

ETUDES CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DE PLANTES ENDEMIQUES

Les études chimiques et biologiques de quelques plantes endémiques ont été confiées à des étudiants préparant leurs mémoires de Master II. Outre l'aspect pédagogique, l'objectif principal a été de chercher des nouvelles substances biologiquement actives et des nouvelles entités chimiques.

➤ Isolement et identification de principes antioxydants et marqueurs chimiotaxonomiques de *Melicope tsaratananensis*. Mémoire de Master II de RAKOTOMENA Ny Aina.¹²²

L'étude chimique de *Melicope tsaratananensis* (Rutaceae), une plante endémique de Madagascar a conduit à l'extraction et l'isolement de trois polyméthoxyflavones : ternatine (**11.1**), ayanine (**11.2**) et rétusine (**11.3**) (Figure 20). Ces composés ont été isolés par la combinaison de diverses techniques chromatographiques. Leurs structures chimiques ont été établies grâce à la spectrométrie de masse (ESI-HR) et la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN 1D et 2D). Le test antioxydant sur le radical libre DPPH a montré que ces trois produits sont doués d'une activité antioxydante. La présence de méthoxyflavones dans cette espèce apporte un soutien à sa reclassification taxonomique du genre *Euodia* vers *Melicope*.

¹²² RAKOTOMENA, R.A. H. (2016) - Etude chimique des principes antioxydants de *Melicope tsaratananensis*. Mémoire de Master II, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo. 53 pp.

