

Etudes chimique et biologique de sept plantes médicinales de Madagascar de la famille Rubiaceae

Mbolatiana A. Rakotoarisoa (1,3), Henintsoa Rakotoarivelo (1,2), Stephan Rakotonandrasana (1), Jesuka R. Rasolofomanana (1), Faliarivony Randriamialinoro (1), Lalasoana Ranarivelo (1), Michel Ratsimbason (1), Vahinalahaja Eliane Razafintsalama (1), Sylvia T. R. Ralambonirina (1)*

- (1) Centre National d'Application de Recherches Pharmaceutiques, rue R. P. Rahajarizafy A. de Padoue, Ambodivoanjo Ambohitato, BP 702, 101 Antananarivo, Madagascar
(2) Université d'Antananarivo, Faculté des Sciences, Chimie des Produits Naturels, BP 906, 101 Antananarivo, Madagascar.
(3) Université d'Antananarivo, Faculté des Sciences, Biochimie Fondamentale et Appliquée, BP 906, 101 Antananarivo, Madagascar.

*Correspondance courriel : ralambonirina@yahoo.fr

Résumé

Les criblages chimiques et biologiques de sept plantes endémiques de Madagascar de la famille Rubiaceae ont permis d'évaluer leurs richesses en métabolites secondaires biologiquement actifs. Les analyses CCM et quelques réactions de caractérisations de famille chimique ont montré que *Razafimandimbisonia minor*, *Gaertnera phanerophlebia*, *Carphalea pervilleana* et les deux espèces d'*Anthospermum* présentent une variété de famille chimique telles que coumarines, anthraquinones, leucoanthocyanes, flavones, flavonols, iridoïdes, triterpénoïdes et stéroïdes. Les analyses biologiques ont montré que *Razafimandimbisonia minor* possède une activité antibactérienne à large spectre. Pour *Gaertnera phanerophlebia* et *Carphalea pervilleana*, l'activité antibactérienne est plus spécifique sur *S. pyogenes* et *S. pneumoniae*. L'extrait d'*Anthospermum perrieri* possède une activité très intéressante sur *P. falciparum* FCM29, souche résistante à la chloroquine, avec une IC₅₀ de 3.19 µg/ml. Ces quatre plantes sont toutes douées de pouvoir antioxydant. Ces résultats ont montré que les extraits les plus riches chimiquement sont les plus actifs.

Mots clés : Rubiaceae, criblage chimique, activités antimicrobienne et antioxydante

Abstract: Chemical and Biological Studies of seven Madagascan medicinal plants belonging to the Rubiaceae family

Chemical and biological screening of seven endemic plants from Madagascar belonging to the Rubiaceae family were used to evaluate their wealth in biologically active secondary metabolites. The TLC analysis and some chemical reactions for family characterizations showed that *Razafimandimbisonia minor*, *Gaertnera phanerophlebia*, *Carphalea pervilleana* and two species of *Anthospermum* presents a variety of chemical family such as coumarin, anthraquinone, leucoanthocyanins, flavones, flavonols, iridoids, triterpenoids and steroids. The biological analysis showed that *Razafimandimbisonia minor* has a broad spectrum antibacterial activity. For *Gaertnera phanerophlebia* and *Carphalea pervilleana*, the antibacterial activity is more specific to *S. pyogenes* and *S. pneumoniae*. The *Anthospermum perrieri* extract has a very interesting activity on *P. falciparum* FCM29 (strain resistant to chloroquine) with an IC₅₀ of 3.19 µg/ml. These four plants are all endowed with antioxidant power. These results showed that the richest chemically extracts are the most active.

Keywords: Rubiaceae, chemical screening, antimicrobial and antioxidant activities

1. INTRODUCTION

Madagascar possède de nombreuses plantes médicinales encore mal connues. Concernant particulièrement la famille végétale Rubiaceae, un nombre très réduit d'espèces a fait l'objet d'étude chimique et biologique. Nous avons sélectionné sept plantes provenant de diverses régions de Madagascar, ayant chacune des utilisations précises suivant leurs localités. La plupart est utilisée pour les maladies infectieuses. Parmi ces plantes, *Anthospermum emirnense*, *Carphalea kirontron* et *Pauridiantha paucinervis* sont répertoriés dans quelques ouvrages ou articles sur le Pharmacopée Malagasy (Bost, 1961 ; André *et al.*, 1976 ; Randriamahefa, 1979 ; Descheemaeker, 1986 ; Andriamihaja, 1986 ; Rakotobe *et al.*, 1993 ; Boiteau, 1997). *Carphalea pervilleana* a fait objet de quelques enquêtes (André *et al.*, 1976 ; Herbiers PBZT, 2016). Les trois autres plantes ne présentent aucune donnée dans la littérature, ainsi les utilisations traditionnelles ont été obtenues par nos propres enquêtes. Le principal objectif de la présente étude consiste à évaluer les activités antimicrobiennes et antioxydantes des extraits méthanoliques de sept plantes endémiques de Madagascar et de déterminer leurs caractéristiques chimiques.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Plantes étudiées

Les espèces végétales et les organes considérés sont présentés dans le Tableau 1 avec les lieux et les dates de récolte, ainsi que les noms vernaculaires et les utilisations traditionnelles.

