

# Screening phytochimique et isolement par voie bioguidée de substances à activité antibactérienne d'extraits de *Cassia occidentalis* Sond récoltée à Maevatanàna

Edouard Ravalison Andrianarison\* ; Rijalalaina Rakotosaona ;  
Oliva Jacomet Andrianaivoravelona ; Rovantsoa Jemima Andrianarison ;  
Jean Emilien Handrinirina et Philippe Antoine Andrianary.

Laboratoire de Chimie organique du Département Génie Chimique de l'Ecole Supérieure Polytechnique  
d'Antananarivo, Madagascar

\*Correspondance courriel : edoravali@yahoo.fr

## Résumé

Dans ce travail, notre but est de faire le screening phytochimique préliminaire, de déterminer l'activité antibactérienne et d'isoler les molécules présentes dans la fraction active de *Cassia occidentalis* Sond.

Après extraction méthanolique du matériel végétal, l'extrait sec obtenu est soumis au partage liquide/liquide, puis au fractionnement sur colonne chromatographique et finalement à la chromatographie préparative sur couche mince. Les activités antibactériennes des extraits méthanoliques de feuilles, racines et graines de *Cassia occidentalis* Sond sont déterminées par antibiogramme. Le fractionnement et l'isolement des substances incluses dans la fraction active par voie bioguidée a été suivi par antibiogramme des fractions sur des souches bactériennes indicatrices.

L'antibiogramme des huit souches bactériennes de référence a indiqué les graines de *C. occidentalis* comme partie particulièrement active *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 aux diamètres de halos d'inhibition respectifs de 20mm, 15mm, 10mm, 15mm. Après partage liquide/liquide en cascade à différents solvants, les germes *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* et *Pseudomonas aeruginosa* se sont avérés très fortement sensibles au fraction n-butanolique de graines de *C. occidentalis* et très sensibles à l'extrait au dichlorométhane. Le fractionnement sur colonne chromatographique à gel de silice a permis d'obtenir 8 fractions regroupées dont la fraction EGB-2 a été démontrée active contre les 3 souches précédentes (diamètres d'inhibition respectifs 11mm, 29mm et 10mm). La CCM préparative nous a permis d'isoler trois molécules majoritaires contenues dans la fraction active.

Les graines de *Cassia occidentalis* ont montré une intéressante activité biologique vis-à-vis des trois souches bactériennes à gram négatif *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* et *Pseudomonas aeruginosa*. Le fractionnement par méthode bioguidée a permis l'isolement de trois composés dont les structures sont en cours de détermination.

Mots-clés : *Cassia occidentalis*, graines, fraction butanolique, screening phytochimique, antibactérien, fractionnement bioguidé, CCM préparative.

## Abstract

In this work, our purpose is to carry out the preliminary phytochemical screening, to determine the antibacterial activity and isolate by mean of bioassay guided fractionation some molecules present in the active fraction of *Cassia occidentalis* Sond.

After methanolic extraction of the plant material, the dry extract obtained is subjected to liquid/liquid partition, then fractionation column chromatography and finally preparative TLC. The antibacterial activities of methanolic extracts of leaves, roots and seeds of *Cassia occidentalis* Sond are determined by antibiogram. Fractionation and isolation of substances included in the active fraction were carried out according to the bioassay guided fractionation against indicator bacterial strains.

The antibiogram of eight reference bacterial strains indicated the seeds of *C. occidentalis* as particularly active part against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* ATCC 19430 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, having the respective diameters of inhibition halos 20mm, 15mm and 15mm. After liquid/liquid successive partition with different solvents, *Escherichia coli* bacteria, *Salmonella typhi* and *Pseudomonas aeruginosa* were found very highly sensitive to the n-butanol fraction of seeds and very sensitive extracted with dichloromethane. Fractionation column

chromatography on silica gel yielded to 8 grouped fractions then fraction F2 show great activities against the three strains (respective inhibition diameters 11mm, 29mm and 10mm). Preparative TLC allowed us to the isolation of three compounds included in the active fraction.

