

Screening phytochimique et activité antimicrobienne d'extraits non volatils de *Psiadia salviifolia* (Asteraceae) ou « kijitina » provenant de la région Amoron'i Mania à Madagascar

Edouard Ravalison Andrianarison * ; Rijalalaina Rakotosaona ;
Oliva Jaconnet Andrianaivoravelona ; Rovantsoa Jemima Andrianarison ;
Lovatiana Emmanuel Rakotonantoandro 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

Le but du présent travail est de s'initier aux études phytochimique et biologique de la plante *Psiadia salviifolia* Baker.

Après screening phytochimique, un antibiogramme des extraits méthanoliques de feuilles, fleurs, petites tiges et racines de *Psiadia salviifolia* Baker a été établi par la méthode de diffusion sur disque pour élucider leurs activités antimicrobiennes. La méthode de fractionnement bioguidé a été adoptée pour déterminer la fraction active sur les souches microbiennes indicatrices testées et d'en isoler les composés majoritaires.

L'antibiogramme a indiqué les fleurs et feuilles *P. salviifolia* comme parties actives sur les souches bactériennes testées. En particulier, l'extrait méthanolique des fleurs s'est révélé actif contre *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Streptococcus faecalis* ATCC 19433 aux diamètres de halos d'inhibition respectifs de 12mm, 9mm, 9mm et 10mm. L'extrait méthanolique de feuilles manifeste une intéressante activité antifongique contre le dermatophyte *Candida albicans* 10231 avec un diamètre d'inhibition de 10mm. La fraction hexanique obtenu par partage liquide/liquide, après fractionnement sur colonne chromatographique à gel de silice, suivis de test biologique ont conduit à la fraction ELH-6 très active contre *Escherichia coli* ATCC 25922 (d=18mm), *Salmonella typhi* ATCC 19430 (d=11mm) et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (d=16mm).

La CCM préparative réalisée avec la fraction ELH-6 a permis d'isoler quatre composés majoritaires.

Mots-clés : *Psiadia salviifolia*, fleur, fraction hexanique, screening phytochimique, antibactérien, fractionnement bioguidé, chromatographie sur colonne.

Abstract

The purpose of this work is to initiate the phytochemical and biological studies of the plant *Psiadia salviifolia* Baker.

After the phytochemical screening, antimicrobial susceptibility testing of methanol extracts of leaves, flowers, small stems, and roots of *Psiadia salviifolia* Baker was established by the disk diffusion method to elucidate their antimicrobial activities. The bioassay guided fractionation method was adopted to determine the active fraction on indicator microbial strains tested and isolate its major compounds.

Antimicrobial susceptibility showed the flowers and leaves of *P. salviifolia* as active parts on the bacterial strains tested. The methanolic extract of the flowers has been found particularly active against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Streptococcus faecalis* ATCC 19433 and the respective diameters of the inhibition halos are 12mm, 9mm, 9mm and 10mm. The methanolic extract of leaves manifest an interesting antifungal activity against the dermatophyte *Candida albicans* 10231 with an inhibition diameter of 10mm. The hexanic fraction obtained by liquid/liquid partitioning and fractionation by column chromatography on silica gel, followed by bioassay, led to the ELH-6 fraction which is fraction highly

active against *Escherichia coli* ATCC 25922 (d = 18mm), *Salmonella typhi* ATCC 19430 (d = 11mm) and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (d = 16mm).

Preparative TLC performed with the ELH-6 fraction permit us to isolate four major compounds.

Keywords: *Psiadia salviifolia*, flower, hexanic fraction, phytochemical screening, antibacterial, bioassay guided fractionation, chromatographic column.

1. INTRODUCTION

Plante médicinale endémique de Madagascar, appartenant à la famille des Asteraceae, *Psiadia salviifolia* Baker est un arbuste (Figure 1) rencontré en particulier dans la partie centrale de l'Ile (Hautes Terres), notamment dans les régions d'Amoron'i Mania et de Haute Matsiatra (Boiteau, 1998). Elle se reconnaît facilement par ses petites fleurs jaunes odorantes, par ses jeunes rameaux et jeunes feuilles à aspect collant au toucher, d'où son appellation vernaculaire de « kijitina » (gluant, collant). Elle est répandue au bord des champs, sur les bords de la route et dans les forêts primaires et secondaires (Humbert, 1960) (Pernet, 1957) (Dennis, 1974).



Figure 1 : Cliché de la partie aérienne (feuilles et fleurs) de *Psiadia salviifolia* Baker (source : auteur)

La tradition locale la reconnaît comme plante antidote aux morsures d'insectes, vermifuge, plante permettant de soulager les maux de dents, guérir les furoncles, guérir l'incontinence des enfants, guérir les maux de ventre, traiter en inhalation les affections des voies respiratoires (Pernet, 1957) (Descheemacker, 1979). Cependant, ses vertus thérapeutiques demeurent encore mal exploitées d'où la nécessité de mener des travaux scientifiques sur son étude phytochimique et sur ses activités biologiques.

