

Les méthodes suivantes ont été appliquées lors des études des plantes, dès leur sélection jusqu'à l'obtention de produits purs, structuralement identifiés et biologiquement testés.

I. CHOIX DES PLANTES

La sélection des plantes étudiées a été faite selon une approche systématique par criblage d'activités biologiques. Elles ont été récoltées dans le cadre d'activités du CNARP ou du programme ICBG. Les herbiers de référence sont déposés au Département de Botanique et d'Ethnobotanique du CNARP et au Missouri Botanical Garden (USA). Avant leur utilisation, les parties de plantes sont préalablement séchées puis finement broyées.

II. EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT

Pour chaque plante étudiée, le mode de préparation de l'extrait brut consiste à macérer le matériel végétal dans l'éthanol 95° pendant 48 heures. L'évaporation du solvant d'extraction sous pression réduite fournit un extrait brut éthanolique. L'isolement des produits met en œuvre plusieurs techniques de fractionnement et de purification, à savoir le partage liquide-liquide avec des solvants non miscibles entre eux, la chromatographie sur colonne ouverte, la chromatographie flash, la chromatographie circulaire, la cristallisation dans des solvants adéquats, la chromatographie sur couche mince préparative et la chromatographie liquide haute performance (CLHP) à l'échelle semi-préparative.

Les techniques chromatographiques utilisent diverses phases stationnaires, notamment la silice, la silice greffée par le groupement *n*-octadécyle (C₁₈) et le gel de Sephadex LH-20, et différentes phases mobiles constituées par des mélanges binaires de solvants organiques ou de méthanol et d'eau. En ce qui concerne la CLHP, la phase stationnaire employée est la silice greffée en C₁₈ et la phase mobile est généralement formée par un mélange de méthanol et d'eau.

III. TESTS BIOLOGIQUES

Dans le cadre de la préparation de ce Mémoire de HDR, les principales activités biologiques recherchées sont : antiplasmodiale, antimicrobienne, anti-anaphylactique et anticancéreuse.

III.1. Test d'activité antiplasmodiale

Sauf indication contraire, le test d'activité antiplasmodiale a été réalisé *in vitro* au CNARP sur la souche chloroquino-résistante FCM29 de *Plasmodium falciparum* en utilisant la méthode fluorimétrique au SYBR Green I.

SYBR Green I (Figure 1) est un réactif des acides désoxyribonucléiques (ADN) en biologie moléculaire. Le complexe ADN-réactif formé émet une intense fluorescence entre 505 et 615 nm à la suite d'une excitation par un rayonnement dans le domaine du visible entre 390 et 505 nm. En se fixant sur l'ADN du *Plasmodium*, l'utilisation du SYBR Green I permet de suivre quantitativement la croissance du parasite lors du test d'activité antiplasmodiale *in vitro*. Les globules rouges humains sains indispensables à la croissance du *Plasmodium* étant dépourvus d'ADN, ils ne contribuent point à la fluorescence du milieu après addition du réactif. Les résultats sont exprimés en concentration médiane inhibitrice (CI₅₀). Celle-ci correspond à la concentration d'extrait (ou fraction ou produit pur) qui inhibe la croissance de la moitié (50%) de la population parasitaire en culture après 72 heures d'incubation.

