BRUNETON, 1999). En effet, de nos jours, environ 3000 huiles essentielles sont produites et utilisées de part le monde dans des domaines variés.

La flore malgache est unique par sa richesse, sa diversité et son endémicité. Il existe 14000 espèces sur une superficie de 590000 km². Huit familles botaniques entières, 25% des genres et 80% des espèces ne se trouvent nulle part ailleurs qu'à Madagascar (RASOANAIVO, 1999). Malgré le nombre croissant d'études sur cette biodiversité végétale, nombreuses sont les espèces qui n'ont pas encore fait l'objet d'étude approfondies (PERNET, 1957). Actuellement, plusieurs chercheurs se penchent sur la flore endémique de Madagascar afin d'une part, d'en approfondir la connaissance scientifique et d'autre part, de sauvegarder quelques espèces menacées ou en voie de disparition.

Toutes ces observations ont éveillé notre curiosité de mieux connaître la plante aromatique et endémique malgache *Ocotea auriculiformis* Kost. sur le plan scientifique vue que cette plante est utiliser de façon anarchique la ou on a fait le récolte.

De plus, la menace de déforestation et la recrudescence des besoins des riverains qui défrichent toute la forêt pour leur besoins quotidiens afin d'y aménager leur culture risque de diminuer le forêt.

Dans ce contexte, cette étude a été menée pour valoriser cette plante afin de contribuer à son utilisation rationnelle et à sa conservation. Pour cela, nous allons déterminer ses potentielles thérapeutiques, approfondir les connaissances sur l'utilisation de cette l'huile essentielle extraites de feuille. Afin de développer des alternatives à la lutte chimique toxique pour l'environnement et valorisation de la biodiversité Malgache. A notre connaissance, cette espèce n'a fait l'objet d'aucune étude approfondie jusqu'à ce jour.

Le présent travail se subdivisera en deux parties : la première traitera des matériels et méthodes mis en œuvre pour le bon déroulement de l'étude et la deuxième traitera des résultats, des discussions ainsi que des recommandations et permettra alors de répondre à l'objectif fondamental posé précédemment.

II-MATERIEL

II-1-Matériel végétal

Collecte

La récolte d'*Ocotea auriculiformis* Kost était effectuée au mois de juillet 2013 au environ de Mandraka à 70 km d'Antananarivo. La plante était en pleine croissance, en cette période.

Elle est endémique de Madagascar (www.tropicos.org). On la rencontre aussi dans la partie de Sud et Sud-est de Madagascar (www.tropicos.org).

Identification

L'identification de l'échantillon sous forme d'herbier a été faite avec l'aide des départements « botanique » respectifs, FOFIFA d'Ambatobe et l'université d'Antananarivo.

Les paysans connaissent la plante sous différents noms vernaculaires selon les guides respectifs « varongy tavolomanitrakondro, varongy be ». La plante est dénommée *Ocotea auriculiformis* Kost. par comparaison avec l'herbier de référence n° 183_R_73 établi par H Van der Werf en 2007 au FOFIFA d'Ambatobe d'Antananarivo de Madagascar.

Classification

La plante a été classée comme suit (KOSTERMANS, 1950) :

- _ Règne : *Végétal*
- _ Embranchement : *Spermaphytes*
- _ Sous-embranchement : *Angiospermes*
- _ Classe : *Magnolopsida*
- _ Ordre : *Laurales*
- _ Famille : *Lauraceae*
- _ Genre : *Ocotea*
- _ Espece : *auriculiformis* Kost.
- _ Nom vernaculaire : varongy tavolomanitrakondro, varongy be

D'après les enquêtes ethnobotaniques effectuées, aucune utilisation en médecine traditionnelle n'a été enregistrée. Par contre, le bois est utilisé localement pour la fabrication de meubles, de poteaux dans les bâtiments, d'ustensile et de manches d'outils et aussi, en charbon de bois. Les feuilles sont utilisées pour la nourriture des bœufs.

II-2-Matériel biologique

II-2-1-*Animaux à sang chaud*

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des souris OF1, procurés aux prés de l'Institut Pasteur de Madagascar. Les animaux sont hébergés dans des cages où ils ont accès libre à l'eau et à l'aliment.

II-2-2-Souche microbienne

Les souches disponibles au Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement du CNRE ont servi de germes-tests. Leur liste est donnée dans le tableau ci-dessous avec leurs références et leurs caractéristiques.