Seeds of *Cassia occidentalis* have shown an interesting biological activity against the three gram negative bacterial strains *Escherichia coli* bacteria, *Salmonella typhi* and *Pseudomonas aeruginosa*. The fractionation by bioguided assay have allowed the isolation of three major compounds whose structures are currently being determined.

Keywords: *Cassia occidentalis*, seeds, butanolic fraction, phytochemical screening, antibacterial, bioassay guided fractionation, preparative TLC.

## 1. INTRODUCTION

La présente étude cerne la détermination des activités antibactériennes de l'espèce *Cassia occidentalis* Sond (Figure 1), arbisseau de la famille des Caesalpinaceae, poussant dans les régions des Hauts Plateaux de Madagascar, notamment dans la région de Betsiboka. Communément appelé selon les différentes localités « tsoisoronangatra, bemaimbo, voanembanalika, famônoakoho », les feuilles, racines ou graines de *C. occidentalis* sont couramment utilisées par les habitants autochtones pour se guérir contre les maladies vénériennes, les règles douloureuses, la fièvre, le paludisme, les diarrhées et de la dysenterie (Descheemacker, 1979) (Ethnopharmacologia, 2005) (Nicolas, 2012).

Les matériels végétaux de *C. occidentalis* sont extraits par macération méthanolique. Après déchlorophyllation au charbon actif, les extraits méthanoliques sont analysés qualitativement par screening phytochimique préliminaire afin de connaître les familles chimiques des métabolites secondaires probablement responsables des activités biologiques. Un partage liquide/liquide par extraction en cascade au moyen de solvants à polarité croissante (hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et n-butanol) a permis d'obtenir quatre extraits organiques. Un antibiogramme *in vitro* des extraits a été réalisé pour mettre en évidence leurs activités antimicrobiennes. Les résultats ont montré que les extraits de graines possèdent particulièrement de forte activité antibactérienne. Sept souches bactériennes de référence et une souche fongique, à l'origine des diverses maladies citées précédemment atteignant la population indigène, ont été testées dont *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhi* (ATCC 19430), *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et la souche fongique *Candida albicans* (ATCC 10231). En particulier, parmi les huit souches essayées, les souches bactériennes à gram négatif *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* ATCC 19430 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 se sont montrées fortement sensibles à l'extrait brut méthanolique et à l'extrait butanolique des graines de *Cassia occidentalis*.



Figure 1 : Cliché de la partie aérienne (feuilles, fleur et gousses) de *Cassia occidentalis* (Source : Auteur)

## 2. MATERIEL ET METHODOLOGIE

**2.1. Cueillette** : Les parties de *Cassia occidentalis* Sond (famille des Caesalpinaceae) ayant servi à l'étude ont été récoltées en Juin 2014, dans la commune de Beratsimanina, district de Maevatanana de la Région Betsiboka.

**2.2. Extraction** : Chaque matériel végétal de *Cassia occidentalis* récolté est en premier lieu séché à l'ombre pendant 7 jours puis broyées au moyen de broyeur à lame puis passées sur tamis ASTM à des granulométries inférieures à 2 mm. Les broyats obtenus sont ensuite conservés à l'abri de la lumière dans des emballages plastiques étanches jusqu'à leur utilisation. Le matériel végétal sec de masse bien définie est ensuite extrait par trois macérations successives de 24 heures au mélange méthanol dans un erlen-meyer. La filtration sur Büchner, puis la déchlrorophyllation au charbon actif Fischer-Chemie et évaporation du filtrat sous pression réduite au rotavapor de marque Buchi, donne l'extrait brut méthanolique sec. Ce dernier subit les étapes d'extraction en cascade par partage liquide-liquide avec l'eau et quatre solvants organiques à polarité croissante : hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et n-butanol. Les extraits organiques obtenus, après dessiccation au sulfate de sodium anhydre et évaporation de solvant, donnent les résidus secs successifs ou extraits non volatils à l'hexane, au dichlorométhane, à l'acétate d'éthyle et au n-butanol, disposés dans des flacons sombres et conservés à 5°C à l'abri de la lumière au réfrigérateur.

