

GLOSSAIRE

Ataxie : incoordination des mouvements avec conservation de la force musculaire.

Clastogène : se dit d'une substance chimique qui occasionne une aberration chromosomique structurelle (**anticlastogène** : substance contrant l'effet clastogène).

Colite : inflammation du côlon.

Enophthalmie : enfoncement des globes oculaires.

Erysipèle : infection aiguë de la peau due à un streptocoque, caractérisée par une plaque rouge douloureuse et de la fièvre.

Gastrite : inflammation de la muqueuse de l'estomac.

Glomérulite : variété de maladie des reins atteignant électivement les glomérules.

Hydropisie : épanchement de sérosité dans une cavité naturelle du corps ou entre les éléments du tissu conjonctif.

Hyperplasie : prolifération anormale des cellules d'un tissu.

Hyperpnée : augmentation de la fréquence respiratoire.

Imbibition oedémateuse : imprégnation ou infiltration séreuse d'un tissu.

Infarctissement : formation d'un infarctus dans un organe.

Myocardite : inflammation du myocarde.

Néphrite : inflammation du rein.

Péricardite : inflammation du péricarde.

Piloérection : érection des poils.

Stéatose : infiltration ou dégénérescence graisseuse d'un tissu ou d'un organe.

LISTE DES ABREVIATIONS

ACN : acétonitrile
AcOEt : acétate d'éthyle
ADN : acide désoxyribonucléique
CCM : chromatographie sur couche mince
CD3OD : méthanol deutérié
CDCl3 : chloroforme deutérié
CH2Cl2 : dichlorométhane
CI50 : concentration provoquant 50% d'inhibition
CMI : concentration minimale inhibitrice
COSY : « *C*orrelation *S*pectroscopY » spectroscopie de corrélations
d : doublet
dd : doublet de doublet
ddl : doublet de doublet large
dl : doublet large
DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane
DL50 : dose létale 50%
ESI : « *E*lectro*S*pray *I*onisation » Ionisation par électronébulisation
EtOH : éthanol
HMBC : « *H*eteronuclear *M*ultiple *B*ond *C*orrelation »
HPLC : « *H*igh *P*erformance *L*iquid *C*hromatography » Chromatographie liquide à haute performance
HSQC : « *H*eteronuclear *S*ingle *Q*uantum *C*oherence »
J : constante de couplage
j : jour
m : multiplet
MeOH : méthanol
MPLC : « *M*edium *P*ressure *L*iquid *C*hromatography » (Chromatographie liquide à moyenne pression)
NOESY : « *N*uclear *O*verhauser *E*ffect *s*pectroscopY »
ppm : partie par million
Pyr-d5 : pyridine deutérié
Rdt : rendement
RMN 2D : résonance magnétique nucléaire à deux dimensions
RMN : résonance magnétique nucléaire
s : singulet
sl : singulet large
TFA : acide trifluoroacétique
UI : unité internationale

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Les deux types de squelette d'aglycones.	15
<u>Figure 2</u> : Structure de la dioscine et de la diosgénine.	16
<u>Figure 3</u> : Structure de la protodioscine.	16
<u>Figure 4</u> : Structure des dioscorésides A et B.	17
<u>Figure 5</u> : Structures de dioseptemlosides E et G.	17
<u>Figure 6</u> : Structure de la dumétorine.	18
<u>Figure 7</u> : Structure de la dioscorine.	19
<u>Figure 8</u> : Structure de la crinamine	19
<u>Figure 9</u> : Structures des diosbulbines A, B et C.	19
<u>Figure 10</u> : Structure des diosbulbines D-H.	20
<u>Figure 11</u> : Structures des diosbulbinosides D et F.	20
<u>Figure 12</u> : Structure des bafoudiosbulbines A, B, D, F et G.	21
<u>Figure 13</u> : Structures de quelques stilbènes isolés des <i>Dioscorea</i> .	22
<u>Figure 14</u> : Structures d'un phénanthrène et d'un dihydrophénanthrène isolés de <i>Dioscorea</i> .	22
<u>Figure 15</u> : Structures des hydroxyphénanthrènes isolés de <i>Dioscorea opposita</i> , 3,4,6-trihydroxyphénanthrène (C) et 6,7-dihydroxy-2-méthoxy-1,4-phénanthrènedione (E), de la dioscorone A (D). Structures de la phénanthraquinone, diocoreanone (E) et des naphtofuranoxépines, dioscorealides A (G) et B (EH) isolées de <i>D. membranacea</i> .	23
<u>Figure 16</u> : <i>Dioscorea antaly</i> Jum. & Perr.	31
<u>Figure 17</u> : Carte de répartition de <i>Dioscorea antaly</i> Jum. & Perr.	33
<u>Figure 18</u> : Résumé des différentes étapes d'extraction par les solvants organiques.	37
<u>Figure 19</u> : Les différentes étapes menant à l'obtention des trois produits nouveaux (D5 : antadiosbulbine A, et D6 : antadiosbulbine B et D12 : 8-épidiosbulbine G)	39
<u>Figure 20</u> : Schéma d'isolement des constituants de l'extrait par AcOEt.	40
<u>Figure 21</u> : Procédé de purification de l'extrait brut aqueux.	41
<u>Figure 22</u> : Sous-structures a , b , c et d déduites du spectre 1H-1H COSY du composé D11 .	43
<u>Figure 23</u> : A : Principales corrélations observées dans le spectre HMBC entre les sous-structures a , b , c et d ; B : Structure plane du composé D11 ; C : Principaux NOEs observés dans le spectre NOESY de D11 .	45
<u>Figure 24</u> : 8-épi-diosbulbine E (D11).	46
<u>Figure 25</u> : Structure de la 6-O-acétyl-8-épidiosbulbine E.	49
<u>Figure 26</u> : Sous-structures a , b , c et d déduites du spectre 1H-1H COSY du composé D7 .	51

<u>Figure 27</u> : A : Structure plane du composé D7 ; B : Principaux NOEs observés dans le spectre NOESY.	52
<u>Figure 28</u> : Diosbulbine E (D7).	53
<u>Figure 29</u> : A : Corrélations HMBC et structure plane du composé D12 ; B : Principaux NOEs observés dans le spectre NOESY du composé D12 .	55
<u>Figure 29C</u> : 8-épidiosbulbine G (D12).	56
<u>Figure 30</u> : Sous-structures a , b , c et d déduites du spectre 1H-1H COSY du composé D5 .	59
<u>Figure 31</u> : Antadiosbulbine A . A : Corrélations HMBC permettant d'assembler les sous-structures a-d issues du H-H COSY de D5 ; B : Structure plane du composé D5 .	60
<u>Figure 32</u> : A : Sélection de corrélation NOE observées sur le spectre NOESY de l'antadiosbulbine A (D5) ; B : Structure de l'antadiosbulbine A.	61
<u>Figure 33</u> : Sous-structures a-d identifiées à partir du spectre H-H COSY et assemblage de ces sous-structures par analyse des corrélations observées sur le spectre HMBC pour aboutir à la structure plane proposée pour le composé D6 .	63
<u>Figure 34</u> : Antadiosbulbine B . A : Sélection de corrélations NOE observées sur le spectre NOESY de l'antadiosbulbine B (D6) ; B : Structure de l'antadiosbulbine B.	65
<u>Figure 35</u> : Structures des squelettes labdane et clérodane.	65
<u>Figure 36</u> : Schéma simplifié et hypothétique pour la biosynthèse des diosbulbines E, G ,de l'antadiosbulbine A et de leurs épimères en C-8.	67
<u>Figure 37</u> : Structure du composé D13 : 5,7,4'-trihydroxyflavone-3-O-β-D-glycopyranosyl(6-1)-α-L-rhamnose.	68
<u>Figure 38</u> : Structure du composé D14 : kaempférol.	69
<u>Figure 39</u> : Structure du composé D15 : quercétine.	70
<u>Figure 40</u> : Structure du composé D16 : isorhamnétine.	71
<u>Figure 41</u> : Structure du composé D8 : catéchine.	72
<u>Figure 42</u> : Sous-structures a , b et c déduites du spectre COSY.	73
<u>Figure 43</u> : Structure du composé D1 : 3,7-dihydroxy-2,4-diméthoxyphénanthrène.	74
<u>Figure 44</u> : Sous-structures a , b et c déduites du spectre ¹ H- ¹ H COSY de D3 .	75
<u>Figure 45</u> : Structure de D3 : hydroxy-3-resvératrol ou picéatannol.	76
<u>Figure 46</u> : Sous-structures a , b et c déduites du spectre ¹ H- ¹ H COSY de D2 .	77
<u>Figure 47</u> : Structure de D2 : dihydro-7,8-hydroxy-3-resvératrol ou dihydropicéatannol.	78
<u>Figure 48</u> : Sous-structures a , b , c et d déduites du spectre ¹ H- ¹ H COSY de D10 .	79
<u>Figure 49</u> : Structure du composé D10 : cassigarol D.	80
<u>Figure 50</u> : Sous-structures a-f déduites du spectre ¹ H- ¹ H COSY de D9 .	81
<u>Figure 51</u> : Assemblage des sous-structures a-f à l'aide des corrélations du spectre HMBC de D9 .	82
<u>Figure 52</u> : Structure de D9 ou scirpusine B.	83

<u>Figure 53</u> : Relations biosynthétiques plausibles entre les stilbènes isolés de <i>Dioscorea antaly</i> Jum. & Perr.	84
<u>Figure 54</u> : Coupes histologiques de a) cerveau non traité b) cerveau traité par l'extrait à 5 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 72 h.	91
<u>Figure 55</u> : Coupes histologiques de a) cerveau non traité b) cerveau traité par l'extrait à 1,3g/kg par voie intra-péritonéale après un temps d'exposition de 24 h.	91
<u>Figure 56</u> : Coupes histologiques de a) poumon non traité b) poumon traité par l'extrait à 5 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 72 h.	92
<u>Figure 57</u> : Coupes histologiques de a) poumon non traité b) poumon traité par l'extrait à 5 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 72 h.	92
<u>Figure 58</u> : Coupes histologiques de a) coeur non traité b) coeur traité par l'extrait à 12 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 72 h.	93
<u>Figure 59</u> : Coupes histologiques de a) coeur non traité b) coeur traité par l'extrait à 1,3 g/kg par voie intra péritonéale après un temps d'exposition de 72 h.	93
<u>Figure 60</u> : Coupes histologiques de a) rein non traité b) rein traité par l'extrait à 12 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 72 h.	94
<u>Figure 61</u> : Coupes histologiques de a) rein non traité b) rein traité par l'extrait à 1,3 g/kg par voie intra péritonéale après un temps d'exposition de 24 h.	94
<u>Figure 62</u> : Coupes histologiques de a) estomac non traité b) estomac traité par l'extrait à 12g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 24 h.	95
<u>Figure 63</u> : Coupes histologiques de a) estomac non traité b) estomac traité par l'extrait à 1 g/kg par voie intra-péritonéale après un temps d'exposition de 72 h.	95
<u>Figure 64</u> : Coupes histologiques de a) foie non traité b) foie traité par l'extrait à 12 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 24 h.	96
<u>Figure 65</u> : Coupes histologiques de a) foie non traité b) foie traité par l'extrait à 1,3 g/kg par voie intrapéritonéale après un temps d'exposition de 24 h.	96
<u>Figure 66</u> : Coupes histologiques de a) intestin non traité b) intestin traité par l'extrait à 1,3 g/kg par voie intrapéritonéale après un temps d'exposition de 24 h.	97
<u>Figure 67</u> : Coupes histologiques de a) intestin non traité b) intestin traité par l'extrait à 1,3 g/kg par voie intrapéritonéale après un temps d'exposition de 24 h.	97
<u>Figure 68</u> : Courbes des totaux cumulatifs permettant la détermination de la DL50 (24 h) par la méthode de Reed et Muench (1938).	98
<u>Figure 69</u> : Courbe effet-dose de l'extrait brut aqueux de <i>Dioscorea antaly</i> Jum. & Perr. par administration par voie orale et sa droite de régression linéaire.	99
<u>Figure 70</u> : Courbes des totaux cumulatifs permettant la détermination de la DL50 (24 h) par la méthode de Reed et Muench (1938).	100
<u>Figure 71</u> : Courbe effet-dose de l'extrait brut aqueux de <i>Dioscorea antaly</i> Jum. & Perr. administré par voie intra péritonéale et sa droite de régression linéaire.	100
<u>Figure 72</u> : Courbes montrant 1) les taux de mortalité de <i>Oryzias latipes</i> après exposition à l'extrait brut aqueux de <i>Dioscorea antaly</i> Jum. & Perr. ; 2) l'effet-dose pour les trois jours de test.	103

<u>Figure 73</u> : Vue au microscope optique de coupes transversales de rein et de foie d'embryon de medaka (<i>Oryzia latipes</i>) : a) rein non traité ; b) rein traité par l'extrait brut de <i>D. antaly</i> ; c) .foie non traité ; d) foie traité avec l'extrait brut de <i>D. antaly</i> .	105
<u>Figure 74</u> : Effets de différentes concentrations des extraits par le méthanol (MeOH) et l'acétate d'éthyle (AcOEt) de <i>Dioscorea antaly</i> Jum. & Perr.sur <i>E. coli</i> .	105
<u>Figure 75</u> : Effets de différentes concentrations des extraits MeOH et AcOEt de <i>Dioscorea antaly</i> sur <i>S. aureus</i> .	105
<u>Figure 76</u> : Répartition géographique des Hyacinthaceae.	120
<u>Figure 77</u> : Quelques variétés de bufadiénolides [d'après Steyn et van Heerden, 1998].	123
<u>Figure 78</u> : Structure de l'hellébrine.	124
<u>Figure 79</u> : Structure du scilliroside.	124
<u>Figure 80</u> : Structures moléculaires de (A) : Transvaaline [d'après Kellermann, 1988] ; (B) : scillarène A, scillarénine et proscillaridine [d'après Van Wyk, 2000]	124
<u>Figure 81</u> : Structure de la rubelline	125
<u>Figure 82</u> : Structure de la fugaxine	125
<u>Figure 83</u> : <i>Rhodocodon madagascariensis</i> Baker : a) pied ; b) inflorescence ; c) capsule ouverte ; d) graines ; e) villageois d'Amboasary (Site d'étude)	129
<u>Figure 84</u> : Carte de distribution de <i>Rhodocodon madagascariensis</i>	130
<u>Figure 85</u> : Schéma d'extraction et de purification des composés isolés de bulbes frais de <i>Rhodocodon madagascariensis</i>	136
<u>Figure 86</u> : Structure plane du composé R1 .	86
<u>Figure 87</u> : Structure du composé R1 : scillirosidine.	141
<u>Figure 88</u> : Structure plane du composé R2 .	142
<u>Figure 89</u> : Structure du composé R2 , scilliroside	142
<u>Figure 90</u> : Structure plane du composé R3 .	145
<u>Figure 91</u> : Structure du composé R3 : 3-O-β-glucoside de l'hellébrigénine.	146
<u>Figure 92</u> : Schéma de biosynthèse des bufadiénolides et des cardénolides à partir du squalène.	148
<u>Figure 93</u> : Coupes histologiques de a) cerveau non traité b) cerveau traité par l'extrait à 2,4 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 24 h.	155
<u>Figure 94</u> : Coupes histologiques de a) cerveau non traité b) cerveau traité par l'extrait à 300 mg/kg par voie intra-péritonéale après un temps d'exposition de 24 h.	155
<u>Figure 95</u> : Coupes histologiques de a) poumon non traité b) poumon traité par l'extrait à 2,4g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 7 h.	156
<u>Figure 96</u> : Coupes histologiques de a) poumon non traité b) poumon traité par l'extrait à 2,4g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 7 h.	156
<u>Figure 97</u> : Coupes histologiques de a) coeur non traité b) coeur traité par l'extrait à 1,2 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 48 h.	157
<u>Figure 98</u> : Coupes histologiques de a) coeur non traité b) coeur traité par l'extrait à	157

300 mg/kg par voie intra-péritonéale après un temps d'exposition de 24 h.

Figure 99 : Coupes histologiques de a) **rein** non traité b) **rein** traité par l'extrait à 2,4 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 7 h. 158

Figure 100 : Coupes histologiques de a) **rein** non traité b) **rein** traité par l'extrait à 2,4 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 7 h. 158

Figure 101 : Coupes histologiques de a) **estomac** non traité b) **estomac** traité par l'extrait à 2,4g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 7 h. 159

Figure 102 : Coupes histologiques de a) **estomac** non traité b) **estomac** traité par l'extrait à 300mg/kg par voie intrapéritonéale après un temps d'exposition de 24 h. 159

Figure 103 : Coupes histologiques de a) **foie** non traité b) **foie** traité par l'extrait à 2,4 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 24 h. 160

Figure 104 : Coupes histologiques de a) **foie** non traité b) **foie** traité par l'extrait à 300 mg/kg par voie intrapéritonéale après un temps d'exposition de 24 h 160

Figure 105 : Coupes histologiques de a) **intestin** non traité b) **intestin** traité par l'extrait à 2,4 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 24 h. 161

Figure 106 : Coupes histologiques de a) **intestin** non traité b) **intestin** traité par l'extrait à 300 mg/kg par voie intra-péritonéale après un temps d'exposition de 24 h. 161

Figure 107 : Courbes des totaux cumulatifs permettant la détermination de la DL50 (24 h) par la méthode de Reed et Muench (1938) 162

Figure 108 : Courbe effet-dose de l'extrait brut aqueux de *Rhodocodon madagascariensis* par administration par voie orale et sa droite de régression linéaire. 163

Figure 109 : Courbes des totaux cumulatifs permettant la détermination de la DL50 (24 h) par la méthode de Reed et Muench (1938) 163

Figure 110 : Courbe effet-dose de l'extrait brut de *Rhodocodon madagascariensis* par voie intra péritonéale et sa droite de régression linéaire. 164

Figure 111 : Evolution des stades de développement embryonnaire en présence de différentes concentrations d'extrait de *Rhodocodon madagascariensis*. 167

Figure 113 : Taux de survie de larves de medaka incubés dans des milieux contenant d'extrait de *Rhodocodon madagascariensis* à de différentes concentrations 168

Figure 112 : Comparaison de deux embryons de 6 jours : a) embryon traité se trouvant au stade 23 de son développement, b) embryon témoin se trouvant au stade 36 169

Figure 114 : Courbe montrant l'effet-dose et la mortalité de larves de medaka dus à l'extrait de *Rhodocodon madagascariensis* 169

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau 1</u> : Liste des espèces de <i>Dioscorea</i> présentes à Madagascar et leur origine.	10
<u>Tableau 2</u> : Utilisation des ignames (<i>Dioscorea</i>) par les pygmées Baka du Cameroun d'après Dounias (1996).	11
<u>Tableau 3</u> : Sélection d'indications thérapeutiques des ignames dans le monde d'après Ake Assi (1998).	11
<u>Tableau 4</u> : Utilisation de certaines ignames comme poisons d'après Neuwinger (1996).	13
<u>Tableau 5</u> : Quelques facteurs antinutritionnels des ignames (<i>D. polygonoides</i> , <i>D. alata</i> , <i>D. rotundata</i> , <i>D. cayenensis</i>) de la Jamaïque d'après Mcanuff (2005).	23
<u>Tableau 6</u> : Quantités de substances antinutritionnelles isolées de quatre espèces d'igname d'après UDOESSIEN, 1992.	24
<u>Tableau 7</u> : Composition chimique de quelques espèces du genre <i>Dioscorea</i> présentes à Madagascar d'après Jeannoda et al. (2007).	28
<u>Tableau 8</u> : Production annuelle d'ignames [Données FAOSTAT].	29
<u>Tableau 9</u> : Données de RMN ^{13}C et ^1H pour le composé D11 (8-épi-diosbulbine E).	45
<u>Tableau 10</u> : Correlations observées dans les spectres de RMN 2D pour D11 et D11' .	47
<u>Tableau 11</u> : Données de RMN ^{13}C et ^1H pour les composés D11 (8-épi-diosbulbine E) et son dérivé acétylé D11AC .	49
<u>Tableau 12</u> : Données de RMN ^{13}C et ^1H pour le composé D7 (diosbulbine E).	53
<u>Tableau 13</u> : Données de RMN ^{13}C et ^1H pour le composé D12 (8-épidiosbulbine G).	57
<u>Tableau 14</u> : Données de RMN ^{13}C et ^1H pour le composé D5 (antadiosbulbine A).	60
<u>Tableau 15</u> : Données de RMN ^{13}C et ^1H pour le composé D6 (antadiosbulbine B).	64
<u>Tableau 16</u> : Données de RMN ^{13}C et ^1H pour D13 .	68
<u>Tableau 17</u> : Données de RMN ^{13}C et ^1H pour D14 .	69
<u>Tableau 18</u> : Données de RMN ^{13}C pour la quercétine D15 .	70
<u>Tableau 19</u> : Données de RMN ^{13}C et ^1H pour D16 .	71
<u>Tableau 20</u> : Données de RMN ^{13}C et ^1H du composé D8 .	72
<u>Tableau 21</u> : Données de RMN ^{13}C et ^1H pour D1 .	74
<u>Tableau 22</u> : Données de RMN ^{13}C et ^1H pour les composés D3 et D2 .	76
<u>Tableau 23</u> : Données de RMN ^{13}C et ^1H pour D10 .	80
<u>Tableau 24</u> : Données de RMN ^{13}C et ^1H pour D9 .	83
<u>Tableau 25A</u> : Lésions tissulaires provoquées par l'extrait brut de <i>Dioscorea antaly</i> Jum. & Perr. en fonction de la dose, de la voie d'administration et de la durée d'exposition au niveau du cerveau et du poumon.	87
<u>Tableau 25B</u> : Lésions tissulaires provoquées par l'extrait brut de <i>Dioscorea antaly</i>	88

Jum. & Perr. en fonction de la dose, de la voie d'administration et de la durée d'exposition au niveau du cœur et du rein.

Tableau 25C : Lésions tissulaires provoquées par l'extrait brut de *Dioscorea antaly* 89
Jum. & Perr. en fonction de la dose, de la voie d'administration et de la durée d'exposition au niveau de l'estomac et du foie.

Tableau 25D : Lésions tissulaires provoquées par l'extrait brut de *Dioscorea antaly* 90
Jum. & Perr. en fonction de la dose, de la voie d'administration et de la durée d'exposition au niveau de l'intestin.

Tableau 26 : Calcul des totaux cumulatifs dans la détermination de la DL50 (24 h) de 98
l'extrait brut aqueux de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr., par voie orale, selon la méthode de Reed et Muench (1938).

Tableau 27 : Calcul des totaux cumulatifs dans la détermination de la DL50 (24 h) de 99
l'extrait brut aqueux de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr., par voie intra péritonéale, selon la méthode de Reed et Muench (1938).

Tableau 28 : Effets de l'extrait brut de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. sur différentes 101
espèces animales à sang chaud.

Tableau 29 : Nombre d'individus morts et différents taux de mortalité et de survie 102
durant les trois jours de test.

Tableau 30 : Effets de différents types d'extraits (2 mg/ disque) sur les 106
microorganismes.

Tableau 31 : Effets de différentes concentrations des extraits MeOH et AcOEt de 106
Dioscorea antaly sur *Staphylococcus aureus* et *Escherischia coli*.

Tableau 32 : Effets de quelques produits purs (100 µg/ disque) sur *Staphylococcus 108*
aureus

Tableau 33 : Résultats des tests d'activité anti-mycobactérienne 108

Tableau 34 : Résultats du test anti-inflammatoire 109

Tableau 35 : Résultats des tests d'activité antiplasmodiale *in vitro* 110

Tableau 36 : Résultats des tests d'activité cytotoxique 110

Tableau 37 : Résultats des différentes techniques d'extraction des principes toxiques à 134
partir de bulbes frais

Tableau 38 : Données de RMN ¹³C et ¹H NMR pour **R1**. 140

Tableau 39 : Données de RMN ¹³C et ¹H NMR pour **R2** ou scilliroside 143

Tableau 40 : Données de RMN ¹³C et ¹H NMR pour **R3**, 3-O-β-glucoside de 147
l'hellébrigénine

Tableau 41 : Symptômes d'intoxications observés lors des tests des différents extraits. 149

Tableau 42A : Lésions tissulaires provoquées par l'extrait brut de *Rhodocodon 151*
madagascariensis Baker à 1200 et 170 mg/kg de poids (valeur de la DL₅₀) et à 300 et 2400 mg/kg de poids (valeur de la DL₁₀₀) selon la voie d'administration, la dose et la durée d'exposition au niveau du cerveau et du poumon.

Tableau 42B : Lésions tissulaires provoquées par l'extrait brut de *Rhodocodon 152*

madagascariensis Baker à 1200 et 170 mg/kg de poids (valeur de la DL₅₀) et à 300 et 2400 mg/kg de poids (valeur de la DL₁₀₀) selon la voie d'administration, la dose et la durée d'exposition au niveau du cœur et du rein.

Tableau 42C : Lésions tissulaires provoquées par l'extrait brut de *Rhodocodon madagascariensis* Baker à 1200 et 170 mg/kg de poids (valeur de la DL₅₀) et à 300 et 2400 mg/kg de poids (valeur de la DL₁₀₀) selon la voie d'administration, la dose et la durée d'exposition au niveau de l'estomac et du foie. 153

Tableau 42D : Lésions tissulaires provoquées par l'extrait brut de *Rhodocodon madagascariensis* Baker à 1200 et 170 mg/kg de poids (valeur de la DL₅₀) et à 300 et 2400 mg/kg de poids (valeur de la DL₁₀₀) selon la voie d'administration, la dose et la durée d'exposition au niveau de l'intestin. 154

Tableau 43 : Calcul des totaux cumulatifs dans la détermination de la DL₅₀ (24 h) de l'extrait brut aqueux de *Rhodocodon madagascariensis* Baker, par voie orale, selon la méthode de Reed et Muench (1938). 162

Tableau 44 : Calcul des totaux cumulatifs dans la détermination de la DL₅₀ (24 h) de l'extrait brut aqueux de *Rhodocodon madagascariensis* Baker, par voie intra péritonéale, selon la méthode de Reed et Muench (1938). 163

Tableau 45 : Effets de l'extrait brut de *Rhodocodon madagascariensis* Baker sur différentes espèces animales à sang chaud. 164

Tableau 46 : Données expérimentales sur le test sur des embryons de 6 jours (nombre d'embryons tués sur nombre d'embryons testés). 165

Tableau 47 : Données expérimentales sur le test sur des embryons de 6 jours (nombre d'œufs éclos sur nombre d'œufs testés). 166

Tableau 48 : Les différents stades de développement embryonnaire en fonction des concentrations des milieux en extrait aqueux de *Rhodocodon madagascariensis*. 167

Tableau 49 : Données expérimentales sur les effets de l'extrait aqueux de *Rhodocodon madagascariensis* sur l'éclosion des larves (nombre d'individus vivants sur nombre d'individus testés). 168

Tableau 50 : Données expérimentales sur les effets de l'extrait aqueux de *Rhodocodon madagascariensis* Baker sur les larves (nombre d'individus morts sur nombre d'individus testés). 169

Tableau 51 : Conditions expérimentales des essais sur la confection d'appâts empoisonnés pour la souris et résultats obtenus. 170

Tableau 52 : Fractionnement de l'extrait par l'AcOEt des tubercules de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. 181

Tableau 53 : Fractionnement de l'extrait par le n-BuOH de *Rhodocodon madagascariensis* Baker sur colonne XAD₄. 184

Tableau 54 : Rassemblement des fractions. 184

Tableau 55 : Normes utilisées pour la lecture des résultats par la méthode des disques selon l'IPM. 190

TABLE DES MATIERES

Glossaire	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
INTRODUCTION GENERALE	1
Première partie : Etude de <i>Dioscorea antaly</i> Jum. & Perr.	5
1. INTRODUCTION	5
2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	7
2.1. Généralités sur les Dioscoreaceae	7
2.1.1. Données botaniques	7
2.1.1.1. Description botanique de la famille des Dioscoreaceae	7
2.1.1.2. Présentation du genre <i>Dioscorea</i>	7
2.1.1.3. Répartition géographique	8
2.1.1.4. Les espèces présentes à Madagascar	9
2.2. Données ethnopharmacologiques et ethnobotaniques	9
2.2.1. Utilisations des ignames dans le monde	9
2.2.2. Utilisations des ignames à Madagascar	13
2.3. Travaux phytochimiques et pharmacologiques antérieurs sur le genre <i>Dioscorea</i>	14
2.3.1. Etudes phytochimiques antérieures sur les <i>Dioscorea</i>	14
2.3.2. Les facteurs antinutritionnels	23
2.3.3. Les propriétés et activités pharmacologiques potentielles	24
2.3.3.1. Activités cytotoxiques	24
2.3.3.2. Activité anti-ostéoporotique	25
2.3.3.3. Effets hypoglycémians, traitement de l'hypercholestérolémie et recherche de mesure d'anti-obésité	25
2.3.3.4. Activités anti-oxydantes	26
2.3.3.5. Activité anti-inflammatoire	26
2.3.3.6. Activités immunologiques	26
2.3.3.7. Effet vasorelaxant	26
2.3.3.8. Propriétés antivirales	27
2.3.3.9 Propriétés antimicrobiennes	27
2.4. Intérêts nutritionnel et commercial	27
3. DONNEES SUR <i>Dioscorea antaly</i> Jum. & Perr.	30
3.1. Description botanique	30
3.2. Répartition géographique	32
3.3. Classification	32
4. ENQUETES ETHNOBOTANIQUES	34
5. ETUDE CHIMIQUE	36
5.1. Préparation des tubercules	36
5.2. Etudes phytochimiques préliminaires	36
5.3. Extraction et purification	37
5.3.1. Extraction	37
5.3.1.1. Extraction avec des solvants organiques	37
5.3.1.2. Extraction aqueuse ou décoction	38
5.3.2. Purification	38

5.3.2.1. Purification et isolement des constituants de l'extrait par AcOEt	38
5.3.2.2. Purification et isolement des constituants de l'extrait aqueux	41
5.4. Détermination structurale	42
5.4.1. Structures des composés de la classe des diterpénoïdes	42
5.4.1.1. Structure des composés D11 et D11' : 8-épidiosbulbine E	42
5.4.1.2. Structure du composé D7 : diosbulbine E	50
5.4.1.3. Structure du composé D12 : 8-épidiosbulbine G	54
5.4.1.4. Structure du composé D5 : antadiosbulbine A	57
5.4.1.5. Structure du composé D6 : antadiosbulbine B	62
5.4.2. Structures des composés de la classe des flavonoïdes	68
5.4.2.1. Structure du composé D13	68
5.4.2.2. Structure du composé D14 : kaempférol	69
5.4.2.3. Structure du composé D15 : quercétine	69
5.4.2.4. Structure du composé D16 : isorhamnétine	70
5.4.3. Structure du composé D8 : catéchine	71
5.4.4. Structures des composés de la classe des stilbènes et phénanthrène	72
5.4.4.1. Structure du composé D1 de la classe du phénanthrène	72
5.4.4.2. Structure du composé de la classe des stilbènes	74
5.4.4.2.1. Structure du composé D3 : picéatannol	74
5.4.4.2.2. Structure du composé D2 : dihydropicéatannol	76
5.4.4.2.3. Structure du composé D10 : cassigarol D	78
5.4.4.2.4. Structure du composé D9 : scirpusine B	81
6. ETUDE TOXICOLOGIQUE	85
6.1. Etude de l'activité toxique sur souris	85
6.1.1. Symptômes développés	85
6.1.2. Etude des lésions anatomo-pathologiques	86
6.1.3. Toxicité	98
6.1.3.1. Détermination de la DL50 orale	98
6.1.3.2. Détermination de la DL50 intra péritonéale	99
6.2. Activité sur d'autres espèces à sang chaud	100
6.3. Activité ichtyotoxique	101
6.3.1. Effets des extraits de <i>Dioscorea antaly</i> Jum. & Perr. sur les embryons de médaka, <i>Oryzias latipes</i>	101
6.3.2. Effets de l'extrait de <i>Dioscorea antaly</i> Jum. & Perr. sur les organes des embryons de médaka	104
6.4. Activités antimicrobiennes	105
6.5. Activité antimycobactérienne	108
6.6. Activité anti-inflammatoire	109
6.7. Activité antiplasmodiale <i>in vitro</i>	109
6.8. Activité cytotoxique	110
7. RESUME -DISCUSSION - CONCLUSION	111
Deuxième partie : Etude de <i>Rhodocodon madagascariensis</i> Baker	117
1. INTRODUCTION	117
2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	119
2.1. Généralités sur les Hyacinthaceae	119
2.1.1. Description botanique de la famille des Hyacinthaceae	119
2.1.2. Répartition géographique des Hyacinthaceae	119
2.1.3. Les espèces présentes à Madagascar	120
2.2. Données ethnopharmacologiques et ethnobotaniques	120
2.2.1. Utilisations des Hyacinthaceae dans le monde	120

2.2.2. Utilisations à Madagascar	121
2.2.3. Données sur la toxicité	121
2.3. Travaux phytochimiques et pharmacologiques antérieurs sur les Hyacinthaceae	122
2.3.1. Etudes phytochimiques antérieures	122
2.3.3. Propriétés et activités pharmacologiques / biologiques	126
3. DONNEES SUR <i>Rhodocodon madagascariensis</i> Baker	128
3.1. Description botanique	128
3.2. Répartition géographique	128
3.3. Ecologie	131
3.4. Classification	131
3.5. Utilisations de <i>Rhodocodon madagascariensis</i> Baker	131
4. ENQUETES ETHNOBOTANIQUES	132
5. ETUDE CHIMIQUE	134
5.1. Préparation du matériel d'étude	134
5.2. Extractions	134
5.3. Fractionnement et purification des extraits	135
5.4. Détermination structurale	137
5.4.1. Structure du composé R1 : scillirosidine	137
5.4.2. Structure du composé R2 : scilliroside	141
5.4.3. Structure du composé R3 : 3- <i>O</i> - β -glucoside de l'hellébrigénine	143
6. ETUDE TOXICOLOGIQUE	149
6.1. Activité toxique sur souris	149
6.1.1. Symptômes d'intoxication provoqués par les différents extraits	149
6.1.2. Lésions anatomopathologiques	149
6.1.3. Evaluation de la toxicité	162
6.1.3.1. Détermination de la DL50 orale	162
6.1.3.2. Détermination de la DL50 intra péritonéale	163
6.2. Effets de l'extrait sur d'autres espèces à sang chaud	164
6.3. Activité ichtyotoxique	165
6.3.1. Effets de l'extrait aqueux de <i>Rhodocodon madagascariensis</i> Baker sur les embryons de médaka <i>Oryzias latipes</i>	165
6.3.1.1. Effets sur des embryons de 6 jours	165
6.3.1.2. Effets sur des embryons de 1 jour : stade embryonnaire 17	166
6.3.2. Effets de l'extrait aqueux de <i>Rhodocodon madagascariensis</i> Baker sur les larves de médaka <i>Oryzias latipes</i>	168
6.3.2.1. Effets sur les larves	168
6.3.2.2. Effets sur le développement embryo-larvaire	169
6.4. Préparation d'appâts empoisonnés	170
6.5. Activités antimicrobiennes	171
7. RESUME - DISCUSSION - CONCLUSION	172
Troisième partie : Partie expérimentale	175
1. MATERIELS ET METHODES	175
1.1. Chimie extractive	175
1.2. Chimie analytique et structurale	177
1.2.1. Spectrométrie de masse	177
1.2.2. Activité optique	177
1.2.3. Spectrométrie de RMN	178
2. EXTRACTION, FRACTIONNEMENT ET PURIFICATION	180
2.1. Etude de <i>Dioscorea antaly</i> Jum. & Perr.	180
2.1.1. Extraction	180

2.1.2. Fractionnement de l'extrait par AcOEt	180
2.1.3. Purification des différentes fractions	181
2.2. Etude de <i>Rhodocodon madagascariensis</i> Baker	184
2.2.1. Extraction et fractionnement	184
2.2.2. Purifications des différentes fractions	184
3. TESTS TOXICOLOGIQUES	186
3.1. Activité toxique sur les animaux à sang chaud	186
3.1.1. Activité toxique sur souris	186
3.1.1.1. Evaluation de la toxicité	186
3.1.1.2. Détermination des DL50	186
3.1.2. Activités toxiques sur d'autres espèces	187
3.1.3. Examens anatomopathologiques	187
3.1.3.1. Prélèvement et fixation des organes	187
3.1.3.2. Inclusion	188
3.1.3.2.1. Circulation	188
3.1.3.2.2. Inclusion proprement dite	188
3.1.3.3. Microtomie et étalement des coupes	188
3.1.3.4. Coloration des coupes et montage des lames	189
3.2. Activité ichtyotoxique	189
3.3. Activité anti-microbienne	190
3.4. Activité antimycobactérienne	191
3.5. Activité anti-inflammatoire	192
3.6. Activité antiplasmodiale <i>in vitro</i>	192
3.7. Activité cytotoxique	193
CONCLUSION GENERALE	195
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	197

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Un poison est une substance capable de troubler gravement ou d'interrompre les fonctions vitales d'un organisme auquel elle a été administrée, délibérément ou accidentellement. Les toxines sont des poisons d'origine naturelle, végétale, animale ou microbienne.

L'utilisation des poisons remonte à des temps immémoriaux. Des parchemins datant de 1500 avant Jésus-Christ montraient que les Egyptiens avaient une vaste connaissance empirique des poisons et des plantes médicinales. Des recettes de poison y étaient décrites [Timbrell, 1995 ; Koeman, 1995]. On pense même que la connaissance des poisons est aussi vieille que l'humanité. Des extraits d'organismes toxiques ont été utilisés à des fins diverses qui sont résumées ainsi :

- **Pour se procurer de la nourriture.** Les utilisations d'extraits de plantes toxiques comme poisons de chasse et/ou de pêche sont parmi les plus anciennes. Il ne faut pas oublier que le terme « toxique » vient du Grec « *toxikon* » qui signifie poison de flèche (toxon = arc, flèche). De nombreuses plantes à curare telles que *Chondondendron tomentosum* et *Strychnos toxifera* ont été utilisées comme poisons pour enduire les flèches. Des lianes à roténoïdes, telles que *Derris elliptica*, *Lonchocarpus nicou* et *Tephrosia vogelii* ont été employées en Amazonie, en Asie et en Afrique comme poisons de pêche. A Madagascar, les plantes à propriété ichtyotoxique, connues souvent sous le nom vernaculaire *famamo*, sont nombreuses et fréquemment utilisées.

- **Pour se soigner.** Plusieurs extraits d'organismes toxiques ont été employés pour traiter différentes pathologies :

- le venin de crapaud (sécrétion de la peau) est probablement le premier venin animal utilisé en thérapeutique, connu il y a déjà 3000 ans. Jusqu'à maintenant des poudres de peau sont utilisées en Asie de l'Est et du Sud-Est, comme par exemple à Taiwan, dans le traitement des maladies du cœur et de l'hydropisie ;

- des préparations de venin de crotale étaient employées avec succès dans le traitement de l'épilepsie ;

- des préparations de venin d'abeille ont été utilisées pour traiter les maladies rhumatismales, les douleurs musculaires et articulaires, les arthrites, les névralgies ;

- les propriétés analgésiques de plusieurs venins de serpent ont été employées pour apaiser les douleurs atroces lors des cancers en phase terminale ;
- la digitaline, toxine végétale, est utilisée pour traiter les insuffisances cardiaques.
- **Pour se défendre.** Les flèches empoisonnées servaient également à combattre l'ennemi lors des conflits.
- **Pour rendre la justice ou régler des litiges.** Le recours aux poisons d'épreuve et aux ordalies (*Cerbera venenifera*) était commun.
- **Pour empoisonner.** L'utilisation des toxines à des fins criminelles a marqué la vie politique des civilisations anciennes, romaines et grecques par exemple. L'élimination des opposants par empoisonnement était une pratique courante. Ce type d'homicide se pratique toujours dans plusieurs pays, dont Madagascar.

Si, à travers les âges, certaines utilisations des poisons tendent à disparaître, d'autres persistent et sont encore pratiquées de nos jours, surtout chez les populations qui vivent encore en contact étroit avec la nature et ce, dans les divers continents.

Avec l'évolution des connaissances dans diverses disciplines scientifiques comme la chimie, la physiologie, la médecine et la biochimie, la toxicologie, une science multidisciplinaire, s'est beaucoup développée. Ainsi, les recherches sur les toxines ont connu un regain d'intérêt remarquable. Le nombre d'organismes toxiques étudiés a augmenté, les principes actifs sont connus, et leurs propriétés pharmacologiques ainsi que leurs mécanismes d'action sont pour la plupart élucidés. De nouvelles applications basées sur des connaissances scientifiques sont apparues. A la place des extraits, les molécules actives elles-mêmes sont employées.

En médecine, de nombreuses substances toxiques sont utilisées, l'essentiel étant de respecter les doses utilisées. A titre d'illustration on peut citer quelques exemples parmi les plus connus :

- la morphine, un alcaloïde du groupe des morphinanes et extrait de *Papaver somniferum*, est un antalgique non spécifique utilisé dans la prise en charge de la douleur persistante intense, en particulier les douleurs d'origine cancéreuse [Bruneton, 1999] ;

- le taxol diterpénoïde des ifs ou *Taxus*, et son analogue semi-naturel le taxotère, médicaments anticancéreux puissants par leur action antimitotique sont aussi des substances très toxiques.
- l'atropine, un alcaloïde de type tropanique fréquent chez les Solanaceae, en particulier chez la belladone ou *Atropa belladonna*, la stramoine ou *Datura stramonium* et la jusquiame noire ou *Hyoscyamus niger*, est un antagoniste cholinergique qui agit en se fixant aux récepteurs muscariniques. Elle est également utilisée contre le malaise vagal, comme accélérateur de la fréquence cardiaque en cas de bradycardie et pour diminuer les tremblements chez les parkinsoniens ;
- la toxine botulique, bien connue pour son emploi dans les traitements esthétiques est aussi utilisée pour le traitement du strabisme [Cordonnier *et al.*, 1994].

Sous un angle plus fondamental, des toxines sont devenues des outils pharmacologiques précieux pour élucider divers phénomènes biologiques. Comme l'écrivait Claude Bernard dans « La science expérimentale » publié en 1875 : « *Les poisons peuvent être employés comme agents de destruction de la vie ou comme moyens de guérison des maladies ; mais outre ces deux usages bien connus de tout le monde, il en est un troisième qui intéresse particulièrement le physiologiste. Pour lui, le poison devient un instrument qui dissocie et analyse les phénomènes les plus délicats de la machine vivante, et, en étudiant attentivement le mécanisme de la mort dans les divers empoisonnements, il s'instruit par voie indirecte sur le mécanisme physiologique de la vie...* ».

- Plusieurs toxines ont contribué à l'élucidation de différentes voies métaboliques, dont la réplication de l'ADN, la biosynthèse des protéines (exemple : la ricine, une protéine extraite de *Ricinus communis*), la phosphorylation oxydative (exemple : la roténone, un flavonoïde extrait de diverses espèces de *Derris*), le cycle cellulaire et les voies de signalisation ;
- D'autres ont permis d'explorer les récepteurs et les interactions biologiques importantes ainsi que les fonctions régulatrices de la cellule.
- Le mécanisme d'action de la toxine tétanique a apporté des éclaircissements sur les fonctions fondamentales du système nerveux central [Bizzini, 1976] ;
- Les toxines bactériennes cytolytiques ont servi de sondes pour élucider l'organisation et la fonction des membranes biologiques et pour étudier les facteurs qui contrôlent leur intégrité et leur perméabilité [Alouf, 1976].

En plus de ces nombreuses utilisations des organismes toxiques, plusieurs plantes, malgré leur toxicité avérée, occupent toujours une place non négligeable dans l'alimentation humaine

surtout dans les pays du Sud. Parmi tant d'autres on peut citer les tubercules des ignames *Dioscorea sansibarensis* et de *Dioscorea dumetorum*, les fruits et rhizomes du faux taro *Typhonodorum lindleyanum*, une Araceae.

Il apparaît donc que l'homme, bien que conscient du danger que représentent les toxines, a toujours su tirer profit de leurs propriétés.

La toxicologie moderne compte parmi ses objectifs la recherche et la caractérisation de nouvelles toxines afin de rechercher de nouvelles propriétés pharmacologiques utiles.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi d'étudier deux plantes endémiques de Madagascar qui n'ont pas encore fait l'objet d'études chimiques et toxicologiques. La première est *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. de la famille des Dioscoreaceae, une igname sauvage réputée toxique, mais qui constitue en milieu rural de certaines régions de l'île un appoint alimentaire important, voire incontournable, pendant les périodes de disette. La deuxième est *Rhodocodon madagascariensis* Baker de la famille des Hyacinthaceae, bien connue pour sa forte toxicité et qui est utilisée essentiellement comme raticide sur les Hauts Plateaux malgaches.

Cette thèse comprendra deux parties principales : les travaux personnels relatifs à *Dioscorea antaly* Jum. & Per. et *Rhodocodon madagascariensis* Baker constitueront respectivement la première et la deuxième partie. Chacune de ces parties sera elle-même composée d'une introduction, d'une étude bibliographique botanique, biologique/toxicologique et chimique présentant les travaux antérieurs, d'une partie résultats et discussion, d'une conclusion. Ces deux parties seront suivies d'une partie expérimentale consacrée aux matériels et méthodes utilisés et enfin d'une bibliographie.

Première partie :

Etude de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr.

1 – INTRODUCTION

Un certain nombre de plantes utilisées dans l'alimentation humaine et/ou animale sont toxiques. Si certaines sont consommées occasionnellement, d'autres le sont régulièrement quand elles sont disponibles. C'est le cas par exemple du manioc, une euphorbe (*Manihot esculenta*) ou des tubercules de différentes espèces de *Tacca* (arrowroot de Tahiti), des graines et des rhizomes de *Typhonodorum lindleyanum* (faux taro), de divers champignons et de certaines baies (morelle noire, belladone,...). L'ingestion de ces plantes est parfois associée à des intoxications graves, voire mortelles. Ces accidents sont dus à leur méconnaissance ou à leur confusion avec d'autres plantes, mais plus souvent à la non-maîtrise ou à la mauvaise conduite des techniques pour les détoxiquer.

Pendant les périodes de disette, les populations rurales de certaines régions de Madagascar se rabattent sur les produits de cueillette qui constituent en partie, ou en totalité, leur nourriture. Ces situations difficiles peuvent être cycliques, comme les périodes de « soudure » qui correspondent aux moments où les réserves alimentaires sont minces ou presque épuisées, alors que les récoltes de riz (aliment de base) sont encore à venir. Mais ces périodes peuvent être dues aux cataclysmes naturels comme les cyclones, les inondations ou la sécheresse qui détruisent les cultures vivrières.

Les ignames sont des monocotylédones du genre *Dioscorea*, connues pour leurs tubercules comestibles qui constituent la base de l'alimentation dans plusieurs pays tropicaux [Jeannoda *et al.*, 2003] et elles appartiennent à la famille des Dioscoreaceae.

Les tubercules de certaines espèces de Dioscoreaceae, communément appelées ignames, comptent parmi les plantes toxiques couramment consommées dans les pays du sud. Les populations utilisent des techniques traditionnelles de lavage pour les détoxiquer. A Madagascar, même l'espèce la plus redoutée des *Dioscorea* (*D. sansibarensis*) est consommée après traitement pour la rendre comestible. En effet, cette espèce compte parmi les espèces les plus intéressantes du point de vue nutritionnel et organoleptique.

Dioscorea antaly Jum. & Perr., qui constitue le matériel de la présente étude est une igname réputée toxique et impropre à la consommation. Comme nous l'avons déjà signalé plus haut, cette plante n'a pas encore été étudiée ni sur le plan chimique, ni sur le plan

toxicologique. Par ailleurs, elle est bien connue et relativement abondante dans le Menabe (Centre-Ouest de Madagascar), région où nous avons mené nos enquêtes, ce qui facilite la récolte.

Nos travaux ont été entrepris dans le cadre d'un projet du Fonds d'Appui au Développement de l'Enseignement supérieur (FADES) intitulé « *Appui à la recherche sur les possibilités de valorisation des ignames de Madagascar* », financé par la Banque Mondiale. Nous avons alors pris part aux activités du volet « *Utilisations autres qu'alimentaires des ignames* » dudit projet [Projet FADES, 2005].

Nos travaux sur *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. ont essentiellement consisté à :

- effectuer des enquêtes ethnobotaniques sur le terrain pour rassembler le maximum d'informations sur la plante et ses utilisations ;
- isoler et caractériser les constituants chimiques des tubercules de la plante ;
- évaluer leurs propriétés toxicologiques.

2 – ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1. GENERALITES SUR LES DIOSCOREACEAE

La famille des Dioscoreaceae R. Br., comprend environ 880 espèces localisées principalement dans les régions tropicales, mais parfois dans les régions tempérées et qui sont réparties en 8 genres : *Avetra*, *Borderea*, *Dioscorea*, *Nanarepentia*, *Rajania*, *Stenomeris*, *Tamus* et *Trichopus*. Le genre *Dioscorea* L. est le plus important avec 850 espèces (97 %) [Mabberley, 2002] et le seul représenté à Madagascar avec le genre *Avetra* qui est composé lui, d'une seule espèce.

2.1.1 DONNEES BOTANIKES [Burkill, 1950 ; Projet FADES, 2005]

2.1.1.1 Description botanique de la famille des Dioscoreaceae

Les Dioscoreaceae sont des plantes vivaces, à corne pérenne portant un ou plusieurs tubercules diversement conformés. La tige est annuelle et presque toujours volubile, très rarement dressée. Les feuilles sont souvent alternes, rarement opposées, palminerves, souvent cordées, entières ou plus rarement palmatilobées ou composées palmées. Le pétiole est souvent élargi ou épaissi à la base et embrassant la tige par deux auricules épaisses.

Les plantes sont dioïques (elles produisent des fleurs mâles et des fleurs femelles sur des pieds séparés). Les inflorescences mâles sont en grappes ou en épis simples ou composés, axillaires, isolés ou fasciculés en petit nombre, parfois groupés en panicule au sommet des rameaux. Les fleurs sont petites et de couleur terne et se trouvent à l'aisselle d'une bractée. Les fleurs femelles, trimères, à ovaire infère triloculaire donnent des samares à trois ailes.

Le fruit capsulaire est triptère et trivalve. Les graines sont au nombre de deux par loge. Elles sont comprimées, ailées et albuminées et à embryon très petit.

2.1.1.2. Présentation du genre *Dioscorea*

Le nom *Dioscorea* a été donné par Linné en l'honneur de Pedionos Dioscorides, médecin et botaniste grec de l'époque de Néron (1er siècle ap. J.-C.), qui est l'auteur d'un très important traité sur les plantes « *De materia medica* ». Sa classification est la suivante :

- Règne : Végétal
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Liliopsida
- Sous-classe : Liliidae
- Ordre : Dioscoreales
- Famille : Dioscoreaceae
- Genre : *Dioscorea*

Dans son ouvrage « *Flore de Madagascar et des Comores* », Burkill indique que ce genre dont les caractères sont ceux indiqués pour la famille, est représenté à Madagascar par 32 espèces dont 27 endémiques et 5 introduites, anciennement cultivées, mais actuellement plus ou moins naturalisées [Burkill 1950].

Les espèces malgaches sont à tiges volubiles à gauche et à capsule à géotropisme négatif. Les espèces introduites, par contre, ont des tiges qui s'enroulent dans le sens contraire des aiguilles d'une montre. A la déhiscence, les graines, restent dans la capsule ouverte jusqu'à ce qu'une cause accidentelle, telle que le vent, les disperse et les dissémine.

Chez certaines espèces, à l'aisselle des feuilles se développent des bulbilles pouvant servir à la multiplication de la plante, et qui sont parfois consommables comme dans le cas de *Dioscorea bulbifera*.

Les ignames commencent à se développer au début de la saison des pluies. Les tiges et les feuilles se dessèchent et meurent lors de la saison sèche.

Les tubercules de forme variable, ovoïde à oblongue, parfois aplatie ou en forme de massue allongée, peuvent atteindre 1 m de longueur et leur poids est généralement de 3 à 5 kg, mais peut aller jusqu'à 15 kg. La peau est généralement jaune, mais peut être presque blanche ou plus foncée (de brunâtre à noirâtre). La chair est généralement blanche, parfois jaunâtre. Certaines espèces malgaches ont une chair violette, comme c'est le cas du cultivar *lalaina* de *D. alata*.

2.1.1.3. Répartition géographique

Le genre *Dioscorea* est largement réparti et se trouve principalement dans les régions tropicales (pays chauds et humides) : en Afrique, Asie, Amérique centrale et Amérique du

Sud. Leur origine est très diverse et les différentes espèces s'adaptent à divers écosystèmes [FAO, 1991] :

- *D. trifida* a comme origine l'Amérique tropicale ;
- *D. rotundata*, *D. cayenensis*, *D. bulbifera* et *D. dumetorum* sont originaires de l'Afrique de l'Ouest ;
- *D. alata*, *D. esculenta* et *D. opposita* proviennent d'Asie ;
- *D. opposita* et *D. japonica* viennent de Chine et du Japon.

2.1.1.4. Les espèces présentes à Madagascar

A Madagascar, depuis 1950, les espèces d'igname n'avaient pas fait l'objet de recherche exhaustive. A l'époque, 32 espèces avaient été inventoriées, dont 27 endémiques (*tableau 1*). Récemment, une collaboration entre des équipes de chercheurs malgaches et étrangers a permis de recenser au moins 40 espèces du genre *Dioscorea* dont certaines restent à décrire [Jeannoda *et al.*, 2003].

Dans la Grande Ile, les ignames poussent dans les forêts, dans les lisières forestières, dans les jachères, les lieux de culture sur brûlis et dans les champs [Projet FADES, 2005]. Le littoral occidental est une zone riche en ignames sauvages endémiques. Elles sont abondantes dans les forêts denses sèches sur le sable, souvent en lisière ou encore sur les terrains alluvionnaires (*baiboho*), ou sur les lieux de culture après défrichement (*hatsaka*), ou encore sur les recrus forestiers [Jeannoda *et al.*, 2003].

2.2. DONNEES ETHNOPHARMACOLOGIQUES ET ETHNOBOTANQUES

2.2.1. UTILISATIONS DES IGNAMES DANS LE MONDE

Plusieurs utilisations ont été décrites pour les ignames de par le monde :

- Sur le plan ethnopharmacologique, les ignames ont été longtemps utilisées dans la médecine traditionnelle, notamment chinoise, pour soigner les gastropathies et les rhumatismes [Dong *et al.*, 2001] ainsi que les maladies de l'appareil urinaire [Liu *et al.*, 2003]. Elles sont utilisées contre la lèpre au Bangladesh [Murray *et al.*, 1984] et en Afrique chez le peuple Zulu [Mulholland *et al.*, 2002].
- D'après Dounias (1996), les pygmées Baka du Cameroun représentent l'une des populations utilisant les ignames en ethnomédecine, mais aussi pour d'autres usages tels

la préparation de poisons de chasse. Certaines espèces font également l'objet d'interdits.

Ces utilisations sont consignées dans le tableau 2.

Tableau 1 : Liste des espèces de *Dioscorea* présentes à Madagascar et leur origine
[Source :http :// eflora].

Espèces	Noms vernaculaires	Origine
<i>D. alata</i>	revoroke, bemako, ovitaty, mavondro, ovilava, ovifoahy, ovifantaka, oviharina, ovimboay	M, C, A, NC
<i>D. minutiflora</i>	ovihazo, oviazio	M, C, A
<i>D. quartiniana</i>	-	M, C, A
<i>D. esculenta</i>	mavondro	M, C
<i>D. maciba</i>	masiba, malita, mality, ovio, ovy	M, C
<i>D. acuminata</i>	ovy	M
<i>D. alatipes</i>	oviala	M
<i>D. analalavensis</i>	voamanga ala, sosa, soso	M
<i>D. antaly</i>	tshina, antademena, antaly, papa, ataly, ovirombe, reoreo, antadena, antandina, antandy, fangahanga	M
<i>D. arcuatineris</i>	ovifaitra, mareka, ovifotsy, ovimarika	M
<i>D. bemandry</i>	bemandry, soso, babo	M
<i>D. bemarivensis</i>	elakelaka, trengitrengy, ovikambary, ovitsimanandena	M
<i>D. bosseri</i>	elakelaky	M
<i>D. decaryana</i>	oviala	M
<i>D. fandra</i>	fandra, sandry, fangitsy, andra, anjiky, kenjika, kenzika, kianjiky, ndra	M
<i>D. heteropoda</i> = <i>D. tricantha</i>	bako, keliloha, bemandry, baboha, angile, beboha, sosa, soso	M
<i>D. hexagona</i>	kitaotao, kitaratara, kitaratasy, kitsaotsao, ovitsangana	M
<i>D. hombrika</i>	ataza, kato	M
<i>D. karatana</i>	karatana	M
<i>D. madecassa</i>	voamanga ala	M
<i>D. mamillata</i>	voamanga ala	M
<i>D. nako</i>	nako, bako, babona	M
<i>D. namorokensis</i>	-	M
<i>D. ovinala</i>	angily, bemalandy, angaroka, ovinala, sosa, angaroky	M
<i>D. perpilosa</i>	voamanga ala	M
<i>D. proteiformis</i>	voamanga ala	M
<i>D. sambiranensis</i>	angona, babanga, oviala	M
<i>D. sansibarensis</i>	lepapa, fanfanga, fangahanga, angitrika, hofika, hofimamy, haranana, makabiha, ndranara, angitriky	M
<i>D. seriflora</i>	ovifotsy, banabana, ovilava, ovisofina	M
<i>D. soso</i>	soso, babo, bemandry, sosa, kianjiky	M
<i>D. sterilis</i>	bako, ovy, oviala	M
<i>D. tanalarum</i>	ovimpasika	M
<i>D. tsaratananensis</i>	ovihotro, ovisofina	M

M : Madagascar ; C : Comores ; A : Afrique ; NC : Nouveau Continent (Amérique)

Tableau 2 : Utilisations des ignames (*Dioscorea*) par les pygmées Baka du Cameroun d'après Dounias (1996).

Espèces	Pharmacopée	Interdit	Poison de chasse
<i>D. bulbifera</i>	Abcès (emplâtre avec bulbilles) Morsures de serpents (emplâtre avec bulbilles)		Chasse à l'arbalète (bulbille)
<i>D. dumetorum</i>	Anesthésique local (décocté de tubercule)		Chasse à l'arbalète (tubercule et bulbille)
<i>D. preussii</i>			Chasse à l'arbalète (tubercule)
<i>D. sansibarensis</i>	Hernie (purgé avec décocté de tubercule) Stérilité (repas incluant tubercule cuit)		Chasse à l'arbalète (tubercule et bulbille)
<i>D. sempefflorens</i>		Réussite jeune chasseur (consommation interdite)	
<i>D. praehensilis</i>	Goitre (incisions, cendres de tubercule) Ocytocique (purgé, décocté de tubercule) Maux de ventre (voie orale, décocté de tubercule)		
<i>D. mangelotiana</i>		Chasseur d'éléphant (transport de tubercule interdit) Célibataire (consommation interdite) Objet rituel	
<i>D. burkilliana</i>	Ocytocique (cendres et tubercules)	Femme enceinte (consommation interdite)	
<i>D. smilacifolia</i>	Fixations des gens, séduction (fibres + incantations magiques)	Femme allaitante et épouse (consommation interdite) Réussite chasseur d'éléphant (consommation interdite)	

Différentes espèces ont également fait l'objet de quelques indications thérapeutiques pour différents usages, en particulier en Afrique et à Madagascar [Ake Assi, 1998]. Le **tableau 3** résume ces indications.

Tableau 3 : Sélection d'indications thérapeutiques des ignames dans le monde d'après Ake Assi (1998).

Indications	Espèces	Mode d'utilisation
Piqûres d'insectes et morsures de serpent	<i>D. alata</i> (Côte d'Ivoire)	Pâte de feuilles fraîches (application locale)
	<i>D. cayenensis</i> (Antilles)	Décocté de feuilles fraîches (application locale)
	<i>D. multiflora</i> (Côte d'Ivoire)	Poudre de tubercule mélangée avec du piment (application locale)
Douleurs	<i>D. dumetorum</i> (Afrique Orientale)	Tubercule (application locale)
	<i>D. smilacifolia</i> (Gabon)	Fragment de tige macéré dans l'eau (sous forme de lavement pour la douleur pelvienne)
	<i>D. cayenensis</i> (Antilles)	Tubercules bouillis et réduits en purée (application locale)
	<i>D. alata</i> (Afrique centrale)	Feuilles fraîches (application locale)
Impuissance sexuelle	<i>D. bulbifera</i> (Guinée)	Bourgeons végétatifs (à ingérer)
Parasitose : - mycose cutanée - schistosomiase	<i>D. bulbifera</i> (Sénégal)	Pommade de bulbilles mélangée avec de l'huile de palme (application locale)
	<i>D. dumetorum</i> (Tanzanie)	Tubercules (à ingérer)
Epilepsie	<i>D. sansibarensis</i> (Tanzanie)	Décocté de racines (à ingérer)
	<i>D. smilacifolia</i> (Côte d'Ivoire)	Extrait de 3 feuilles en friction sur les tempes du malade
Hémorroïde	<i>Dioscorea alata</i> (Côte d'Ivoire)	Pâte de feuilles et de racines (application locale)
Abcès	<i>D. bulbifera</i> (Madagascar)	Pâte de bulbilles (application locale)
Ulcère	<i>D. alata</i> (Inde)	Poudre de tubercule (à ingérer)
	<i>D. ovala</i> (Madagascar)	Tubercules crus (à ingérer avant le repas)
	<i>D. alata</i> (Madagascar)	
Vermifuge	<i>D. seriflora</i> (Madagascar)	Tubercules cuits (à ingérer)
Brûlure	<i>D. alata</i> (Madagascar)	Pâte de tubercules (application locale)

Selon Coursey (1967), une remarquable relation plante-homme existe entre l'homme et les ignames. Ce volet éco-anthropologique concerne aussi bien l'alimentation, la pratique quotidienne par leur utilisation comme poison de chasse et de pêche, mais aussi dans certains rituels.

Les ignames sauvages sont surtout connues comme aliment de « soudure » pour faire face aux disettes. Celles cultivées constituent dans de nombreux pays tropicaux des aliments quotidiens.

Parmi ces ignames sauvages se rencontrent des ignames toxiques et dont le processus de détoxication est fondé sur le lessivage à l'eau. Les tubercules lessivés peuvent être consommés crus comme cuits, préalablement découpés, pilés et macérés. Le lessivage se fait soit directement dans l'eau d'un ruisseau soit dans un récipient en utilisant de l'eau froide ou chaude et éventuellement salée. Tout ceci dans le but d'extraire les constituants hydrosolubles supposés responsables de la toxicité : telle la dioscorine isolée de *D. hispida* et la dihydrodioscorine de *D. dumetorum*. Leur ingestion peut provoquer des symptômes sévères et pénibles.

L'igname comestible cultivée, à l'état mature, ne renferme pas, en principe, de produits toxiques. L'accumulation de principes amers, par contre, dans les tubercules immatures de certaines espèces (*D. rotundata*, *D. cayenensis* et les formes sauvages de *D. dumetorum*) a été décrite. Ces principes amers sont supposés être des polyphénols ou des dérivés de tanins [<http://www.food-info.net/fr/products/rt/intro.htm>].

Ainsi, comme indiqué dans le tableau 4, certaines ignames constituent des sources importantes de poisons, utilisées quotidiennement, pour des raisons variées telles que la chasse, la pêche ou comme poison d'épreuve [Neuwinger, 1996].

Tableau 4 : Utilisations de certaines ignames comme poisons d'après Neuwinger (1996).

Utilisations	Espèces	Parties utilisées
Poison de flèche	<i>D. dumetorum</i> (Afrique de l'Est) <i>D. bulbifera</i> (Afrique de l'Ouest et Centrale) <i>D. sansibarensis</i> (Kenya)	Racine de tubercule (à enduire) Décocté de bulbilles et de tubercules (à enduire) Racine de tubercules et bulbilles (à enduire)
Ingrédient pour les poisons de chasse	<i>D. quartiniana</i> (Kenya) <i>D. sansibarensis</i> (Kenya) <i>D. smilacifolia</i> (Cameroun)	Racines de tubercules et tubercules (broyat mélangé avec d'autres poisons)
Poison de pêche	<i>D. bulbifera</i> (Afrique de l'Ouest et Centrale) <i>D. sansibarensis</i> (Afrique de l'Ouest et Centrale)	Tubercules (broyat dans l'étang ou rivière)
Appât pour tuer les bêtes et les oiseaux	<i>D. bulbifera</i> (Afrique de l'Ouest) <i>D. dumetorum</i> (Nigéria) <i>D. sansibarensis</i> (Kenya)	Racines de tubercules (données à manger) Racines de tubercules (données à manger) Poudre de tubercules et de bulbilles mélangée avec celle du manioc (donnée à manger)
Homicide	<i>D. bulbifera</i> (Egypte) <i>D. dumetorum</i> (Côte d'Ivoire et Congo) <i>D. sansibarensis</i> (Tanzanie)	Tubercules et bulbilles (donnés à manger) Racines de tubercules et jus de tubercules (donnés à ingérer) Jus de tubercules et de bulbilles (donnés à boire)
Poison d'épreuve	<i>D. sansibarensis</i> (Madagascar)	Tubercules (donnés à ingérer)

2.2.2. UTILISATIONS DES IGNAMES A MADAGASCAR

Les ignames sont nommées en malgache *oviala* avec pour étymologie *ala* qui signifie forêt et *ovy* qui signifie pomme de terre. Cette dernière racine est à rapprocher de « uwi » et « ubi » qui désignent en Indonésien, deux espèces asiatiques : *D. alata* et *D. esculenta*. Les ignames sont importantes pour la population malgache, notamment pour les populations rurales et celles vivant dans les forêts, car elles leur procurent un aliment, surtout pendant les périodes difficiles.

Sur le plan ethnobotanique, bien que mal connues de l'ensemble des malgaches, les ignames sont bien connues des populations de certaines régions de l'Ile (populations locales des zones d'intervention du projet : Morondava, Brickaville, Ambohimahaso). Une importante relation ignames-hommes existe et certaines espèces ont été adoptées et cultivées à des fins alimentaires. Ainsi, deux espèces tiennent une place importante à cette fin, il s'agit de *D. alata* et de *D. esculenta*. Deux espèces sauvages, *D. soso* et *D. fandra*, ont la particularité d'être consommées crues, et servent également pour se désaltérer en forêt. D'autres espèces, en revanche, sont consommées après cuisson ou simplement bouillies, comme c'est le cas de *D. maciba* [Kew, Wilkin, <http://www.kew.org/scihort/madagascar/projects/yams/Yams.html> ; Projet FADES, 2005]. Certaines ignames nécessitent, avant d'être consommées, une préparation particulière pour leur ôter toxicité et amertume.

L'histoire des ignames à Madagascar remonte à l'arrivée des premiers malgaches sur l'Ile qui, soit collectaient directement les espèces sauvages dans la nature soit les cultivaient.

Ces ignames sont d'ailleurs qualifiées de « plantes des ancêtres » dans le Menabe (partie Ouest de l'Ile). Elles entrent également dans les pratiques traditionnelles et utilisées comme *alasakana* dans la région du Betsileo (région des hautes terres, partie centrale de l'Ile) : c'est le cas de *D. alata* (cultivar *ovy soroka*). La pratique *alasakana* consiste à traiter les adolescents lors des crises de puberté et les vieillards pour celles de sénilité. Enfin, l'espèce *D. sansibarensis*, connue pour sa forte toxicité, est utilisée pour combattre les ravageurs des cultures, tels les rats et corbeaux [Projet FADES, 2005] et aussi comme poison de pêche [Neuwinger, 2004].

Les ignames sont également utilisées dans la médecine traditionnelle malgache, même si leur place n'est pas aussi importante que dans les autres pays africains et asiatiques. Les bulbilles de *D. bulbifera* var. *anthropophagorum* ont été longtemps utilisées pour soigner les furoncles et les brûlures. D'autres espèces, telles *D. soso* ; *D. trichanta* ; *D. seriflora* ; *D. ovinata* et *D. alata* (cultivar *ovy soroka*) sont utilisées pour soigner les maux d'estomac. Certaines espèces, comme *D. alata* (cultivars *ovy lalaina*, *ovy masoandrovololo*, *ovibe*) ainsi que *D. seriflora* sont utilisées pour soigner les brûlures [Projet FADES, 2005].

2.3. TRAVAUX PHYTOCHIMIQUES ET PHARMACOLOGIQUES ANTERIEURS **SUR LE GENRE *Dioscorea***

2.3 1. ETUDES PHYTOCHIMIQUES ANTERIEURS SUR LES *Dioscorea*

Depuis le début du 20ème siècle de nombreuses études phytochimiques ont été consacrées aux *Dioscorea*, en particulier aux constituants des tubercules de *D. bulbifera*. De façon générale, les substances qui ont été isolées des *Dioscorea* se répartissent principalement en quatre classes qui seront examinées successivement : les saponosides nommés parfois saponines, les diterpénoïdes, les dérivés du stilbène ou du phénanthrène, et les alcaloïdes.

En outre, la découverte en 1943, par le chimiste américain Russell Marker, de la diosgénine précurseur pour la production d'une hormone femelle, la progestérone, dans la fabrication des contraceptifs, a stimulé les recherches phytochimiques sur les *Dioscorea* [Laveaga, 2005].

2.3.1.1. Les saponosides

Les saponosides (ou saponines) d'origine végétale forment un groupe important de glycosides de triterpènes ou de stéroïdes, qui possèdent une large gamme d'activités biologiques ou pharmacologiques et dont le nom vient de leur action tensioactive. Ils sont présents dans de nombreuses espèces de plantes. Leur présence dans des extraits végétaux est mise en évidence par leur activité hémolytique et leur capacité à former des mousses stables.

A partir du genre *Dioscorea*, il en a été identifié un grand nombre et ainsi dans la période 2000-2006, plus de 50 saponosides ont été découverts et caractérisés à partir des 13 espèces étudiées [Sautour, 2007].

Pour les saponosides des *Dioscorea*, le groupe oligosaccharide est généralement lié à la position C-3 de l'aglycone et il est composé d'une partie glucopyranosyle qui n'est substituée que sur les positions -2, -3, et -4, soit par des unités glucopyranosyles, soit par des unités rhamnopyranosyles.

Deux types d'aglycones ou génines stéroïdiques se rencontrent principalement dans la famille des Dioscoreaceae : ce sont les génines pentacycliques de type furostane et les génines hexacycliques de type spirostane et qui résultent eux de l'engagement de l'hydroxyle en C-26 dans une liaison osidique [Sautour, 2006]. La plupart des aglycones possèdent un squelette de type furostane et diffèrent entre elles par la nature et la configuration des substituants. La configuration du carbone C-25 est généralement (R), rarement (S).

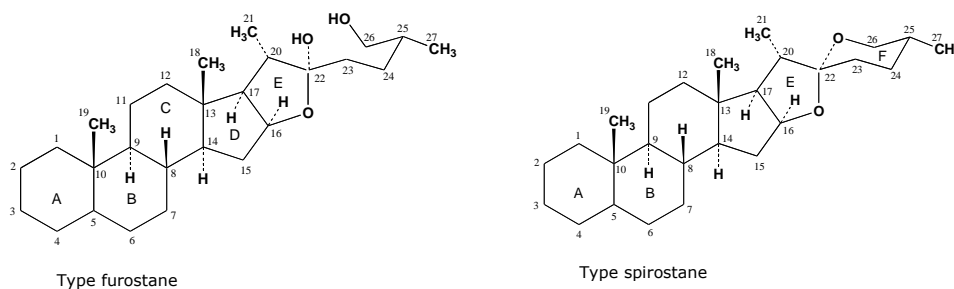


Figure 1 : Les deux types de squelette d'aglycones.