Tableau 1 : Liste des plantes étudiées, récolte et données ethnobotaniques

Référence Herbier	Nom scientifique	Organe étudié	Lieu et date de récolte	Noms vernaculaires	Utilisations traditionnelles
SSR 401**	<i>Carphalea kirontron</i>	Rameau feuillé	Antsiranana - Avril 2012	Kirontrona, Menavogny, menavony, hazomenavony, hazonankodiavitra, voninjazava, folerahala, menamena	Traitement des blessures, plaie venant de sorcellerie, morsure d'animaux venimeux Traitement des maladies infantiles : rougeole, fièvre**
ST 1491**	<i>Carphalea pervilleana</i>	Rameau feuillé	Andriba - Mai 2012	Menavoha, Reiampy Lahy, Hazombaratra, Menavony	Infusion pour les enfants**
SSR 128*	<i>Pauridiantha paucinervis</i>	Rameau feuillé	Moramanga - Mai 2012	Tamirova, Maroatody, Tsiandrova	Febrifuge, Paludisme, Diarrhée, Dysenterie, Stimulante, Ulcère d'estomac, Maux de ventre, colique, Emétique, Analgésique, Amincissant, Rhumatisme, Rhume, Toniques, Fortifiant, Rachitisme*
ST 380*	<i>Gaertnera phanerophlebia</i>	Rameau feuillé	Moramanga - Mai 2012	Tsitsivoafitaka, tsitirontafika	Fébrifuge, plaie*
ROL 734*	<i>Razafimandimbisonia minor</i>	Feuilles et tige	Moramanga - Octobre 2014	Hazomborondreo, Tapialahy, Voamalitony	Infection néphrologique*
RS1**	<i>Anthospermum emirnense</i>	Parties aériennes	Iharanandriana (Casque de Behenjy) - Juin 2009	Hazonorana, Hasinorana, Alamianga, alaiwana, Matoa, kijanombazimba, kisanga	maux de dents, maladies de la bouche, maladies de l'appareil digestif (estomac, foie), toux, maladie cutanée, maladies vénériennes, épilepsie**
RS2**	<i>Anthospermum perrieri</i>	Parties aériennes	Arivonimamo - Novembre 2009	Hazonorana, kofehimamy, hazomamy	maladies de l'appareil digestif, maux de têtes, piqûres d'insectes**

Légende du Tableau 1 :

*Les utilisations traditionnelles proviennent des enquêtes effectuées par les botanistes du CNARP.

** Les utilisations traditionnelles et les noms vernaculaires proviennent des enquêtes effectuées par Sylvia RALAMBONIRINA 2007 – 2009 et/ou combinées aux données bibliographiques (Bost, 1961 ; André *et al.*, 1976 ; Randriamahefa, 1979 ; Descheemaeker, 1986 ; Andriamihaja, 1986 ; Rakotobe *et al.*, 1993 ; Boiteau, 1997)

2.2. Extraction

Les extractions ont été réalisées par macération à température ambiante de poudre végétale dans le méthanol. La poudre végétale sèche est macérée pendant 48 heures, puis la solution extractive est prélevée et concentrée. Le solvant récupéré est remis en contact avec la poudre végétale pour une nouvelle macération. L'opération est répétée jusqu'à épuisement de la poudre végétale par le solvant.

Caractérisation chimique des extraits obtenus

Les CCM ont été réalisées sur gel de silice (phase normale). Pour les dépôts, chaque extrait est mis en solution dans le méthanol. Pour l'éluion, trois systèmes de polarités variées ont été utilisés, dont CH_2Cl_2 / 2 % MeOH ; CH_2Cl_2 / 18 % MeOH et AcOEt/ MeOH/H₂O (100/16.5/13.5) afin d'obtenir un profil CCM complet pour chaque extrait : profils des produits apolaires, moyennement polaires et polaires. Pour pouvoir détecter l'ensemble des molécules, les plaques CCM sont observées sous UV (à 254 nm et à 366nm) puis révélées avec un réactif non spécifique, la vanilline perchlorique sulfurique.

Le criblage phytochimique a été effectué avec les méthodes classiques de détection des familles chimiques susceptibles d'être présentes en utilisant des réactions et réactifs spécifiques (Tableau 3). Ces tests sont basés sur la formation de complexes insolubles (réactions de précipitation) ou bien sur la formation de complexes colorés (réactions de coloration).

2.4. Evaluation biologique

2.4.1. Evaluation de la propriété antioxydante

La stratégie consiste à un criblage de tous les échantillons puis quantification des activités des échantillons ayant présentés de résultat positif lors du criblage.

Le criblage préliminaire est effectué par CCM sur plaque de silicagel (phase normale), éluée avec AcOEt / 10 % MeOH puis révélée avec le DPPH.

La quantification de l'activité est effectuée par spectroscopie UV/visible à 517 nm. La méthode adoptée est celle d'Awika et al. (2003). 25 mg de DPPH sont dissous dans 100 ml de méthanol et gardés à -20 °C à l'abri de la lumière avant utilisation. Dans des tubes secs, 200 µl de la solution à tester sont introduits, puis 3800 µl de la solution de DPPH à 25% sont ajoutés. Pour chaque concentration, un blanc constitué de 3800 µl de DPPH, additionné de 200 µl de méthanol est préparé. Après 30 min d'incubation à l'obscurité à la température ambiante, une mesure de l'absorbance à $\lambda = 517$ nm a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre. L'activité antioxydante qui exprime la capacité de piéger le radical libre est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol. Elle est donnée par la formule suivante (Yoo et al., 2008):

$$\text{Inhibition (\%)} = (\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{test}} / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$$

Où Abs désigne l'absorbance à la longueur d'onde de $\lambda = 517$ nm.

Les résultats ont été exprimés par la moyenne de 3 mesures \pm écart type.