Tableau 1 : Souches microbiennes utilisées

Souches		Coloration de Gram
BACTERIES	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13061	+
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 11632	+
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6301	+
	<i>Escherichia coli</i>	-
	<i>Salmonella enteridis</i>	-
	<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 700323	-
LEVURE	<i>Candida albicans</i>	

II-2-3-Test anti-moustiques

Différentes larves et moustiques ont été élevés dans l'insectarium du département entomologie du CNRE à savoir *Anophele gambiae*, *Culex quinquefasciatus*, *Aedes albopictus*.

III-METHODES

III-1-Séchage et conservation

Les feuilles, fraîchement récoltées, sont séchées à l'abri de soleil dans un endroit sec et aéré pendant environ 20 à 30 jours.

III-2-Extraction de l'huile essentielle

La distillation des huiles essentielles *d'Ocotea auriculiformis* Kost. a été effectuée par la technique d'hydrodistillation sur un appareil de type Clevenger (Clevenger, 1928). Au cours de chaque essai, 100 g de matière première fraîche (ou séchées) a été traitée.

III-3-Caractérisation physico-chimique de l'huile essentielle

III-3-1-Caractéristiques physiques

Tableau 2 : Tableau résumant les Normes utilisées pour caractérisation physiques

Mesure	Norme française homologuée
densité relative	NF T 75-111
pouvoir rotatoire	NF T 75-113
indice de réfraction	NF T 75-112

III-3-2-Caractéristiques chimiques

Tableau 3 : Tableau résumant les Normes utilisées pour caractérisation chimiques

Mesure	Norme française homologuée
indice d'acide	NF T 75-103
indice d'ester	NF T 75-104

III-4-Identification des différents constituants de l'huile essentielle

Différentes techniques chromatographiques ont été mise à profit pour déterminer les différents composants de l'huile essentielle à savoir

- la Chromatographie en couche mince (CCM) ;
- la Chromatographie Liquide à Basse Pression (CLBP) ;
- la Chromatographie en Phage Gazeuse (CPG).

La technique de la chromatographie est fondée sur le principe de l'adsorption sélective des différents constituants (phase mobile) sur une phase fixe, ou sur leur partage en présence de phases liquides ou gazeuses.

III-4-1-Chromatographie sur couche mince

La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une feuille d'aluminium ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique.

L'échantillon est déposé sous forme de spot et déposé sur la phase stationnaire. Les constituants chimiques de l'échantillon sont élués par la phase mobile et se mouvement par capillarité vers le haut de la plaque (chromatographie ascendant). Ainsi, chaque constituant se déplace à sa propre vitesse en fonction des forces électrostatiques envers la phase stationnaire et de sa solubilité sur la phase mobile.

Chaque constituant migre à une certaine hauteur, caractéristique de la substance, appelée rapport frontal ou rétention frontale (Rf).

$$Rf = \frac{dx}{ds}$$

Où

dx : distance parcouru par le composé à partir de la ligne de dépôt

ds : distance parcourue par l'éluant à partir de la ligne de dépôt

Un révélateur universel est utilisé pour observer chaque tache à savoir la vanilline sulfurique ou UV-visible.

III-4-2-Chromatographie Liquide à Basse Pression (CLBP)

L'échantillon est déposé au sommet de la colonne et est aussitôt adsorbé en un zone cylindrique de faible épaisseur. L'écoulement continu d'éluant provoque alternativement la désorbction et l'adsorbction des molécules de l'échantillon.

Les molécules sont entraînées vers le bas à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant. Le chromatogramme se développe en formant une succession de zones cylindriques qui se séparent en migrant vers le bas. On recueille chaque zone qui s'écoule de la colonne. C'est une méthode d'analyse qualitative.

III-4-3-Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

Cette méthode permet de séparer les molécules d'un mélange complexe de nature et de volatilité divers.

Elle est destinée à séparer des mélanges gazeux par suite d'équilibre entre un phase gazeux mobile et un phase stationnaire (liquide ou solide).

En CPG, la phase mobile est un gaz appelé gaz vecteur qui est généralement de l'azote ou de l'hélium ou parfois de l'hydrogène. Ce fluide traverse une colonne renfermant des granulés poreux, imprégnés d'un liquide très peu volatil qui constitue la phase stationnaire.