La structure des saponosides de type spirostane est dérivée de celle de la diosgénine. Cette génine stéroïdique tient la première place, car elle est très utilisée dans l'industrie pharmaceutique comme source de synthons pour la synthèse d'hormones stéroïdes. Elle a été isolée principalement à partir de racines d'ignames sauvages *D. villosa* et *D. balcanica*

[Savikin-Fodulovic *et al.*, 1998]. Elle est ainsi un précurseur dans la synthèse de la progestérone et cette espèce est utilisée pour minimiser les symptômes de pré-ménopause [Benghuzzi, 2003].

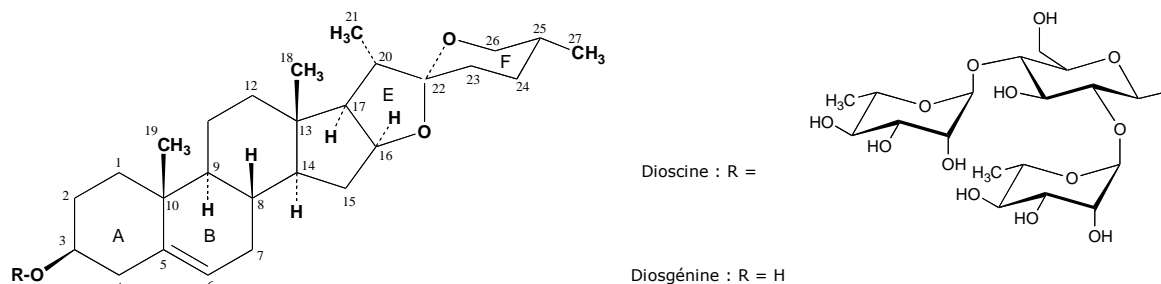


Figure 2 : Structure de la dioscine et de la diosgénine.

La dioscine est un hétéroside de la diosgénine comprenant deux unités de rhamnose liées à un glucose, elle-même liée à la position 3 de la génine. Elle est capable d'induire la cytotoxicité et l'apoptose dans les cellules de la leucémie myéloblastique humaine HL-60 [Liu *et al.*, 2004].

A partir de *D. nipponica*, la dioscine et différents saponosides stéroïdiques de type furostane tels la protodioscine, comportant en plus un groupe glucose lié à la position 26, la *O*-méthyl-22-protodioscine et la pseudoprotodioscine produit de déshydratation de l'hydroxyle en 22 de la protodioscine, ont été caractérisés, principalement par des études en spectrométrie de masse [Tewtrakul et Itharat, 2007a].

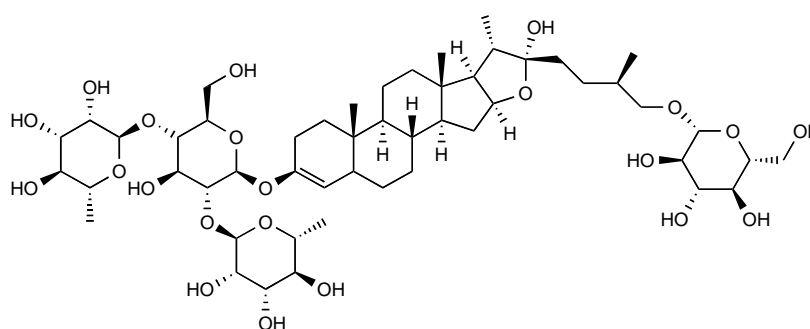


Figure 3 : Structure de la protodioscine.

A partir de *D. collettii* var. *hypoglauca*, une plante médicinale chinoise, ont été isolés divers saponosides de type furostane, dont la diversité structurale est produite par des oxydations variées, telle l'hypoglaucine F, où l'oxygène en -3 est ici encore lié à un groupe rhamnopyranosyl(1->2)rhamnopyranosyl(1->2)-glucopyranoside(1->4) et celui en -22 à un

glucopyranoside, mais où le groupe en -27 n'est pas un méthyle, mais un -CH₂OH. Son analogue l'hypoglaurine G où le groupe en -27 est un méthyle, mais où le cycle E (tétrahydrofurane) a subi une coupure oxydante, est cytotoxique *in vitro* vis-à-vis des cellules tumorales humaines.

D. panthaica renferme des saponosides stéroïdiques, les dioscorésides A et B qui possèdent un squelette furostanol différent suite à une ouverture oxydante du cycle E et leur cytotoxicité sur différents types de cellules a été établie.

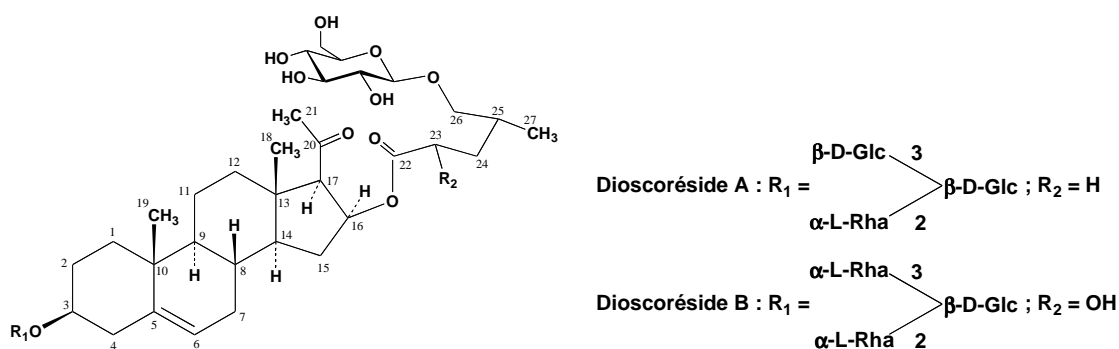


Figure 4 : Structure des dioscorésides A et B.

Une série de saponosides de type spirostane a été caractérisée dans les tubercules de *D. polygonoides*, une plante médicinale du Mexique et du Brésil, ainsi que dans ceux de *D. septemloba*, ce sont les dioseptemlosides A–H avec comme exemples types les dioseptemlosides E et G. Ils n'ont pas présenté d'activité cytotoxique sur les cellules tumorales à la concentration de 10 μ M [Liu et al., 2008].

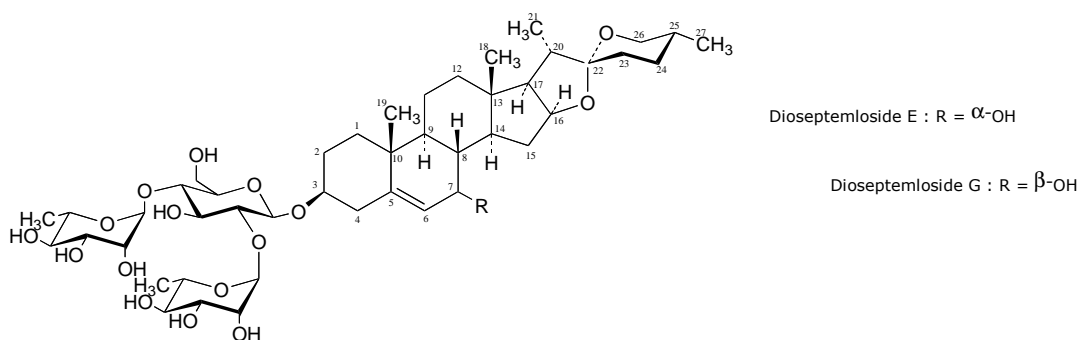


Figure 5 : Structures des dioseptemlosides E et G.

De façon intéressante, Yang et Lin ont montré, au cours d'une étude sur les saponosides de *D. pseudojaponica*, que sous l'effet des conditions de stockage et de séchage des tubercules, les saponosides de type furostanol pouvaient être transformés en saponosides

de type spirostane. Ainsi au cours du séchage, les effets de la température et de la lumière sont peu importants pour la stabilité des saponosides, alors que les glucosidases endogènes jouent un rôle essentiel pour l'altération de la structure des saponosides. Sur un modèle expérimental, ils ont montré que la 26-O- β -glucosidase était capable d'enlever le glucose en position -26 d'un saponoside de type furostane et de le transformer en un saponoside de type spirostane [Yang et Liu, 2008].

Par ailleurs, à partir des tubercules de *D. zingiberensis*, différents champignons endophytes (*Fusarium*, *Acremonium*, *Penicillium*...) ont été caractérisés et il a été montré que la production de diosgénine par une culture de cellules de cette plante était stimulée par la présence de ces champignons dans les cultures [Zhang *et al.*, 2008].

Les nombreuses études sur les activités pharmacologiques des saponosides des *Dioscorea* ont montré une panoplie d'activités biologiques variées telles les activités cytotoxique, immunomodulatrice, antimicrobienne, anabolisante, hormonale, anti-ostéoporotique, anti-inflammatoire et anti-allergique. Une mise au point sur ces activités a été publiée récemment [Sautour *et al.*, 2007]. De façon intéressante, il n'a pas été signalé de saponoside chez *D. bulbifera*.

2.3.1.2. Les alcaloïdes

Quelques rares alcaloïdes ont été isolés de divers *Dioscorea*. Il s'agit de :

- la dumétorine, cet alcaloïde a été obtenu de *D. dumetorum* Pax [Amarasekara et Hassner, 1987].

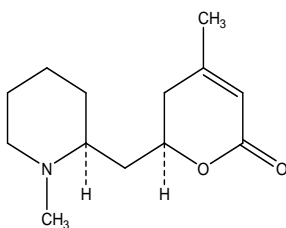


Figure 6 : Structure de la dumétorine.

- la dioscorine est un alcaloïde de type quinocludinique qui a été isolé de nombreuses espèces de *Dioscorea*, tels *D. dumetorum* et *D. bulbifera*. Accompagnée de la dihydrodioscorine, elle a été isolée de *D. hispida* Dennst et il a été montré des activités convulsivantes pour ces deux alcaloïdes [Corley et Tempesta, 1985].

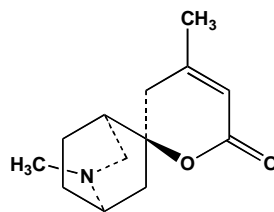


Figure 7 : Structure de la dioscorine.

- la crinamine est un alcaloïde de type isoquinoléine qui a d'abord été obtenu à partir des Amaryllidaceae du genre *Crinum* où il est fréquent et caractéristique, mais a été également isolé de façon inattendue à partir des tubercules de *D. dregeana* [Mulholland et al., 2002]

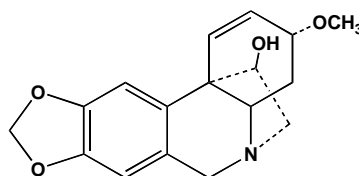


Figure 8 : Structure de la crinamine

2.3.1.3. Les diterpénoïdes

A partir des tubercules de *Dioscorea bulbifera* var. *spontanea*, a été isolée depuis 1970 une série de diterpènes originaux possédant le squelette nor-clérodane très oxydé et fonctionnalisé. Ces composés présentent un goût amer et sont responsables de l'amertume des plantes qui les produisent. Pour toutes les diosbulbines la jonction des cycles **a** et **b** est *trans*. Pour les diosbulbines A, B et C le cycle **c** est de type tétrahydrofurane et le groupe furane substituant en -12 est en α [Kawasaki *et al.*, 1968 ; Komori *et al.*, 1973].

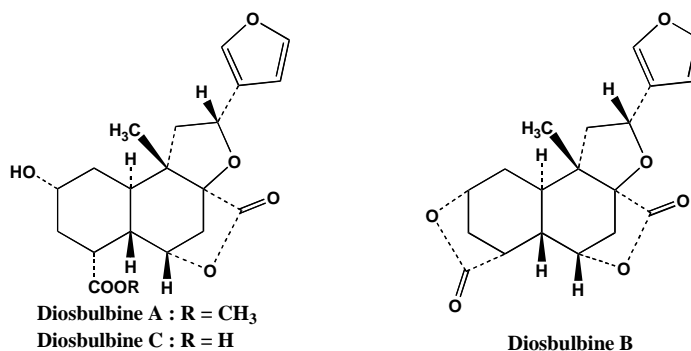


Figure 9 : Structures des diosbulbines A, B et C.

Pour les diosbulbines D-G, l'hétérocycle à 6 carbones est une pyranone et le groupe furane en -12 est β . La variété des structures résulte principalement de la formation selon des modes variés de butyrolactones. La détermination des structures dans cette série repose pour une part importante sur des analyses cristallographiques. Ainsi, la configuration absolue de la diosbulbine A, a été établie par l'analyse cristallographique de son dérivé 3-bromo-2oxo-tétrahydrodiosbulbine A. La structure de la diosbulbine G résulte également d'une analyse cristallographique [Ida *et al.*, 1978a ; 1978b].

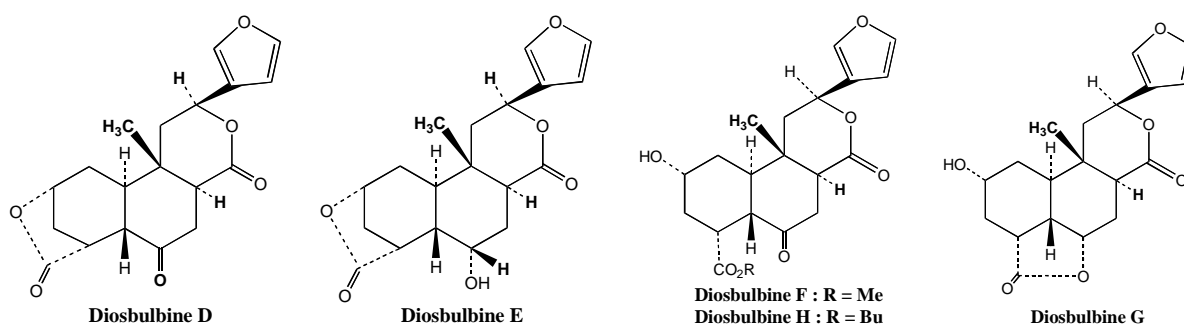


Figure 10 : Structure des diosbulbines D-H.

A partir de l'extrait MeOH/eau de tubercules de *D. bulbifera* a été isolé l'acétate de la 8-épidiosbulbine E qui a montré une action antibiotique intéressante sur des souches de bactéries résistantes [Shriram *et al.*, 2008].

Enfin, deux glucosides ont été caractérisés, les diosbulbinosides D et F : un glucose est lié à la position -6 des diosbulbines D et F [Ida *et al.*, 1978c].

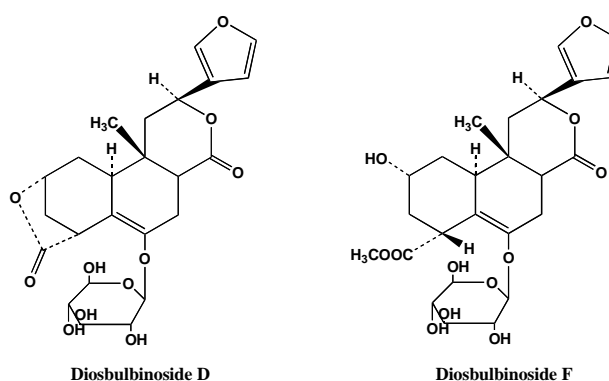


Figure 11 : Structures des diosbulbinoside D et F.

Isolées plus récemment, les bafoudiosbulbines A-B, C-E et -F sont des diterpènes de type nor-clérodane, isolés de *D. bulbifera* var *sativa* et présentant des activités

antibactériennes contre les salmonelles. La structure des bafoudiosbulbines A, F et G a été résolue par cristallographie et spectrométrie [Teponno *et al.*, 2006 ; 2007a ; 2007b ; 2008].

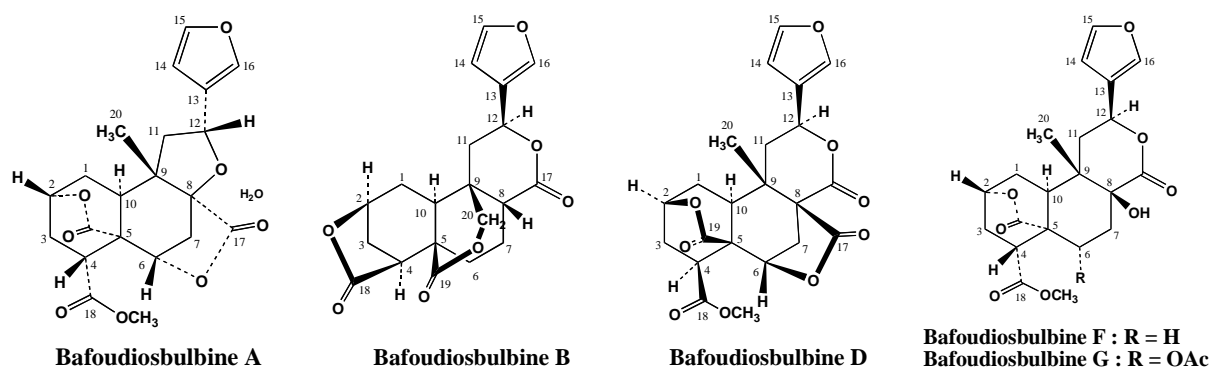


Figure 12 : Structure des bafoudiosbulbines A, B, D, F et G.

Toutes ces structures sont caractérisées par la présence de plusieurs ponts esters et la présence d'un groupe furanne, lié à la position -12 du squelette diterpénique.

2.3.1.4. Les phénanthrènes et stilbènes

Les phénanthrènes forment un groupe relativement restreint de composés naturels aromatiques qui sont vraisemblablement formés par couplage oxydatif des cycles aromatiques de précurseurs de type stilbène. C'est pour cette raison qu'ils seront présentés ensemble. Toutefois, certains phénanthrènes sont issus de l'aromatisation de précurseurs diterpéniques. La plupart des phénanthrènes ont été isolés de plantes supérieures de la famille des Orchidaceae, mais un certain nombre ont été obtenus chez les Betulaceae, les Combretaceae et les Dioscoreaceae [Kovacs *et al.* ; 2008 ; Leong *et al.*, 1997 ; Majmuder *et al.*, 2001].

Une série de dihydrostilbènes a été isolée des tubercules de différents *Dioscorea*, uniquement lorsqu'ils étaient infectés par le champignon *Botrydiplodia*, et certains de ces composés qui ont montré une activité antifongique contre une série de moisissures (*Penicillium*, *Aspergillus*) et antibactérienne contre *S. aureus* et *E. coli*, sont considérés comme des phytoalexines induites par le champignon. Ainsi, la dihydropinosylvine a été isolée de *D. batatas*, *D. rotundata* et *D. magenotiana* et le dihydroresvératrol de *D. bulbifera* et *D. dumentorum*. Les batatasines III et IV et leurs dérivés déméthylés l'ont été de *D. rotundata* et *D. alata* [Fagboun *et al.*, 1987 ; Takasugi *et al.*, 1987 ; Adesanya *et al.*, 1989 ; Cline *et al.*, 1989]. Enfin, le 4,2'-dihydroxy-3,5-diméthoxydihydrostilbène des tubercules de *D. magenotiana* infectés par *Botrydiplodia theobromae*, pathogène des ignames [Kaganda et Adesanya, 1990].

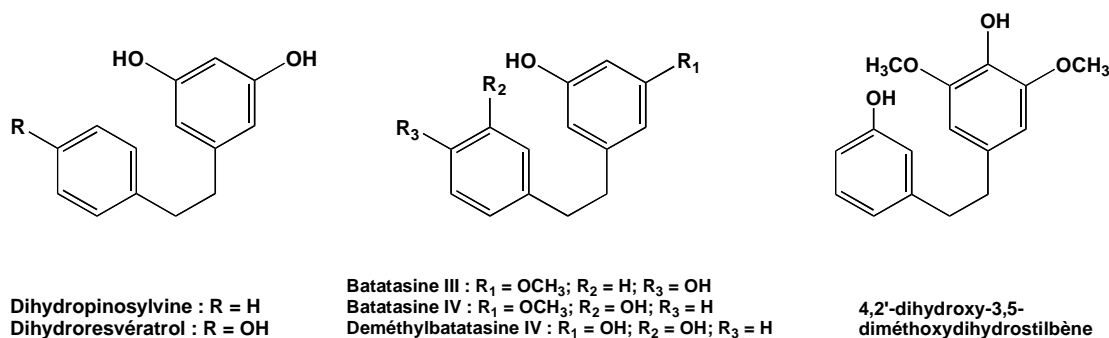
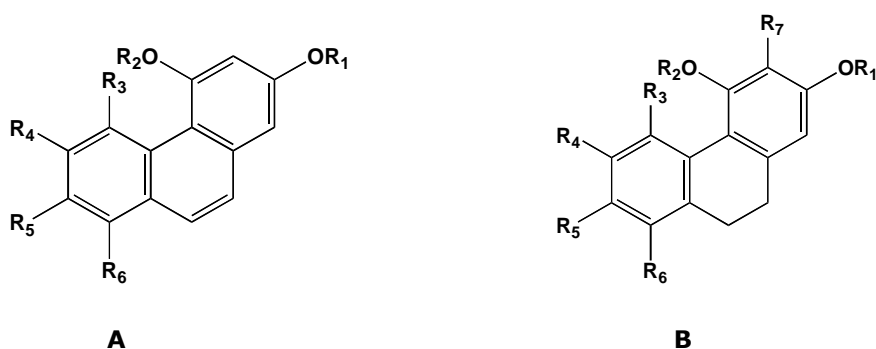


Figure 13 : Structures de quelques stilbènes isolés de *Dioscorea*.

Des dérivés du phénanthrène et du dihydrophénanthrène ont été caractérisés dans les tubercules de différents *Dioscorea*, tels l'hircinol et le 7-hydroxy-2,4,6-triméthoxyphénanthrène de *D. rotundata*, le 2,7-dihydroxy-1,3,5-triméthoxy-9,10-dihydrophénanthrène de *D. descipiens*, le prazérol de *D. prazeri*, la batatasine I et ses analogues à partir de *D. batatas* [Coxon *et al.*, 1982 ; Biswas *et al.*, 1988].



Phénanthrènes (A) - Batatasine I : R₁=R₂=CH₃; R₃=R₅=H; R₄=OH; R₆=OCH₃ ; 7-hydroxy-2,4,6-triméthoxyphénanthrène : R₁=R₂=CH₃; R₃=R₅=H; R₄=OH; R₆=OCH₃.

Dihydrophénanthrènes (B) - Hircinol : R₁=R₄=R₅=R₆=R₇=H ; R₂=CH₃; R₃=OH; Prazérol : R₁=R₂=CH₃; R₃=R₄=OH; R₅=R₆=H; R₇=OCH₃ ; 2,7-dihydroxy-1,3,5-triméthoxy-9,10-dihydrophénanthrène ; R₁=R₄=R₇=H ; R₂=CH₃; R₅=R₆=OCH₃; R₃=OH.

Figure 14 : Structures d'un phénanthrène et d'un dihydrophénanthrène isolés de *Dioscorea*.

Un dérivé glucosylé du 3,4,6-trihydroxyphénanthrène, a été caractérisé dans les tubercules de *D. opposita* et il a été montré qu'il avait une action neuroprotectrice. De sa partie aérienne a été isolée une quinone, la 6,7-dihydroxy-2-méthoxy-1,4-phénanthrènedione [Ma *et al.*, 2005]. Enfin, plus récemment, la dioscorone A, composé tétracyclique a été caractérisée chez *D. futschauensis* [Liu *et al.*, 2003 ; Sautour *et al.*, 2004].

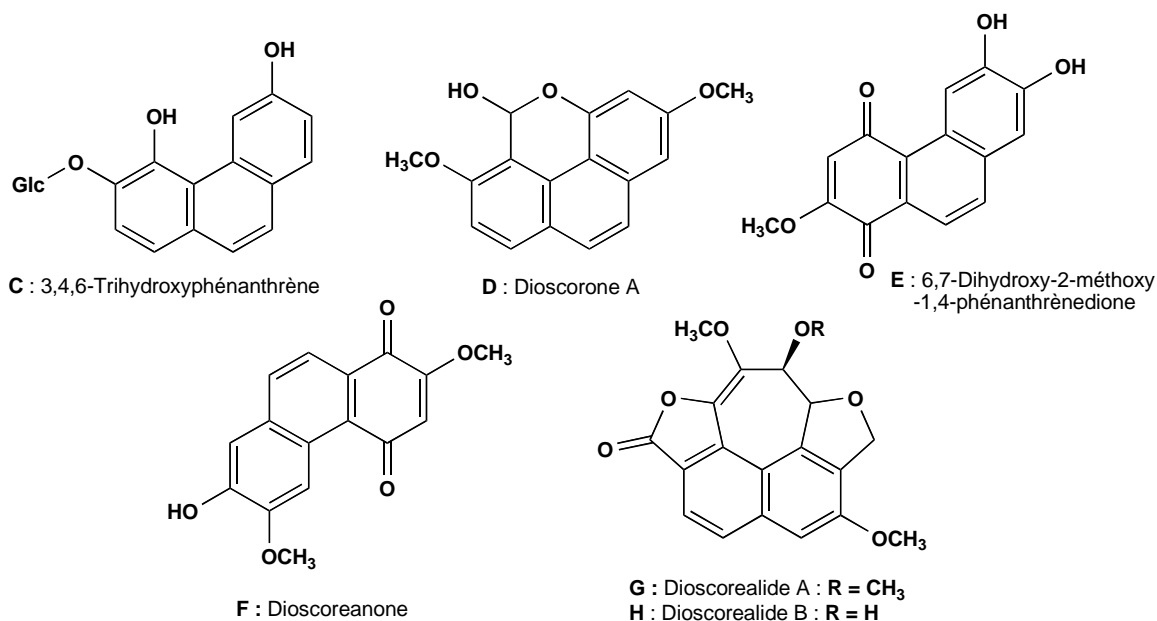


Figure 15 : Structures des hydroxyphénanthrènes isolés de *Dioscorea opposita*, 3,4,6-trihydroxyphénanthrène (**C**) et 6,7-dihydroxy-2-méthoxy-1,4-phénanthrènedione (**E**), de la dioscorone A (**D**). Structures de la phénanthraquinone, dioscoreanone (**F**) et des naphthofuranoxépines, dioscorealides A (**G**) et B (**H**) isolées de *D. membranacea*.

Une phénanthraquinone et deux naphthofuranoxépines présentant des propriétés antiallergiques ont été isolées de *D. membranacea* [Tewtrakul *et al.*, 2006 ; 2007].

2.3.2. LES FACTEURS ANTINUTRITIONNELS

Les facteurs antinutritionnels ont une définition imprécise, mais de façon générale il s'agit de substances contenues dans un aliment et qui en diminuent la digestibilité. Ils peuvent être des inhibiteurs de la trypsine, des tanins, des lectines ou encore des glucosinolates.

Des études sur quelques espèces jamaïcaines ont révélé la présence de certains facteurs antinutritionnels comme l'indique le **tableau 5** [Mcanuff *et al.*, 2005].

Tableau 5 : Quelques facteurs antinutritionnels des ignames (*D. polygonoides*, *D. alata*, *D. rotundata*, *D. cayenensis*) de la Jamaïque d'après Mcanuff *et al.* (2005).

Facteurs antinutritionnels	Teneur par kg du poids sec	Remarque
Saponosides	<600 mg	<i>D. polygonoides</i> = 2962 ± 60mg
Phénols totaux	1,3 ±0,1 à 79,3±6,1 g	
Tanins totaux condensés	0,1±0,0 à 26,7±3,8 g	
Inhibiteurs de protéases :		
▪ Inhibiteur de l'activité de la trypsine	118,7±17,9 à 279,6±2,3 mg	Certaines espèces < 100 UI
▪ Inhibiteur de l'activité de la chymotrypsine	144,4±4,7 à 226,4±4,7 mg	
Cyanoglucosides	0,3 à 15 mg	

L'étude faite sur d'autres espèces (*D. alata*, *D. cayenensis*, *D. rotundata*, *D. esculenta*) a permis également de titrer positivement la présence de quatre constituants antinutritionnels à savoir l'acide oxalique, l'acide phytique, l'ion cyanure, ainsi que les tanins. Le tableau 6 ci-après montre les teneurs en ces substances [Udoessien et Ifon, 1992].

Tableau 6 : Quantités de substances antinutritionnelles isolées de quatre espèces d'igname d'après Udoessien et Ifon, 1992.

Constituants antinutritionnels	Quantité en mg/100 g de matière sèche (espèce)
Oxalate total	43,80 ± 1,25 (<i>D. esculenta</i>) à 55,00 ± 2,00 (<i>D. rotundata</i>)
Phytate	3,99 ± 0,03 (<i>D. esculenta</i>) à 9,70 ± 0,39 (<i>D. rotundata</i>)
Cyanure total	1,08 ± 0,02 (<i>D. alata</i>) à 1,89 ± 0,27 (<i>D. cayenensis</i>)
Tanins	20,00 ± 0,50 (<i>D. rotundata</i>) à 75,00 ± 5,00 (<i>D. alata</i>)

L'acide oxalique et les oxalates sont des substances toxiques rencontrées dans de nombreuses plantes comme le cacao, les noix et noisettes, les baies, les haricots et les épinards. L'acide oxalique est présent à l'état naturel, essentiellement sous forme d'oxalate de calcium ou de potassium dans les racines et rhizomes de plantes telles que l'oseille, la rhubarbe ou la betterave.

L'acide phytique ou acide myo-inositol hexaphosphorique est rencontré dans les graines de nombreuses céréales et légumineuses et est généralement rencontré sous forme de sel de calcium ou de magnésium. Il diminue, voire inhibe l'absorption de divers cations (zinc, cuivre, cobalt, calcium, fer, magnésium) en formant des sels insolubles ou phytates.

L'acide cyanhydrique et ses sels, extrêmement toxiques, sont à l'origine des intoxications par les glycosides cyanogéniques.

2.3.3. LES PROPRIETES ET ACTIVITES PHARMACOLOGIQUES POTENTIELLES

Le genre *Dioscorea* a été largement étudié du point de vue de leurs activités biologiques et thérapeutiques potentielles. Les recherches ont été entreprises soit avec des extraits bruts, soit avec des fractions ou encore avec les composés isolés.

2.3.3.1 Activités cytotoxiques

Plusieurs espèces, utilisées seules ou faisant partie des ingrédients de remèdes traditionnels, ont été étudiées pour leurs activités cytotoxiques :

- *D. bulbifera* : la fraction soluble dans l'AcOEt de l'extrait EtOH à 75% révèle un effet inhibiteur de promoteur de tumeur des cellules épidermiques JB6 de souris [Gao *et al.*, 2002] ;
- *D. panthaica* : les dioscorésides A et B, des saponosides stéroïdiques, ont montré une activité cytotoxique, *in vitro*, sur les lignées cellulaires HeLa, A 375-52 et L929 [Dong *et al.*, 2001] ;
- *D. collettii* var *hypoglauca* : la protonédioscine est toxique contre les principales lignées cellulaires de leucémie, du cancer du système nerveux central et du cancer de la prostate [Hu et Yao, 2002]. La méthyl-protodioscine (NSC-698790) a un effet anti-prolifératif sur les cellules cancéreuses hépatiques Hep G2 (possibilité d'une activité antimittotique) [Wang *et al.*, 2006] ;
- la méthyl-protodioscine (un stéroïde furostanol biglycosylé naturel) est un composé anticancéreux ayant montré une activité potentielle contre les principales lignées cellulaires de leucémie et des souches des tumeurs malignes d'un panel de cancers humains du NCI (National Cancer Institute, USA) [He *et al.*, 2006] ;
- *D. membranacea* et *D. birmanica* : les extraits aqueux et EtOH ont révélé des activités cytotoxiques élevées et sélectives contre différents types cellulaires, à savoir la lignée cellulaire COR-L23 des carcinomes à larges cellules pulmonaires humaines, la lignée cellulaire MCF-7 de l'adénocarcinome des seins humains, la lignée cellulaire LS-174T de l'adénocarcinome du colon humain et des kératinocytes SVK-14 normaux humains [Itharat *et al.*, 2004] ;
- la diosgénine (une saponoside furostanol isolée d'un certain nombre d'espèces de *Dioscorea*) est un inhibiteur potentiel des cellules du carcinome HCT-116 du colon humain, en augmentant l'inhibition et l'induction de l'apoptose [Raju et Bird, 2007].

2.3.3.2. Activité anti-ostéoporotique

Le spongioside A (un cholestane glycosylé), l'hypoglauicine G, ainsi que la méthyl-protodioscine, tous isolés de *Dioscorea spongiosa*, ont montré une activité antiostéoporotique [Yin *et al.*, 2003 ; 2004].

2.3.3.3. Effets hypoglycémiants, traitement de l'hypercholestérolémie et recherche de mesure d'anti-obésité

- Les expérimentations sur des rats rendus diabétiques ont révélé des effets hypoglycémisants en réduisant considérablement l'activité ATP-asiq $\text{Na}^+ - \text{K}^+$. Une augmentation de l'activité de l' α -amylase sur la région proximale de la muqueuse de l'intestin grêle a été également induite à la suite d'une complémentation du régime alimentaire avec un extrait de sapogénine d'igname amer (*D. polygonoides*) [Mcanuff *et al.*, 2003 ; 2005]. Le même extrait diminue considérablement le taux de glucose plasmatique et de cholestérol total des rats rendus diabétiques [Mcanuff *et al.*, 2002], ainsi que des activités disaccharidases de l'intestin [Mcanuff-Harding *et al.*, 2006].
- L'extrait méthanolique de *D. nipponica* a une activité potentielle inhibitrice de la lipase pancréatique porcine dont le composé actif est la dioscine [Kwon *et al.*, 2003].

2.3.3.4 Activités anti-oxydantes

Des extraits d'ignames sauvages (*Dioscorea sp.*) du Népal, renfermant des composés phénoliques, ont montré des propriétés anti-oxydantes intéressantes [Bhandari et Kawabata, 2004].

2.3.3.5. Activité anti-inflammatoire

D. membranacea : la dioscoréanone (une phénanthraquinone) présente une activité potentielle contre le $\text{TNF-}\alpha$ libéré, ainsi que les deux naphtofuranoxyépines (dioscoréolides A et B) qui ont montré une activité modérée. Ces toxines ont conduit à l'utilisation de la plante par les médecins traditionnels Thaï pour le traitement des maladies inflammatoires [Tewtrakul et Itharat, 2007].

2.3.3.6 Activités immunologiques

- *D. batatas* Decne : le mucopolysaccharide de cette plante a révélé des effets immunoactifs en augmentant l'activité cytotoxique des splénocytes murins contre les cellules leucémiques, suggérant ainsi l'induction des réponses immunes médiatrices cellulaires. Il augmente également l'activité phosphatase lysosomiale des macrophages péritonéaux murins *in vitro* [Choi *et al.*, 2004].

- *D. opposita* Thunb : un polysaccharide isolé de cette espèce a révélé lors de tests préliminaires *in vitro*, une stimulation de la prolifération de la Coenzyme A-lymphocyte T induite [Zhao *et al.*, 2005].

2.3.3.7 Effet vasorelaxant

La diosgénine fait apparaître une relaxation vasculaire induite impliquant l'activation du récepteur endothélial muscarinique lequel augmente les concentrations en calcium intracellulaire et par conséquent la libération des facteurs relaxant dérivant de l'endothélium notamment l'oxyde nitrique et les dérivés de la cyclo-oxygénase activant les canaux Ca²⁺-K⁺ [Dias *et al.*, 2007].

2.3.3.8. Propriétés antivirales

L'extrait aqueux de *D. birmanica* et l'extrait EtOH de *D. membranacea* ont montré des effets inhibiteurs contre la HIV-1 intégrase (IC₅₀ respectives de 4,5 et 4,7 µg/ml). L'extrait EtOH de *D. membranacea* a révélé une activité contre la HIV-1 protéase (CI₅₀ = 48 µg/ml) [Tewtrakul *et al.*, 2006].

2.3.3.9. Propriétés antimicrobiennes

2.3.3.9.1. Propriétés antifongiques

La prosapogénine A de la diosceine, isolée de *D. cayenensis*, a montré une activité antifongique contre des levures pathogènes pour l'homme : *Candida albicans*, *C. glabrata* et *C. tropicalis*, avec des CMI respectives de 20,8, 6,2 et 25,0 µg/ml [Sautour *et al.*, 2004].

2.3.3.9.2. Propriétés antibactériennes

- *D. bulbifera* L. *sativa* : la fraction soluble dans le dichlorométhane de l'extrait brut, ainsi que les deux clérodanes, bafoudiosbulbines A et B, ont révélé des activités antibactériennes significatives contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *S. paratyphi A* et *S. paratyphi B* [Teponno *et al.*, 2006].
- *D. dregeana* : les extraits MeOH, aqueux et AcOEt sont actifs contre *Pseudomonas aeruginosa* [Kelmanson *et al.*, 2000].

2.4. INTERETS NUTRITIONNEL ET COMMERCIAL

2.4.1. COMPOSITION CHIMIQUE ET INTERET NUTRITIONNEL

La composition chimique des tubercules est voisine de celle des pommes de terre avec environ 25 % d'amidon, mais avec une teneur plus forte en protéines. Elles en contiennent environ 7 %, soit quatre fois plus que le manioc. L'igname est une bonne source de calories. L'igname contient de petites quantités de vitamine B1 (thiamine) et de vitamine C (6 à 10 mg pour 100 g et jusqu'à 21 mg dans certains cas), et les variétés jaunes de patate, d'igname et de manioc renferment du bêta-carotène ou de la provitamine A. Les racines et les tubercules contiennent de faibles quantités d'autres vitamines et minéraux mais renferment des quantités importantes de fibres. Les plantes-racines, dont fait partie l'igname, contiennent généralement une bonne quantité de lysine, moins toutefois que les légumineuses ; la teneur en acides aminés soufrés est insuffisante. Par exemple, l'igname est riche en phénylalanine et en thréonine, mais pauvre en tryptophane et en acides aminés soufrés, cystine et méthionine. Comme toutes les plantes-racines, l'igname présente une très faible teneur en lipides [FAO, 1991].

Une étude entreprise à Madagascar a révélé les compositions de quelques unes des espèces de *Dioscorea* présentes dans deux régions de l'île, celle de Morondava dans la partie occidentale et celle de Brickaville dans la partie orientale. Le tableau 7 regroupe les teneurs en eau, lipides, protéines, amidon et fibres des espèces analysées [Jeannoda *et al.*, 2007].

Tableau 7 : Composition chimique de quelques espèces du genre *Dioscorea* présentes à Madagascar d'après Jeannoda *et al.* (2007).

<i>Dioscorea</i>	Teneur en eau (%)	Teneur (g / 100 g matière sèche)				
		Lipides	Protéines	Amidon	(dont amylose)	Fibres
<i>D. maciba</i>	76,6	0,6	2,5	75,5	(13,8)	13,7
<i>D. bako</i>	88,1	0,9	5,5	67,4	(10,1)	12,7
<i>D. ovinala</i>	87,9	0,5	5,8	67,9	(15,7)	9,2
<i>D. bemarivensis</i>	62,9	0,7	1,1	82,4	(26,2)	7,2
<i>D. antaly</i>		0,6	7,4	78,0	(12,1)	12,1
<i>D. sansibarensis</i>		0,4	3,7	81,2	(26,3)	10,4
<i>D. alata (ovy toko)</i>	74,7	0,9	5,2	59,2	(19,3)	10,7
<i>D. seriflora (oviala)</i>	67,7	0,3	6,7	61,2	(26,8)	10,0
<i>D. cayenensis (ovihazo)</i>	81,1	0,6	6,5	66,4	(15,2)	6,4
<i>D. alata (ovibe)</i>	73,6	0,6	6,3	61,3	(38,2)	3,5
<i>D. alata (ovy masoandrovololo)</i>	78,8	0,8	3,6	42,5	(9,5)	37,0
<i>D. alata (ovy soroka)</i>	81,0	0,7	6,2	52,0	(13,8)	15,0

2.4.2. PRODUCTION ET INTERET COMMERCIAL

Les ignames sont une culture importante au plan mondial puisqu'elles occupent 4 millions d'hectares et produisent une récolte annuelle d'environ 40 millions de tonnes répartis

dans 56 pays. Cette culture a néanmoins régressé devant celle du manioc, plus facile à cultiver selon les variétés, les sols. Les principaux pays producteurs sont en Afrique de l'Ouest [<http://www.fao.org>].

Les tubercules riches en amidon sont consommés presque exclusivement dans les régions tropicales.

Les ignames sont consommées cuites, braisées, ou frites. Selon les espèces et variétés, le goût est très variable, très agréable, tendre et sucré dans certains cas, farineux, au goût de châtaigne le plus souvent. Certaines espèces, notamment africaines, sont âcres ou amères, mais pas véritablement toxiques.

La production annuelle d'ignames, des années récentes, par les principaux pays producteurs est résumée dans le tableau 8.

Tableau 8 : Production annuelle d'ignames [Données FAOSTAT].

Production en tonnes				
Pays	Année 2003		Année 2004	
Nigéria	27 000 000	67 %	27 000 000	66 %
Ghana	3 812 800	9 %	3 870 400	10 %
Côte d'Ivoire	3 000 000	7 %	3 000 000	7 %
Bénin	2 408 581	6 %	2 500 000	6 %
Autres pays	4 254 477	11 %	4 284 472	11 %
Total	40 475 858	100 %	40 654 872	100 %

3.1. DESCRIPTION BOTANIQUE [Burkill, 1950]

Dioscorea antaly Jum. & Perr. est une espèce endémique de Madagascar identifiée par Jumelle et Perrier de la Bâthie. Dans la collection « Flore de Madagascar et des Comores, 44ème famille », Burkill l'a décrite comme une plante ayant une corne gisant dans le sol à près de 30 cm de profondeur, émettant de nombreuses racines horizontales, au-dessous de nombreux tubercules et au-dessus une tige ascendante, radicante aux nœuds dans la couche humifère superficielle. Les tubercules, à chair blanche, mais virant à l'orange au contact de l'air, sont en forme de massue allongée pouvant être entiers ou parfois diversement lobés (ramifiés), tous turgescents et en voie de croissance au moment de la floraison. Ils peuvent atteindre 30 cm de long ou même plus. La tige est armée d'aiguillons et elle est glabre. Les feuilles sont opposées alternes (*Figure 16*). Elles sont finement pubescentes à l'état jeune. La pubescence persiste plus longtemps sur les nervures des feuilles adultes. Le pétiole, un peu dilaté et embrassant la tige à la base, est souvent tordu. Il est aussi long que le limbe lequel est largement ovale-cordé (15 à 20 cm de long et de large), à larges auricules arrondies et à long (1 à 2 cm) acumen aigu. Les nervures, au nombre de 9 à 11, ordinairement avec des poils écailleux et durs, sont saillantes à la face inférieure. Les inflorescences mâles sont glabres, solitaires, atteignant jusqu'à 35 cm de long et comportant un épi simple de fleurs sessiles, solitaires ou groupés en cymes contractées et portant 2 à 7 fleurs. Les fleurs sont espacées de 2 à 12 mm. Les bractées sont triangulaires, moins aigües et plus longues que les fleurs ou les groupes de fleurs. Les boutons floraux sont globuleux, et le périanthe est jaune verdâtre. Les inflorescences femelles récurvées sont aussi longues que les inflorescences mâles. Les fleurs sont solitaires et sessiles à l'aisselle d'une bractée courte et large. Les staminodes sont nus et l'ovaire est non contracté en volume au sommet. La capsule est réfléchie, obovale à oblongue (4 à 5 x 2,7 à 4 cm) dans son contour. Les trois ailes (de 4 à 7 mm de large) deviennent ligneuses à la fin et alternent avec trois costules. Les graines sont insérées au-dessus du milieu de la loge. Elles sont aigües à l'extrémité avec un hile terminal et une aile bien développée (15 à 20 x 6 mm) vers la base de la capsule et prolongée sur le bord externe jusqu'à l'autre extrémité.

La floraison a lieu du mois d'octobre au mois de janvier et la fructification pendant la saison sèche.

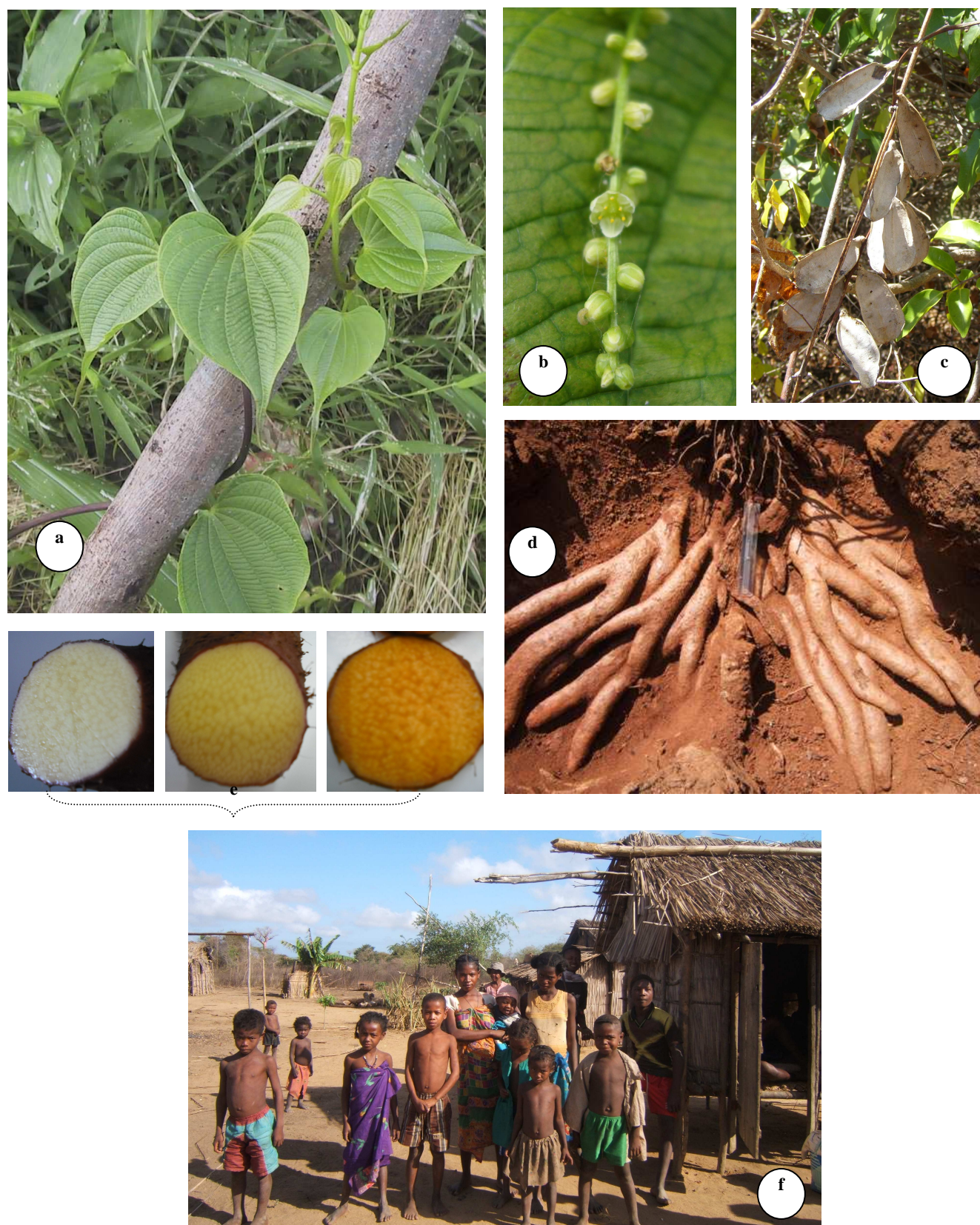


Figure 16 : *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. :

- a) Pied en forêt ;
- b) Inflorescence mâle ;
- c) Fruits ;
- d) Tubercules
- e) Coupes de tubercules montrant le changement de couleur de la chair au contact de l'air
(allant du blanc beige à l'orange);
- f) Site d'enquête (un village de Beroboka)

3.2. REPARTITION GEOGRAPHIQUE

Dioscorea antaly Jum. & Perr. se rencontre dans les forêts tropophylles, de 0 à 900 m d'altitude, ainsi que sur tous les sols pas trop arides du domaine occidental (Ankarana, Ankarafantsika, Ambongo-Boina, Isalo, Menabe, Onilahy, Manambolo, ...) [Burkill, 1950]. D'après de récentes investigations, *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. a une plus large distribution à Madagascar. Un aperçu de cette distribution est présenté sur la figure 2, carte établie à partir des sites où des herbiers ont été confectionnés et déposés dans des herbiers de référence [Jeannoda, 2009] (figure 17).

Dans la région du Menabe, notre site d'enquête et de récolte, la plante a été inventoriée à Beroboka et dans la commune de Tsimañana au nord de Beroboka [Projet FADES, 2005].

Dioscorea antaly Jum. & Perr. pousse principalement sur les terrains alluvionnaires (*baiboho*) longeant les cours d'eau ainsi que dans les forêts dégradées du Menabe [Jeannoda et al., 2003 ; Projet FADES, 2005].

3.3. CLASSIFICATION

L'espèce *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. appartient à la classe des Liliopsida, à la sous-classe des Lilidae, à l'ordre des Dioscoréales, à la famille des Dioscoreaceae et au genre *Dioscorea*.

Dans les différentes régions du sud de l'île, l'espèce est connue sous différentes appellations vernaculaires : *Tsihina* (Antandroy) ; *Antandena* et *Veoveo* (Bara) ; *Papa* (Bara), *antady* ou plus fréquemment *antaly*.

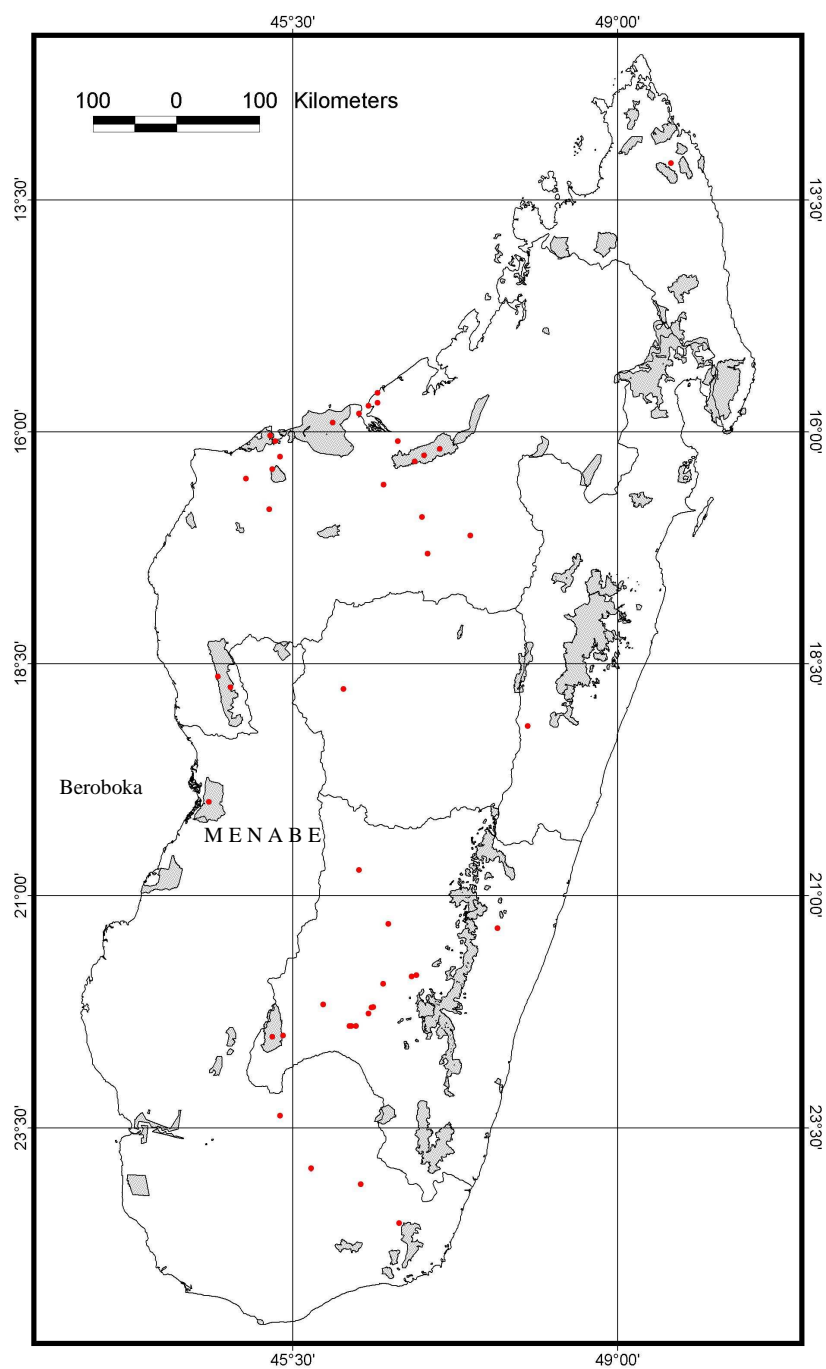


Figure 17 : Carte de répartition de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. (en gris sur la carte)

[Source : JEANNODA V. H., 2009]

- : Lieux de collecte d'échantillons d'herbier de *Dioscorea antaly* déposés dans des herbiers nationaux et internationaux

4 – ENQUÊTES ETHNOBOTANQUES

Les enquêtes ont été menées dans la localité de Beroboka. Cette commune rurale se trouve dans le district de Belo sur Tsiribihina, région du Menabe. Elle se situe à environ 60 km au Nord-Est de Morondava, sur la route nationale N° 8A reliant Morondava à Belo/Tsiribihana.

La population de Beroboka est constituée d'environ 7 000 habitants. Cette population est composée de plusieurs groupes ethniques dont les Sakalava, les Antesaka, les Antemoro et les Antefasy. L'ethnie Sakalava est numériquement la plus importante. Leurs principales activités sont l'agriculture et l'élevage. Ils pratiquent la polyculture (culture de riz, maïs, arachide, haricot, lentille, manioc et patate douce) et élèvent des bovins, des caprins, des ovins et des volailles [<http://www.menabe.gov.mg>].

Le but de ces enquêtes a consisté à collecter toutes les informations pertinentes relatives à *Dioscorea antaly*, notamment sa toxicité et ses éventuelles utilisations. Les personnes enquêtées ont été composées d'autorités locales, des techniciens des services techniques décentralisés et d'organisations non gouvernementales, de ménages paysans et autres personnes ressources dont des guides, des gardes forestiers.

La méthode d'approche participative que nous avons appliquée (enquêtes, discussions...) nous a permis d'obtenir diverses informations.

- Douze espèces d'ignames (*oviala*) se rencontrent dans la localité. Elles se trouvent pour la plupart à l'état sauvage et ne sont pas cultivées. Elles sont toutes consommées, mais si certaines comme *D. bako* (*bako*) et *D. maciba* (*ovy*) sont très appréciées et recherchées, d'autres telles que *Dioscorea antaly*, *D. ovinala* (*angily*) et *D. sansibarensis* (*veoveo*), à cause de leur amertume et/ou de leur toxicité, ne sont consommées que par nécessité.
- *Dioscorea antaly*, malgré la faible préférence qu'on lui accorde, constitue un appoint alimentaire indispensable surtout pour les plus démunis pendant la période de disette qui se situe entre les mois de novembre et mars. Pour certains ménages, il remplace le riz. Sa consommation nécessite une préparation préalable visant à éliminer l'amertume et la toxicité des tubercules. La préparation comprend les étapes suivantes :

- le tubercule est d'abord épluché, puis coupé en morceaux ;
- les cossettes ainsi obtenues sont placées dans un sac en jute ;
- le sac est immergé dans l'eau courante (fleuve ou ruisseau) pendant trois à sept jours ;
- les cossettes sont ensuite mises à sécher au soleil.

Les cossettes ainsi préparées peuvent être consommées après cuisson ou conservées.

- A propos de la toxicité de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr., bien qu'elle ait été souvent évoquée pendant les enquêtes, aucun cas concret d'intoxication n'a été rapporté à l'exception d'un témoignage selon lequel pendant la période de disette des enfants affamés d'une même famille ayant mangé des tubercules crus non traités ont été gravement intoxiqués. Les enfants, très malades, ont manifesté des symptômes d'ivresse, mais ont survécu. Il n'est pas exclu que d'autres intoxications ont eu lieu par le passé.
- La plante ne fait l'objet d'aucune autre utilisation empirique, alors que ses congénères *D. soso* et le redoutable *D. sansibarensis* sont respectivement utilisés pour soigner les maux d'estomac et pour tuer les animaux nuisibles (rats et corbeaux).

5 – ETUDE CHIMIQUE

Les travaux ont été conduits dans l'esprit du Projet FADES sur les ignames (cité plus haut) dont le principal objectif est d'approfondir les connaissances sur ces plantes utiles pour mieux les protéger et les valoriser.

En ce qui concerne les études sur le plan chimique, nous n'avons pas ciblé uniquement les principes toxiques, mais tous les composés chimiques présents dans les tubercules. Aussi, les travaux ont-ils notamment porté sur :

- la mise au point de procédés d'extraction et de purification permettant l'isolement des constituants chimiques des tubercules de *D. antaly* Jum. & Perr. dont les principes toxiques ;
- la détermination de leur nature chimique.

5.1 PREPARATION DES TUBERCULES

Le matériel d'étude a été récolté en mai 2004 dans la localité de Beroboka.

Les tubercules déterrés sont lavés, essorés puis découpés en rondelles d'environ cinq millimètres d'épaisseur puis séchés. Le séchage est fait au soleil (dans une serre) durant 48 heures. Quinze kilos de tubercules frais ont été ainsi préparés. A partir de ce mode de séchage, la teneur en eau des tubercules de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. est estimée à environ 70%, les 15 kg de tubercules ont permis d'obtenir 3,03 kg de cossettes séchées.

Les cossettes séchées sont broyées jusqu'à pulvérisation. La poudre ainsi obtenue est conservée dans des bocaux fermés hermétiquement placés dans un endroit bien sec à la température ambiante.

5.2. ETUDES PHYTOCHIMIQUES PRELIMINAIRES

Un criblage phytochimique réalisé sur des extraits bruts de tubercule a révélé la présence de tanins et de polyphénols, de flavonoïdes, de leucoanthocyanes et d'iridoïdes. Les alcaloïdes et les saponosides, composés relativement courants dans les tubercules de *Dioscorea* n'ont pas été trouvés.

5.3. EXTRACTION ET PURIFICATION

5.3.1. EXTRACTION

5.3.1.1. Extraction avec des solvants organiques

La poudre de tubercule finement broyée (546 g) a été extraite successivement avec le cyclohexane, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle (Cf. § 2.1.1, p. 180). Les rendements obtenus sont respectivement de 0,14%, 2,06%, 0,06% et 1,52%. Les différentes étapes sont résumées sur la *figure 18*. L'extrait CH₂Cl₂ obtenu avec un très faible rendement (R=0,06%) laisse supposer une absence ou un très faible taux d'alcaloïdes contenus dans les tubercules.

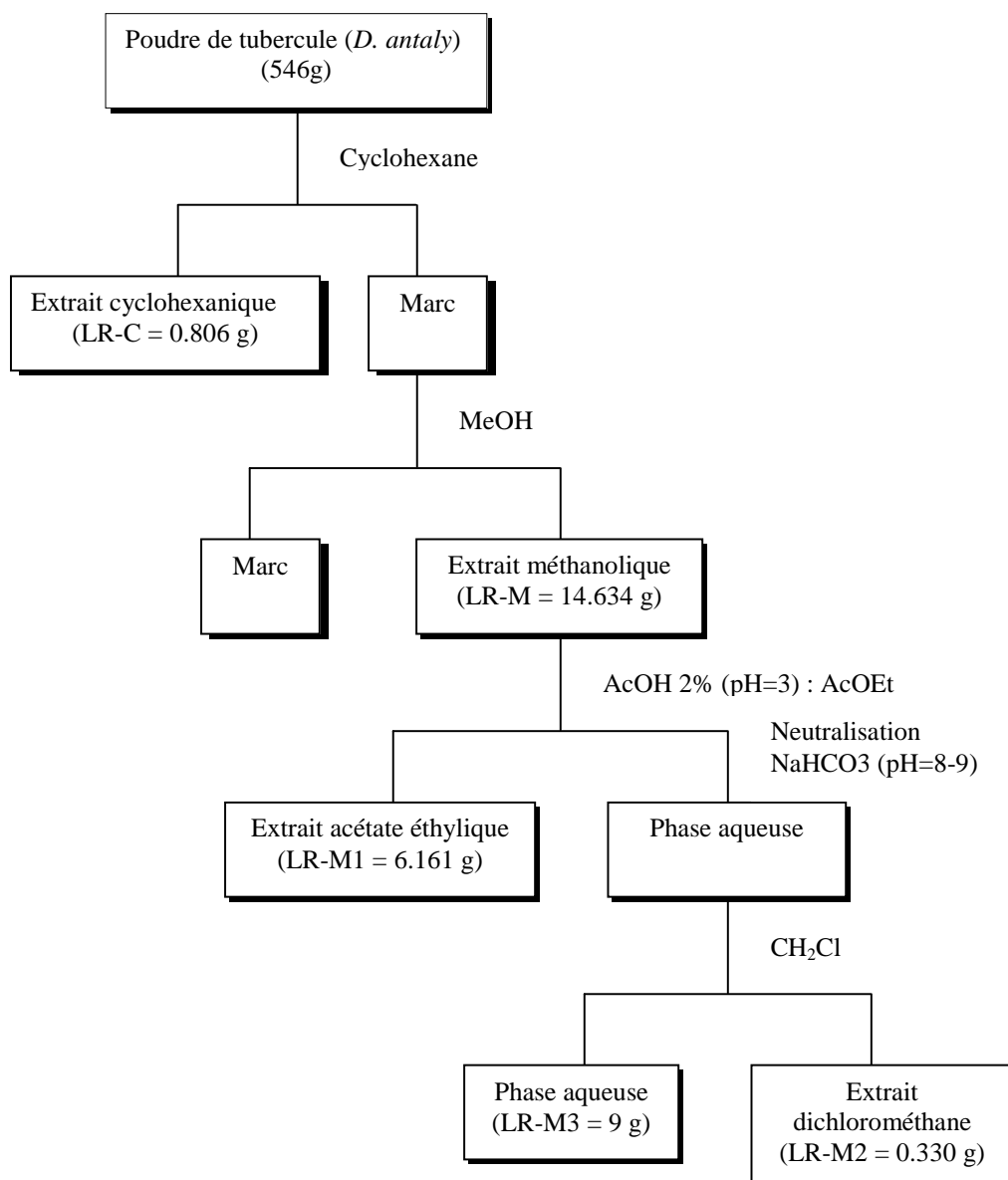


Figure 18 : Résumé des différentes étapes d'extraction avec les solvants

5.3.1.2. Extraction aqueuse ou décoction

Pour se rapprocher du procédé de détoxification mentionné lors des enquêtes ethnobotaniques, nous avons réalisé une extraction avec de l'eau à froid pour récupérer les composés hydrosolubles dont certains sont supposés être responsables des intoxications. La poudre de tubercule est macérée dans de l'eau distillée, à température ambiante. Le rendement élevé obtenu en extrait brut (R = 13,6%) montre la richesse de l'extrait en composés polaires.

5.3.2. PURIFICATION

5.3.2.1. Purification et isolement des constituants de l'extrait par AcOEt

Un premier fractionnement de l'extrait AcOEt (5,72g) a été effectué par chromatographie sur colonne de silice et a fourni 13 fractions ([F1] à [F13]).

La purification de ces sous-fractions jusqu'à l'obtention de composés purs a été réalisée grâce à des enchaînements de différentes méthodes chromatographiques, sur gel de silice en phase normale et en phase inverse, ainsi que par exclusion stérique sur Sephadex® LH-20, par MPLC et HPLC (CF. §2.1.3, p. 181). Certains produits ont été obtenus purs par recristallisation.

Ainsi, de cet extrait AcOEt, 13 composés ont été isolés dont quatre présentent des structures nouvelles (*Figure 19*).

Figure 19 : Les différentes étapes menant à l'obtention des trois produits nouveaux (**D5** : antadiosbulbine A, et **D6** : antadiosbulbine B et **D12** : 8-épidiosbulbine G).

Le schéma ci-après (*figure 20*) représente le procédé d'isolement des différents constituants chimiques de l'extrait par l'AcOEt.

Figure 20 : Schéma d'isolement des constituants de l'extrait par AcOEt.

5.3.2.2. Purification et isolement des constituants de l'extrait aqueux

Un premier fractionnement de l'extrait aqueux (14 g) a été effectué sur colonne d'amberlite XAD4 (éluant : H₂O 100% → MeOH 100%) nous a permis d'obtenir 12 fractions [E1] à [E12]. Les répurifications ont été entreprises sur les fractions peu polaires.

La purification de la fraction E-9 (388 mg) sur colonne de Sephadex® LH-20 avec du MeOH a fourni les composés **D11** (29 mg), **D12** (3 mg), **D14** (12 mg) ainsi que **D15** (6 mg). Celle de la fraction E-10 a fourni à nouveau le composé **D11** (28 mg), un mélange de terpénoïdes (D5+D6) ainsi que le composé **D16** (2mg).

Il est à noter qu'à partir de ces fractions peu polaires provenant de l'extrait aqueux, les composés majoritaires (norditerpènes et flavonoïdes) présents dans l'extrait AcOEt ont été isolés, ce qui expliquerait que la détoxification dans l'eau entraînerait les composés amers.

Un deuxième fractionnement de 10,8 g d'extrait aqueux a fourni 8 fractions (mais les tentatives de purification n'ont pas abouti à isoler de composés purs).

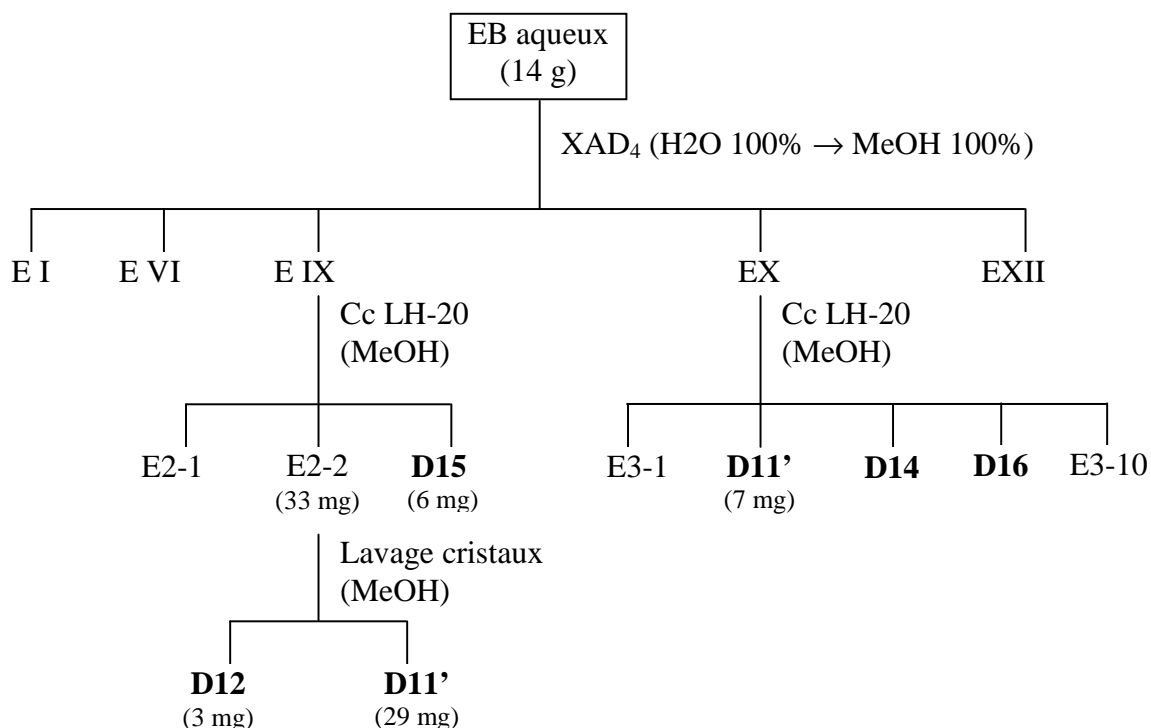


Figure 21 : Schéma de purification de l'extrait brut aqueux.

5.4. DETERMINATION STRUCTURALE

5.4.1. STRUCTURES DES COMPOSES DE LA CLASSE DES DITERPENOÏDES

5.4.1.1. Structure des composés D11 et D11' : 8-épi-diosbulbine E

Le composé **D11** a été isolé sous forme d'un solide amorphe, optiquement actif, $[\alpha]_D^{20}$ -16 (c 0,3, CHCl₃). Le spectre de masse ESI-Q-TOF, en mode positif, du composé **D11** montre l'ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ à $m/z = 347,1485$ (calc. pour C₁₉H₂₃O₆ : 347,1493) correspondant à la formule brute C₁₉H₂₂O₆. Le spectre de masse de **D11'**, enregistré dans les mêmes conditions, présente l'ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ à $m/z = 347,1455$, correspondant à la même formule brute. Cette formule implique neuf degrés d'insaturation. Son spectre d'absorption dans l'infrarouge présente des bandes à ν 1740 cm⁻¹ (lactones), à 3636 cm⁻¹ (hydroxyles) et à 3150 et 1505 cm⁻¹ suggérant la présence d'un cycle furanique.

5.4.1.1.1. Structure du composé D11

Le spectre RMN 1H de **D11** en solution dans CDCl₃ montre, dans la région des protons aromatiques la présence de trois signaux à 7,45 ; 7,37 et 6,40 ppm, intégrant chacun pour un proton. On observe, entre 4,0 et 5,5 ppm les signaux de trois protons qui se présentent sous forme d'un doublet de doublet à 5,49 ppm, d'un doublet de doublet à 4,85 ppm et d'un doublet de doublet dédoublé (1H) à 4,14 ppm. Dans la région des protons aliphatiques, entre 1,0 et 2,8 ppm, les signaux de 16 protons sont distingués, dont un singulet intense à 1,10 ppm, intégrant pour trois protons et attribué à un groupement méthyle. Enfin, un signal large est observé à 2,30 ppm et il attribué à un hydroxyle, car il ne donne pas de corrélation dans le spectre HSQC.

Le spectre de RMN13C montre la présence des 19 carbones de la formule brute, dont quatre méthylènes (CH₂) à 28,2 ; 29,7 ; 38,3 et 39,6 ppm, quatre carbones quaternaires à 34,6 ; 125,0 ; 171,8 et 179,2 ppm (les trois derniers étant des carbones *sp*² du fait de leur déplacement chimique), un méthyle à 22,0 et dix méthines à 29,7 ; 42,7 ; 43,3 ; 45,5 ; 69,4 ; 78,0 ; 108,5 ; 139,7 ; 143,5 ppm. Deux de ces méthines sont liés à un atome d'oxygène et trois sont des carbones *sp*² (Tableau 9). La molécule présentant 9 degrés d'insaturation et comportant 2 doubles liaisons et 2 carbonyles, est pentacyclique. L'attribution complète des protons et des carbones a été réalisée grâce à l'analyse des spectres de RMN 2D.