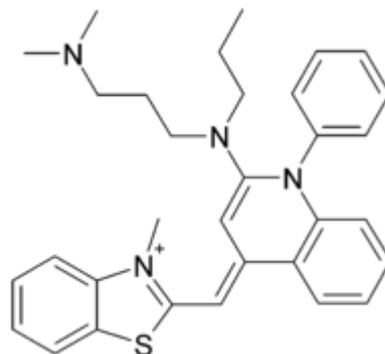


Figure 1 : Structure chimique du SYBR Green I

III.2. Test d'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne a été évaluée par la méthode de diffusion sur disques. Des disques de cellulose de 6 mm de diamètre, imbibés de l'échantillon à tester sont séchés à l'air libre, puis disposés stérilement en boîte de Pétri à la surface du milieu de Mueller-Hinton pour les bactéries *Staphylococcus aureus* (ATCC 11632) et *Klebsiella pneumoniae* (culture du CNARP), et de Sabouraud pour la levure *Candida albicans* (ATCC 10231), préalablement ensemencée avec le germe-test. L'apparition d'une zone d'inhibition circulaire autour du disque après 24 heures à 37°C indique que l'échantillon est actif contre le germe-test. Les tests sont réalisés en trois exemplaires en présence de témoins positifs, la tétracycline pour le test antibactérien et le miconazole pour l'essai antifongique. Pour le bio-guidage des travaux chimiques, la méthode bioautographique sur CCM a été utilisée.

III.3. Test d'activité anti-anaphylactique

L'anaphylaxie est l'augmentation de la sensibilité de l'organisme à une substance étrangère (antigène) après que celle-ci y a été introduite. *In vivo*, l'animal sensibilisé réagit par une broncho-constriction. L'effet contracturant de l'antigène (réaction anaphylactique) peut être retrouvée, *in vitro*, sur un organe isolé prélevé sur un animal sensibilisé. Le test d'activité anti-anaphylactique a été réalisé sur la trachée isolée de cobaye. La contraction d'origine immunologique est obtenue avec une solution saline d'ovalbumine. L'extrait (ou fraction) possède une activité anti-anaphylactique quand il (ou elle) prévient la contraction d'origine immunologique de l'organe.

III.4. Test de cytotoxicité

Sauf indication contraire, l'évaluation de l'activité cytotoxique a été effectuée à Virginia Polytechnic Institute and State University (VPISU) sur la lignée de cellules cancéreuses A2780 de l'ovaire humain en utilisant le réactif au bleu Alamar.

Le bleu Alamar est un réactif qui peut adopter deux formes : la forme oxydée de couleur bleue ou résazurine et la forme réduite de couleur rougeâtre qui est un fluorophore ou résorufine (Figure 2). La possibilité de réduction du bleu Alamar par les cellules vivantes

est mise à profit pour déterminer la viabilité des cellules après un traitement par une substance cytotoxique. La mesure de la fluorescence s'effectue en excitant la résorufine à 530 - 560 nm et déterminant l'émission à 590 nm. Les résultats sont exprimés en concentration médiane inhibitrice (CI_{50}). Le témoin positif est constitué par le paclitaxel ($CI_{50} = 0,028\mu M$).

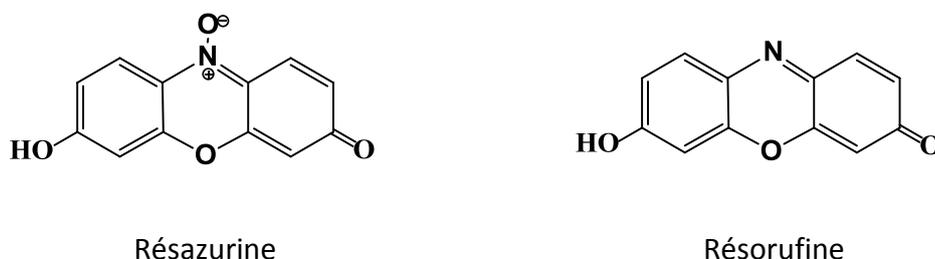


Figure 2: Structures chimiques de la résazurine et la résorufine

IV. DETERMINATION STRUCTURALE

Les structures chimiques présentées dans les différents chapitres qui suivent ont été établies en employant des méthodes physiques et chimiques. Les démarches suivies pour l'identification structurale des produits, notamment lorsqu'il s'agit de produits nouveaux, sont exposées dans les publications correspondantes dans le volume II de ce Mémoire. Elles sont reprises succinctement pour les produits nouveaux figurant dans le troisième chapitre du présent volume. Ces méthodes d'identification structurale comprennent notamment la détermination des constantes physiques, les analyses spectroscopiques et la comparaison avec les données de la littérature.

IV.1. Détermination des constantes physiques

Il s'agit de déterminer les constantes telles que le point de fusion et le pouvoir rotatoire des produits.