Le composé très volatil à analyser est introduit dans l'injecteur à l'aide d'une micro-seringue. Il est vaporisé et ses constituants sont entraînés à des vitesses inégales par le gaz vecteur ; ensuite, il est entraîné par ce dernier vers la colonne où s'effectuent les processus de séparation pendant lequel les constituants chimiques vont se détacher les uns des autres en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire à travers la colonne. A la sortie, se trouve un détecteur relié à un enregistreur qui désigne la courbe de chaque pic en fonction de leur intensité. La surface de chaque pic est proportionnelle à la concentration et l'ensemble de ces pics forme le chromatogramme.

III-5-Test d'activité antimicrobienne

III-5-1-Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque (HAYES AJ, MARKOVIC B ; 2002)

La méthode consiste à déposer un disque stérile, imbibé d'huile essentielle, sur un tapis bactérien au tout début de sa croissance et de mesurer la zone où les bactéries n'ont pas pu se développer. Le diamètre d'inhibition, qui traduit l'activité antibactérienne de l'huile essentielle, est ainsi déterminé.

Deux techniques ont été adaptées pour évaluer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle à savoir l'aromatogramme et l'aérodifusion.

La lecture des résultats se fait en mesurant les diamètres des halos d'inhibitions. Les normes utilisées pour la lecture des résultats sont celles de PONCE *et al* (2003). Elles sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4 : Normes pour la lecture des résultats des tests d'activité antimicrobienne

Diamètre de l'halo d'inhibition	Résultats	Sensibilité des germes
$X \leq 8\text{mm}$	-	Insensible ou résistante
$9\text{mm} < X < 14\text{mm}$	+	Sensible
$15\text{mm} < X < 19\text{mm}$	++	Très sensible
$X > 20\text{mm}$	+++	Extrêmement sensible

III-5-1-1-Aromatogramme

L'antibiogramme consiste à rechercher l'inhibition du développement microbien sur un milieu gélosé.

L'huile essentielle de concentration connue est déposée environ de 10 µl sur les disques 06mm de diamètre. Ces disques stériles imprégnés de l'huile essentielle sont déposés à la surface de la gélose ensemencée par le germe de l'étude.

L'incubation est effectuée en étuve à 37°C pendant 24 h. Les essais sont répétés 2 fois afin de comparer les effets de l'huile essentielle entre eux et d'éviter les faux résultats.

Cette technique a été adaptée pour la réalisation de l'huile essentielle total et huile essentielle fractionnée.

III-5-1-2-Aérodifffusion (LAHLOU, 2004)

L'huile essentielle de concentration connue est déposée environ de 20 µl sur les disques 06mm de diamètre. Ces disques stériles imprégnés de l'huile essentielle sont déposés sur la face interne des couvercles par le germe de l'étude. Enfin, les boîtes sont scellées avec du parafilm pour éviter que les vapeurs s'échappent.

En parallèle, des témoins de croissance sans huile essentielle qui sont scellées avec du parafilm sont préparés. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures. Le test est réalisé en double.

Cette technique a été réalisée sur l'huile essentielle totale.

III-6-Etude de la toxicité aiguë

La détermination de la toxicité aiguë consiste à savoir la dose unique mortelle de l'huile essentielle en une seule fois dans un temps déterminé.

Nous avons utilisé 3 lots de 3 souris dont un lot témoin. Chaque animal est identifié par un numéro et une marque différente. Les animaux sont préalablement mis à jeun pendant 24 h, ensuite le poids de chaque souris est pris. Ils sont reçus une dose donnée par lot à raison de 0,3ml pour 25g de souris. La voie d'administration est la voie orale.

La méthode de MILLER et TAINTER est utilisé pour déterminer la DL50 et de ses limites de confiance. Elle peut permettre de montrer graphiquement la DL50 en traçant sur du papier log-probit les pourcentages de mortalité par rapport au logarithme de la dose.

L'écart-type de la DL50 est donné par:

$$s = \frac{\text{dose letale } 80\% - \text{dose letale } 16\%}{2}$$

L'écart à la moyenne de la DL50 est estimé par la formule:

$$\text{Ecart à la moyenne} = \frac{2S}{2N}$$

Où :