L'examen du spectre ^1H - ^1H COSY a permis de mettre en évidence les quatre sous-structures **a** à **d** suivantes (Figure 22) :

- le proton à 4,85 ppm (H-2) dont le déplacement chimique suggère que le carbone qui le porte est lié à un atome d'oxygène, est corrélé d'une part avec les protons à 2,10 et 1,45 ppm (CH₂-1) et d'autre part aux protons à 2,52 et 1,77 ppm (CH₂-3) et ce méthylène est corrélé au proton à 2,65 ppm (H-4) qui est lui même corrélé à celui à 1,80 ppm (H-5). L'ensemble définit la sous-structure **a** ;
- le proton à 2,71 ppm (H-10) est corrélé à celui à 1,80 ppm (H-5) qui à son tour donne une corrélation avec le proton à 4,14 ppm (H-6). Ce dernier est corrélé aux protons à 2,75 et 1,88 ppm (CH₂-7) qui sont corrélés à celui à 2,25 (H-8) ppm. Ces données définissent la sous-structure **b** ;
- le proton oxy-méthine à 5,49 ppm (H-12) est corrélé à ceux à 1,74 ppm et à 2,08 ppm du groupe méthylène CH₂-11 dont le carbone est à 39,6 ppm (sous-structure **c**) ;
- le proton 6,40 ppm (H-14) est corrélé aux protons à 7,45 et 7,37 ppm et l'ensemble est caractéristique d'un furane monosubstitué (sous-structure **d**).

Les carbones protonés ont été identifiés et corrélés aux protons auxquels ils sont liés grâce au spectre HSQC (Tableau 9).

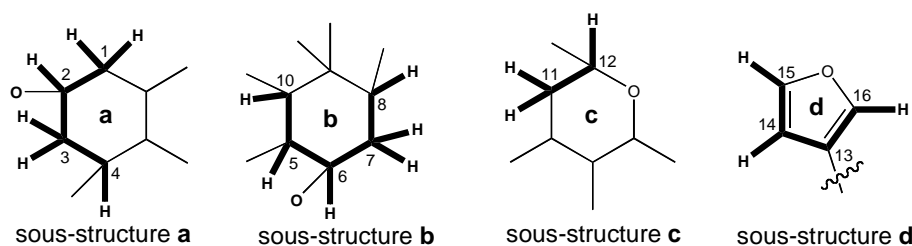


Figure 22 : Sous-structures **a**, **b**, **c** et **d** déduites du spectre H-H COSY du composé **D11**.

Les différentes corrélations à longue distance, observées sur le spectre HMBC ont permis de relier entre elles les différentes sous-structures **a** à **d** (Figures 22 et 23A et Tableau 9) :

- le proton H-15 à 7,37 ppm porté par le carbone à 143,5 ppm, est fortement corrélé aux carbones à 108,5 et 139,7 ppm, mais faiblement avec celui à 125,0 ppm (C-13). Le proton H-16 (7,45 ppm) lié au carbone à 139,7 ppm, est fortement corrélé avec ceux à 125,0 et 143,5 ppm et faiblement corrélé avec celui à 108,5 ppm (C-14). Le proton H-14 à 6,40 ppm est lié au carbone à 108,5 ppm et est fortement corrélé aux

- carbones à 139,7 et 143,5 ppm, mais faiblement corrélé à celui à 125,0 ppm (C-13) constituant ainsi le cycle furanique **d**. Celui-ci est relié au cycle **c**, *via* une liaison entre les carbones C-12 et C-13, car le spectre HMBC montre les corrélations entre le carbone C-13 et les protons H-11 à 2,08 et 1,74 ppm et H-12 à 5,49 ppm;
- le proton à 5,49 ppm (H-12) porté par le carbone à 69,4 ppm corrèle avec les carbones à 125,0 ; 139,7 et 45,4 ppm reliant ainsi la sous-structure **c** au noyau furanique (sous-structure **d**). Le carbonyle de lactone à 171,8 ppm (C-17) est corrélé aux protons à 1,88 et 2,75 ppm (CH₂-7) et à 2,25 ppm (H-8) ce qui permet de le lier au carbone C-8. De plus, il est corrélé au proton à 5,49 ppm (H-12) ce qui permet de refermer le cycle lactonique **c**, en liant le carbonyle C-17 au carbone C-12 *via* un atome d'oxygène ;
 - les protons du méthyle à 1,10 ppm (carbone à 22,0 ppm) corrélaient avec les carbones à 29,7 (C-10) ; 34,6 (C-9) ; 39,6 (C-11) et 45,5 ppm (C-8), ce qui permet de lier ce méthyle (C-20) au carbone C-9 ;
 - le proton à 2,71 ppm (H-10) porté par le carbone qui résonne à 29,7 ppm, corrèle avec les carbones à 69,4 (C-6) ; 45,5 (C-8) ; 42,7 (C-5) et 34,6 ppm (C-9), ce qui permet de fermer le cycle **b** ;
 - le proton à 2,25 ppm (H-8) porté par le carbone à 45,5 ppm corrèle avec les carbones à 29,7 (C-10), 69,4 (C-12), 34,6 ppm (C-9), 39,6 ppm (C-11), au méthyle à 22,0 ppm, ainsi qu'au carbonyle à 171,8 ppm (C-17) dont le déplacement chimique est caractéristique d'une fonction lactone. Ces résultats permettent de relier la sous-structure **b** aux sous-structures **a** et **c** ;
 - le proton à 2,65 ppm (H-4) porté par le carbone à 43,3 ppm corrèle fortement avec les carbones à 29,7 (C-10), 78,0 ppm (C-2) et au carbonyle à 179,2 ppm (C-18). Des corrélations moins intenses sont observées avec les carbones à 38,3 ppm (C-3), 42,7 ppm (C-5) et 69,4 ppm (C-6). Ceci permet de relier la sous-structure **a** à l'ensemble des autres sous-structures.
 - le carbonyle de lactone à 179,2 ppm (C-18) présente des corrélations à 2 et 3 liaisons avec respectivement H-4, H-3 et H-5, ce qui conduit à le lier au carbone C-4. Par ailleurs, il donne une tache de corrélation intense avec le proton à 4,89 ppm (H-2) ce qui permet de refermer le cycle lactonique sur le carbone C-2

L'ensemble des données conduit ainsi à la structure plane du composé **D11** (*Figure 23 B*).

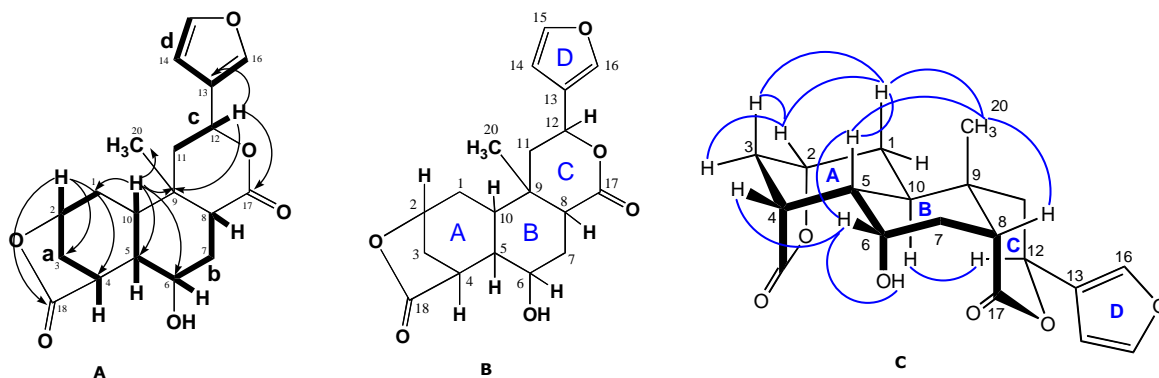


Figure 23 : **A** : Principales corrélations observées dans le spectre HMBC entre les sous-structures **a**, **b**, **c** et **d** ; **B** : Structure plane du composé **D11** ; **C** : Principaux NOEs (en bleu) observés dans le spectre NOESY de **D11**.

Tableau 9 : Données de RMN ^{13}C et ^1H pour le composé **D11** (8-épi-diosbulbine E) en solution dans CDCl_3 et dans $\text{Pyr}-d_5$ pour **D11'** (^1H : 400.13 MHz).

N°	D11 (CDCl_3)				D11' ($\text{Pyr}-d_5$)			
	δ_{C}	δ_{H}	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)	δ_{C}	δ_{H}	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)
1a (éq)	28,2	2,10	<i>dddd</i>	13,3 ; 6,0 ; 4,9 ; 1,7	28,4	1,97	<i>dddd</i>	12,3 ; 6,0 ; 5,0 ; 1,5
b (ax)	-	1,45	<i>ddd</i>	13,3 ; 12,2 ; 0,9	-	1,31	<i>ddd</i>	12,3 ; 12,1 ; 1,2
2 (éq)	78,0	4,85	<i>dd</i>	5,5 ; 4,9	77,6	4,73	<i>dd</i>	5,5 ; 5,0
3a (éq)	38,3	2,52	<i>dddd</i>	11,6 ; 5,5 ; 5,1 ; 1,7	38,6	2,32	<i>dddd</i>	11,5 ; 5,5 ; 5,5 ; 1,5
b (ax)	-	1,77	<i>d</i>	11,6	-	1,62	<i>d</i>	11,5
4 (éq)	43,3	2,65	<i>ddl</i>	5,1 ; 1,1	43,6	2,63	<i>dd</i>	5,5 ; 1,8
5 (ax)	42,7	1,80	<i>ddd</i>	12,5 ; 2,0 ; 1,1	43,4	1,75	<i>ddd</i>	12,1 ; 1,8 ; 1,5
6 (éq)	69,4	4,14	<i>ddd</i>	2,5 ; 2,2 ; 2,0	68,8	4,19	<i>ddddl</i>	3,4 ; 2,2 ; 1,5 ; 1,5
7a (éq)	29,7	2,75	<i>ddd</i>	14,7 ; 3,2 ; 2,2	31,2	2,99	<i>ddd</i>	14,2 ; 3,4 ; 2,0
b (ax)	-	1,88	<i>ddd</i>	14,7 ; 6,3 ; 2,5	-	1,91	<i>ddd</i>	14,2 ; 6,5 ; 2,2
8	45,5	2,25	<i>dd</i>	6,3 ; 2,1	45,9	2,41	<i>dd</i>	6,5 ; 2,0
9	34,6	-			34,8	-		
10 (ax)	29,7	2,71	<i>ddd</i>	12,5 ; 12,2 ; 6,0	30,1	3,09	<i>ddd</i>	12,1 ; 12,1 ; 6,0
11a (éq)	39,6	2,08	<i>dd</i>	15,4 ; 3,1	39,5	2,04	<i>dd</i>	14,6 ; 3,1
b (ax)	-	1,74	<i>dd</i>	15,4 ; 12,3	-	1,80	<i>dd</i>	14,6 ; 12,6
12 (ax)	69,4	5,49	<i>dd</i>	12,3 ; 3,1	69,5	5,56	<i>dd</i>	12,6 ; 3,1
13	125,0	-			126,4	-		
14	108,5	6,40	<i>dd</i>	1,8 ; 0,9	109,4	6,53	<i>dd</i>	1,9 ; 0,8
15	143,5	7,37	<i>dd</i>	1,8 ; 1,7	143,9	7,56	<i>sl</i>	
16	139,7	7,45	<i>ddd</i>	1,7 ; 0,9 ; 0,5	140,4	7,59	<i>sl</i>	
17	171,8	-			171,8	-		
18	179,2	-			178,3	-		
20	22,0	1,10	<i>s</i>		21,9	0,98	<i>s</i>	
OH	-	2,30	<i>sl</i>		-	5,69	<i>s</i>	

La constante de couplage de H-5 avec H-10 ($J = 12.5$ Hz) est en faveur d'une configuration relative *trans*. Comme le montre leur constante de couplage mutuelle, ($J = 12,1$ Hz), le proton H-10 est également en disposition *trans*-diaxiale avec H-1b, qui se trouve donc β -axial. Le proton H-2 est de ce fait β -équatorial. Le proton H-4 qui ne présente que de faibles couplages avec H-3a et 3b ($J = 5,1$ et $1,1$ Hz) est donc aussi β -équatorial. Les protons H-6 et

H-8 qui ne présentent également que de faibles couplages avec les protons du méthylène en 7 sont donc aussi en position β -équatoriale. En revanche, H-12 qui présente une constante de couplage caractéristique d'une disposition *trans*-diaxiale avec H-11b ($J = 12,3$ Hz) est α -axial sur le cycle C (Tableau 10).

Ces propositions de configuration relative sont confirmées par les corrélations NOEs observées sur le spectre NOESY (Figure 23C). Le méthine H-8 donne des corrélations intenses avec le méthyle -20 et les protons H-7b (β -axial) et H-11b (β -axial). De même, des corrélations intenses sont observées d'une part entre H-4 et à la fois H-3a, H-3b, H-5 et H-6 et d'autre part entre H-5 et H-6. Tous ces protons sont donc sur la même face β de la structure. Les protons H-10 et H-12 sont corrélés entre eux et non avec les précédents sont donc sur la face α .

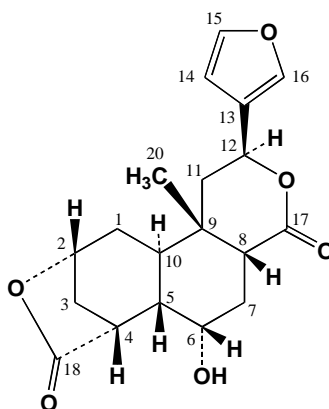


Figure 24 : 8-épi-diosbulbine E (**D11**).

L'ensemble de ces données permet de proposer pour le composé **D11**, la structure 8-épi-diosbulbine E : c'est donc un norditerpénoïde de la classe des clérodanes.

5.4.1.1.2. Structure du composé **D11'**

Pour confirmer la structure proposée et en particulier pour résoudre des superpositions de signaux observées dans le spectre enregistré pour **D11** en solution dans CDCl_3 , l'étude RMN a été reprise pour ce composé en solution dans la pyridine deutériée ($\text{Pyr}-d_5$). L'échantillon **D11'** a été isolé par recristallisation dans le méthanol de la fraction [20] issue de l'extrait de *D. antaly* par l'acétate d'éthyle.

Le spectre RMN ^1H réalisé dans de la pyridine- d_5 révèle dans la région des aromatiques la présence de deux singulets larges, à 7,56 et 7,59 ppm, ainsi qu'un doublet de doublet à 6,52 ppm, intégrant chacun pour un proton ; le singulet large à 5,69 ppm est attribué à un

hydroxyle. Les signaux entre 5,60 et 1,00 ppm sont attribués aux 18 autres protons de la molécule (*Tableau 9*).

Le spectre RMN ¹³C fait apparaître les signaux de 19 carbones dont quatre quaternaires à 34,8 ; 126,4 ; 171,8 et 178,3 ppm, quatre méthylènes à 28,4 ; 31,2 ; 38,6 et 39,5 ppm, un méthyle à 21,9 ppm et 10 méthines (*Tableau 9*). Les deux carbones C-6 et C-12 confondus à 69,4 ppm (en solution dans CDCl₃), sont maintenant distincts, respectivement à 68,8 et 69,5 ppm. L'analyse de leurs corrélations dans le spectre HMBC confirme la structure plane proposée précédemment pour **D11** (*Figures 23 A et B*) et celle de son spectre NOESY de la configuration relative de **D11** (*Figure 23 C*).

Tableau 10 : Corrélations observées dans les spectres de RMN 2D pour **D11** et **D11'**.

C n°	D11 (CDCl ₃)				D11' (pyridine-d ₅)			
	δC	COSY	HMBC (H→C)	NOESY	δC	COSY	HMBC (H→C)	NOESY
1	28,2	2	3,7,9,10 2,3,5,7,8,9,10,9,17,20	11,2	28,4		2,3,5,9,10,	5,2
2	78,0	3,1	3,4,7,10,19	3,1,11,5	77,6	3,1	5,10,19	3,1
3	38,3		1,2,4	1,2	38,6		1,2,4,19	1
4	43,3	3	7,10,3,5,6,12,2,19	3	43,6	3,5	2,5,6,10,19	5,3
5	42,7		7,10,9,3,4,19	20	43,4		3,4,10,19	3,2
6	69,4	11,5	11,14,13,15	7,4,8,10, 3	68,8	7,11		7,4,11
7	29,7	5,3	20,1,9,3,11,5,8,6,12,17	7,11,3	31,2	8	8,17	8,2
8	45,5	10	20,7,10,9,11,6,12,17	10,11, 20	45,9	7	20,10,7,9,6,17	7,11,20
9	34,6				34,8			
10	29,7	5,1	5,6,8,9 1,3,5,6,8,9,11,12,17,20	8	30,1	1,5	1,5,6,9,20	
11a b	39,6		5,6,7,8,9,10,12,13,19,20 1,2,3,5,7,8,9,10,17,20	20	39,5	5	8,9 8,9,10,12,13,20	20
12	69,4	10,6	4,7,8,10	7,1,11,3	69,5	11	13,14,15	10,11
13	125,0				126,4			
14	108,5		13,15,16	12	109,4		13,15,16	
15	143,5	14,15,16	13,14,16	16,14,12	143,9	12	13,14,16,	16
16	139,7	14	13,14,15	14	140,4			14
17	171,8				171,8			
19	179,2				178,3			
20	22,0		7,10		21,9		8,9,10,11,12,15,17	

Si la 8-épidiosbulbine E (**D11**) est un composé original, son dérivé acétylé avait été obtenu par différents auteurs à partir de *D. bulbifera* [Murray et al, 1984; Shriram et al. 2008]. Aussi, pour confirmer sa structure, le composé **D11** a été acétylé par le mélange

anhydride acétique/pyridine et le produit de la réaction comparé à l'acétate de la 8-épidiosbulbine E.

5.4.1.1.3. Structure du composé **D11** acétylé

Le composé **D11** a été acétylé par le mélange anhydride acétique/pyridine, puis le dérivé obtenu **D11Ac** purifié par cristallisation. Analysé par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF, en mode positif, il donne un ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ à $m/z = 389,1485$ correspondant à la formule brute $C_{21}H_{24}O_7$ (calc. pour $C_{21}H_{25}O_7$: 389,1608).

Le spectre de RMN ^{13}C (CD_3OD) comprend outre les 19 signaux analogues de ceux observés précédemment pour **D11**, deux signaux à 20,9 et 170,0 ppm, respectivement caractéristiques du méthyle et du carboxyle d'un groupe acétyle.

L'analyse des spectres de RMN 2D (1H - 1H COSY, HSQC, HMBC) de cette molécule permet de retrouver et d'attribuer tous les éléments de structure déjà décrits pour **D11** (*Tableau 11*). En particulier, le spectre HMBC présente de taches de corrélations entre :

- le carbonyle à 175,7 ppm (C-18) et les protons à 4,85 (H-2), 2,57 (H-4), 1,95 (H-5), 2,51 et 1,77 ppm (H-3a et 3b). Ceci implique la liaison de ce carbonyle de lactone avec le carbone C-4 et la fermeture du cycle lactonique sur le carbone C-2.
- le carbonyle à 170,8 ppm (C-17) et le proton à 4,85 (H-8), ce qui implique la liaison de ce carbonyle avec le carbone C-8.
- le carbonyle à 170,7 ppm (C-21) et les protons à 5,15 (H-6), 2,83 et 1,87 ppm (H-7a et 7b), 1,99 (CH_3 -22). Ce qui permet d'identifier le groupe acétyle et de le lier à l'oxygène du carbone C-6.

Le spectre NOESY montre des corrélations intenses entre le proton H-6 et les protons H-4, H-5, H-7éq et plus faiblement avec H-7ax. Le proton H-8 qui est fortement corrélé avec les protons H-7éq, H-7ax, H-11βax, est donc sur la face β : il est axial sur le cycle **C** et équatorial sur le cycle **B**. Les protons H-10 et H-12 sont fortement corrélés entre eux et sur la face α de la molécule.

Toutes ces données conduisent à la structure 6-acétyl-8-épidiosbulbine E pour **D11Ac**. Ces valeurs sont identiques à celles observées pour cette molécule en solution dans $CDCl_3$ par Murray [Murray et al., 1984]. Toutefois, certaines attributions qui avaient été proposées avec

des incertitudes par ces auteurs sont maintenant réalisées sans ambiguïtés [Shriram, 2008 ; Murray, 1984].

Tableau 11: Données de RMN ^{13}C et ^1H pour les composés **D11** (8-épi-diosbulbine E) et son dérivé acétylé **D11AC** en solution dans CDCl_3 (^1H : 400.13 MHz).

N°	D11 (CDCl_3)				Acétyl-D11(CDCl_3)			
	δ_{C}	δ_{H}	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)	δ_{C}	δ_{H}	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)
1a (éq)	28,2	2,10	<i>dddd</i>	13,3; 6,0 ; 4,9 ; 1,7	28,2	2,10	<i>dddl</i>	13,3 ; 6,0 ; 5,0
b (ax)	-	1,45	<i>ddd</i>	13,3 ; 12,2 ; 0,9	-	1,46	<i>ddd</i>	13,3 ; 12,0 ; 1,1
2 (éq)	78,0	4,85	<i>dd</i>	5,5 ; 4,9	76,4	4,85	<i>dd</i>	5,5 ; 4,7
3a (éq)	38,3	2,52	<i>dddd</i>	11,6; 5,5; 5,1 ; 1,7	38,6	2,51	<i>dddd</i>	11,4;5,7;5,5 ;1,7
b (ax)	-	1,77	<i>d</i>	11,6	-	1,77	<i>d</i>	11,5
4 (éq)	43,3	2,65	<i>ddl</i>	5,1 ; 1,1	42,0	2,57	<i>dd</i>	5,8 ; 1,6
5 (ax)	42,7	1,80	<i>ddd</i>	12,5 ; 2,0; 1,1	41,2	1,92	<i>ddd</i>	12,3 ; 2,0 ; 2,0
6 (éq)	69,4	4,14	<i>ddd</i>	2,5 ; 2,2 ; 2,0	69,0	5,15	<i>dddl</i>	2,8 ; 2,7 ; 2,7
7 a (éq)	29,7	2,75	<i>ddd</i>	14,7 ; 3,2 ; 2,2	26,8	2,83	<i>ddd</i>	15,1 ; 3,1 ; 2,1
b (ax)	-	1,88	<i>ddd</i>	14,7 ; 6,3 ; 2,5	-	1,87	<i>ddd</i>	15,1 ; 6,2 ; 2,6
8	45,5	2,25	<i>dd</i>	6,3 ; 2,1	45,9	2,31	<i>dd</i>	6,2 ; 2,1
9	34,6	-			34,5	-		
10 (ax)	29,7	2,71	<i>ddd</i>	12,5 ; 12,2 ; 6,0	31,6	2,60	<i>ddd</i>	12,3 ; 12,0 ; 4,0
11 a (éq)	39,6	2,08	<i>dd</i>	15,4 ; 3,1	39,7	2,11	<i>dd</i>	14,7 ; 3,3
b (ax)	-	1,74	<i>dd</i>	15,4 ; 12,3	-	1,78	<i>dd</i>	14,7 ; 12,6
12 (ax)	69,4	5,49	<i>dd</i>	12,3 ; 3,1	69,6	5,51	<i>dd</i>	12,6 ; 3,3
13	125,0	-			124,9	-		
14	108,5	6,40	<i>dd</i>	1,8 ; 0,9	108,6	6,41	<i>ddl</i>	1,9 ; 0,8
15	143,5	7,37	<i>dd</i>	1,8 ; 1,7	143,9	7,40	<i>ddl</i>	1,9 ; 1,6
16	139,7	7,45	<i>ddd</i>	1,7 ; 0,9 ; 0,5	139,9	7,48	<i>ddd</i>	1,6 ; 0,8 ; 0,8
17	171,8	-			170,8	-		
18	179,2	-			175,7	-		
20	22,0	1,10	<i>s</i>		21,9	1,16	<i>s</i>	
OH	-	2,30	<i>sl</i>		-	-		
21 CO	-	-			170,7	-		
22 CH3	-	20,9			1,99	<i>s</i>		

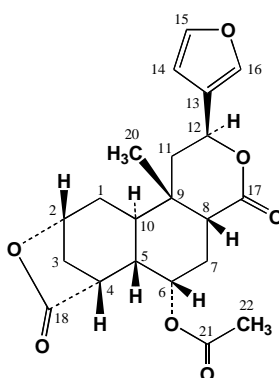


Figure 25 : Structure de la 6-O-acétyl-8-épidiosbulbine E.

5.4.1.2. Structure du composé **D7**, diosbulbine E

Le spectre de masse ESI-Q-TOF, en mode positif, du composé **D7** montre l'ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ à $m/z = 347,1378$ correspondant à la formule brute $C_{19}H_{22}O_6$ (calc. pour $C_{19}H_{23}O_6$: 347,1493). Cette formule implique 9 degrés d'insaturation.

Le spectre de RMN ^{13}C de **D7** en solution dans $CDCl_3$, fait apparaître les 19 carbones de la formule brute, qui se répartissent en : quatre carbones quaternaires, l'un sp^3 à 35,9, un autre sp^2 à 124,2 et deux carboxyles à 174,2 et 180,0 ppm, quatre méthylènes (CH_2) à 28,5 ; 28,9 ; 38,6 et 42,3 ppm, un méthyle à 18,3 ppm et dix méthines à 39,0 ; 41,0 ; 42,9 ; 43,6 ; 69,4 ; 70,0 ; 78,4 ; 108,5 ; 139,6 et 143,7 ppm ; trois de ces méthines sont liés à un atome d'oxygène car leur déplacement chimique est entre 60,0 et 80,0 ppm et les trois derniers sont des carbones sp^2 (Tableau 12). L'attribution complète des protons et des carbones a été réalisée grâce à l'analyse des spectres de RMN 2D. Comme la molécule possède 9 degrés d'insaturation, dont deux doubles liaisons et deux carbonyles, elle comporte 5 cycles.

Le spectre RMN 1H de **D7** ($CDCl_3$) laisse apparaître, dans la région des aromatiques, trois signaux à 7,44 ; 7,40 et 6,39 ppm attribués à des protons éthyléniques ou aromatiques, mais caractéristiques d'un groupe furane monosubstitué. Entre 4,0 et 5,5 ppm, on observe les signaux de trois protons méthines liés à un carbone lui-même lié à un atome d'oxygène : un doublet de doublet à 5,36 ppm (H-12), à 4,23 ppm un doublet de doublet dédoublé (H-6) et un doublet de doublet à 4,92 ppm. Entre 3,30 et 1,30 ppm on observe les signaux complexes de 12 protons et à 0,98 ppm celui intense d'un méthyle singulet.

L'examen du spectre 1H - 1H COSY a permis de mettre en évidence les quatre sous-structures **a** à **d** suivantes (Figure 26) :

- le proton à 2,68 ppm (H-4) est corrélé aux protons à 2,53 et 1,78 ppm du méthylène (CH_2 -3), qui sont corrélés à celui à 4,92 ppm (H-2), lui-même corrélé aux protons du méthylène à 2,12 et 1,42 ppm (CH_2 -1). L'ensemble définit la sous-structure **a**. Une corrélation de faible intensité est observée entre H-2 et H-4, attribuable à un couplage en *W* et suggérant que ces deux protons sont en position équatoriale à quatre liaisons de distance ;
- le proton à 3,20 ppm (H-8) est corrélé aux protons à 2,14 et 1,75 ppm du méthylène (CH_2 -7), eux-mêmes corrélés au proton du l'oxyméthine à 4,23 ppm (H-6). Ce dernier est corrélé au proton à 1,72 (H-5) qui est corrélé au proton à 2,39 (H-10). Ces

données permettent de construire la sous-structure **b**. Il est important d'observer que les protons (H-8), (H-7b) et (H-10) présentent tous une constante de couplage caractéristique d'une disposition *trans*-diaxiale : $J \approx 12,5$ Hz (Tableau 12) ;

- le proton oxyméthine à 5,36 ppm (H-12) est corrélé aux deux protons à 1,77 et 2,13 ppm du méthylène (CH₂) en position 11, formant ainsi la sous-structure **c** ;
- le proton à 6,39 ppm est couplé aux protons à 7,44 et 7,40 ppm formant un cycle furanique monosubstitué (sous-structure **d**).

Le spectre HSQC a permis de corréler les carbones protonés aux protons auxquels ils sont liés.

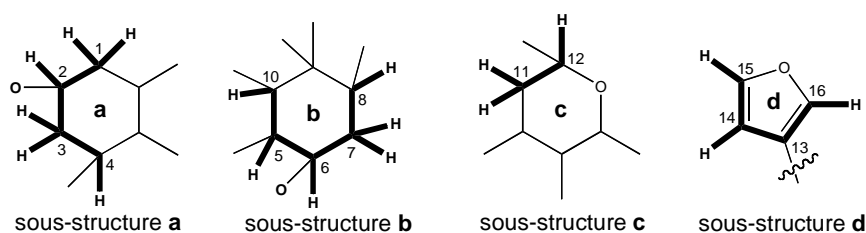


Figure 26 : Sous-structures **a**, **b**, **c** et **d** déduites du spectre H-H COSY du composé **D7**.

Les différentes corrélations à longue distance, observées sur le spectre HMBC ont permis de relier entre elles les différentes sous-structures **a** à **d** de la Figure 26 (Tableau 12) :

- le proton H-15 à 7,40 ppm porté par le carbone à 143,7 ppm, est fortement corrélé aux carbones à 124,2 et 139,6 ppm, et faiblement à celui à 108,5 ppm (C-14). Le proton H-16 (7,45 ppm) lié au carbone à 139,7 ppm, est fortement corrélé avec ceux à 108,5, 124,2 et 143,7 ppm. Le proton H-14 à 6,39 ppm lié au carbone à 108,5 ppm est fortement corrélé aux carbones C-13, C-15 et C-16, constituant ainsi le cycle furanique **d**. Celui-ci est relié au cycle **c**, *via* une liaison entre les carbones C-12 et C-13, car le spectre HMBC montre des taches de corrélation intenses entre les carbones C-13, C-14 et C-16 et le proton H-12 à 5,36 ppm et entre le carbone C-13 et les protons du méthylène CH₂-11 à 2,13 et 1,77 ppm ;
- les protons du méthyle à 0,98 ppm liés au carbone à 18,3 ppm, corrélaient avec les carbones à 39,0 (C-10) ; 35,9 (C-9) ; 42,3 (C-11) et 41,0 ppm (C-8), ce qui permet de lier ce méthyle au carbone C-9 et de relier les cycles **b** et **c** ;
- le proton à 2,39 ppm (H-10) porté par le carbone qui résonne à 39,0 ppm corréla avec les carbones à 69,4 (C-6) ; 41,0 (C-8) ; 42,9 (C-5) et 35,9 ppm (C-9), ce qui permet de fermer le cycle **b**. De plus, comme il est corrélé aux carbones à 28,5 ppm (C-1) et à 78,4 ppm (C-2), les sous-structures **a** et **b** peuvent être reliées entre elles ;

- les corrélations du carbone à 42,9 ppm (C-5) avec les protons à 2,39 (H-10), 2,14 et 1,75 (CH₂-7) et 2,68 ppm (H-4) permettent de fermer le cycle **a** en le reliant à la sous-structure **b** ;
- le carbonyle de lactone à 180,0 ppm (C-18) est corrélé non seulement avec les protons H-3b, H-4 et H-5, ce qui confirme sa liaison avec le carbone C-4, mais aussi avec le proton H-2 à 4,92 ppm, en donnant une tache de corrélation intense. Ceci est expliqué par la fermeture du cycle lactonique sur la position -2.

Les cinq cycles que comporte la molécule sont ainsi définis et l'ensemble de ces données conduit ainsi à proposer pour le composé **D7**, la structure plane de la figure 27 A.

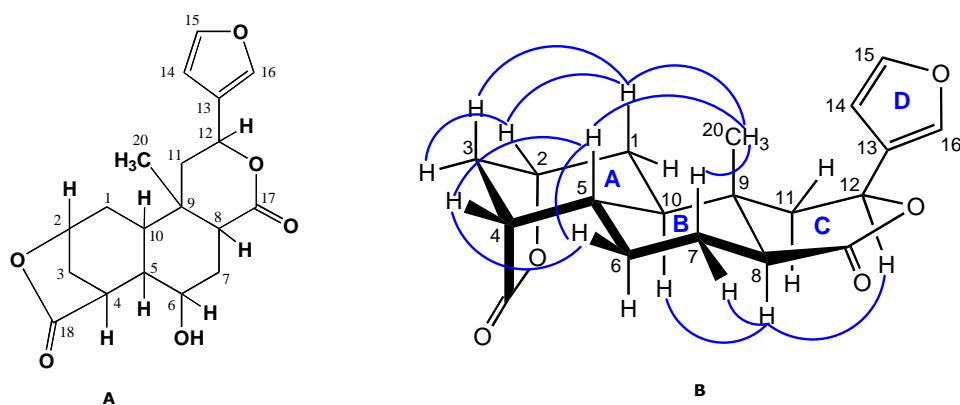


Figure 27 : **A** : Structure plane du composé **D7**; **B** : Principaux NOEs (en bleu) observés dans le spectre NOESY.

La constante de couplage de H-5 avec H-10 ($J = 12,4$ Hz), est en faveur d'une configuration relative *trans*-diaxiale ; le proton H-10 est également en disposition *trans*-diaxiale avec H-1b comme le montre leur constante de couplage mutuelle, ($J = 12,5$ Hz) qui se trouve donc β -axial. H-2 est de ce fait β -équatorial. Le proton H-4 qui ne présente que de faibles couplages avec H-3a et 3b ($J = 5,5$ et $1,8$ Hz) est donc β -équatorial. Le proton H-6 qui ne présente également que de faibles couplages avec les protons du méthylène en 7 ($J = 3,4$ et $2,2$ Hz) est aussi en position β -équatoriale sur le cycle B. En revanche, H-12 qui présente une constante de couplage caractéristique d'une disposition *trans*-diaxiale avec H-11b ($J = 11,2$ Hz) est α -axial sur le cycle C. De même, le proton H-8 qui présente une constante de couplage caractéristique d'une disposition *trans*-diaxiale avec H-7b ($J = 12,2$ Hz) et une faible avec H-7a ($J = 3,6$ Hz) est β -axial sur le cycle C (Tableau 12).

Tableau 12 : Données de RMN ^{13}C et ^1H pour le composé **D7** (diosbulbine E) en solution dans CDCl_3 (^1H : 400.13 MHz).

N°	D7 (CDCl_3)			
	δ_{C}	δ_{H}	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)
1a (éq)	28,5	2,12	<i>dl</i>	13,2
b (ax)	-	1,42	<i>ddd</i>	13,2 ; 12,5 ; 0,7
2 (éq)	78,4	4,92	<i>dd</i>	5,3 ; 5,0
3a (éq)	38,6	2,53	<i>dddd</i>	11,7 ; 5,5 ; 5,3 ; 1,9
b (ax)	-	1,78	<i>dl</i>	11,7
4 (éq)	43,6	2,68	<i>ddl</i>	5,4 ; 1,5
5 (ax)	42,9	1,72	<i>ddd</i>	12,4 ; 2,0 ; 1,5
6 (éq)	69,4	4,23	<i>ddd</i>	2,6 ; 2,6 ; 2,0
7 a (éq)	28,9	2,14	<i>dl</i>	14,6 ; 2,6
b (ax)	-	1,75	<i>dd</i>	14,6 ; 12,2
8 (ax)	41,0	3,20	<i>dd</i>	12,2 ; 3,6
9	35,9	-		
10 (ax)	39,0	2,39	<i>ddd</i>	12,5 ; 12,4 ; 5,5
11a (éq)	42,3	2,13	<i>dd</i>	15,0 ; 6,1
b (ax)	-	1,77	<i>dd</i>	15,0 ; 11,2
12 (ax)	70,0	5,36	<i>dd</i>	11,2 ; 6,1
13	124,2	-		
14	108,5	6,39	<i>dd</i>	1,7 ; 1,0
15	143,7	7,40	<i>dd</i>	1,7 ; 1,7
16	139,6	7,44	<i>dd</i>	1,7 ; 1,0
17	174,2	-		
18	180,0	-		
20	18,3	0,98	<i>s</i>	
OH	-	2,35	<i>sl</i>	

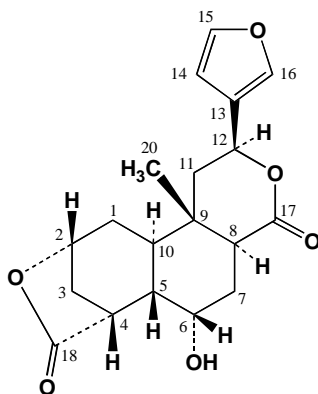


Figure 28 : diosbulbine E (D7).

Les corrélations NOE observées sur le spectre NOESY confirment ces propositions de configuration relative. Le méthine H-8 ne donne pas de corrélation avec le méthyle -20, mais en donne d'intenses avec les protons H-7a (α -équatorial), H-10 (α -axial) et H-12 (α -axial). Ces protons sont sur la face α de la structure. De même des corrélations intenses sont observées d'une part entre H-4 et à la fois H-3b (β -axial), H-5 et H-6 (β -équatorial) et d'autre

part entre H-5 et H-6 et enfin entre le CH₃-20 et les protons H-1b (β -axial), H-5 (β -axial) et H-7b (β -axial). Tous ces protons sont donc sur la même face β de la structure (*Figure 27 B*).

L'ensemble de ces données permet de proposer pour le composé **D7**, la structure de la diosbulbine E, qui est un norditerpénoïde de la classe des clérodanes, isolé de *Dioscorea bulbifera* par Ida *et al.* (1978) (*Figure 28*). Cette structure est épimère en position 8 de celle de **D11**.

5.4.1.3. Structure du composé D12 : 8-épidiosbulbine G

Le composé **D12** a été isolé sous forme d'un solide amorphe, optiquement actif, $[\alpha]_D^{20}$ -20 (*c* 0,3, CHCl₃). Le spectre de masse ESI-Q-TOF, en mode positif, du composé **D12** montre l'ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ à $m/z = 347,1403$ correspondant à la formule brute C₁₉H₂₂O₆ (calc. pour C₁₉H₂₃O₆: 347,1493) impliquant 9 degrés d'insaturation. Le spectre d'absorption dans l'infrarouge de **D12** présente des bandes à ν 1759 et 1719 cm⁻¹ (lactones), à 3484 cm⁻¹ (hydroxyles) et à 3150 et 1503 cm⁻¹ suggérant la présence d'un cycle furanique.

Le spectre de RMN ¹³C de **D12** en solution dans la pyridine-*d*₅, comporte les 19 carbones de la formule brute, qui se répartissent en : quatre carbones quaternaires l'un *sp*³ à 33,5, un autre *sp*² à 126,1, ainsi que deux carboxyles à 172,1 et 178,2 ppm, quatre carbones secondaires (CH₂) à 25,8 ; 30,6 ; 40,4 et 46,3 ppm, un méthyle à 21,6 ppm et dix méthines à 28,7 ; 38,5 ; 40,5 ; 46,3 ; 64,5 ; 70,2 ; 76,2 ; 109,3 ; 140,4 et 144,0 ppm ; trois de ces méthines sont liés à un atome d'oxygène car leur déplacement chimique est entre 60,0 et 80,0 ppm et les trois derniers sont des carbones *sp*² (*Tableau 13*). L'attribution complète des protons et des carbones a été réalisée grâce à l'analyse des spectres de RMN 2D. Comme la molécule possède 9 degrés d'insaturation dont deux doubles liaisons et deux carbonyles, elle comporte cinq cycles.

Le spectre de RMN ¹H de **D12** en solution dans la pyridine-*d*₅ comporte les mêmes éléments de structure que ceux décrits précédemment pour la diosbulbine E (**D7**) et la 8-épidiosbulbine E (**D11**). En particulier l'analyse du spectre COSY permet de définir les mêmes sous-structures **a-d** que celles décrites plus haut. L'analyse du spectre HMBC permet de relier ces sous-structures de façon similaire à la 8-épidiosbulbine E, comme indiqué dans la *figure 29A*.

Ainsi, le carbone quaternaire C-9 est corrélé avec les protons de CH₃-20, H-12, -CH₂-7, H-10, -CH₂-1 et H-8, ce qui permet d'assembler les sous-structures **a**, **b** et **c**.

Le carbonyle lactonique à 172,1 ppm (C17) est corrélé fortement aux protons à 2,18 et 3,00 ppm (-CH₂-7) et à 2,51 ppm (H-8) ce qui conduit à le lier au carbone C-8, et plus faiblement au proton à 5,82 ppm (H-12) ce qui permet de refermer le cycle C sur cette position.

Le carbonyle lactonique à 178,2 ppm (C18) est corrélé fortement aux protons à 1,88 et 2,54 ppm (-CH₂-3), à 2,85 ppm (H-4) et à 2,22 ppm (H-5) ce qui conduit à le lier à C-4. La corrélation de ce carbonyle avec le proton H-2 n'est pas observée, alors qu'elle est intense dans les exemples précédents. Ceci conduit à proposer la fermeture de la lactone sur un autre carbone. Comme les déplacements chimiques du carbone C-6 et du proton H-6 sont plus forts que dans le cas de la diosbulbine E, il est proposé que la fonction alcool en C-6 soit estérifiée et donc que la cyclisation soit comme présentée dans la *figure 29 A*. Le fait que la corrélation C-18 à H-6 ne soit pas observée dans le spectre HMBC est expliqué par la valeur de l'angle de torsion C-18/O/C-6/H-6 qui est proche de 90°, ce qui se traduit pas une constante de couplage $J_{C-18/H-6}$ nulle et donc l'absence de corrélation observable.

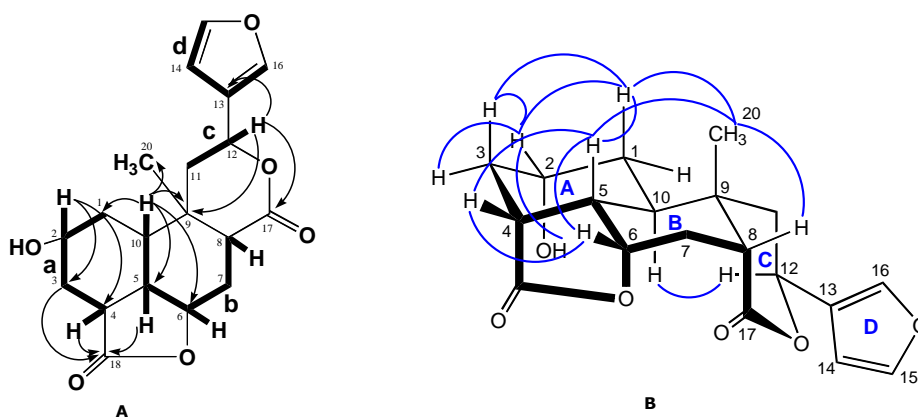


Figure 29 : **A** : Corrélations HMBC et structure plane du composé **D12** ; **B** : Principaux NOEs (en bleu) observés dans le spectre NOESY du composé **D12**.

La constante de couplage entre H-5 et H-10 ($J = 12,2$ Hz) est caractéristique d'une disposition *trans*-diaxiale, la jonction des cycles A et B est donc *trans*. Comme le proton H-1b, β -axial ne donne pas de constante de couplage *trans*-diaxiale avec H-2, ce dernier est β -equatorial.

Le spectre NOESY fait apparaître une tache de corrélation intense entre le groupe hydroxyle à 5,10 ppm et le proton H-2 à 4,35 ppm, ce qui confirme la présence de l'hydroxyle sur cette position -2 et donc la lactonisation du carbonyle C-18 avec l'oxygène en C-6. Il présente également des taches de corrélation intenses entre H-6 et à la fois H-7a, H-7b, H-5 et H-4, entre H-5 et H-4, entre H-4 et à la fois H-3a et H-3b et entre H-1b (axial) et H-3b (axial), H-2 (équatorial) et H-5 (axial) sur la face β de la molécule. Ces données sont en accord avec la disposition β -équatoriale des protons H-2 et H-4 sur le cycle A. Le proton H-12 donne des corrélations NOESY avec H-10 (α -axial) : il est donc en position α -axiale sur le cycle C, ce qui est en accord avec ses constantes de couplage ($J_{H12-H11ax} = 12,5$ Hz). Enfin, le méthyle CH₃-20 est corrélé avec les protons H-5 (β -axial), H-1b (β -axial), H-8 (β -équatorial), H-11a et H-11b, et le proton H-8 avec H7a (α -équatorial). Ces données sont interprétées par la disposition des protons H-2, H-4, H-5, H-6, H-8 et Me-20 sur la face β et H-10 et H-12 sur la face inférieure α de la molécule.

En conclusion, l'analyse des spectres de RMN 2D conduit à proposer pour **D12** non seulement la même structure plane que la diosbulbine G, mais aussi la même configuration relative pour l'ensemble des carbones, à l'exception du carbone C-8 pour lequel le proton H-8 β -équatorial sur le cycle B pour **D12**, alors qu'il est α -axial pour la diosbulbine G. La diosbulbine G avait été isolée auparavant de *D. bulbifera* par Ida *et al.* (1978a ; 1978b) et ses spectres de RMN attribués plus récemment [Lentini *et al.*, 2005]. **D12** est ainsi un nouveau composé que nous proposons de nommer 8-épi-diosbulbine G.

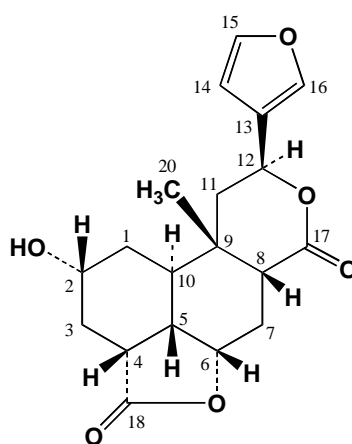


Figure 29C : 8-épi-diosbulbine G (D12)

Tableau 13: Données de RMN ^{13}C et ^1H pour le composé **D12** (8-épidiosbulbine G) en solution Pyr- d_5 (^1H : 400.13 MHz).

N°	D12 (Pyr- d_5)			
	δ_{C}	δ_{H}	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)
1a (éq)	30,6	1,79	<i>dp</i>	12,8 ; 72,0
b (ax)		1,16	<i>ddd</i>	12,8; 12,8 ; 2,2
2 (éq)	64,5	4,35	<i>m</i>	
3a (éq)	30,3	2,54	<i>dq</i>	14,5 ; 2,0
b (ax)		1,88	<i>dp</i>	14,5 ; 2,0
4 (éq)	40,5	2,85	<i>ddd</i>	7,8 ; 6,2 ; 1,5
5 (ax)	38,5	2,22	<i>ddd</i>	12,2 ; 4,0 ; 2,5
6 (éq)	76,2	4,48	<i>ddd</i>	5,7 ; 4,9 ; 4,0
7a (éq)	25,8	3,00	<i>ddd</i>	15,3 ; 5,9 ; 3,0
b (ax)		2,18	<i>ddd</i>	15,3; 5,9 ; 4,9
8 (éq)	46,3	2,51	<i>dd</i>	5,9 ; 5,9
9	33,5	-		
10 (ax)	28,7	2,65	<i>ddd</i>	12,8 ; 12,2 ; 2,2
11a (éq)	40,4	2,23	<i>dd</i>	14,6 ; 2,8
b (ax)		1,83	<i>dd</i>	14,6 ; 12,5
12 (ax)	70,2	5,82	<i>dd</i>	12,5 ; 2,8
13	126,1	-		
14	109,3	6,51	<i>dd</i>	2,0 ; 1,0
15	144,0	7,54	<i>dd</i>	2,0 ; 1,8
16	140,4	7,59	<i>sl</i>	
17	172,1	-		
18	178,2	-		
20	21,6	0,97	<i>s</i>	
OH-2	-	5,10	<i>s</i>	

5.4.1.4. Structure du composé D5 antadiosbulbine A

Le composé **D5** a été isolé sous forme d'un solide amorphe, optiquement actif, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 45$ (*c* 0,7, CHCl_3). L'ion moléculaire protoné $[\text{M}+\text{H}]^+$ du composé **D5** en spectrométrie de masse ESI-Q-TOF, mode positif, est observé à $m/z = 405,1519$ et correspond à la formule brute $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_8$ (calc. pour $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{O}_8$: 405,1548) qui implique 10 degrés d'insaturation. Son spectre d'absorption dans l'infrarouge présente des bandes intenses à ν 1740 cm^{-1} (ester et lactones), à 3447 cm^{-1} (hydroxyles) et à 3150 et 1506 cm^{-1} en faveur de la présence d'un cycle furanique.

Le spectre de RMN ^{13}C de **D5** en solution dans CD_3OD , fait apparaître les 21 carbones de la formule brute, qui se répartissent en :

- sept carbones quaternaires dont trois *sp*³ à 37,2 ; 53,3 et 76,5, un *sp*² à 125,9 et trois carboxyles à 174,0 ; 176,7 et 177,2 ppm ;
- cinq carbones secondaires (CH_2) à 19,7 ; 24,1 ; 28,1 ; 40,2 et 44,0 ppm ;

- un méthyle singulet à 20,6 ppm ;
- une méthoxyle à 53,4 ppm ;
- et huit méthines dont cinq sp^3 à 47,8 ; 48,0 ; 53,3 ; 71,6 ; 74,3 et trois sp^2 à 109,7 ; 141,6 et 145,1 ppm. Deux de ces méthines sp^3 sont liés à un atome d'oxygène car leur déplacement chimique est entre 70,0 et 80,0 ppm (Tableau 14).

Comme la molécule possède 10 degrés d'insaturation, dont deux doubles liaisons et trois carbonyles, elle comporte 5 cycles. L'attribution complète des protons et des carbones a été réalisée grâce à l'analyse des spectres de RMN 2D.

Le spectre RMN 1H de **D5** (CD_3OD) laisse apparaître, dans la région des aromatiques, la présence de trois signaux à 7,56 ; 7,50 et 6,49 ppm attribués à des protons éthyléniques et caractéristiques d'un groupe furane monosubstitué, comme dans les exemples précédents.

Entre 3,00 et 1,50 ppm, sont observés les signaux de deux protons méthines et les signaux complexes de 10 protons attribués à 5 méthylènes grâce à l'étude du spectre HSQC. Enfin, on observe à 0,90 ppm le signal intense d'un méthyle singulet.

L'examen du spectre 1H - 1H COSY a permis de mettre en évidence les quatre sous-structures **a** à **d** suivantes (Figure 30) :

- le proton à 2,20 ppm (H-10) est corrélé aux protons à 2,32 et 1,63 ppm du méthylène (CH_2 -3) qui sont corrélés à celui à 4,92 ppm (H-2), lui-même corrélé aux protons du méthylène à 2,77 et 2,13 ppm (CH_2 -3). Les corrélations de H-2 sont fortes avec H-1a et H-3b et faibles avec H-1b et H-3a. L'ensemble définit la sous-structure **a** ;
- le proton à 2,78 ppm (H-8) est corrélé aux protons à 1,91 et 1,56 ppm du méthylène (CH_2 -7), eux-mêmes corrélés aux protons du méthylène à 2,62 et 2,06 ppm (CH_2 -6). Ces données permettent de construire la sous-structure **b**. Il est important d'observer que les protons (H-8), (H-7b) et (H-10) présentent tous une constante de couplage caractéristique d'une disposition *trans*-diaxiale : $J \# 12,0$ Hz (Tableau 14) ;
- le proton oxyméthine à 5,50 ppm (H-12) est corrélé aux deux protons à 1,86 et 2,07 ppm du méthylène (CH_2) en position 11, formant ainsi la sous-structure **c** ;
- le proton à 6,49 ppm (H-14) est couplé aux protons à 7,50 et 7,56 ppm formant le cycle furanique monosubstitué suggéré plus haut (sous-structure **d**).

Le spectre HSQC a permis de corréler les carbones protonés aux protons auxquels ils sont liés.

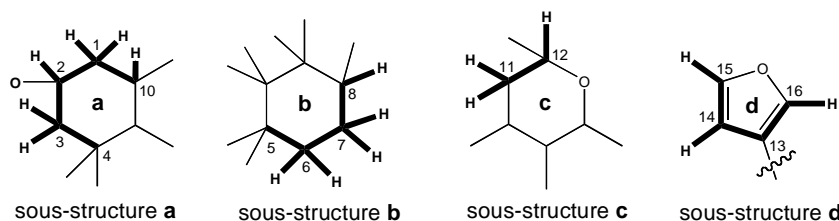


Figure 30 : Sous-structures **a**, **b**, **c** et **d** déduites du spectre H-H COSY du composé **D5** (liaisons en caractère gras)

Les corrélations à longue distance observées sur le spectre HMBC ont permis de relier entre elles ces sous-structures **a** à **d** (*Figure 15* et *Tableau 14*) :

- les corrélations du carbonyle à 174,0 ppm (C-18) d'une part avec les protons H-3a et H-2 et d'autre part avec ceux du méthoxyle à 3,80 permettent respectivement de le lier au carbone C-4 et à ce méthoxyle : la molécule comporte donc une fonction carboxyméthyle en position C-4. Le déplacement chimique de ce carbone C-4 (76,5 ppm) indique qu'il est également lié à un atome d'oxygène ;
- les corrélations du carbonyle lactonique à 174,0 ppm (C-19) d'une part avec les protons à 2,60 (H-6a), 2,06 (H-6b) et 2,20 ppm (H-10) permettent de le lier au carbone C-5, et d'autre part sa corrélation intense avec le proton H-2 conduit à refermer le cycle lactonique sur le carbone C-2 ;
- le carbonyle lactonique à 176,7 ppm (C-17) est corrélé avec les protons à 1,91 (H-7a), 1,56 (H-7b) et 2,78 ppm (H-8), ce qui indique qu'il est lié au carbone C-8 et sa corrélation avec le proton à 5,50 ppm (H-12), que ce cycle lactonique doit être refermé sur le carbone C-12 ;
- les protons du méthyle CH₃-20 sont fortement corrélés aux carbones à 48,0 (C-9), 47,8 (C-10) et 44,0 ppm (C-11). Ce méthyle CH₃-20 est donc lié au carbone C-9 et ces données permettent aussi de relier les sous-structures **a**, **b** et **c**.
- le carbone quaternaire à 125,9 (C-13) du groupe furanique est non seulement corrélé aux trois protons de ce cycle, mais aussi aux protons à 5,50 (H-12) et 1,86 ppm (H-11b) ce qui conduit à lier le groupe furane au carbone C-12.

Les autres corrélations du spectre HMBC confirment ces assemblages. Les cinq cycles que comporte la molécule sont ainsi définis et l'ensemble de ces données conduit ainsi à proposer pour le composé **D5**, la structure plane de la *figure 31* suivante:

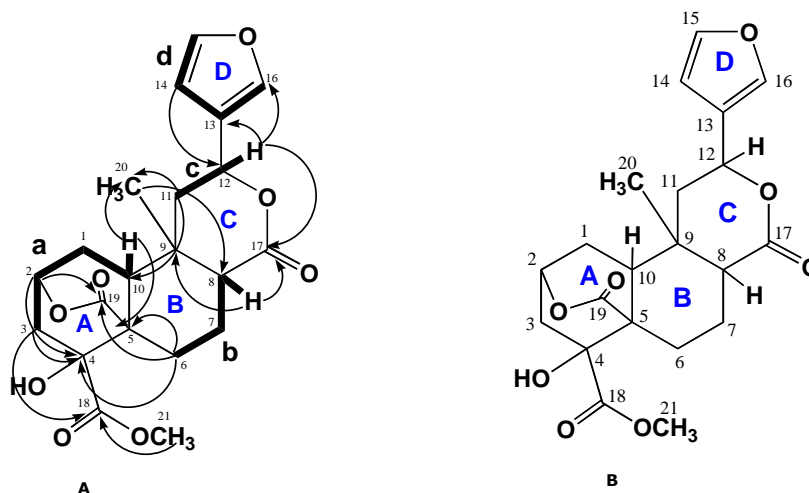


Figure 31 : Antadiosbulbine A. **A** : Corrélations HMBC (flèches) permettant d'assembler les sous-structures **a-d** issues du H-H COSY (traits gras) de **D5**; **B** : Structure plane du composé **D5**.

Tableau 14 : Données de RMN ^{13}C et ^1H pour le composé **D5** (antadiosbulbine A) en solution dans CDCl_3 (^1H : 400.13 MHz).

C n°	D5 (CDCl_3)				D5 (CD_3OD)			
	δ_{C}	δ_{H}	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)	δ_{C}	δ_{H}	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)
1a	27,1	2,31	<i>m</i>		28,1	2,32	<i>dddd</i>	13,4 ; 11,2 ; 5,2; 2,1
b	-	1,57	<i>dd</i>	13,3 ; 8,8	-	1,63	<i>dd</i>	13,4 ; 8,2
2	72,1	4,90	<i>dd</i>	5,2 ; 5,2	74,3	4,90	<i>dd</i>	5,2 ; 5,2
3a	38,6	2,70	<i>ddd</i>	14,9 ; 1,1 ; 1,1	40,2	2,77	<i>d</i>	14,8
b	-	2,26	<i>m</i>		-	2,13	<i>ddd</i>	14,8 ; 5,2 ; 2,1
4	75,9	-			76,5	-		
5	52,2	-			53,3	-		
6a (éq)	23,1	2,34	<i>m</i>		24,1	2,62	<i>ddd</i>	15,1 ; 3,9 ; 3,0
b (ax)	-	2,14	<i>m</i>		-	2,06	<i>ddd</i>	15,1 ; 14,5 ; 5,0
7a (éq)	18,3	2,04	<i>dddd</i>	14,2; 4,8; 3,2; 3,2	19,7	1,91	<i>dddd</i>	14,8; 5,0; 3,0; 3,0
b (ax)	-	1,44	<i>dddd</i>	14,2;14,2;12,0;3,2	-	1,56	<i>dddd</i>	14,8;14,5; 12,4;3,9
8 (ax)	46,7	2,48	<i>dd</i>	12,0 ; 3,2	48,0	2,78	<i>dd</i>	12,4 ; 3,0
9	36,0	-			37,2	-		
10 (ax)	46,2	2,09	<i>m</i>		47,8	2,20	<i>dd</i>	11,2 ; 8,2
11a (éq)	43,6	1,94	<i>dd</i>	14,1 ; 6,4	44,0	2,07	<i>dd</i>	14,5 ; 6,3
b (ax)	-	1,83	<i>dd</i>	14,1 ; 11,0	-	1,86	<i>dd</i>	14,5 ; 12,0
12 (ax)	69,9	5,33	<i>dd</i>	11,0 ; 6,4	71,6	5,50	<i>dd</i>	12,0 ; 6,3
13	124,0	-			125,9	-		
14	108,4	6,37	<i>dd</i>	1,9 ; 0,9	109,7	6,49	<i>dd</i>	1,8 ; 0,8
15	143,8	7,40	<i>dd</i>	1,7 ; 1,7	145,1	7,50	<i>dd</i>	1,8 ; 1,6
16	139,6	7,42	<i>ddd</i>	1,6 ; 0,9 ; 0,9	141,6	7,56	<i>ddd</i>	1,6 ; 0,9 ; 0,8
17	172,9	-			176,7	-		
18	173,9	-			174,0	-		
19	172,1	-			177,2	-		
20	20,2	0,83	<i>s</i>		20,6	0,90	<i>s</i>	
21	53,5	3,83	<i>s</i>		53,4	3,80	<i>s</i>	
OH-4	-	3,45	<i>s</i>		-	-		

Les constantes de couplage de H-10 avec H-1a ($J = 11,2$ Hz) et H-1b ($J = 8,2$ Hz) sont en faveur d'une configuration relative *trans*-diaxiale entre H-10 et H-1a.

Le proton H-8 est également en disposition *trans*-diaxiale avec H-7b comme le montre leur constante de couplage mutuelle, ($J = 12,4$ Hz) et H-8 se trouve donc β -axial sur le cycle C. Le proton H-12 est également en disposition *trans*-diaxiale avec H-11b comme le montre leur constante de couplage mutuelle, ($J = 12,0$ Hz) et H-12 se trouve donc α -axial sur le cycle C (*Tableau 14*).

Les corrélations NOE observées sur le spectre NOESY confirment ces propositions et permettent de déterminer la configuration relative de la molécule. Le méthine H-8 ne donne pas de corrélation avec le méthyle CH₃-20, mais en donne d'intenses avec les protons H-7a (α -équatorial), H-10 (α -axial) et H-12 (α -axial). Ces protons sont donc sur la face α de la structure. De même, des corrélations intenses sont observées d'une part entre H-2 et à la fois H-1a, H-1b, H-3a et H-3b : H-2 étant équatorial, il donne des interactions avec ses quatre voisins axiaux et équatoriaux. D'autre part, les NOEs intenses entre CH₃-20 et H-3a, H-7b, H-11a et H-14 indiquent que tous ces protons sont sur la face β de la molécule.

La structure de ce composé **D5** en solution dans CDCl₃ a été également analysée par RMN 2D. Les résultats confirment la structure proposée et les attributions sont rassemblées dans le *tableau 14*. En particulier, l'analyse du spectre NOESY est en accord avec la configuration relative proposée : d'une part H-8 sur la face α est fortement corrélés avec H-12, H-10 et H-7a (α -équatorial). D'autre part, le méthyle CH₃-20, sur la face β , est fortement corrélé à H-3a, H-7b (β -axial), H-11a (β -équatorial) et OCH₃-21. Ce groupe méthoxyle-21, est de plus corrélé avec H-3a et H-7b, ce qui conduit à le disposer comme indiqué sur la *figure 32A*. De plus, les corrélations observées entre le proton de l'hydroxyle à 3,44 ppm et H-6a (α -équatorial) et H-3b, confirment la liaison de cet hydroxyle avec le carbone C-4.

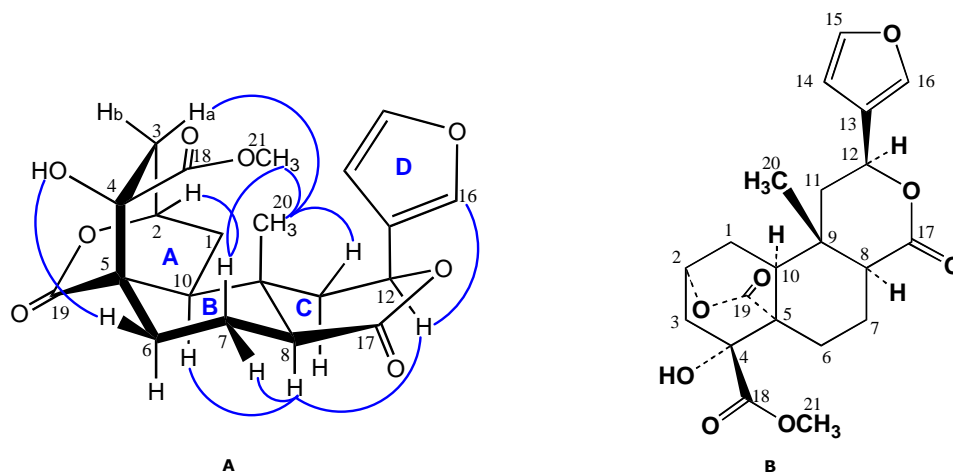


Figure 32 : **A** : sélection de corrélations NOE observées sur le spectre NOESY de l'antadiosbulbine A (**D5**). **B** : structure de l'antadiosbulbine A.

L'ensemble de ces données permet de proposer pour le composé **D5**, la structure de la figure 32. C'est un nouveau norditerpénoïde de la classe des clérodanes que nous avons proposé de nommer antadiosbulbine A.

5.4.1.5. Structure du composé **D6** antadiosbulbine B

Le composé **D6** a été isolé sous forme d'un solide amorphe, optiquement actif, $[\alpha]_D^{20}$ -28 (c 0,4, CHCl_3). Le spectre de masse ESI-Q-TOF, en mode positif, du composé **D6** présente l'ion moléculaire protoné $[\text{M}+\text{H}]^+$ à $m/z = 405,1627$ correspondant à la formule brute $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_8$ (calc. pour $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{O}_8$: 405,1548) impliquant dix degrés d'insaturation. Dans le spectre d'absorption dans l'infrarouge de **D6**, sont observées des bandes à ν 1750 et 1735 cm^{-1} (ester et lactone), à 3447 cm^{-1} (hydroxyles) et à 3150 et 1505 cm^{-1} suggérant la présence d'un cycle furanique.

Le spectre de RMN ^{13}C de **D6** en solution dans CD_3OD , comporte les 21 carbones de la formule brute, qui se répartissent en :

- sept carbones quaternaires dont trois sp^3 à 36,3 ; 53,0 et 77,0 un sp^2 à 126,5 et trois carboxyles à 174,0 ; 174,5 et 177,0 ppm,
- cinq méthylènes (CH_2) à 19,9 ; 21,6 ; 28,0 ; 39,8 et 42,2 ppm,
- un méthyle singulet à 24,0 ppm,
- un méthoxyle à 53,4 ppm,
- et sept méthines dont quatre sp^3 à 38,8 ; 48,1 ; 72,3 ; 74,1 et trois sp^2 à 109,6 ; 141,5 et 144,9 ppm ; deux de ces méthines sp^3 sont liés à un atome d'oxygène car leur déplacement chimique est entre 70,0 et 80,0 ppm (Tableau 15).

L'ensemble de ces données, même formule brute et répartition très similaire des atomes de carbone dans le spectre de RMN, suggère que **D6** est un isomère de **D5**. De plus, l'analyse des spectres de RMN 1D et 2D COSY et HSQC permet de définir les mêmes sous-structures **a-d** que dans le cas de **D5** (Figure 33 et Tableau 15).

Sur le spectre HMBC, les corrélations observées permettent d'assembler les sous-structures **a-d** comme indiqué sur la Figure 33.

Ainsi, le carbonyle d'ester à 174,0 ppm (C-18) est corrélé fortement d'une part au méthoxyle à 3,82 ppm (CH_3O -21) et d'autre part au proton à 2,76 ppm (H-3a) et plus

faiblement au proton à 4,92 (H-2 ; couplage en W), ce qui identifie le groupe carboxyméthyle et le lie au carbone C-4.

Le carbonyle lactonique à 174,5 ppm (C-17) est corrélé d'une part fortement aux protons à 2,30 (H-7a), 1,75 (H-7b), 2,53 ppm (H-8) et plus faiblement au méthyle à 0,98 ppm (CH₃-20 ; couplage en W), ce qui permet de le lier au carbone C-8 ; d'autre part, il est corrélé au proton à 5,48 ppm (H-12) ce qui referme le cycle lactonique sur le carbone C-12.

Enfin, le carbonyle lactonique à 177,0 ppm (C-17) est corrélé d'une part fortement aux protons à 1,90 (H-6b) et 2,08 ppm (H-10), 2,53 ppm (H-8) ce qui permet de le lier au carbone C-5 et il est aussi corrélé d'autre part au carbone à 4,92 ppm (H-2) ce qui indique que ce cycle lactonique est refermé sur le carbone C-2.

Les corrélations du carbone quaternaire à 126,5 ppm (C-13) avec les protons H-11b et H-12, confirment la fixation du cycle furanique sur le carbone C-12 et les autres corrélations du spectre HMBC conduisent à assembler les sous-structures **a-c** comme indiqué dans la figure 33.

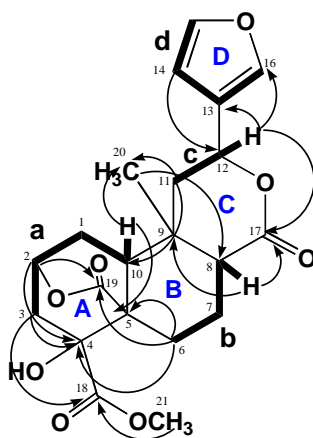


Figure 33 : Sous-structures **a-d** identifiées à partir du spectre H-H COSY (traits gras) et assemblage de ces sous-structures par analyse des corrélations observées sur le spectre HMBC (flèches H->C) pour aboutir à la structure plane proposée pour le composé **D6**.

Tableau 15 : Données de RMN ^{13}C et ^1H pour le composé **D6** (antadiosbulbine B) en solution dans CDCl_3 et CD_3OD (^1H : 400.13 MHz).

C n°	D6 (CDCl_3)				D6 (CD_3OD)			
	δ_{C}	δ_{H}	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)	δ_{C}	δ_{H}	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)
1a	27,1	2,27	<i>m</i>		28,0	2,34	<i>dddd</i>	13,5; 11,2; 5,2; 2,0
b	-	1,57	<i>m</i>		-	1,62	<i>dd</i>	13,5 ; 8,3
2	71,8	4,90	<i>dd</i>	5,2 ; 5,2	74,1	4,92	<i>dd</i>	5,3; 5,2
3a	38,2	2,50	<i>dd</i>	15,0 ; 0,7	39,8	2,76	<i>d</i>	15,0
b	-	2,31	<i>m</i>		-	2,16	<i>ddd</i>	15,0 ; 5,3 ; 2,0
4	76,1	-			77,0	-		
5	51,8	-			53,0	-		
6a (éq)	20,5	2,10	<i>m</i>		21,6	2,40	<i>dddd</i>	14,8; 3,5; 3,5; 0,8
b (ax)	-	2,10	<i>m</i>		-	1,90	<i>ddd</i>	14,8; 14,2; 4,0
7a (éq)	19,0	2,39	<i>dddd</i>	14,0; 3,8; 3,8; 3,8	19,9	2,30	<i>dddd</i>	14,3 ; 4,0 ; 3,5 ; 3,3
b (ax)	-	1,55	<i>m</i>		-	1,75	<i>dddd</i>	14,3; 14,2; 4,5; 3,5
8	47,3	2,36	<i>m</i>		48,1	2,53	<i>ddd</i>	4,5; 3,3; 0,8
9	35,0	-			36,3	-		
10 (ax)	37,1	2,11	<i>m</i>		38,8	2,08	<i>dd</i>	11,2 ; 8,3
11a (éq)	41,7	2,03	<i>dd</i>	14,8 ; 3,5	42,2	2,09	<i>dd</i>	14,8 ; 3,8
b (ax)	-	1,75	<i>dd</i>	14,8 ; 12,3	-	1,86	<i>dd</i>	14,8 ; 12,5
12 (ax)	70,2	5,27	<i>dd</i>	12,3 ; 3,5	72,3	5,48	<i>dd</i>	12,5 ; 3,8
13	124,6	-			126,5	-		
14	108,3	6,38	<i>dd</i>	1,9 ; 0,9	109,6	6,53	<i>dd</i>	1,9 ; 0,9
15	143,7	7,39	<i>dd</i>	1,7 ; 1,7	144,9	7,49	<i>dd</i>	1,9 ; 1,7
16	139,8	7,43	<i>dd</i>	1,7 ; 0,9	141,5	7,59	<i>ddd</i>	1,7 ; 0,9 ; 0,8
17	171,0	-			174,5	-		
18	173,6	-			174,0	-		
19	172,3	-			177,0	-		
20	24,1	0,98	<i>s</i>		24,0	0,98	<i>s</i>	
21	53,4	3,85	<i>s</i>		53,4	3,82	<i>s</i>	
OH-4	-	3,44	<i>s</i>		-	-		

Les constantes de couplage des protons à la jonction de cycles H-8 ($J= 4,5$ et $3,3$ Hz), H-10 ($J= 11,8$ Hz) et H-12 ($J= 12,5$ Hz) indiquent que H-8 est β -équatorial et H-10 et H-12 sont α -axiaux. Pour les mêmes raisons, les protons H-6b, H-7b et H-11b sont axiaux.

Le spectre NOESY fait apparaître des taches de corrélation intenses entre H-2 et à la fois H-1a, H-1b, H-3a et H-3b en accord avec la disposition β -équatoriale de H-2 (*Figure 34 A*). Le carboxyméthyle C-21 est corrélé avec H-7b qui est β -axial et aussi H-3a et H-1b. Le méthyle C-20 est fortement corrélé avec H-1b, H-3a, H-7b (β -axial), H-11b (β -axial) et H-8 (β -équatorial sur le cycle B) qui sont donc tous situés sur la face β de la molécule. Le proton H-8 (β -équatorial) est également corrélé aux protons H-7b et H-11b et le proton H-12, aux protons H-10 et H-16.

L'étude structurale de **D6** a également été réalisée par RMN 1D et 2D pour ce composé en solution dans CDCl_3 . Les résultats confirment la structure proposée et les

attributions sont consignées dans le tableau 15. En particulier la configuration relative proposée est confirmée par l'analyse des constantes de couplage et l'observation des NOEs caractéristiques dans le spectre NOESY.