IV.2. Analyses spectroscopiques

- La spectrométrie de masse (SM) où les modes d'ionisation « Fast Atom Bombardment (FAB) » et « Electrospray-ionization (ESI) » ont été employés à haute

résolution. La technique « Spectrométrie de Masse/Spectrométrie de Masse » ou « Tandem Mass Spectroscopy » a été mise à profit pour obtenir le spectre de masse d'un ion particulier, résultant de la fragmentation d'un produit lors de son analyse en ESI-FAB.

- La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire monodimensionnelle (RMN du ^1H et du ^{13}C) ainsi que les expériences en RMN du ^{13}C utilisant les séquences d'acquisition « Attached Proton Test (^{13}C -APT)» et « Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (^{13}C -DEPT)». Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm.

- La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire bidimensionnelle (RMN 2D) employant principalement les techniques « Homonuclear Shift-Correlated Spectroscopy (COSY ^1H - ^1H) », « Total Correlation Spectroscopy (TOCSY) », « Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC) », « Heteronuclear Multiple-Bond Correlation (HMBC) » et « Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY) ».

- Les spectroscopies d'absorption dans l'Ultra-violet et le Visible (UV/Vis) et dans l'Infrarouge (IR).

IV.3. Comparaison avec les données de la littérature

Dans de nombreux cas, la comparaison des données spectrales obtenues avec celles publiées dans la littérature pour le produit en question ou les substances de structures chimiques analogues est d'une grande utilité pour établir définitivement la structure chimique. Vu le nombre important de produits connus isolés, les bibliographies qui indiquent les données spectrales ayant servi de références pour leur identification structurale se trouvent dans les publications correspondantes dans le volume II de ce Mémoire et ne sont pas reprises dans le présent volume.

Chapitre III : TRAVAUX DE RECHERCHE

Les travaux de recherche qui font l'objet de synthèse dans ce chapitre se rapportent aux cinq plantes suivantes :

- *Melicope madagascariensis* (Baker) T.G. Hartley (Rutaceae),
- *Diospyros gracilipes* Hiern (Ebenaceae),
- *Turraea* sp. (Meliaceae),
- *Vitex cauliflora* Moldenke (Verbenaceae),
- *Baseonema acuminatum* P. Choux (Asclepiadaceae),

L'espèce du genre *Turraea* n'a pas encore été identifiée spécifiquement au niveau taxonomique. Les quatre autres plantes sont endémiques de Madagascar.

Les plantes susdites ont été sélectionnées pour des études approfondies car leurs extraits bruts ont montré l'une ou l'autre des activités biologiques observées lors du criblage préliminaire : antiplasmodiale, anti-anaphylactique et antimicrobienne. Les travaux chimiques et biologiques ont été réalisés dans le cadre du programme « International Cooperative Biodiversity Group (ICBG) » qui vise à chercher des nouvelles substances à activités antiplasmodiale et anticancéreuse à partir des ressources naturelles de Madagascar d'une part, et du programme de recherche au CNARP relatif à la valorisation des plantes endémiques dans la recherche de nouvelles substances d'intérêt biologique d'autre part. Les résultats obtenus sur ces cinq plantes ont donné lieu à des publications dans des revues de niveau international, pour lesquelles je suis le premier auteur.

I. VUE SYNOPTIQUE DES RESULTATS

Le tableau 1 représente une vue synoptique des résultats des travaux entrepris sur les cinq plantes, avec les intitulés et les références des publications y afférents. Les publications y sont classées dans l'ordre chronologique en commençant par les plus récentes. Par souci de clarté, seuls les produits nouveaux et les produits connus d'intérêts biologique et/ou chimiotaxonomique sont reportés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Vue synoptique des résultats des travaux sur *Melicope madagascariensis*, *Diospyros gracilipes*, *Turraea sp.*, *Vitex cauliflora* et *Baseonema acuminatum*