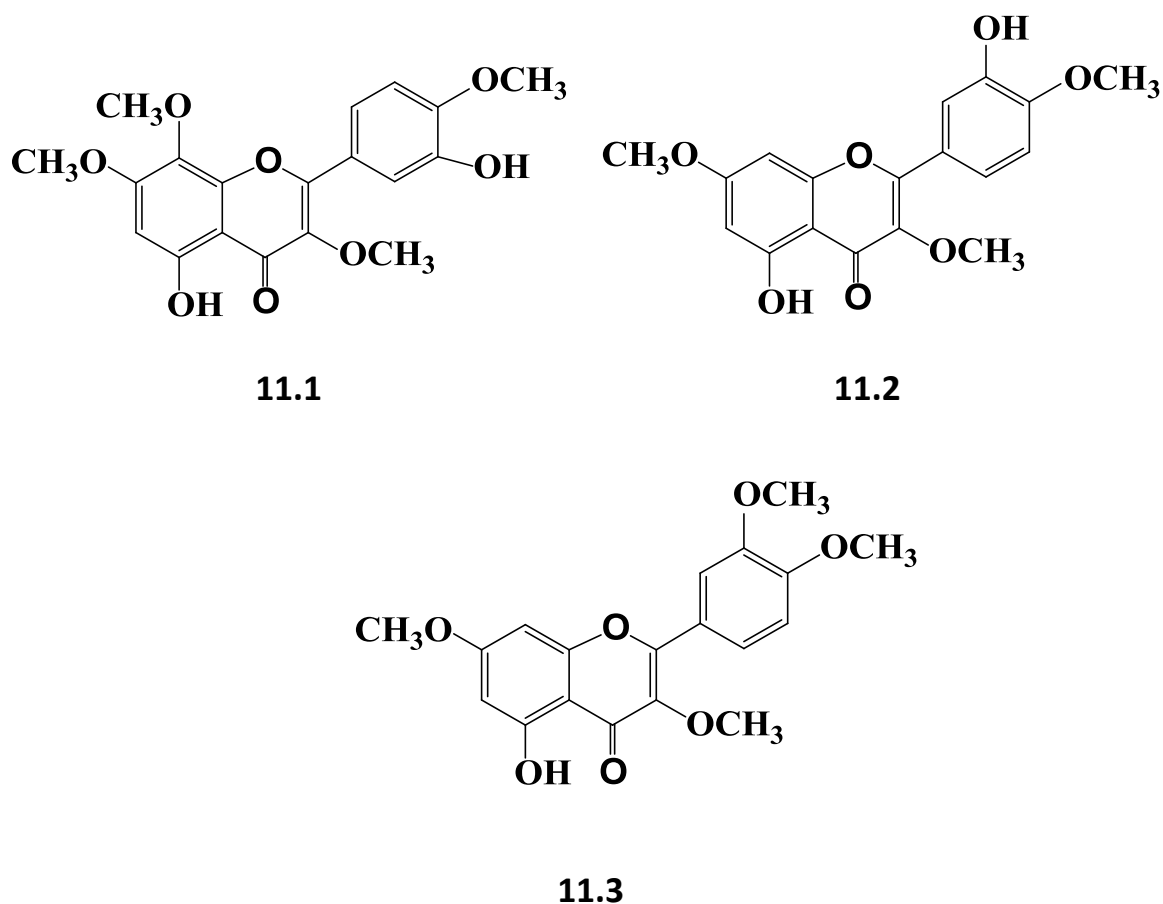


Figure 20: Structures chimiques des produits 11.1-11.3 issus de *M. tsaratananensis*

En marge de ce mémoire de Master II, les trois produits **11.1-11.3** ont été évalués pour leur activité cytotoxique sur la lignée cellulaire cancéreuse A2780 de l’ovaire à VPISU. La ternatine (**11.1**) s’est montrée fortement active avec une valeur de CI_{50} égale à 0,4 μM . L’ayanine (**11.2**) est faiblement cytotoxique ($CI_{50} = 11 \mu M$) tandis que la rétusine (**11.3**) est inactive dans ce test.

L’ensemble des résultats obtenus de *M. tsaratananensis* a fait l’objet d’une communication affichée lors du Symposium International Chimie Verte.¹²³ L’étude de cette plante s’inscrit dans notre programme de recherche sur le genre *Melicope*.⁵⁷

¹²³ **Rasamison, V.E.**, Rakotomena, A.H.R., Presley, C., Rasoanaivo, L.H., Brodie, P.J., Merino, E.F., Cassera, M.B., Andrianjakaniaina, M., Rakotonandrasana, S., Rakotondrafara, A., Ratsimbason, M.A., Rafidinarivo, E., Rakotondraibe, H.L., Kingston, D.G.I. (2016) - Alcaloïdes furoquinoléiques et méthoxyflavones issus de *Melicope madagascariensis* et *M. tsaratananensis*. Communication affichée présentée lors du Symposium International Chimie verte, Antananarivo.

➤ Isolement et identification de principes antifongiques de *Billburtia capensoides*. Mémoire de Master II de RAKOTONDRAMANANA Lova Diano.¹²⁴

B. capensoides Sales & Edges (Apiaceae) est une plante endémique de Madagascar et est utilisée traditionnellement pour traiter les coliques abdominales et les douleurs intestinales. L'extrait éthanolique des feuilles de la plante a montré une activité antifongique sur *Candida albicans* (CMI = 65 µg/mL) par la méthode de microdilution et une propriété antioxydante sur le radical libre DPPH par la méthode bioautographique. Le fractionnement de cet extrait par partage liquide-liquide suivi de séparations chromatographiques a abouti à l'obtention de deux produits. Leur structure chimique a été établie au moyen de techniques spectroscopiques en RMN (1D et 2D). Ce sont deux furanocoumarines connues et identifiées à l'impératorine (**12.1**) et la xanthotoxine (**12.2**) (Figure 21). Les produits **12.1** et **12.2** ont présenté une activité antioxydante en réduisant le radical libre DPPH et une propriété antifongique en inhibant la croissance de *C. albicans* avec des valeurs de CMI égales à 16 et 31,25 µg/mL, respectivement.

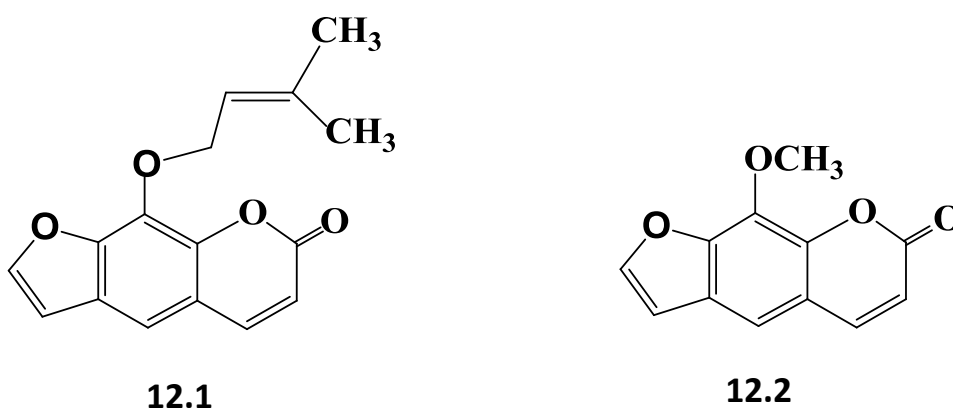


Figure 21: Structures chimiques des produits **12.1** et **12.2** issus de *B. capensoides*