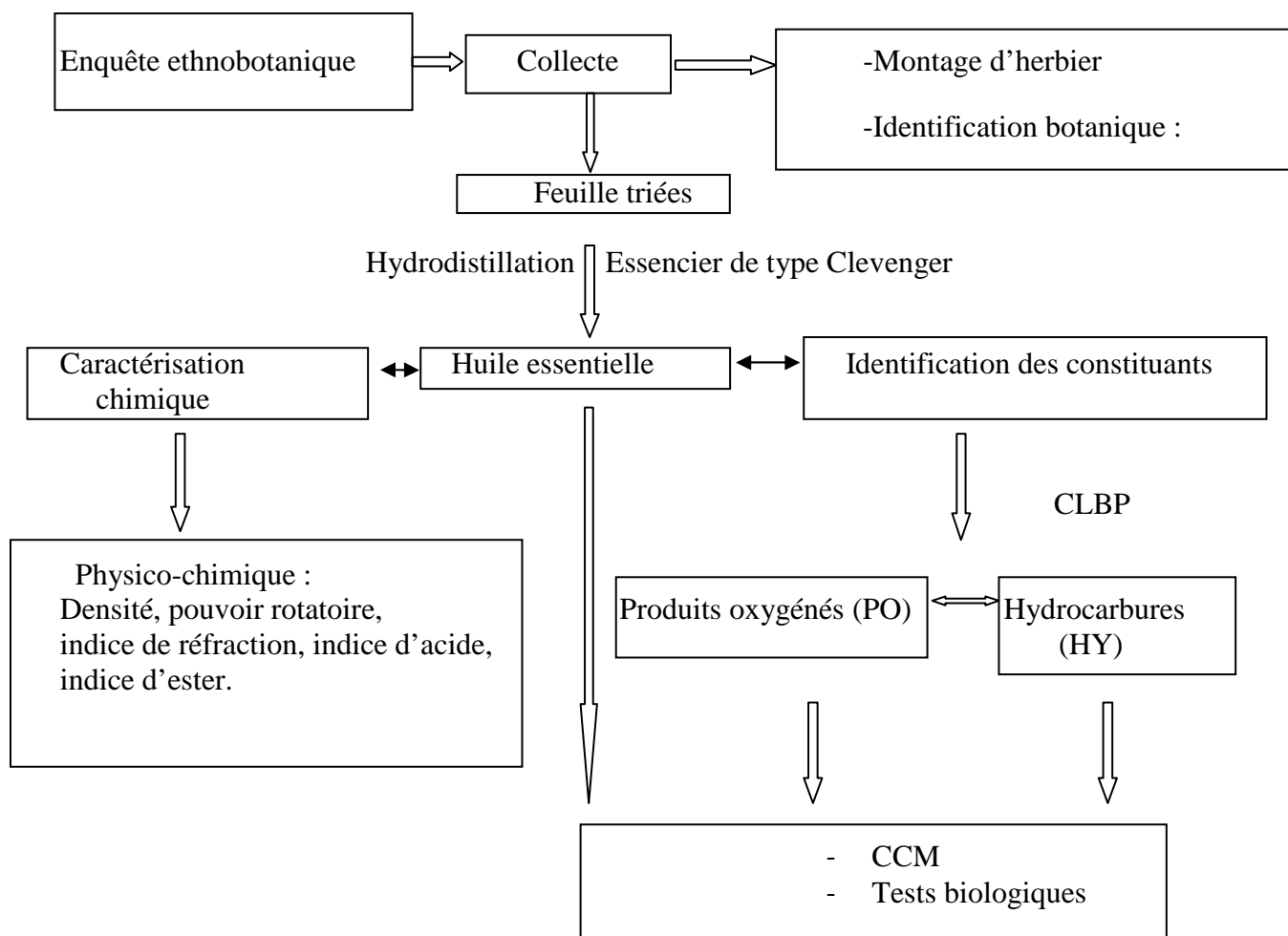
N'est le nombre total d'animaux dans les lots ayant donné des pourcentages de mortalité entre 7 et 93%.

La détermination de la DL50 permettra de situer la toxicité de l'extrait sur l'échelle de valeur de toxicité des substances chimiques proposé en 1980 par HODGE A.C. et STERNER J.H. par le tableau ci-dessous.

Tableau 5 : Echelle de toxicité de substances chimiques (d'après HODGE et STERNER, 1949).

Classe de toxicité	DL50 (rat, souris : mg/kg)	Doses pour un enfant de 12,5kg
Extrêmement toxique	< 1	Environ 8 mg (il est généralement suffisant de goûter le produit pour provoquer une intoxication)
Très toxique	1 à 50	Une petite gorgée ou 500 µl
Moyennement toxique	50 à 500	Une cuillerée à café ou 10 ml
Faiblement toxique	500 à 5000	Un coquetier
Pratiquement non toxique	5000 à 15000	Environ 180g
Relativement sans danger	> 1500	>180 g

Schéma 1 : Récapitulation de la méthode utilisée pour l'étude de l'huile essentielle



III-7-Antioxydant (GACHKAR *et al.*, 2007)

III-7-1-Dépistage de l'activité antioxydant sur CCM à l'aide du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Le principe est basé sur la réduction du radical 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle par les substances antiradicalaires.