### 2.3. Screening phytochimique

**2.3.1. Alcaloïdes** : A 500 mg d'extrait méthanolique sec sont ajoutés 10 mL de HCl 2N aqueux. Le mélange est ensuite porté au bain marie bouillant pendant 5 mn tout en agitant avec une baguette de verre. Après refroidissement, on y ajoute 500mg de NaCl. Le mélange est alors agité puis filtré sur papier Whatman. Le volume du filtrat est ensuite ramené à 10mL par addition de HCl 2N puis réparti dans quatre tubes à essai dont l'un servira de témoin et les trois autres sont testés respectivement par addition de 5 gouttes de réactif d'alcaloïde (Ranarivelo, 2004). La réalisation de trois tests au minimum est nécessaire pour pouvoir affirmer la présence d'alcaloïdes dans le matériel végétal testé et éviter des réactions faussement positives (Bruneton, 1999) (Luhata, 2008).

- *Test au réactif de Mayer* : la présence d'alcaloïde est indiquée par l'apparition de flocon de précipité blanc lors de l'addition de tétraiodomercurate de potassium (solution mélange de  $HgCl_2$  et de KI) dans l'extrait acide.
- *Test au réactif de Wagner* : la présence d'alcaloïde se révèle à l'apparition de précipité rouge orangé lors de l'addition de réactif iodo-ioduré (solution mélange de  $I_2$  et de KI) dans l'extrait analysé.
- *Test au réactif de Dragendorff* : la présence d'alcaloïde est révélée par l'apparition de précipité orange lors de l'addition de tétraiodobismuthate de potassium (solution mélange de sous-nitrate de bismuth et de KI) dans l'extrait testé.

**2.3.2. 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 min, l'apparition d'une coloration rouge indique la présence de flavonoïdes (Ranarivelo, 2004).

**2.3.3. Détection 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 (Gurib-Fakim, 1997).

- 2.3.4. *Détection 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 (Gurib-Fakim, 1997).
- 2.3.5. *Tanins et autres composés phénoliques* : L'extrait organique de masse 100mg est dissout dans 25mL d'eau distillée bouillante puis additionné de quatre gouttes de solution aqueuse de NaCl à 10%. La solution ainsi obtenue est filtrée sur papier Whatman. Le filtrat refroidi est alors réparti dans quatre tubes à essai, le 4<sup>ème</sup> tube servant de témoin (Rizk, 1982).
- Tube n°1: addition de cinq gouttes de gélatine à 1%. 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 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 FeCl<sub>3</sub> dilué à 1% dans le méthanol.
    - La *présence de tanins galliques et ellagiques* (tanins hydrolysables) est indiquée par l'apparition d'une coloration bleue noire.
    - La *présence de tanins catéchiques* (tanins condensés) s'observe par l'apparition d'une coloration brune verdâtre.
    - Une réaction négative à la gélatine salée accompagnée d'une coloration verte ou bleue noire avec FeCl<sub>3</sub>, est due à la présence d'autres types de composés phénoliques.
- 2.3.6. *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 EE, 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) sous UV 365nm indique la présence des coumarines (méthode indicative et non une identification) (Rizk, 1982) (Bruneton, 1999).
- 2.3.7. *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 min. Laisser décanter puis sécher la solution avec Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre. Filtrer et répartir le filtrat dans 5 tubes à essais propres et secs ; le tube n°5 servira de témoin (Ranarivelo, 2004) (Bolivar, 2011).
- 2.3.7.1. *Test de Liebermann Burchard* : Dans le 1<sup>er</sup> 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.
- 2.3.7.2. *Test de Salkowski* : Incliner le tube à 45° puis ajouter 1mL d'acide sulfurique concentré. Après 30mn, la présence de stérols insaturés est indiquée par l'apparition d'un anneau de séparation des phases de couleur rouge.
- 2.3.7.3. *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.
- 2.3.7.4. *Test de Keller-Killiani* : Incliner le tube de 45° et additionner quelques gouttes de FeCl<sub>3</sub> 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.