Le pourcentage d'inhibition ainsi calculé a été comparé en utilisant deux courbes d'étalonnage de l' α - tocophérol des valeurs comprises entre 6,25 µM à 100 µM et 150 µM à 600 µM.

2.4.2. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne des plantes a été effectuée en deux étapes. La première consiste à l'antibiogramme ou méthode de diffusion sur disque. Chaque extrait est testé à 1 mg/disque sur 8 souches de bactéries Gram-négatif (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella enterica* ATCC 13076, *Shigella flexnerii* ATCC 12022, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048); sur 6 souches de bactéries Gram positif : *Staphylococcus aureus* ATCC 11632, *Bacillus cereus* ATCC 14579 , *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305) et sur une levure (*Candida albicans* ATCC 10231).

La deuxième étape consiste à la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) sur les extraits ayant présenté des résultats positifs lors de la première étape et sur les souches sensibles. La méthode a été faite suivant celle décrite auparavant (Razafintsalama et al., 2013) avec quelques modifications. Chaque extrait a été dissout dans du DMSO à 3% pour avoir une concentration égale à 1mg/ml, puis stérilisée par filtration millipore ayant de 0,22 µm de diamètre des pores. Ensuite, 100µl de chaque extrait à tester ont été dilués avec 95µl du Muller Hinton Broth (MHB) puis répartis dans les microplaques à 96 puits. 5 µl d'inoculum standardisés à 10⁸ CFU/mL et ajustés à 0,5McFarland sont ajoutés dans chaque puits. Ces dilutions ont été réalisées de façon à avoir des concentrations finales des extraits comprises entre 0,24µg /ml et 500µg/ml. Un contrôle positif de croissance contenant l'inoculum sans extrait et un contrôle négatif qui ne comporte que le milieu MHB sont également préparés. Chaque microplaque est par la suite celée avec du parafilm (MicroAmp® Optical Adhesive Film; Applied Biosystems). Le test est répété trois fois. La CMI a été évaluée par ajout de 20µl de solution de 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) à 10% dans chaque puits, après incubation à 37°C

pendant 30min (Kuetee *al.*,2008). Le MTT, un indicateur coloré de couleur jaune vire au violet lorsqu'il y a croissance bactérienne. En effet, la CMI est indiquée par la cupule qui contient la plus faible concentration d'extrait où aucun changement de coloration n'est observé. Pour la détermination de la CMB, le contenu de chaque puits (10µL) utilisé pour la détermination de la CMI qui ne présente pas de croissance visible est repiqué sur milieu de Mueller Hinton Agar puis incubé à 37°C pendant une nuit. La CMB correspond à la plus faible concentration de l'extrait où aucune colonie bactérienne ne pousse après incubation.

2.4.3. Evaluation de l'activité antiplasmodiale

Une sonde fluorescente, SYBR Green I, spécifique à l'ADN double brin est utilisée pour le suivi de la croissance intra-érythrocytaire du *Plasmodium falciparum*. La fluorescence du complexe ADN-SYBR Green I est proportionnelle à la quantité d'ADN. L'importance de la fluorescence permet d'évaluer l'importance de la population parasitaire. Nous utilisons des microplaques de 96 puits et un lecteur de microplaque à fluorescence (Flx 800, Biotek) pour la lecture : excitation à 485nm/lecture à 518nm. La quinine est la substance de référence (Bennett *et al.*, 2004).

La phase érythrocytaire (globule rouge du sang humain) de la souche *Plasmodium falciparum* FCM29 (naturellement résistante à la chloroquine) est maintenue en culture continue (Trager *et al.* 1976). Les extraits sont mis en contact avec le parasite à la concentration unique de 50 µg/mL pour un premier triage. Les extraits qui inhibent à 75% et plus de la croissance de la population parasitaire après 72h d'incubation à 37°C sont sélectionnés pour un test d'évaluation de l'IC₅₀ à partir d'une série de dilutions allant de 50 µg/mL à 0,33 µg/mL.

3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Résultats chimiques

Le résultat d'extraction par macération au méthanol pour chaque plante est donné dans le Tableau 2. Il montre que les rendements pour *Gaertnera phanerophlebia* (ST 380) et *Razafimandimbisonia minor* (ROL 734) sont importants.

Tableau 2 : Résultats d'extraction brute

Plantes	Masse de poudre végétale	Masse d'extrait obtenu	Rendement d'extraction	Apparence de l'extrait
SSR 401 (<i>C. kirondron</i>)	40 g	2.93 g	7.32%	Brun
ST 1491 (<i>C. pervil.</i>)	40 g	3.55 g	8.87%	Brun
SSR 128 (<i>P. pauciner.</i>)	40 g	1.62 g	4.05%	Vert
ST 380 (<i>G. phaner.</i>)	40 g	4.65 g	11.62%	Vert
ROL 734 (<i>R. minor</i>)	100 g	16.8 g	16.8%	Brun
RS1 (<i>A. emimen.</i>)	37 g	3.05 g	8.24%	Brun
RS2 (<i>A. perrieri</i>)	38 g	2.80 g	7.36%	Brun

L'analyse CCM a montré que les profils de SSR 401 (*C. kirondron*) et de SSR 128 (*P. paucinervis*) sont similaires, en effet le chromatogramme est constitué de produit restant au dépôt avec un trainé faible. Pour les autres plantes, les profils sont plus riches car ils contiennent des taches représentant des composés de polarités variées (Figure 1).