➤ Constituants chimiques et activités biologiques de *Lygodium lanceolatum*. Mémoire de Master II de HARISENTONAVALLONA Libera.¹²⁵

Dans le cadre de notre collaboration avec le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et Chimie Organique Biologique, Faculté des Sciences de l'Université

¹²⁴ Rakotondramanana, L.D. (2017) – Furanocoumarines isolées des feuilles de *Billburtia capensoides* Sales & Edges (Apiaceae). Mémoire de Master, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, 58 pp.

¹²⁵ HARISENTONAVALLONA, L. (2017) – Etude chimique et activité antifatique de *Lygodium lanceolatum* Desv. (Lygodiaceae). Mémoire de Master II, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, 51 pp.

d'Antananarivo, nous avons examiné les constituants chimiques de *Lygodium lanceolatum* (Lygodiaceae).

Lygodium lanceolatum Desv. (Lygodiaceae) est une plante endémique de Madagascar qui est traditionnellement utilisée dans le traitement de la fatigue musculaire, du rhumatisme et de la douleur. Le criblage phytochimique a révélé la présence de polyphénols, triterpènes et stéroïdes. L'extrait éthanolique des feuilles a présenté une activité antioxydante sur le radical libre 2,2-diphényle-2-picrylhydrazyle (DPPH) par la méthode bioautographique sur CCM et une activité antifatique chez la souris en la faisant subir des épreuves à la barre fixe. L'extraction solide-liquide au Soxhlet des feuilles a fourni un extrait hexanique actif dans les deux tests biologiques. Sa séparation par des méthodes chromatographiques (CC, CCM) a conduit à l'isolement de sept produits. Les analyses spectroscopiques (RMN 1D et 2D) réalisées sur le produit 38 a permis de l'identifier au 1-oxo-friedelane (**13.1**) (Figure 22).

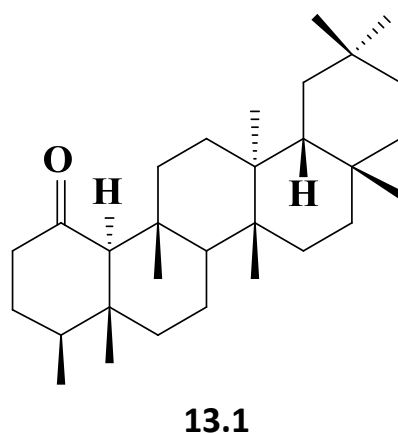


Figure 22: Structure chimique du produit 13.1 issu de *L. lanceolatum*

Mise en évidence d'activités biologiques et isolement de constituants chimiques d'une souche d'Actinomycètes. Thèse de Doctorat d'ANDRIANASOLO Rakotomalala Hery Rado.¹²⁶

¹²⁶ Rakotomalala, A.H. (2017) – Activités biologiques d'Actinomycètes du sol sous-baobabs dans les parties Ouest et Moyen-Ouest de Madagascar. Thèse de Doctorat, ESSA, Université d'Antananarivo, 174 pp.