La première étape de notre étude aborde l'extraction au méthanol des métabolites secondaires des feuilles et des fleurs de *Psiadia salviifolia*. Ensuite, un antibiogramme des extraits non volatils sur des souches microbiennes de référence par la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé a été établi de manière à élucider leurs activités antimicrobiennes. En deuxième étape, nous avons procédé particulièrement au fractionnement par méthode bioguidée de l'extrait méthanolique de fleurs et effectuer l'isolement des molécules contenues dans la fraction active.

2. Matériel et méthodologie

2.1. Cueillette : Les feuilles et fleurs de *Psiadia salviifolia* Baker ayant servi à ce travail ont été récoltées le 11 Juillet 2014 à 7 h du matin, au Fokontany Ambalampary, Commune d'Ikorombe, district d'Ambositra, région d'Amoron'i Mania..

2.2. Extraction : Chaque matériel végétal de *Psiadia salviifolia* récolté est en premier lieu séché à l'ombre pendant 7 jours puis broyées au moyen de broyeur à lame puis sassées 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 méthanol dans un erlen-meyer. La filtration sur Büchner, puis la déchlorophyllation 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 trois solvants organiques à polarité croissante : hexane, dichlorométhane et acétate d'éthyle. 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 et à l'acétate d'éthyle, déposés 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 HgCl₂ 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 I₂ 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^{ème} 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 FeCl₃ 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 FeCl₃, 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. *Terpénoïdes 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 Na₂SO₄ 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^{er} 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 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.
- 2.3.8. *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 NH₄OH 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_3 . Insérer ensuite une bandelette de papier filtre Whatman imprégnée de solution fraîchement préparée de picrate de sodium (5g de Na_2CO_3 + 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 *Psiadia salviifolia* ont été évaluées par la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé (Michel, 2011) (Ouattara, 2012). Huit 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),
 - ✓ *Bacillus cereus* ATCC 11778,
 - ✓ *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6301,
 - ✓ *Enterococcus faecalis* ATCC 19433,
- trois bactéries à gram négatif :
 - ✓ *Escherichia coli* (ATCC 25922),
 - ✓ *Salmonella typhi* (ATCC 19430),
 - ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853,
- et la souche fongique *Candida albicans* ATCC 10231.

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 10^6 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'huile essentielle 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. Au terme de 24 heures d'incubation, une zone claire (halo) est présente autour du disque si l'huile essentielle inhibe le développement microbien. Plus la zone d'inhibition est grande, plus le germe est sensible au produit testé. La mesure du diamètre de halo d'inhibition au moyen d'un pied à coulisse permet alors d'évaluer la sensibilité des souches microbiennes testées à l'huile essentielle. Deux boîtes sont utilisées par souche. En effet, tous les tests ont été répétés deux fois et les résultats enregistrés comme diamètre moyen de ces deux expériences. La sensibilité des souches microbiennes à l'huile essentielle analysée est évaluée de la manière suivante : insensible ($d \leq 7\text{mm}$), assez sensible ($7 < d \leq 8\text{mm}$), sensible ($8 < d \leq 9\text{mm}$) et très sensible ($d > 9\text{mm}$) (Tsirinirindravo, 2009) (Andriambololona, 2010).

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

Tableau 1 : Rendements d'extraction méthanolique des matériels végétaux de *P. salviifolia*

| Matériel végétal | Masse initiale (g) | Masse d'extrait (g) | Rendement d'extraction (%) |
|-------------------------|--------------------|---------------------|----------------------------|
| <i>Feuille</i> | 200 | 78,265 | 39,13 |
| <i>Fleur</i> | 49 | 15,698 | 32,03 |
| <i>Petite tige</i> | 138 | 21,759 | 15,76 |
| <i>Ecorce de racine</i> | 39 | 4,933 | 12,65 |

Ces résultats montrent que les feuilles et les fleurs possèdent des rendements d'extraction élevés respectifs de 39,13% et de 32,03% comparés à ceux des petites tiges et de l'écorce de racine.

3.2. Screening phytochimique

Les résultats de screening phytochimique recueillis dans le tableau 2 sont marqués par la prépondérance des métabolites secondaires dans les extraits bruts méthanoliques de feuilles et de fleurs *Psiadia salviifolia* Baker récolté dans la région d'Amoron'i Mania, principalement des flavonoïdes, des leucoanthocyanes, des tanins condensés, des coumarines, des terpénoïdes et stéroïdes, des stérols insaturés, des saponines et d'autres composés phénoliques.