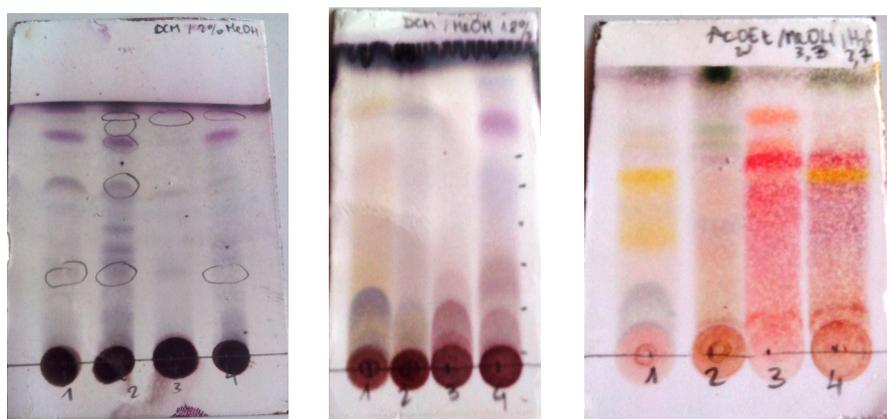


Figure 1 : Photos de CCM de quelques extraits de Rubiaceae : éluants : CH₂Cl₂ / 2 % MeOH ; CH₂Cl₂ / 18 % MeOH et AcOEt/ MeOH/H₂O (100/16.5/13.5) ; Dépôts : ST1491 (1), ST380 (2), ROL734 (3) ; RS2(4)

Le résultat de criblage phytochimique avec les réactifs utilisés est présenté dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Résultats de criblage phytochimique des Rubiaceae

Famille chimique	Réactifs de caractérisation	C.	C.	P.	G.	R. minor	A.	A.
		<i>kirondron</i> SSR401	<i>pervil.</i> ST1491	<i>pauciner.</i> SSR128	<i>phaner.</i> ST380	ROL734	<i>emirnen.</i> RS1	<i>perrieri</i> RS2
Coumarines	NaOH, lampe U.V.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
anthraquinones	NH ₄ OH	+++	+++	+	+	++	+	++
Hétérosides anthracéniques	HCl ou H ₂ SO ₄ , FeCl ₃ , NH ₄ OH	+++	-	-	-	+++	-	-
Flavanes	Vanilline chlorhydrique	-	+	-	+	+	-	+
Anthocyanes	HCl à froid	-	-	-	-	-	-	-
Leucoanthocyanes	HCl à chaud	-	-	+++	+++	++	-	-
Flavones	HCl, Mg, alcool isoamylique	-	+++	-	-	+++	+++	++
Flavonols		-	-	-	++	-	+++	++
Flavanones, flavanonols	HCl, Mg	-	-	-	-	-	+++	++
Polyphénols	Gélatine	-	-	-	+	+++	+++	+++
Tanins	NaCl, gélatine	-	-	-	+++	+++	+++	+++
Tanins hydrolysables	FeCl ₃	-	-	-	-	-	++	+
Tanins condensés		+++	+++	-	+++	+++	+	+
Hétérosides cyanogènes	CHCl ₃ ; picrate de sodium	-	+	-	+	+	-	-
Alcaloïdes	KI, I ₂ , HgCl ₂ , Bi(NO ₃) ₃ , acide tartrique	-	-	-	-	-	-	-
Iridoïdes	HCl, CuSO ₄ , glycérol	-	-	-	-	-	+++	+++
Triterpénoïdes	Anhydride acétique, H ₂ SO ₄ , antimoine	+	+++	-	-	++	+++	+++
Stéroïdes		-	+++	-	-	+++	+++	+
Stéroïdes insaturés	H ₂ SO ₄	+++	+++	-	-	+++	-	-
Stéroïdes lactoniques	Acide picrique, KOH ou NaOH, acide 3,5-dinitrobenzoïque	-	+++	-	-	+++	-	-
cardénolide	H ₃ PO ₄ , CCl ₃ COOH	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
Hétérosides 2-déoxysucres	H ₃ PO ₄ , CCl ₃ COOH	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
Saponines	Hauteur de mousse	-	-	+	+	+++	-	-
Polysaccharides	Ethanol 90°	-	-	-	-	-	+++	+

Légende du Tableau 3 :

- : aucune réaction observée (test négatif)

+ : faible coloration ou formation de peu de précipité

++ : Coloration franche ou précipité abondante

+++ : Coloration intense ou floculation immédiate ou hauteur de mousse supérieure à 5cm

Les plantes étudiées sont généralement riches en composés phénoliques (coumarines, flavonoïdes, anthraquinones, tanins et polyphénols), et en triterpénoïdes (triterpènes, stéroïdes). Notons cependant que les extraits de *Carphalea kirondron* (SSR 401) et *Pauridiantha paucineris* (SSR 128) sont relativement pauvres par rapport aux autres échantillons. En effet, ST1491, ST380, ROL734, RS1 et RS2 contiennent une variété de flavonoïdes, ce qui n'est pas le cas de SSR 401 et SSR 128. A part cela, *Carphalea pervilleana* (ST1491) et *Razafimandimbonia minor* (ROL734) présentent une série de triterpénoïde tandis que les *Anthospermum* sont particulièrement riches en iridoïdes.

3.2. Résultats biologiques

La CCM révélée au DPPH a montré que seuls les extraits de SSR 401 (*Carphalea kirondron*) et SSR 128 (*Pauridiantha paucineris*) n'ont pas présenté d'activité antioxydante significative (Figure 2). Nous avons alors procédé à la quantification de l'activité pour les autres extraits (Tableau 4).