Au total 87 souches d'Actinomycètes ont été obtenues à partir de 30 échantillons de sols rhizosphériques sous les espèces de baobabs endémiques de Madagascar telles qu'*Adansonia madagascariensis*, *A. grandidieri*, *A. digitata*, *A. Za* et *A. rubrostifa*. Le criblage antibactérien a montré que parmi les 87 isolats et 87 extraits qui en résultent, 29 souches (33,3%) et 20 extraits éthanoliques (22,9%) sont actifs sur au moins un germe-test. L'extrait (R₂12) issu de la souche isolée d'*Adansonia grandidieri* a montré une forte activité antifongique sur les champignons *Candida*. En outre, le même extrait a présenté une activité antioxydante avec une valeur de Cl₅₀ égale à 9,1 mg/mL. L'étude chimique de cet extrait actif a permis de constater sa richesse en lipides et localiser les principes antifongiques dans des fractions moyennement polaires. Son fractionnement guidé par l'activité antifongique a abouti à l'isolement de quatre produits par des méthodes chromatographiques. La structure chimique d'un produit ACT2015-45 a pu être établie par des méthodes spectroscopiques en RMN. Il s'agit du 3-(4-hydroxybenzyl)-6-benzyl-pipérazine-2,5-dione (**14.1**) (Figure 23). L'étude statistique des données collectées a révélé qu'il subsiste une relation entre les sites de prélèvement, les souches d'Actinomycètes y existantes et leurs activités biologiques.

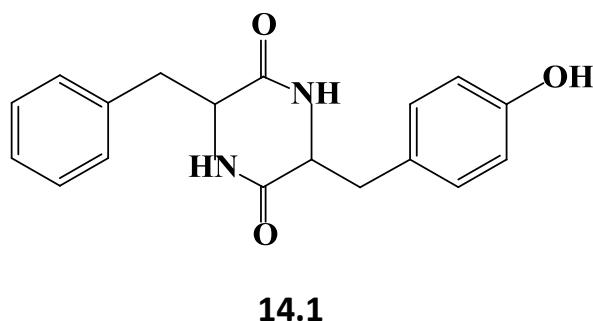


Figure 23: Structure chimique du produit **14.1** issu d'une souche d'Actinomycètes

Des résultats obtenus dans le cadre de cette thèse de Doctorat sont publiés dans la revue « Afrique Science » en 2017.¹²⁷

¹²⁷ Rakotomalala, A.H., **Rasamison, V.E.**, Ramananarivo, S., Ramananarivo, R., Rasolomampianina, R. (2017) - Propriétés biologiques de *Streptomyces* sp. isolé à partir du sol rhizosphérique d'une espèce de baobab (*Adansonia*) endémique de Madagascar. *Afr. Sci. Rev. Int. Sci. Technol.*, 13 :1-12.

**Chapitre VI : ACTIVITES DE RECHERCHE EN COURS ET
PERSPECTIVES**

Malgré le nombre de médicaments déjà existants et utilisés à travers le monde pour lutter contre les pathologies humaines, les Chercheurs et Scientifiques continuent toujours à en chercher dans l'espoir de trouver plus actifs et/ou moins toxiques. A cet effet, la NATURE met à leur service sa capacité d'élaborer une grande variété de métabolites secondaires ayant des structures moléculaires et des activités biologiques totalement imprévisibles.

La biodiversité de Madagascar est une des plus riches au monde. Ce patrimoine gagnerait à être exploité afin de contribuer au développement socio-économique de la Nation. C'est ainsi un travail d'une immense valeur d'évaluer le plus grand nombre possible de « RESSOURCES NATURELLES » pour découvrir des sources de nouveaux composés biologiquement actifs exploitables, pouvant aboutir à l'obtention de produits pharmaceutiques. Les connaissances et les méthodologies acquises par l'équipe de Chercheurs au CNARP dans le domaine d'études chimiques des Substances Naturelles depuis une quinzaine d'années et soutenues par de multiples collaborations nous poussent à poursuivre et renforcer la recherche sur les plantes endémiques et les microorganismes associés. Les activités y afférentes ont pour objectif de contribuer à leur valorisation en menant des investigations chimiques et biologiques. Elles s'articulent autour de deux axes principaux : i) la recherche de nouvelles substances bioactives à partir des plantes endémiques et ii) la recherche de nouvelles substances bioactives à partir des microorganismes.

I. RECHERCHE DE NOUVELLES SUBSTANCES D'INTERÊT BIOLOGIQUE A PARTIR DES PLANTES ENDEMIQUES

Ce programme de recherche est la suite des activités que j'ai déjà menées auparavant sur les plantes dans le cadre du projet « Conservation de la biodiversité et découverte de médicaments à Madagascar » et du programme d'activités au CNARP relatif à la valorisation des plantes endémiques dans la recherche de nouvelles substances naturelles d'intérêt biologique. Ainsi, au-delà des résultats acquis et synthétisés précédemment, des travaux d'investigations sont déjà en cours de réalisation. Ils se rapportent aux études chimiques et biologiques de quatre plantes endémiques, faisant partie de mes travaux de recherche au CNARP ou entrant dans le cadre de travaux d'encadrement de recherche

auxquels je participe. Compte tenu de l'impact des maladies infectieuses et des affections respiratoires à Madagascar, et du cancer à travers le monde, ces travaux visent à chercher des nouveaux composés à propriétés antimicrobienne, anti-anaphylactique et antioxydante.