- 2.3.8. *Quinones* : 200 mg d'extrait organique sont dissous dans de l'eau distillée, puis filtrés. Le filtrat est extrait deux fois au benzène. A 10 mL d'extrait benzénique sont ajoutées 5 mL de solution aqueuse d'ammoniaque NH<sub>4</sub>OH à 20 %, puis le mélange est agité. Après décantation, une coloration rouge orangée ou rouge violacée de la phase ammoniacale indique un test positif (Bruneton, 1999) (Dohou, 2003) (Alilou, 2014).
- 2.3.9. *Saponines* (test de mousse) : Une masse de 2 g de matériel végétal sec ou son équivalent en extrait brut est agitée 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 (Ranarivelo, 2004).
- 2.3.10. *Composés cyanogénétiques* : Dans un tube à essai, humecter 2g de matériel végétal sec avec une quantité suffisante d'eau puis ajouter 1 mL de CHCl<sub>3</sub>. Insérer ensuite une bandelette de papier filtre Whatman imprégnée de solution fraîchement préparée de picrate de sodium (5g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 0,5g d'acide picrique + 100mL d'eau distillée) juste au-dessus de la drogue et plier sur le bord du tube à essai. Boucher le tube avec du coton hydrophile et chauffer à 35°C au bain marie pendant 3 heures. La présence des composés cyanogénétiques est indiqué par le virage de la coloration du papier picrossodé au rouge orangé par production de HCN (Dohou, 2003) (Alilou, 2014).

**2.4. Test d'activité antimicrobienne** : Les activités antimicrobiennes des extraits méthanoliques de *Cassia occidentalis*, des fractions ont été évaluées par la méthode de diffusion en milieu gélosé (méthode des disques) (Michel, 2011) (Ouattara, 2012). Cinq souches microbiennes indicatrices, prélevées à partir de lots ATCC (American Type Culture Collection), ont été testées :

- quatre bactéries à gram positif :
  - *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), origine des diverses maladies de la peau comme les furoncles, l'impétigo, la cellulite folliculite et les abcès ;
  - *Bacillus cereus* ATCC 11778, germe à l'origine d'intoxications alimentaires opportunistes sous forme émétique ou sous forme diarrhéique ;
  - *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6301, pneumocoque, germe causal des méningites bactériennes, pneumonies lobaires, bronchopneumonies, pleurésies, sinusites, otites et conjonctivites.
  - *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 bactérie pathogène opportuniste, à l'origine d'infections chez les patients fragilisés et responsable des infections urinaires, abcès abdominaux, péritonites, infections secondaires des plaies chirurgicales, endocardites lentes ou subaiguës.
- trois bactéries à gram négatif :
  - *Escherichia coli* (ATCC 25922), bactérie responsable d'infections nosocomiales, de gastroentérite, d'infections de l'étendue urinaire et méningite néo-natale ;
  - *Salmonella typhi* (ATCC 19430), agent responsable de la fièvre typhoïde et des intoxications alimentaires ;
  - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, bactérie très résistante naturellement aux antibiotiques, germe ubiquitaire responsable de diverses infections : infections nosocomiales, infection de l'œil, plaies (surtout brûlures et plaies opératoires), appareil urinaire, gastro-intestinales, des poumons, origine des méningites d'inoculation et des septicémies ;
- et la souche fongique *Candida albicans* ATCC 10231, agent pathogène opportuniste très polyvalent, responsable des infections fongiques (candidose) des muqueuses digestives et gynécologiques, de multitude d'infections comme les infections superficielles cutanées, l'érythème fessier des nouveau-nés, la bronchopneumonie, la vaginite et diverses d'infections profondes (Michel, 2011) (Dabbagh, 2006).

Le bouillon de Müller-Hinton (MHB) à 37°C a été appliqué à la culture des bactéries à gram négatif et à gram positif, et le bouillon de Sabouraud à la culture à 25°C de la souche fongique *Candida albicans*.