N°	Noms scientifiques (Famille botanique)	Activités biologiques des extraits bruts	Produits isolés	Activités biologiques et/ou importance chimiotaxonomique des produits isolés	Publications	
					Intitulés	Références
1	<i>Melicope madagascariensis</i> (Rutaceae)	Antiplasmodiale	Héliparvifoline	Antiplasmodiale	Furoquinoline alkaloids and methoxyflavones from the stem bark of <i>Melicope madagascariensis</i> (Baker) T.G. Hartley	Rasamison et al. (2016) - <i>Natural Products and Bioprospecting</i> , 6: 261-265
			Skimmianine	Cytotoxique		
			3,5-dihydroxy-3',4',7-triméthoxyflavone	Cytotoxique		
			Alcaloïdes furoquinoléiques et méthoxyflavones : marqueurs chimiotaxonomiques			
2	<i>Diospyros gracilipes</i> (Ebenaceae)	Antimicrobienne	Plumbagine	Antimicrobienne et cytotoxique	Chemical constituents from stems and leaves of <i>Diospyros gracilipes</i> Hiern and the antimicrobial and cytotoxic principles.	Rasamison et al. (2016) - <i>Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry</i> , 5: 109-113
			Elliptinone	Cytotoxique		
			1,4-naphtoquinones : marqueurs chimiotaxonomiques			
3	<i>Turraea sp.</i> (Meliaceae)	Antiplasmodiale	Acide turranioïque (<i>nouveau</i>)	Antiplasmodiale et cytotoxique	Nitrogen-Containing Dimeric <i>nor</i> -Multiflorane Triterpene from a <i>Turraea sp.</i>	Rasamison et al. (2014) - <i>Organic Letters</i> , 16: 2626–2629
			Turraenine (<i>nouveau</i>)	Antiplasmodiale		
			Acide triptocallique B	Antiplasmodiale		
4	<i>Vitex cauliflora</i> (Verbenaceae)	Antiplasmodiale	15,17,18-triacétoxy-labda-7,13E-diène-3-one (<i>nouveau</i>)	Inactif	New Labdane Diterpene from <i>Vitex cauliflora</i> Moldenke from the Madagascar Rainforest	Rasamison et al. (2010) - <i>Fitoterapia</i> , 81: 55-58.
5	<i>Baseonema acuminatum</i> (Asclepiadaceae)	Anti-anaphylactique	Baséonémoside C (<i>nouveau</i>)	Non testé	Additional Pregnane Glycoside from <i>Baseonema acuminatum</i>	Rasamison et al. (2002) - <i>Fitoterapia</i> , 73: 442-444.

II. METABOLITES SECONDAIRES ISSUS de *Melicope madagascariensis* (Baker) T.G. Hartley

II.1. Cadrage

Le genre *Melicope* (Rutaceae) comprend environ 235 espèces présentes dans les régions malgaches et indo-himalayennes, aux îles Hawaï et Marquises ainsi qu'en Nouvelle Zélande. *M. madagascariensis* (Baker) T.G. Hartley est une plante endémique de Madagascar qui a été initialement placée dans le genre *Euodia* sous le nom scientifique *Euodia madagascariensis* Baker avant d'être transférée dans *Melicope*. Cette révision taxonomique a été conduite par Thomas Gordon Hartley en 2001 sur la base de critères morphologiques.³⁵



Figure 3 : Photographie de *Melicope madagascariensis* (Baker) T.G. Hartley
Source : Stephan Rakotonandrasana (CNARP)

M. madagascariensis est une plante connue sous le nom vernaculaire « Fatraina », et est utilisée en médecine traditionnelle comme tonique et purgatif, dans le traitement des maladies du foie, des reins et de l'estomac, de la bronchite et rougeole.^{36,37,38} Les espèces du genre *Melicope* sont particulièrement riches en alcaloïdes, flavonoïdes et acétophénones,

³⁵ Hartley TG. (2001) - On the taxonomy and biogeography of *Euodia* and *Melicope* (Rutaceae). Allertonia, 8: 1-341.

³⁶ Boiteau, P., Boiteau, M., Allorge-Boiteau, L. (1999) – Dictionnaire des noms malgaches de végétaux. Editions Alzieu, Grenoble, France, p. 345.