Quelque quantité de l'huile essentielle a été éluée sous forme de bande sur des plaques de silice 60G F254. Le développement des plaques a été fait avec les systèmes de migration *n*-hexane (90cc) /éther diéthylique (10cc).

Après séchage, nous avons giclé les plaques avec une solution DPPH / méthanol à 2 mg/ml.

Les constituants de l'huile essentielle présentant une activité antiradicalaire apparaissent sous forme de couleur Jaune-blanc sur fond violet.

IV-RESULTAT

IV-1-Rendement en huile essentielle

Les rendements obtenus lors des différentes extractions des feuilles fraîches et séchées sont consignés dans le tableau suivant.

Tableau 6 : Tableau représentant le rendement d'extraction d'huile essentielle frais et séché

Feuilles	Méthode d'extraction	Durée de l'extraction (h)	Rendement (%)
Frais	Hydrodistillation	12	0,3
Secs	Hydrodistillation	12	0,8

Tableau 7 : tableau représentant les caractéristiques de l'huile essentielle

Caractéristiques organoleptiques	Essence de feuilles
Aspect	Liquide limpide mobile
Couleur	Jaunâtres
Odeur	Piquante

IV-3-Characterisation physico-chimique

D'une manière générale, les huiles essentielles sont caractérisées et classées à partir de leurs constantes physico-chimiques : la densité, le pouvoir rotatoire, l'indice de réfraction, l'indice d'acide et l'indice d'ester déterminés au moyen des normes nationales et internationales AFNOR (Association Française de NORMALISATION).

Les résultats de la détermination des constantes physico-chimiques pour l'huile essentielle étudiée sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 8 : Tableau représentant les résultats de *caractérisation physico-chimique*

Caractéristiques Physico-chimiques	Huile essentielle
Densité	0,9299 ± 0,0001
Pouvoir rotatoire	+9°25 ± 0°21
Indice de réfraction	1,5202 ± 0,0002
Indice d'acide	3,79 ± 0,01
Indice d'ester	11,22 ± 0,22

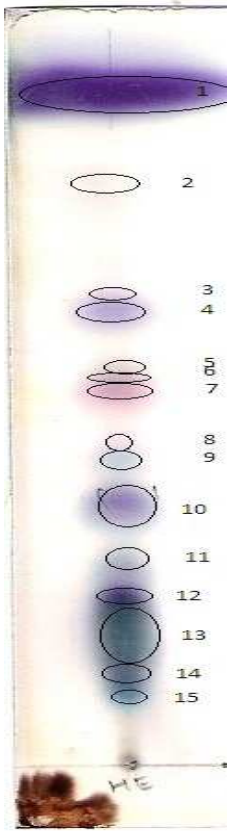
IV-4-Identification des constituants chimiques

IV-4-1-Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince de l'huile essentielle a permis de séparer certaines substances qui sont plus ou moins visibles sous forme de taches à UV ou après révélation à la vanilline sulfurique.

La figure et le tableau suivant illustrent le résultat de la chromatographie sur couche mince de l'huile essentielle total obtenues après élution avec *n*-hexane (90cc)/éther diéthylique (10cc), après révélation à la vanilline sulfurique.

Tableau 9 : Tableau représentant le résultat de la chromatographie sur couche mince de l'huile essentielle total

Huile essentielle Total	N° Spot	Rf	Coloration observé		
			U.V à 254nm	U.V à 356nm	Vanilline sulfurique
	1	0,88	Invisible	Invisible	Violet-foncée
	2	0,77			Jaune poussin
	3	0,61			Violet-claire
	4	0,59			Violet-claire
	5	0,53			Brun-violette
	6	0,51			Brune
	7	0,48			Acajou
	8	0,42			Violette
	9	0,39			Bleue verte
	10	0,32			Violet-claire
	11	0,26	Invisible	Brune	
	12	0,21	Bleue claire	Violet-foncée	
	13	0,16	Invisible	Bleue verte	
	14	0,12	Invisible	Bleue violette	
	15	0,007	Bleue violacée	Bleue claire	

Rf : rapport frontal ; HE : huile essentielle

Quinze taches ont été observées après révélation par la vanilline sulfurique. Elles sont repérées par leur Rf leurs couleurs respectives. Toute fois, on remarque que les composéé apolaires (vis à vis du système de solvant utilisé) ont migrés et se sont entassés en haut du chromatogramme.