➤ *Garcinia orthoclada* Baker (Clusiaceae). Le genre *Garcinia* appartient à la famille Clusiaceae et compte environ 200 espèces dans le monde. *Garcinia orthoclada* Baker figure parmi les 25 espèces de *Garcinia* endémiques de Madagascar. Les tests biologiques préliminaires sur l'extrait éthanolique des feuilles de *G. orthoclada* ont montré qu'il possède une activité antibactérienne sur *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexnerii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus mirabilis* avec des diamètres d'inhibition variant de $7,5 \pm 0,7$ mm à $14 \pm 1,4$ mm par la technique de diffusion sur disque. En outre, il a présenté une activité antioxydante sur le radical libre 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) par le test bioautographique direct sur CCM. Les travaux chimiques ont pour objectif d'isoler les substances responsables des activités antimicrobienne et antioxydante de la plante. Une partie des résultats déjà obtenus a fait l'objet d'une communication affichée lors du Symposium International Chimie Verte.¹²⁸ Ce projet de recherche est mené en partenariat avec le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et Chimie Organique Biologique à la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo et le Laboratoire de Pharmacognosie à l'Université Paris Descartes, France.

➤ *Lygodium lanceolatum* Desv. (Lygodiaceae). Le genre *Lygodium* comprend environ 40 espèces de fougères originaires des régions tropicales, avec quelques espèces tempérées dans l'Est de l'Asie et dans l'Est de l'Amérique du Nord. *L. lanceolatum* est une plante connue à Madagascar sous plusieurs noms vernaculaires tels que « Vahia, Vahylambo, Karaka et Fandrikakanga », et est traditionnellement utilisée dans le traitement d'un certain nombre de maladies humaines comme l'asthme, les ulcères d'estomac, l'hypertension artérielle, le diabète et la diarrhée. Notre étude sur cette plante a pour objectifs de vérifier certaines vertus thérapeutiques présumées de la plante et d'isoler les principes actifs

¹²⁸ Andrianjakaniaina, M., Ralambonirina, S., Razafintsalama, V., Rakotoarisoa, M., Vérité, P., Seguin, E., Rakotonandrasana, S., Rakotondrafara, A., Ratsimbason, M.A., Razanamahefa, B., Rasoanaivo, L., **Rasamison, V.E. (2016)** – Etude chimique et pharmacologique de *Garcinia orthoclada* (Clusiaceae). Communication affichée lors du Symposium International « Chimie verte », Hôtel Colbert, Antananarivo.

correspondants. Les résultats obtenus jusqu'ici de cette plante ont fait l'objet d'une communication affichée lors de la 5^{ième} édition du Forum de la Recherche.¹²⁹ Les travaux sur cette plante sont réalisés en collaboration avec le Laboratoire de Biochimie Fondamentale et Appliquée à la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo et College of Pharmacy, The Ohio State University, USA.

➤ *Terminalia septentrionalis* Capuron (Combretaceae). Le genre *Terminalia* comprend une centaine d'espèces d'arbres et d'arbustes qui poussent dans les savannes d'Asie et d'Afrique. Il est particulièrement riche en flavonoïdes, lignans, tannins et terpénoïdes, dont certains possèdent des propriétés cytotoxique, antimicrobienne, anthelmintique et antiplasmodiale. En outre, l'activité antioxydante de plusieurs espèces comme *T. gazensis*, *T. mollis* a été rapportée. *T. septentrionalis* est une espèce endémique que l'on rencontre exclusivement au Nord de Madagascar, dans la région de Tsaratanana. Elle a été sélectionnée pour une étude approfondie du fait de sa propriété antibactérienne, d'une part, et de l'absence de travaux chimiques et biologiques antérieurs, d'autre part. Lors du criblage antimicrobien mené sur des extraits de parties de plantes récoltées à Tsaratanana, l'extrait éthanolique des écorces de *T. septentrionalis* a présenté une activité antibactérienne intéressante sur *Staphylococcus aureus* (CMI = 0,2 µg/mL) et *Escherichia coli* (CMI = 2 µg/mL) en utilisant la méthode de microdilution. Deux produits ont été isolés et analysés en spectroscopie de résonance magnétique nucléaire. Ce sont des triterpènes monoglucosylés connus et identifiés au paradrymonoside¹³⁰ (**15.1**) et au 24-déoxyséricoside¹³¹ (**15.2**), respectivement (Figure 24). L'isolement d'autres produits et les tests d'activité antimicrobienne se poursuivent en collaboration avec College of Pharmacy, The Ohio State University, USA.