Tableau 2: Résultats de screening phytochimique des extraits méthanoliques de *P. salviifolia*

| Familles chimiques | Partie de la plante | | | |
|----------------------|---------------------|-------|-------------|--------|
| | Feuille | Fleur | Petite tige | Racine |
| Alcaloïdes | - | - | - | - |
| Flavonoïdes | +++ | +++ | ++ | + |
| Leucoanthocyanes | ++ | ++ | - | - |
| Anthocyanes | + | + | - | + |
| Tanins condensés | +++ | +++ | +++ | ++ |
| Tanins hydrolysables | - | - | - | - |
| Composés phénoliques | ++ | ++ | + | - |

| | | | | |
|-----------------------|-----|-----|-----|---|
| Stéroïdes | +++ | - | - | - |
| Stérols insaturés | +++ | +++ | +++ | + |
| Stéroïdes lactoniques | - | - | - | - |
| Triterpénoïdes | + | +++ | +++ | - |
| Quinones | - | - | - | - |
| Saponines | +++ | + | - | + |
| Coumarines | ++ | ++ | - | - |

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

3.3. Activité antibactérienne

Le tableau 3 résume les résultats d'antibiogramme des extraits bruts méthanoliques des parties de la plante *P. salviifolia* vis-à-vis des huit souches indicatrices essayées. Ce tableau nous informe sur les valeurs des diamètres d'inhibition relatives aux activités antimicrobiennes de chacun des extraits analysés.

Tableau 3 : Résultats d'antibiogramme réalisé sur les extraits méthanoliques de *P. salviifolia*

| Partie de la plante | Souche microbienne et diamètre de halo d'inhibition (mm)* | | | | | | | |
|-----------------------|---|------------------|-----------------|------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|
| | <i>E.coli</i> | <i>S. aureus</i> | <i>S. typhi</i> | <i>B. cereus</i> | <i>S. pneumoniae</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>C. albicans</i> |
| Feuille (EF) | 9 | 6 | 8 | 6 | 9 | 11 | 9 | 10 |
| Fleur (EL) | 12 | 7 | 9 | 7 | 7 | 9 | 10 | 7 |
| Petite tige(ET) | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Ecorce de 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 la sensibilité des souches bactériennes à gram négatif *E. coli* ATCC 25922, *S. typhi* ATCC 19430, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et de la souche à gram positif *E. faecalis* ATCC 19433 envers les extraits bruts méthanoliques de feuilles et de fleurs de *P. salviifolia*. Le dermatophyte *Candida albicans* 10231 s'est avéré très sensible à l'extrait brut de feuille.

Les souches indicatrices essayées sont pratiquement insensibles aux extraits de petites tiges et d'écorce de racine.

3.4. Fractionnement par voie bioguidée

Les résultats d'antibiogramme du tableau 3 montrent que les extraits bruts méthanoliques de feuilles EF et de fleurs EL ont tous montré des activités remarquables parmi les quatre parties de *P. salviifolia* essayées. Cependant, l'extrait brut de fleurs EL a été choisi particulièrement dans la suite de nos études biologiques et phytochimiques pour sa forte activité sur *E. coli*. La masse de 9,665 g d'extrait EL a été soumise au partage liquide/liquide en cascade avec les solvants successifs : hexane, dichlorométhane (DCM) et acétate d'éthyle. Les masses d'extraits successifs à ces trois solvants, indicés EGH - EGD et EGA recueillies sont respectivement 0,143g - 0,315g - 1,555g et 4,754 g Après dessiccation au sulfate de sodium anhydre et évaporation de solvant (voir Tableau 4).

Tableau 4 : Résultats de partage liquide/liquide de l'extrait méthanolique de fleurs de *P. salviifolia*

| | Extrait | | |
|-------------------|---------|-------|-------|
| | ELH | ELD | ELA |
| Masse obtenue (g) | 2,889 | 1,563 | 1,181 |
| Rendement (%) | 29,90 | 16,17 | 12,21 |

Le tableau 5 informe sur les résultats de tests d'activité antibactérienne des quatre extraits obtenus par partage liquide/liquide vis-à-vis des quatre souches révélées sensibles.

Tableau 5 : Diamètres d'inhibition (mm) des extraits de partage liquide/liquide

| Extrait | Souche bactérienne et diamètre de halos d'inhibition (mm) | | | |
|---------|---|-----------------|----------------------|--------------------|
| | <i>E. coli</i> | <i>S. typhi</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. feacalis</i> |
| ELH | 13 | 10 | 9 | 11 |
| ELD | 6 | 6 | 6 | 6 |
| ELA | 9 | 12 | 6 | 6 |

Les résultats d'antibiogramme du tableau 5 révèlent que parmi les trois analysés, l'extrait de partage à l'hexane ELH dispose de très fortes activités contre les quatre souches *E. coli* ATCC 25922 (d=13mm), *S. typhi* ATCC 19430 (d=10mm), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (d=9mm) et *E. feacalis* ATCC 19433 (d=11mm). L'extrait au dichlorométhane ELD est aussi actif mais uniquement contre *E. coli* ATCC 25922 (d = 9mm), *S. typhi* ATCC 19430 (d=12mm).