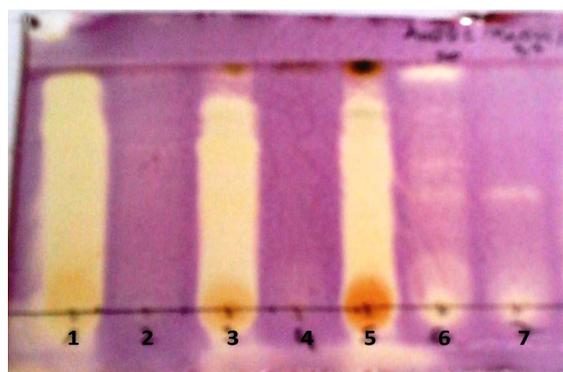
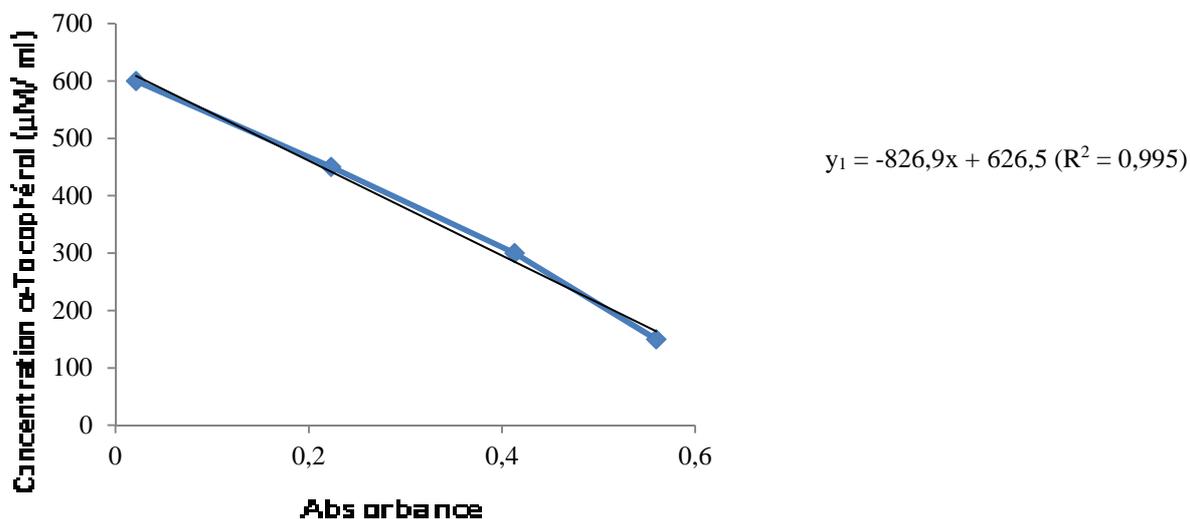


Figure 2 : Résultat d'étude antioxydante des 7 extraits : éluant : AcOEt/ MeOH/H₂O (100/16.5/13.5) révélée avec le DPPH – dépôts : ROL734 (1) ; SSR401 (2) ; ST1491 (3) ; SSR128 (4) ; ST380 (5), RS1 (6), RS2 (7)

Tableau 4 : Résultats de la quantification des activités antioxydantes des extraits de Rubiaceae par méthode spectroscopique (Longueur d'onde de lecture: 517nm ; Concentration des extraits : 1mg/ml)

Extraits de plantes	% d'inhibition de DPPH	équivalent α -tocophérol (μ M/mg/mL d'extrait)
ST 380(<i>G. phaner.</i>)	82,15	516,52
ROL 734 (<i>R. minor</i>)	93,33	548,77
RS1(<i>A. emirnen.</i>)	44,86	63,44
RS2(<i>A. perrieri</i>)	66,38	234,55
ST 1491 (<i>C. pervil.</i>)	85,17	453,68

D'après ce tableau, à une concentration de 1mg/ml chaque extrait inhibe le radical DPPH de 44, 86% à 93,33%. En amenant chaque valeur d'absorbance du DPPH de chaque extrait analysé dans les équations des courbes de tendance de l' α -tocophérol $y_1 = -826,9x + 626,5$ ($R^2 = 0,995$) et $y_2 = -74,18x + 121,1$ ($R^2 = 0,999$) (Figure 3), la capacité des extraits à inhiber le radical libre DPPH varie en équivalent α - tocophérol de 63,44 μ M/mg/ml d'extrait à 548,77 μ M/mg/ml d'extrait. L'activité inhibitrice est très significative pour ROL 734 (*R. minor*), ST 1491 (*C. pervilleana*), ST 380(*G. phanerophlebia*) et RS2(*A. perrieri*). En effet, à 1mg/ml leur pouvoir à piéger le DPPH est supérieur à 50%. En revanche, l'activité de RS1 (*A. emirnense*) est moindre.