Toutes ces données conduisent à proposer la structure suivante pour le composé **D6**, qui apparaît comme l'épimère en C-8 de l'antadiosbulbine A (**D5**) (Figure 34 B). C'est un composé original où le proton H-8 est en β et que nous proposons de nommer antadiosbulbine B.

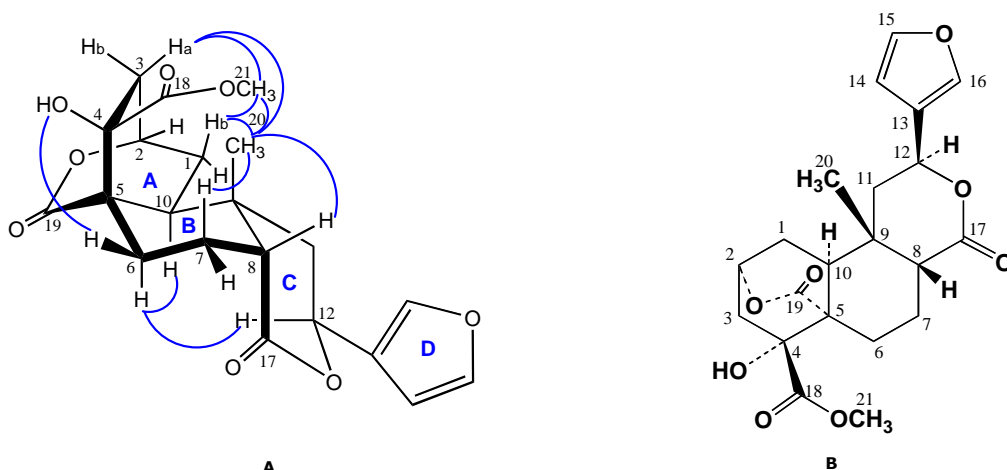


Figure 34 : Antadiosbulbine B. **A** : sélection de corrélations NOE observées sur le spectre NOESY de l'antadiosbulbine B (**D6**). **B** : structure de l'antadiosbulbine B.

Les cinq composés isolés, 8-épidiosbulbines E et G, antadiosbulbines A et B et diosbulbine E, appartiennent à la famille des clérodanes, groupe de diterpènes ayant en commun le squelette « clérodane », comprenant plus de 650 structures décrites et présent dans les plantes, les micro-organismes et certains organismes marins (Figure 35). Selon la stéréochimie de la jonction des cycles A et B, une première division conduit à définir les *cis* et *trans*-clérodanes. Puis les composés ayant la même stéréochimie que le premier composé isolé dans cette famille, la clérodine, sont nommés *neo*-clérodanes et la série énantiomère *ent*-*neo*-clérodanes.

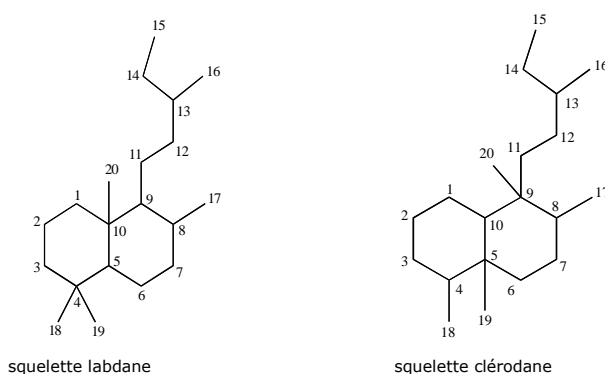


Figure 35 : Structures des squelettes labdane et clérodane.

Du point de vue biosynthétique, les clérodanes apparaissent comme reliés au squelette labdane, *via* une série de migrations de groupes méthyles et de protons. Le squelette labdane est lui-même dérivé du diphosphate de géranylgeranyle. Très schématiquement, car il peut exister un nombre considérable de voies parallèles pour conduire à la multitude des substances naturelles dérivées de ce squelette, on peut représenter la biosynthèse du triacide précurseur des diosbulbines isolées de *D. antaly*, comme représenté dans la figure 36 suivante. Le précurseur diphosphate de géranylgeranyle subit une cyclisation en composé de type labdane. La migration du méthyle 19 de la position 4 à la position 5, suivie de celle du proton en 5 à la position 10 dont le méthyle 20 migre lui-même à la position 9, conduit à un intermédiaire de type clérodane. L'oxydation des méthyles en acides carboxyliques conduit au triacide intermédiaire dont les méthylènes en C-2, C-6 et C-12 qui peuvent être oxydées simultanément en fonctions alcool secondaires.

L'intermédiaire ainsi obtenu peut subir des cyclisations internes pour former des lactones à 6 chaînons. Ainsi le groupe carboxylique en C-18 peut être cyclisé soit avec l'alcool en C-2, soit avec l'alcool en C-6 pour former les diosbulbines E ou G, après décarboxylation du carboxyle en C-19. Le groupe carboxylique en C-18 peut également être *O*-méthylé et le groupe carboxylique en C-18 peut estérifier l'alcool en C-2 pour donner l'antadiosbulbine A. Les épimères résultent de l'épimérisation du C-8, facilité par sa position en α du groupe acide carboxylique en C-17.

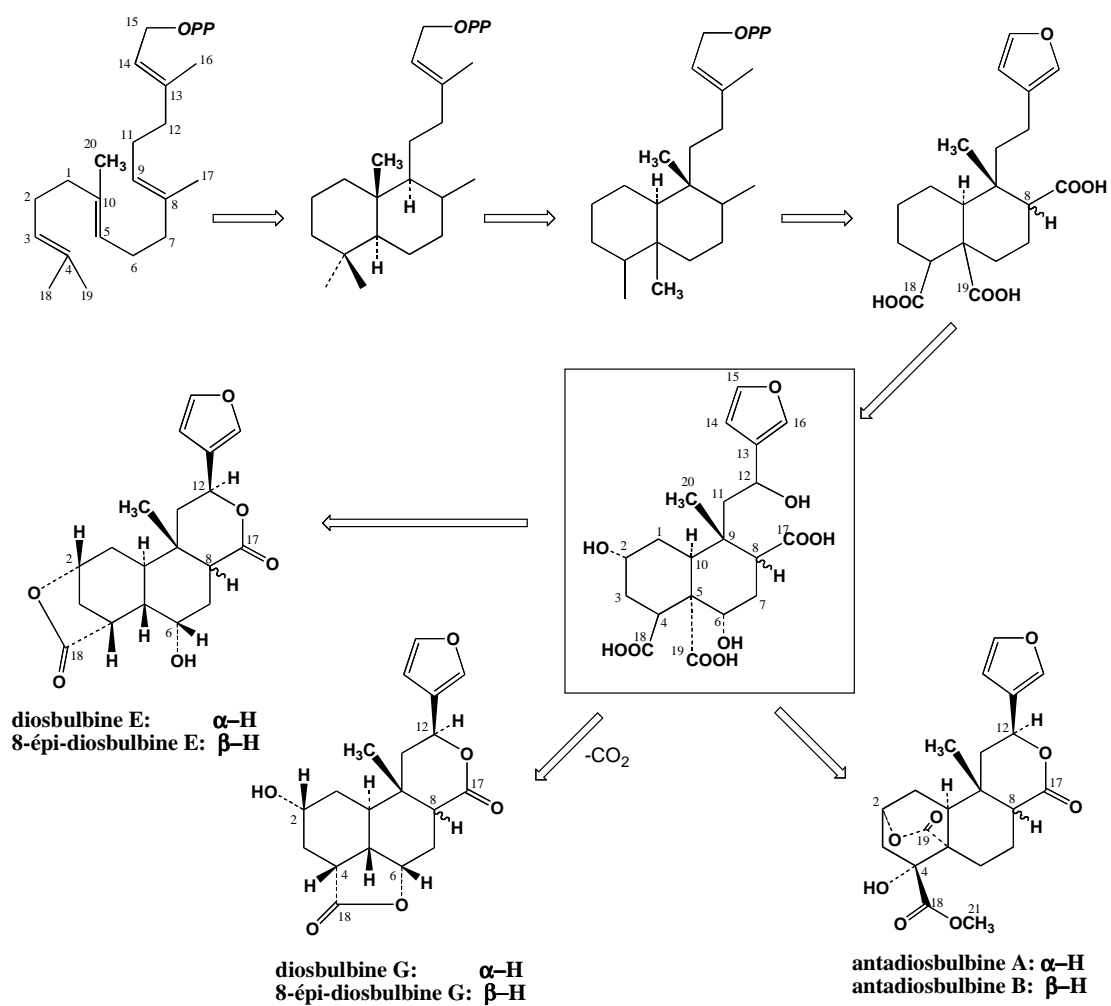


Figure 36 : Schéma hypothétique et simplifié pour la biosynthèse des diosbulbines E, G, de l'antadiosbulbine A et de leurs épimères en C-8.

5.4.2. STRUCTURES DES COMPOSES DE LA CLASSE DES FLAVONOÏDES

5.4.2.1. Structure du composé D13

Le spectre de masse ESI-TOF en mode positif du composé **D13** révèle la présence de l'ion moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 594, qui correspond à la formule brute $C_{27}H_{31}O_{15}$, donc conduisant à $C_{27}H_{30}O_{15}$ pour le composé **D13** lui-même.

Les données des spectres RMN 2D, réalisés en solution dans CD_3OD , ont permis de déterminer le composé **D13** qui est un produit connu dans la littérature et correspondant au 5,7,4'-trihydroxyflavone-3-*O*- β D-glucopyranosyl(6-1)- α -L-rhamnose [Markham, 1978].

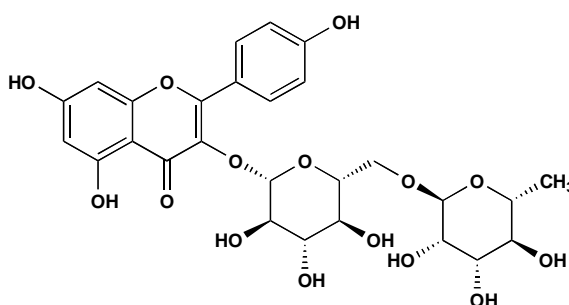


Figure 37 : Structure du composé **D13** : 5,7,4'-trihydroxyflavone-3-*O*- β D-glucopyranosyl(6-1)- α -L-rhamnose.

Tableau 16 : Données de RMN ^{13}C et 1H pour **D13** (CD_3OD , 1H : 400.13 MHz, 298 K).

N°	δC	δH	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)
2	159,4	-		
3	135,5	-		
4	179,3	-		
4a	105,6	-		
5	162,9	-		
6	100,0	6,21	<i>d</i>	2,1
7	165,9	-		
8	95,0	6,41	<i>d</i>	2,1
8a	158,8	-		
1'	127,7	-		
2',6'	132,4	8,06	<i>d</i>	9,0
3', 5'	116,1	6,88	<i>d</i>	9,02
4'	161,4	-		
Glu 1	104,7	5,13	<i>d</i>	7,6
2	75,7	3,44	<i>m</i>	
3	78,1	3,26	<i>m</i>	
4	71,4	3,34	<i>m</i>	
5	77,2	3,46	<i>m</i>	
6	68,6	3,80	<i>m</i>	
Rha 1	102,4	4,52	<i>s</i>	
2	72,0	3,63	<i>m</i>	
3	72,3	3,51	<i>dd</i>	3,4 ; 9,5
4	73,9	3,28	<i>m</i>	
5	69,7	3,48	<i>m</i>	
6	17,9	1,12	<i>d</i>	6,2

5.4.2.2. Structure du composé **D14** : kaempférol

Le spectre de masse ESI-TOF en mode positif du composé **D14** montre la présence de l'ion moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 286 concordant avec la formule brute $C_{15}H_{11}O_6$, supposant celle à $C_{15}H_{10}O_6$ pour **D14**. Les spectres de RMN ^{13}C et 1H du composé **D14** réalisés dans du CD_3OD montrent respectivement la présence des signaux de quinze carbones, ainsi que de six protons non-échangeables et dont les attributions sont présentées dans le *tableau 17*. La comparaison des données de RMN à celles de la littérature confirme qu'il s'agit du kaempférol ou 3,5,7,4'-tétrahydroxyflavone [Fukunaga, 1988] (*figure 38*).

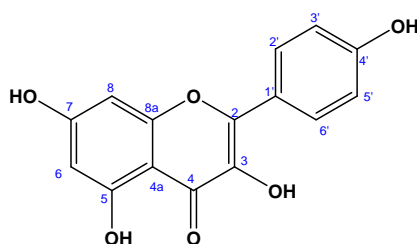


Figure 38 : Structure du composé **D14** : kaempférol.

Tableau 17 : Données de RMN ^{13}C et 1H pour **D14** (CD_3OD , 1H : 400.13 MHz, 298 K).

N°	δC	δH	m	J (Hz)
2	147,8	-		
3	137,1	-		
4	177,4	-		
4a	104,6	-		
5	160,5	-		
6	99,3	6,18	<i>s</i>	
7	165,6	-		
8	94,5	6,40	<i>s</i>	
8a	156,2	-		
1'	123,7	-		
2', 6'	130,7	8,08	<i>m</i>	2,0
3', 5'	116,3	6,92	<i>m</i>	2,0
4'	158,3	-		

5.4.2.3. Structure du composé **D15** : quercétine

En mode positif, le spectre de masse ESI-TOF du composé **D15** montre la présence de l'ion moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 302 correspondant à la formule brute $C_{15}H_{11}O_7$. La formule brute de **D15** est donc $C_{15}H_{10}O_7$.

Les spectres de RMN ^{13}C et 1H de **D15** réalisés dans CD_3OD montrent la présence des signaux de quinze carbones et de cinq protons. Les attributions réalisées à partir des spectres

RMN sont résumées dans le tableau 18. Le composé **D15** est connu dans la littérature et correspond à la quercétine ou 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone [Fukunaga, 1988] (figure 39).

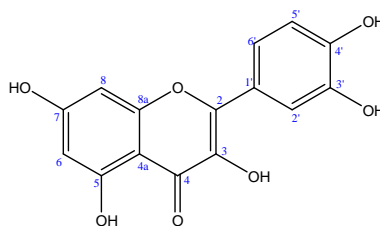


Figure 39 : Structure du composé **D15** : quercétine.

Tableau 18 : Données de RMN ^{13}C pour la quercétine **D15** (CD_3OD , ^{13}C : 75.47 MHz, 298 K).

N°	δC
2	146,2
3	137,2
4	177,4
4a	104,0
5	162,5
6	99,2
7	165,5
8	94,5
8a	158,2
1'	124,1
2'	116,0
3'	148,0
4'	148,7
5'	116,3
6'	121,7

5.4.2.4. Structure du composé **D16** : isorhamnétine

La spectrométrie de masse en ESI-Q-TOF, en mode positif, du composé **D16** montre la présence de l'ion moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 316, correspondant à la formule brute $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_7$ ainsi la formule brute $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$ est attribuée au composé **D16**.

Les spectres de RMN ^{13}C et ^1H du composé **D16** réalisés en solution dans le $\text{DMSO}-d_6$ montrent la présence des signaux de seize carbones ainsi que de sept signaux de protons. Les attributions des différents protons et carbones, d'après les données des spectres de RMN 2D, sont résumées dans le tableau 19. Le composé **D16** est décrit dans la littérature comme étant l'isorhamnétine ou 3,3',4',5,7-pentahydroxy-3'-méthoxyflavone [Krishna Kumari, 1986 ; Kim, 2006] (figure 40).

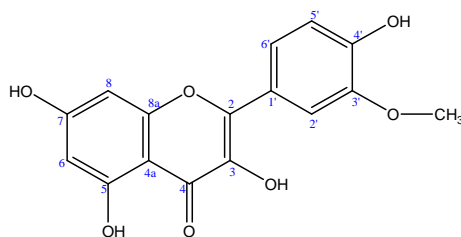


Figure 40 : Structure du composé **D16** : isorhamnétine.

Tableau 19 : Données de RMN ^{13}C et ^1H pour **D16** (DMSO- d_6 , ^1H : 400.13 MHz, 298 K).

N°	δC	δH	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)
2	147,0	-		
3	136,0	-		
4	176,2	-		
4a	103,3	-		
5	161,0	-		
6	98,7	6,17	<i>sl</i>	
7	164,4	-		
8	94,0	6,46	<i>sl</i>	
8a	156,6	-		
1'	122,1	-		
2'	112,0	7,74	<i>d</i>	2,0
3'	147,8	-		
4'	148,3	-		
5'	115,8	6,91	<i>d</i>	8,4
6'	122,3	7,66	<i>dd</i>	8,4 ; 2,0
3'-OCH3	56,2	3,83	<i>s</i>	
OH		12,45	<i>s</i>	

5.4.3. STRUCTURE DU COMPOSE D8 : CATECHINE

Le spectre de masse ESI-TOF du composé **D8** en mode positif fait apparaître l'ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 291 en accord avec la formule brute $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_6$ et donc $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ pour la molécule.

Les spectres de RMN ^{13}C et ^1H de **D8** en solution dans CD_3OD présentent respectivement les signaux de quinze carbones et de neuf protons non échangeables. Les attributions résumées dans le **tableau 20** ont été réalisées par l'analyse des spectres de RMN 2D. La configuration relative des protons en -2 et -3 est *trans*-diaxiale à cause de la valeur de leur constante de couplage ($J = 7,7$ Hz). Ce produit est donc identifié comme la catéchine, ce qui est confirmé par la comparaison des données de RMN à celle de la littérature [Cren-Olivé, 2002 ; Mirabel, 1999] (**figure 41**).

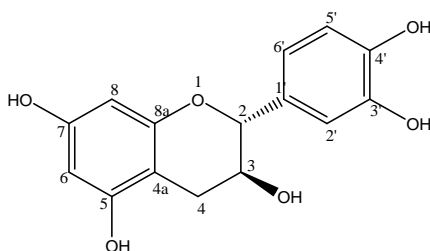


Figure 41 : Structure du composé **D8** : catéchine.

Tableau 20 : Données de RMN ^{13}C et ^1H du composé **D8** (CD $_3$ OD, 400 MHz).

C n°	D8 : catéchine			
	δC	δH	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)
2	82,8	4,57	<i>d</i>	7,7
3	68,8	3,97	<i>ddd</i>	8,1 ; 7,7 ; 5,4
4	28,4	2,51	<i>dd</i>	16,0 ; 8,1
	-	2,85	<i>dd</i>	16,0 ; 5,4
4a	100,8	-		-
5	157,5	-		
6	96,3	5,92	<i>d</i>	2,4
7	157,8	-		-
8	95,5	5,85	<i>d</i>	2,4
8a	156,7	-		-
1'	132,2	-		-
2'	115,2	6,72	<i>dd</i>	8,0 ; 2,2
3'	146,2	6,76	<i>d</i>	8,0
4'	146,2	-		-
5'	116,1	-		-
6'	120,0	6,84	<i>d</i>	2,2

5.4.4. STRUCTURES DES COMPOSES DE LA CLASSE DES STILBENES ET PHENANTHRENES

5.4.4.1. Structure du composé D1 de la classe du phénanthrène

Le spectre de masse (ESI-Q-TOF), en mode négatif du composé **D1**, montre l'ion quasimoléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 269,0659 en accord avec la formule brute $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$ (masse calculée pour $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$: 269,0808).

Son spectre de RMN du ^{13}C met en évidence les 16 carbones de la formule brute, dont six méthines sp^2 (entre 106,2 et 129,2 ppm), deux méthyles à respectivement 56,5 et 59,8 ppm dont le déplacement chimique est caractéristique des groupements méthoxyles et huit carbones quaternaires sp^2 entre 120,3 et 156,0 ppm dont quatre sont liés à une atome d'oxygène (**Tableau 21**). La formule brute implique 10 degrés d'insaturation et comme la molécule comporte 14 carbones sp^2 formant 7 doubles liaisons, la molécule est tricyclique.

Le spectre de ^1H -RMN du composé **D1** en solution dans CD_3OD , fait apparaître dans la région des aliphatiques deux singulets intenses à 3,88 et 3,99 ppm, intégrant chacun pour trois protons, et qui sont attribués à deux groupements méthoxyles. Dans la région des aromatiques, entre 7,08 et 7,55 ppm, on observe quatre signaux : un doublet de doublet intégrant pour un proton à 7,10 ppm ; deux singulets superposés à 7,14 ppm et qui intègrent pour deux protons ; deux doublets intégrant chacun pour un proton respectivement à 7,40 et 7,54 ppm. Enfin à 9,29 ppm, est présent un doublet intégrant pour un proton.

Le spectre COSY permet de définir les sous structures **a**, **b** et **c** (*Figure 42*). Le proton à 7,10 ppm est couplé aux protons à 9,29 et 7,14 ppm (sous structure **a**), avec des constantes de couplage caractéristiques, respectivement d'un couplage *ortho* ($J = 9,2 \text{ Hz}$) et *meta* ($J = 2,7 \text{ Hz}$). Le proton à 7,53 ppm est couplé avec celui à 7,39 ppm (sous structure **b**) avec une constante de couplage *ortho*. La sous-structure **c** est constituée d'un proton aromatique singulet à 7,15 ppm suggérant un noyau benzénique penta-substitué. Les carbones protonés ont été identifiés grâce au spectre HSQC.

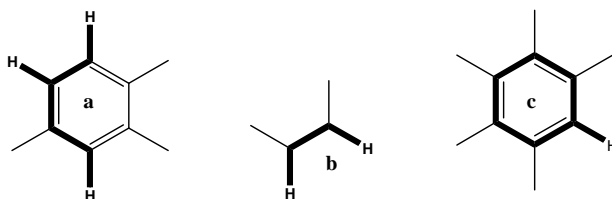


Figure 42 : Sous-structures a, b et c déduites du spectre COSY.

Les carbones protonés ont été identifiés grâce au spectre HSQC et les différentes corrélations à partir du spectre HMBC ont permis de relier ces sous structures. Ainsi :

- H-1 (9,29 ppm) est porté par le carbone à 129,2 ppm qui est fortement corrélé avec les carbones à 156,0 et 130,3 ppm mais faiblement avec celui à 135,4 ppm ;
- H-2 (7,10 ppm) lié au carbone à 117,3 ppm corrèle avec les carbones à 112,3 et 124,2 ppm ;
- H-3 (7,15 ppm) lié au carbone à 112,3 ppm qui est corrélé avec les carbones à 117,3 ; 124,2 et 120,3 ppm ;
- H-4 (7,40 ppm) porté par le carbone à 125,5 ppm qui corrèle avec les carbones à 127,0 et 124,2 ppm et à plus longue distance à celui à 112,3 ppm ;
- H-5 (7,54 ppm) est porté par le carbone à 128,2 ppm. Ce proton est corrélé aux carbones à 120,3 ; 135,4 et 127,0 ppm ;
- H-6 (7,14 ppm) lié au carbone à 106,2 ppm.

Les différentes sous-structures ont été reliées entre elles grâce aux différentes corrélations sus-citées pour aboutir à la structure ci-dessous. Ce composé **D1** est donc le 3,7-dihydroxy-2,4-diméthoxyphénanthrène. Cette molécule avait déjà été isolée à partir de deux espèces d'Orchidaceae : *Eria flava* et *Bulbophyllum vaginatum*.

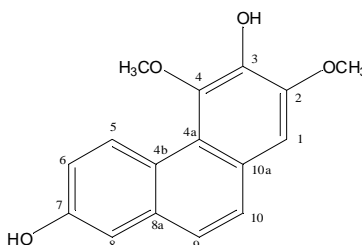


Figure 43 : Structure du composé **D1** : 3,7-dihydroxy-2,4-diméthoxyphénanthrène.

Tableau 21 : Données de RMN ^{13}C et ^1H pour **D1** (CD₃OD, ^1H : 400.13 MHz, 298 K).

C n°	D1 (CD ₃ OD)			
	δC	δH	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)
1	106,2	7,5	<i>s</i>	
2	148,9	-		
3	141,2	-		
4	145,7	-		
4a	135,4	-		
4b	124,2			
5	129,2	9,26	<i>d</i>	9,2
6	117,4	7,09	<i>dd</i>	9,2 ; 2,7
7	156	-		
8	112,3	7,14	<i>d</i>	2,7
8a	120,3	-		
9	125,6	7,39	<i>d</i>	8,8
10	128,2	7,53	<i>d</i>	8,8
10a	127,5	-		
2-OMe	56,5	3,99	<i>s</i>	
4-OMe	59,8	3,88	<i>s</i>	

5.4.4.2. Structure du composé de la classe des stilbènes

5.4.4.2.1. Structure du composé **D3** : picéatannol

Le spectre de masse ESI-TOF du composé **D3** fait apparaître l'ion moléculaire protoné $[\text{M}+\text{H}]^+$ à $m/z = 245,0836$ correspondant à $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_4$ (cal. : 245,0814). La formule brute de **D3** est donc $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_4$, comportant 9 degrés d'insaturation.

Son spectre de RMN ^1H (CD₃OD) présente les signaux de 8 protons aromatiques ou éthyléniques entre 7,0 et 8,0 ppm sur les 12 que comporte la formule brute : quatre protons

ont donc été échangés avec le solvant. Le spectre de RMN ^{13}C comporte 12 signaux dont deux, à 105,8 et 159,5, impliquent chacun 2 carbones.

L'analyse du spectre ^1H - ^1H COSY met en évidence les 3 systèmes de spins **a**, **b** et **c** de la figure 44. Le proton à 6,83 ppm est couplé aux protons à 6,74 et 6,98 ppm avec des constantes de couplage caractéristiques, respectivement d'un couplage *ortho* (J_{5-6} : 8,2 Hz) et d'un couplage *meta* (J_{2-6} : 2,0 Hz). L'ensemble constitue un benzène 1,3,4-trisubstitué (sous structure **a**, figure 44). Le proton à 6,17 ppm qui forme un triplet avec une constante de couplage *meta* ($J_{2-10,14}$: 2,1 Hz) est couplé aux deux protons aromatiques équivalents à 6,44 ppm. Ce système définit un benzène 1,3,5-trisubstitué (sous structure **b**). Enfin, les deux derniers protons à 6,75 et 6,89 ppm, couplés entre eux avec une grande constante de couplage (J_{7-8} : 16,2 Hz), sont attribués à une double liaison *trans* (sous-structure **c**).

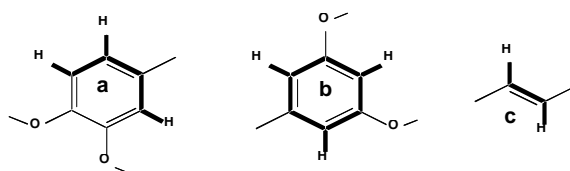


Figure 44 : Sous-structures **a**, **b** et **c** déduites du spectre ^1H - ^1H COSY de **D3**
(— corrélations observées)

Les attributions des carbones protonés ont été réalisées grâce à l'analyse du spectre HSQC (Tableau 22) et les sous-structures **a**, **b** et **c** de la figure 44 ont été reliées entre elles par l'étude des corrélations du spectre HMBC. Les carbones quaternaires à 142,6 (C-3), 146,4 (C-4) et 159,5 (x2 ; C-11 et C-13) ppm ont été attribués à des carbones *sp*² liés à des atomes d'oxygène, à cause de la valeur de leur déplacement chimique. Leur attribution précise résulte de l'observation de corrélations avec :

- H-5 pour le carbone à 142,6 ppm (C-3)
- H-2, H-5 et H-6 pour le carbone à 146,4 ppm (C-4)
- H-10, H-12 et H-14 pour les carbones à 159,5 ppm (C-11 et C-13)

Les quatre protons mobiles ont été interprétés comme appartenant à des hydroxyles phénoliques.

Le carbone quaternaire à 131,0 ppm (C-1) est fortement corrélé d'une part au proton à 6,74 ppm (H-5) et d'autre part aux protons à 6,75 et 6,89 ppm de la double liaison (sous-structure **c**) : la position C-1 lui a donc été attribuée. Enfin, au carbone quaternaire à 141,3

ppm qui donne des taches de corrélation avec les protons à 6,44 ppm et aussi avec les protons éthyléniques (H-7 et H-8), a été attribuée la position C-9.

L'ensemble de ces données permet de proposer pour le composé **D3**, la structure hydroxy-3-resvératrol ou picéatannol (*figure 45*). Le picéatannol avait été isolé auparavant de différentes plantes, d'abord de différentes espèces de *Vouacapoua* [King, 1956], des racines d'*Euphorbia lagascae* [Ferrigni, 1984] et enfin de la canne à sucre *Saccharum* sp. [Brinker, 1991] où des propriétés de phytoalexine ont été décrites.

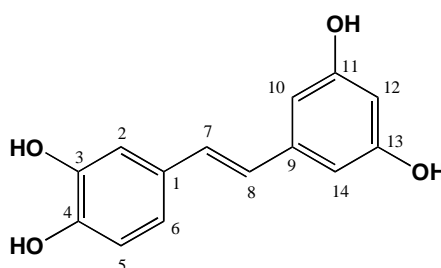


Figure 45 : Structure de **D3** : hydroxy-3-resvératrol ou picéatannol.

Tableau 22: Données de RMN ^{13}C et ^1H pour les composés **D3** et **D2** (CD_3OD ; ^1H : 400.13 MHz, 298 K).

N°	Composé D3 (CD_3OD)				Composé D2 (CD_3OD)			
	δC	δH	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)	δC	δH	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)
1	131,0	-			135,0	-		
2	113,8	6,98	<i>d</i>	2,0	116,6	6,61	<i>d</i>	2,0
3	142,6	-			146,0	-		
4	146,4	-			144,3	-		
5	116,4	6,74	<i>d</i>	8,2	116,2	6,65	<i>d</i>	8,0
6	120,2	6,83	<i>dd</i>	8,2 ; 2,0	120,7	6,49	<i>dd</i>	8,0 ; 2,0
7	129,7	6,89	<i>d</i>	16,2	38,3	2,68	<i>m</i>	
8	127,0	6,75	<i>d</i>	16,2	39,5	2,67	<i>m</i>	
9	141,3	-			145,7	-		
10,14	105,8	6,44	<i>d</i>	2,1	108,0	6,13	<i>d</i>	2,2
11,13	159,5	-			159,3	-		
12	102,6	6,17	<i>t</i>	2,1	101,1	6,08	<i>t</i>	2,2

5.4.4.2.2. Structure du composé D2 : dihydropicéatannol

Le spectre de masse ESI-TOF à haute résolution du composé **D2** présente l'ion moléculaire protoné $[\text{M}+\text{H}]^+$ à $m/z = 247,0949$ correspondant à la formule brute $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}_4$ (cal. : 247,0970). La formule brute de **D2** est donc $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_4$, comportant 8 degrés d'insaturation. Son spectre de RMN ^1H (CD_3OD) présente les signaux de 6 protons aromatiques entre 7,0 et 8,0 ppm et 4 protons aliphatiques à 2,67 et 2,68 ppm sur les 14 que comporte la formule brute : quatre protons sont donc échangeables avec le solvant. Le spectre

de RMN ^{13}C comporte 12 signaux dont deux, à 108,0 et 159,3 ppm, impliquant chacun 2 carbones.

L'analyse du spectre ^1H - ^1H COSY met en évidence les 3 systèmes de spins **a**, **b** et **c** de la *figure 46*. Le proton à 6,83 ppm est couplé aux protons à 6,74 et 6,98 ppm avec des constantes de couplage caractéristiques, respectivement d'un couplage *ortho* (J_{5-6} : 8,2 Hz) et d'un couplage *meta* (J_{2-6} : 2,0 Hz). L'ensemble forme un benzène 1,3,4-trisubstitué (sous-structure **a**, *figure 46*). Le proton à 6,17 ppm qui forme un triplet avec une constante de couplage *meta* ($J_{2-10,14}$: 2,1 Hz) est couplé aux deux protons aromatiques équivalents à 6,44 ppm. Ce système définit un benzène 1,3,5-trisubstitué (sous-structure **b**). Enfin, les quatre derniers protons, à 2,67 et 2,68 ppm, forment deux groupes méthylènes (CH_2) couplés entre eux et sont attribués à la sous-structure **c**.

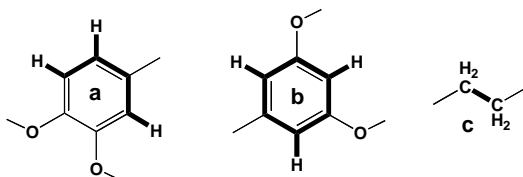


Figure 46 : Sous-structures **a**, **b** et **c** déduites du spectre ^1H - ^1H COSY de **D2**.

Les attributions des carbones protonés ont été réalisées grâce à l'analyse du spectre HSQC (*tableau 22*) et les sous-structures **a**, **b** et **c** de la *figure 46* ont été reliées entre elles par l'étude des corrélations du spectre HMBC. Les carbones quaternaires à 146,0 (C-3), 144,3 (C-4) et 159,3 (x2 : C-11 et C-13) ppm ont été attribués à des carbones sp^2 liés à des atomes d'oxygène, à cause de la valeur de leur déplacement chimique. Leur attribution précise résulte de l'observation de corrélations avec:

- H-5 pour le carbone à 146,0 ppm (C-3)
- H-2, H-5 et H-6 pour le carbone à 144,3 ppm (C-4)
- H-10, H-12 et H-14 pour les carbones à 159,3 ppm (C-11 et 13)

Les quatre protons mobiles ont été interprétés comme appartenant à des hydroxyles phénoliques.

Le carbone quaternaire à 135,0 ppm (C-1) est fortement corrélé d'une part au proton à 6,65 ppm (H-5) et d'autre part aux protons à 6,75 et 6,89 ppm du système $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ (sous-structure **c**, *figure 46*) : la position C-1 lui a donc été attribuée. Au carbone quaternaire à

145,7 ppm qui donne des taches de corrélation avec les protons à 6,13 ppm et aussi avec les protons de la sous-structure **c**, a été attribuée la position C-9.

L'ensemble de ces données permet de proposer pour le composé **D2**, la structure dihydro-7,8-hydroxy-3-resvératrol ou dihydropicéatannol (*figure 47*). Ce composé qui a été décrit dans la littérature a été obtenu d'une part par hydrogénation du resvératrol [Matsuda et al, 2001 ; Zhang et al., 2009], et aussi par hydrolyse de son glucoside isolé de *Picea abies* [Mannila et al., 1993], mais n'avait jamais été isolé directement à partir d'une source naturelle.

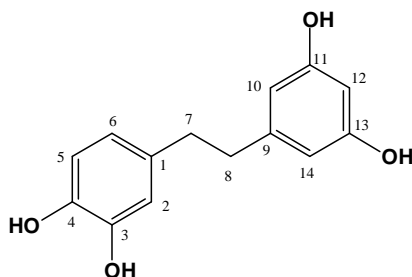


Figure 47 : Structure de **D2** : dihydro-7,8-hydroxy-3-resvératrol ou dihydropicéatannol.

5.4.4.2.3. Structure du composé **D10** : cassigarol D

Le spectre de masse ESI-TOF de D10 fait apparaître l'ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ à $m/z = 485,1299$ correspondant à la formule brute $C_{28}H_{21}O_9$ (calc.: 485,1236). La formule brute de **D10** est donc $C_{28}H_{20}O_9$, comportant 19 degrés d'insaturation. Son spectre de RMN 1H (CD_2OD) présente les signaux de 11 protons aromatiques entre 6,0 et 9,1 ppm, de 2 protons à 4,65 et 5,39 ppm liés à des carbones sp^3 et de 7 signaux larges entre 8,9 et 10,5 ppm attribués à des protons d'hydroxyles phénoliques (*Tableau 23*). Le spectre de RMN ^{13}C comporte 28 signaux dont deux à 56,2 et 92,9 ppm attribués à des carbones sp^3 et 26 à des carbones sp^2 : la molécule comporte donc treize doubles liaisons carbone-carbone et donc six cycles, compte tenu des 19 degrés d'insaturation de la formule brute.

L'analyse du spectre 1H - 1H COSY met en évidence les quatre systèmes de spins **a**, **b**, **c** et **d** de la *figure 48*, en plus de trois protons aromatiques sous forme de singulets. Le proton à 6,59 ppm est couplé aux protons à 6,70 et 6,69 ppm avec des constantes de couplage caractéristiques, respectivement d'un couplage *ortho* (J_{5-6} : 8,3 Hz) et d'un couplage *meta* (J_{2-6} : 2,0 Hz). L'ensemble forme un benzène 1,3,4-trisubstitué (sous-structure **a**, *figure 48*). Le proton à 6,03 ppm qui forme un triplet avec une constante de couplage *meta* (J_{H-2} -

*H*10,14 : 2,1 Hz) est couplé aux deux protons aromatiques équivalents à 5,99 ppm. Ce système définit un benzène 1,3,5-trisubstitué (sous-structure **b**). Les deux protons aromatiques à 7,34 et 6,94 ppm, couplés entre eux avec une constante de couplage J_{7-8} de 8,9 Hz, sont attribués deux protons *ortho* d'un benzène tétrasubstitué et les deux protons à 4,53 et 5,30 ppm, vicinaux avec une constante de couplage de 4,7 Hz forment la sous-structure **c** (*figure 48*).

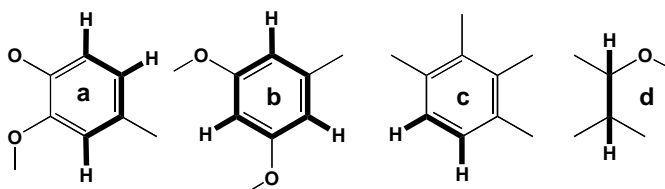


Figure 48 : Sous-structures **a**, **b**, **c** et **d** déduites du spectre H-H COSY de **D10**.

Le spectre HMBC permet d'assembler ces sous-structures avec les autres éléments. Les carbones quaternaires à 113,1 (C-10') et 156,9 ppm (C-11') sont corrélés à la fois avec le proton aromatique singulet à 6,75 ppm appartenant au même benzène penta-substitué et aussi avec les protons à 4,53 (H-8) et 5,30 ppm (H-7) (sous-structure **d**). Cela conduit à une structure dihydrobenzofurane. Le carbone à 132,9 ppm (C-1) est corrélé aux protons à 6,69 (H-5) et 6,70 (H-2) (sous-structure **a**) et aussi aux protons à 4,53 (H-8) et 5,30 ppm (H-7). Réciproquement, le carbone C-7 est corrélé aux protons à 6,59 et 6,70 ppm (H-2 et H-6). Ces données permettent de relier la sous-structure **a**, à la position 7 du dihydrobenzofurane. De même, comme le carbone à 146,3 (C-9, sous-structure **a**) est corrélé aux protons H-7 et H-8, il est lié au carbone C-8 ; celui-ci est corrélé aux protons H-10 et H-14, confirmant la proposition de structure. Les fortes corrélations du carbone à 125,2 ppm (C-6') avec les protons à 7,34 et 7,05 ppm (H-2' et H-7') permettent de relier la sous-structure **c** au système dibenzofurane. L'analyse des corrélations des carbones quaternaires oxygénés à 144,1 (C-3') et 145,7 ppm (C-4') et des carbones protonés à 112,0 ppm (C-2') et 112,5 ppm (C-5'), permet de relier à la sous-structure **c** un benzène tétrasubstitué avec deux protons en *para*. L'ensemble de ces données permet de proposer la structure plane de **D10**. L'attribution des hydroxyles phénoliques résulte de l'observation dans le spectre HMBC de corrélations 3J entre le carbone considéré et le proton de l'hydroxyle qui lui est lié.

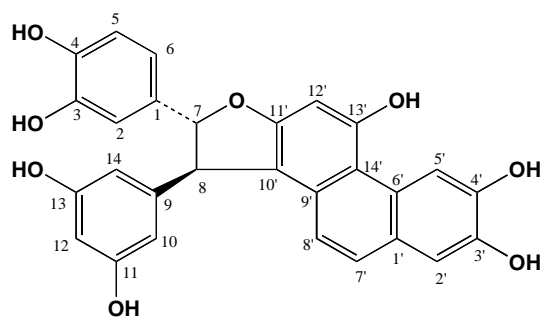


Figure 49 : Structure du composé **D10** : cassigarol D.

Tableau 23 : Données de RMN ^{13}C et ^1H pour **D10** (DMSO- d_6 et CD $_3$ -CO-CD $_3$; ^1H : 400.13 MHz).

N°	D10 (DMSO- d_6)				D10 (CD $_3$ -CO-CD $_3$)			
	δC	δH	m	J (Hz)	δC	δH	m	J (Hz)
1	132,9	-			135,0	-		
2	112,6	6,70	<i>d</i>	2,0	113,4	6,83	<i>d</i>	2,0
3	142,5	-			146,0	-		
4	146,3	-			146,0	-		
5	115,6	6,69	<i>d</i>	8,3	116,0	6,81	<i>d</i>	8,1
6	116,9	6,59	<i>dd</i>	8,3 ; 2,0	118,4	6,73	<i>dd</i>	8,1 ; 2,0
7	92,9	5,30	<i>d</i>	4,7	94,4	5,39	<i>d</i>	4,9
8	56,2	4,53	<i>d</i>	4,7	57,3	4,65	<i>d</i>	4,9
9	146,3	-			147,6	-		
10	105,3	5,99	<i>d</i>	2,1	106,8	6,15	<i>d</i>	2,2
11	158,6	-			159,8	-		
12	101,0	6,03	<i>t</i>	2,1	102,1	6,21	<i>t</i>	2,2
13	158,6	-			159,8	-		
14	105,3	5,99	<i>d</i>	2,1	106,8	6,15	<i>d</i>	2,2
1'	125,2	-			127,0	-		
2'	112,0	7,05	<i>s</i>		112,7	7,19	<i>s</i>	
3'	144,1	-			144,7	-		
4'	145,7	-			146,0	-		
5'	112,5	9,04	<i>s</i>		113,5	9,24	<i>s</i>	
6'	125,2	-			127,1	-		
7'	127,4	7,34	<i>d</i>	8,9	128,4	7,38	<i>d</i>	8,9
8'	119,5	6,94	<i>d</i>	8,9	121,1	7,07	<i>d</i>	8,9
9'	129,6	-			131,3	-		
10'	113,1	-			114,7	-		
11'	156,9	-			158,6	-		
12'	95,9	6,75	<i>s</i>		97,0	7,06	<i>s</i>	
13'	157,4	-			158,3	-		
14'	113,6	-			115,1	-		
OH-13'	-	10,51	<i>s</i>		-	8,11 <i>s</i> large (7 OH)		
OH	-	9,29	<i>s</i>					
OH	-	9,19	<i>s</i>					
OH-11	-	9,04	<i>s</i>					
OH-13	-	9,04	<i>s</i>					
OH	-	8,94	<i>s</i>					
OH	-	8,94	<i>s</i>					

L'analyse du spectre NOESY montre des corrélations entre H-7 et H-2, H-6, H-10 et H-14, entre H-8 et H-10, H-14 et H-2, et entre H-7' et H-2' et H-8'. De plus, la faible intensité de la tache de corrélation entre H-7 et H-8 permet de proposer une configuration relative *trans* pour ces deux protons du cycle tetrahydrofurane. L'ensemble de ces données permet de proposer la structure précédente pour **D10**. Cette structure a été confirmée par l'analyse des spectres de RMN de ce produit en solution dans de l'acétone deutériée (*Tableau 23*). Cette structure avait été décrite auparavant pour une molécule isolée du bois d'une Légumineuse de Thaïlande, *Cassia garrettiana* [Baba, 1992].

5.4.4.2.4. Structure du composé **D9** : scirpusine B

Le spectre de masse ESI-TOF du composé **D9** fait apparaître l'ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ à $m/z = 487,1350$ correspondant à la formule brute $C_{28}H_{23}O_8$ (cal. : 487,1393). La formule brute de **D9** est donc $C_{28}H_{22}O_8$, comportant 18 degrés d'insaturation.

Son spectre de RMN 1H (CD_3OD) présente les signaux de 13 protons aromatiques ou éthyléniques entre 6,1 et 6,8 ppm et de deux protons aliphatiques à 4,34 et 5,29 ppm sur les 22 que comporte la formule brute : sept protons ont donc été échangés avec le solvant. Le spectre RMN ^{13}C comporte 20 signaux dont deux à 107,4 et 160,0 ppm impliquent chacun deux carbones.

L'analyse du spectre 1H - 1H COSY met en évidence les six systèmes de spins **a-f** de la *figure 50*. Parmi les quatre systèmes aromatiques repérés, deux sont 1,3,4-trisubstitués (sous-structures **a** et **e**, *figure 50*), un 1,3,5-trisubstitué (sous-structure **b**) et un 1,2,4,6-tetrasubstitué (sous-structure **d**). De plus, le spectre COSY met en évidence les deux systèmes de deux protons vicinaux représentés par les sous-structures **c** et **f**. Ces six sous-structures ont été assemblées grâce aux données du spectre HMBC.

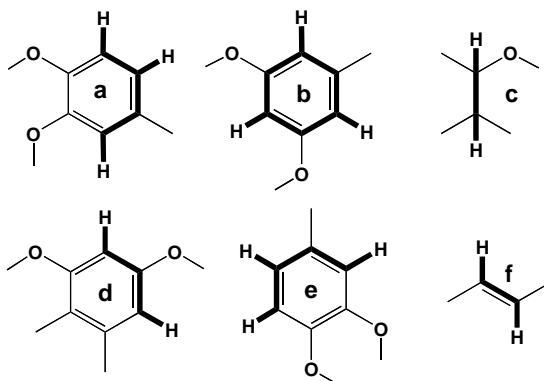


Figure 50 : Sous-structures **a-f** déduites du spectre 1H - 1H COSY de **D9**.

Ainsi, d'une part, le carbone à 58,1 ppm (C-8) est corrélé aux protons H-10 et H-14 de la sous-structure **d** ce qui permet de lier les carbones C-8 et C-9 et d'autre part le carbone à 94,9 ppm (C-7) est corrélé au proton H-2 de la sous-structure **a** ce qui permet de lier les carbones C-1 et C-7. Les protons H-2 et H-8 sont corrélés aux carbones à 118,5 ppm (C-10') et 163,0 ppm (C-11) et C-10' est lui-même corrélé aux protons H-12' (6,26 ppm) et H-14' (6,60 ppm), ce qui définit le système dihydrofurane. Le carbone C-9' est corrélé aux protons éthyléniques H-7' et H-8' et aussi à H-8 (4,34 ppm). Le carbone C-1' est corrélé d'une part aux mêmes protons éthyléniques H-7' et H-8' mais aussi à H-2' (6,70 ppm) et H-6' (6,65 ppm). Les sous-structures **d** et **e** sont ainsi reliées par une double liaison constituée par la sous-structure **f** (figure 51). La valeur de la constante de couplage $^3J_{H7-H8}$ de 16,3 Hz indique clairement que cette double liaison est *trans*.

L'ensemble des données permet de proposer pour **D9** la structure de la figure 52. Les attributions sont consignées dans le tableau 24.

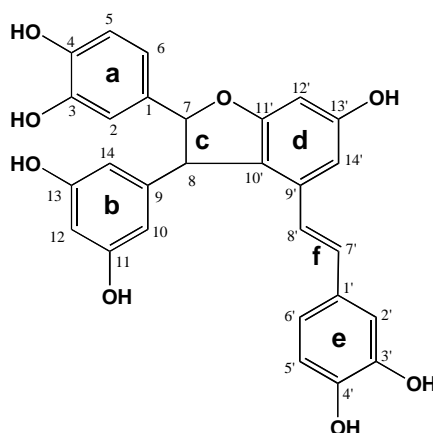


Figure 51 : Assemblage des sous-structures **a-f** à l'aide des corrélations du spectre HMBC de **D9**.

L'analyse de spectre NOESY confirme cette proposition. En effet, on observe des corrélations intenses entre les protons H-8 et H-10, H-14, H-2 et H-8' ; entre H-7 et H-2, H-6, H-10 et H-14 et enfin entre H-10 (14) et H-8'. Ces données indiquent de plus que la configuration relative des protons de la liaison C-7-C-8 du dihydrofurane est *trans*.

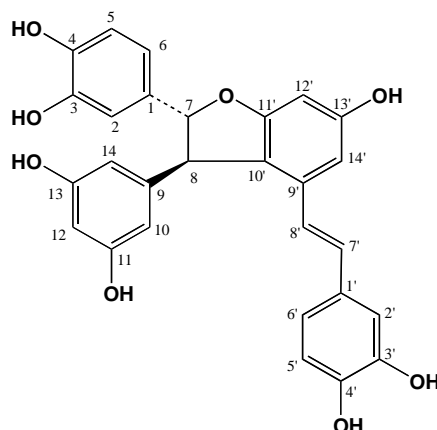


Figure 52 : Structure de **D9** ou scirpusine B.

Tableau 24 : Données de RMN ^{13}C et ^1H pour **D9** (CD_3OD , ^1H : 400.13 MHz, 298 K).

N°	D9 (CD_3OD)			
	δC	δH	m	J (Hz)
1	135,0	-		
2	113,7	6,76	<i>d</i>	2,0
3	146,3	-		
4	146,3	-		
5	118,5	6,64	<i>d</i>	8,0
6	116,3	6,75	<i>dd</i>	8,0 ; 2,0
7	94,9	5,29	<i>d</i>	5,8
8	58,1	4,34	<i>d</i>	5,8
9	148,9	-		
10	107,4	6,16	<i>d</i>	2,2
11	160,0	-		
12	102,3	6,18	<i>dd</i>	2,2 ; 2,2
13	160,0	-		
14	107,4	6,16	<i>d</i>	2,2
1'	130,9	-		
2'	114,1	6,70	<i>d</i>	2,0
3'	146,3	-		
4'	146,3	-		
5'	116,3	6,64	<i>d</i>	8,0
6'	120,1	6,65	<i>dd</i>	8,0 ; 2,0
7'	130,7	6,77	<i>d</i>	16,3
8'	123,7	6,54	<i>d</i>	16,3
9'	137,0	-		
10'	118,5	-		
11'	163,0	-		
12'	96,8	6,26	<i>d</i>	2,5
13'	158,0	-		
14'	104,5	6,60	<i>d</i>	2,5

L'ensemble de ces données permet de proposer pour le composé **D9**, la structure de la **figure 52**. C'est un bis-hydroxyresvératrol. Cette structure avait été attribuée à la scirpusine B qui avait été isolée des rhizomes de *Scirpus fluviatilis*, une Cyperaceae [Nakajima, 1978], puis de l'écorce de tronc de *Callistemon rigidus* [Kobayashi, 2006].

Les composés **D2** et **D3** sont des dérivés du resvératrol possédant un hydroxyle supplémentaire en position 3, **D2** ayant en plus subi une réduction de la double liaison. Les deux autres composés sont des bis-stilbènes résultant d'un couplage oxydatif formant une liaison carbone-carbone entre les positions 8 et 10 de deux unités hydroxy-resvératrol (*figure 53*). Ensuite, l'addition d'un hydroxyle phénolique sur la double liaison C-7-C-8 forme un dihydrobenzofurane et conduit à **D9**. Enfin, l'isomérisation de la double liaison éthylénique de **D9**, suivie d'un nouveau couplage oxydatif entre les positions 6 et 14, conduit à la formation d'un noyau phénanthrène et donne le composé **D10**.

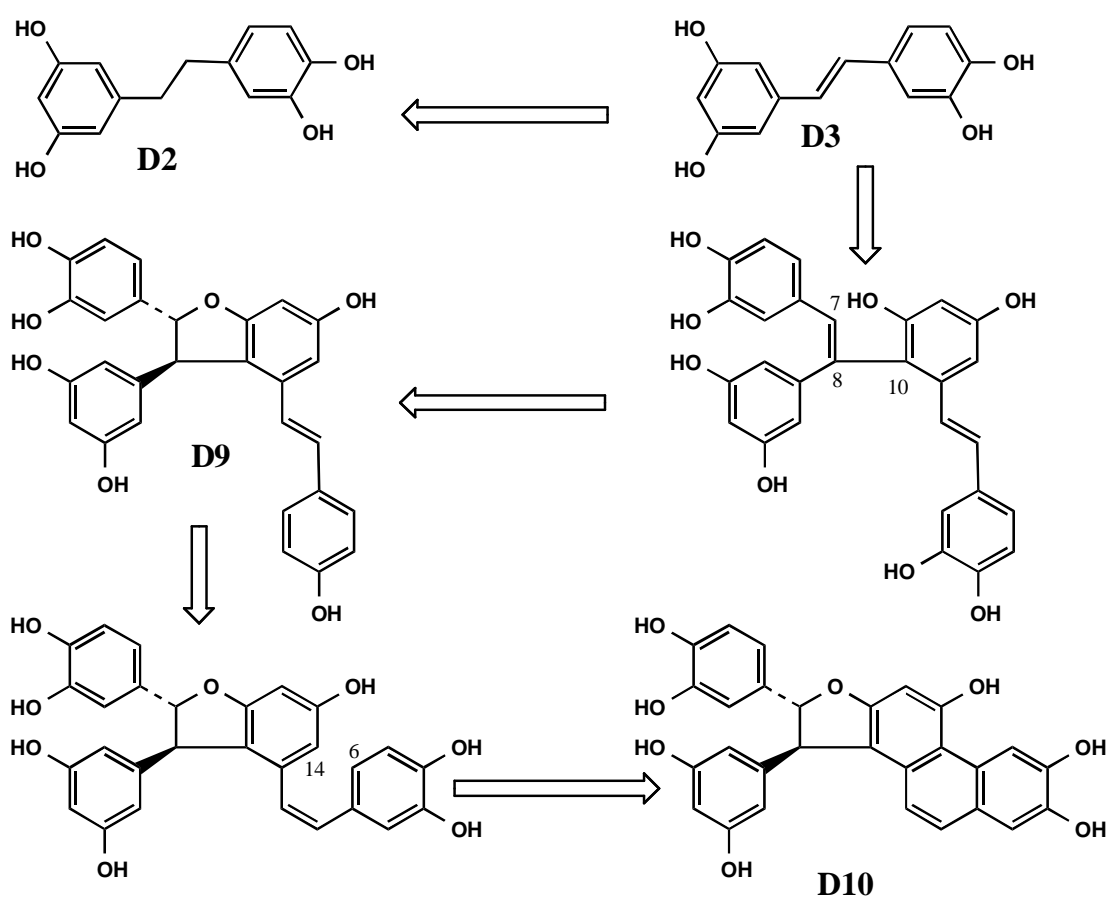


Figure 53 : Relations biosynthétiques plausibles entre les stilbènes isolés de *Dioscorea antaly* Jum.& Perr.

6 – ETUDE TOXICOLOGIQUE

Ce travail ayant pour principal objectif l'étude de la toxicité des tubercules de *D. antaly*. Il a consisté à vérifier si cette toxicité est justifiée, et dans l'affirmative, l'évaluer et la caractériser et enfin identifier les composés qui en sont responsables.

L'extrait brut de tubercule et les produits isolés, quand leur quantité le permet, ont été testés sur divers organismes animaux à sang chaud (rongeur et oiseau) et à sang froid (poisson).

Des recherches sur les utilisations thérapeutiques possibles des extraits ont été entreprises. Dans cette perspective, des tests antimicrobiens, antiinflammatoire et antipaludique ont été effectués.

6.1. ETUDE DE L'ACTIVITE TOXIQUE SUR SOURIS

6.1.1. SYMPTOMES DEVELOPPES

Les symptômes varient selon la voie d'administration de l'extrait. Ces symptômes sont similaires pour les deux doses éprouvées (DL₅₀ et DL₁₀₀). Toutefois, la différence réside au niveau du temps d'apparition des symptômes. En effet, ceux causés par la dose la plus forte apparaissent plus rapidement.

Par voie orale, il provoque chez la souris les symptômes suivants : une piloérection et une démangeaison au niveau des museaux suivies d'une contorsion abdominale, d'une ataxie accompagnée d'une augmentation de la fréquence respiratoire (hyperpnée). La mort, précédée d'un état d'immobilisation de l'animal, survient au bout de 18 h.

Par voie intra-péritonéale, quelques minutes après injection de l'extrait les animaux présentent une piloérection suivie d'une contorsion abdominale. Ces états sont accompagnés de tremblements intermittents. L'activité motrice diminue progressivement jusqu'à l'immobilisation totale peu de temps avant la mort qui a lieu au-delà de 2 h après l'injection.

6.1.2. ETUDE DES LESIONS ANATOMO-PATHOLOGIQUES

Les effets de l'extrait brut de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. au niveau tissulaire ont été appréciés par comparaison de coupes histologiques d'organes (cerveau, foie, reins, poumons, cœur, estomac et intestin) prélevés de souris non traitées, de souris traitées puis sacrifiées ou de cadavres immédiatement après le décès. Les doses d'extrait utilisées sont 5 et 12 g/kg pour l'administration orale et 1 et 1,3 g/kg pour l'injection intra-péritonéale.

6.1.2.1. Lésions macroscopiques

L'autopsie a révélé des lésions macroscopiques au niveau du foie et de l'estomac. Le foie présente des tâches noîrâtres hémorragiques et blanchâtres, tandis que l'estomac augmente de volume. Les autres organes, à savoir le cerveau, les poumons, le cœur, l'intestin et les reins ont un aspect macroscopique apparemment normal.

6.1.2.2. Lésions microscopiques

Les résultats de l'étude anatomopathologique (tableau 25 et figures 54-67) ont révélé que l'extrait brut de tubercules de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. provoque des lésions de tous les organes examinés (cerveau, foie, reins, poumons, cœur, estomac et intestin). Les lésions varient selon l'organe, la dose et la voie d'administration de l'extrait ainsi que la durée du temps d'exposition. En général, ces lésions se présentent sous forme d'une réaction inflammatoire. Elle est caractérisée par une congestion vasculaire, des foyers d'imbibition oedémateuse et d'infiltrat inflammatoire polymorphe plus ou moins diffus.

De tous ces organes, le cerveau est le moins touché. En effet, seule une dose élevée administrée par voie intra-péritonéale et après un temps d'exposition au-delà de 7 h y provoque des lésions notables. Par contre, le foie et les reins, qui sont les organes d'élimination des toxines sont les plus atteints. Toutefois, l'organe cible semble être le cœur car les lésions observées au niveau de cet organe sont importantes et se présentent sous forme de péricardite et de myocardite à l'origine des altérations cellulaires. Ces dommages pourraient à eux seuls entraîner la mort des animaux.

Au niveau de l'appareil digestif, avec le mode d'administration orale, des lésions sont observées au niveau de l'estomac et de l'intestin. Il s'agit d'une atteinte d'une ou des quatre tuniques digestives. Les lésions observées à une dose élevée au niveau de l'estomac sont du type gastrite intersituelle ou ulcérate. Néanmoins, à une dose plus faible, une hyperplasie des

cellules mucosécrétantes (cellules bordantes) est observée. Les lésions de l'intestin sont constituées par une inflammation plus ou moins importante de la paroi intestinale avec abrasion superficielle de la muqueuse.

Tableau 25A : Lésions tissulaires provoquées par l'extrait brut de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. en fonction de la dose, de la voie d'administration et de la durée d'exposition au niveau du cerveau et du poumon.

CERVEAU					
Durée de l'exposition en heure	Lésions observées selon la voie d'administration				
	Voie orale		Voie intra-péritonéale		
48	5	- Méninge et parenchyme cérébral histologiquement normaux	1	- Méninge et parenchyme cérébral histologiquement normaux	
72	5	- Méninge et parenchyme cérébral histologiquement normaux	1	- Méninge et parenchyme cérébral histologiquement normaux	
3	12	- Méninge et parenchyme cérébral histologiquement normaux	1,3	- Méninge et parenchyme cérébral histologiquement normaux	
24	12	- Méninge et parenchyme cérébral histologiquement normaux	1,3	- Méninge histologiquement normal - Présence de foyers de cellules inflammatoires au niveau du parenchyme cérébral	
POUMON					
Durée de l'exposition en heure	Lésions observées selon la voie d'administration				
	Voie orale		Voie intra-péritonéale		
48	5	- Atteinte du parenchyme pulmonaire (éclatement des alvéoles, congestion vasculaire, infiltrat inflammatoire des septums inter-alvéolaires, nappe hémorragique) - Atteinte du tissu péri-bronchiolaire (congestion vasculaire, œdème, infiltrat inflammatoire)	1	- Atteinte du parenchyme pulmonaire (éclatement des alvéoles, congestion vasculaire, infiltrat inflammatoire des septums inter-alvéolaires)	
72	5	- Atteinte marquée du parenchyme pulmonaire (éclatement des alvéoles, congestion vasculaire, infiltrat inflammatoire des septums inter-alvéolaires, nappe hémorragique) - Atteinte du tissu péri-bronchiolaire (congestion vasculaire, œdème, infiltrat inflammatoire)	1	- Atteinte du parenchyme pulmonaire (éclatement des alvéoles, épaississement focalisé du septum inter-alvéolaire par de nombreuses cellules inflammatoires et des capillaires congestifs)	
3	12	- Atteinte du parenchyme pulmonaire (éclatement des alvéoles, épaississement focalisé du septum inter-alvéolaire par congestion vasculaire et nappe hémorragique importante)	1,3	- Atteinte du parenchyme pulmonaire (éclatement des alvéoles, épaississement diffus du septum inter-alvéolaire par de nombreuses cellules inflammatoires, des capillaires congestifs et des foyers d'imbibition oedémateuse) - Présence d'un infiltrat inflammatoire très marquée au niveau de la paroi bronchiolaire	
24	12	- Atteinte du parenchyme pulmonaire (éclatement des alvéoles, épaississement diffus du septum inter-alvéolaire par congestion vasculaire et nappe hémorragique importante) - Atteinte du tissu péri-bronchiolaire (infiltrat inflammatoire)	1,3	- Atteinte du parenchyme pulmonaire (éclatement des alvéoles, épaississement diffus du septum inter-alvéolaire par de nombreuses cellules inflammatoires, des capillaires congestifs, des foyers d'imbibition oedémateuse et des nappes hémorragiques) - Présence d'un infiltrat inflammatoire très marquée au niveau de la paroi bronchiolaire	

Les doses utilisées sont celles des DL₅₀ et DL₁₀₀ par voie intrapéritonéale (1 et 1,3 g/kg) et par voie orale (5 et 12 g/kg).

Tableau 25B : Lésions tissulaires provoquées par l'extrait brut de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. en fonction de la dose, de la voie d'administration et de la durée d'exposition au niveau du cœur et du rein.

COEUR				
Durée de l'exposition en heure	Lésions observées selon la voie d'administration			
	Voie orale		Voie intra-péritonéale	
48	5	Péricarde et myocarde histologiquement normaux	1	- Présence de quelques cellules inflammatoires et d'œdème au niveau du péricarde (discrète péricardite) et du myocarde (discrète myocardite)
72	5	- Œdème et infiltrat inflammatoire au niveau du péricarde (péricardite). - Œdème au niveau du myocarde	1	- Péricardite et myocardite modérées par présence d'assez nombreuses cellules inflammatoires
3	12	- Œdème et infiltrat inflammatoire au niveau du péricarde (péricardite) - Œdème et capillaires congestifs au niveau du myocarde	1,3	- Discrète péricardite et myocardite modérée par présence d'assez nombreuses cellules inflammatoires et par des foyers d'imbibition œdémateuse
24	12	- Œdème et infiltrat inflammatoire au niveau du péricarde (péricardite) - Œdème, capillaires congestifs et infiltrat inflammatoire péri-vasculaire au niveau du myocarde (myocardite)	1,3	- Discrète péricardite et myocardite sévère par présence de capillaires congestifs, de nombreuses cellules inflammatoires et par des foyers d'imbibition œdémateuse.
REIN				
Durée de l'exposition en heure	Lésions observées selon la voie d'administration			
	Voie orale		Voie intra-péritonéale	
48	5	- Atteinte glomérulaire par réduction de la taille des glomérules, mais congestion du floculus (capillaires intra-glomérulaires)	1	- Atteinte glomérulaire (œdème, infiltrat inflammatoire, congestion vasculaire) (glomérulite)
72	5	- Atteinte glomérulaire : par réduction de la taille des glomérules, mais congestion du floculus (capillaires intra-glomérulaires) avec infiltrat inflammatoire intra-glomérulaire (glomérulite) - Infiltrat inflammatoire du tissu interstitiel inter-tubulaire et inter- glomérulaire (néphrite interstitielle)	1	- Atteinte glomérulaire : œdème, infiltrat inflammatoire, congestion vasculaire (glomérulite) - Congestion et inflammation inter-tubulaire avec œdème (néphrite interstitielle)
7	12	- Atteinte glomérulaire (destruction des glomérules par les capillaires congestifs, les cellules inflammatoires et les foyers d'imbibition œdémateuse importante)	1,3	- Atteinte glomérulaire (œdème, infiltrat inflammatoire important, congestion vasculaire) (glomérulite marquée) - Présence de capillaires congestifs et de multiples larges foyers inflammatoires inter-tubulaires avec œdème (néphrite interstitielle sévère)
24	12	- Atteinte glomérulaire (destruction des glomérules par les capillaires congestifs, les cellules inflammatoires et les foyers d'imbibition œdémateuse importante)	1,3	- Atteinte glomérulaire (œdème, infiltrat inflammatoire important, congestion vasculaire) (glomérulite marquée) - Présence de capillaires congestifs et de multiples larges foyers inflammatoires inter-tubulaires avec œdème (néphrite interstitielle sévère)

Les doses utilisées sont celles des DL₅₀ et DL₁₀₀ par voie intrapéritonéale (1 et 1,3 g/kg) et par voie orale (5 et 12 g/kg).

Tableau 25C : Lésions tissulaires provoquées par l'extrait brut de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. en fonction de la dose, de la voie d'administration et de la durée d'exposition au niveau de l'estomac et du foie.

ESTOMAC					
Durée de l'exposition en heure	Lésions observées selon la voie d'administration				
	Voie orale			Voie intra-péritonéale	
48	5	- Muqueuse gastrique peu modifiée - Inflammation au niveau de la sous muqueuse et de la musculuse (gastrite interstitielle)		1	- Inflammation modérée au niveau de la sous muqueuse - Inflammation importante dans la musculuse (gastrite interstitielle modérée)
72	5	- Epaississement de la muqueuse gastrique par multiplication des cellules mucosécrétantes. - Inflammation au niveau de la sous muqueuse et de la musculuse (gastrite interstitielle)		1	- Musculuse : présence de nombreuses cellules inflammatoires - Séreuse : présence de cellules inflammatoires, de vaisseaux dilatés et d'œdème (gastrite interstitielle sévère)
7	12	- Muqueuse gastrique partiellement ulcérée ou épaissie par endroits - Présence de nombreuses cellules inflammatoires au niveau de la musculuse - Séreuse occupée par quelques cellules inflammatoires (gastrite ulcéralive)		1,3	- Présence de cellules inflammatoires sur les 4 tuniques gastriques (Réaction inflammatoire modérée de la paroi gastrique)
24	12	- Muqueuse gastrique partiellement ulcérée ou par endroits épaissie - Présence de nombreuses cellules inflammatoires au niveau de la musculuse. - Décollement focalisé de la séreuse par l'œdème avec quelques cellules inflammatoires (gastrite ulcéralive)		1,3	- Nombreuses cellules inflammatoires sur les 4 tuniques (Réaction inflammatoire importante de la paroi gastrique)
FOIE					
Durée de l'exposition en heure	Lésions observées selon la voie d'administration				
	Voie orale			Voie intra-péritonéale	
48	5	- Parenchyme hépatique histologiquement normal		1	- Parenchyme hépatique remanié par un infiltrat inflammatoire localisé autour de la veine centrolobulaire avec présence de capillaires sinusoides dilatés, de petites nappes hémorragiques et d'œdème
72	5	- Parenchyme hépatique siège d'un infiltrat inflammatoire diffus avec présence de quelques foyers d'éléments inflammatoires, de capillaires sinusoides dilatés et d'œdème		1	- Parenchyme hépatique remanié par un infiltrat inflammatoire localisé autour de la veine centrolobulaire avec présence de capillaires sinusoides dilatés, de petites nappes hémorragiques et d'œdème
7	12	- Parenchyme hépatique siège d'un infiltrat inflammatoire diffus avec une dilatation de la veine centrolobulaire et présence de discrets foyers d'imbibition œdémateuse		1,3	- Parenchyme hépatique remanié par un infiltrat inflammatoire localisé autour de la veine centrolobulaire avec présence de capillaires sinusoides dilatés, de petites nappes hémorragiques et d'œdème - Transformation adipeuse des hépatocytes (discrète stéatose hépatique)
24	12	- Atteinte du parenchyme hépatique caractérisée par un infiltrat inflammatoire diffus dense avec une dilatation des capillaires sinusoides et destruction des hépatocytes par picnose nucléaire et imbibition œdémateuse		1,3	- Parenchyme hépatique remanié par un infiltrat inflammatoire localisé autour de la veine centrolobulaire avec présence de capillaires sinusoides dilatés, de petites nappes hémorragiques et d'œdème - Transformation adipeuse des hépatocytes (discrète stéatose hépatique)

Les doses utilisées sont celles des DL₅₀ et DL₁₀₀ par voie intrapéritonéale (1 et 1,3 g/kg) et par voie orale (5 et 12 g/kg).

Tableau 25D : Lésions tissulaires provoquées par l'extrait brut de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. en fonction de la dose, de la voie d'administration et de la durée d'exposition au niveau de l'intestin.

INTESTIN				
Durée de l'exposition en heure	Lésions observées selon la voie d'administration			
	Voie orale		Voie intra-péritonéale	
48	5	- Présence de cellules inflammatoires au niveau de la musculature, de la sous muqueuse et de la muqueuse (colite interstitielle modérée)	1	- Présence de cellules inflammatoires au niveau de la muqueuse, de la sous muqueuse et de la musculature (colite interstitielle)
72	5	- Inflammations importantes au niveau de la sous muqueuse et de la muqueuse provoquant un épaissement de la sous muqueuse et une réduction de la musculature (colite interstitielle sévère)	1	- Présence de cellules inflammatoires au niveau de la muqueuse, de la musculature et de la sous muqueuse avec congestion vasculaire (colite interstitielle)
7	12	- Abrasion partielle des villosités intestinales. - Œdème, quelques cellules inflammatoires et congestion vasculaire au niveau de la muqueuse (colite ulcéreuse)	1,3	- Rares cellules inflammatoires sur l'axe des villosités intestinales de la muqueuse.
24	12	- Abrasion partielle des villosités intestinales. - Présence de cellules inflammatoires au niveau de la muqueuse, de la musculature, de la sous muqueuse avec congestion vasculaire (colite ulcéreuse)	1,3	- Apparition de quelques cellules inflammatoires au niveau de la muqueuse, de la sous muqueuse et de la musculature. - Epaissement de la musculature par l'œdème (colite interstitielle)

Les doses utilisées sont celles des DL₅₀ et DL₁₀₀ par voie intrapéritonéale (1 et 1,3 g/kg) et par voie orale (5 et 12 g/kg).