Après inoculation par inondation d'une dilution de 10<sup>6</sup> UFC/mL de microorganisme à tester réalisée suivant l'échelle de Mac Farland, un disque stérile de papier filtre Whatman de 6 mm est imbibé de 20µL d'extrait puis déposé sur la boîte de pétri préalablement inoculée et l'ensemble est incubé pendant 24 heures à 37°C pour les bactéries et à 25°C pour la souche fongique. La sensibilité des bactéries au chloramphénicol à 2mg/mL sur la culture bactérienne et à la nystatine à 2mg/mL sur la culture de *Candida albicans* (antibiotiques de référence) est appréciée selon le même protocole. Au terme de 24 heures d'incubation, une zone claire (halo) est présente autour du disque si l'extrait inhibe le développement microbien. Plus la zone d'inhibition est grande, plus le germe est sensible au produit testé. La mesure du diamètre du halo d'inhibition au moyen d'un pied à coulisse permet alors d'évaluer la sensibilité des souches microbiennes testées à l'extrait. Deux boîtes sont utilisées par souche. En effet, tous les tests ont été répétés deux fois et les résultats enregistrés représentent le diamètre moyen de ces deux expériences. La sensibilité des souches microbiennes à l'extrait est appréciée de la manière suivante : insensible ( $d \leq 7$ mm), assez sensible ( $7 < d \leq 8$ mm), sensible ( $8 < d \leq 9$ mm) et très sensible ( $d > 9$ mm) (Andriambololona, 2010) (Tsirinirindravo, 2009).

**2.5. Fractionnement par voie bioguidée :** L'extrait brut méthanolique du matériel végétal indiqué biologiquement actif par l'antibiogramme sur les souches indicatrices subit alors les étapes de fractionnement.

**2.5.1. Partage liquide/liquide :** La première étape de fractionnement consiste à diviser l'extrait brut en grosses fractions par partage liquide/liquide en cascade avec les solvants successifs : hexane, dichlorométhane (DCM) et acétate d'éthyle par ordre de polarité croissante. Les extraits de partage obtenus sont alors soumis à des tests d'activité biologique sur les souches indicatrices précédentes.

**2.5.2. Fractionnement sur colonne chromatographique :** L'extrait de partage déclaré biologiquement actif par l'antibiogramme de routine est ensuite fractionné sur colonne chromatographique à gel de silice de granulométrie comprise entre 0,040 à 0,063mm par élution aux systèmes de solvants successifs hexane/DCM et DCM/acétate d'éthyle. Les éluats obtenus sont soumis aux analyses par CCM. Le profil chromatographique est alors observé par visualisation des chromatoplaques sous lampe UV-254 et 365 nm, avant et après pulvérisation à la vanilline sulfurique suivie d'un chauffage à 110°C pendant 10 mn. Les éluats à profil chromatographique similaire sont alors rassemblés et les fractions regroupées sont soumises à l'analyse antimicrobienne sur les souches indicatrices sensibles. La fraction démontrée la plus active subit alors la CCM préparative.

**2.5.3. Chromatographie préparative sur couche mince :** La fraction active obtenue par fractionnement sur colonne est soumise à la chromatographie sur couche mince préparative par dépôt en bande avec le système éluant de développement approprié. Les bandes de migration éluées séparément correspondant aux substances majoritaires renfermées dans l'extrait actif sont alors récupérées et soumises à la détermination structurale.

### 3. RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1. Rendement d'extraction en cascade

Les masses extraites des matériels végétaux secs de *C. viminalis* et résultats d'extraction méthanolique sont condensés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Rendements d' extraction méthanolique des matériels végétaux de *C. occidentalis*

Matériel végétal	Masse initiale (g)	Masse d'extrait (g)	Rendement d'extraction (%)
Feuille	174	29,441	16,92
Graine	360	13,050	3,63
Racine	56	6,001	10,72

D'après ce tableau 1, les feuilles possèdent le rendement d'extraction le plus élevé de (16,92%) comparé ceux des graines et racines.