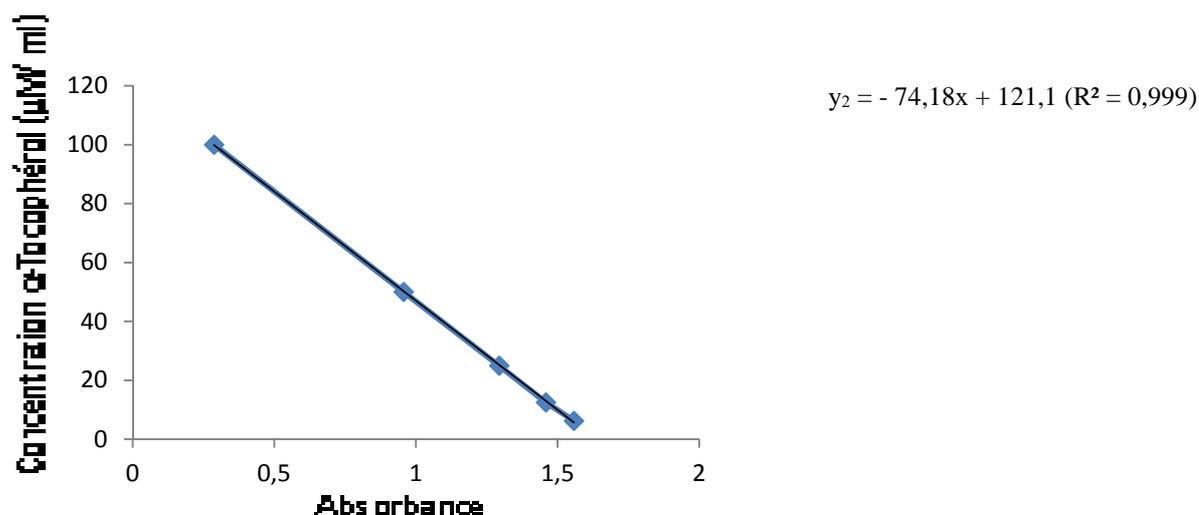


Figure 3 : Courbes standards de l' α tocophérol

En ce qui concerne les activités antibactérienne et antiplasmodiale, les résultats d'antibiogrammes ainsi que les résultats de tests sur *Plasmodium falciparum* respectifs sur les 7 extraits sont présentés dans le Tableau 5. Les résultats de détermination de CMI et de CMB des extraits actifs sur des bactéries sont récapitulés dans le Tableau 6.

Tableau 5 : Résultats des tests biologiques préliminaires sur les extraits MeOH des Rubiaceae (antibactériens, antifongique, antiplasmodial)

Souches	C. kirondron	C. pervil.	G. phaner.	P. pauciner.	R. minor	A. emirnen.	A. perrieri	Témoins
	SSR401	ST1491	ST380	SSR128	ROL 734	RS1	RS2	
<i>Bactéries Gram négatives</i>								
<i>E.coli</i>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	21±0.6
<i>S.enterica</i>	0±0	0±0	0±0	0±0	12±0.5	0±0	07±0	23±0.3
<i>S.flexnerii</i>	0±0	0±0	0±0	0±0	11±0	0±0	0±0	21±0
<i>P.mirabilis</i>	0±0	0±0	0±0	0±0	12±0	0±0	07±0	22±0
<i>P.aeruginosa</i>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	13±0.6
<i>Y.enterocolitica</i>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	21±0
<i>E.cloacae</i>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	23±0
<i>E.aerogenes</i>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	16±0
<i>Bactéries Gram positives</i>								
<i>S.aureus</i>	0±0	0±0	13±0	0±0	11±0	0±0	0±0	21±0
<i>B.cereus</i>	0±0	0±0	0±0	0±0	10±0	0±0	0±0	22±0
<i>L.monocytogenes</i>	0±0	0±0	0±0	0±0	12±0	0±0	0±0	21±0
<i>C.perfringens</i>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	21±0.6
<i>S.pyogenes</i>	0±0	0±0	16±0	0±0	11±0	0±0	0±0	27±0.3
<i>S.pneumoniae</i>	0±0	09±0	15±0.5	0±0	12±0	0±0	0±0	26±0
<i>levure</i>								
<i>C.albicans</i>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	23±0,6
<i>parasite</i>								
<i>P.falciparum</i> (IC ₅₀)	19.77	33.48	7.86	NA	50.71	37.38	3.19	0.0012

Légende du Tableau 5 :

Test antibactérien : activité exprimée en HI (Diamètre de l'halo d'inhibition ; mm ± écart-type) ; - : Non testé, 0 : aucune zone d'inhibition ; Témoin = Néomycine (30µg/disque) ;

Test antifongique : Témoin : Miconazole (50µg/disque) : HI (mm ± écart-type)

Test antiplasmodial : activité exprimée en IC₅₀ (µg/ml), témoin = quinine ; NA = non actif

Test antioxydant : résultat de test préliminaire par CCM : +++ = trainée active, ++ : quelques bandes actives, + : peu de bandes actives, NA : aucune bande active

Ce tableau montre que, pour le criblage de l'activité antimicrobienne, à une concentration de 1mg/disque, ROL 734 est à la fois actif sur les bactéries Gram positives et les bactéries Gram négatives. ST380 est spécifique sur quelques bactéries Gram positives testées (*S. aureus*, *S. pyogenes* et *S. pneumoniae*). ST1491 n'est actif que sur une bactérie Gram positive (*S. pneumoniae*). SSR401, ST380, SSR128, RS1 et RS2 n'ont aucun effet sur toutes les souches testées. Toutes les plantes testées n'ont pas d'activité contre la levure.

Pour l'activité antiplasmodiale, ST380 (IC₅₀= 7.86 µg/ml) et RS2 (IC₅₀= 3.19 µg/ml) présentent des valeurs remarquables.