D'après ces résultats, la suite du fractionnement a été réalisée avec l'extrait hexanique de fleur de *P. salviifolia* qui a montré un large spectre d'activité, en particulier sur les quatre souches bactériennes indiquées par l'antibiogramme.

Le fractionnement sur colonne chromatographique à gel de silice de 1,476 g de l'extrait ELH aux mélanges de solvant hexane/DCM à gradient variant de 100/0 à 0/100 (v/v) puis DCM/acétate d'éthyle à gradient 95/5 et 91/10 (v/v). L'analyse par chromatographie sur couche mince des 317 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 rassembler en huit fractions regroupées indicées ELH-1 à ELH-8 selon les résultats récapitulés dans le tableau 6.

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

| | Fractions regroupées | | | | | | | |
|---------------------------------------|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | ELH-1 | ELH-2 | ELH-3 | ELH-4 | ELH-5 | ELH-6 | ELH-7 | ELH-8 |
| Numéro des tubes de petites fractions | 1 à 205 | 206 à 251 | 252 à 257 | 258 à 267 | 268 à 281 | 282 à 294 | 295 à 305 | 306 à 317 |
| Masse (mg) | 34 | 319 | 43 | 85 | 152 | 64 | 35 | 88 |
| Rendement (%) | 2,30 | 21,61 | 2,91 | 5,75 | 10,29 | 4,33 | 2,37 | 5,96 |

Le tableau 7 récapitule le test biologique de ces huit fractions obtenues sur les souches déclarées précédemment sensibles.

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

| Souches bactériennes | Fractions regroupées | | | | | | | |
|----------------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | ELH-1 | ELH-2 | ELH-3 | ELH-4 | ELH-5 | ELH-6 | ELH-7 | ELH-8 |
| <i>E. coli</i> | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 18 | 10 | 6 |
| <i>S. typhi</i> | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 11 | 6 | 6 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 16 | 6 | 6 |
| <i>E. feacalis</i> | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 7 | 6 | 6 |

Ces résultats permet de constater que la fraction ELH-6 possède une très forte activité antibactérienne vis-à-vis des souches bactériennes à gram négatif *E. coli* ATCC 25922 (d=18mm), *S. typhi* ATCC 19430 (d=11mm) et *P. aeruginosa* ATCC 27853 (d=16mm). La souche *E. coli* s'est aussi montrée très sensible à la fraction ELH-7. Ces résultats nous indique que la fraction ELH-6 peut être appliquée à remédier les infections nosocomiales, la gastroentérite, les infections de l'étendue urinaire, la fièvre typhoïde les intoxications alimentaires.

Comme le germe *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, bactérie très résistante naturellement aux antibiotiques et germe ubiquitaire responsable de diverses infections, la fraction ELH-6 peut être employées pour guérir notamment les infections nosocomiales, les plaies (surtout brûlures et plaies opératoires), les infections pulmonaires, méningites d'inoculation et des septicémies.

La CCM préparative réalisée sur la fraction regroupée ELH-6 sur plaque chromatographique à gel de silice normale 60F254 par élution avec les systèmes de solvants de développement

hexane/acétate d'éthyle – 90:10 (v/v/v) puis DCM/acétate d'éthyle – 90:10 (v/v) nous a permis l'isolement de quatre molécules majoritaires de la fraction active ELH-6 dont les structures chimiques sont en cours de détermination.

4. CONCLUSION

La méthode de fractionnement par voie bioguidée des extraits non volatils de *Psiadia salviifolia* Baker démontre une forte activité de ses extraits méthanoliques de feuilles et des fleurs. Le fractionnement bioguidé exécuté sur l'extrait brut méthanolique de fleurs a donné la sous-fraction active hexanique ELH-6 et a conduit à l'isolement de trois molécules majoritaires à partir de cette fraction biologiquement active. Les résultats obtenus sur *Psiadia salviifolia* Baker confirment l'intérêt porté à l'étude phytochimique et biologique de cette plante endémique des Hautes Terres de Madagascar et de nombreux travaux sur les activités biologiques de *Psiadia saviifolia* sont envisageables. Les usages traditionnels de cette plante contre de nombreuses maladies, comme pour soulager les maux de dents, guérir les maux de ventre et traiter les affections des voies respiratoires, ont pu être justifiés à travers nos résultats de travaux expérimentaux.

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) 316 - 328.

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

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

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, 142, 61-78.

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

Gurib-Fakim, A., J. Gueho, 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.

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.[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.

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.