³⁷ Matu, E.N., (2013) - *Melicope madagascariensis* (Baker) T.G. Hartley, ed. by G.H. Schmelzer and A. Gurib-Fakim. Prota 11 (2): Medicinal Plants 2. PROTA, Wageningen, Pays Bas, pp. 193-194

³⁸ Schmidt, J.P. (1971) - Contribution à l'Inventaire des Plantes Médicinales de Madagascar. ORSTOM.

dont certains possèdent des propriétés cytotoxique, inhibitrice de l'agrégation plaquettaire et antiplasmodiale.^{39,40,41} Les travaux chimiques antérieurs sur *M. madagascariensis* font mention de la présence de méthoxyflavones et d'huile essentielle.^{42,43}

Deux échantillons d'écorces de *M. madagascariensis* ont été récoltés à Zahamena en 2000 dans le cadre du projet ICBG et à Moramanga en 2009 lors d'une mission de récolte effectuée par le CNARP. L'étude chimique que nous avons entreprise sur ces deux échantillons consiste à chercher des métabolites secondaires à propriété antiplasmodiale et d'intérêt chimiotaxonomique.

II.2. Résultats et discussion

II.2.1. Isolement et identification structurale

L'extrait éthanolique (11,5 g) d'un échantillon d'écorces de *M. madagascariensis* (MG250, 300 g) récoltées à Zahamena en 2000 a montré une activité antiplasmodiale sur la souche chloroquino-résistante FCM29 de *Plasmodium falciparum* avec une valeur de CI_{50} égale à 11,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Une partie (1,5 g) de cet extrait a été soumise à un partage liquide-liquide pour donner entre autres, une fraction chlorofomique active ($CI_{50} = 3,66 \mu\text{g}/\text{mL}$). Son fractionnement bio-guidé par chromatographies sur colonne de Sephadex LH-20 et gel de silice a abouti à l'isolement de trois produits **3.1 – 3.3** (Schéma 1).

³⁹ Chen, I-S., Chen, H-F., Cheng, M-J., Chang, Y-L., Teng, C-M., Tsutomu, I., Chen, J-J., Tsai, I-L. (2001) - Quinoline Alkaloids and other Constituents of *Melicope semecarpifolia* with Antiplatelet Aggregation Activity. J. Nat. Prod., 64: 1143-1147.

⁴⁰ Rei-Sheu, H., Chano-Yih, D., Shang-Kwei, W., Tai-Tsung, C. (1993) - Cytotoxic flavonoids from the leaves of *Melicope triphylla*. Phytochemistry, 35, 271–272.

⁴¹ Simonsen, H.T. (2012) - Four novel geminally dialkylated, non-aromatic acetophenone derivatives from *Melicope coodeana*. Phytochem. Lett., 5, 371–375.

⁴² Gleye, J., Moulis, C., Doazan, M.N. (1983) - Constituants chimiques d'*Evodia madagascariensis*. Plantes Méd. Phyt., 17: 92-95.

⁴³ Randriamialinoro, F. (2001) - Contribution à l'étude chimique de l'huile essentielle des feuilles d'*Evodia madagascariensis* Baker (Rutaceae), plante endémique de Madagascar, Mémoire de DEA, Université d'Antananarivo, 95 pp.

La suite des travaux chimiques sur cette plante a été menée sur un autre échantillon d'écorces (ST1375, 1,3 kg) récoltées à Moramanga en 2009. Le protocole de fractionnement d'une portion (25 g) de son extrait éthanolique (65,3 g) comprend un partage liquide-liquide opéré comme précédemment, un traitement acide-base de la fraction chloroformique, et une série d'analyses chromatographiques. Il a permis d'obtenir six produits **3.4 – 3.9** (Schéma 2).