IV-4-2-Chromatographie sur colonne

Le fractionnement d'une prise d'essai bien déterminée d'huile essentielle total de *l'ocotea auriculiformis* Kost. nous a conduit aux divers valeurs portées sur le tableau suivante.

Tableau 10 : Résultats de la Chromatographie sur colonne

Type de composer à fractionner	Solvant d'élution		Masse (mg)	Couleur
	Désignation	Volume (cc)		
HY	<i>n</i> -hexane 100%	255	2900.0	Incolore
P.O	EtO ₂ 100%	250	2416,7	Jaune et vert
Huile essentielle totale			6041,7	Jaunâtres

HY : hydrocarbure ;

PO : produit oxygénée

On remarque que le produit oxygéné (PO) est responsable de la coloration de l'huile essentielle. Toute fois, le HY est plus abondant.

IV-5-Test d'activité antimicrobienne

IV-5-1-Résultats de l'aromatogramme de l'huile essentielle total et fractionnée en facteur hydrocarbure et oxygénée

Le tableau 11 montre les effets de l'huile essentielle totale de *l'ocotea auriculiformis* Kost. vis-à-vis des différents germes utilisés.

Tableau 11 : Sensibilité des germes à l'huile essentielle

Huile essentielle total	Souches microbienne	Diamètre d'halo d'inhibition	Résultats	Sensibilité de la souche
Feuilles	<i>Bacillus cereus</i>	15 mm	++	Très sensible
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0 mm	-	Insensible ou résistant
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	35 mm	+++	Extrêmement sensible
	<i>Escherichia coli</i>	14mm	++	sensible
	<i>Salmonella enteridis</i>	0 mm	-	Insensible ou résistant
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0 mm	-	Insensible ou résistant
	<i>Candida albicans</i>	0 mm	-	Insensible ou résistant

D'après se résultat, il s'avère que les bacterie à Gram + est plus sensible que les bactéries à Gram - (*Bacillus cereus* 15mm ; *Streptococcus pneumoniae* 35mm).

Le tableau 12 montre les effets de l'huile essentielle fractionnée facteur en hydrocarbure et oxygénée de *l'ocotea auriculiformis* Kost. sur les germes les plus sensible (*Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus cereus*).

Tableau 12 : Sensibilité des germes à l'huile essentielle

Huile essentielle	Souches microbienne	Diamètre d'halo d'inhibition (mm)	Résultats	Sensibilité de la souche
HY	<i>Bacillus cereus</i>	8	++	Insensible ou résistant
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	20	+++	Extrêmement sensible
PO	<i>Bacillus cereus</i>	10	++	Sensible
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	24	+++	Extrêmement sensible

HY : hydrocarbure ;

PO : produit oxygénée

Le résultat nous montre que la partie oxygénée est plus actif.

IV-4-2-Résultats de l'aérodifusion de l'huile essentielle total

Le tableau 13 montre les effets de l'huile essentielle de l'*ocotea auriculiformis* Kost. sur les différents germes testés.

Tableau 13 : Sensibilité des germes à l'huile essentielle

Huile essentielle totale	Souches microbienne	Diamètre d'halo d'inhibition (mm)	Résultats	Sensibilité de la souche
Feuille	<i>Bacillus cereus</i>	12	++	sensible
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	-	Insensible ou résistant
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	24	+++	Extrêmement sensible
	<i>Escherichia coli</i>	0	++	Insensible ou résistant
	<i>Salmonella enteridis</i>	0	-	Insensible ou résistant
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	-	Insensible ou résistant
	<i>Candida albicans</i>	8	-	Insensible ou résistant

Au vue du tableau, il est observé une activité inhibitrice des composants volatils de l'huile essentielle sur *Bacillus cereus*, *Streptococcus pneumoniae* qui sont de bacterie à Gram +.