Tableau 6 : Résultats de la détermination de CMI et de CMB des extraits actifs sur les souches sensibles avec un HI > 10 mm

Souches	<i>G. phaner.</i>		<i>R. minor</i>	
	ST380		ROL 734	
	CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMB(µg/ml)
<i>Bactéries Gram négatives</i>				
<i>S. enterica</i>	NT	NT	500	>1000
<i>S. flexnerii</i>	NT	NT	500	>1000
<i>P. mirabilis</i>	NT	NT	500	>1000
<i>Bactéries Gram positives</i>				
<i>S. aureus</i>	500	1000	>1000	>1000
<i>B. cereus</i>	NT	NT	500	>1000
<i>L. monocytogenes</i>	NT	NT	500	>1000
<i>S. pyogenes</i>	250	1000	250	>1000
<i>S. pneumoniae</i>	250	1000	>1000	>1000

NT : Non testé

Ces résultats montrent que ST 380 inhibe la croissance de *Staphylococcus aureus* à 500µg/ml, et tue cette même souche à 1000µg/ml. A 250µg/ml, la plante inhibe l'accroissement de *Streptococcus pneumoniae* et de *Streptococcus pyogenes*. A 1000µg/ml et au-delà de cette concentration, ST 380 tue ces deux souches respectives.

Pour les activités inhibitrice et bactéricide de ROL 734, elle inhibe la multiplication des trois bactéries Gram négatives (*S. enterica* ; *S. flexnerii* et *P. mirabilis*) et deux bactéries Gram positives (*B. cereus* et *L. monocytogenes*) sensibles, à 500µg/ml. La croissance de *S. pyogenes* est inhibée par la plante à 250 µg/ml. Au-delà de 1000 µg/ml, ROL 734 inhibe *S. aureus* et *S. pneumoniae* et tue toutes les germes sensibles.

4. CONCLUSION

Les sept plantes de la famille Rubiaceae, appartenant aux genres *Carphalea*, *Anthospermum*, *Gaertnera*, *Pauridiantha* et *Razafimandimbisonia* contiennent comme métabolites secondaires majoritaires des composés phénoliques et des triterpénoïdes. Aucun des échantillons étudiés n'a présenté de réactions positives sur les tests d'alcaloïdes. Ce résultat confirme les recherches effectuées par André et al. en 1976, qui ont conclu que les Rubiaceae de Madagascar sont souvent pauvres en alcaloïdes (André et al., 1976).

En ce qui concerne les profils chimiques de chaque espèce, *Razafimandimbisonia minor* (ROL 734), *Gaertnera phanerophlebia* (ST 380), *Carphalea pervilleana* (ST 1491) et les *Anthospermum* ont présenté une variété de famille chimique telles que coumarines, anthraquinones, leucoanthocyanes, flavones, flavonols, iridoïdes, triterpénoïdes et stéroïdes. La richesse chimique de ces cinq plantes est confirmée par les résultats de CCM montrant divers produits de polarité variée représentés par des taches de couleurs diverses.

Concernant les résultats biologiques, quatre extraits (ROL 734 ; ST 1491 ; ST 380, RS2) possèdent des activités significatives.

L'extrait méthanolique de *Razafimandimbisonia minor* (ROL 734) possède une activité antibactérienne à large spectre. *Gaertnera phanerophlebia* (ST 380) a une activité spécifique sur les bactéries Gram positives. *Gaertnera phanerophlebia* (ST 380), *Razafimandimbisonia minor* (ROL 734), *Carphalea pervilleana* (ST1491) et *Anthospermum perrieri* (RS2) sont doués de propriétés antioxydantes très significatives. En plus, *Gaertnera*

phanerophlebia(ST 380) et *Anthospermum perrieri* (RS2) inhibent à 50% la croissance du *P. falciparum* seulement à des valeurs respectives de l'IC₅₀ égale à 7.86 µg/ml et à 3.19 µg/ml.

En comparant avec les données de la littérature sur les activités biologiques des Rubiaceae, les potentialités antibactérienne et antioxydante ont été répertoriées dans plusieurs espèces, par exemple, les extraits méthanoliques d'*Hedyotis dichotoma* et de *Mitracarpus scraber* sont actifs sur *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (Bisignano et al. 2000 ; Ahmad et al., 2005) et les extraits méthanoliques de *Galium verum* (Demirezer et al., 2006) et de sept espèces d'*Hedyotis* (Ahmad et al., 2005) sont antioxydants. En effet, des études biologiques sur quelques composants largement répandus dans la famille Rubiaceae possèdent ces activités : les acides gènipinique et gènipique, la loganine et ses dérivés ainsi que l'ixoroside inhibent la croissance de bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Tobey et al., 1978 ; El-Naggar, Beal, 1980 ; Dinda et al., 2007). Une azaanthraquinone isolée de *Mitracarpus scraber* inhibe *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium intracellulare*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* (Okunade et al., 1999). Les propriétés antioxydantes sont surtout retrouvées chez les flavonoïdes, tels que le quercétol et ses dérivés, des flavonols couramment rencontrés chez les Rubiaceae (Lu et al., 2000 ; Hazama et al. 2005 ; Gulsen et al., 2007 ; Liu et al., 2010). Nous remarquons cependant que les études antiplasmodiales n'ont pas été beaucoup développées sur les Rubiaceae.

Ces résultats nous conduisent à conclure une relation entre la richesse chimique et l'activité biologique des extraits. En effet les plantes les plus pauvres comme *Carphalea kirondrone* (SSR 401) et *Pauridiantha paucinervis* (SSR 128) selon les résultats de criblage et de CCM, sont les moins actives, voire même inactives selon nos résultats.