¹²⁹ Andriamamonjisoa, D., Ralamboranto, L., Andriantsoa, M., Rakotonandrasana, S.R., Rakotondrafara, A., Ratsimbason, M.A., **Rasamison, V.E. (2017)** - Evaluation biologique des extraits de *Lygodium lanceolatum* (Schizaeaceae), plante endémique malgache à vertu antiasthmatique. Communication affichée présentée lors du Forum de la Recherche, Antananarivo.

¹³⁰ Terraux, C., Maillard, M.P., Gupta, M.P., Hostettmann, K. (1996) – Triterpenes and triterpene glycosides from *Paradrymonia macrophylla*. *Phytochemistry*, 42: 495-499.

¹³¹ Tomczyk, M., Latté, K.P. (2009) – *Potentilla* – A review of its phytochemical and pharmacological profile. *J. Ethnopharmacol.*, 122: 184-204.

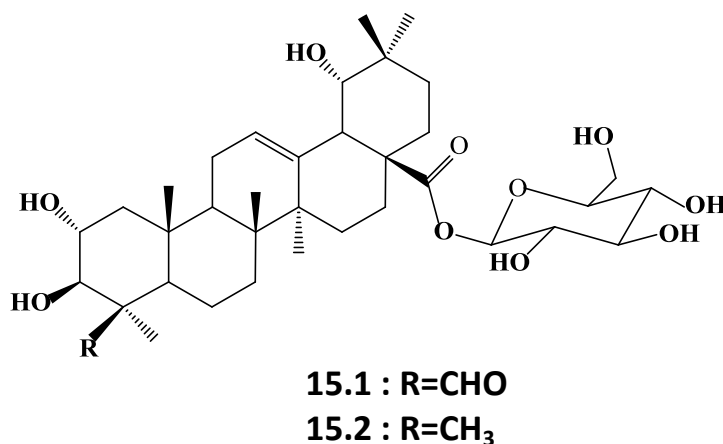


Figure 24: Structures chimiques des produits 15.1 et 15.2 issus de *T. septentrionalis*

➤ Le genre *Phyllarthron* appartient à la famille Bignoniaceae et comprend une quinzaine d'espèces que l'on rencontre à Madagascar et aux Comores. On les reconnaît aisément à leurs feuilles aplaties constituées d'un à cinq, voire plus d'articles, et à ses fruits gluants et de grande taille. Plusieurs espèces malgaches du genre *Phyllarthron* sont indifféremment connues sous les noms vernaculaires « Zahana ou Antohiravina » et sont utilisées en médecine traditionnelle. Nos travaux antérieurs sur le genre *Phyllarthron* ont porté sur la caractérisation de constituants chimiques de *P. bernierianum*.¹³² La présente étude concerne *P. madagascariense* et couvre quatre volets : biologique, toxicologique, chimique et agronomique. Les objectifs fixés consistent à évaluer l'activité de la plante sur l'asthme allergique et sa toxicité éventuelle et isoler les principes actifs correspondants d'une part, et à étudier les effets de certains facteurs agro-écologiques sur le développement de la plante, la productivité et le rendement en extraits bruts de ses organes d'autre part. Les travaux de recherche sur *P. madagascariense* sont menés par une équipe de Chercheurs pluridisciplinaires au CNARP.

¹³² **Rasamison, V.E., Okunade, A.L. (2002)** - Iridoid glucoside from *Phyllarthron bernierianum*. *ACGC Chem. Res. Comm.*, 14: 26-30.