IV-6-Détermination de la toxicité générale aiguë

La mortalité due à la toxicité aiguë de l'huile essentielle de la plante *ocotea auriculiformis* Kost est présentée au tableau ci-après

Tableau 14 : Résultats de l'étude de la toxicité aiguë de l'huile essentielle totale en 24h

Concentration d'HE	Nombre de souris	Nombre de morts	% de morts
6000mg/kg	3	0	0%
3000mg/kg	3	0	0%
1500mg/kg	3	0	0%

Aucune souris n'est morte pendant le test et elles se sont toutes remises après 4 à 5 heures au plus tard. Alors, selon l'échelle de toxicité de substances chimiques d'après HODGE et STERNER, 1949. La DL 50 de l'huile essentielle d'*ocotea auriculiformis* est supérieur 6000mg/kg donc l'huile est pratiquement non toxique.

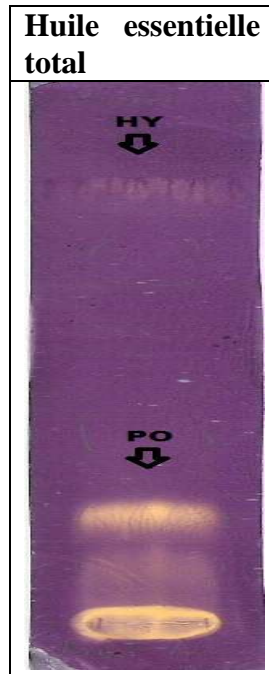
IV-7-Antioxydant

IV-7-1 Dépistage de l'activité antioxydant sur CCM à l'aide du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

L'activité antioxydant de l'huile essentielle d'*ocotea auriculiformis* Kost. a été évaluée selon la méthode au DPPH donnée au §. 7-1.

La **figure 1** montre les effets de l'huile essentielle totale sur le DPPH.

Figure 1 : effets de l'huile essentielle totale sur le DPPH.



HY : hydrocarbure ; **PO** : produit oxygénée

L'huile essentielle possède une activité antioxydant. En effet, la de gel de silice colorée en violet par DPPH est décolorée en jaune clair au niveau des bandes à activité antioxydant. Et d'après cette figure c'est la partie oxygénée à plus d'activité.

V-DISCUSSION ET CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous nous sommes consacrés à l'étude de l'huile essentielle de la feuille de *Ocotea auriculiformis* Kost., plante endémique de Madagascar. Cette espèce n'est reconnue aucune vertus médicinales auparavant. L'huile essentielle est extraite par hydrodistillation avec rendement 0,8 à l'état sèche et 0,3 à l'état frais.

L'analyse physico-chimique de l'huile essentielle comprend les mesures de la densité ($0,9299 \pm 0,0001$), du pouvoir rotatoire ($+9^{\circ}25 \pm 0^{\circ}21$), de l'indice de réfraction ($1,5202 \pm 0,0002$), de l'indice d'acide ($3,7867 \pm 0,01$) et de l'indice d'ester ($11,2200 \pm 0,22$). L'huile essentielle est de type léger et dextrogyre.

Une étape pour déterminer les différents composants de l'huile essentielle consiste à séparer la partie oxygénée et les hydrocarbures de l'huile totale. On a constaté que la partie hydrocarbure (HY) constitue le produit majoritaire (60%) et la partie oxygénée (PO) est responsable de la coloration de l'huile essentielle. L'analyse par CPG et /ou CPG/SM est (sont) en cours.

L'analyse microbiologique a déterminé le pouvoir antibactérien et antifongique de l'huile essentielle. Sept souches bactériennes de référence ont été utilisées et présentée au tableau 1. L'huile totale a montré une activité inhibitrice sur trois de ces souches à savoir *Bacillus cereus* (15mm), *Streptococcus pneumoniae* (35mm), *Escherichia coli* (14mm). Ce qui explique que l'huile essentielle a un spectre court. Le résultat des tests antimicrobien de chaque partie est donné dans les tableaux 12 et 13.

L'huile essentielle totale n'est pas toxique sur la souris à une dose de 6000 mg/kg administré par voie orale.

L'ensemble du travail a été complété par la mise en évidence la présence de la propriété antioxydant. Selon le résultat obtenu, l'espèce est pourvue de composés antioxydants.

Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle de *Ocotea auriculiformis* Kost. pourrait être utilisée dans les domaines de la parfumerie et celui de la pharmacologie due à la présence de composant antioxydant pourrait être mis à profit pour la réalisation de nouvelles parfum sans détérioration.

Concernant le domaine de la pharmacologie, les résultats préliminaires sont prometteurs et méritent d'être approfondis pour une utilisation rationnelle de l'huile essentielle en tant qu'agent antibactérien et donc pour la synthèse de nouveaux médicaments préconisables dans le traitement des maladies parasitaires et infectieuses. L'espèce est donc à préserver. Une meilleure connaissance de ces vertus thérapeutiques pourrait éveiller la population riveraine pour son utilisation rationnelle.