5. REFERENCES

- Ahmad R., Ali A. M., Israf D. A., Ismail N. H., Shaari K., Lajis N. H. (2005) : Antioxidant, radical-scavenging, anti-inflammatory, cytotoxic and antibacterial activities of methanolic extracts of some *Hedyotis* species. *Life Sciences*, 76, 1953-1964.
- Andre R., Delaveau P., Jacquemin H., (1976) : Recherches phytochimiques sur quelques Rubiacées malgaches. *Plantes médicinales et phytothérapie*, 10(4), 233-242.
- Andriamihaja S., (1986) : *Essai d'inventaire des plantes médicino-dentaire malgaches*, Tome 1, DL n°112, SME, , p. 39 – 40, p. 164 - 165
- Bisignano G., Sanogo R., Marino A., Aquino R., D'Angelo V., Germano M. P., De Pasquale R., Pizza C., (2000): Antimicrobial activity of *Mitracarpus scraber* extract and isolated constituents. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 105-108.
- Boiteau P., Boiteau M., Allorge-Boiteau L., (1997) : *Index des noms scientifiques avec leurs équivalents malgaches*, p. A (*Anthospermum*) - Extrait du dictionnaire des noms malgaches de végétaux, C. Alzieu Eds., Grenoble.
- Bost R., (1961) : Pharmacopée malgache (2^{ème} note) - *Mem. Inst. Sci. Madagascar Ser. B*, 10, p.200
- Demirezer L. O., Gurbuz F., Guvenalp Z., Stroch K., Zecek A., (2006): Iridoids, Flavonoids and Monoterpene Glycosides from *Galium verum* subsp. *verum*. *Turk. J. Chem.*, 30, 525-534.
- Descheemaeker A., (1986) : *Plantes Médicinales Malgaches*, Traduction française de Ravi-Maitso', 6^{ème} édition, Imprimerie Saint Paul, Fianarantsoa.
- Dinda B., Debnath S., Harigay Y. (2007): Naturally Occurring Secoiridoids and Bioactivity of Naturally Occurring Iridoids and Secoiridoids. A Review, Part 2 - *Chem. Pharm. Bull.*, 55, 689—728.
- El-Naggar L. J., Beal J. L. (1980): Iridoids. A Review. *J. Nat. Prod.*, 43, 649-707.
- Gulsen A., Makris D., Kefalas P., (2007): Biomimetic oxidation of quercetin : Isolation of a naturally occurring quercetin heterodimer and evaluation of its *in vitro* antioxidant properties. *Food Research International*, 40, 7-14.
- Kuete V., Fozing D. C., Kapche, W. F. G. D., Mbaveng, A. T., Kuate, J. R., Ngadjui B. T. and Abega Z. B. M. (2008): Antimicrobial activity of the methanolic-extract and compounds from *Morus mesozygia* stem bark. *Journal ethnopharmacologie*, 124 (3), 551-5.
- Liu P.-Y., Li K., Zhang J., Zhang D.-W., Lin H.-H., Yu X.-Q. (2010): Who is the King? The α -Hydroxy- β -oxo- α,β -enone Moiety or the Catechol B Ring : Relationship between the Structure of Quercetin Derivatives and their Pro-oxidative Abilities. *Chem. Biodiversity*, 7, 236-244.
- Lu C.-M., Yang J.-J., Wang P.-Y., Lin C.-C. (2000): A New Acylated Flavonol Glycoside and Antioxydant Effects of *Hedyotis diffusa*. *Planta Med.*, 66, 374-377.
- Ly T. N., Hazama C., Shimoyamada M., Ando H., Kato K., Yamauchi R. (2005): Antioxidative Compounds from the Outer Scales of Onion. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 8183-8189.
- Okunade A. L., Clark A. M., Hufford C. D., Oguntimein B. O., (1999): Azaanthraquinone : An Antimicrobial Alkaloid from *Mitracarpus scraber*. *Planta Med.*, 65, 447-448.
- Parc Botanique et Zoologique de Tsimbazaza (PBZT), (2016) : Collection d'Herbiers de l'Herbarium national (Herbiers nationaux), consulté en 2016.
- Rakotobe. E. A., Rasolomanana C. J., Randrianasolo S.S., (1993) : *Pharmacopées de l'Ambongo et Boina*, CIDST Antananarivo.
- Randriamahafa M., Rakotozafy A. (1979) : *Tari-dalana ahafantarana ny raokandro Malagasy* (Recherche bibliographiques sur les utilisations empiriques des plantes médicinales malagasy), Boky voalohany (1^{ère} Eds., 1979), s.n (s.l) éditeurs, p. 213
- Razafintsalama, V., Sarter, S., Mambu, L., Randrianarivo, R., Petit T., Rajaonarison, J. F., Mertz, C., Rakoto, D., Jeannoda, V. (2013): Antimicrobial activities of *Dilobeia thouarsii* Roemer and Schulte, a traditional medicinal plant of Madagascar. *South Africa Journal of Botany* 87: 1-3.

- Tobey R. A., Orlicky D. J., Deaven L. L., Rall L. B., Kissane R. J., (1978): Effect of Bouvardin (NSC 259968), a Cyclic hexapeptide from *Bouvardia ternifolia*, on the Progression Capacity of Cultured Chinese Hamster Cells. *Cancer Research*, 38, 4415-4421.
- Trager W., Jensen J. B., (1976): Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193 (4254), 6673-6675.
- Tyler N. Bennett, Michelle P., Bojana G., Clement S., Andrew D. Kosar, Eugene D., Roepe P. D., (2004): Novel, rapid and inexpensive cell-based quantification of antimalarial drug efficacy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Vol. 48, n°5, pp 1807-1810.
- Yoo M. K., Lee H. C., Lee H., Moon B. K. and Lee Y. C. (2008), Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*, 106, 929-936.