### 3.2. Screening phytochimique

Le tableau 2 indique que les résultats de screening phytochimique des extraits bruts méthanoliques, sont marqués par la prépondérance des métabolites secondaires dans graines et racines de *Cassia occidentalis* Sond récolté dans la région de Betsiboka, notamment des alcaloïdes, des flavonoïdes, des leucoanthocyanes, des tanins, des triterpénoïdes, des stéroïdes, des quinones, des saponines et d'autres composés phénoliques.

Tableau 2: Résultats de screening phytochimique des extraits méthanoliques de *C. occidentalis*

Familles chimiques	Feuille	Graine	Racine
Alcaloïdes	-	+++	+++
Flavonoïdes	-	++	++
Anthocyanes	-	-	+
Leucoanthocyanes	-	+	++
Tanins	-	++	+
Tanins condensés	-	-	-
Tanins hydrolysables	-	++	+
Composés phénoliques	+	++	-
Triterpénoïdes	-	+++	+
Stéroïdes	++	++	++
Stérols insaturés	-	-	-
Quinones	+	++	++
Coumarines	-	++	+
Saponines	+	++	++
Composés cyanogénétiques	-	-	-

Note : (+) = présence faible, (++) = présence moyenne, (+++) = forte présence, (-) = absence

### 3.3. Activité antibactérienne

Les diamètres d'inhibition relatifs aux activités antimicrobiennes des extraits bruts méthanoliques de la plante *C. occidentalis* vis-à-vis des huit souches essayées sont donnés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Résultats d'antibiogramme réalisé sur les extraits méthanoliques de *C. occidentalis*

Partie de la plante	Souche microbienne et diamètre de halo d'inhibition (mm)*							
	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhii</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
Feuille EF	6	6	6	6	6	6	6	6
Graine EG	20	6	15	10	6	15	6	6
Racine ER	6	6	6	6	6	6	6	6

\*Sensibilité des souches microbiennes : insensible ( $d \leq 7$ mm), assez sensible ( $7 < d \leq 8$ mm), sensible ( $8 < d \leq 9$ mm), très sensible ( $d > 9$ mm).

Les résultats d'antibiogramme du tableau 3 montrent que les souches bactériennes à gram négatif *E. coli* ATCC 25922, *S. typhi* ATCC 19430 et *P. aeruginosa* ATCC 27853 se sont avérées très sensibles à l'extrait brut méthanolique de graines de *C. occidentalis* avec des diamètres de halo d'inhibition respectifs de 20mm, 15mm et 15mm. Le germe à gram positif *B. cereus* s'est également montré très sensible à l'extrait brut de graine EG. Les germes essayés sont pratiquement insensibles aux extraits de feuilles EF et de racines ER.

### 3.4. Fractionnement par voie bioguidée

D'après les résultats indiqués par l'antibiogramme du tableau 3, l'extrait brut méthanolique de graines EG, est le plus actif parmi les trois parties de *C. occidentalis*, est choisi pour la suite de nos études biologiques et phytochimiques. La masse de 13,050 g d'extrait EG a été soumise au partage liquide/liquide en cascade avec les solvants successifs : hexane, dichlorométhane (DCM), acétate d'éthyle et n-butanol.

Après dessiccation au sulfate de sodium anhydre et évaporation de solvant, les masses respectives des extraits par partage indicés successivement EGH - EGD - EGA et EGB recueillies sont 0,143g - 0,315g - 1,555g et 4,754g selon le tableau 4.

Tableau 4 : Résultats de partage liquide/liquide de l'extrait méthanolique de graines de *C. occidentalis*

	Extrait par partage			
	EGH	EGD	EGA	EGB
Masse obtenue (g)	0,143	0,315	1,555	4,754
Rendement (%)	1,10	2,41	11,92	16,15

Tableau 5 : Tests d'activité antibactérienne des extraits de partage de graines de *C. occidentalis*

Extrait	Souche bactérienne et diamètre de halos d'inhibition (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
EGH	6	6	6	6
EGD	10	15	10	6
EGA	6	6	6	6
EGB	20	20	6	20

Les résultats des tests d'activité antibactérienne des quatre extraits obtenus par partage liquide/liquide vis-à-vis des quatre souches révélées sensibles selon les résultats d'antibiogramme du tableau 5 démontre que l'extrait butanolique de graine EGB dispose de très forte activité contre les souches *E. coli* ATCC 25922 (d = 20mm), *S. typhii* ATCC 19430 (d = 20mm) et *P. aeruginosa* ATCC 27853 (d = 20 mm). L'extrait au dichlorométhane EGD est aussi très actif contre *E. coli* ATCC 25922 (d = 10mm), *S. typhii* ATCC 19430 (d = 15mm) et *B. cereus* (d = 10mm).