D'après ces résultats préliminaires, nous pouvons proposer l'huile essentielle comme une alternative aux agents antioxydants synthétique pour les agro-industries. Par conséquent, il serait également intéressant de tester l'huile essentielle d'*Ocotea auriculiformis* Kost. dans les aliments pour développer de nouveaux agents antioxydants pour empêcher ou retarder la détérioration des denrées alimentaires.

Bien qu'il y ait beaucoup d'études focalisées sur les propriétés biologiques des plantes aromatiques et leurs huiles essentielles, les applications sur les aliments sont très peu (Raza *et al.*, 2009; Foda *et al.*, 2010). Ceci est dû en fait à la complexité de la création de nouveaux conservateurs, efficaces et sûrs.

Beaucoup de questions technologiques devraient être soulevées avant que de nouveaux conservateurs naturels puissent être considérés comme additifs. Le mécanisme d'action, la solubilité et la stabilité dans les aliments, les impacts sur la saveur ou la couleur du produit et

la concentration appropriée requise sont importants pour les industries alimentaires. Dans beaucoup de cas des antioxydants et antimicrobiens d'origine naturelle ont échoué à répondre à certaines de les questions (la solubilité, l'odeur et la couleur sont les limitations les plus communes).

VI- PERSPECTIVES

Le fractionnement, l'isolement et la purification des molécules bioactives sont en cours. D'autres activités biologiques sont en phase d'études à savoir les tests insecticides, les tests anti-inflammatoires, dosage antioxydant ect... Par ailleurs, nous envisageons l'étude de l'espèce sur d'autres régions de Madagascar.

VII- BIBLIOGRAPHIE

AFNOR. Huiles essentielles. Echantillonnage et méthodes d'analyse (Tome 1) Monographies relatives aux huiles essentielles (Tome 2. Volumes 1 et 2). 2000.

BRUNETON, J. Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales ; Tech.& Doc./Lavoisier. 3 : 1999.

CLEVENGER J.F.,. Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 1928, **17**, 341-346.

FODA M.I., EL-SAYED M.A., HASSAN A.A., RASMY N.M. AND EL-MOGHAZY M.M., Effect of spearmint essential oil on chemical composition and sensory properties of white cheese. *Journal of American Science* ; 2010, 6 (5) : pp. 272-280.

GACHKAR L., YADEGARI D., REZAEI M.B., TAGHIZADEH M., ASTANEH S.A. AND RASOOLI I., Chemical and biological characteristics of Cuminumcyminum and Rosmarinus officinalis essential oils. *Food Chem.*, 2007, 102: pp.898-904.

KOSTERMANS A.J.G.H. Flore de Madagascar et des Comores. 81^{ème} famille Lauraceae, Paris : Typographie Firmin-Didot et Cie, 1950 ; 90p.

HODGE A.C. et STERNER J.H . in études de toxicité: quelques données fondamentales (A.K. DONE) TEMPO MEDICAL Afrique N°7, 1980.

HAYES AJ, MARKOVIC B. Toxicity of australian essential oil *Backhousiacitriodora*, 2002.

LAHLOU M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oil. *Phytother. Res.*, 2004 ; 18 : pp 435-448.

MILLER LC.; TAINTER M.L. Estimation of DL50 and Its Error by means of Logarithmic Probit Paper. *Proc.Soc.Exp. Biol. Med.* 1944, 57,261-264.

PERNET R., MEYER G. Pharmacopée de Madagascar. Publications de l'Institut de recherche Scientifique de Madagascar, 1957 ; 86p.

PONCE A.G, FRITZ R., DEL KALLE C., ROURA S.L. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic swiss chard. *Lebensmittel-wissenschaft and technologic*. 2003, 36:679-684.

RASOANAIVO P. International Development Research Centre. (<http://www.idrc.ca>),1999.

RAZA S. A., REHMAN A., ADNAN A. & QURESHI F., Comparison of antioxidant activity of essential oil of *Centella asiatica* and Butylated hydroxyanisole in sunflower oil at ambient conditions. *Biharean Biol.* 3, Vol. 3, N°1, 2009, pp.71-75.

TURBIDE M. L'aromathérapie : applications thérapeutiques, les huiles du Québec et du monde ; Montréal. (<http://sante-arome.com>) 2010.

www.tropicos.org