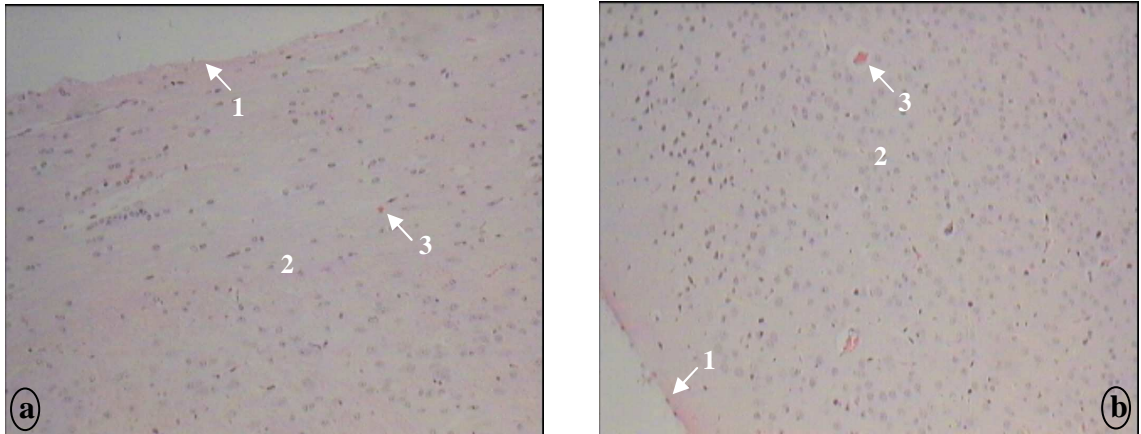


Figure 54 : Coupes histologiques de a) **cerveau** non traité b) **cerveau** traité par l'extrait à 5 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 72 h.
1 : méninge ; **2** : parenchyme cérébral ; **3** : capillaire sanguin.

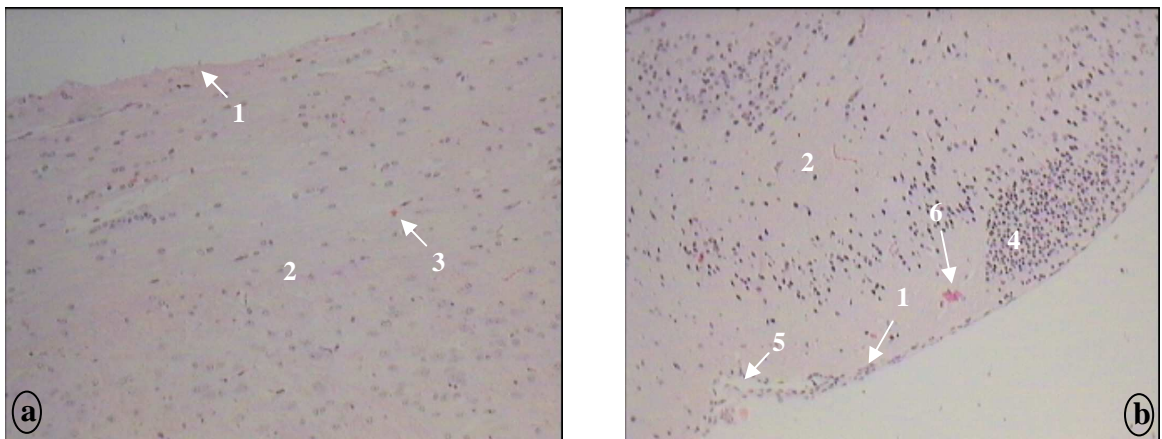


Figure 55 : Coupes histologiques de a) **cerveau** non traité b) **cerveau** traité par l'extrait à 1,3g/kg par voie intra-péritonéale après un temps d'exposition de 24 h.
1 : méninge ; **2** : parenchyme cérébral ; **3** : capillaire sanguin ;
4 : foyer inflammatoire ; **5** : œdème ; **6** : vaisseau congestif.

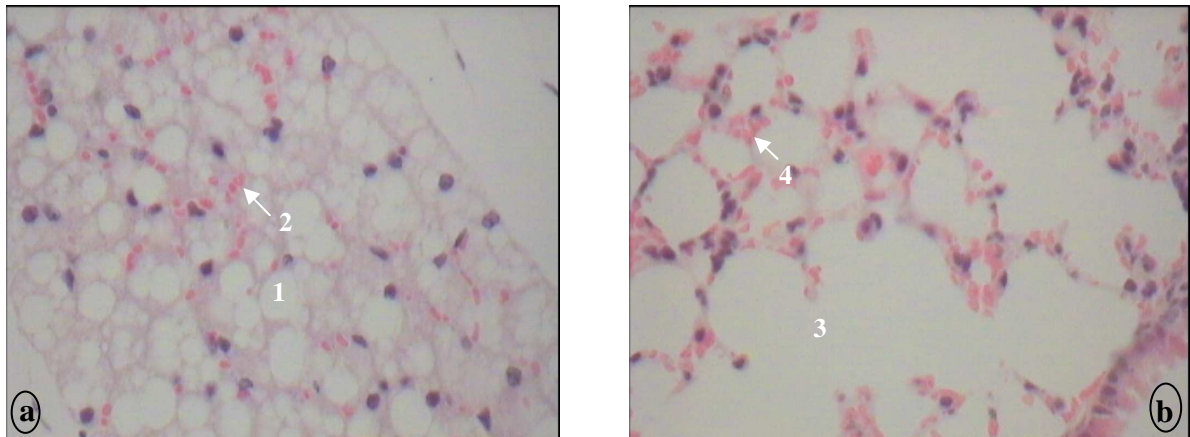


Figure 56 : Coupes histologiques de a) **poumon** non traité b) **poumon** traité par l'extrait à 5 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 72 h.
1 : alvéole ; **2** : capillaires interalvéolaires ; **3** : alvéoles éclatées ; **4** : capillaires congestifs.

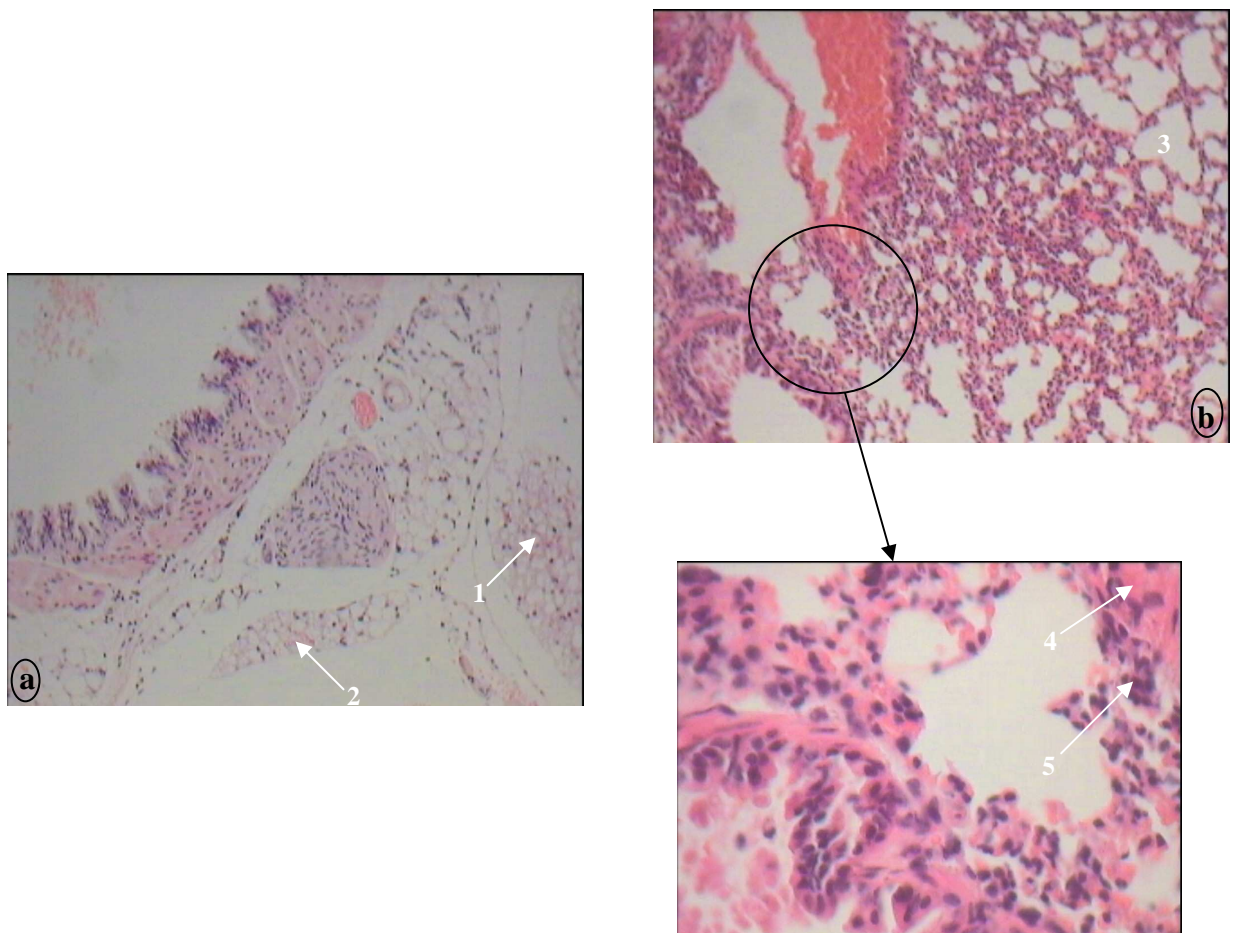


Figure 57 : Coupes histologiques de a) **poumon** non traité b) **poumon** traité par l'extrait à 5 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 72 h.
1 : alvéole ; **2** : capillaires interalvéolaires ; **3** : alvéoles éclatées ; **4** : capillaires congestifs ; **5** : infiltrat inflammatoire.

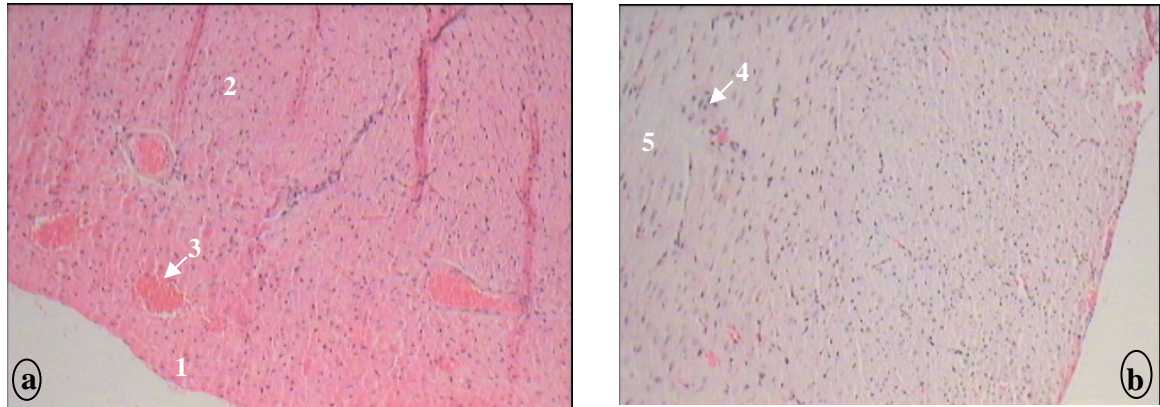


Figure 58 : Coupes histologiques de a) **cœur** non traité b) **cœur** traité par l'extrait à 12 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 72 h.
1 : péricarde ; **2** : myocarde ; **3** : vaisseau sanguin ; **4** : cellules inflammatoires ; **5** : œdème.

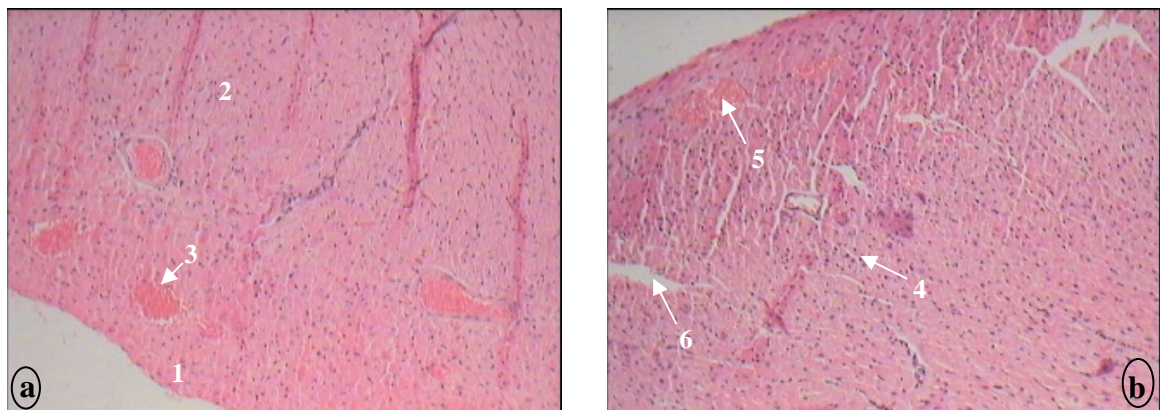


Figure 59 : Coupes histologiques de a) **cœur** non traité b) **cœur** traité par l'extrait à 1,3 g/kg par voie intra péritonéale après un temps d'exposition de 72 h.
1 : péricarde ; **2** : myocarde ; **3** : vaisseau sanguin ; **4** : cellules inflammatoires ; **5** : vaisseau dilaté ; **6** : oedème.

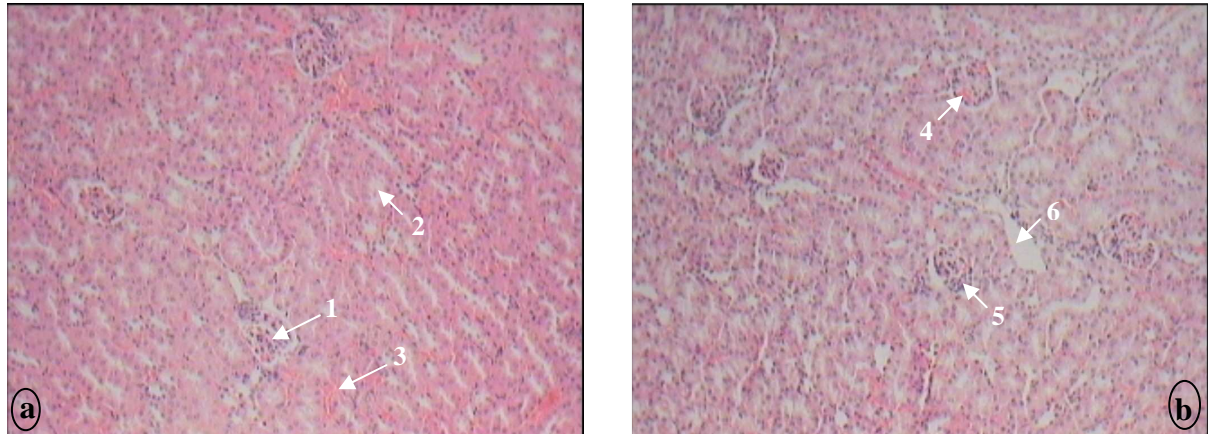


Figure 60 : Coupes histologiques de a) **rein** non traité b) **rein** traité par l'extrait à 12 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 72 h.

1 : glomérule ; **2** : tubule ; **3** : vaisseau sanguin intertubulaire ;

4 : capillaire intra-glomérulaire congestif ; **5** : cellules inflammatoires ; **6** : oedème.

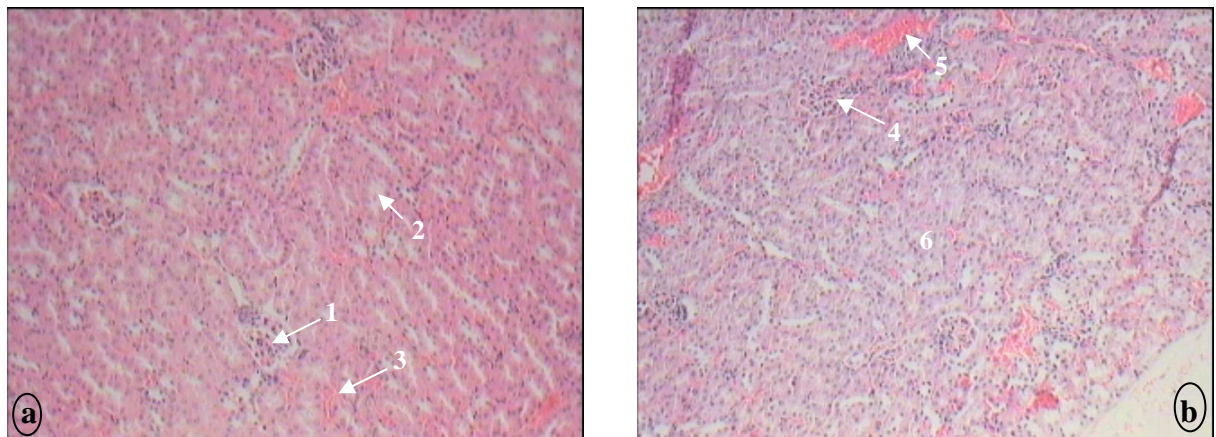


Figure 61 : Coupes histologiques de a) **rein** non traité b) **rein** traité par l'extrait à 1,3 g/kg par voie intra péritonéale après un temps d'exposition de 24 h.

1 : glomérule ; **2** : tubule ; **3** : vaisseau sanguin intertubulaire ; **4** : infiltrat inflammatoire ;

5 : capillaire congestif ; **6** : oedème.

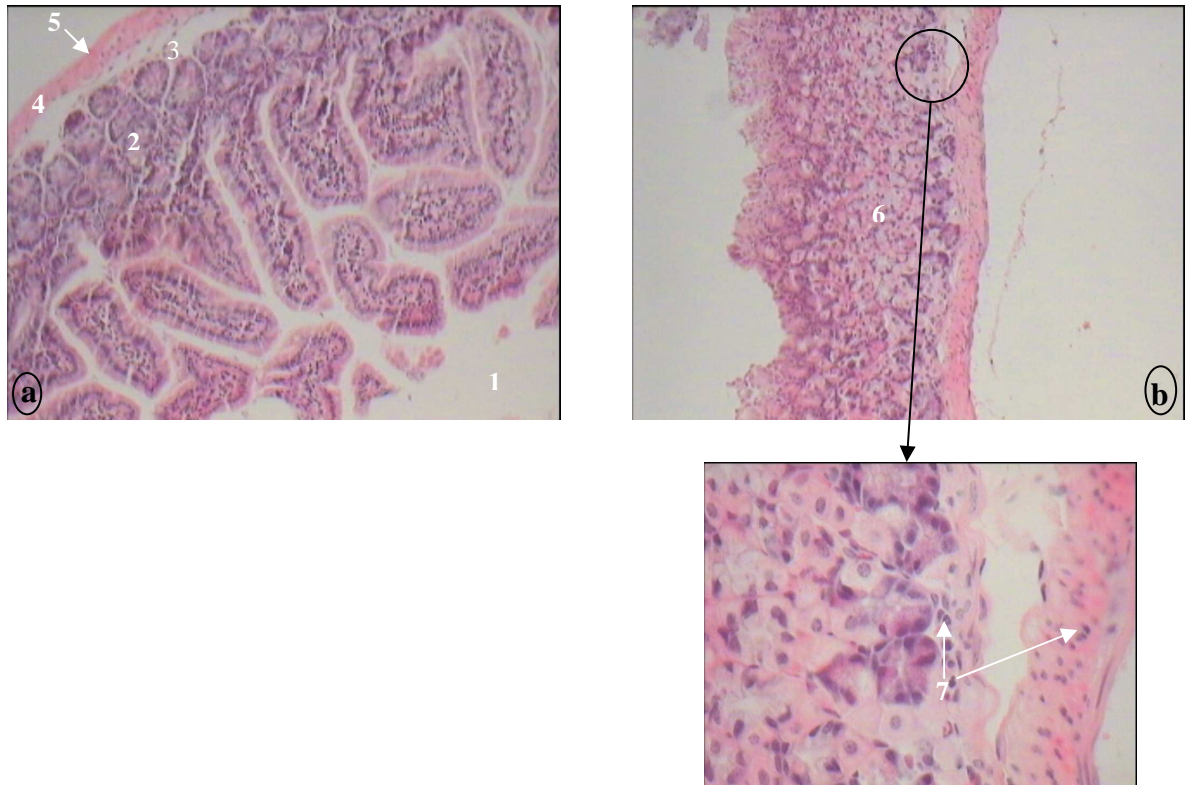


Figure 62 : Coupes histologiques de a) **estomac** non traité b) **estomac** traité par l'extrait à 12g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 24 h.
1 : cavité gastrique ; **2** : muqueuse ; **3** : sous muqueuse ; **4** : musculature ; **5** : séreuse ; **6** : muqueuse épaissie ; **7** : cellules inflammatoires.

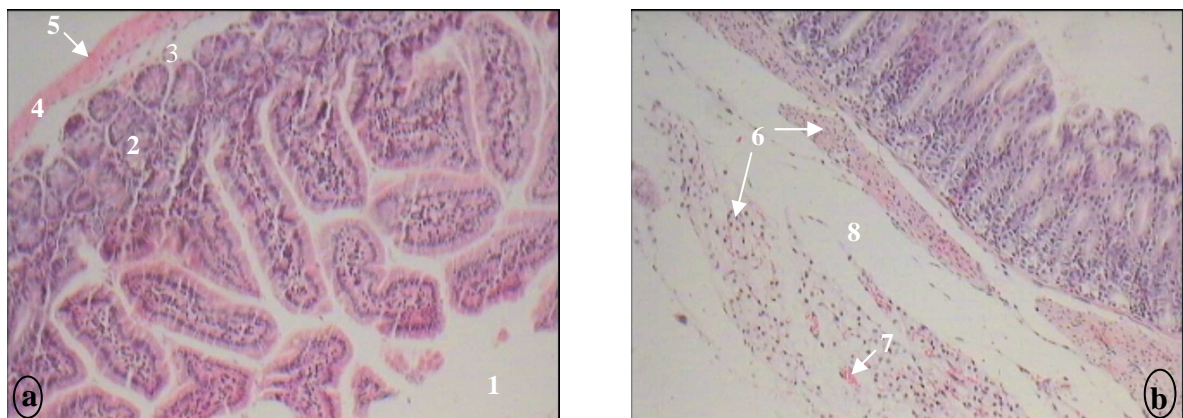


Figure 63 : Coupes histologiques de a) **estomac** non traité b) **estomac** traité par l'extrait à 1 g/kg par voie intra-péritonéale après un temps d'exposition de 72 h.
1 : cavité gastrique ; **2** : muqueuse ; **3** : sous muqueuse ; **4** : musculature ; **5** : séreuse ; **6** : cellules inflammatoires ; **7** : vaisseau sanguin dilaté ; **8** : œdème.

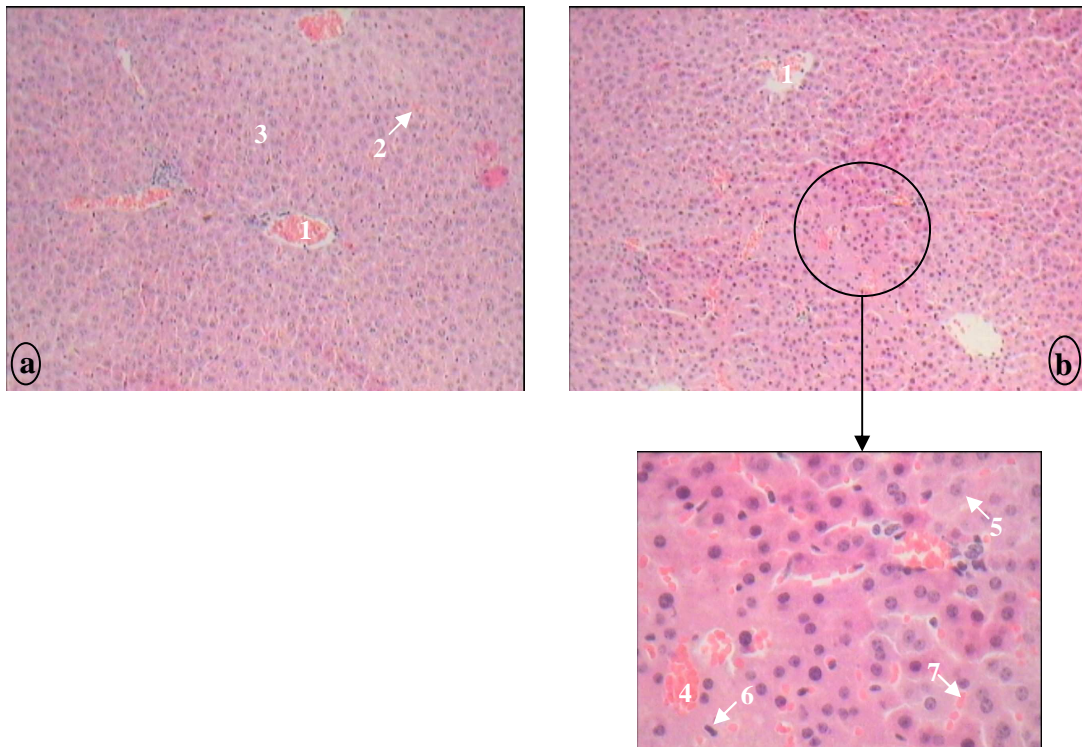


Figure 64 : Coupes histologiques de a) **foie** non traité b) **foie** traité par l'extrait à 12 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 24 h.
1 : veine centrolobulaire ; **2** : capillaire sinusoïde ; **3** : parenchyme hépatique ; **4** : nappe hémorragique ; **5** : hépatocyte normal ; **6** : hépatocyte altéré avec son noyau pycnotique ; **7** : capillaire sinusoïde dilaté.

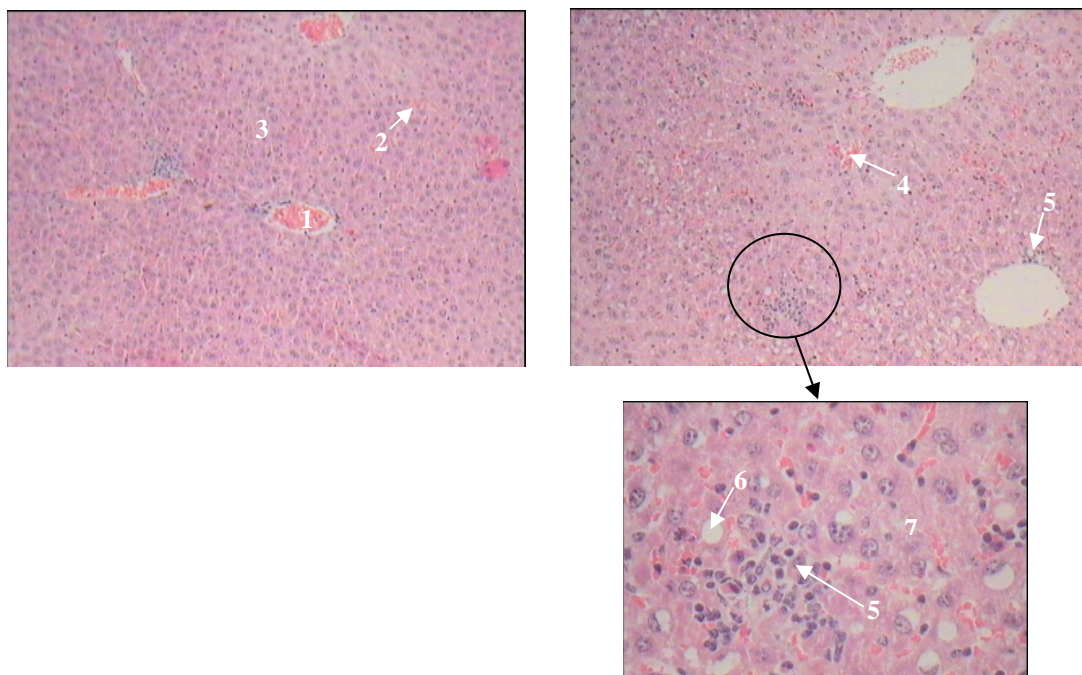


Figure 65 : Coupes histologiques de a) **foie** non traité b) **foie** traité par l'extrait à 1,3 g/kg par voie intrapéritonéale après un temps d'exposition de 24 h.
1 : veine centrolobulaire ; **2** : capillaire sinusoïde ; **3** : parenchyme hépatique ; **4** : nappe hémorragique ; **5** : infiltrats inflammatoires ; **6** : adipocyte ; **7** : œdème.

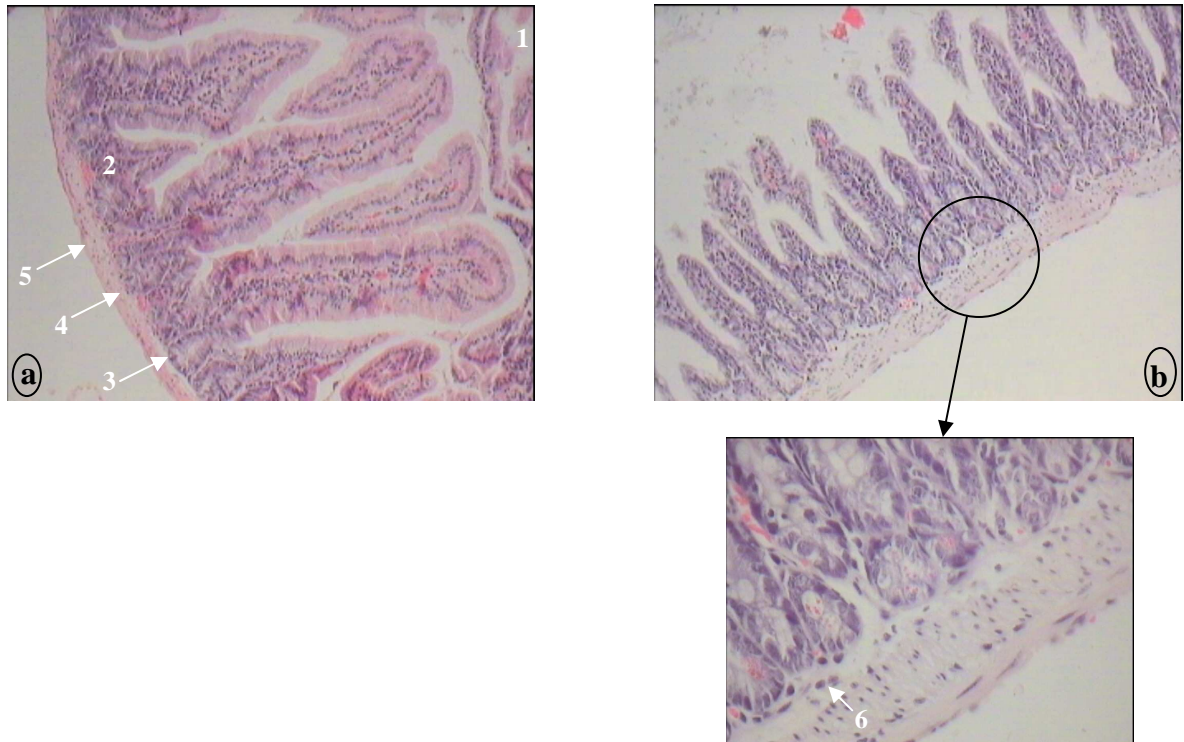


Figure 66 : Coupes histologiques de a) **intestin** non traité b) **intestin** traité par l'extrait à 1,3 g/kg par voie intrapéritonéale après un temps d'exposition de 24 h.
1 : cavité intestinale ; **2** : muqueuse ; **3** : sous muqueuse ; **4** : musculature ; **5** : séreuse ; **6** : infiltrat inflammatoire.

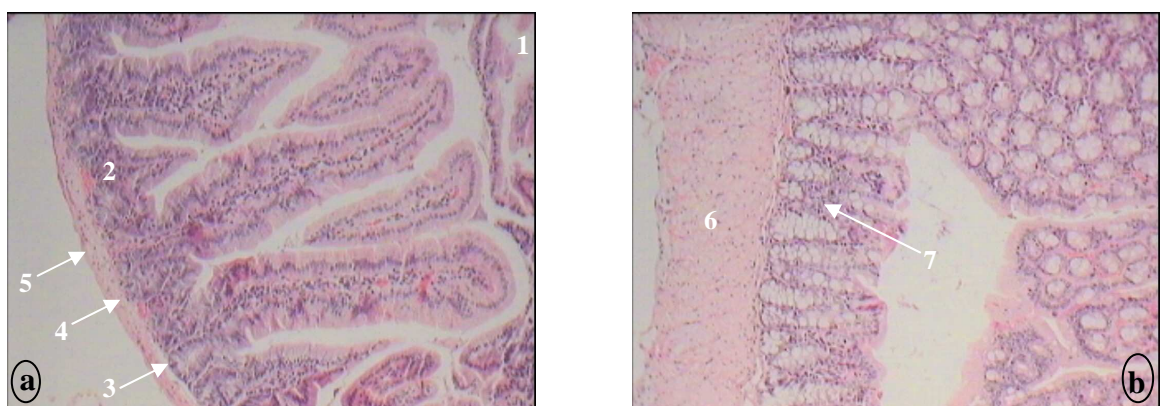


Figure 67 : Coupes histologiques de a) **intestin** non traité b) **intestin** traité par l'extrait à 1,3 g/kg par voie intrapéritonéale après un temps d'exposition de 24 h.
1 : cavité intestinale ; **2** : muqueuse ; **3** : sous muqueuse ; **4** : musculature ; **5** : séreuse ; **6** : épaissement de la musculature ; **7** : infiltrat inflammatoire.

6.1.3. TOXICITE

La toxicité de l'extrait brut aqueux de *Dioscorea antaly* est appréciée par la détermination de la DL₅₀ (24 h), ou dose tuant 50% des animaux testés en 24 h, sur la souris. La DL₅₀ est un indice de toxicité aiguë.

Deux DL₅₀ ont été déterminées, l'une orale et l'autre intra-péritonéale. La méthode utilisée est celle de Reed et Muench (1938) (Cf. « Partie expérimentale », §3.1.1.2, p. 186).

6.1.3.1. Détermination de la DL50 orale

Les animaux testés sont gavés d'extrait brut aqueux à l'aide d'une aiguille à gavage. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 26.

Tableau 26 : Calcul des totaux cumulatifs dans la détermination de la DL50 (24 h) de l'extrait brut aqueux de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr., par voie orale, selon la méthode de Reed et Muench (1938).

Dose (g/kg de souris)	Nombre de souris testées	Nombre de souris		Totaux cumulatifs	
		survivantes	mortes	survivantes	mortes
1,2	5	5	0	14	0
2,16	5	4	1	9	1
3,88	5	3	2	5	3
6,99	5	2	3	2	6
12,58	5	0	5	0	11

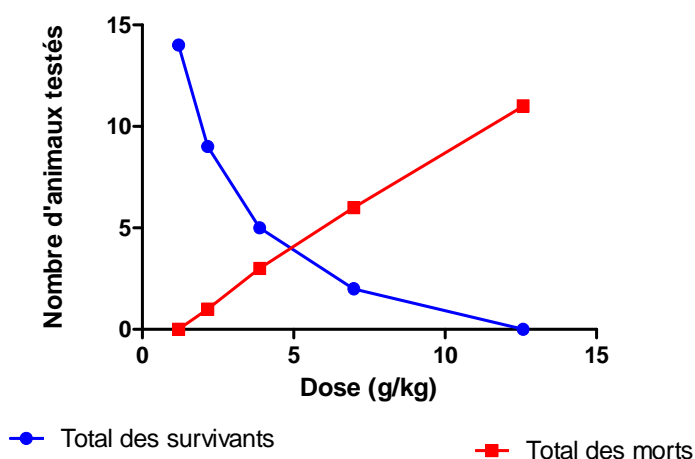


Figure 68 : Courbes des totaux cumulatifs permettant la détermination de la DL₅₀ (24 h) par la méthode de Reed et Muench (1938).

La projection de l'intersection des deux courbes de totaux cumulatifs nous donne une valeur approximative de la DL₅₀ (24 h) de **4,95 g/kg** de poids de souris.

D'après la deuxième variante, ou la méthode de calcul des mêmes auteurs en utilisant la formule citée plus haut avec $B = 3,88$ g/kg de souris ; $N = 0,4$; $M = 0,6$ et $R = 1,8$; la valeur de la DL_{50} (24 h) est de **5,06 g/kg** de poids de souris.

Les deux variantes donnent, pour l'extrait brut aqueux administré par voie orale, une valeur de DL_{50} (24 h) avoisinante les **5 g/kg** de souris.

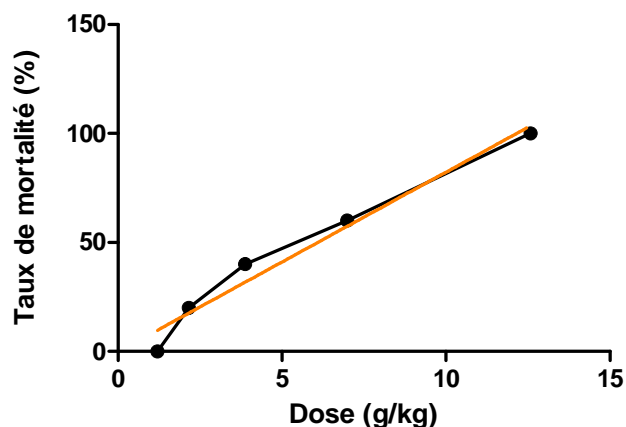


Figure 69 : Courbe effet-dose de l'extrait brut aqueux de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. par administration par voie orale et sa droite de régression linéaire.

Expérimentalement, en utilisant la droite de régression linéaire, la valeur de la DL_{50} (24 h) est estimée à **5,85 g/kg** de souris.

6.1.3.2. Détermination de la DL_{50} intra péritonéale

Ce mode d'administration permet une meilleure distribution de l'extrait au niveau des viscères.

Comme dans le cas de l'administration *per os*, les deux variantes de la méthode de Reed et Muench (1938) sont utilisées. Les données expérimentales sont présentées dans le tableau 27.

Tableau 27 : Calcul des totaux cumulatifs dans la détermination de la DL_{50} (24 h) de l'extrait brut aqueux de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr., par voie intra péritonéale, selon la méthode de Reed et Muench (1938).

Dose (mg/kg de souris)	Nombre de souris testées	Nombre de souris		Totaux cumulatifs	
		survivantes	mortes	survivantes	mortes
750	5	5	0	10	0
900	5	3	2	5	2
1080	5	2	3	2	5
1296	5	0	5	0	10

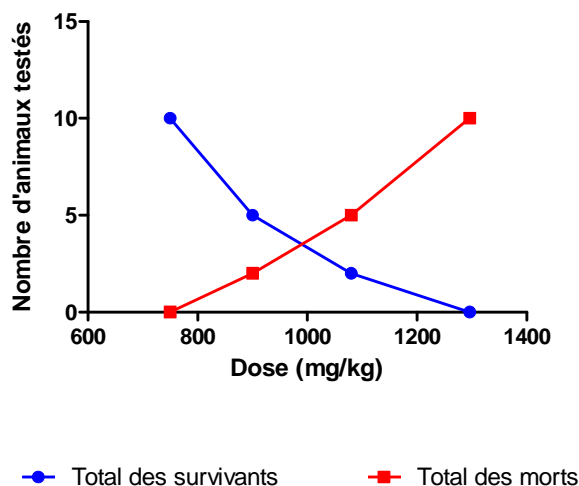


Figure 70 : Courbes des totaux cumulatifs permettant la détermination de la DL_{50} (24 h) par la méthode de Reed et Muench (1938).

Les deux variantes de la méthode donnent respectivement **989 mg/kg** (méthode graphique) et **975 mg/kg** (calcul). La DL_{50} (24h) intra péritonéale est donc de l'ordre de **1g/kg** de souris.

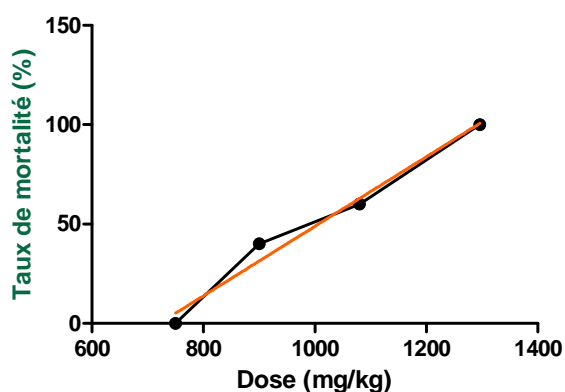


Figure 71 : Courbe effet-dose de l'extrait brut aqueux de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. administré par voie intra péritonéale et sa droite de régression linéaire.

Expérimentalement, en faisant une projection avec la droite de régression linéaire, la DL_{50} (24h) est de **1003 mg/kg** de souris.

6.2. ACTIVITE SUR D'AUTRES ESPECES A SANG CHAUD

La sensibilité d'autres animaux à sang chaud dont le rat, le cobaye et le poussin a été comparée à celle de la souris. Pour ce faire, l'extrait brut a été administré par voie orale et

intrapéritonéale à raison de 12 g/kg et 1,3 g/kg respectivement. Ces doses provoquent 100% de mortalité chez la souris. Les résultats sont consignés dans le tableau 28.

Tableau 28 : Effets de l'extrait brut de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. sur différentes espèces animales à sang chaud.

Dose / voie d'administration	Souris	Rat	Cobaye	Poussin
12 g/kg* Voie orale	18 H	Insensible	> 6 H	22 H
1,3 g/kg** Voie intra péritonéale	2 H	4 H	4 H	15 H

* : Cette dose correspond à la valeur de la DL₁₀₀ par voie orale chez la souris.

** : Cette dose correspond à la valeur de la DL₁₀₀ par voie intrapéritonéale chez la souris.

Les chiffres indiquent le temps de survie après administration de l'extrait.

- **Par voie orale**, la dose administrée a tué également le cobaye et le poussin : le cobaye est plus sensible que la souris, alors que le poussin l'est moins. Par contre, le rat, bien qu'il ait manifesté des symptômes d'intoxication, n'est pas mort au bout d'une semaine.
- **Par voie intrapéritonéale**, la dose utilisée tue les trois espèces. Elles sont moins sensibles que la souris. Le poussin s'est avéré le moins sensible, tandis que le rat et le cobaye manifestent la même sensibilité.
- En général, dans tous les cas, les symptômes observés sont similaires à ceux développés chez la souris.

6.3. ACTIVITE ICHTYOTOXIQUE

6.3.1. EFFETS DES EXTRAITS DE *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. SUR LES EMBRYONS DE MEDAKA, *Oryzias latipes*

Des tests préliminaires sur des alevins de carpe ont montré une activité ichtyotoxique de l'extrait brut aqueux de tubercule de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. Nous avons confirmé cette propriété sur un modèle standardisé. L'activité de l'extrait brut aqueux et du composé **D11**, produit majoritaire de la plante isolé à la fois de l'extrait brut aqueux et de l'extrait organique AcOEt, a été ainsi éprouvée sur le poisson medaka (*Oryzias latipes*).

Pour l'extrait brut aqueux, un effet-dose est observé. Ainsi, pour une concentration de 4 mg/mL d'extrait brut aqueux de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr., le taux de survie est diminué de 100%. Pour des concentrations de 2 et 1 mg/mL, les taux de survie avoisinent les

20-40%. Enfin, pour de plus faibles concentrations (0,5 ; 0,25 ; 0,125 ; 0,062 ; 0,031 mg/mL), il n'y a presque plus d'effet, les taux de survie dépassent les 90%.

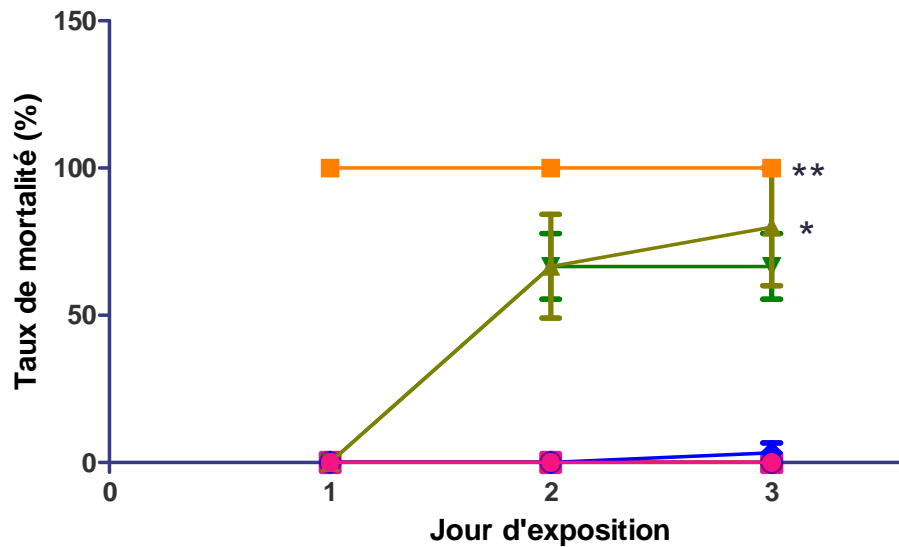
Le **tableau 29** ci-après présente les résultats obtenus après 3 jours de mis en contact des animaux tests avec les différentes concentrations d'extrait brut aqueux de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. Les tests sont réalisés en triplicat (A, B, C) et les témoins sont mis en milieu Yamamoto (Yamamoto, 1975) dépourvu d'extrait.

Tableau 29 : Nombre d'individus morts et différents taux de mortalité et de survie durant les trois jours de test.

Jour	Témoins	4 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,25 mg/mL	0,125 mg/mL	0,062 mg/mL	0,031 mg/mL
1	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 5/5 B : 5/5 C : 5/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5
2	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 5/5 B : 5/5 C : 5/5	A : 2/5 B : 3/5 C : 5/5	A : 1/5 B : 2/5 C : 5/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5
3	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 5/5 B : 5/5 C : 5/5	A : 2/5 B : 5/5 C : 5/5	A : 2/5 B : 2/5 C : 5/5	A : 0/5 B : 1/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5
Cumul	0/15	15/15	12/15	9/15	1/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Mortalité	0	100%	80%	60%	< 1%	0	0	0	0
Survie	100%	0	20%	40%	> 90%	100%	100%	100%	100%

Les différentes valeurs sont reportées en courbes, en utilisant la méthode d'analyse statistique ANOVA (Graphpad Prism 5 Software, <http://www.graphpad.com>). Toujours d'après cette méthode statistique, la valeur de la CL50 est 0,8 mg/mL (**Figure 72**).

Mortalité d'embryons de *Oryzias latipes* après exposition à l'extrait brut aqueux de *Dioscorea antaly*



Courbe effet-dose pour 3 jours

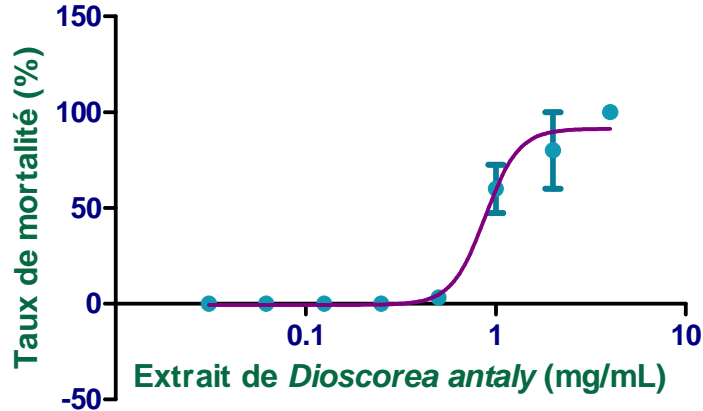


Figure 72 : Courbes montrant

- 1) les taux de mortalité de *Oryzias latipes* après exposition à différentes doses de l'extrait brut aqueux de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr.
- 2) l'effet-dose pour les trois jours de test

Le développement des embryons traités par l'extrait brut aqueux de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. semble normal par rapport à celui des embryons non traités. Aucun retard de développement et aucune malformation ne sont observés.

Toutefois, un retard d'éclosion est observé par rapport aux témoins pour les concentrations supérieures à 1 mg/mL. Ainsi, une inhibition d'éclosion totale est observée à la plus forte concentration de 4 mg/mL. Elle est de 40 à 80% pour les concentrations de 1 et 2 mg/mL. Cette inhibition d'éclosion s'avère moins marquée pour les concentrations comprises entre 0,062 et 0,5 mg/mL. A ces concentrations, elle se trouve même plus accélérée aux premiers jours de test par rapport aux témoins pour donner un taux d'inhibition d'éclosion d'environ 10%. A la concentration de 0,031 mg/mL, la vitesse d'éclosion est identique à celle des témoins.

6.3.2. EFFETS DE L'EXTRAIT DE *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. SUR LES ORGANES DES EMBRYONS DE MEDAKA

Les effets de l'extrait de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. ont été recherchés au niveau de divers organes (tissus) de l'embryon de *Oryzia latipes*. Pour ce faire, des observations au microscope optique ont été faites sur des coupes minces d'organes prélevés respectivement sur des embryons non traités (témoins) et des embryons traités par l'extrait de *D antaly* Jum. & Perr. à 0,5 mg/ml. Les résultats ont montré qu'il n'y a pas de modifications anatomopathologiques évidentes au niveau des reins, de la région buccale et du tractus intestinal. Au niveau du foie, les structures générales sont conservées mais un élargissement des capillaires sinusoïdaux a été noté chez les embryons traités. En effet, il y a une augmentation significative de la largeur de ces capillaires ($34 \pm 4 \mu\text{m}$ pour les embryons traités et $21 \pm 2 \mu\text{m}$ pour les témoins). Il en est de même pour l'épaisseur des capillaires ($25 \pm 3 \mu\text{m}$ pour les embryons traités et $17 \pm 2 \mu\text{m}$ pour les embryons témoins). Ce type de modification suggère une réaction inflammatoire au niveau du foie. La figure 73 montre une partie des résultats obtenus.

D'après les résultats obtenus, l'extrait brut aqueux des tubercules de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. est toxique pour *Oryzias latipes*.

L'extrait n'a pas d'effet sur le développement embryonnaire, ce qui supposerait que l'extrait, ou le/les principe(s) actifs, à faibles concentrations, n'ont pu traverser le chorion. Néanmoins, un milieu à plus fortes concentrations en extrait engendre un retard d'éclosion voir même la mort embryonnaire à la concentration la plus élevée de 4mg/mL.

Pour les concentrations sub-létales, les alevins éclos survivent. Des analyses anatomo-pathologiques ont été effectuées sur les alevins (traités et témoins) pour une localisation et une observation du/des organe(s) cible(s).

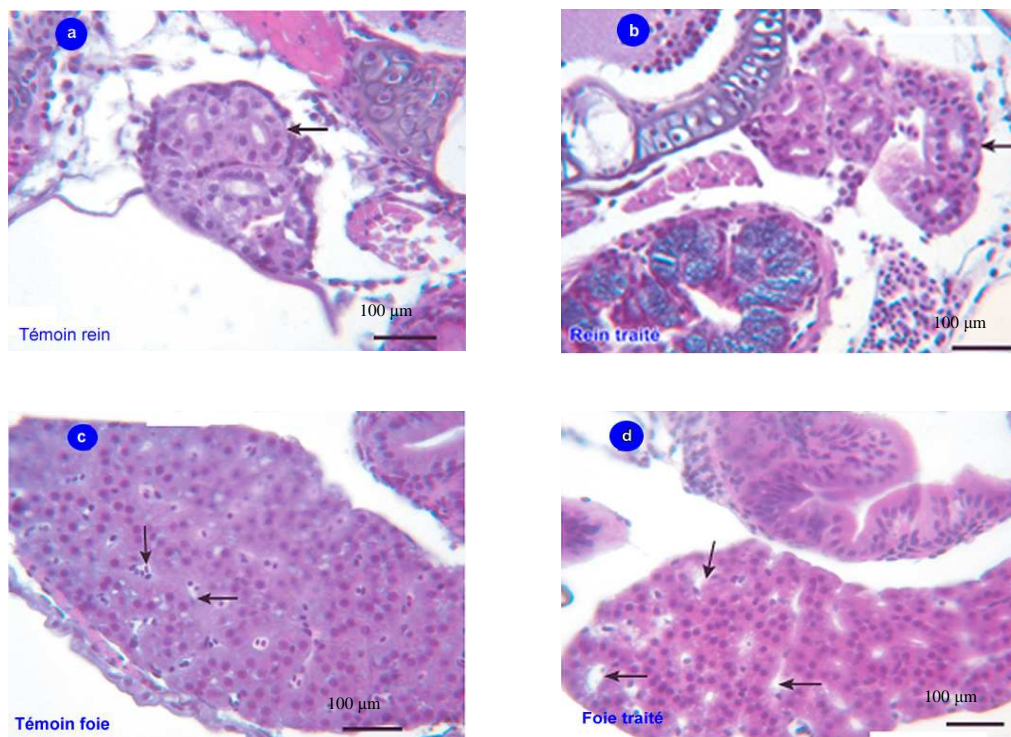


Figure 73 : Vue au microscope optique de coupes transversales de rein et de foie d'embryon de medaka (*Oryzia latipes*) :

a) rein non traité ; b) rein traité avec l'extrait brut de *D. antaly* (0,5 mg/ml) : pas de modification ; c) foie non traité ; d) foie traité avec l'extrait brut de *D. antaly* (0,5 mg/ml) : élargissement des capillaires sinusoidaux.

6.4. ACTIVITÉS ANTIMICROBIENNES

L'étude des effets des divers extraits et produits purs sur les microorganismes a été faite selon la méthode de diffusion en milieu solide ou méthode des disques ou encore méthode d'antibiogramme en utilisant les souches bactériennes Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et Gram négatif (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Vibrio harveyi* et *Vibrio fischeri*) ainsi que sur une souche fongique (*Candida tropicalis*). Il s'agit des extraits par le cyclohexane, le MeOH, l'AcOEt et le CH₂Cl₂. Pour les produits purs, il s'agit des composés **D2** (dihydro-7,8-hydroxy-3-resvératol), **D3** (picéatannol), **D10** (cassigarol D), **D8** (catéchine), **D5** (antadiosbulbine A), **D6** (antadiosbulbine B), **D7** (diosbulbine E), **D11** (8-épidiosbulbine E), **D11Ac** (6-acétyl-8-épidiosbulbine E), **D12** (8-épidiosbulbine G).

6.4.1. ACTIVITES ANTIMICROBIENNES DES DIFFERENTS EXTRAITS

Les résultats des tests antimicrobiens sur les différents extraits sont présentés dans le tableau 30 :

- Les extraits dichlorométhane et aqueux sont inactifs sur tous les germes testés ;
- L'extrait hexanique n'est actif que sur *Vibrio fischeri* ;
- Aucun extrait n'est actif sur *Salmonella* et *Candida tropicalis* ;
- L'extrait MeOH est le plus actif et les *Vibrio* sont les plus sensibles avec des halos d'inhibition supérieurs à 20 mm.

Tableau 30 : Effets de différents types d'extraits (2 mg/ disque) sur les microorganismes

Type d'extrait	<i>Escherischia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Candida tropicalis</i>
Hexanique	–	–	–	–	10 mm	–
AcOEt	13 mm	9 mm	–	–	21 mm	–
MeOH	18 mm	12 mm	–	24 mm	23 mm	–
CH ₂ Cl ₂	–	–	–	–	–	–
Aqueux	–	–	–	–	–	–

Les chiffres désignent les diamètres des halos d'inhibition.

Les effets de différentes concentrations des extraits MeOH et AcOEt ont été étudiés sur *Staphylococcus aureus* et *Escherischia coli* afin de déterminer les CMI, par la méthode des disques. D'après les résultats présentés sur les figures 74 et 75 et dans le tableau 31 les valeurs des CMI sont :

- Pour l'extrait MeOH, 125 µg pour *Staphylococcus aureus* et 62,5 µg pour *Escherichia coli*
- Pour l'extrait AcOEt, 31,2 µg pour *Staphylococcus aureus* et de l'ordre de 7,8 µg pour *Escherichia coli*

Tableau 31 : Effets de différentes concentrations des extraits MeOH et AcOEt de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

Concentration (mg/mL)		100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39
Dépôt (µg / disque)		2000	1000	500	250	125	62,5	31,2	15,6	7,8
Extrait MeOH	<i>S. aureus</i>	16	14	13	11	8	–	–	–	–
	<i>E. coli</i>	20	16	14	12	9	7	–	–	–
Extrait AcOEt	<i>S. aureus</i>	13	12	11	9	8	7	7	–	–
	<i>E. coli</i>	12	11	10	10	8	8	8	7	7

Les chiffres désignent les diamètres des halos d'inhibition (en mm).

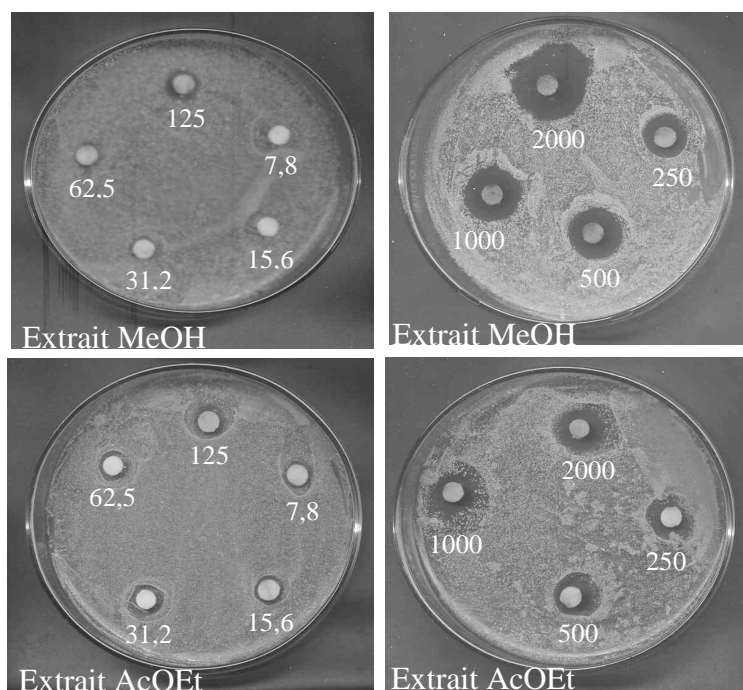


Figure 74 : Effets de différentes concentrations des extraits par le MeOH et par l'AcOEt de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. sur *E. coli*. Les chiffres indiquent les dépôts (en µg/disque).

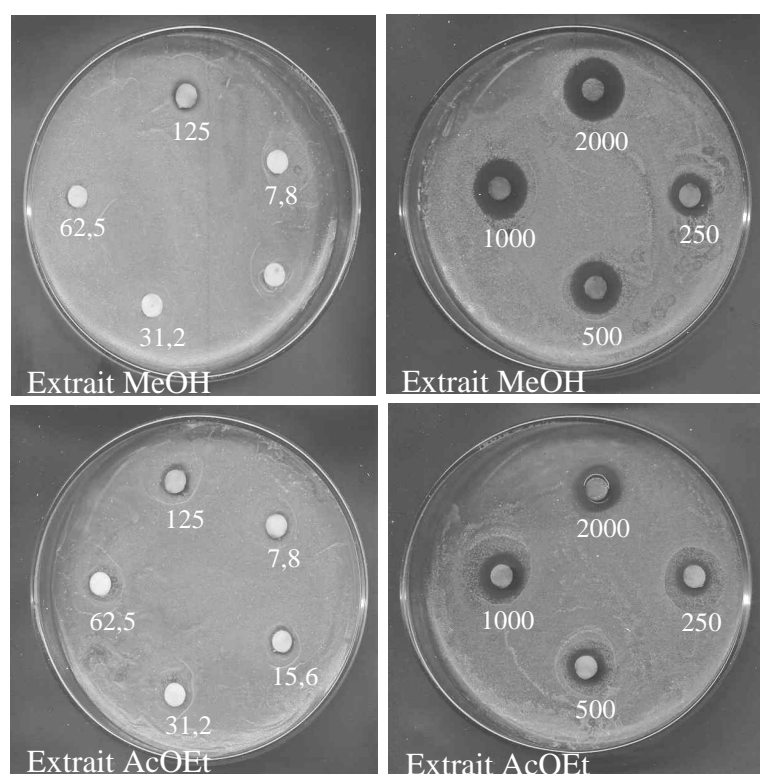


Figure 75 : Effets de différentes concentrations des extraits par le MeOH et par l'AcOEt de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. sur *S. aureus*. Les chiffres indiquent les dépôts (en µg/disque).

6.4.2. ACTIVITES ANTIMICROBIENNES DE PRODUITS PURS

Les quelques produits purs obtenus en quantité suffisante ainsi que les quatre produits nouveaux ont été testés pour leur activité anti-bactérienne sur la souche *Staphylococcus aureus*. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 32.

Tableau 32 : Effets de quelques produits purs (100 µg/ disque) sur *Staphylococcus aureus*.

Produits purs testés	Diamètre du halo d'inhibition
D5 (antadiosbulbine A)	—
D6 (antadiosbulbine B)	—
D11 (8-épidiosbulbine E)	—
D11Ac (8-épidiosbulbine E acétylé)	—
D13 (8-épidiosbulbine G)	—
D2 (dihydro-7,8-hydroxy-3-resvératrol)	14 mm
D3 (picéatannol)	9 mm
D10 (cassigarol D)	12 mm

Les quatre produits nouveaux, **D5**, **D6**, **D11** et **D12** ainsi que le diterpénoïde **D11Ac** n'ont montré aucune activité envers *Staphylococcus aureus* avec un dépôt de 100 µg par disque. Les autres produits testés, **D2**, **D3** et **D10** qui appartiennent tous à la famille des stilbénos, ont montré une activité contre le germe testé.

6.5. ACTIVITE ANTIMYCOBACTERIENNE

L'activité antimycobactérienne des stilbènes **D2**, **D3**, **D10**, du composé **D8**, ainsi que des autres produits de la classe des diterpénoïdes (**D5**, **D6**, **D11** et **D11Ac**) a été évaluée sur la souche *Mycobacterium bovis* à la dose de 100 µg/mL. La valeur de la CMI (ou Concentration Minimale Inhibitrice) pour chaque produit testé a été ainsi déterminée et un témoin de référence positive est réalisé avec l'isoniazide. Les résultats sont consignés dans le tableau 28.

Tableau 33 : Résultats des tests d'activité antimycobactérienne.

Produit	CMI (µg/mL)
D2 (dihydro-7,8- hydroxy-3-resveratol)	> 200
D3 (picéatannol)	> 200
D10 (cassigarol D)	> 200
D8 (catéchine)	> 200
D5 (antadiosbulbine A)	> 200
D6 (antadiosbulbine B)	> 200
D11 (8-épidiosbulbine E)	> 200
D11Ac (6-acétyl-8-épidiosbulbineE)	> 200
Isoniazide	0,4

Tous les produits testés ne présentent aucune activité inhibitrice sur la croissance de *Mycobacterium bovis* BCG, souche utilisée comme cible au laboratoire, à la dose maximale de 100 µg/mL.

6.6. ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE

Plusieurs espèces de *Dioscorea* sont connues pour leur activité anti-inflammatoire. Des espèces malgaches sont également utilisées empiriquement pour traiter des maux d'estomac (*D. soso* ; *D. trichanta* ; *D. seriflora* ; *D. ovinala* et *D. alata*) d'où notre intérêt pour une étude de l'activité anti-inflammatoire des extraits de *D. antaly* et des composés purs majoritaires.

Tableau 34 : Résultats du test anti-inflammatoire.

Echantillon	DOt		DOt0		% inhibition	
Extrait cyclohexanique	0,334	0,329	0,498	0,539	154	145
Extrait MeOH	0,334	0,329	0,858	0,820	88	94
Extrait AcOEt	0,360	0,373	0,494	0,522	160	156
D7 (Diosbulbine E)	0,336	0,349	1,141	1,150	37	37
D11 (8-épidiosbulbine E)	0,334	0,321	0,971	0,893	66	79
D12 (8-épidiosbulbine G)	0,319	0,301	0,886	0,852	79	83
Témoin	0,329	0,308	0,874	0,789	84	95

DOt : densité optique au temps t ; **DOt0** : densité optique au temps t0

En cas d'inhibition, la coloration de la préparation vire au rose. Pour notre cas, aucune des préparations n'a changé de coloration. Les préparations tests restent colorées en jaune de même que les témoins, ce qui confirme une réponse négative.

6.7. ACTIVITE ANTIPLASMODIALE *in vitro*

Les tests ont été réalisés au sein du laboratoire de biologie fonctionnelle des protozoaires (USM 0504, MNHN).

Les tests ont porté sur des souches FcB1, souche chloroquino-résistante isolée en Colombie. Les extraits (cyclohexanique, MeOH, AcOEt, CH₂Cl₂), les quelques produits purs **D7**, **D10** et **D3** disponibles en quantités suffisantes pour les tests ainsi que les nouveaux produits (**D5**, **D6**, **D11** et **D12**) ont été solubilisés dans le DMSO pour donner des solutions de 10 mg/mL, diluées ensuite en cascade pour la détermination de la CI₅₀.

Tableau 35 : Résultats des tests d'activité antiplasmodiale *in vitro*.

Echantillons	CI ₅₀ (µg/mL)
Extraits	
Extrait cyclohexanique	59,2
Extrait MeOH	80,1
Extrait AcOEt	44,6
Extrait CH ₂ Cl ₂	83
Produits purs	
D7 (diosbulbine E)	> 100
D10 (cassigarol D)	14,1 ± 1,531
D3 (picéatannol)	5,1 ± 0,153
Produits nouveaux	
D5 (antadiosbulbine A)	> 50
D6 (antadiosbulbine B)	> 50
D11 (8-épidiosbulbine E)	> 100
D12 (8-épidiosbulbine G)	> 100
Chloroquine	0,13 ± 0,03

D'après les résultats consignés dans le tableau 35, les extraits et produits testés n'ont révélé aucune activité antiplasmodiale au vu des valeurs de leurs CI₅₀ qui sont de 140 à plus de 1000 fois supérieures à celle de la chloroquine qui est de 0,13 µM [Frappier, 1996]. Toutefois, les deux stilbènes, cassigarol D (**D10**) et picéatannol (**D3**), ont un effet nettement plus marqué par rapport aux autres produits purs, malgré leur très faible activité par rapport à celle de la chloroquine.

6.8. ACTIVITE CYTOTOXIQUE

La cytotoxicité des deux produits purs de structures originales **D5** (antadiosbulbine A) et **D6** (antadiosbulbine B) est éprouvée sur la lignée cellulaire humaine MRC-5 (cellules embryonnaires diploïdes pulmonaires). Les valeurs de la concentration inhibitrice 50% (IC₅₀) sont déterminées en se référant au témoin qui est la camptothécine. Les résultats des tests sont présentés dans le tableau 36.

Tableau 36 : Résultats des tests d'activité cytotoxique

Composé	IC ₅₀ (µg/mL)
D5 (antadiosbulbine A)	> 100
D6 (antadiosbulbine B)	> 100
Camptothécine	0,0012 ± 0,0003

Aucun des deux produits testés n'a manifesté une activité cytotoxique.

7 – RESUME -DISCUSSION - CONCLUSION

Les enquêtes réalisées sur le terrain ont montré que *Dioscorea antaly* Jum. & Perr., malgré son amertume et les rumeurs sur sa toxicité, constitue un appoint alimentaire, voir même la seule ressource alimentaire pour certains ménages pendant la période de disette.

Quinze composés différents dont cinq diterpénoïdes (8-épidiosbulbine E, diosbulbine E, 8-épidiosbulbine G, antadiosbulbine A et antadiosbulbine B), cinq flavonoïdes (kaempférol, quercétine, isorhamnétine et 3-O- β -D-glycopyranosyl-(6->1)- α -L-rhamnose-5,7,4'-trihydroxyflavone) et une catéchine, cinq stilbénoides (picéatannol, dihydropicéatannol, resvératrol, cassigarol D et scirpusine B) et un phénanthrène (3,7-dihydroxy-2,4-diméthoxyphénanthrène) ont été isolés du tubercule de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. Les diterpénoïdes sont quantitativement majoritaires. Quatre d'entre eux sont nouveaux : deux diterpénoïdes clérodanes que nous avons nommés **antadiosbulbine A**, **antadiosbulbine B** : le préfixe **anta** dérive du nom de l'espèce **antaly** ainsi que deux diterpènes 19-norclérodanes : **8-épidiosbulbine E** et **8-épidiosbulbine G**.

Les composés connus mis en évidence dans *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. ont été trouvés dans d'autres espèces de *Dioscorea* et/ou dans d'autres plantes :

- les **diosbulbines** E et G, ainsi que la 6-O-acétyl-8-épidiosbulbine E chez *Dioscorea bulbifera*. Les autres types (A, B, C, D, F, H) sont communs chez *Dioscorea bulbifera* et chez d'autres espèces de *Dioscorea* (par exemple diosbulbine B chez *Dioscorea pentaphylla*). Par contre, ils n'ont pas été retrouvés dans les fractions étudiées de *Dioscorea antaly*. Toutefois, des diterpénoïdes de type clérodane ont été isolés de certaines espèces de la famille des Asteraceae, telles que *Rhaponticum uniflorum* et *Pulicaria wightiana* [Bin et al., 2004 ; Das et al., 2005].
- les **flavonoïdes**, kaempférol, quercétine et isorhamnétine chez plusieurs espèces de *Dioscorea* (*D. bulbifera*, *D. sylvatica*, *D. opposita*, *D. pentaphylla*), chez certains fruits et légumes : le fruit du mûrier (*Morus alba*), la fraise (*Fragaria ananassa*), la ciboulette (*Allium schoenoprasum*), l'épinard (*Spinacia oleracea*). La catéchine, un flavonoïde de la sous-classe des flavan-3-ols, a déjà été isolée de *Dioscorea bulbifera* et *Dioscorea cayenensis*. Elle se rencontre le plus souvent, en quantité importante dans

les feuilles du théier (*Camellia sinensis*), chez la vigne (*Vitis vinifera*) et le cacaoyer (*Theobroma cacao*).

- les **stilbénoides** picéatannol, resvératrol, cassigarol respectivement chez *Dioscorea villosa* et *D. batatas*, *D. zingiberensis*, *D. hispida* et *D. dumetorum*, et chez d'autres plantes : le resvératrol abondamment dans divers fruits tels le raisin, le cacao, la rhubarbe, l'arachide... ; le picéatannol, un métabolite du resvératrol dans les raisins rouges ; les cassigarols (A-G) dans d'autres plantes dont des espèces de *Cassia*. Des dérivés du phénanthrène ont été isolés de tubercules de *Dioscorea decipiens* et des parties aériennes de *Dioscorea opposita*.

Il faut noter que certaines des fractions que nous avons obtenues lors du fractionnement des divers extraits n'ont pas pu encore être étudiées. Par conséquent, d'autres produits, connus ou nouveaux, pourraient encore être mis en évidence : c'est le cas par exemple de polyphénols qui ont été détectés lors des criblages préliminaires des extraits aqueux.

La toxicité des tubercules de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. a été d'abord éprouvée sur un modèle animal standard, la souris.

L'indice de toxicité aiguë DL_{50} (24 h) a été évalué. Si l'on se réfère à l'échelle de Hodge et Stern [WHO, 1996], avec une valeur de DL_{50} orale de 5 g/kg de poids, l'extrait n'est même pas considéré comme nuisible (DL_{50} orale comprise entre 0,2 et 2 g/kg). Même la DL_{50} intra péritonéale est relativement élevée, de l'ordre de 1 g/kg de poids. Les 5 g d'extrait qui provoquent 50% de mortalité chez la souris correspondent à 122,5 g de tubercules frais compte tenu de la teneur en eau des tubercules qui est de 70%. En supposant que l'homme ait une sensibilité similaire à celle de la souris vis-à-vis des tubercules de *D. antaly*, pour provoquer les mêmes effets toxiques chez un adulte de 70 kg il faudrait que ce dernier consomme 8,57 kg de tubercules frais en une seule prise, ce qui n'est pas réaliste. Si vraiment, *D. antaly* Jum. & Perr. est toxique pour l'homme, cela signifie que ce dernier serait beaucoup plus sensible que la souris et le rat. Par ailleurs, la plante ne contient ni des alcaloïdes, ni des saponosides, or les composés démontrés comme responsables de la toxicité de plusieurs espèces de *Dioscorea* sont des alcaloïdes (dihydrodioscorine, dioscorine ...) et des saponosides (yamogénine, cryptogénine, disogénine ...) [Neuwinger, 1996].