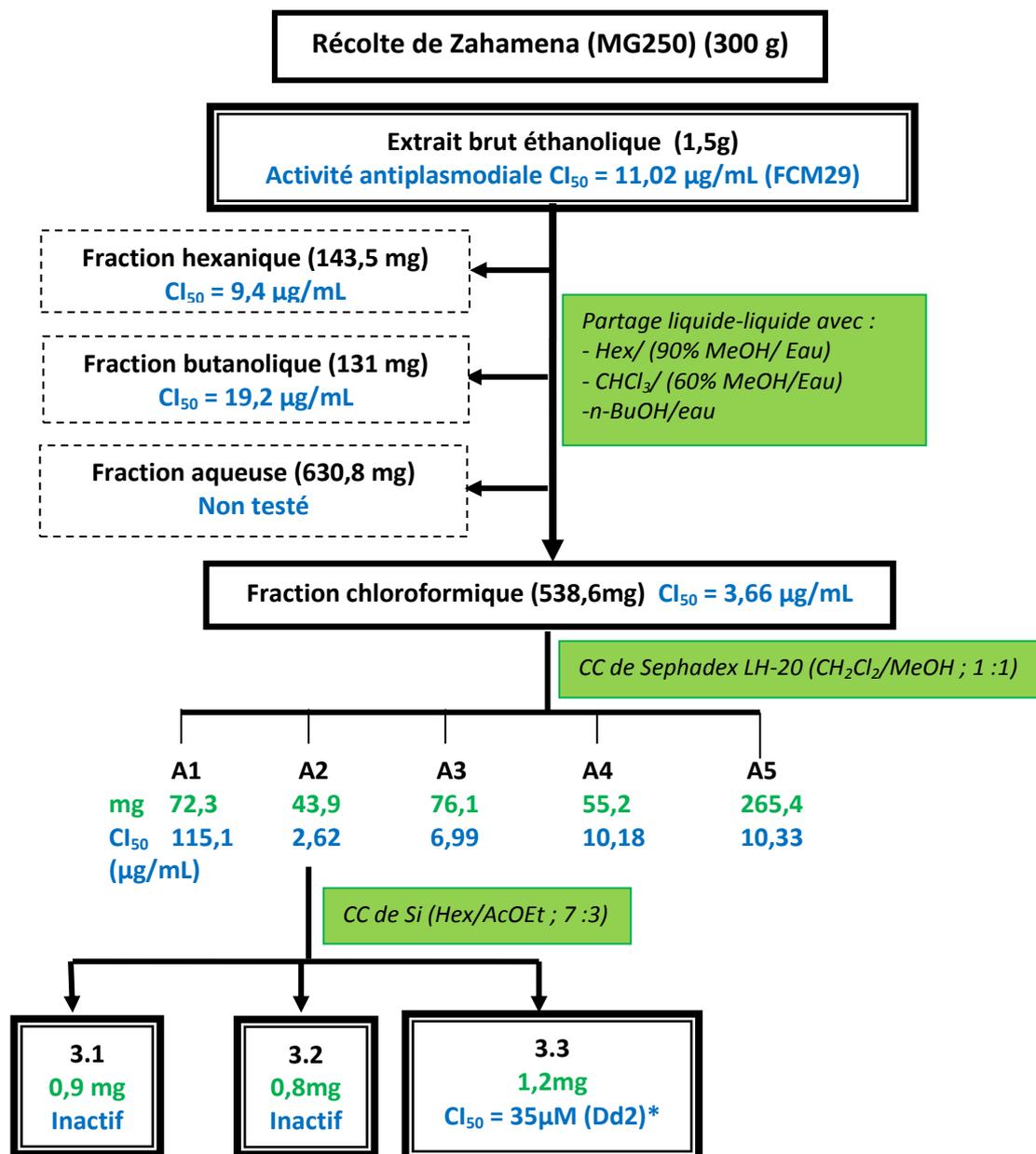


Schéma 1 : Protocole d'isolement des produits 3.1 – 3.3 issus de *M. madagascariensis*

*Dd2 est une souche multirésistante de *Plasmodium falciparum* utilisée pour l'évaluation de l'activité antiplasmodiale des trois produits 3.1 -3.3 (Test antiplasmodial fait à VPISU).