La logique de fractionnement par voie bioguidée impose que la suite de fractionnement soit réalisée avec l'extrait butanolique de graine EGB démontré fortement active vis-à-vis des trois souches bactériennes à gram négatif. Le fractionnement sur colonne chromatographique à gel de silice de 1,350 g de l'extrait EGB a été effectué par élution au mélange de solvant acétate d'éthyle/méthanol à gradient variant de 100/0 à 0/100 (v/v). La chromatographie sur couche mince des 115 petites fractions éluées recueillies dans des tubes à essai, après visualisation sous rayonnement UV 254-365nm et pulvérisation de réactif à la vanilline sulfurique, a permis de les regrouper en huit fractions regroupées indicées EGB-1 à EGB-8 selon les résultats récapitulés dans le tableau 6.



Tableau 6 : Résultats de fractionnement sur colonne chromatographique de l'extrait EGB

	Fractions regroupées							
	EGB-1	EGB-2	EGB-3	EGB-4	EGB-5	EGB6	EGB-7	EGB-8
Numéro des tubes de petites fractions	1 à 29	30 à 37	38 à 46	47 à 59	60 à 74	75 à 84	85 à 100	101 à 115
Masse (mg)	197	49	50	43	2	24	157	450
Rendement (%)	14,59	3,63	3,70	3,19	0,15	1,78	11,63	33,33

Le tableau 7 résume le test biologique de ces huit fractions obtenues sur les souches déclarées précédemment sensibles. On constate que la fraction EGB-2 possède une très importante activité antibactérienne vis-à-vis de *S. typhi* ATCC 19430 (d = 29mm), nettement supérieur à l'activité biologique du chloramphénicol, antibactérien de référence (d=21mm) (Andrianarison, 2015). Les souches *E. coli* ATCC 25922 (d = 11mm) et *P. aeruginosa* ATCC 27853 (d = 10mm) se sont aussi avérées très sensibles à la fraction EGB-2. La fraction EGB-3 a montré une moyenne activité envers ces trois souches. Les trois souches essayées sont restées insensibles aux autres fractions regroupées EGB-4 à EGB-8.

Tableau 7 : Résultats de tests biologiques des fractions regroupées de l'extrait EGB de *P. salviifolia*

Souches bactériennes	Fractions regroupées et diamètre de halos d'inhibition (mm)							
	EGB-1	EGB-2	EGB-3	EGB-4	EGB-5	EGB6	EGB-7	EGB-8
<i>E. coli</i>	6	11	8	6	-	6	6	6
<i>S. typhi</i>	6	29	8	6	-	6	6	6
<i>P. aeruginosa</i>	6	10	9	6	-	6	6	6

La CCM préparative de la fraction regroupée EGB-2, réalisée sur plaque chromatographique à gel de silice normale 60F254 par élution avec le système de solvants de développement AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O - 10:1,5:1 (v/v/v), nous a permis l'isolement de trois molécules majoritairement de la fraction active EGB-2 dont les structures sont en cours de détermination.

#### 4. CONCLUSION

Les résultats obtenus de l'antibiogramme réalisé sur l'extrait brut de différentes parties de *Cassia occidentalis* Sond démontre une importante activité de son extrait méthanolique de graines EG, notamment contre *Salmonella typhi*. Le processus d'isolement des composés chimiques par partage liquide/liquide suivi de fractionnement sur colonne chromatographique à gel de silice de la fraction butanolique EGB, démontrée active, puis finalisé par une CCM préparative, a conduit à l'obtention de trois molécules à partir de la fraction biologiquement active EGB-2 dont la détermination structurale est en cours. Les résultats d'analyse biologique obtenus sur *Cassia occidentalis* confirment en fait ses usages traditionnels à guérir de nombreuses maladies comme les gastroentérites, les diarrhées et dysenteries, la fièvre typhoïde, les méningites et les maladies pulmonaires.