Cependant, les extraits de tubercule de *D. antaly* Jum. & Perr. provoquent chez la souris des lésions macroscopiques au niveau du foie et de l'estomac et des lésions tissulaires

graves au niveau du cœur, des poumons, des reins, du foie, de l'estomac et de l'intestin. Le cerveau est le moins atteint. Dans la plupart des cas, les lésions s'aggravent en fonction du temps. Ces lésions au niveau de tous les organes rendent bien compte de la toxicité de l'extrait pour les animaux testés. Toutefois, elles ne permettent pas d'identifier ni une cible privilégiée, ni les effets primaires.

Cependant, les extraits de tubercule préalablement détoxiqués par la technique traditionnelle ne provoquent aucun symptôme d'intoxication, même à des doses élevées. Une vérification d'une éventuelle toxicité chronique devrait être faite.

La toxicité des tubercules de *D. antaly* Jum. & Perr. non traités envers divers organismes est prouvée. Quant à la toxicité envers l'homme, on ignore si :

- la forte réputation de la toxicité de *D. antaly* Jum. & Perr. est exagérée par la peur en général des plantes amères qui sont toujours considérées comme toxiques, une peur qui est encore renforcée par l'existence dans la région de la redoutable *D. sansibarensis* qui est très amère et dont la toxicité est de notoriété publique.
- elle est bien fondée, alors dans ce cas, des enquêtes supplémentaires devront encore être menées afin de prospecter des témoignages auprès de diverses sources et dans d'autres régions de Madagascar où pousse la plante.

La toxicité observée avec l'extrait brut de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. pourrait être imputée, au moins en partie, aux différentes diosbulbines présentes dans le tubercule. En effet, parmi les substances déjà identifiées, ces dernières sont majoritaires. La contribution d'autres substances, éventuellement présentes dans les fractions non encore étudiées et dont la nature chimique reste encore à déterminer, n'est pas à exclure. A ce propos, il a été rapporté que des concentrations élevées de substances cyanogènes et d'acide oxalique seraient responsables de la toxicité de *Dioscorea spp*, une igname du Népal [Bhandari et al., 2005].

Les valeurs de DL_{50} que nous avons obtenues sont toutefois comparables à celles des extraits bruts de tubercules d'autres espèces de *Dioscorea* réputées et prouvées toxiques. Ainsi, la DL_{50} orale de *Dioscorea bulbifera* taiwanais est supérieure à 4 g/kg [Akahane, 1999] et la DL_{50} intra-péritonéale de *D. dumetorum* est de 1,4 g/kg [Iwu et al., 1990]. Ces valeurs ne reflètent pas non plus la toxicité connue de ces plantes.

Les résultats préliminaires relatifs à la toxicité des extraits de *D. antaly* Jum. & Perr. sur des animaux à sang froid dont les têtards de grenouille et les alevins de carpe ont été

confirmés sur *Oryzia latipes* (medaka), un modèle biologique standard utilisé couramment pour évaluer la toxicité. Ce poisson s'est avéré sensible à l'extrait brut de *D. antaly* (CL₅₀ = 0,8 mg/ml). Des lésions tissulaires au niveau du foie ont été notées chez des embryons. Cette propriété ichtyotoxique justifie l'utilisation de plusieurs espèces de *Dioscorea* comme poison de pêche.

Les tubercules de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. possèdent des propriétés antibactériennes. L'extrait aqueux est inactif sur les souches testées, ce qui supposerait que 1) les principes actifs ne sont pas polaires et 2) ils ne sont pas éliminés lors des opérations de détoxification. Ces propriétés seraient imputables en partie aux stilbénoides. Des recherches sur les tubercules détoxiqués sont encore nécessaires avant toute recommandation quant à l'exploitation de ces propriétés des tubercules.

Les résultats des enquêtes que nous avons réalisées dans la zone d'étude n'ont pas révélé d'utilisations thérapeutiques des extraits de *D. antaly* Jum. & Perr. Cependant, d'après la littérature, la plupart des molécules isolées de *D. antaly* Jum. & Perr. sont douées d'activités biologiques :

- l'activité anti-bactérienne des furanoïdes norditerpènes [Shriram et al., 2008 ; Teponno et al., 2006]
- les propriétés anti-oxydante et anti-inflammatoire du resvératrol ;
- l'action inhibitrice, *in vitro*, sur certaines maladies virales notamment celles associées avec le virus Epstein-Barr et une propriété anti-cancéreuse du picéatanol [Wolter et al., 2002 ; Swanson-Murgenson et al., 2003] ;
- les propriétés antihistaminiques, antioxydantes et anti-inflammatoires de la quercétine [<http://www.amessi.org/La-quercetine-des-proprietés>] ;
- les propriétés anti-oxydantes des trois flavonols (isorhamnétine, kaempférol et quercétine) ;
- les activités neuroprotectrice et antioxydante modérées des dérivés du phénanthrène ont été isolés de tubercules de *Dioscorea decipiens* et des parties aériennes de *Dioscorea opposita* [Sunder et al., 1978 ; Ma et al., 2005] ;

- la propriété anti-oxydante et l'action préventive de maladies inflammatoires et coronarienne de la catéchine ;
- les propriétés anti-tumorales du cassigarol A (celui trouvé chez *D. antaly* Jum. & Perr. est cassigarol D) [Kimura et al., 2000].

Ces molécules devraient donc conférer à *D. antaly* Jum. & Perr. des propriétés qui ne sont pas connues des malgaches et qui mériteraient d'être vérifiées et exploitées.

Les extraits testés n'ont pas présenté d'activité anti-inflammatoire sur le test enzymatique sur l'inhibition de la phospholipase A2. Ce résultat est assez inattendu, puisque les propriétés anti-inflammatoires sont bien connues chez les *Dioscorea*. De plus, parmi les substances isolées, plusieurs ont des propriétés anti-inflammatoires (voir plus haut). L'absence d'activité serait peut-être due à la faible teneur en ces produits. Notons que dans la zone d'étude, *D. alata* et *D. soso* sont employées pour soigner des maux d'estomac.

Les extraits, testés sur la lignée cellulaire humaine MRC-5 n'ont pas montré d'effets cytotoxiques et les extraits n'ont pas non plus d'activité anti-malariale.

Certains des extraits testés ont présenté une activité anti-bactérienne : l'extrait hexanique contre *Vibrio fischeri*, l'extrait par MeOH contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio fischeri* et *V. harveyi* et l'extrait par AcOEt contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Vibrio fischeri*. Les composés de la famille des stilbénoides sont un des supports de l'activité contre *Staphylococcus aureus*.

D'après Wilkin et al. (2005), du point de vue phylogénétique, *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. est la seule espèce de *Dioscorea* endémique de Madagascar qui ne fait pas partie du clade malgache. Elle est incluse dans un clade comprenant des espèces toxiques africaines et asiatiques telles que *D. dumetorum*, *D. hispida*, *D. pentaphylla* et *D. bulbifera*. Sur le plan phytochimique, nous avons noté une ressemblance entre *D. bulbifera* et *D. antaly*. En effet, à l'exception des antadiosbulbines A et B, les autres diosbulbines isolées de *D. antaly* ont été trouvées chez *D. bulbifera*. Ce point commun nous semble un argument supplémentaire en faveur de cette classification de *D. antaly*.

En conclusion,

- Les résultats de nos travaux constituent les premières données sur les plans chimique et biologique, à la fois sur *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. et sur les *Dioscorea*

malgaches en général. Ils compléteront les données sur l'aspect alimentaire et nutritionnel obtenues par notre laboratoire d'accueil dans le cadre du Projet FADES [Randriamahatody, 2003].

- A la lumière de ces résultats, les tubercules de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. sont toxiques pour divers organismes. Si les techniques de détoxification sont bien conduites, la consommation des tubercules ne devrait pas comporter de risques. L'élimination des principes amers (diosbulbines et polyphénols) devrait améliorer leurs qualités organoleptiques. La communication de ces résultats aux populations locales pourra conduire à une meilleure considération de *D. antaly* Jum. & Perr. et partant, diminuera la pression sur les autres espèces de *Dioscorea* qui sont surexploitées.

Parmi nos perspectives de recherche figurent notamment,

- l'extension des enquêtes ethnobotaniques à d'autres régions de Madagascar (où vivent d'autres ethnies) compte tenu de la large distribution de *D. antaly* dans le but de rechercher des utilisations empiriques de la plante, autres qu'alimentaires ;
- la préparation en quantités plus importantes des nouveaux composés **antadiosbulbine A, antadiosbulbine B, 8-épidiosbulbines E et G** afin de déterminer leurs propriétés biologiques et toxicologiques ;
- l'achèvement des travaux sur les autres fractions et l'étude des propriétés biologiques des composés isolés ;
- la poursuite des études toxicologiques sur les tubercules de *D. antaly* en procédant à l'évaluation des toxicités sub-chronique et chronique et en utilisant d'autres espèces animales ;
- l'approfondissement des résultats obtenus sur les propriétés anti-bactériennes en diversifiant les germes tests et en recherchant les molécules auxquelles ces propriétés sont imputées ;
- l'extension de travaux similaires à d'autres espèces de *Dioscorea* malgaches.

Deuxième partie :

Etude de

***Rhodocodon madagascariensis* Baker**

1 – INTRODUCTION

Madagascar est un pays à vocation agricole. La majorité de la population malgache (85%) vit en milieu rural. Les agriculteurs sont constamment confrontés à de graves problèmes posés par divers animaux, dont les insectes phytophages tels les criquets migrateurs, les hannetons, les bruches, les chenilles de Lépidoptères, les charançons, ainsi que des rongeurs comme les rats et les souris. La destruction des cultures par ces animaux nuisibles constitue un des facteurs déterminants de la diminution des productions. Les dégâts causés ne se limitent pas aux cultures sur pied, mais également aux stocks de récoltes entraînant la diminution de la disponibilité des aliments exposant ainsi les ménages à une insécurité alimentaire. D'autres problèmes sont également associés à certaines espèces animales nuisibles. Certaines sont des vecteurs de maladies contagieuses. A titre d'exemple, les moustiques anophèles véhiculent le paludisme et les rongeurs diverses maladies parasitaires sanguines dont les plus connues sont la peste, la leptospirose et la chorioméningite lymphocytaire... Parmi les dégâts causés par les rongeurs, il convient aussi de mentionner la détérioration des biens mobiliers (literies, vêtements...).

Dans un tel contexte, la lutte contre les animaux nuisibles constitue une priorité dans les domaines de l'agriculture et de la santé, notamment en milieu rural, d'où l'importance de l'utilisation de pesticides. Mais l'accès économique aux pesticides de synthèse est un autre problème en milieu rural. En effet, le coût de ces composés n'est pas à la portée des moyens modestes des populations. De plus, ils représentent un danger pour l'environnement. En effet, il s'agit de polluants rémanents et non biodégradables, donc potentiellement dangereux pour les agriculteurs et pour les écosystèmes en général. C'est le cas par exemple du DDT, du chlordécone et de façon générale de nombreux composés organochlorés ou organophosphorés.

La recherche et l'exploitation de pesticides d'origine végétale s'avèrent ainsi importantes. A Madagascar, plusieurs plantes sont utilisées empiriquement à des fins pesticides [Boiteau, 1986]. Parmi les plus utilisées on peut citer les espèces des genres *Crotalaria*, *Mundulea*, *Cadia*, *Milletia*, *Derris*, *Tephrosia*, *Chrysanthemum*, *Pistia*, *Rhodocodon*, *Calaphyllum*, *Dipcadi*, *Euphorbia*.... La valorisation de ces plantes, dont les

principes actifs sont souvent des isoflavonoïdes, des roténoïdes ou des pyrétroïdes, est encouragée par les autorités malgaches et les partenaires économiques.

Pour notre part, nous avons choisi d'étudier *Rhodocodon madagascariensis* Baker qui est bien connue pour ses propriétés raticides et qui est utilisée d'une manière empirique depuis longtemps dans certains milieux ruraux des Hauts Plateaux malgaches. Le choix de la plante a été justifié, en plus de ses propriétés, par son abondance, sa facilité de récolte et aussi par le fait qu'aucune autre étude que botanique n'a été entreprise sur elle et même sur le genre *Rhodocodon* tout entier qui est endémique de Madagascar.

Nous avons commencé les travaux sur *Rhodocodon madagascariensis* Baker dans le cadre d'un projet intitulé «Préparation d'appâts empoisonnés» et financé par le Service de Coopération et d'Action Culturelle (SCAC) de l'Ambassade de France.

Les travaux et les résultats y afférents seront présentés selon le même plan que celui adopté pour *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. *Rhodocodon madagascariensis* Baker appartient à la famille des Hyacinthaceae et donc nous situerons d'abord cette espèce dans ce cadre, du point de botanique, comme du point de vue phytochimique. Nous présenterons donc successivement après cette introduction, une synthèse bibliographique sur les connaissances sur les Hyacinthaceae, les enquêtes ethnobotaniques sur *Rhodocodon madagascariensis* Baker, l'étude chimique puis l'étude toxicologique de cette plante. La discussion de ces résultats, ainsi que la conclusion termineront cette deuxième partie.

2 – ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1. GENERALITES SUR LES HYACINTHACEAE [Pfosser et al., 1999]

La famille des Hyacinthaceae est une famille de plantes monocotylédones comprenant environ 1000 espèces réparties en 70 genres faisant partie de quatre sous-familles : Oziroeoideae, Urgineoideae, Ornithogaloideae et Hyacinthoideae.

Il s'agit d'une famille nouvellement créée à partir des Liliaceae et qui a fait l'objet de plusieurs remaniements. Ses délimitations ainsi que celles des genres qu'elle renferme font encore débat chez les botanistes.

2.1.1. DESCRIPTION BOTANIQUE DE LA FAMILLE DES HYACINTHACEAE

Cette famille cosmopolite est composée de plantes herbacées pérennes, le plus souvent à bulbes. L'inflorescence, racémeuse, porte d'une à une centaine de fleurs. L'ovaire supérieur de leurs fleurs distingue les Hyacinthaceae des autres plantes bulbeuses de la famille des Amaryllidaceae.

Ce sont des plantes printanières des prairies et des pelouses de montagne et de façon générale d'autres habitats ouverts.

2.1.2. REPARTITION GEOGRAPHIQUE DES HYACINTHACEAE

Un grand nombre d'espèces se trouvent principalement dans la partie sud et nord (partie méditerranéenne) de l'Afrique. La sous-famille monotypique Oziroeoideae avec son unique genre *Oziroea* est le seul représentant rencontré en Amérique du Sud. Les Urgineoideae se rencontrent en Afrique, de l'Afrique du Sud à la région méditerranéenne, en Arabie, en Inde et en Birmanie. Les Ornithogaloideae s'étendent de l'Afrique du Sud jusqu'au Sud de la France, en Arabie et en Inde. La sous-famille des Hyacinthoideae a une plus large répartition allant de l'Afrique du Sud jusqu'en Asie, en Inde et au Nord Ouest de l'Europe (*figure 76*).

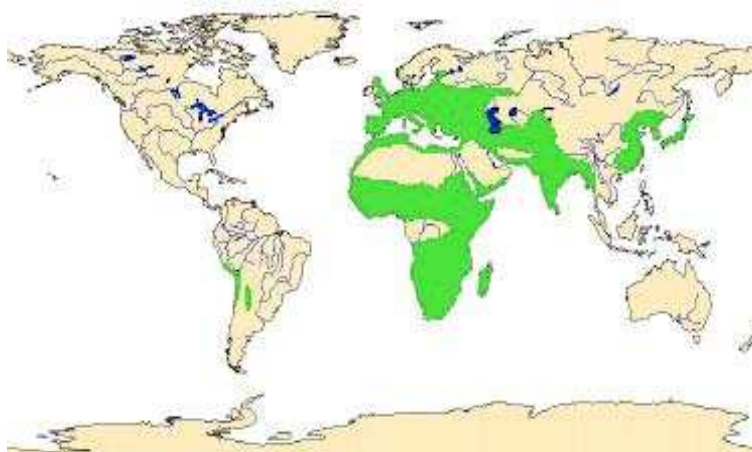


Figure 76 : Répartition géographique des Hyacinthaceae (en vert) [Source : Pfosser & Franz, 2001 (<http://tolweb.org/Hyacinthaceae>)]

2.1.3. LES ESPECES PRESENTES A MADAGASCAR

La plupart des genres présents à Madagascar ont fait partie auparavant de la famille des Liliaceae. Ce sont entre autres les genres *Drimia*, *Dipcadi*, *Ornithogalum*, *Rhodocodon* et *Igidia*. [Perrier de la Bâthie, 1938 ; Manning *et al.*, 2003].

2.2. DONNEES ETHNOBOTANQUES

2.2.1. UTILISATIONS DES HYACINTHACEAE DANS LE MONDE

Connues pour leur toxicité, certaines espèces de la famille sont toutefois utilisées dans des médecines traditionnelles, surtout par les peuples des régions sud-africaines à des fins thérapeutiques. Il a même été rapporté que les plantes bulbeuses utilisées principalement par les tradipraticiens sud-africains sont celles issues de la famille de Hyacinthaceae et de celle des Amaryllidaceae. Parmi les Hyacinthaceae on peut citer :

- *Drimia robusta* dont les bulbes et les feuilles sont utilisés pour le traitement des fièvres et rhumes, comme expectorants, émétiques, diurétiques et toniques cardiaques [Watt *et al.*, 1962 ; Hutching *et al.*, 1996 ; Van Wyk *et al.*, 1997].
- *Urginea sanguinea* est utilisée comme « purificateur du sang », pour l'avortement et pour le traitement des maladies vénériennes, des douleurs abdominales, des maux de reins, de l'hypertension, des bronchites et de l'asthme [Neuwinger, 1996 ; Watt *et*

- al., 1962 ; Hedberg et Stugard, 1989 ; Foukaridis et al., 1995 ; Van Wyk et al., 2000 ; Marx et al., 2005].
- Les bulbes de plusieurs espèces d'*Eucomis* sont utilisés pour soigner les troubles nerveux chez les enfants ainsi que la dysenterie. Le peuple Sotho, en Afrique australe, les utilise pour traiter chez le bétail des pathologies de la vésicule biliaire et les bulbes écrasés sont ajoutés à la nourriture donnée aux enfants en tant que laxatif. Ces bulbes, cuits ou mixés avec de la bouillie, sont également utilisés pour le traitement de l'infertilité chez la femme [Watt *et al.*, 1962 ; Guillardmod *et al.*, 1971 ; Hedberg *et al.*, 1989 ; Hutching *et al.*, 1996 ; Van Wyk *et al.*, 1997].
 - *Boweia volubis* est connue pour être le remède de divers ennuis de santé notamment les maux de tête [Watt *et al.*, 1962 ; Hutching *et al.*, 1996 ; Van Wyk *et al.*, 1997].
 - *Scilla nervosa* est importante dans la médecine Zulu et utilisée pour le traitement des douleurs et fièvres associées aux rhumatismes et aussi comme purgatif pour les enfants. La plante est aussi utilisée pour le traitement des infections et aussi supposée augmenter la fertilité féminine [Silayo *et al.*, 1999].
 - *Scilla maderensis* dont les bulbes sont utilisés par les personnes souffrant d'érysipèle [Rivera *et al.*, 1995].

2.2.2. UTILISATIONS A MADAGASCAR

A Madagascar, les seules données disponibles relatives aux utilisations des espèces de Hyacinthaceae concernent essentiellement leurs emplois comme raticides. Ceci est probablement lié à leur forte toxicité. Ces espèces sont *Dipcadi cowanii*, *D. heterocuspe*, *Rhodocodon madagascariensis*, *R. urGINEOIDES* et *Scilla nossibeensis* [Boiteau, 1986 ; Rasoanaivo *et al.*, 1993].

2.2.3. DONNEES SUR LA TOXICITE

De nombreuses espèces de la famille des Hyacinthaceae sont toxiques et les symptômes d'intoxications sont variables [Botha et al., 2008]. L'ingestion de la plante *Urginea macrocentra* par le bétail entraîne chez ce dernier des problèmes respiratoires, musculaires et enfin la mort [Mulholand et Drewes, 2004]. Mais l'espèce la plus connue et la plus étudiée est *Urginea sanguinea*. Non seulement des intoxications ont été observées chez le bétail, mais également chez l'homme (affection du système nerveux central ou splanchnique et du système urinaire) [Foukaridis *et al.*, 1995].

2.3. TRAVAUX PHYTOCHIMIQUES ET PHARMACOLOGIQUES ANTERIEURS **SUR LES HYACINTHACEAE**

2.3.1. ETUDES PHYTOCHIMIQUES ANTERIEURES

Les produits naturels isolés des Hyacinthaceae sont nombreux et variés, toutefois pour la plupart d'entre-eux, ils se répartissent en deux groupes de triterpénoïdes, les bufadiénolides et les cardénolides qui sont des glycosides cardiotoxiques. Ce sont les bufadiénolides que l'on rencontre le plus souvent. Il a même été annoncé que, chez les végétaux, c'est dans la famille des Hyacinthaceae que cette classe de substances naturelles est la plus importante en nombre et en variété. Les bufadiénolides se rencontrent également chez les animaux (crapaud, serpent). Ces deux classes de stéroïdes se distinguent l'une de l'autre par la nature de l'hétérocycle oxygéné fixé en position 17 qui peut comporter 5 ou 6 atomes pour conduire à une furanone dans le cas des cardénolides et à une pyrone dans celui des bufadiénolides [Steyn et van Heerden, 1998 ; Krenn et Kopp, 1998].

Les homoisoflavonoïdes et les stilbénolides se rencontrent aussi assez souvent dans la famille des Hyacinthaceae.

2.3.1.1. Les bufadiénolides

Cette classe de composés se rencontre le plus fréquemment chez quelques genres (*Urginea*, *Scilla*, *Drimia* et *Bowiea*).

C'était en 1949 que Louw a établi la structure de la transvaaline qui correspond au scillarène A décrit par Tamm en 1953 [Mulholland et Drewes, 2004]. Depuis, de nombreux auteurs ont isolé à partir des Hyacinthaceae une grande variété de bufadiénolides [Steyn et van Heerden, 1998 ; Krenn et Kopp, 1998 ; Iizuka et al., 2001 ; Kopp et al., 1996 ; Pohl et al., 2001 ; Koorbanally et al., 2004 ; Crouch et al., 2006]. Dans cette famille, ces composés sont surtout des dérivés de la scillarénine (**29**), proscillaridine A (**30**), scillarène A (**31**), scillicyanoside (**32**), scilliglaucogénine (**33**), scilliglaucoside (**34**), scilliglaucosidine (**35**), scilliphaeosidine (**36**), scilliphaeoside (**37**), scillirosidine (**38**), scilliroside (**39**), scillirubrosidine (**40**) et scillirubroside (**41**). La physodine A (**42**) et la physodine B (**43**), deux dérivés de l'hellébrigénine, sont les principes toxiques d'*Urginea physodes*. La physodine C (**44**) et la physodine D (**45**) sont des bufadiénolides non toxiques également isolés à partir

d'*U. physodes*. La rubelline (**46**) est connue pour être le principe toxique d'*U. rubella*. La bovogénine A (**47**) est issue de *Bowiea volubis* [Steyn et van Heerden, 1998].

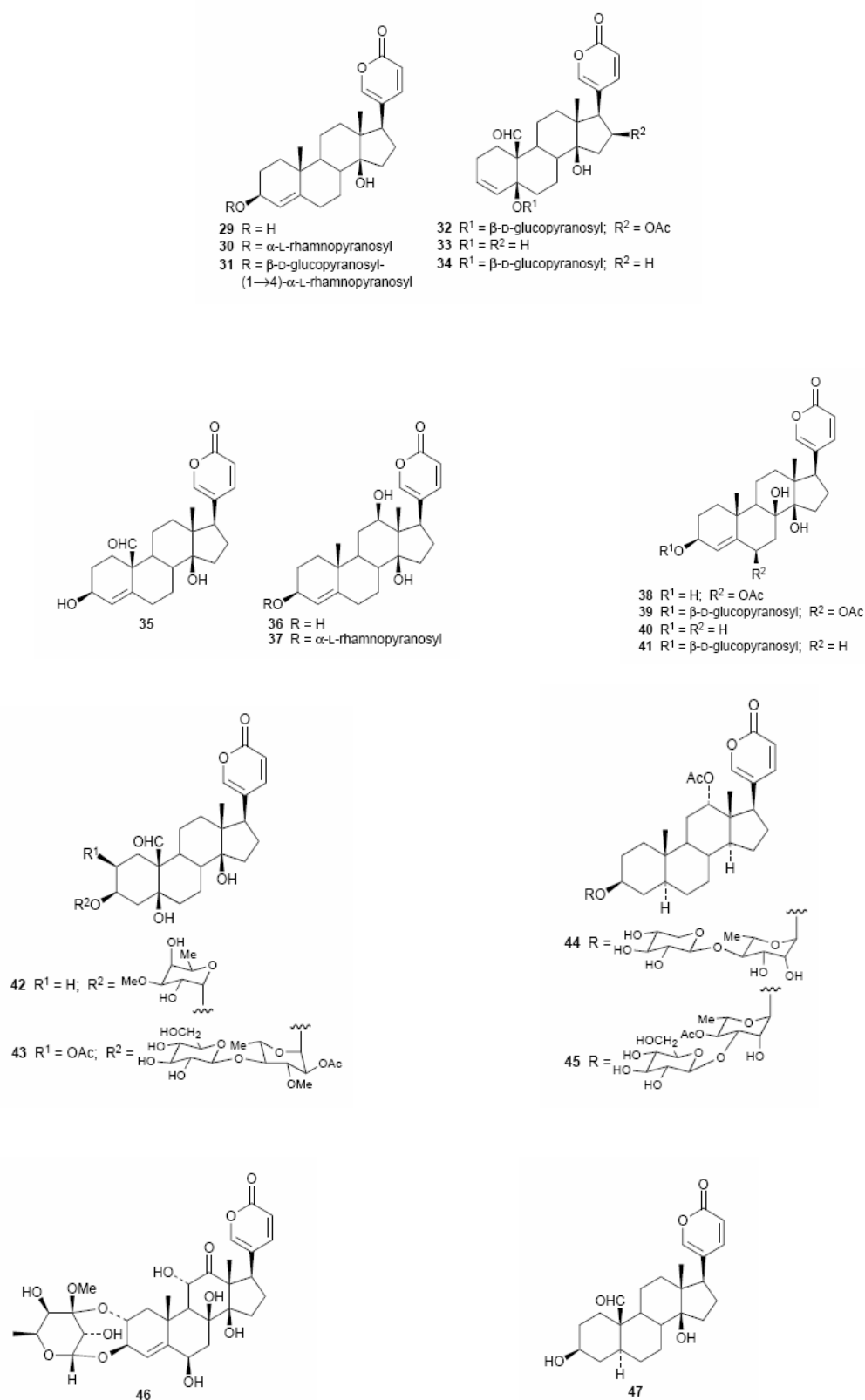


Figure 77 : Quelques variétés de bufadiénolides [d'après Steyn et van Heerden, 1998].

Parmi les produits toxiques les plus connus, il convient de citer :

- Hellébrine (hellébrigenin-3-*O*-glucosylrhannoside) isolée de bulbes d'*Urginea depressa* [Harborne, 1999 ; Tempone, 2008]

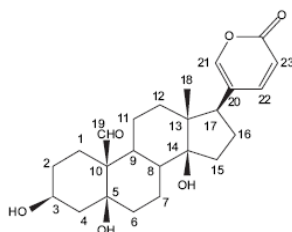


Figure 78 : Structure de l'hellébrigénine.

- Scilliroside (scillirosidin-3-*O*- β -D-glucoside) isolé de la variété rouge d'*Urginea maritima*.

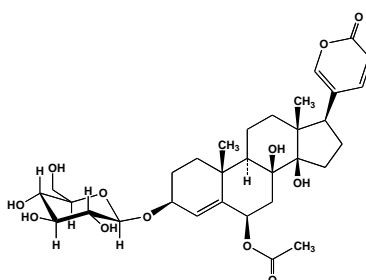


Figure 79 : Structure du scilliroside.

- Scillarène A (scillarenin-3-*O*- β -glycosylrhannoside, glucoproscllaridine A, transvaaline) isolé de la variété blanche de *Urginea maritima* (*U. scilla* ou *U. maritima*) [Harborne et al., 1999 ; Marx et al., 2004].

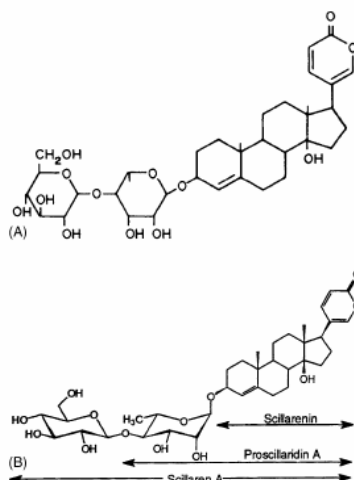


Figure 80 : Structures moléculaires de (A) : Transvaaline [d'après Kellermann, 1988].
(B) : Scillarène A, Scillarenine et Proscillaridine [d'après Van Wyk, 2000].

D'autres bufadiénolides sont moins connus et isolés récemment, respectivement des bulbes de *Drimia macrocentra* et d'*Urginea riparia* : la rubelline et la riparianine [Moodley et al., 2007].

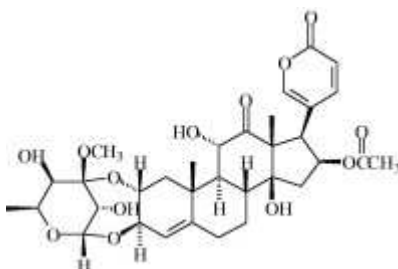


Figure 81 : Structure de la rubelline.

2.3.1.2. Les cardénolides

Les cardénolides se rencontrent très rarement chez les Hyacinthaceae, mais plus fréquemment chez les Liliaceae. Leur présence dans la famille des Hyacinthaceae est encore discutée du point de vue chimiotaxonomique. L'étude de l'extrait par MeOH des bulbes de *Urginea fugax* a permis de détecter la présence de plusieurs cardénolides. La fugaxine ou 12 α ,14 β -dihydroxy-2 α ,3 β -(tétrahydro-3',5'-dihydroxy-4'-méthoxy-6'-méthyl-2H-pyran-2',4'-diylbisoxy)-card-4,20-diénolide est l'un de ces composés [Krenn et al., 2004].

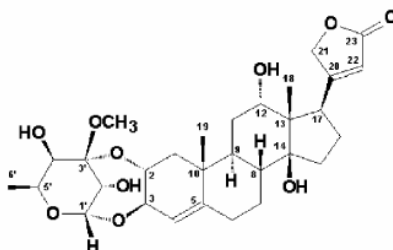


Figure 82 : Structure de la fugaxine.

2.3.1.3. Les homoisoflavonoïdes

Cette classe de composés, qui le plus souvent sont des homoisoflavanones, se rencontre assez souvent chez quelques espèces de Hyacinthaceae dont *Ornithogalum longibracteatum* [Mulholland et al., 2004], *Ledebouria graminifolia* [Mutanyatta et al., 2003], *Muscari racemosus* [Miadokova et al., 2002], *Drimiopsis maculata* [Koorbanally et al., 2001], *Scilla nervosa* et d'autres *Scilla spp.* [Silayo et al., 1999; Bangani et al., 1999; Crouch et al., 1999].

Les scillascillines 1 et 2 sont des exemples d'homoisoflavanones des Hyacinthaceae. Ils ont été isolés principalement des genres *Muscari* et *Scilla* [Koorbanally *et al.*, 2001].

2.3.1.4. Les stilbénoides

Les bulbes de *Scilla nervosa* renferment un certain nombre de dérivés du stilbène [Silayo *et al.*, 1999 ; Bangani *et al.*, 1999 ; Crouch *et al.*, 1999].

2.3.1.5. Les triterpénoïdes

Un nortriterpène spirocyclique, le 22-acétoxy-15-déoxo-eucostérol, a été isolé de *Veltheimia viridifolia* [Amschler *et al.*, 1999].

2.3.1.6. Les alcaloïdes

La présence d'alcaloïdes chez les *Urginea* est souvent rapportée.

Des alcaloïdes pyrrolidiniques ont été identifiés chez les feuilles du muguet (*Hyacinthoides non-scripta*) [Watson *et al.*, 1997].

2.3.3. PROPRIETES ET ACTIVITES PHARMACOLOGIQUES / BIOLOGIQUES

2.3.3.1. Propriétés toxiques

Les cardénolides et les bufadiénolides, nommés glycosides cardiaques, ont des activités biologiques similaires : ils augmentent la force de contraction cardiaque en inhibant l'enzyme Na⁺-K⁺-ATPase. La transvaaline, un bufadiénolide isolé d'*U. sanguinea*, présente le même mécanisme physiologique [Marx *et al.*, 2005].

2.3.3.2. Propriété insecticide

Le scilliroside isolé d'*U. maritima* présente une activité insecticide sur l'insecte *Tribolium castaneum* ravageur de récolte [Pascual-Villalobos, 1999 ; 2002].

2.3.3.3. Propriétés anti-inflammatoires

Les extraits bruts préparés à partir de feuilles et de bulbes d'*Eucomis* ont révélé une activité inhibitrice de COX-1 (cyclo-oxygénase), enzyme utilisé dans la mesure de l'activité

anti-inflammatoire. Les extraits de *Merwillia natalensis* (syn. *Scilla natalensis*) possèdent aussi une activité anti-inflammatoire par l'inhibition de COX-1. Pour *Drimia robusta*, l'activité est modérée [Jäger *et al.*, 1996 ; Fennell *et al.*, 2004].

2.3.3.4. Propriétés antibactériennes

Les extraits par EtOH et par le dichlorométhane de *Ledebouria ovatifolia* sont actifs contre les bactéries Gram positif [Sparg *et al.*, 2002].

2.3.3.5. Propriétés antimutagénique et anticlastogénique potentielles

L'extrait de bulbes de *Muscari racemosus* exerce des effets antimutagénique et anticlastogénique sur les souches bactériennes *Salmonella typhimurium*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Vicia sativa* [Miadokova *et al.*, 2002].

3 – DONNEES SUR *Rhodocodon madagascariensis* Baker

3.1. DESCRIPTION BOTANIQUE

Perrier de la Bâthie (1938) a donné les descriptions suivantes pour *Rhodocodon madagascariensis* Baker : c'est une plante de 20-35 cm, à bulbe ovale à écailles minces ; une seule feuille par bulbe, ordinairement non développée à la floraison. La feuille est lancéolée-linéaire. La hampe à pédoncule est 3 à 5 fois plus longue que la grappe lâche et pauciflore (5-15 fleurs). Les bractées inférieures sont subpétiolées, à limbe largement ovale-aigü, à appendice (éperon) plus long, plus large et plus épais que le limbe, de forme irrégulière. Les pédicelles sont grêles. Les fleurs sont d'abord blanchâtres, puis se teintent à l'anthèse d'un bord rouge clair. Le périanthe est campanulé, plus haut que large, peu contracté au sommet, à lobes arrondis, de 1 mm de haut. Les étamines sont insérées très près de la base du tube, profondément incluses, à filets élargis à la base, puis brusquement linéaires et subulés. Les anthères sont oblongues, obtuses, à point d'attache au quart inférieur. L'ovaire est largement ovale, à loges à 10-14 ovules. La capsule est ovale et oblongue. Les graines de couleur noire sont au nombre de 4-5 par loge. Elles sont irrégulièrement comprimées, anguleuses et allongées (3 x 1-1,5 mm).

Des photos relatives à cette plante sont données dans la figure 83.

3.2. REPARTITION GEOGRAPHIQUE

Rhodocodon madagascariensis Baker se rencontre principalement dans la partie centrale de Madagascar (région des hauts plateaux) aux alentours d'Ambatolampy, de Betafo, de l'Ankaratra, sur le mont Ibity et dans le massif d'Andringitra. Elle se trouve en altitude (de 900 à 2500 m) [Perrier de la Bâthie, 1938] (figure 84).



Figure 83 : *Rhodocodon madagascariensis* Baker : a) pied ; b) inflorescence ; c) capsule ouverte ; d) graines ; e) bulbes ; f) villageois d'Amboasary (site d'étude)

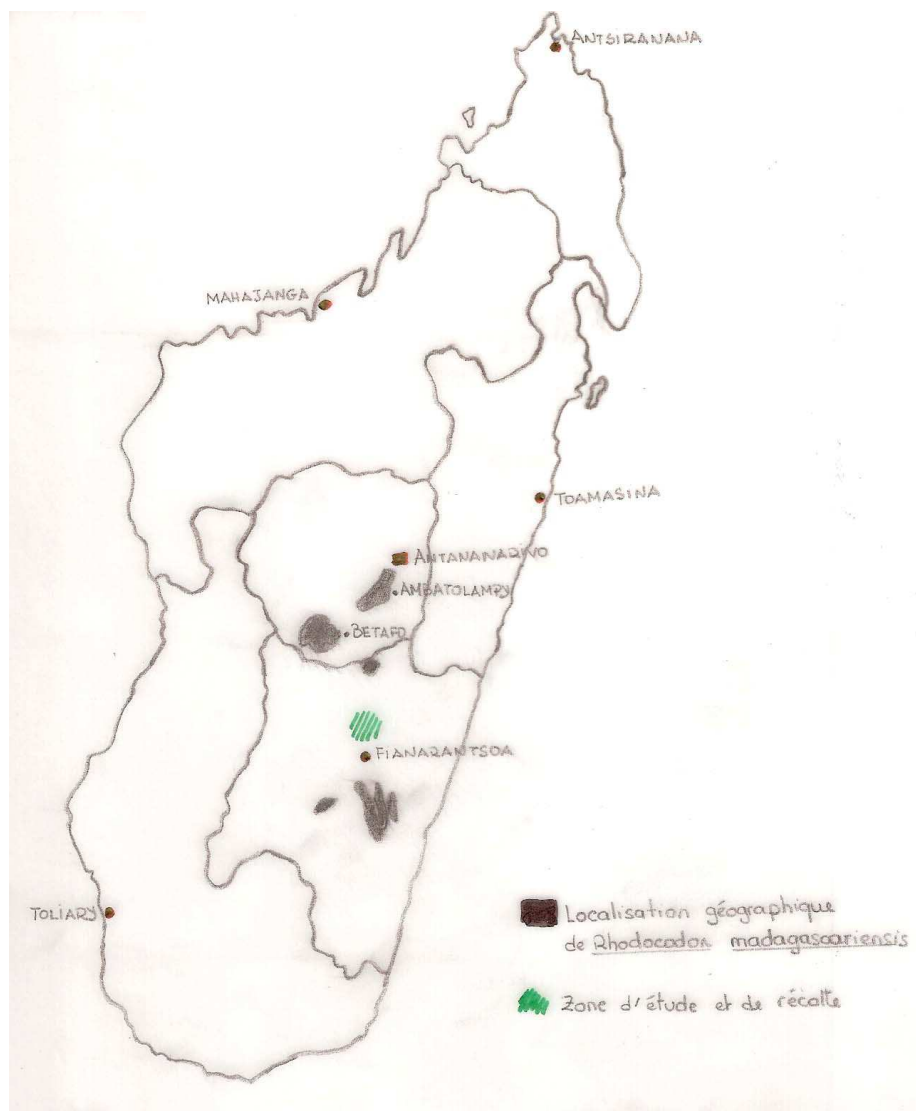


Figure 84 : Carte de répartition de *Rhodocodon madagascariensis* Baker
(en noir : localisation géographique de la plante ; en vert : zone d'étude et de récolte).

3.3. ECOLOGIE

Rhodocodon madagascariensis Baker pousse sur les terrains rocailleux.

3.4. CLASSIFICATION

Sa classification est la suivante :

- Règne : Végétal
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Liliopsida
- Sous-classe : Liliidae
- Ordre : Asparagales
- Famille : Hyacinthaceae
- Genre : *Rhodocodon*
- Espèce : *madagascariensis* Baker

Rhodocodon madagascariensis Baker est connu sous les noms vernaculaires famonototozy, kilobaloba, sahondra, tapabatana, tongolomboalavo [Boiteau, 1979].

Le genre *Rhodocodon* Baker est un genre endémique de Madagascar et il comprend 8 espèces (*R. apiculatus*, *R. calciolus*, *R. cyathiformis*, *R. floribundus*, *R. intermedius*, *R. madagascariensis*, *R. rotundus* et *R. urGINEOIDES*). [Perrier de la Bâthie, 1938 ; Mabberley, 1997]

3.5. UTILISATIONS DE *Rhodocodon madagascariensis* Baker

A Madagascar, *Rhodocodon madagascariensis* Baker est surtout utilisé comme mort-aux-rats dans la région des hauts plateaux de l'Ile. Sa toxicité a été reconnue et les effets ont été décrits comme suit : cardiotonique, stimulant cardiaque, constipation, laxatif, purgatif et cathartique. En raison de sa toxicité, la plante a été également utilisée comme poison et toxique pour diverses fins. Elle est par exemple employée comme poison d'épreuve et ordalie (épreuve judiciaire supposée établir la culpabilité ou l'innocence d'un accusé) [Terrac, 1947 ; Boiteau, 1986 ; Boiteau et Allorge-Boiteau, 1993 ; Rasoanaivo *et al.*, 1993].

4 – ENQUETES ETHNOBOTANQUES

Les enquêtes ont été menées plusieurs fois dans la localité d'Amboasary, commune rurale d'Ampitana, district d'Ambohimahaso, région de la Haute Matsiatra. Cette localité se situe à environ 12 km de la ville d'Ambohimahaso.

Lors de la première descente dans la zone d'étude, nous avons demandé aux populations locales les plantes qu'elles utilisaient comme raticides. De cette enquête a surgi le nom « famonotozozy » qui signifie « mort aux souris » et la désignation de la plante en question. Des échantillons de la plante ont été récoltés (pied entier et bulbe) et un herbier a été confectionné. La détermination de la plante par le département de Biologie et Ecologie Végétale de la Faculté des Sciences d'Antananarivo a permis l'identification de la plante comme étant *Rhodocodon madagascariensis* Baker.

Lors des enquêtes ultérieures, nous avons recueilli des compléments d'informations concernant la plante et ses utilisations.

- La plante est bien connue à Amboasary et ses environs : les habitants connaissent son habitat et son cycle végétatif (période où la plante perd ses feuilles, périodes de floraison et de fructification).
- Elle pousse abondamment dans la région : plusieurs dizaines de kilogrammes de bulbes ont été récoltés en une seule journée.
- La toxicité des bulbes est bien connue et crainte. Selon un témoignage, des zébus les ayant broutés ont été empoisonnés. Ceux qui ne sont pas morts après ingestion et auxquels on a fait boire du lait de vache ont survécu à l'intoxication.
- Sa propriété raticide est communément exploitée par les habitants. A cet effet, nous avons assisté à des démonstrations, faites par certains ménages sur la confection et la pose d'appâts empoisonnés à base de bulbes. Les bulbes dépoussiérés, broyés grossièrement à l'aide de cailloux, sont mélangés avec des restes d'aliments (riz, manioc, maïs, miettes de pain ...). Les appâts ainsi préparés sont placés devant des souricières, dans les greniers à récolte et dans les champs de culture. D'après ces villageois ces préparations sont très efficaces. Cependant, il a été bien signalé qu'il ne faut pas laisser les appâts à la portée des enfants et des animaux domestiques car des accidents ont déjà eu lieu.

- Les autres organes de la plante, feuilles, fruits et graines ne sont pas utilisés dans la préparation des appâts. Leur toxicité n'a d'ailleurs pas été signalée.
- Dans les villages où les enquêtes ont été réalisées, la plante ne fait l'objet d'aucune autre utilisation empirique.

5 – ETUDE CHIMIQUE

L'étude chimique entreprise avec *Rhodocodon madagascariensis* Baker avait pour but d'en caractériser les principes toxiques. Des procédés d'extraction et de fractionnement guidés par des tests de toxicité sur souris et d'homogénéité par CCM ont été ainsi mis au point afin d'isoler les principes toxiques dont les structures moléculaires ont été ensuite déterminées par les méthodes spectrométriques.

5.1. PREPARATION DU MATERIEL D'ETUDE

La récolte de *Rhodocodon madagascariensis* Baker a été faite en mars 2005 dans notre zone d'étude. Les bulbes, débarrassés des racines et des feuilles, ont été nettoyés et conservés au congélateur. Ils constituent notre matériel d'étude.

Une partie a été séchée au soleil et il a été déduit de cette opération que la teneur en eau des bulbes est de 85,6%.

5.2. EXTRACTIONS

Différentes techniques d'extraction utilisant divers solvants à deux températures différentes ont été effectuées sur des bulbes frais afin de déterminer celle qui permet d'obtenir un extrait toxique avec un bon rendement et plus commode (ayant des caractéristiques moins gênantes) pour l'isolement des principes actifs. Le tableau ci-après résume les résultats obtenus.

Tableau 37 : Résultats des différentes techniques d'extraction des principes toxiques à partir de bulbes frais.

Technique d'extraction	Aspect de l'extrait	Rendement	Dose	Temps de survie des souris testées
Aqueux à froid	limpide	9,4 %	1,2 g/kg	60 min
Aqueux à chaud	sirupeux	6,9 %	1,2 g/kg	20 min
Hydroalcoolique à froid	trouble	10,3 %	1,2 g/kg	25 min
Ethanolique à froid	limpide	12,3 %	1,2 g/kg	20 min

La technique d'extraction à l'alcool à froid a fourni l'extrait ayant les caractéristiques recherchées (**Tableau 37**). L'extraction par EtOH fournit un extrait plus important en poids avec une toxicité plus importante se manifestant par un temps de survie plus court que

l'extrait aqueux à froid. L'extrait aqueux à chaud donne également des temps de survie courts, mais l'extrait est alors presque deux fois moins abondant que l'extrait par EtOH.

Ainsi, avec 3,5 L de EtOH on obtient de 1210 g de bulbes frais 149,19 g d'extrait brut à partir. A la dose de 1,2 g/kg de poids cet extrait brut tue les animaux au bout de 20 min.

5.3. FRACTIONNEMENT ET PURIFICATION DES EXTRAITS

L'extrait brut est extrait par le n-BuOH (volume/volume). Un seul traitement a été effectué. Après évaporation, la toxicité de chacune des deux phases (organique et aqueuse) a été évaluée sur souris. A la dose de 1,2 g/kg, la phase butanolique et la phase aqueuse ont provoqué la mort des animaux respectivement au bout de 15 min et au-delà de 24 h.

Une succession de techniques chromatographiques sur colonne (XAD₄, SiO₂ et LH-20) a conduit à l'isolement à partir de l'extrait butanolique, de trois composés purs : **R1** (2 mg), **R2** (5 mg) et **R3** (17 mg).

Le schéma ci-après résume ces différentes étapes.

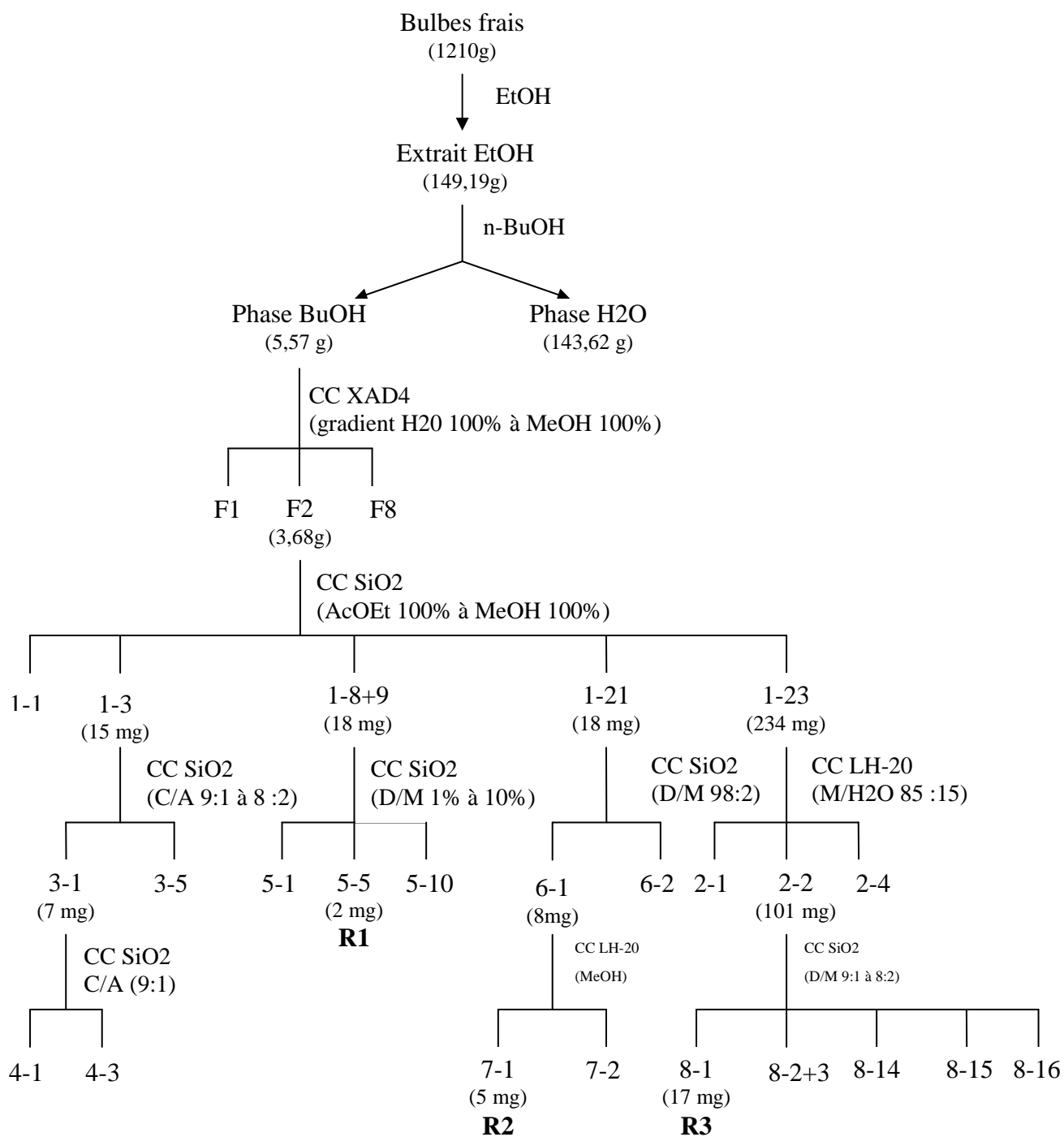


Figure 85 : Schéma d'extraction et de purification des composés **R1**, **R2** et **R3** isolés de bulbes frais de *Rhodocodon madagascariensis* Baker.

5.4. DETERMINATION STRUCTURALE

5.4.1. STRUCTURE DU COMPOSE R1 : SCILLIROSIDINE

Le spectre de masse ESI-Q-TOF, en mode positif, du composé **R1** montre l'ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ à $m/z = 459,2348$ correspondant à la formule brute $C_{26}H_{34}O_7$ (calc. pour $C_{26}H_{35}O_7$: 459,2381). Cette formule implique dix degrés d'insaturation.

Le spectre de RMN ^{13}C montre les 26 carbones de la formule brute qui se répartissent de la façon suivante (*tableau 38*) :

- deux carbonyles détectés à 162,5 et 168,5 ppm;
- six carbones sp^2 éthyléniques entre 110 et 150 ppm répartis en quatre méthines à δC 115,4, 133,7, 146,7 et 148,4 ppm et deux carbones quaternaires à 122,8 et 140,3 ppm. La molécule comporte donc trois doubles liaisons carbone-carbone ;
- quatre carbones quaternaires sp^3 dont deux à δC 77,0 et 84,6 ppm, sont liés à un atome d'oxygène ;
- quatre méthines, dont deux à δC 67,7 et 76,4 ppm liés à un atome d'oxygène ;
- sept méthylènes entre δC 18,0 et 41,0 ppm ;
- trois méthyles à δC 19,0, 21,6 et 22,2 ppm.

Compte tenu des dix degrés d'insaturation de la formule brute et de la présence de cinq doubles liaisons, la molécule comporte cinq cycles.

Les éléments décrits ci-dessus sont retrouvés sur le spectre de RMN 1H de **R1** en solution dans $CDCl_3$ qui montre, dans la région des champs faibles, la présence de quatre protons éthyléniques à δH 5,81, 6,25, 7,17 et 7,80 ppm. Les trois méthyles de la molécule apparaissent comme des singulets, à δH 0,83, 1,25 et 2,04 ppm, ce dernier étant attribuable à un groupe acétyle (*Tableau 38*). L'analyse des spectres de RMN 2D, HSQC et COSY, permet de définir les sous-structures **a-e** indiquées en traits gras dans la *figure 86*.

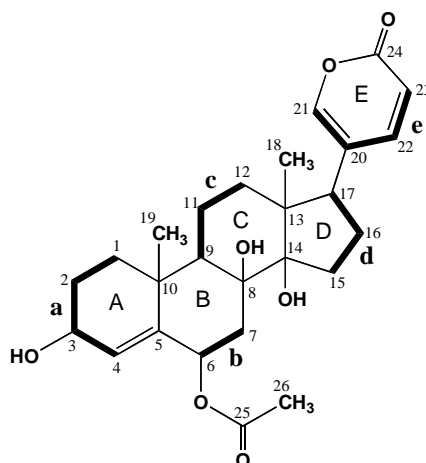


Figure 86: Structure plane du composé **R1**. Les corrélations COSY sont indiquées par des liaisons en caractère gras.

Ainsi, le proton éthylénique à δ H 5.81 ppm (H-4) est corrélé sur le spectre COSY avec l'oxyméthine à δ H 4,18 ppm (H-3), lui-même corrélé avec le méthylène à δ H 2,00 et 1,55 ppm (H2-2) qui l'est à son tour avec le méthylène à 1,82 et 1,29 ppm (H2-1), ce qui définit la sous-structure **a**. Partant de l'oxyméthine à 5,53 ppm (H-6) corrélé avec le méthylène à 1,20 et 1,49 ppm (H2-7) la sous-structure **b** est obtenue. De même sont mises en évidence les sous-structures **c** ($>$ CH-CH₂-CH₂-) et **d** ($>$ CH-CH₂-CH₂-). Le proton éthylénique à δ H 7,80 ppm (H-22) qui forme un doublet de doublet dans le spectre proton ($J_1 = 9,7$; $J_2 = 2,6$ Hz) est corrélé avec les protons éthyléniques à δ H 6,25 et 7,17 ppm. Comme la grande constante de couplage est avec le premier et la petite avec le second, une disposition respectivement de type *ortho* et *meta* est suggérée, définissant la sous-structure **e**.

Ces sous-structures **a** à **e** ont été reliées entre elles grâce aux différentes corrélations à longue distance observées sur le spectre HMBC. Ainsi, le carbone à δ C 38,4 (C-1) est corrélé d'une part aux protons à δ H 2,00 et 1,55 ppm (CH₂-2), mais aussi à ceux du méthyle à δ H 1,25 ppm (CH₃-19). Le carbone à δ C 140,3 ppm (C-5) est corrélé au proton éthylénique à δ H 5,81 ppm (H-4), mais aussi aux protons équatoriaux des méthylènes CH₂-1 et CH₂-7, à ceux de l'oxyméthine à 5,53 ppm (CH-6) et du méthyle CH₃-19, ce qui définit le cycle A. Le carbone quaternaire à δ C 77,0 ppm (C-8) est corrélé aux protons à δ H 5,53 (H-6), 2,40 et 1,49 (H-7) et aussi à l'hydroxyle à 3,29 ppm (OH-8). Le carbone quaternaire à δ C 84,6 ppm (C-14) l'est aux protons à δ H 2,41 (H-17), 1,49 (H-7), 2,14 et 1,74 (H-16) et au méthyle à 0,83 (CH₃-18), ainsi qu'à l'hydroxyle à 3,29 ppm (OH-14).

Enfin, le carbone à δC 49,4 (C-13) est corrélé aux protons CH-17, CH₂-16 et CH₂-12, ainsi qu'au méthyle à δH 0,83 ppm (CH₃-18) : ces données permettent de refermer les cycles B et C comme indiqué sur la *figure 86*. Le carbone à δC 51,8 (C-17) est corrélé aux protons du méthyle CH₃-18, ce qui permet de refermer le cycle D. De plus, il est corrélé avec les protons aromatiques à δH 7,80 (H-22) et 7,17 ppm (H-21). Le carbonyle à δC 162,5 ppm (C-24) est fortement corrélé avec les protons H-22 et H-23, mais aussi avec H-21: le cycle D est donc une pyrano-lactone qui est reliée au carbone C-17 par le carbone quaternaire C-20.

Le carbonyle à δC 168,5 ppm (C-23) est corrélé d'une part au méthyle à δH 2,04 ppm (CH₃-26) et d'autre part au proton oxyméthine à δH 5,53 ppm (H-6) : la fonction alcool en -6 est donc acétylée.

L'attribution complète des protons et des carbones a été réalisée grâce à l'analyse des spectres de RMN 2D (*tableau 38*).

L'analyse du spectre NOESY met en évidence des effets NOE importants entre H-3 et H-1_{ax} ce qui les situe sur la même face de la molécule. Comme le proton H-3 présente une constante de couplage forte avec H-2_{ax} ($J = 10,2$ Hz) il est axial et donc l'hydroxyle en -3 est β -équatorial. Le proton H-6 donne de faibles constantes de couplage, caractéristiques d'une disposition gauche avec les deux protons H-7 ($3J = 3,5$ et $3,0$ Hz) et donne des NOEs d'intensités sensiblement équivalentes : H-6 est donc α -équatorial et le groupe acétoxyle β -axial. Les protons aromatiques H-21 et H-22 donnent des corrélations avec le méthyle CH₃-18, lui-même corrélé à H-11 β -axial et H-12 β -équatorial : tous ces protons sont donc sur la face β de la molécule.

Tableau 38 : Données de RMN ^{13}C et ^1H NMR pour **R1** (CDCl_3 ; ^1H : 400.13 MHz).

N°	R1			
	δ_{C}	δ_{H}	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)
1	38,4	1,82	<i>m</i> (éq)	
		1,29	<i>m</i> (ax)	
2	28,4	2,00	<i>m</i> (éq)	
		1,55	<i>m</i> (ax)	
3	67,7	4,18	<i>ddd</i>	10,2 ; 6,3 ; 2,1
4	133,7	5,81	<i>dd</i>	1,8 ; 1,8
5	140,3	-		
6	76,4	5,53	<i>dd</i>	3,5 ; 3,0
7	37,2	2,40	<i>m</i>	
		1,49	<i>m</i>	
8	77,0	-		
9	50,8	1,35	<i>m</i>	
10	36,5	-		
11	18,3	1,82	<i>m</i>	
		1,44	<i>m</i>	
12	40,9	1,58	<i>m</i> (éq)	
		1,35	<i>m</i> (ax)	
13	49,4	-		
14	84,6	-		
15	33,6	1,88	<i>m</i>	
		1,68	<i>m</i>	
16	29,1	2,14	<i>m</i>	
		1,74	<i>m</i>	
17	51,8	2,41	<i>m</i>	
18	19,0	0,83	<i>s</i>	
19	22,2	1,25	<i>s</i>	
20	122,8	-		
21	148,4	7,17	<i>dd</i>	2,6 ; 1,1
22	146,7	7,80	<i>dd</i>	9,7 ; 2,6
23	115,4	6,25	<i>dd</i>	9,7 ; 1,1
24	162,5	-		
25	168,5	-		
26	21,6	2,04	<i>s</i>	
OH-8	-	3,29	<i>s</i>	
OH-14	-	3,19	<i>d</i>	2,4

L'ensemble de ces données conduit à attribuer à **R1** la structure suivante, qui est celle de la scillirosidine, préalablement isolée à partir de *Scilla maritima* par d'autres auteurs [Wartburg et Renz, 1959] puis de *Urginea sanguinea* [Krenn et al., 1993] et qui appartient à la classe des bufadiénolides.

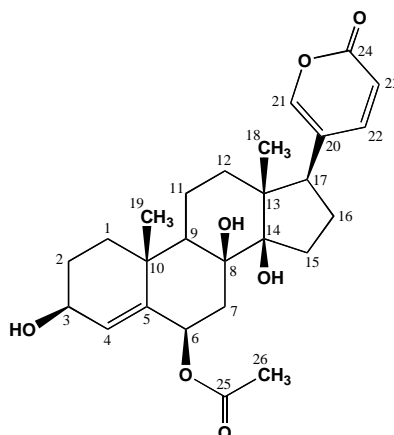


Figure 87 : Structure du composé **R1**, scillirosidine.

5.4.2. STRUCTURE DU COMPOSE R2 : SCILLIROSIDE

Le spectre de masse ESI-Q-TOF, en mode positif, du composé **R2** montre l'ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ à $m/z = 621,2904$ correspondant à la formule brute $C_{32}H_{44}O_{12}$ (calc. pour $C_{32}H_{45}O_{12}$: 621,2908). Cette formule implique dix degrés d'insaturation.

On observe dans le spectre deux fragments l'un à $m/z = 561,2740$ correspondant à la perte d'une molécule d'acide acétique, un autre à $m/z = 459,2390$ correspondant à la scillirosidine et enfin un à $m/z = 399,2196$ correspondant à la perte d'une molécule d'acide acétique à partir de l'ion 459 précédent.

Le spectre de RMN ^{13}C montre les signaux des 32 carbones de la formule brute. Ils se répartissent de la façon suivante : trois carbonyles, six carbones éthyléniques dont quatre méthines (CH) et deux quaternaires, quatre carbones quaternaires dont deux portant un atome d'oxygène, neuf méthines dont six oxyméthines, sept méthylènes dont un portant un atome d'oxygène et trois méthyles (*tableau 39*). La plupart des signaux du spectre de **R1** sont retrouvés, avec, en plus, un nouvel ensemble de six signaux. Ainsi, sont observés les signaux correspondant à : un groupe méthine acétalique à δC 103,6 ppm, un méthylène lié à un atome d'oxygène à δC 63,1 ppm et entre 71 et 78 ppm quatre signaux d'oxyméthine. Le spectre de RMN 1H est en accord avec ces propositions et suggère la présence d'un pyranose. L'analyse des spectres 2D HSQC et COSY permet de définir pour cette molécule les mêmes sous-structures **a-e** que celles définies pour **R1**.

Le méthine à δH 4,42 ppm (H-1') est corrélé avec l'oxyméthine à 3,15, lui-même avec celui à 3,48, qui est corrélé aux oxyméthines à 3,30, eux-mêmes corrélés au CH_2-OH à δH 3,82 et 3,64 ppm. L'ensemble constitue la sous-structure **f** (*figure 88*).

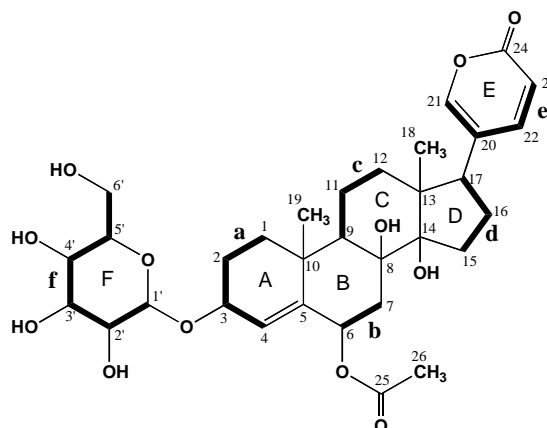


Figure 88: Structure plane du composé **R2**. Les corrélations COSY sont indiquées par des liaisons en caractère gras.

Les sous-structures **a-e** sont assemblées entre elles à l'aide du spectre HMBC de façon identique à ce qui a été fait pour **R1**. Ensuite, le carbone à δC 103,6 ppm (C-1') est corrélé d'une part aux protons à δH 3,15 ppm (H-2') et 3,30 ppm (H-5') ce qui permet de cycliser la sous-structure **f** en glucopyranose et d'autre part au proton à δH 4,25 ppm (H-3) ce qui permet de lier ce sucre à la position -3 du terpène. Les grandes constantes de couplage des protons et les déplacements chimiques des atomes de la sous-structure **f** permettent d'identifier un glucose et la constante de couplage de H-1' (7,7 Hz), montre que ce proton est axial. L'analyse des NOEs détectés sur le spectre NOESY indique une stéréochimie identique pour la partie terpénique à celle observée pour **R1**. L'ensemble des données permet d'identifier le composé **R2** au scilliroside, qui est le 3-O- β -glucoside de la scillirosidine (*figure 89*). Ce composé avait été isolé auparavant d'*Urginea maritima* [Verbiscar *et al.*, 1986 ; Kopp *et al.*, 1996] et d'*U. pancraticum* [Kopp *et al.*, 1990].

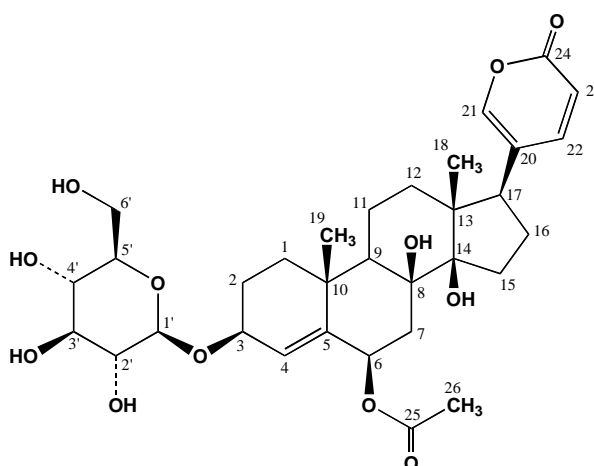


Figure 89 : Structure du composé **R2**, scilliroside.

Tableau 39 : Données de RMN ^{13}C et ^1H NMR pour **R2** ou scilliroside (CD_3COCD_3 ; ^1H : 400.13 MHz).

N°	R2			
	δ_{C}	δ_{H}	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)
1	38,8	1,83	<i>m</i>	
		1,38	<i>m</i>	
2	27,5	2,02	<i>m</i>	
		1,70	<i>m</i>	
3	76,1	4,24	<i>ddd</i>	10,2 ; 6,2 ; 1,7
4	131,5	5,85	<i>brs</i>	
5	142,1	-		
6	5,47	5,53	<i>dd</i>	3,6 ; 2,6
7	38,1	2,41	<i>dd</i>	15,2 ; 2,5
8	77,0	-		
9	51,5	1,47	<i>m</i>	
10	35,5	-		
11	18,9	1,84	<i>m</i>	
		1,49	<i>m</i>	
12	41,5	1,60	<i>m</i>	
		1,49	<i>m</i>	
13	49,9	-		
14	85,5	-		
15	34,6	2,02	<i>m</i>	
16	29,6	2,15	<i>m</i>	
		1,73	<i>m</i>	
17	51,8	2,53	<i>dd</i>	9,2 ; 6,0
18	19,5	0,88	<i>s</i>	
19	22,3	1,32	<i>s</i>	
20	123,5	-		
21	149,9	7,35	<i>dd</i>	2,6 ; 0,8
22	146,7	7,92	<i>dd</i>	9,8 ; 2,6
23	115,4	6,18	<i>dd</i>	9,8 ; 0,8
24	162,6	-		
25	169,5	-		
26	21,5	2,01	<i>s</i>	
1'	103,6	4,42	<i>d</i>	7,7
2'	74,9	3,15	<i>m</i>	
3'	77,9	3,48	<i>m</i>	
4'	71,8	3,33	<i>m</i>	
5'	77,4	3,30	<i>m</i>	
6'	63,1	3,82	<i>m</i>	
		3,64	<i>m</i>	

5.4.3. STRUCTURE DU COMPOSE R3 : 3-O- β -glucoside de l'hellébrigénine

Le spectre de masse ESI-Q-TOF, en mode positif, du composé **R3** présente l'ion moléculaire protoné $[\text{M}+\text{H}]^+$ à $m/z = 579,2830$ correspondant à la formule brute $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_{11}$ (calc. pour $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{O}_{11}$: 579,2805). Cette formule implique dix degrés d'insaturation. On

observe dans le spectre un fragment à $m/z = 417,2296$ correspondant à la formule brute $C_{24}H_{33}O_6$ (calc.: 417,2275) et donc à la perte d'un glucose et d'une molécule d'eau.

Le spectre de RMN ^{13}C montre les 30 carbones de la formule brute qui se répartissent de la façon suivante (tableau 40) :

- quatre carbones éthyléniques dont trois méthines ($=CH-$) (δC 112,1, 147,0 et 148,6 ppm) et un quaternaire (δC 122,7 ppm) ;
- quatre carbones quaternaires sp^3 dont deux liés à un atome d'oxygène (δC 73,4 et 84,4 ppm) ;
- neuf méthines, dont cinq liés à un atome d'oxygène ;
- dix méthylènes dont un CH_2OH à δC 61,9 ppm ;
- un méthyle à δC 16,3 ppm ;
- un signal à δC 208,5 ppm correspondant à un méthine (CH) d'après le spectre de RMN ^{13}C J -modulé et donc attribué à un aldéhyde ($-CHO$).

L'analyse des spectres de RMN 2D, HSQC et COSY, permet de définir les sous-structures suivantes :

- le proton à δH 4.12 ppm est corrélé dans le spectre COSY avec deux méthylènes l'un à 1,94 et 1,70 ppm (CH_2-4) et l'autre à 1,87 et 1,52 ppm (CH_2-2) ; ce dernier est lui-même corrélé au méthylène à 2,13 et 1,65 ppm (CH_2-1), ce qui définit la sous-structure **a** (tableau 40).
- trois systèmes de spins de type $-CH_2-CH_2-CH<$ sont détectés sur le spectre COSY et ils sont attribués aux trois sous-structures **b**, **c** et **d**.
- la sous-structure **e** observée dans les composés précédents est retrouvée. Elle implique les protons éthyléniques à δH 6,22, 7,19 et 7,79 ppm.
- la sous-structure **f** attribuée à un glucopyranose est également retrouvée : elle implique les protons à δH 4,34, 3,23, 3,40 3,39, 3,26, 3,71 et 3,80 ppm.

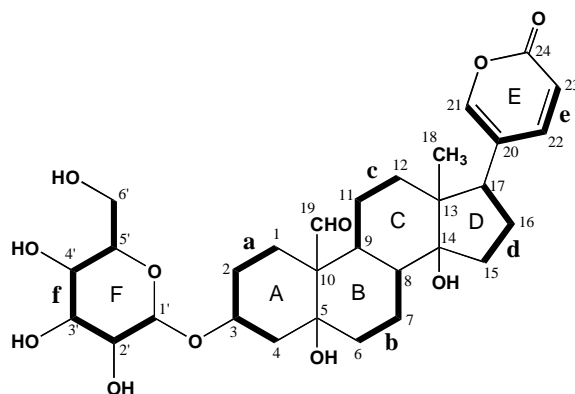


Figure 90 : Structure plane du composé **R3**. Les corrélations COSY sont indiquées par des liaisons en caractère gras.

Grâce au spectre HMBC, ces sous-structures ont été assemblées. Le carbone quaternaire à δC 54,7 ppm (C-10) est corrélé avec le proton aldéhydique à δH 9,96 ppm et avec les protons à 2,13 (H-1) et 1,55 ppm (H-9) ; le carbone quaternaire oxygéné à δC 73,4 ppm (C-5) est corrélé avec les protons à δH 1,70 ppm (H-4) et 2,03 ppm (H-6). Ces données permettent de définir le cycle A et de fixer le groupe aldéhyde.

Le carbone quaternaire oxygéné à δC 84,4 ppm (C-14) est corrélé avec les protons à δH 2,41 ppm (H-17), 2,15 et 1,65 (H-16), 1,46 ppm (H-12) et le méthyle à 0,62 ppm (C-18). Les protons de ce méthyle sont également corrélés avec les carbones à δC 40,5 (C-12), 48,5 (C-13) et 50,8 (C-17). Ces données permettent de construire les cycles B, C et D, en reliant les sous-structures **b**, **c** et **d** (**figure 90**).

Le carbone à δC 100,7 (H-1') est corrélé avec les protons à δH 3,23 (H-2') et 3,26 ppm (H-5') ce qui définit le cycle pyranose F. Il est également corrélé au proton à δH 4,12 (H-3) ce qui indique que le glucopyranose est lié à la position -3 de la partie terpénique.

Les corrélations des carbones éthyléniques et celles du carbonyl à δC 162,8 (C-24) avec les protons éthyléniques correspondent à la structure pyronique E déjà décrite pour les bufadiénolides précédents. Les corrélations des carbones à δC 122,7 ppm (C-20), 148,6 ppm (C-21) et 147,0 ppm (C-22) avec le proton à 2,41 ppm (H-17) confirment la liaison entre C-17 et C-20 (**figure 90**).

L'ensemble définit la structure plane de **R3** donnée dans la **figure 90**.

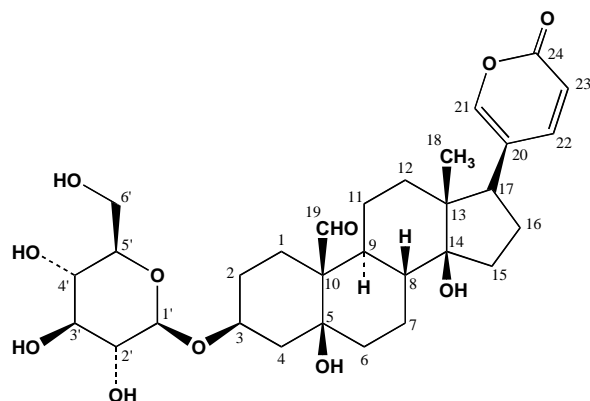


Figure 91 : Structure du composé **R3**, 3-*O*- β -glucoside de l'hellébrigénine.

Les corrélations observées sur le spectre NOESY entre les protons à δ H 4,12 (H-3) et 4,34 ppm (H-1') confirment la jonction 1'-3 entre le glucopyranose et le terpène. Le méthyle-18 est corrélé avec les protons à δ H 1,46 (H-12_{eq}), 1,80 ppm (H-8) et à 7,79 ppm (H-22), qui sont sur la même face β de la molécule. Le proton aldéhydique est corrélé avec les protons à δ H 2,03 (H-6) et 1,80 ppm (H-8) qui sont donc sur la même face β . Toutes ces données conduisent à la formule suivante avec la stéréochimie relative indiquée. Cette structure est celle du 3-*O*- β -glucoside de l'hellébrigénine (**figure 91**). L'hellébrigénine a été isolée auparavant par Schmutz [Schmutz *et al.*, 1949] de la plante *Helleborus niger* et plus récemment du crapaud *Rhinella jimi* [Tempone *et al.*, 2008], son rhamnoside de *Kalanchoe lanceolata* [Anderson *et al.*, 1984] et son gluco-(1->4)-rhamnoside, nommé hellébrine d'*Urginea altissima* par Shimada [Shimada *et al.*, 1979] et d'*H. torquatus* [Meng *et al.*, 2001]. Ainsi, **R3** est également un glucoside de bufadiénolide.

Tableau 40 : Données de RMN ^{13}C et ^1H NMR pour **R3**, 3-O- β -glucoside de l'hellébrigénine ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$, ^1H : 400.13 MHz).

N°	R3			
	δ_{C}	δ_{H}	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)
1	17,8	2,13	<i>m</i>	
		1,65	<i>m</i>	
2	25,3	1,87	<i>m</i>	
		1,52	<i>m</i>	
3	73,7	4,12	<i>brs</i>	
4	34,5	1,94	<i>m</i>	
		1,70	<i>m</i>	
5	73,4	-		
6	36,5	2,05	<i>m</i>	
		1,65	<i>m</i>	
7	24,1	2,11	<i>m</i>	
		1,26	<i>m</i>	
8	41,9	1,80	<i>m</i>	
9	39,4	1,55	<i>m</i>	
10	54,7	-		
11	22,2	1,48	<i>m</i>	
		1,15	<i>m</i>	
12	40,5	1,46	<i>m</i>	
		1,27	<i>m</i>	
13	48,5	-		
14	84,4	-		
15	31,5	1,90	<i>m</i>	
		1,66	<i>m</i>	
16	28,5	2,15	<i>m</i>	
		1,65	<i>m</i>	
17	50,8	2,41	<i>m</i>	
18	16,3	0,62	<i>s</i>	
19	208,5	9,96	<i>s</i>	
20	122,7	-		
21	148,6	7,19	<i>brd</i>	2,5
22	147,0	7,79	<i>dd</i>	9,8 ; 2,5
23	115,1	6,22	<i>d</i>	9,8
24	162,8	-		
1'	100,7	4,34	<i>d</i>	7,7
2'	73,3	3,23	<i>m</i>	
3'	76,5	3,40	<i>m</i>	
4'	70,0	3,39	<i>m</i>	
5'	75,8	3,26	<i>m</i>	
6'	61,9	3,80	<i>m</i>	
		3,71	<i>m</i>	

Les trois composés isolés de *Rhodocodon madagascariensis* Baker, la scillirosidine (**R1**), le scilliroside (**R2**) et le 3-O- β -glucoside de l'hellébrigénine (**R3**), appartiennent à la classe des bufadiénolides qui sont des stéroïdes cardioactifs isolés à partir de différentes familles de plantes et d'animaux. Des composés de cette classe ont déjà été isolés chez les Hyacinthaceae, essentiellement à partir du genre *Urginea*.

Ces composés sont biosynthétisés par la voie des isoprénoïdes, *via* le squalène et le cholestérol ou un 24-alkylstérol, comme cela a été démontré [Herbert, 1994 ; Galagovsky, 1983]. Le cholestérol est oxydé en prégnénolone avec coupure partielle de la chaîne latérale. La conversion de la prégnénolone en digitoxigénine implique l'incorporation d'une molécule d'acide acétique, tandis que la formation de la scillirosidine et l'hellébrigénine implique l'incorporation d'une molécule d'acide oxaloacétique, puis perte d'un atome de carbone par décarboxylation (*figure 92*).

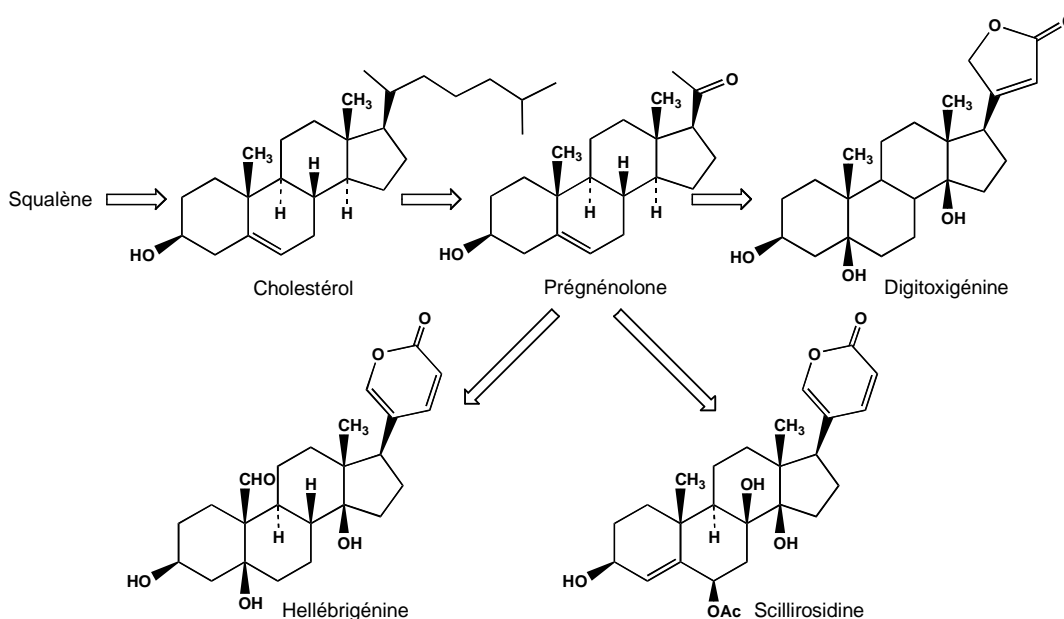


Figure 92 : Schéma de biosynthèse des bufadiénolides et des cardénolides à partir du squalène (selon [Steyn et van Heerden, 1998]).

6 – ETUDE TOXICOLOGIQUE

6.1. ACTIVITE TOXIQUE SUR SOURIS

6.1.1. SYMPTOMES D'INTOXICATION PROVOQUES PAR LES DIFFERENTS EXTRAITS

Les symptômes d'intoxication observés pour chaque type d'extrait, à la dose de 1,2g/kg, sont consignés dans le tableau suivant.

Tableau 41 : Symptômes d'intoxications observés lors des tests des différents extraits.

Type d'extrait	Symptômes d'intoxication observés
Extrait aqueux à froid	<ul style="list-style-type: none"> - 3 min après injection : les souris deviennent passives, il y a ataxie et exophtalmie - au bout de 5 min : il y a convulsions - au bout de 30 min : les membres sont paralysés et les animaux n'arrivent plus à se déplacer. Présence de convulsions - l'animal décède au bout d'une heure
Extrait aqueux à chaud	<ul style="list-style-type: none"> - Après 10 min d'injection : immobilisation totale des souris suivie de convulsions - La mort de l'animal a lieu 20 min après l'injection
Extrait hydroalcolique à froid	<ul style="list-style-type: none"> - 10 min après injection : il y a exophtalmie suivie d'une immobilisation totale des animaux et de convulsions - l'animal meurt au bout de 25 min
Extrait EtOH à froid	<ul style="list-style-type: none"> - 5 min après injection, il y a paralysie des membres suivie de convulsions - La mort survient au bout de 20 min

6.1.2. LSIONS ANATOMOPATHOLOGIQUES

Les effets de l'extrait brut de *Rhodocodon madagascariensis* Baker au niveau tissulaire ont été appréciés par comparaison de coupes histologiques d'organes (cerveau, foie, reins, poumons, cœur, estomac et intestin) prélevés de souris non traitées, de souris traitées puis sacrifiées ou de cadavres immédiatement après le décès. Les doses d'extrait utilisées sont 1200 mg/kg et 2400 mg/kg pour l'administration orale et 170 mg/kg et 300 mg/kg pour l'injection intra-péritonéale.

6.1.2.1. Lésions macroscopiques

L'autopsie a révélé des lésions macroscopiques au niveau du foie. Le foie est hyperhémique (de couleur rouge foncé) avec présence de tâches blanchâtres. Les autres organes, à savoir le cerveau, les poumons, le cœur, l'estomac, l'intestin et les reins semblent macroscopiquement normaux.

6.1.2.2. Lésions microscopiques

Les résultats de l'étude anatomopathologique (*tableau 42 A-D* et *figures 93-106*) ont révélé que l'extrait brut de bulbes de *Rhodocodon madagascariensis* Baker provoque des lésions au niveau des organes examinés (cerveau, foie, reins, poumons, cœur, estomac et intestin). Toutefois, les lésions varient selon l'organe, la dose et la voie d'administration de l'extrait. En général, ces lésions sont caractérisées par des réactions inflammatoires. Elles se traduisent par une congestion vasculaire, des foyers d'imbibition oedémateuse et un infiltrat inflammatoire plus ou moins diffus. Cet infiltrat inflammatoire se compose de polynucléaires neutrophiles, de lymphocytes et d'histiocytes.

Bien que les lésions au niveau du cerveau soient relativement moins importantes que dans les autres organes, elles sont suffisantes pour provoquer les troubles neurologiques observés lors des intoxications.

Parmi les organes d'élimination des toxines, le foie est le plus touché. Les lésions sont de type inflammatoire, avec des nappes hémorragiques et une stéatose hépatique aboutissant même à une destruction des cellules hépatocytaires.

Les lésions observées au niveau des autres organes sont importantes et très variées. Leur gravité explique le décès brutal des animaux traités.

Tableau 42A : Lésions tissulaires provoquées par l'extrait brut de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. en fonction de la dose, de la voie d'administration et de la durée d'exposition au niveau du cerveau et du poumon.

CERVEAU				
Durée de l'exposition en heure	Lésions observées selon la voie d'administration			
	Voie orale		Voie intra-péritonéale	
24	1,2	- Méninge et parenchyme cérébral histologiquement normaux	0,17	- Parenchyme cérébral ponctué par quelques cellules inflammatoires
48	1,2	- Méninge et parenchyme cérébral histologiquement normaux	0,17	- Parenchyme cérébral ponctué par quelques cellules inflammatoires
7	2,4	- Présence de quelques cellules inflammatoires au niveau du parenchyme cérébral	0,3	- Œdème au niveau de la méninge et du parenchyme cérébral.
24	2,4	- Au niveau du parenchyme cérébral (présence de cellules inflammatoires diffuses avec formation de petits foyers inflammatoires et de capillaires sanguins congestifs)	0,3	- Méninge (présence de capillaires sanguins dilatés, de quelques cellules inflammatoires et d'œdème (méningite)) - Parenchyme cérébral remanié par des foyers d'imbibition oedémateuse et d'infarctissement hémorragique (ramollissement cérébral)
POUMON				
Durée de l'exposition en heure	Lésions observées selon la voie d'administration			
	Voie orale		Voie intra-péritonéale	
24	1,2	- Parenchyme pulmonaire caractérisé par un éclatement alvéolaire, un épaississement des septums interalvéolaires par des vaisseaux dilatés et nappe hémorragique - Paroi bronchiolaire siège d'un infiltrat inflammatoire et d'œdème	0,17	- Parenchyme pulmonaire caractérisé par un éclatement alvéolaire, de petites congestions vasculaires avec présence de quelques cellules inflammatoires, des vaisseaux dilatés, de petits foyers hémorragiques et d'un léger œdème des septums inter-alvéolaires - Paroi bronchiolaire siège d'un discret infiltrat inflammatoire
48	1,2	- Parenchyme pulmonaire caractérisé par un éclatement alvéolaire, un épaississement des septums interalvéolaires par des cellules inflammatoires, des vaisseaux dilatés et nappe hémorragique. - Paroi bronchiolaire siège d'un infiltrat inflammatoire et d'œdème	0,17	- Parenchyme pulmonaire caractérisé par un éclatement alvéolaire voire disparition partielle, un épaississement des septums inter- alvéolaires par des capillaires congestifs avec présence d'assez nombreuses cellules inflammatoires, de larges nappes hémorragiques et d'un œdème important - Paroi bronchiolaire siège d'un infiltrat inflammatoire diffus
7	2,4	- Parenchyme pulmonaire caractérisé par un éclatement alvéolaire avec réduction de la taille des alvéoles restantes, un épaississement des septums inter-alvéolaires par des cellules inflammatoires, des vaisseaux dilatés et d'œdème - Paroi bronchiolaire occupée par une inflammation diffuse de nappe hémorragique et d'œdème	0,3	- Parenchyme pulmonaire caractérisé par la destruction partielle, l'épaississement des septums inter- alvéolaires par des capillaires congestifs avec présence de cellules inflammatoires, de nappes hémorragiques et d'un œdème important - Paroi bronchiolaire siège d'un infiltrat inflammatoire diffus
24	2,4	- Parenchyme pulmonaire caractérisé par un éclatement alvéolaire, un épaississement des septums inter-alvéolaires par des cellules inflammatoires, des vaisseaux dilatés, d'œdème et de plusieurs nappes hémorragiques - Paroi bronchiolaire occupée par une inflammation diffuse par endroits, par des nappes hémorragiques et d'œdème	0,3	- Parenchyme pulmonaire caractérisé par la destruction partielle, l'épaississement des septums inter-alvéolaires par des capillaires congestifs avec présence de cellules inflammatoires, de nappes hémorragiques et d'un œdème important.

Les doses utilisées sont celles des DL₅₀ et DL₁₀₀ par voie intrapéritonéale (1,2 et 2,4 g/kg) et par voie orale (0,17 et 0,3 g/kg).

Tableau 42B : Lésions tissulaires provoquées par l'extrait brut de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. en fonction de la dose, de la voie d'administration et de la durée d'exposition au niveau du cœur et du rein.

COEUR					
Durée de l'exposition en heure	Lésions observées selon la voie d'administration				
	Voie orale		Voie intra-péritonéale		
24	1,2	- Discrète inflammation et œdème du péricarde (discrète péricardite)	0,17	- Présence de petits foyers inflammatoires d'œdème et de congestion vasculaire au niveau du péricarde et du myocarde	
48	1,2	- Présence d'œdème et de foyers inflammatoires au niveau du péricarde et du myocarde (péricardite et myocardite)	0,17	- Inflammation et œdème marqués au niveau du péricarde et du myocarde - Altération des cellules myocardiques par disparition des noyaux due à l'œdème	
7	2,4	- Discrète inflammation, congestion vasculaire et oedème au niveau du péricarde et du myocarde. (discrète péricardite et myocardite)	0,3	- Œdème et inflammation et vaisseaux légèrement congestifs au niveau du péricarde et du myocarde	
24	2,4	- Inflammation importante, congestion vasculaire et oedème au niveau du péricarde et du myocarde avec altération des cellules myocardiques. (péricardite et myocardite sévères)	0,3	- Œdème et inflammation, vaisseaux très congestifs au niveau du péricarde et du myocarde	
REIN					
Durée de l'exposition en heure	Lésions observées selon la voie d'administration				
	Voie orale		Voie intra-péritonéale		
24	1,2	- Inflammations intra-glomérulaires - Congestion des vaisseaux et inflammation du tissu interstitiel inter-tubulaire. (glomerulite et néphrite interstitielle)	0,17	- Inflammations intra-glomérulaires - Congestion des vaisseaux et inflammation du tissu interstitiel inter-tubulaire (glomerulite et néphrite interstitielle)	
48	1,2	- Augmentation de la taille des glomérules par l'œdème et infiltrat inflammatoire. - Congestion des vaisseaux et inflammation du tissu interstitiel inter-tubulaire (glomerulite et néphrite interstitielle)	0,17	- Inflammations intra-glomérulaires - Congestion des vaisseaux et inflammation du tissu interstitiel inter-tubulaire (glomerulite et néphrite interstitielle)	
7	2,4	- Inflammations intra-glomérulaires - Congestion vasculaire marquée, œdème et nappe hémorragique du tissu interstitiel inter-tubulaire (glomerulite et néphrite interstitielle hémorragique)	0,3	- Réduction taille des glomérules - Congestion des vaisseaux, inflammation importante, petits foyers hémorragiques et œdème au niveau du tissu interstitiel inter-tubulaire (glomérulopathie et néphrite interstitielle).	
	2,4	- Inflammations intra-glomérulaires - Congestion vasculaire marquée, œdème et nappe hémorragique du tissu interstitiel inter-tubulaire	0,3	- Réduction taille des glomérules - Congestion des vaisseaux, inflammation importante, petits foyers hémorragiques et œdème au niveau du tissu interstitiel inter-tubulaire (glomérulopathie et néphrite interstitielle).	

Les doses utilisées sont celles des DL₅₀ et DL₁₀₀ par voie intrapéritonéale (1,2 et 2,4 g/kg) et par voie orale (0,17 et 0,3 g/kg).

Tableau 42C : Lésions tissulaires provoquées par l'extrait brut de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. en fonction de la dose, de la voie d'administration et de la durée d'exposition au niveau de l'estomac et du foie.

ESTOMAC				
Durée de l'exposition en heure	Lésions observées selon la voie d'administration			
	Voie orale		Voie intra-péritonéale	
24	1,2	Elargissement de la séreuse par la présence de nappe hémorragique, de cellules inflammatoires et d'œdème Présence de nombreuses cellules inflammatoires sur les 3 autres tuniques gastriques (gastrite interstitielle)	0,17	Présence de cellules inflammatoires sur les 4 tuniques surtout au niveau de la musculuse (pangastrite)
48	1,2	Infiltrat inflammatoire au niveau des 4 tuniques gastriques. Œdème et congestion vasculaire au niveau de la séreuse. (gastrite interstitielle)	0,17	Présence de quelques foyers inflammatoires au niveau de la sous muqueuse Musculuse peu modifiée Congestion vasculaire, nappe hémorragique, et foyers inflammatoires de la séreuse (gastrite interstitielle)
7	2,4	Ulcération partielle de la muqueuse Inflammation importante au niveau des 4 tuniques gastriques Œdème au niveau de la muqueuse et de la sous- muqueuse (gastrite ulcéralive)	0,3	Inflammation modérée au niveau des 4 tuniques gastriques Présence de vaisseaux congestifs au niveau de la sous muqueuse et de la musculuse. (gastrite interstitielle)
24	2,4	Ulcération de la muqueuse par perte de substances de la couche des cryptes Inflammations au niveau de la muqueuse, de la sous muqueuse et de la musculuse (gastrite ulcéralive)	0,3	Inflammation modérée au niveau des 4 tuniques gastriques Œdème au niveau de la séreuse et de la musculuse entraînant leur épaissement (gastrite interstitielle)
FOIE				
Durée de l'exposition en heure	Lésions observées selon la voie d'administration			
	Voie orale		Voie intra-péritonéale	
24	1,2	Parenchyme hépatique atteint d'infiltrat inflammatoire, d'œdème, de congestion des capillaires sinusoides et de nappe hémorragique	0,17	Parenchyme hépatique atteint d'infiltrat inflammatoire, d'œdème, de congestion des capillaires sinusoides et de stéatose hépatique importante.
48	1,2	Parenchyme hépatique atteint d'infiltrat inflammatoire parfois péri-vasculaire, d'œdème, de congestion des capillaires sinusoides et de la veine centrolobulaire avec présence d'une discrète stéatose hépatique	0,17	Parenchyme hépatique atteint d'infiltrat inflammatoire, d'œdème, de congestion des capillaires sinusoides et de stéatose hépatique importante avec une destruction focalisée des hépatocytes
7	2,4	Parenchyme hépatique atteint d'infiltrat inflammatoire, d'œdème, de congestion des capillaires sinusoides avec présence et de nappe hémorragique d'une stéatose hépatique modérée.	0,3	Parenchyme hépatique atteint d'infiltrat inflammatoire, d'œdème, de congestion des capillaires sinusoides et de la veine centrolobulaire avec présence de nappe hémorragique
24	2,4	Parenchyme hépatique atteint d'infiltrat inflammatoire, d'œdème, de congestion des capillaires sinusoides avec présence et de nappe hémorragique, d'une stéatose hépatique modérée Présence de foyers de destruction des hépatocytes par altération nucléaire et imbibition oedémateuse	0,3	Parenchyme hépatique atteint d'infiltrat inflammatoire très marqué, d'œdème, de congestion des capillaires sinusoides et de la veine centrolobulaire avec présence de nappe hémorragique et d'une destruction focalisée des hépatocytes

Les doses utilisées sont celles des DL₅₀ et DL₁₀₀ par voie intrapéritonéale (1,2 et 2,4 g/kg) et par voie orale (0,17 et 0,3 g/kg).

Tableau 42D : Lésions tissulaires provoquées par l'extrait brut de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. en fonction de la dose, de la voie d'administration et de la durée d'exposition au niveau de l'intestin.

INTESTIN			
Durée de l'exposition en heure	Lésions observées selon la voie d'administration		
	Voie orale		Voie intra-péritonéale
24	1,2	<ul style="list-style-type: none"> - Présence de cellules inflammatoires et de congestion vasculaire au niveau de la muqueuse - Présence de quelques cellules inflammatoires au niveau de la musculature. - Epaissement de la séreuse par des cellules inflammatoires et d'un œdème. (colite interstitielle) 	0,17 <ul style="list-style-type: none"> - Présence de cellules inflammatoires et de nappe hémorragique au niveau de la muqueuse - Epaissement de la sous muqueuse par des cellules inflammatoires et un œdème (colite interstitielle)
48	1,2	<ul style="list-style-type: none"> - Présence de cellules inflammatoires au niveau de la muqueuse, de la sous muqueuse et de la musculature avec œdème et congestion vasculaire importants (colite interstitielle) 	0,17 <ul style="list-style-type: none"> - Présence de cellules inflammatoires au niveau de la muqueuse, de la sous muqueuse et de la musculature - Abrasion partielle de la muqueuse. (colite ulcérate)
7	2,4	<ul style="list-style-type: none"> - Inflammation et congestion vasculaire au niveau de la muqueuse - Epaissement de la musculature par des cellules inflammatoires et un œdème. (colite interstitielle) 	0,3 <ul style="list-style-type: none"> - Présence de cellules inflammatoires et de petites congestions au niveau de la muqueuse - Présence de rares cellules inflammatoires au niveau de la musculature. (colite interstitielle)
24	2,4	<ul style="list-style-type: none"> - Présence de cellules inflammatoires et œdème de la muqueuse et de la musculature. - Abrasion de la muqueuse avec nappe hémorragique (colite ulcérate) 	0,3 <ul style="list-style-type: none"> - Infiltrat inflammatoire marqué de la muqueuse - Quelques cellules inflammatoires au niveau de la sous muqueuse - Epaissement de la musculature par la présence de cellules inflammatoires et d'œdème (colite interstitielle)

Les doses utilisées sont celles des DL₅₀ et DL₁₀₀ par voie intrapéritonéale (1,2 et 2,4 g/kg) et par voie orale (0,17 et 0,3 g/kg).

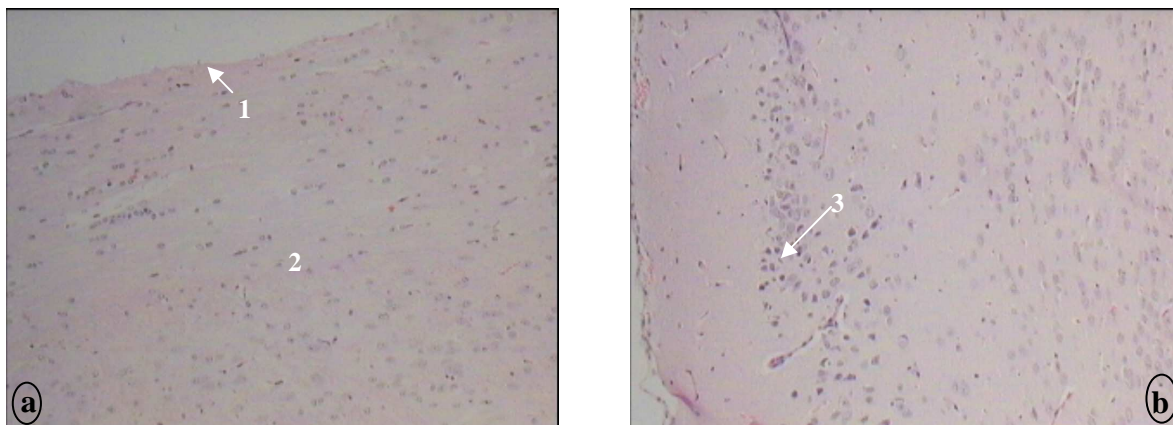


Figure 93 : Coupes histologiques de a) **cerveau** non traité b) **cerveau** traité par l'extrait à 2,4 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 24 h.
1 : méninge ; **2** : parenchyme cérébral ; **3** : infiltrat inflammatoire.

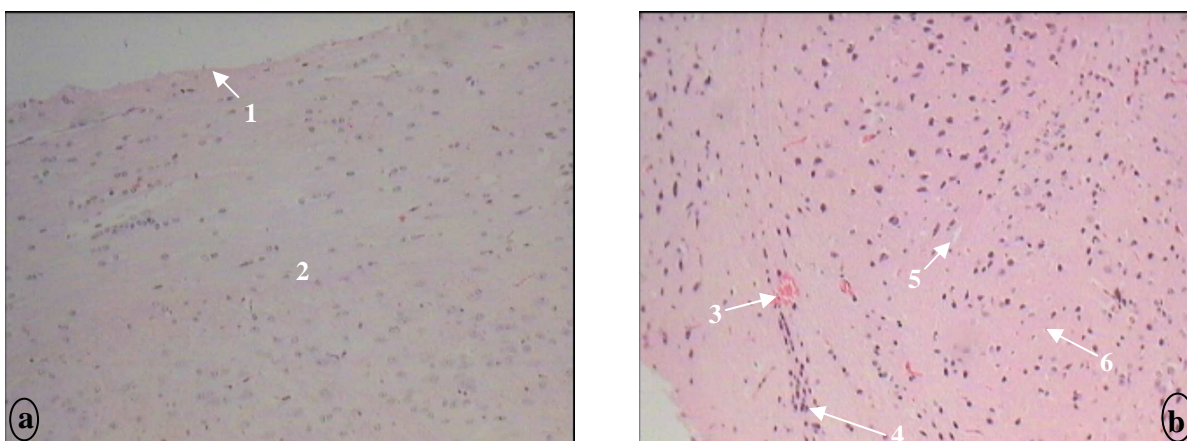


Figure 94 : Coupes histologiques de a) **cerveau** non traité b) **cerveau** traité par l'extrait à 300 mg/kg par voie intra-péritonéale après un temps d'exposition de 24 h.
1 : méninge ; **2** : parenchyme cérébral ; **3** : vaisseau congestif ; **4** : infiltrat inflammatoire ; **5** : œdème ; **6** : infarctus hémorragique.

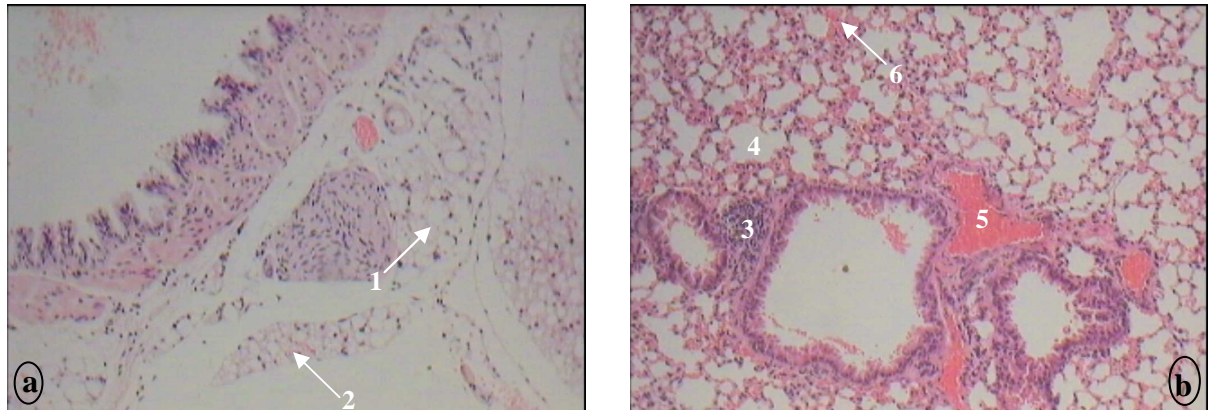


Figure 95 : Coupes histologiques de a) **poumon** non traité b) **poumon** traité par l'extrait à 2,4g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 7 h.
1 : alvéole ; **2** : capillaires interalvéolaires ; **3** : infiltrat inflammatoire ; **4** : alvéoles éclatées ;
5 : nappe hémorragique ; **6** : vaisseau congestif inter-alvéolaire.

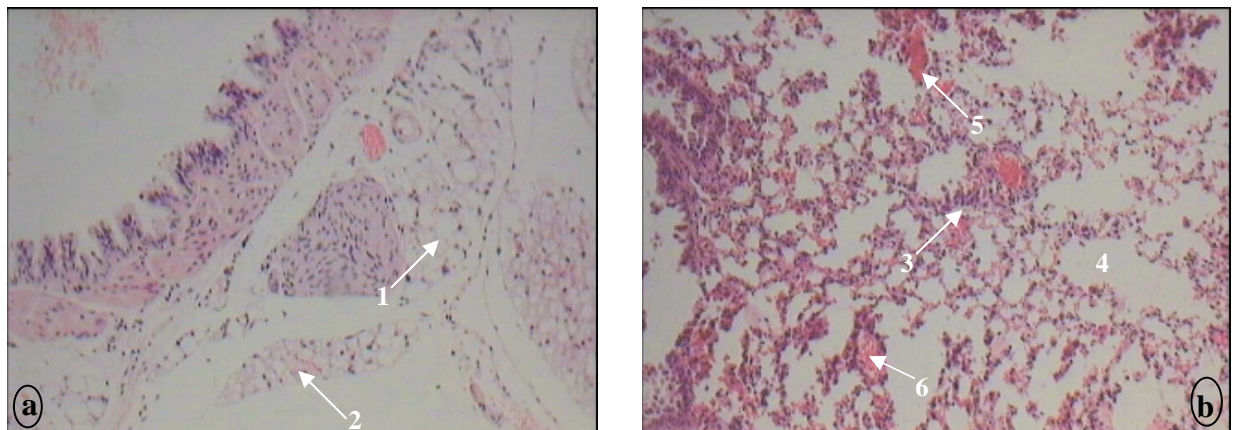


Figure 96 : Coupes histologiques de a) **poumon** non traité b) **poumon** traité par l'extrait à 2,4g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 7 h.
1 : alvéole ; **2** : capillaires interalvéolaires ; **3** : infiltrat inflammatoire ; **4** : alvéoles éclatées ;
5 : nappe hémorragique ; **6** : vaisseau congestif inter-alvéolaire.

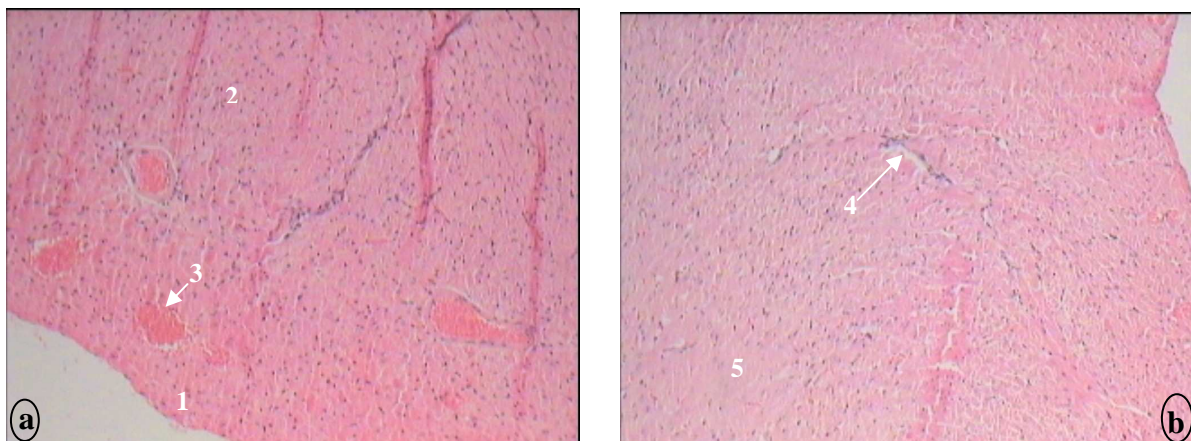


Figure 97 : Coupes histologiques de a) **coeur** non traité b) **coeur** traité par l'extrait à 1,2 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 48 h.
1 : péricarde ; **2** : myocarde ; **3** : vaisseau sanguin ; **4** : œdème ;
5 : cellules myocardiques altérées.

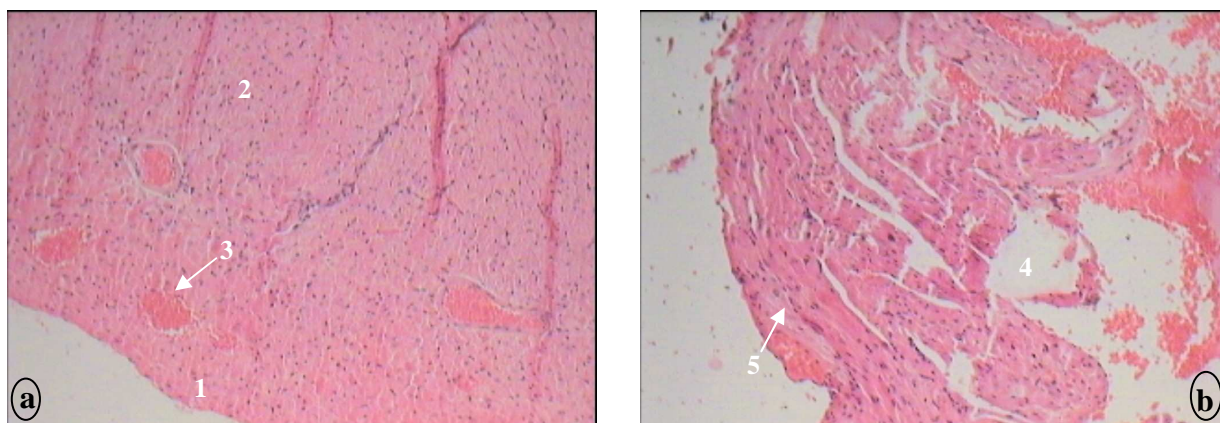


Figure 98 : Coupes histologiques de a) **coeur** non traité b) **coeur** traité par l'extrait à 300 mg/kg par voie intra-péritonéale après un temps d'exposition de 24 h.
1 : péricarde ; **2** : myocarde ; **3** : vaisseau sanguin ; **4** : œdème ;
5 : cellules myocardiques altérées.

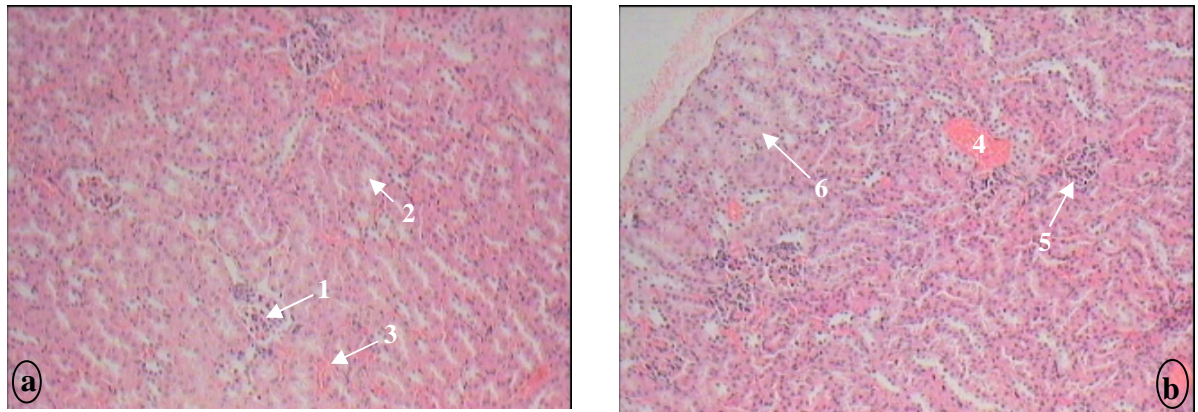


Figure 99 : Coupes histologiques de a) **rein** non traité b) **rein** traité par l'extrait à 2,4 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 7 h.
1 : glomérule ; **2** : tubule ; **3** : vaisseau sanguin intertubulaire ; **4** : nappe hémorragique ; **5** : cellules inflammatoires ; **6** : oedème.

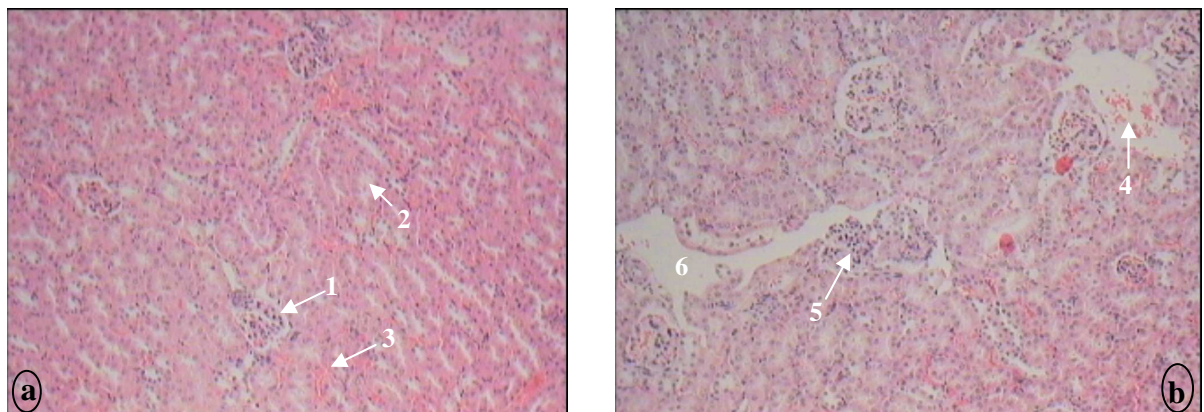


Figure 100 : Coupes histologiques de a) **rein** non traité b) **rein** traité par l'extrait à 2,4 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 7 h.
1 : glomérule ; **2** : tubule ; **3** : vaisseau sanguin intertubulaire ; **4** : nappe hémorragique ; **5** : cellules inflammatoires ; **6** : oedème.

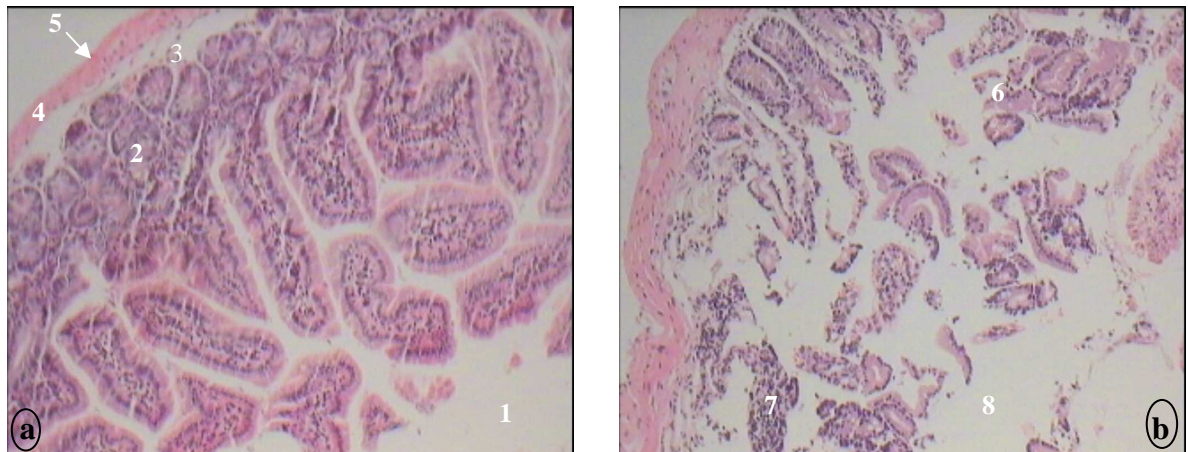


Figure 101 : Coupes histologiques de a) **estomac** non traité b) **estomac** traité par l'extrait à 2,4 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 7 h.
1 : cavité gastrique ; **2** : muqueuse ; **3** : sous muqueuse ; **4** : musculature ; **5** : séreuse ;
6 : muqueuse ulcérée ; **7** : cellules inflammatoires ; **8** : œdème.

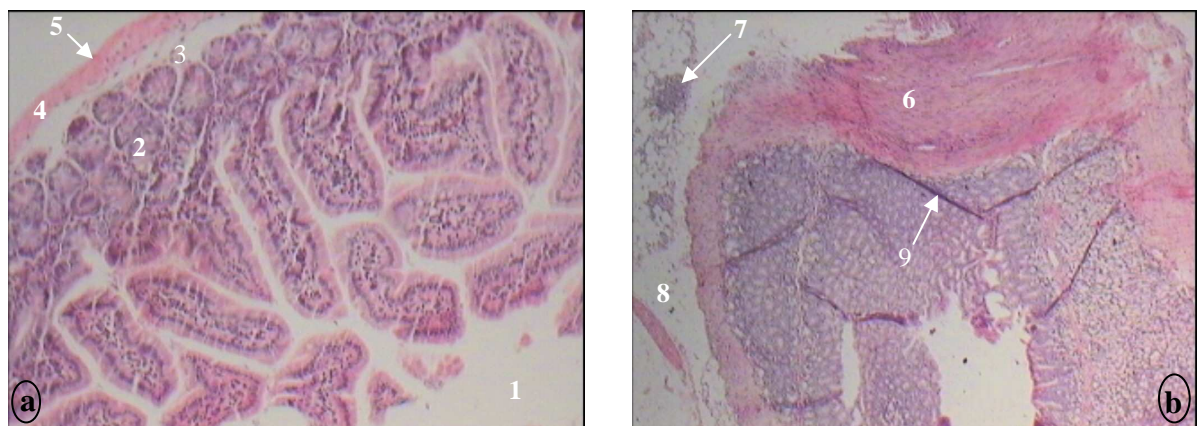


Figure 102 : Coupes histologiques de a) **estomac** non traité b) **estomac** traité par l'extrait à 300mg/kg par voie intrapéritonéale après un temps d'exposition de 24 h.
1 : cavité gastrique ; **2** : muqueuse ; **3** : sous muqueuse ; **4** : musculature ; **5** : séreuse ;
6 : musculature épaissie ; **7** : cellules inflammatoires ; **8** : œdème ; **9** : artefact.

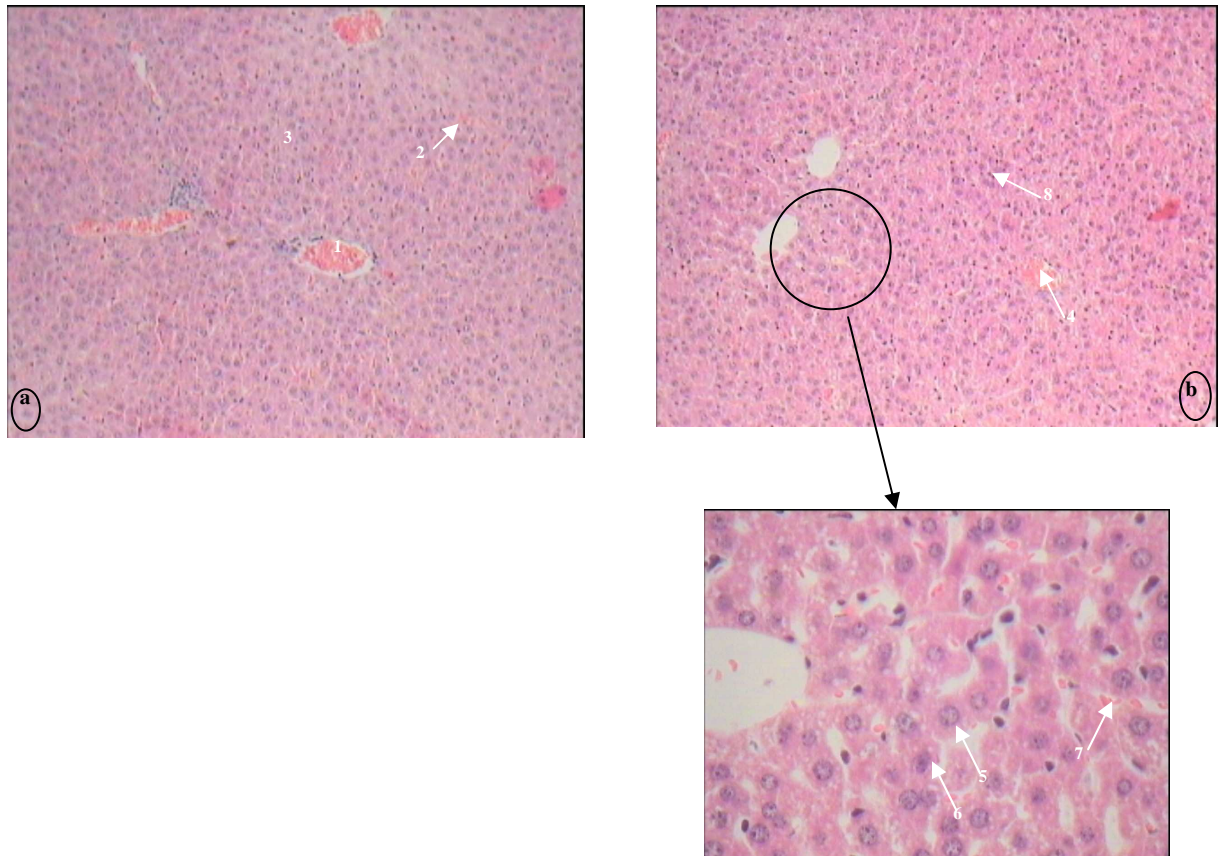


Figure 103 : Coupes histologiques de a) **foie** non traité b) **foie** traité par l'extrait à 2,4 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 24 h.
1 : veine centrolobulaire ; **2** : capillaire sinusoidé ; **3** : parenchyme hépatique ;
4 : nappe hémorragique ; **5** : hépatocyte normal ; **6** : hépatocyte altéré avec son noyau pycnotique ; **7** : capillaire sinusoidé dilaté ; **8** : cellules inflammatoires.

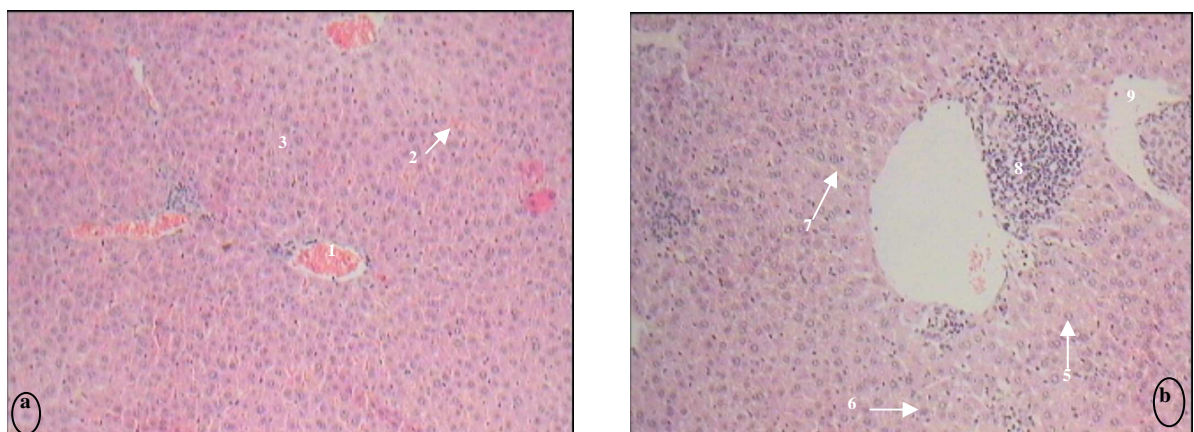


Figure 104 : Coupes histologiques de a) **foie** non traité b) **foie** traité par l'extrait à 300 mg/kg par voie intrapéritonéale après un temps d'exposition de 24 h
1 : veine centrolobulaire ; **2** : capillaire sinusoidé ; **3** : parenchyme hépatique ;
4 : infiltrat inflammatoire ; **5** : hépatocyte normal ; **6** : hépatocyte altéré avec son noyau pycnotique ; **7** : capillaire sinusoidé dilaté ; **8** : cellules inflammatoires ; **9** : œdème.

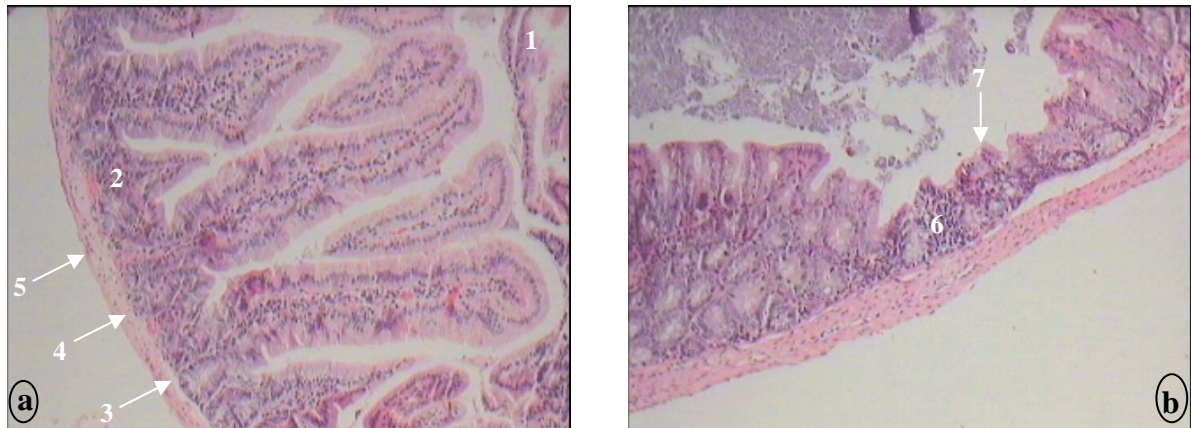


Figure 105 : Coupes histologiques de a) **intestin** non traité b) **intestin** traité par l'extrait à 2,4 g/kg par voie orale après un temps d'exposition de 24 h.
1 : cavité intestinale ; **2** : muqueuse ; **3** : sous muqueuse ; **4** : musculature ; **5** : séreuse ;
6 : infiltrat inflammatoire ; **7** : muqueuse ulcérée.

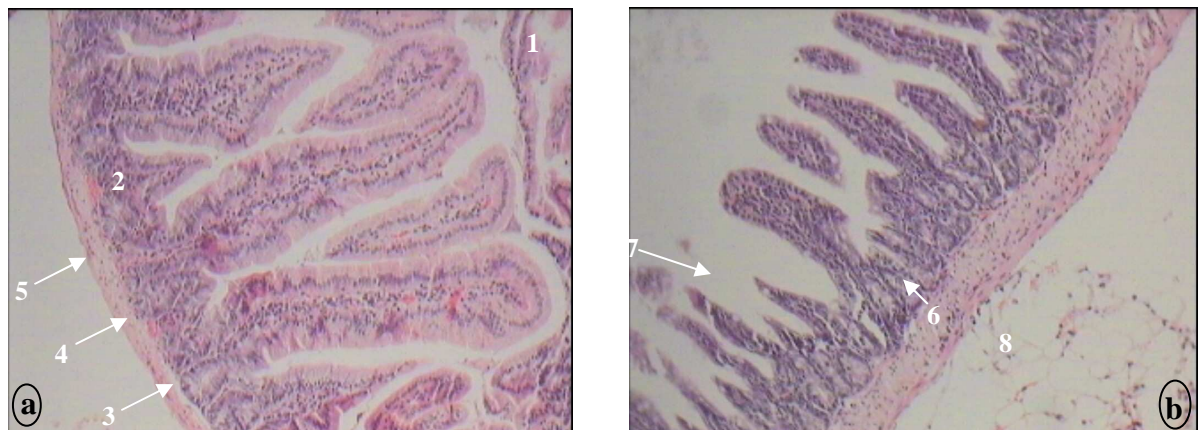


Figure 106 : Coupes histologiques de a) **intestin** non traité b) **intestin** traité par l'extrait à 300 mg/kg par voie intra-péritonéale après un temps d'exposition de 24 h.
1 : cavité intestinale ; **2** : muqueuse ; **3** : sous muqueuse ; **4** : musculature ; **5** : séreuse ;
6 : infiltrat inflammatoire ; **7** : muqueuse ulcérée ; **8** : œdème.

6.1.3. EVALUATION DE LA TOXICITE

Le nombre de décès et de survie ainsi que leurs totaux cumulatifs ou somme de nombre d'animaux décédés et somme d'animaux survivants cumulés, selon le cas, pour les différentes doses constituent les données pour l'évaluation des DL₅₀.

6.1.3.1. Détermination de la DL₅₀ orale

Les données expérimentales sont données dans le tableau 43 ci-après.

Tableau 43 : Calcul des totaux cumulatifs dans la détermination de la DL₅₀ (24 h) de l'extrait aqueux de *Rhodocodon madagascariensis* Baker, par voie orale, selon la méthode de Reed et Muench (1938).

Dose (g/kg de souris)	Nombre de souris testées	Nombre de souris		Totaux cumulatifs	
		survivantes	mortes	survivantes	mortes
0,97	5	5	0	11	0
1,22	5	3	2	6	2
1,53	5	2	3	3	5
1,92	5	1	4	1	9
2,40	5	0	5	0	14

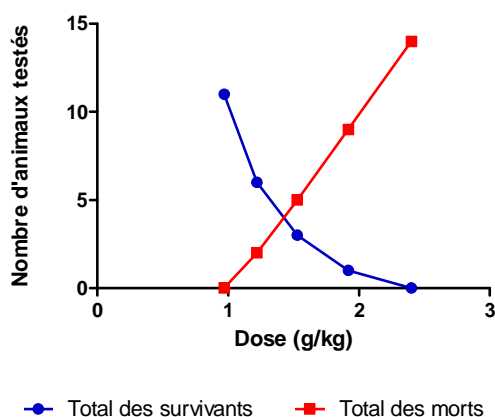


Figure 107 : Courbes des totaux cumulatifs permettant la détermination de la DL₅₀ (24 h) orale par la méthode de Reed et Muench (1938).

Les valeurs de la DL₅₀ (24 h) orale de l'extrait brut aqueux de *Rhodocodon madagascariensis* Baker, obtenues par la méthode de calcul et la méthode graphique, sont respectivement de **1,09 g/kg** et **1,43 g/kg** (figure 107).

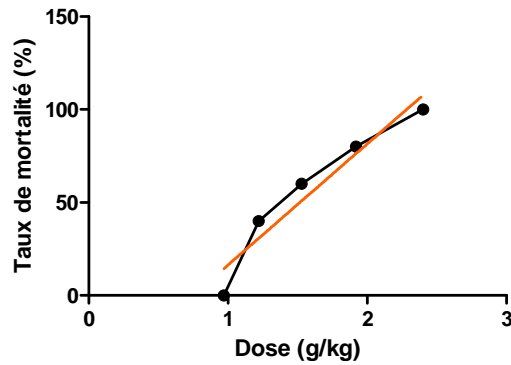


Figure 108 : Courbe effet-dose de l'extrait aqueux de *Rhodocodon madagascariensis* Baker par administration par voie orale et sa droite de régression linéaire.

Expérimentalement, en utilisant la droite de régression linéaire de la courbe montrant l'évolution des effets en fonction des doses administrées, la valeur de la DL₅₀ (24 h) orale est estimée à **1,52 g/kg** de souris (*figure 108*).

6.1.3.2. Détermination de la DL₅₀ intra péritonéale

Le tableau ci-après présente les données expérimentales.

Tableau 44 : Calcul des totaux cumulatifs dans la détermination de la DL₅₀ (24 h) de l'extrait aqueux de *Rhodocodon madagascariensis* Baker, par voie intra péritonéale, selon la méthode de Reed et Muench (1938).

Dose (mg/kg de souris)	Nombre de souris testées	Nombre de souris		Totaux cumulatifs	
		survivantes	mortes	survivantes	mortes
123	5	5	0	11	0
154	5	3	2	6	2
192	5	2	3	3	5
240	5	1	4	1	9
300	5	0	5	0	14

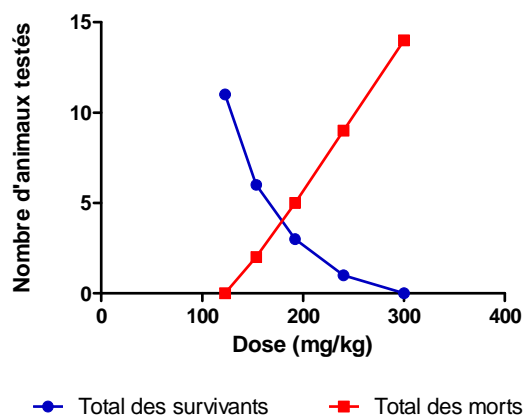


Figure 109 : Courbes des totaux cumulatifs permettant la détermination de la DL₅₀ (24 h) intra péritonéale par la méthode de Reed et Muench (1938).

Les valeurs de la DL₅₀ (24 h) intra péritonéale de l'extrait brut aqueux de *Rhodocodon madagascariensis* Baker, obtenues par la méthode de calcul et la méthode graphique sont respectivement de **170,6 mg/kg** et **179 mg/kg** (*figure 109*).

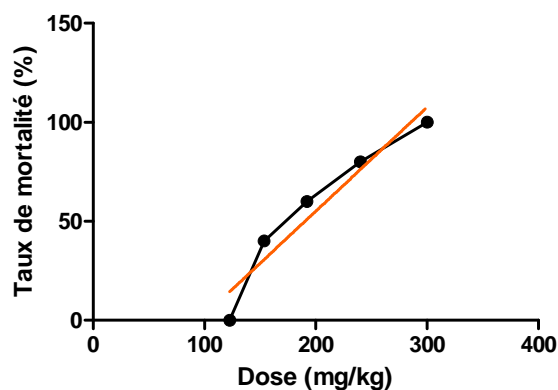


Figure 110 : Courbe effet-dose de l'extrait brut de *Rhodocodon madagascariensis* Baker par voie intra péritonéale et sa droite de régression linéaire.

Expérimentalement, en utilisant la droite de régression linéaire, la valeur de la DL₅₀ (24 h) est estimée à **183 mg/kg** de souris (*figure 110*).

6.2. EFFETS DE L'EXTRAIT SUR D'AUTRES ESPECES A SANG CHAUD

La sensibilité d'autres espèces animales à sang chaud est comparée à celle de la souris. Les doses correspondant aux DL₁₀₀ orale et intrapéritonéale ont été utilisées. Les résultats sont présentés dans le *tableau 45*.

Tableau 45 : Effets de l'extrait brut de *Rhodocodon madagascariensis* Baker sur différentes espèces animales à sang chaud.

Dose / voie d'administration	Souris	Rat	Cobaye	Poussin
2,4 g/kg* Voie orale	6 H	10 H	3 H	24H
0,3 g/kg** Voie intra péritonéale	20 min	6 H	10 min	20 min

* : Cette dose correspond à la valeur de la DL₁₀₀ par voie orale chez la souris.

** : Cette dose correspond à la valeur de la DL₁₀₀ par voie intrapéritonéale chez la souris.

Les chiffres indiquent le temps de survie après administration de l'extrait.

Les espèces testées sont toutes sensibles à l'extrait aux doses utilisées. Les effets sont similaires chez toutes les espèces. Par conséquent, les doses provoquant la mort de 100% des animaux chez la souris sont aussi létales pour les autres espèces. Avec le deux voies

d'administration le cobaye s'avère être le plus sensible. Le rat et le poussin sont les moins sensibles respectivement par voie intra péritonéale et par voie orale.

6.3. ACTIVITE ICHTYOTOXIQUE

6.3.1. EFFETS DE L'EXTRAIT AQUEUX DE *Rhodocodon madagascariensis* Baker SUR LES EMBRYONS DE MEDAKA, *Oryzias latipes*

Le poisson médaka est couramment utilisé dans les domaines de la toxicologie et de l'écotoxicologie car il présente plusieurs avantages pratiques (Cf. « Etude expérimentale », § 3.2. p. 189)

6.3.1.1. Effets sur des embryons de 6 jours

Pour ce premier test, il a été observé que la mort embryonnaire a lieu à la concentration de 2 mg/mL (*tableau 46*). Pour les concentrations 1 et 0,5 mg/mL de l'extrait aqueux de *R. madagascariensis* Baker, il n'y a pas eu d'éclosion. Tandis que pour la concentration de 0,25 mg/mL, un retard d'éclosion par rapport au témoin est observé. Avec la concentration de 0,125 mg/mL, la vitesse d'éclosion est identique à celle du lot témoin (*tableau 47*).

Tableau 46 : Données expérimentales sur la toxicité de l'extrait aqueux de *R. madagascariensis* Baker, sur des embryons de médaka de 6 jours (nombre d'embryons tués sur nombre d'embryons testés)

Jour	Témoins	2 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,25 mg/mL	0,125 mg/mL
1	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 5/5 B : 3/5 C : 3/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5
2	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 5/5 B : 5/5 C : 5/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5
3	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 5/5 B : 5/5 C : 5/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5
Cumul	0/15	15/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Mortalité	0	100%	0%	0%	0%	0%
Survie	100%	0%	100%	100%	100%	100%

Tableau 47 : Données expérimentales de l'extrait aqueux de *Rhodocodon madagascariensis* Baker, sur l'éclosion des oeufs de médaka (nombre d'œufs éclos sur nombre d'œufs testés)

Jour	Témoins	2 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,25 mg/mL	0,125 mg/mL
1	A : 1/5 B : 0/5 C : 3/5	A : M B : M C : M	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5
2	A : 1/5 B : 0/5 C : 3/5	A : M B : M C : M	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 1/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 2/5 B : 1/5 C : 1/5
3	A : 2/5 B : 2/5 C : 3/5	A : M B : M C : M	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 0/5 B : 0/5 C : 0/5	A : 2/5 B : 0/5 C : 2/5	A : 2/5 B : 2/5 C : 3/5
Cumul	7/15	M	0/15	0/15	4/15	7/15

M : mort embryonnaire

A partir de cette première expérience, un retard de développement a été observé chez les embryons non éclos. Ce qui a dicté la deuxième expérience consistant à tester l'extrait sur des embryons de 1 jour.

6.3.1.2. Effets sur des embryons de 1 jour : stade embryonnaire 17

Cette expérience avec des œufs fécondés d'un jour permet de mieux suivre le développement embryonnaire avec les différents stades de développement. Les effets de six concentrations ont été ainsi évalués.

Lors de ce test, un important retard de développement est observé chez les embryons placés dans les milieux à fortes concentrations en extrait de *Rhodocodon madagascariensis* Baker. Cette observation est faite en comparaison avec le développement normal décrit par Yamamoto (1975) et Iwamatsu (2004) et les pourcentages d'inhibition du développement embryonnaire sont évalués par rapport au développement embryonnaire des témoins qui suit un développement normal et qui est supposé avoir un développement équivalent à 100%. Un effet-dose est ainsi observé : pour les milieux avec de concentrations de 4 et 3 mg/mL, le développement embryonnaire est inhibé de 40-30%. Pour les milieux à 2 et 1 mg/mL, le taux de développement est aux environs de 80% par rapport à la normale. Les plus faibles concentrations (0,5 et 0,25 mg/mL) s'avèrent sans effet avec un développement quasi-normal $\geq 90\%$).

Tableau 48 : Les différents stades de développement embryonnaire en fonction des concentrations des milieux en extrait aqueux de *Rhodocodon madagascariensis* Baker.

Jour	Témoin	4 mg/mL	3 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,25 mg/mL
0	17	17	17	17	17	17	17
1	30	18	19	23	27	28	28
2	34	20	21	24	29	32	32
3	36	23	25	27	30	35	35
4	37	23	26	28	32	36	36

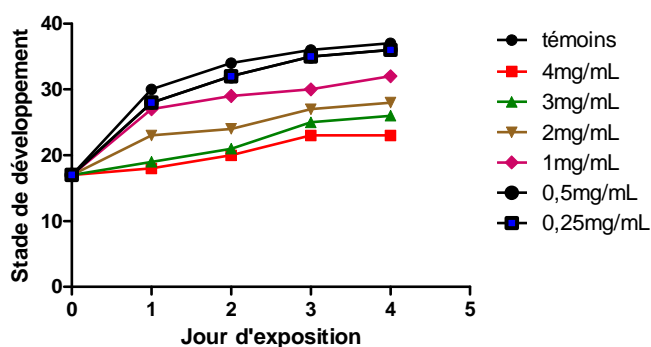


Figure 111 : Evolution des stades de développement embryonnaire en présence de différentes concentrations d'extrait de *Rhodocodon madagascariensis* Baker.

Pour illustrer ce retard de développement embryonnaire, au bout de 6 jours d'expérimentation, un embryon traité dans un milieu à 1 mg/mL se trouve encore au stade 23 de son développement (correspondant à un embryon normal de 1 jour et 17 h) alors qu'un embryon non traité est au stade 36 de son développement (embryon normal de 6 jours) (*figure112*).

D'après les observations ainsi que les données documentaires [Iwamatsu, 2004], pour l'embryon au stade 23, la partie antérieure du tube cardiaque s'étend au-dessous de l'extrémité postérieure de la vésicule oculaire et les vaisseaux sanguins ainsi que les veines vitéllocaudales commencent à se former. Par contre, celui au stade de développement embryonnaire 36 est marqué par le développement cardiaque. L'extrémité de la queue atteint la vésicule otique et l'étendue de la courbure de la région atrio-ventriculaire du cœur augmente de façon à ce que l'oreillette et le ventricule soient contigus l'un à l'autre.

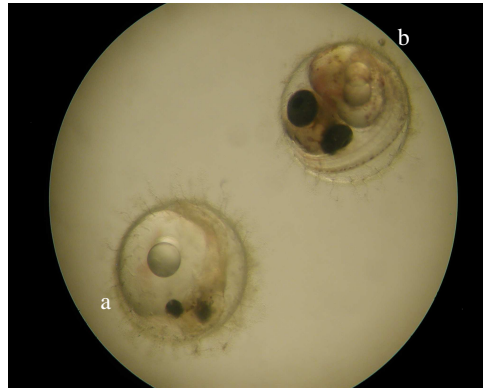


Figure 112 : Comparaison de deux embryons de 6 jours : a) embryon traité par l'extrait aqueux de *Rhodocodon madagascariensis* se trouvant au stade 23 de son développement, b) embryon témoin se trouvant au stade 36.

6.3.2 EFFETS DE L'EXTRAIT AQUEUX DE *Rhodocodon madagascariensis* Baker SUR LES LARVES DE MEDAKA, *Oryzias latipes*

6.3.2.1. Effets sur les larves

Pour cette expérience, les effets de l'extrait aqueux de *R. madagascariensis* Baker sont analysés sur des larves de médaka juste après leurs éclosions (10 jours après fécondation). Les données expérimentales sont consignées dans les tableaux 49 et 50 et les courbes montrant les effets-doses sur les figures 113 et 114. Un effet dose de toxicité est observé en fonction des concentrations du milieu. Ainsi, pour une concentration inférieure ou égale à 0,25 mg/mL, aucun effet toxique n'a été détecté. Le taux de survie des larves testées est de 100%. Pour les larves placées dans des milieux dont les concentrations sont comprises entre 0,5 et 4 mg/mL, les taux de survie des larves sont réduits de 50 à 100%. La valeur de la $CL_{50} = 0,25$ mg/mL est ainsi déterminée.

Tableau 49 : Données expérimentales sur les effets de l'extrait aqueux de *Rhodocodon madagascariensis* sur l'éclosion des larves (nombre d'individus vivants sur nombre d'individus testés).