#### BIBLIOGRAPHIE

Alilou, H., Hassani L. M. I., Barka N., Bencharki B., 2014. Screening phytochimique et identification spectroscopique des flavonoïdes d'*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus.*, Afrique SCIENCE 10(3) (2014) 316 - 328.

Andriambololona, T., 2010. Etudes biologiques et chimiques des métabolites secondaires des *Actinomycetes Telluriques* - Cas de la forêt d'Ankafobe. S.I. : Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée - Faculté des Sciences - Université d'Antananarivo.

Andrianarison, E. R., Andrianary P. A., Rakotosaona R., Andrianaivoravelona O. J., Ralambondrahety R., Ranaivoson N. A., 2015. Composition chimique et activité antimicrobienne d'huile essentielle de

*Callistemon viminalis* cultivée dans les Hautes Terres de Madagascar, Afrique SCIENCE 11(4) 104 – 110.

Tsirinirindravo, L. H., Andrianarisoa, B., 2009. Activités antibactériennes de l'extrait des feuilles de *Dalechampia clematidifolia* (Euphorbiaceae), Int. J. Biol. Chem. Sci. 3(5): 1198-1202, October 2009 - ISSN 1991-8631.

Bolivar, P., Cruz-Parades C., Hernandez L. R., Juarez Z. N., Sanchez-Arreola E., Av-Gay Y., Bach H., 2011. Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*, Journal of Ethnopharmacology, 137 141– 147, published by Elsevier Ireland Ltd.

Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Editions Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 1120p.

Dabbagh, M. A., Foulafi Z., Mahmoudabadi A. Z., 2006. In Vitro Anti-Candida Activity of *Zataria multiflora* Boiss., Advance Access Publication 12 December 2006 - eCAM 2007;4(3) 351-353.

Descheemacker, A., 1979. RAVIMAITSO, 5ème édition, Ambositra, Août.

Dohou, N., Tahrouch S., Hassani L. M. I., Badoc A., Gmira N., Yamni K., 2003. Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *Thymelya lythroides*., Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 2003, 142, 61-78.

Ethnopharmacologia., 2005. Quelques plantes médicinales issues des enquêtes ethnobotaniques à Madagascar, Ethnopharmacologia, n°36, novembre 2005.

Gurib-Fakim, A., Gueho J., 1997. Inventaire et étude des plantes médicinales et des plantes aromatiques des Etats de l'océan Indien, Rapport ethnobotanique et phytochimique sur le projet PLARM, Projet FED – COI, 1990-1997.

Luhata, P., Kanangila A. B., Kitawa E. K., Mulungulungu D., Lumbu J. B., Kalonda E., 2008. Étude chimique de l'espèce *Jacobinia carnea*., Université de Lubumbashi.

Michel, L., 2011. Etude de la sensibilité aux antimicrobiens - Documentation technique extraite des notices techniques commerciales et de différentes publications - Lycée des métiers du tertiaire, de la santé et du social – Grenoble., 2010-2011. [éd.] de la santé et du social Lycée des métiers du tertiaire.

Nicolas, J.-P., 2012. Plantes médicinales du Nord de Madagascar, Ethnobotanique antakarana et informations scientifiques, Jardin du monde.

Ouattara, K., Yeo D., Doumbia I., Coulibaly A., Traoré Y., 2012. Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae), Journal of Applied Biosciences 58: 4234– 4242 ISSN 1997–5902, Ed., Octobre 2012.

Ranarivelo, Y., 2004. Les Grandes familles Chimiques de Produits Naturels, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.

Rizk, A. M., 1982. Constituants of plants growing in Qatar, Fitoterapia, 52 (2), p 35-42, 1982.