Jour	Témoin	4 mg/mL	3 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,25 mg/mL	0,125 mg/mL	0,0625 mg/mL
1	A : 10/10 B : 10/10 C : 10/10	A : 0/10 B : 0/10 C : 0/10	A : 0/10 B : 0/10 C : 0/10	A : 0/10 B : 0/10 C : 0/10	A : 10/10 B : 8/10 C : 10/10	A : 10/10 B : 10/10 C : 10/10	A : 10/10 B : 10/10 C : 10/10	A : 10/10 B : 10/10 C : 10/10	A : 10/10 B : 10/10 C : 10/10
2	A : 10/10 B : 10/10 C : 10/10	A : 0/10 B : 0/10 C : 0/10	A : 0/10 B : 0/10 C : 0/10	A : 0/10 B : 0/10 C : 0/10	A : 6/10 B : 6/10 C : 8/10	A : 10/10 B : 4/10 C : 10/10	A : 10/10 B : 10/10 C : 10/10	A : 10/10 B : 10/10 C : 10/10	A : 10/10 B : 10/10 C : 10/10
3	A : 10/10 B : 10/10 C : 10/10	A : 0/10 B : 0/10 C : 0/10	A : 0/10 B : 0/10 C : 0/10	A : 0/10 B : 0/10 C : 0/10	A : 0/10 B : 0/10 C : 0/10	A : 0/10 B : 0/10 C : 0/10	A : 10/10 B : 10/10 C : 10/10	A : 10/10 B : 10/10 C : 10/10	A : 8/10 B : 10/10 C : 10/10
4	A : 10/10 B : 10/10 C : 10/10	A : 0/10 B : 0/10 C : 0/10	A : 0/10 B : 0/10 C : 0/10	A : 0/10 B : 0/10 C : 0/10	A : 0/10 B : 0/10 C : 0/10	A : 0/10 B : 0/10 C : 0/10	A : 6/10 B : 4/10 C : 6/10	A : 8/10 B : 10/10 C : 8/10	A : 8/10 B : 10/10 C : 10/10

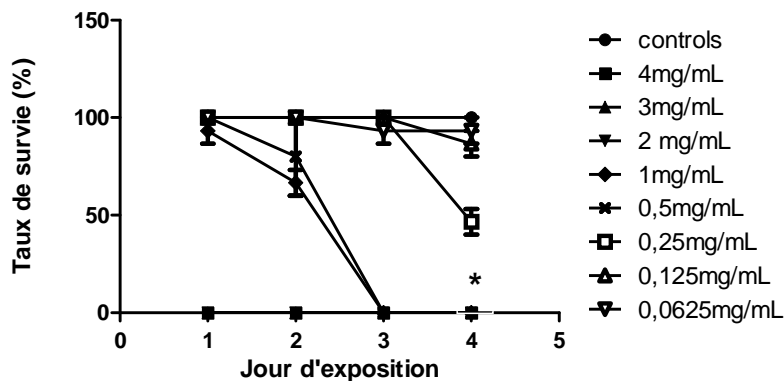


Figure 113 : Taux de survie de larves de medaka incubées dans des milieux contenant d'extrait de *Rhodocodon madagascariensis* Baker à de différentes concentrations (allant de 0,0625 à 4 mg/mL)

Tableau 50 : Données expérimentales sur les effets de l'extrait aqueux de *Rhodocodon madagascariensis* Baker sur les larves (nombre d'individus morts sur nombre d'individus testés).

Concentration	A	B	C
Témoin	0/10	0/10	0/10
4 mg/mL	10/10	10/10	10/10
3 mg/mL	10/10	10/10	10/10
2 mg/mL	10/10	10/10	10/10
1 mg/mL	10/10	10/10	10/10
0,5 mg/mL	10/10	10/10	10/10
0,25 mg/mL	4/10	6/10	6/10
0,125 mg/mL	2/10	0/10	2/10
0,0625 mg/mL	2/10	0/10	2/10

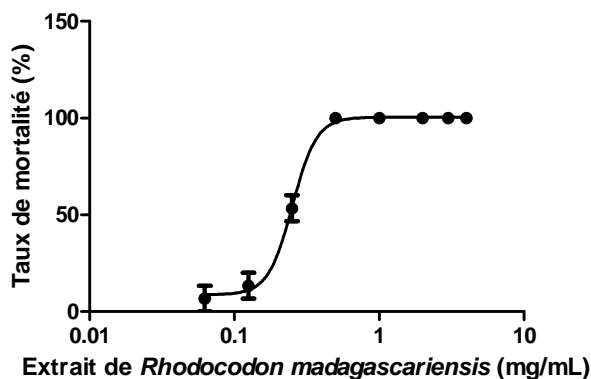


Figure 114 : Courbe montrant l'effet-dose et la mortalité de larves de medaka dus à l'extrait de *Rhodocodon madagascariensis* Baker.

6.3.2.2. Effets sur le développement embryon-larvaire

Lors de cette expérience, les effets de toxicité similaires à ceux avec les larves sont observés. Les embryons sont traités 24 h avant l'éclosion (stade 39 du développement embryonnaire). Les concentrations 4, 2 et 1 mg/mL sont létales pour ces embryons et la CL50 est évaluée à 1,07 mg/mL.

6.4. PREPARATION D'APPATS EMPOISONNES

Un des objectifs visés dans l'étude de *Rhodocodon madagascariensis* Baker consiste à valoriser l'utilisation empirique des bulbes de la plante comme raticide. Aussi, avons nous cherché à confectionner des appâts empoisonnés à partir des bulbes.

Nous avons introduit dans la provende (mélange alimentaire granulé) des souris élevées au laboratoire, différentes quantités de jus brut provenant de bulbe.

Les appâts sont préparés comme suit : les granulés de provende sont imbibés de jus de bulbe, puis séchés au soleil. Les granulés, préalablement pesés, sont donnés aux souris placées une par cage. Le reste de granulés non consommé est aussi pesé, ce qui permet de déduire la quantité de granulés absorbée par souris et partant l'équivalent en bulbes frais.

Pour avoir la correspondance entre le poids de la bulbe et le volume du jus brut exprimé, notons qu'un bulbe frais de 16 g produit environ 8 mL de jus brut. Ainsi, 1 mL de jus est approximativement l'équivalent de 2 g de bulbes frais.

Les conditions des expériences ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 51.

Tableau 51: Conditions expérimentales des essais sur la confection d'appâts empoisonnés pour la souris et résultats obtenus

Volume de jus brut ingéré (µL)	Equivalent de bulbe ingéré (mg)	Principaux symptômes
50	0,1	<ul style="list-style-type: none"> - Piloérection, démangeaison au niveau des museaux - Diminution de l'activité motrice - Enophtalmie - Spasmes au niveau des membres - Rétablissement au bout de 12 h.
200	0,4	<ul style="list-style-type: none"> - Piloérection et démangeaison au niveau des museaux, - Ataxie et paralysie des membres accompagnées d'une augmentation de la fréquence respiratoire - Mort de l'animal au bout de 12 h.
400	0,8	<ul style="list-style-type: none"> - Piloérection accompagnée de démangeaison au niveau des museaux, - Augmentation de la fréquence respiratoire, - Ataxie et spasmes au niveau des membres, - Paralysie générale de l'animal qui semble être toujours conscient - Immobilité permanente - Mort de l'animal au bout de 6 h.

Poids moyen des souris : 25 g ± 2 g

D'après ces résultats, environ 400 mg de bulbes frais suffisent à tuer une souris de 25 g au bout de 12 h et 800 mg au bout de 6 h. Avec un seul bulbe frais d'environ 16 g, avec la dose toxique de 400 mg/souris, il est donc tuer environ 40 souris.

6.5. ACTIVITES ANTIMICROBIENNES

Sur les six souches testées, aucune n'a été sensible à l'extrait aqueux de *Rhodocodon madagascariensis* Baker.

7 – RESUME - DISCUSSION - CONCLUSION

Les résultats des enquêtes ethnobotaniques ont révélé que *Rhodocodon madagascariensis* Baker est une plante dont les bulbes sont communément utilisés comme raticide dans la localité d'Amboasary. Toutefois, on ne lui connaît pas d'autres utilisations empiriques. Cela est certainement lié à la peur justifiée de la toxicité de la plante.

Trois composés ont été isolés des bulbes de *Rhodocodon madagascariensis* Baker. Il s'agit de la scillirosidine, du scilliroside et hellébrigénine. Ces trois produits appartenant à la classe des bufadiénolides ont déjà été isolés d'autres espèces d'Hyacinthaceae. Ainsi :

- la scillirosidine, a été décrite auparavant chez *Scilla maritima* [Wartburg et Renz 1959] et *Urginea sanguinea* [Krenn et al. 1993].
- le scilliroside ou 3-*O*- β -glucoside de la scillirosidine, a été isolé d'*Urginea maritima* [Verbiscar et al. 1986 ; Kopp et al. 1996] et d'*U. pancracion* [Kopp et al. 1990]
- l'hellébrigénine, a été mise en évidence chez la plante *Helleborus niger* puis aussi chez le crapaud *Rhinella jimi*.

Il est à noter que ces produits ont été obtenus à partir de l'une seulement des 8 fractions butanoliques. Par ailleurs, les composés quantitativement minoritaires dans cette fraction n'ont pu être isolés à ce jour. Toutefois, ces produits purs ont été obtenus en trop faibles quantités pour leurs évaluations biologiques d'où l'utilisation de l'extrait aqueux pour les différents tests.

L'extrait aqueux de *Rhodocodon madagascariensis* Baker est toxique pour la souris. Par voie orale, la DL₅₀ 24 h est de l'ordre de 1,4 g/kg et par voie intra péritonéale de 0,17 g/kg. Ces valeurs classent l'extrait parmi les produits dangereux (WHO, 1996). Les doses létales d'extrait pour la souris le sont également pour d'autres espèces animales à sang chaud dont le rat, le cobaye et le poussin. Cependant, la mort survient beaucoup plus tôt chez le cobaye par les deux voies d'administration, tandis que chez le rat et le poussin elle est plus tardive respectivement par voie intrapéritonéale et par voie orale.

Les symptômes qui se développent chez la souris après administration de l'extrait à des doses létales et sub-létales par voies orale et intra péritonéale sont similaires. Certaines caractéristiques dont notamment l'ataxie, la paralysie des membres et les convulsions

cloniques suggèrent une atteinte du système nerveux central. Etant donné que les principes toxiques isolés sont connus pour leurs effets cardiotoniques, les effets neurotoxiques pourraient être les conséquences d'une action primaire au niveau du cœur ou dus à des principes neurotoxiques présents dans l'extrait, mais que nous n'avons pas encore isolés. Il se pourrait que les bufadiénolides agissent également directement sur le système nerveux, auquel cas, il s'agirait d'une propriété non encore décrite.

Les lésions plus ou moins graves observées au niveau de tous les organes examinés rendent compte de la forte toxicité de l'extrait brut et de la rapidité de la mort des animaux. La péricardite et myocardite sévères ainsi que l'œdème au niveau du cœur confirment les effets toxicardiaques connus des bufadiénolides. La méningite, et le ramollissement cérébral caractérisé par la présence d'œdème et d'infarctissement hémorragique expliquent les effets neurotoxiques de l'extrait. L'isolement et l'étude des propriétés des autres composés dans les autres fractions non encore étudiées permettront de déterminer le ou les rôle(s) de chaque principe actif.

Les essais de confection d'appâts empoisonnés sont prometteurs. Avec un seul bulbe frais on peut préparer des appâts pour environ une quarantaine de souris. Des appâts à base d'ingrédients plus accessibles par les paysans comme les restes de nourritures ou des sous-produits (déchets et autres) seraient plus appropriés.

L'extrait est également toxique sur les animaux à sang froid tels les poissons. La CL₅₀ sur *Oryzias latipes* est de 0,8 mg/ml. Il provoque chez ce poisson un retard de développement embryonnaire et une atteinte cérébrale des larves.

L'extrait brut s'est révélé non toxique sur les bactéries testées. Des tests sur d'autres souches permettront de vérifier la présence ou l'absence de propriétés antimicrobiennes.

En conclusion,

- Les résultats de nos travaux constituent les premières données sur les plans chimique et biologique, à la fois sur *Rhodocodon madagascariensis* Baker et sur le genre *Rhodocodon* en général.
- L'utilisation des bulbes de *Rhodocodon madagascariensis* Baker comme raticide est vérifiée. Cependant, étant donné la forte toxicité sur d'autres espèces animales, des précautions doivent être prises lors de leur utilisation.

- La présence de bufadiénolides est en faveur de la classification du genre *Rhodocodon* dans la famille des Hyacinthaceae qui fait toujours débat parmi les systématiciens.

Dans le futur nous envisageons d'entreprendre,

- L'extension des enquêtes ethnobotaniques à d'autres régions des Hauts Plateaux Madagascar où pousse *Rhodocodon madagascariensis* Baker et où vivent d'autres ethnies dans le but de rechercher si la plante fait l'objet d'utilisations empiriques similaires à celles décrites pour des Hyacinthaceae étrangères,
- l'achèvement des travaux sur les autres fractions et l'étude des propriétés biologiques des composés isolés,
- la poursuite des travaux sur les micro-organismes en utilisant d'autres germes tests,
- La continuation des essais sur la préparation d'appâts empoisonnés avec des matières-premières plus disponibles,
- l'extension de travaux similaires aux autres espèces de *Rhodocodon*.

Troisième partie :

Partie expérimentale

1 – MATERIELS ET METHODES

1.1. CHIMIE EXTRACTIVE

CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

Il s'agit de chromatographies liquides, soit sur des colonnes ouvertes à pression atmosphérique, soit sur des colonnes à moyenne pression, soit encore sur des colonnes hautes performances.

1.1.1 Chromatographie sur colonne ouverte de gel de Sephadex ® LH-20

Il s'agit d'un gel réticulé de dextran permettant une séparation des constituants d'un mélange par tailles moléculaires décroissantes. Le solvant utilisé a été le méthanol.

1.1.2. Chromatographie sur colonne ouverte de résine d'Amberlite XAD₄

C'est une résine qui se présente sous forme de billes de polymères synthétiques poreuses non polaires. L'adsorption fait intervenir des interactions hydrophobes. La séparation des molécules se fait selon l'hydrophobie : les molécules hydrophiles, non adsorbées par la résine, sont éluées par un premier lavage à l'eau distillée. Les molécules hydrophobes sont ensuite éluées par un solvant d'élution moins polaire que l'eau (mélange eau/ alcool, puis alcool pur, méthanol ou éthanol).

1.1.3. Chromatographie sur colonne ouverte de silice en phase normale

La phase stationnaire utilisée est un gel de silice 60H Kieselgel Merck ® (40-63µm). Le poids de silice utilisée est selon les cas de 40 à 100 fois celui de l'échantillon à purifier.

1.1.4. Chromatographie liquide moyenne pression (MPLC)

L'appareillage comprend une pompe KNAUER®, un détecteur KNAUER UV detector k-2001®, un collecteur de fractions GILSON Microcol®, un enregistreur GILSON® (facultativement).

Des colonnes de gel de silice, pré-remplies AIT CHROMATO® ont été utilisées : FC-25 SI, 40-60 µm, de 25g, de 10 g, de 5g et de 2g.

Pour une extrapolation des conditions en HPLC à celles de la chromatographie à moyenne pression, la polarité de la phase mobile est augmentée de 10% par rapport au gradient utilisé en HPLC. Une colonne de phase inverse AIT CHROMATO® FC-3 C18, 40-60 µm de 3 g est utilisé en mode isocratique, avec comme éluant le système CH₃CN-H₂O/0,1% TFA (20 : 80), avec un débit de 1 ml/min et la détection est à $\lambda = 220\text{nm}$.

1.1.5. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

L'appareillage utilisé comprend :

- une pompe GILSON 321 Pump®
- un détecteur GILSON 170 Diode Array Detector® utilisant les canaux allant de $\lambda=190$ à 700 nm. La détection a été faite à $\lambda=220$ nm et à $\lambda=254$ nm.

En HPLC analytique, a été utilisée comme phase stationnaire, une colonne de silice en phase inverse KROMASIL® C18 (5µ), de dimension (250 x 4,6) mm, (référence NO031783) et en mode gradient. Le système de solvant était composé d'un gradient de CH₃CN (éluant A) et d'H₂O/0,1% TFA (éluant B) de 5/95 à 95/5. Le débit était de 0,8 ml/min et le volume d'échantillon injecté était de 20 µl.

1.1.6. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Des plaques de gel de silice, Kieselgel 60 F254 Merck®, sur support d'aluminium ont été utilisées pour les CCM analytiques. Différents systèmes d'éluants ont été utilisés selon les conditions de séparation. Un détecteur UV Bioblock Scientific® est utilisé pour la visualisation des taches.

Les révélateurs utilisés sont :

- l'anisaldéhyde / sulfurique modifié (anisaldéhyde 0,5 ml + EtOH 9 ml + H₂SO₄ 0,5 ml + AcOH 0,1ml) : c'est un révélateur général ;
- le réactif de Komarowsky (2% de solution de 4-hydroxybenzaldéhyde dans MeOH (5 : 1) et 50% de H₂SO₄ (10 : 1) ;

- solution éthanolique de chlorure ferrique 2% pour la détection des composés phénoliques ;
- vanilline sulfurique (vanilline 1 g + H₂SO₄ 2 ml + EtOH 100 ml) : réactif à spectre large permettant la détection des sucres, flavones, terpenoïdes, phénols.

Après pulvérisation, sauf pour la solution éthanolique de FeCl₃ 2%, la plaque a été chauffée à 100 °C pendant 5 min.

1.2. CHIMIE ANALYTIQUE ET STRUCTURALE

1.2.1. SPECTROMETRIE DE MASSE

La technique de la spectrométrie de masse consiste à ioniser un composé ou une molécule en général neutre, en phase vapeur, et à séparer des ions produits selon leur rapport m/z (m étant la masse et z la charge de l'ion produit). L'ionisation est réalisée par électronebulisation (Electrospray - ESI) conduisant à la formation d'ions non-fragmentés protonés du type $(M+nH)^{n+}$ en mode positif ou des ions déprotonés du type $(M-nH)^{n-}$ en mode négatif.

Dans le cas où l'appareil fonctionne en mode MS-MS, l'ion moléculaire obtenu subi une fragmentation (sélection de l'ion d'intérêt ou caractéristique par un filtre quadripolaire, Q ; sélection selon $m/z = f$ (UV) permettant d'obtenir des informations structurales sur la molécule.

L'analyseur à temps de vol (TOF) permet la séparation, uniquement en fonction de l'énergie cinétique acquise après l'accélération dans le champ électrique. La distance parcourue est fonction de m .

L'appareil utilisé est un spectromètre PE SCIEX API Q-STAR® *Pulsar i*.

Les données d'un spectre de masse permettent de calculer la masse moléculaire d'une molécule d'intérêt et d'en déduire, lorsque la masse moléculaire est mesurée avec suffisamment de précision, sa formule brute.

1.2.2. ACTIVITE OPTIQUE

Les pouvoirs rotatoires des composés **D11'** (8-épidiosbulbine E), **D5** (antadiosbulbine A) et **D6** (antadiosbulbine B) ont été mesurés sur un appareil PERKIN ELMER Polarimeter

341®, en utilisant une lampe à sodium ($\lambda = 589 \text{ nm}$). Les échantillons analysés ont été solubilisés dans du chloroforme à une concentration c d'environ 0,40 g/100ml.

1.2.3. SPECTROMETRIE de RMN

La résonance magnétique nucléaire ou RMN est fondée sur les propriétés magnétiques que possèdent certains noyaux (noyaux présentant un spin nucléaire). Dans des conditions appropriées, en présence d'un champ magnétique intense, ces noyaux entrent en résonance. La fréquence de résonance correspondante dépend de l'élément considéré, de son environnement électronique et du champ magnétique appliqué. Cette fréquence est traduite en termes de déplacement chimique δ (en ppm) par rapport à une référence qui est le tétraméthylsilane ($\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, TMS). Des informations sur les constantes de couplage sont également fournies.

Les déplacements chimiques des carbones δC (en ppm), sont mesurés par rapport à la raie centrale du solvant utilisé.

1.2.3.1. Spectres à une dimension (RMN 1D)

Ils ont été réalisés sur un appareil Bruker AC 300 MHz® opérant à 300 MHz pour les protons et à 75 MHz pour les carbones.

- Le spectre **RMN ^1H** donne des informations sur les déplacements chimiques du proton (δH) permettant ainsi de déterminer les régions du spectre caractéristiques de certains groupements chimiques (ou sites protoniques). L'intensité du signal ainsi que celle de la courbe d'intégration sont proportionnelles au nombre de protons représentés par le pic (ou le multiplet) donné.
- Le spectre **RMN ^{13}C *J*-modulé** permet d'observer directement les groupes fonctionnels contenant les carbones et d'en déduire leur nombre et leurs déplacements chimiques. Ce spectre permet également de distinguer les carbones secondaires et quaternaires des carbones primaires et tertiaires.

1.2.3.2. Spectres à deux dimensions (RMN 2D)

Les spectres RMN 2D ont été réalisés sur un appareil BRUCKER Avance 400 MHz® opérant à 400 MHz pour le proton.

- Le spectre **COSY** (**C**ORrelation **S**pectroscop**Y**) permet de mettre en évidence l'existence du couplage scalaire ($2J_{H-H}$ et $3J_{H-H}$ et parfois $4J_{H-H}$) présent entre deux noyaux grâce à la présence de taches de corrélation à l'intersection des déplacements chimiques de deux noyaux. Le spectre de RMN monodimensionnel apparaît sur la diagonale tandis que les corrélations entre les protons couplés apparaissent de part et d'autre de cette diagonale d'une manière symétrique. Cette expérience permet de déterminer des fragments de structure.
- Le spectre **HSQC** (**H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**orrelation) met en évidence les corrélations entre protons et carbones directement liés ($1J_{CH}$). Il permet donc de distinguer les carbones protonés des carbones quaternaires.
- Le spectre **HMBC** (**H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**oherence) : cette expérience détecte les corrélations entre protons et carbones à longue distance, c'est-à-dire à travers plusieurs liaisons (couplage $2J_{CH}$, $3J_{CH}$ parfois même $4J_{CH}$). Le spectre HMBC permet ainsi d'assembler les fragments de structure obtenus lors des expériences précédentes.
- Le spectre **NOESY** (**N**uclear **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscop**Y**) : ce spectre met en évidence les couplages dipolaires ($d \leq 4,5 \text{ \AA}$) (corrélations des protons proches dans l'espace). En effet, cette expérience fournit des informations stéréochimiques permettant ainsi de vérifier la structure et de déterminer la configuration relative de la molécule.

2 – EXTRACTION, FRACTIONNEMENT ET PURIFICATION

2.1. ETUDE DE *Dioscorea antaly* Jum. & Perr.

2.1.1. EXTRACTION

Une série d'extractions avec des solvants de polarités croissantes a été effectuée. Pour la première extraction, 546 g de poudre de tubercules séchés et broyés ont été macérés dans du cyclohexane sous agitation à température ambiante pendant une heure. Après évaporation du solvant sous pression réduite, un extrait cyclohexanique de 0,8 g a été ainsi obtenu, soit un rendement de 0,15 %.

Le marc est ensuite traité cinq fois avec du MeOH en utilisant à chaque fois 1 l de MeOH. 15,96 g d'extrait méthanolique ont été ainsi obtenus après évaporation du solvant sous pression réduite, soit un rendement de 2,92 %. Puis, 14,93 g de cet extrait ont été dissous dans 180 ml d'une solution aqueuse d'acide acétique à 2 % et ensuite extraits trois fois avec 180 ml d'AcOEt. Après ces traitements, les phases organiques (AcOEt) ont été rassemblées, évaporées à sec et 6,16 g d'extrait sec obtenus, soit un rendement de 1,13 %. La phase aqueuse a été ensuite alcalinisée avec de l'hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO₃) en poudre, puis traitée par du dichlorométhane pour donner 0,33 g d'extrait dichlorométhane.

2.1.2. FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT PAR L'AcOEt

5,72 g de l'extrait AcOEt ont été chromatographiés sur une colonne de 200 g de gel de silice avec comme système d'élution un gradient de cyclohexane/AcOEt/MeOH : 90/10/0 à 0 / 0 / 100). Le dépôt a été fait à sec. Des fractions de 100 ml ont été recueillies et rassemblées selon leurs profils en CCM. La chromatographie sur gel de silice a utilisé comme solvants de migration le gradient cyclohexane/AcOEt : 95/5 à 70 /30), puis CH₂Cl₂/MeOH : 95 /5 à 85 / 15) (*Tableau 52*).

Tableau 52 : Fractionnement de l'extrait par l'AcOEt des tubercules de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr.

Cyclohexane-AcOEt-MeOH	Tubes [Fractions]	Masse (en mg)	
90 : 10 : 0	4-9 [1-1]	127	F1
80 : 20 : 0	10-20 [1-4]	167	F2
70 : 30 : 0	21-29 [1-7]	245	F3
60 : 40 : 0	30-40 [1-11]	290	F4
50 : 50 : 0	41-44 [1-14]	183	F5
20 : 80 : 0	45-48 [1-16]	560	F6
0 : 100 : 0	49-53 [1-17]	1183	F7
0 : 90 : 10	54-57 [1-18]	346	F8
0 : 80 : 20	58-60 [1-19]	1473	F9
0 : 80 : 20	61-63 [1-20]	559	F10
0 : 70 : 30	64-67 [1-21]	339	F11
0 : 70 : 30	68-69 [1-22]	119	F12
0 : 60 : 40	70-74 [1-23]	194	F13

2.1.3. PURIFICATION DES DIFFERENTES FRACTIONS

Les purifications ont été faites par des chromatographies successives sur colonne de Sephadex® LH-20, de gel de silice (MPLC et colonne ouverte), et par HPLC. Les fractions des chromatographies sur Sephadex® LH-20, ont été analysées par CCM avec comme système de migration des plaques le mélange AcOEt/MeOH/cyclohexane : 20/2/2, tandis que pour les chromatographies sur gel de silice, c'est le solvant d'élution. Le révélateur utilisé étant l'anisaldéhyde.

Les fractions apolaires [1-1] à [1-10] (639 mg), n'ont pas fait l'objet de purification complémentaire car elles sont pour l'essentiel constituées par des composés de type acide gras à longues chaînes tels représentés dans leurs spectres de RMN.

- 1) Les fractions [1-11] à [1-13] (290 mg) présentant le même profil chromatographique sur CCM ont été rassemblées et purifiées par chromatographie sur colonne de Sephadex® LH-20 (volume de gel environ 160 ml, colonne Ø = 2,6 cm et H = 30 cm) et avec comme système d'éluant 350 ml d'un mélange de MeOH/CH₂Cl₂ : 90/10). Dix fractions ont été ainsi obtenues dont une était formée d'un composé pur : c'est le composé **D1** (17 mg) qui est un flavonoïde. [Révélateur CCM : anisaldéhyde ; système de migration : AcOEt/MeOH/cyclohexane : 20 /2 /2].

- 2) La purification de la fraction [1-16] (560 mg) sur colonne Sephadex® LH-20 ($\varnothing=1,6$ cm ; H = 77 cm) avec le système d'éluant MeOH/CH₂Cl₂ (90 : 10) (V=350 ml) a permis d'isoler :
- 25 mg du composé **D2**
 - 20 mg du composé **D3**
 - 1 mg du composé **D4**
 - 294 mg d'un premier mélange A
 - 161 mg d'un deuxième mélange B

Le premier mélange A est re-purifié sur MPLC et a fourni 7 mg du composé **D5**. [Conditions chromatographiques : 10 g de gel de SiO₂, dépôt liquide, système éluant : CH₂Cl₂ / AcOEt 1%, volume éluant : 1400 ml]

Les re-purifications du second mélange B par trois MPLC successives a fourni le composé **D6** (25 mg). Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

	Masses dépôt / SiO ₂	Eluant	Volume éluant
MPLC 1	161 mg / 10 g	CH ₂ Cl ₂ / MeOH (1%)	500 ml
MPLC 2	80 mg / 5 g	CH ₂ Cl ₂ / acétone (de 100 / 0 à 98 / 2)	250 ml
MPLC 3	17 mg / 2g	CH ₂ Cl ₂ / acétone (1%)	100 ml

- 3) La purification de la fraction [1-17] (1183 mg) sur colonne Sephadex® LH-20 a permis d'isoler 150 mg du composé **D8** et 162 mg du composé **D10** [Conditions chromatographiques : $\varnothing = 2,4$ cm ; H = 36 cm ; éluant : MeOH ; volume éluant = 2 L]. Une deuxième purification par MPLC en phase normale a fourni les composés **D7** (16 mg), **D5** (3 mg) et **D6** (3 mg) [Conditions chromatographiques : 25 g SiO₂ ; dépôt liquide ; système éluant : CH₂Cl₂/MeOH gradient de 1 à 5% ; volume éluant : 1250 ml]. Le composé **D9** (1mg) a été obtenu à partir de la purification de la sous-fraction 6-16 (15 mg) par MPLC sur phase inverse (silice RP 18) avec le système éluant ACN/H₂O 0,1% TFA : 20/80 en mode isocratique ($t_r = 14$).
- 4) À partir de la fraction [1-18], 20 mg du composé **D8** et 2 mg de **D10** ainsi qu'un mélange des composés **D5** et **D7** ont été isolés par chromatographie sur colonne de Sephadex® LH-20 avec du MeOH (100%) comme éluant.

- 5) La recristallisation de la fraction [1-19] (1 473 mg) dans le MeOH a fourni 502 mg du composé **D11** qui est le composé majoritaire de l'extrait. La recristallisation de la fraction [1-20] (559 mg) a fourni 34 mg d'un composé proche de **D11** appelé **D11'**, ainsi que 26 mg de composé **D12**.
- 6) Le composé **D13** (32 mg) a été obtenu à l'issue de deux purifications successives sur colonne de Sephadex® LH-20 éluée par MeOH à partir de la fraction [1-21] dont les conditions chromatographiques sont les suivantes :

	Masse dépôt	Ø colonne	Hauteur colonne	Eluant	Volume éluant
LH-20 1	339 mg	3 cm	42 cm	MeOH / CH ₂ Cl ₂ : 90/10	900 ml
MPLC 2	42 mg	1,3 cm	29 cm	MeOH (100%)	300 ml

2.2. ETUDE DE *Rhodocodon madagascariensis* Baker

2.2.1. EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT

Une première extraction par l'EtOH a été faite : 1210 g de bulbes frais ont été broyés avec 3,5 L d'EtOH pour donner 149,19 g d'extrait brut.

Cet extrait brut est de nouveau re-extrait par le n-BuOH : les 149,19 g d'extrait sont repris dans 600 mL d'eau distillée puis fractionné par 600 mL de n-BuOH. La phase butanolique a donnée 5,57 g d'extarrit par le n-BuOH et la phase aqueuse 143,62 g d'extrait.

L'extrait par le n-BuOH a été fractionné sur colonne XAD4 en utilisant une colonne de 4 cm de diamètre et de 30 cm de haut. Des fractions de 50 mL ont été ainsi collectées et rassemblées selon leurs profils sur CCM. Les tableaux ci-après (*Tableaux 53 et 54*) résument les conditions et résultats de ce fractionnement.

Tableau 53 : Fractionnement de l'extrait par le n-BuOH de *Rhodocodon madagascariensis* Baker sur colonne XAD4.

Eluant	Volume	Tubes
H2O (100%)	250 mL	1-5
MeOH-H2O (20 : 80)	250 mL	6-9
MeOH-H2O (30 : 70)	250 mL	10-14
MeOH-H2O (50 : 50)	250 mL	15-18
MeOH-H2O (70 : 30)	250 mL	19-22
MeOH (100%)	500 mL	23-40

Tableau 54 : Rassemblement des fractions.

Fraction	Masse	Tubes
F1	398 mg	2
F2	3680 mg	3-5
F3	540 mg	6-9
F4	24 mg	10-11
F5	181 mg	12-15
F6	88 mg	16-24
F7	349 mg	25-34
F8	68 mg	35-40

2.2.2. PURIFICATIONS DES DIFFERENTES FRACTIONS

Les trois composés purs ont été isolés à partir de la fraction F2 (3,68 g) [Conditions chromatographiques : 92 g SiO₂ ; dépôt à sec ; système éluant : AcOEt/MeOH gradient de 2 à 70% ; volume éluant : 3 L]. Ce premier fractionnement a donné 23 sous fractions.

- 1) Les sous fractions 8 et 9 (18 mg) présentant le même profil chromatographique sur CCM ont été rassemblées et purifiées par chromatographie sur colonne de SiO₂ [Conditions chromatographiques : m SiO₂ = 3 g ; système éluant : CH₂Cl₂-MeOH 1 à 10%, volume = 150 mL] pour donner le produit **R1** (2 mg).
- 2) La purification de la sous fraction 21 (18 mg) sur colonne de SiO₂ [Conditions chromatographiques : m SiO₂ = 3 g ; système éluant : CH₂Cl₂-MeOH 2%, volume = 50 mL] suivie d'une chromatographie sur colonne Sephadex® LH-20 [Conditions chromatographiques : Ø = 1 cm ; H = 14 cm ; éluant : MeOH ; volume éluant = 20 mL] a fourni le produit **R2** (5 mg).
- 3) Le composé **R3** (17 mg) a été obtenu à l'issue de deux purifications successives de la sous fraction 23, d'abord sur colonne Sephadex® LH-20 [Conditions chromatographiques : Ø = 3 cm ; H = 33 cm ; éluant : MeOH-H₂O 85-15 ; volume éluant = 400 mL] suivie d'une chromatographie sur colonne de SiO₂ [Conditions chromatographiques : m SiO₂ = 20 g ; système éluant : CH₂Cl₂-MeOH 10 à 20%, volume = 400 mL].

Pour cette étude de *Rhodocodon madagascariensis* Baker, le système de migration des CCM est le Butanol/Acide acétique/Eau (6 : 2 : 2) et les révélateurs utilisés sont l'anisaldéhyde / sulfurique modifié et la vanilline sulfurique.

3 – TESTS TOXICOLOGIQUES

3.1. ACTIVITE TOXIQUE SUR LES ANIMAUX A SANG CHAUD

3.1.1. ACTIVITE TOXIQUE SUR SOURIS

Les souris utilisées, *Mus musculus*, appartiennent à la souche « Tana Swiss » de l'IPM. Elles proviennent des élevages du Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée ainsi que du Laboratoire de Pharmacologie de la Faculté des Sciences d'Antananarivo.

3.1.1.1. Evaluation de la toxicité

Les animaux testés reçoivent l'extrait de deux manières, soit par injection par voie intrapéritonéale soit par administration orale à l'aide d'une aiguille à gavage. Pour chaque test, un lot de 5 souris mâles d'environ 25 g chacune est utilisé.

3.1.1.2. Détermination des DL₅₀

Plusieurs essais préliminaires sont nécessaires pour la délimitation des doses et des intervalles avant la détermination de la DL₅₀ proprement dite. Compte tenu du nombre élevé d'animaux utilisés, l'expérience est faite en une seule fois. Pour chaque mode d'administration, cinq doses en progression géométrique de raison 1,25 sont préparées pour les déterminations des DL₅₀. La première dose est la dose la plus faible qui provoque 100% de mortalité chez les animaux testés et la cinquième est celle la plus forte n'entraînant aucun décès.

La méthode de détermination des DL₅₀ (24 h) ou dose tuant 50% des animaux testés en 24 h comporte deux variantes :

- la première (méthode graphique) est fondée sur les totaux cumulatifs : l'intersection des courbes des totaux cumulatifs des morts et des survivants en fonction des doses donne la valeur de la DL₅₀ (24 h). Le total cumulatif indique la somme des animaux morts ou des animaux survivants à une dose donnée, compte tenu des doses précédentes. Il est calculé en additionnant le nombre d'animaux morts ou survivants jusqu'à la dose considérée.

- la deuxième variante utilise la formule suivante :

$$\log DL50 = \log B + \frac{(0,5 - N)}{(M - N)} \log R$$

où : B est la dose immédiatement inférieure à la DL50 ;

N : la mortalité provoquée par la dose B ;

M : la mortalité provoquée par la dose immédiatement supérieure à la DL50 ;

R : la raison de la progression géométrique.

3.1.2. ACTIVITES TOXIQUES SUR D'AUTRES ESPECES

Deux autres espèces de mammifères, le rat (*Rattus rattus*) et le cobaye (*Cavia porcellus*) ainsi que le poussin (*Gallus gallus*), reçoivent une dose correspondante à la dose létale 100 %.

Les poussins d'un jour ont été achetés auprès du Centre Avicole Avitech, sis à Mandrosoa Ivato (Antananarivo), tandis que le rat et le cobaye proviennent de l'élevage du Laboratoire de Pharmacologie de la Faculté des Sciences d'Antananarivo.

Les extraits à tester, correspondant aux DL₁₀₀ des souris, ont été administrés par voie orale pour les trois espèces, par injection sous-cutanée pour les poussins et par voie i.p. pour les mammifères.

3.1.3. EXAMENS ANATOMOPATHOLOGIQUES

Les techniques d'étude en anatomie pathologique comportent plusieurs étapes : le prélèvement et la fixation des organes ; l'inclusion, la microtomie et l'étalement des coupes ; la coloration des coupes et le montage des lames [Hould, 1984 ; Phat et al., 1986 ; Dielbold et al., 1991 ; Rosai, 2004].

3.1.3.1. Prélèvement et fixation des organes

La fixation des prélèvements permet la conservation des cellules dans l'état le plus proche possible de l'état normal, en évitant leur déshydratation prématurée et surtout la putréfaction des tissus.

Après la mort ou sacrifice des souris testées et des souris témoins, les organes (cerveau, cœur, poumons, foie, reins, estomac et intestin) sont rapidement prélevés et placés immédiatement dans un liquide fixateur (Formol à 10%). La durée de la fixation des organes prélevés est environ de 48 h.

Chaque organe est ensuite découpé en minces fragments à l'aide d'un bistouri. Les fragments tissulaires ne doivent pas dépasser 5 mm d'épaisseur.

3.1.3.2. Inclusion

L'inclusion consiste à incorporer des fragments tissulaires dans des blocs de paraffine. Avant l'inclusion proprement dite, une série de préparations de ces fragments, appelée « circulation » est faite.

3.1.3.2.1. Circulation

La circulation consiste à remplacer l'eau tissulaire par de l'alcool, puis l'alcool par un solvant de la paraffine (toluène) afin de permettre l'imprégnation tissulaire de la paraffine.

Les fragments tissulaires contenus dans des cassettes « TISSUE-TEK III® » sont mis en circulation dans un circulateur automatique de marque SHANDON® citadel 1000 pendant 24 h. La circulation comprend ainsi :

- la déshydratation des fragments au moyen de l'alcool ;
- l'imprégnation des fragments d'un solvant de la paraffine ;
- l'imprégnation des fragments de paraffine.

3.1.3.2.2. L'inclusion proprement dite

Le fragment tissulaire issu de chaque cassette est ensuite plongé dans la paraffine à 56°C coulée dans un moule de métal (TISSUE-TEK®). Les moules sont placés à 4°C afin de solidifier la paraffine. En se refroidissant, le fragment tissulaire imbibé de paraffine se trouve inclus dans un bloc solide de paraffine à partir duquel va s'effectuer la microtomie.

3.1.3.3. Microtomie et étalement des coupes

Des coupes minces régulières de 5 µm d'épaisseur sont faites à l'aide d'un microtome rotatif (LEICA®). Les coupes sont étalées dans un bain thermostaté, puis dépliées

délicatement au moyen d'un scalpel. Elles sont ensuite fixées sur une lame préalablement enduite de colle.

3.1.3.4. Coloration des coupes et montage des lames

Les coupes sont débarrassées de la paraffine avec du toluène, puis réhydratées. Le tissu rendu incolore, est coloré avec des colorants basiques comme l'hématoxyline (teintant les noyaux en bleu ou en noir) et des colorants acides telle l'éosine (teintant le cytoplasme en rose ou en rouge). Le safran se fixe sur le tissu conjonctif. Les lames colorées sont ensuite déshydratées par l'alcool et rincées au toluène. Une goutte de baume de canada sur lamelle recouvre chaque lame. L'observation et la prise de photographie des coupes colorées sont effectuées sous un microscope optique (LEICA®).

3.2. ACTIVITE ICHTYOTOXIQUE

L'espèce *Oryzias latipes* ou médaka est utilisée pour les raisons suivantes :

- c'est un poisson résistant et robuste qui tolère de larges gammes de températures (allant de 0 à 40°C) et de salinité (eau douce à eau saumâtre) bien qu'étant une espèce d'eau douce ;
- c'est un poisson facile à élever et peu exigeant ;
- il est prolifique (40 à 50 œufs par femelle) avec une reproduction facilement contrôlable par la gestion des cycles lumineux ;
- les œufs peuvent être facilement cultivés dans des boîtes de Pétri avec un développement externe et visualisable au travers du chorion transparent de l'œuf.

3.2.1. EVALUATION DE LA TOXICITE SUR LES EMBRYONS DE MEDAKA

Les géniteurs sont placés dans un aquarium en verre de 8 litres de capacité à une température comprise entre 26 et 28°C sous un régime artificiel de reproduction avec un cycle de 10 h de lumière et 14 h d'obscurité. Les œufs fécondés sont délicatement récupérés des femelles. Les œufs ainsi collectés sont séparés les uns des autres et placés dans des boîtes de Petri contenant du milieu Yamamoto spécifique pour l'élevage des embryons [Yamamoto, 1975].

Pour les expérimentations, les embryons de médaka sont mis à incuber dans du milieu Yamamoto avec différentes concentrations d'extraits et dans les mêmes conditions que précédemment (c'est-à-dire à une température de 25°C et avec des cycles de lumière de 10 h et d'obscurité de 14 h). Pour ce faire, 5 embryons sont placés dans chaque puits d'une microplaque à 12 puits. Les observations et les prises de photos à l'aide d'un microscope (LEICA®) sont faites journalièrement jusqu'au troisième jour de post-éclosion correspondant au 14ème jour de post-fécondation. Les milieux d'expérimentation sont changés tous les 48 h.

3.2.2. EVALUATION DE LA TOXICITE SUR LES LARVES DE MEDAKA

Cette série de tests est réalisée avec des larves récemment écloses (10ème jour après la fécondation). Comme pour l'étude de la toxicité sur les embryons, les larves testées sont placées dans les puits d'une microplaque à 12 puits (5 larves par puits) dans lesquels sont ajoutées les différentes concentrations d'extrait. Les observations sont faites chaque jour et les milieux contenant les extraits sont changés tous les 48 h.

3.3. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

3.3.1. SPECTRE D'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

L'activité antimicrobienne *in vitro* des extraits et produits purs a été évaluée par la mesure, du diamètre du halo d'inhibition de la croissance microbienne autour du disque sur lequel la substance à tester a été déposée. Les résultats sont évalués en se référant aux normes utilisées par l'IPM (tableau.).

Tableau 55 : Normes utilisées pour la lecture des résultats par la méthode des disques selon l'IPM : le diamètre du disque est 6 mm.

Diamètre du halo d'inhibition (X)	Sensibilité des germes	Résultats
X < 7 mm	Insensible	–
7 mm < X < 8 mm	Assez sensible	+
8 mm < X < 9 mm	Sensible	++
X > 9 mm	Très sensible	+++

Les milieux gélosés Müller-Hinton, Marine Agar et Sabouraud, contenus dans des boîtes de Petri, sont uniformément ensemencés avec les germes ciblés :

- milieu Müller-Hinton : pour *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhi* ;
- milieu Marine Agar : pour *Vibrio fischeri* et *Vibrio harveyi* ;
- et milieu Sabouraud pour *Candida tropicalis*.

Des disques de papier buvard stérilisés, de 6 mm de diamètre, sont imprégnés avec 2000 µg d'extrait à tester et avec 100 µg de produit pur. Les échantillons à déposer sont solubilisés dans des solvants appropriés. Chaque test est dupliqué.

Les incubations se font à 37°C et pendant 24 h pour *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhi*, à 27°C pendant 48 h pour *Candida tropicalis*, à 25°C pendant 72 h pour *Vibrio harveyi* et *V. fischeri*.

Après ces temps d'incubation, le diamètre d'inhibition de la culture microbienne est mesuré.

3.3.2. DETERMINATION DE LA CMI

La CMI ou concentration minimale inhibitrice est la plus faible concentration d'une solution qui provoque l'inhibition totale de la prolifération d'une souche microbienne après incubation.

Dans notre travail, la CMI a été déterminée par la méthode de diffusion sur disque d'antibiogramme et elle correspond à la plus faible concentration d'extrait à tester qui donne un halo de 7 mm de diamètre (le disque de papier ayant un diamètre de 6 mm). Les différentes concentrations d'extraits à tester ont été obtenues par dilution en cascade.

3.4. ACTIVITE ANTIMYCOBACTERIENNE

Le test est réalisé dans des microplaques à 96 puits. Les produits à tester sont dilués avec du DMSO pour avoir une concentration de 100 mg/mL et l'inoculum est préparé à partir de la souche de *Mycobacterium bovis* cultivée dans du milieu Dubos enrichi avec 10% d'ADC (Albumine, Dextrose et Catalase).

Un microlitre de chaque échantillon à tester est mélangé directement dans chaque puits avec 100 µL de milieu Dubos pour donner une dose de 100 µg puis avec 100 µL d'inoculum. Chaque test est fait en double. Les microplaques ainsi préparées sont recouvertes hermétiquement puis incubées à 37°C pendant 6 jours. Au bout de 6 jours, 30 µL de solution de résazurine sont ajoutés dans chaque puits et les microplaques sont de nouveau incubées à 37°C pendant 24 h.

Le virage de la coloration bleue en rose indique une réduction de la résazurine signifiant ainsi une croissance de la souche mycobactérienne. Dans le cas où il n'y a pas de

changement de coloration, la croissance de *Mycobacterium bovis* est alors inhibée. L'isoniazide est utilisé comme produit de référence positive.

3.5. ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE

Le test pratiqué est un test enzymatique sur l'inhibition de la phospholipase A2 (PLA2). Elle catalyse spécifiquement l'hydrolyse de la liaison Sn-2 des phospholipides pour libérer un acide gras, l'acide arachidonique. Cet acide ainsi libéré sert de précurseur à la biosynthèse des éicosanoïdes (prostaglandines, thromboxanes et leucotriènes), puissants médiateurs de l'inflammation. Les composés qui inhibent la PLA2 sont donc des agents thérapeutiques potentiels dans le traitement de l'inflammation.

L'enzyme utilisée est donc la PLA2 du venin de l'abeille *Apis mellifera* et le substrat est la lécithine d'œuf à 3,5 mM dans 7 mM de Triton X100, 100 mM de NaCl, 10 mM de CaCl₂ et 0,055 mM de rouge de phénol. Le pH de cette solution est ajusté à 7,6 avec du NaOH 40 mM afin d'obtenir une DO entre 1,8 et 2 à 558 nm.

L'activité de la PLA2 est évaluée par une méthode colorimétrique utilisant un indicateur de pH, le rouge de phénol (rouge en milieu basique et jaune en milieu acide) permettant de suivre l'hydrolyse du substrat (lécithine de l'œuf) par l'enzyme (PLA2) en présence ou en absence du produit à tester.

Pour le test, 25 µg de produit à tester, dissous dans 10 µL de DMSO sont incubés en présence de 1 µL de la solution enzymatique (PLA2 à 1 mg/mL dans le DMSO) pendant 1 h, puis 200 µL de la solution de substrat sont ajoutés et une première lecture de DO à 558 nm est immédiatement effectuée au temps t₀, une deuxième lecture après 5 min donne le résultat au temps t. Chaque test est effectué en double. Un témoin DMSO est réalisé.

3.6. ACTIVITE ANTIPLASMODIALE IN VITRO

L'activité antipaludique est évaluée par incorporation d'hypoxanthine tritiée dans l'ADN parasite, selon la technique mise au point par Desjardins et al. (1979).

La souche utilisée, FcB1 ou souche chloroquino-résistante de *Plasmodium falciparum* isolée en Colombie, est maintenue en culture sur des hématies humaines, dans du milieu RPMI contenant 7,5% de sérum humain, et selon la méthode décrite par Trager et Jensen (1976).

Les tests se déroulent dans des plaques à 96 puits contenant :

- 100 µL de l'échantillon à tester à la concentration de 5 µg/mL dans le premier puit, puis une dilution au 1/2 est appliquée aux puits suivants ;
- 100 µL de suspension d'hématies parasitées dans du milieu de culture.

Les plaques préparées sont incubées pendant 24 h, à 37°C, en atmosphère enrichie en CO₂. Après ajout de 25 µL, d'hypoxanthine tritiée dans chaque puit, les plaques sont de nouveau incubées pendant 24 h. Les cellules de chaque puit sont ensuite lysées par congélation-décongélation. L'ADN est récupéré puis filtré. Les filtres sont séchés et mis en présence de liquide de scintillation. Un compteur à scintillation permet de déterminer la radioactivité pour chaque puit. L'inhibition de la croissance pour chaque concentration-test est déterminée par la comparaison de la radioactivité incorporée aux cultures traitées avec celle du témoin. Les hématies étant anucléées, l'incorporation de l'hypoxanthine tritiée reflète ainsi uniquement la croissance parasitaire dont l'inhibition est marquée par une baisse de la radioactivité.

Les concentrations provoquant l'inhibition de la croissance de 50% des parasites (IC₅₀) sont déterminées à partir des courbes de réponses – concentrations. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm avec les déviations standard déterminées à partir de trois réponses car les expériences sont faites en tripliquette.

Les matériels utilisés pour cette étude sont :

- Milieu de culture : RPMI (Roswell Park Memorial Institute)
- 25 µM d'HEPES ajusté à pH 7,5 ; 27,5 mM de NaHCO₃ ; 11 mM de glucose ; 100 UI/mL de pénicilline ; 100 µg/mL de streptomycine ; 5% de sérum humain décomplémenté (par chauffage à 56°C pendant 30 min).
- Hématies : hématies humaines, groupe O, hématocrite : 4%.

3.7. ACTIVITE CYTOTOXIQUE

Des cellules embryonnaires diploïdes pulmonaires humaines ou MRC-5 sont placées dans des microplaques à 96 puits avec 5000 cellules par puits. Après 24 h, les cellules sont lavées et mises en contact avec différentes concentrations des échantillons à tester pendant 5 jours, à 37°C et sous une atmosphère à 5% de CO₂. L'activité cytotoxique est déterminée par la méthode colorimétrique MTT [Mossmann, 1983] et elle est évaluée en fonction de la

réduction d'absorbance à 540 nm des cultures traitées par rapport à un témoin positif, un produit déjà connu (la camptothécine) et à un témoin négatif, qui est une culture non traitée.

Dans notre cas, les tests de cytotoxicité ont été faits sur deux des produits nouveaux qui sont l'antadiosbulbine A et l'antadiosbulbine B.

Conclusion générale

CONCLUSION GENERALE

Les résultats que nous avons obtenus lors de l'étude de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr., plante utilisée comme aliment de substitution en période de disette et soupçonnée toxique, et de *Rhodocodon madagascariensis* Baker, plante communément utilisée comme raticide, constituent les premières données chimiques et toxicologiques sur ces deux plantes malgaches.

Dans les deux cas, les principales molécules responsables des effets observés ont été isolées et caractérisées et l'étude de leurs activités biologiques entreprises.

De *Dioscorea antaly* Jum. & Perr., nous avons isolé une quinzaine de composés dont neuf composés phénoliques qui se répartissent en cinq dérivés du stilbène et du phénanthrène : le 3,7-dihydroxy-2,4-diméthoxy, le picéatannol, le 3,4,3',5'-tétrahydroxy-dihydrostilbène ou dihydropicéatannol qui est ici isolé d'une source naturelle pour la première fois, la cassigarol D, la scirpusine B et quatre flavonoïdes : la catéchine, le kaempférol, le 3-O- $[\beta$ -D-glucose-(6 \rightarrow 1)- α -L-rhamnose]-kaempférol et la quercétine. Cinq diterpènes dont quatre originaux de la classe des clérodanes ont également été isolés à partir des tubercules de cette espèce, les antadiosbulbines A et B, la 8-épi-diosbulbine E, la 8-épi-diosbulbine G, ainsi qu'un composé décrit antérieurement dans les tubercules de *D. bulbifera*, la diosbulbine E. Ces derniers composés de la classe des diterpènes sont responsables de l'amertume de la plante.

Ils peuvent être considérés comme des facteurs antinutritionnels dont plusieurs principes actifs déjà reconnus comme responsables de la toxicité de diverses espèces de *Dioscorea bulbifera*. Toutefois nous n'avons pas observé la présence d'alcaloïdes toxiques comme la diocorine et ses analogues, ni malgré une recherche poussée, de saponosides décrits comme étant responsable de la toxicité des *Dioscorea*. Il est intéressant de noter les points communs entre *D. bulbifera* et *D. antaly* Jum. & Perr. qui ne renferment pas de saponosides mais en revanche des diterpénoïdes de type clérodane.

Etant donné la diversité et la gravité des lésions que les tubercules de la plante provoquent chez les animaux, les techniques de détoxification, déjà en vigueur, doivent être conduites avec soins et rigueur pour garantir une consommation sans risque des tubercules de la plante.

Trois bufadiénolides (scillirosidine, scilliroside et hellebrigénine), toxiques et également présents chez d'autres Hyacinthaceae et Liliaceae toxiques, ont été isolés de *Rhodocodon madagascariensis* Baker. A eux seuls, ils expliquent la forte toxicité de la plante et son utilisation comme raticide. Une sensibilisation de la population sur la toxicité des bulbes devrait précéder toute vulgarisation de l'utilisation de ce rodenticide végétal.

Nos résultats sur la chimie de *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. et de *Rhodocodon madagascariensis* Baker constituent des arguments supplémentaires à la classification actuelle des ces plantes, comme cela a été exprimé dans les conclusions concernant chaque partie.

L'ensemble des résultats obtenus contribue à l'amélioration des connaissances et à la valorisation de la biodiversité végétale malgache notamment des plantes toxiques.

Il ouvre de nouvelles pistes de recherche sur les deux plantes étudiées et le détail des perspectives dans chaque cas a été exposé dans les conclusions spécifiques des deux parties de ce travail.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Adesanya, S.A., Ogundana, S.K., Roberts, M.F.** (1989). Dihydrostilbene phytoalexins from *Dioscorea bulbifera* and *Dioscorea dumetorum*. **Phytochemistry** **28** (3), 773-774.
- **Akahane, T.** (1999) A pharmacologically active component in *Dioscorea bulbifera* L. on the hypoglycaemic effect. **Memoirs of Numazu College of Technology** **33**, 95-98.
- **Ake Assi L.** (1998). Diversification des utilisations des ignames : usage pharmaceutique traditionnel, 263-268, in : Berthaud J., Bricas N., Marchand J-L. *L'igname, plante séculaire et culture d'avenir. Actes de séminaire international Cirad-Inra-Orstom-Coraf*, 3-6 juin 1997, Montpellier.
- **Alouf, J.E.** (1976). Cell membranes and cytolytic bacterial toxins. In "The specificity and action of animal, bacterial and plant toxins (receptors and recognition, Series B, Volume 1) edited by Cuatrecasas P., Chapman and Hall, London.
- **Amarasekara A.S., Hassner A.** (1987). Stereospecific and stereochemical structure confirmation of dumetorine. **Tetrahedron Lett.** **28** (27), 3151-3154.
- **Amschler G., Frahm A.W., Müller-Doblies D., Müller-Doblies U.** (1998) Spirocyclic nortriterpenes from the bulbs of *Veltheimia viridifolia*. **Phytochemistry** **47** (3), 429-436.
- **Baba K., Kido T., Maeda K., Taniguchi M., Kazawa M.** (1991). Two stilbenoids from *Cassia garettiana*. **Phytochemistry** **36**, No. 6, 1509-1513.
- **Bangani V., Crouch N.R., Mulholland D.A.** (1999). Homoisoflavanones and stilbenoids from *Scilla nervosa*. **Phytochemistry** **51** (7), 947-951.
- **Benghuzzi H., Tucci H., Eckie Z., Hughes J.** (2003). The effects of sustained delivery of diosgenin on the adrenal gland of female rats. **Biomedical Sciences Instrumentation** **39**, 335-340.
- **Bhandari M.R., Kawabata J.** (2004). Organic acid, phenolic content and antioxidant activity of wild yam (*Dioscorea spp.*) tuber of Nepal. **Food Chemistry** **88**, 163-168.
- **Bhandari, M.R., Kawabata, J.** (2005). Bitterness and toxicity in wild yam (*Dioscorea spp.*) tubers of Nepal. **Plant Foods Hum. Nutr.**, 60 (3), 129-135.
- **Bin, L., Renbing, S., Guangzhong, T.** (2004). Isolation and identification of Diosbulbin-B in the aqueous extract of *Rhaponticum uniflorum*. **Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine.** **27** (6), 58-60.
- **Biswas, M., Som, U.K., Ghosh, P.K., Dutta, C.P., Banerji, A.** (1988). Prazerol, a new 9,10-dihydrophenanthrene derivative isolated from *Dioscorea prazeri*. **Tetrahedron** **44** (15), 4871-4876.
- **Bizzini, B.** (1976). Tetanus toxin structure as a basis for elucidating its immunological and neuropharmacological activities. In "The specificity and action of animal, bacterial and plant toxins (receptors and recognition, Series B, Volume 1) edited by Cuatrecasas P., Chapman and Hall, London.
- **Boiteau P.** (1979). Dictionnaire des noms malgaches des végétaux. **Fitoterapia** **1**, 25-47.
- **Boiteau P., Allorge-Boiteau L.** (1993). Plantes médicinales de Madagascar. Ed Karthala, collection : économie et développement, 136 pages

- **Boiteau, P.** (1986). Médecine traditionnelle et pharmacopée. Précis de matière médicale malgache. *Agence de coopération culturelle et technique*, ACCT, Paris, 1-114.
- **Botha C.J., Penrith M.-L.** (2008). Poisonous plant of veterinary and human importance in Southern Africa. *J. Ethnopharmacol.* **119**, 549-558.
- **Brinker, A.M., Seigler, D.S.** (1991). Isolation and identification of piceatannol as a phytoalexin from sugarcane. *Phytochemistry* **30**, 3229-3232.
- **Burkill I.H., Perrier de la Bâthie H.** (1950). La flore de Madagascar et des Comores. 44ème famille : Dioscoreaceae. *Muséum National d'Histoire Naturelle (Phanérogamie)*, Paris.
- **Choi E.M., Koo S.J., Hwang J.K.** (2004). Immune cell stimulating activity of mucopolysaccharide isolated from yam (*Dioscorea batatas*). *J. Ethnopharmacol.* **91**, 1-6.
- **Cline, E.I., Adesanya, S.A., Ogundana, S.K., Roberts, M.F.** (1989). Induction of pal activity and dihydrostilbene phytoalexins in *Dioscorea alata* and their plant growth inhibitory properties. *Phytochemistry* **28** (10), 2621-2625.
- **Cordonnier M., Van Nechel C., Van den Ende P., Zumaran C., Ben Ammar L.** (1994). Le traitement du strabisme par la toxine botulinique. *Journal français d'ophtalmologie* **17** (12), 755-768.
- **Corley D.G., Tempesta M.S.** (1985). Convulsant alkaloids from *Dioscorea dumetorum*. *Tetrahedron Lett.* **26** (13), 1615-1618.
- **Coursey D.G.** (1967). An account of the nature, origins, cultivation and utilisation of the useful members of the Dioscoreaceae. *Longmans, Green and Co Ltd., London*.
- **Coxon, D.T., Ogundana, S.K., Dennis, C.** (1982). Antifungal phenanthrenes in yam tubers. *Phytochemistry* **21**(6), 1389-1392.
- **Cren-Olivé, C., Wieruszeski, J.-M., Maes, E., Rolando, C.** (2002) Catechin and epicatechin deprotonation followed by NMR. *Tetrahedron Lett.* **43**, 4545-4549
- **Crouch N.R., Bangani V., Mulholland D.A.** (1999). Homoisoflavanones from three South African *Scilla*. *Phytochemistry* **51** (7), 943-946.
- **Crouch N.R., du Toit K., Mulholland D.A., Drewes S.** (2006). Bufadienolides from bulbs of *Urginea lydenburgensis* (Hyacinthaceae : Urgineoideae). *Phytochemistry* **67**, 2140-2145.
- **Das, B., Reddy, M. R., Ramu, R., Ravindranath, N., Harish, H., Ramakrishna, K.V. S., Rao, Y. K., Harakishore, K., Murthy, U. S. N.** (2005). Clerodane diterpenoids from *Pulicaria wightiana*. *Phytochemistry* **66**, 633-638.
- **Desjardins, R.E., Canfield, C.J., Haynes, J.D., Chulay, J.D.** (1979). Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**, 710-718.
- **Dias K.L.M., Correia N.A., Pereira K.K.G., Barbosa-Filho J.M., Cavalcante K.V.M., Araujo I.G.A., Silva D.F., Guedes D.N., Neto D.A., Bendhack L.M., Medeiros I.A.** (2007). Mechanisms involved in the vasodilator effect induced by diosgenin in rat superior mesenteric artery. *Eur. J. Pharmacol.* **574**, 172-178.
- **Dong M., Feng X., Wang B., Wu L., Ikejima T.** (2001). Two novel furostanol saponins from the rhizomes of *Dioscorea panthaica* Prain et Burkill and their cytotoxic activity. *Tetrahedron* **57** (3), 501-506.
- **Dounias E.** (1996). Sauvage ou cultivé ? *La paraculture des ignames sauvages par les Pygmées Baka du Cameroun*, 939-960, in : Hladik C.M., Hladik A., Pagezy H., LINARES O., Koppert G.J.A., Froment A. *L'alimentation en forêt tropicale, interactions bioculturelles et perspectives de développement*. UNESCO, Paris.

- **Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo** (Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, Département de Biologie et Ecologie Végétale), Fonds d'Appui au Développement de l'Enseignement Supérieur (FADES) (2005). *Recherche sur les ignames de Madagascar*. 94 p.
- **Fagboun, D.E., Ogundana, S.K., Adesanya, S.A., Roberts, M.F.** (1987). Dihydrostilbene phytoalexins from *Dioscorea rotundata*. *Phytochemistry* **26** (12), 3187-3189.
- **FAO** (1991). Racines, tubercules, plantains et bananes dans la nutrition humaine. *Collection FAO Nutrition*, 24.
- **Fennell C.W., Light M.E., Sparg S.G., Stafford G.I., van Staden J.** (2004). Assessing African medicinal plants of efficacy and safety : agricultural and storage practices. *J. Ethnopharmacol.* **95**, 1136121.
- **Foukaridis G.N., Osuch E., Mathibe L., Tsipa P.** (1995). The ethnopharmacology and toxicology of *Urginea sanguinea* in the Pretoria. *J. Ethnopharmacol.* **49** (2), 77-79.
- **Frappier, F., Jossang, A., Soudon, J., Calvo, F., Rasoanaivo, P., Ratsimamanga-Urveg, S., Saez, J., Schrevel, J., Grellier, P.** (1996). Bibenzylisoquinolineas modulators of chloroquine resistance in tumor cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **6**, 1476-1481.
- **Fukunaga, T., Nishiya, K., Kajikawa, I., Watanabe, Y., Suzuki, N., Takeya, K., Itokawa, H.** (1988). Chemical studies on the constituents of *Hyphear tanakae* Hosokawa from different host trees. *Chem. Pharm. Bull.* **36** (3), 1180-1184.
- **Galagovsky, L.R., Porto A.M., Burton G., Gros E.G.** (1983) Biosynthesis of the bufadienolide ring of scillirosid in *Scilla maritima*. *Z. Naturforsch., Teil C*, **39**, 38-44.
- **Gao H., Kuroyanagi M., Wu L., Kawahara N., Yasuno T., Nakamuray Y.** (2002). Antitumor-promoting constituents from *Dioscorea bulbifera* L. in JB6 mouse epidermal cells. *Biol. Pharm. Bull.* **25** (9), 1241-1243.
- **Harborne J.B., Baxter H., Moss G.P.** (1999). *Phytochemical Dictionnary. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. 2nd Ed, CRC Press, 976 pages.
- **He X., Liu B., Wang G., Wang X., Su L., Qu G., Yao X.** (2006). Microbial metabolism of methyl protoneodioscin by *Aspergillus niger* culture. A new androstenedione producing way from steroid. *J. Steroid Biochem. & Mol. Biol.* **100**, 87-94.
- Hedberg, Stugard (1989)
- **Herbert, R.B.** (1994) *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*. Chapman and Hall, London, 63–95.
- **Hould, R.** (1984). *Techniques d'histopathologie et de cytopathologie*. Maloine Editeur Paris, 399 p.
- **Hu K., Yao X.** (2002). The cytotoxicity of protoneodioscin (NSC-698789), a new furostanol saponin from the rhizomes of *Dioscorea collettii* var *hypoglauca*, against human cancer cells *in vitro*. *Phytomedicine* **9**, 560-565.
- **Ida, Y., Komori, T., Kawasaki, T.** (1978a). Furanoid-norditerpene aus Pflanzen der Familie Dioscoreaceae, VI Kristallstrukturanalyse von diosbulbin-G. *Liebigs Ann. Chem.*, 834-838.
- **Ida, Y., Kubo, S., Fujita, M., Komori, T., Kawasaki, T.** (1978b) Furanoid-norditerpene aus Pflanzen der Familie Dioscoreaceae, V, Struktur der Diosbulbin –D, -E, -F, -G und –H. *Liebigs Ann. Chem.*, 818-833.

- **Ida, Y., Noda, N., Kubo, S., Komori, T., Kawasaki, T.** (1978c). Furanoid-norditerpenes from Dioscorea plants, VII Structures of diosbulbinosides D and -F. *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 435-439.
- **Iizuka M., Warashina T., Noro T.** (2001). Bufadienolides and a new lignan from the bulbs of *Urginea maritima*. *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 282-286.
- **Itharat A., Houghton P.J., Eno-Amooquayne E., Burke P.J, Sampson J.H., Raman A.** (2004). *In vitro* cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *J. Ethnopharmacol.* **90**, 33-38.
- **Iwu, M.M., Okunji, C.O., Ohiaeri, G.O., Akah, P., Corley, D., Tempesta, M.S.** (1990). Hypoglycaemic activity of dioscoretine from tubers of *Dioscorea dumetorum* in normal and alloxan diabetic rabbits. *Planta Med.* **56** (3), 264-267.
- **Jäger A. K., Hutching A., van Staden J.** (1996) Screening of Zulu medicinal plants for prostaglandin-synthesis inhibitors. *J. Ethnopharmacol.* **52**, 95-100.
- **Jeannoda V., Jeannoda V.H., Hladik A., Hladik C.M.** (2003). Les ignames de Madagascar : diversité, utilisations et perceptions. *Hommes et Plantes* **47**, 10-23.
- **Jeannoda, V.H.** (2009). Connaissance, valorisation et conservation de la biodiversité malgache : cas des ignames ou *Dioscorea* L. (Dioscoreaceae). HDR, spécialité : Biologie végétale, Université d'Antananarivo.
- **Kaganda, N.G., Adesania, S.A.** (1990). A new dihydrostilbene from diseased *Dioscorea mangenotiana*. *J. Nat. Prod.*, **53**, 1345-1346.
- **Kawasaki T., Komori T., Setoguchi S.** (1968). Furanoid norditerpenes from Dioscoreaceae plants. I. Diosbulbins A, B and C from *Dioscorea bulbifera* L. forma *spontaneae* Makino et Nemoto. *Chem. Pharm. Bull.* **16** (12), 2430-2435.
- **Kellermann T.S., Coetzer J.A.W., Naude T.W.** (1988). Plant poisonings and mycotoxicoses of livestock in Southern Africa. Oxford University Press, Cape Town.
- **Kelmanson J.E., Jäger A.K., Van Staden J.** (2000). Zulu medicinal plants with antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* **69**, 241-246.
- **Kim, B.-G., Lee, Y., Hur, H.-G., Lim, Y., Ahn, J.-H.** (2006) Flavonoid 3'-O-methyltransferase from rice : cDNA cloning, characterization and functional expression. *Phytochemistry* **67**, 387-394.]
- **Kimura, Y., Baba, K., Okuda, H.** (2000). Inhibitory effects of active substances isolated from *Cassia garrettiana* heartwood on tumor growth and lung metastasis in Lewis lung carcinoma-bearing mice (Part 1). *Anticancer research* **20** (5A), 2899-2906.
- **Koeman, J.H.** (1996). Toxicology, history and scope of the field. In "Toxicology: Principles and Applications" by Niesink R.J.M., de Vries J., Hollinger M.A., Ed by CRC Press Inc. and Open University of the Netherlands, 1284 p.
- **Komori T., Arita M., Ida Y., Fujikura T., Kawasaki T., Sekine K.** (1973). Furanoid-norditerpene aus Pflanzen der familie Dioscoreaceae, zur stuktur des diosbulbine -A, -B und -C. *Liebigs Ann. Chem.*, 978-992.
- **Koorbanally C., Crouch N.R., Mulholland D.A.** (2001). Scillascillin-type homoisoflavanones from *Drimiopsis maculata* (Hyacinthaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **29** (5), 539-541.
- **Koorbanally N.A., Koorbanally C., Harilal A., Mulholland D.A., Crouch N.R.** (2004). Bufadienolides from *Drimia robusta* and *Urginea epigea* (Hyacinthaceae). *Phytochemistry* **65**, 3069-3073.

- Kopp, B., Krenn, L., Draxler, M., Hoyer, A., Terkola, R., Vallaster, P., Robien, W. (1996). Bufadienolides from *Urginea maritima* from Egypt. *Phytochemistry* **42**, 513-522.
- Kopp, B., Unterluggauer, M., Robien, W., Kubelka, W. (1990). *Planta Med.* **56** : 193-197
- Kovacs, A., Vasas, A., Hohmann, J. (2008). Natural phenanthrenes and their biological activity. *Phytochemistry* **69**, 1084-1110.
- Krenn L; Hüffner A., Kastenhuber A., Speta F. (2004). Chemotaxonomic relevance of cardenolides in *Urginea fugax*. *Phytochemistry* **65** (21), 2881-2884.
- Krenn, L. ; Kopp, B. ; Bamberger, M. ; Brustmann, B. ; Kubelka, W. (1993). *Nat. Prod. Res.* **3**, 139-143
- Krenn, L., Kopp, B. (1998). Bufadienolides from animal and plants sources. *Phytochemistry* **48** (1), 1-29.
- Krishna Kumari, G.N., Jagan Mohan Rao, L., Prakasa, N.S. (1986). ¹³C NMR data of flavonol methyl ethers of *Solanum pubescens*. *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)* **97** (2), 171-176.
- Kwon, C.-S., Sohn, H.Y., Kim, S.H., Kim, J.H., Son, K.H., Lee, J.H., Lim, J.K., Kim, J.-S. (2003). Anti-obesity effect of *Dioscorea nipponica* Makino with lipase-inhibitory activity in rodents. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67** (7), 1451-1456.
- Laveaga G.S. (2005). Uncommon trajectories : steroid hormones, Mexican peasants, and the search for a wild yam. *Stud. Hist. Phil. Biol. & Biomed. Sci.* **36**, 743-760.
- Leong, Y.-W., Kang, C.-C., Harrison, L. J., Powell, A. D. (1997). Phenanthrenes, dihydrophenanthrenes and bibenzyls from the orchid *Bulbophyllum vaginatum*. *Phytochemistry* **44** (1), 157-165.
- Liu H.W., Wang S.L., Cai B., Yao X. (2003). Two new non-steroidal constituents from *Dioscorea futschauensis* R. Knuth. *Pharmazie* **58**, 214-215.
- Liu M.-J., Wang Z., JU Y., ZHOU J.-B., Wang Y., Wong R.N.-S. (2004). *Biol. Pharm. Bull.*, **27** (7), 1059-1065.
- Liu, X.-T., Wang, Z.-Z., Xiao, W., Zhao, H.-W., Hu, J., Yu, B. (2008). Cholestane and spirostane glycosides from the rhizomes of *Dioscorea septemloba*. *Phytochemistry* **69**, 1411-1418.
- Ma, C., Wang, W., Chen, Y.Y., Liu, R.-N., Wang, R.-F., Du, L.-J. (2005). Neuroprotective and antioxidant activity of compounds from the aerial parts of *Dioscorea opposita*. *J. Nat. Prod.* **68**, 1259-12161.
- Mabberley (1997). The plant book, 2nd 2d. Cambridge University Press.
- Majmuder, P.L., Sen, S., Majmuder, S. (2001). Phenanthrene derivatives from the orchid *Coelogyne cristata*. *Phytochemistry* **58**, 581-586.
- Manning, J.C., Goldblatt, P., Fay, M.F. (2003). A revised generic synopsis of Hyacinthaceae in Sub-Saharan Africa, based on molecular evidence, including new combinations and the new tribe Pseudoprosperaeae. *Edinburgh J. Botany* **60**, 3, 533-568.
- Markham, K.R., Ternai, B., Stanley, R., Geiger, H., Mabry, T.J. (1978) Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III : Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron* **34**, 1389-1397
- Marx, J., Pretorius, E., Esparg, W.J., Bester, M.J. (2005). *Urginea sanguinea* : medicinal wonder or death in disguise? *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **20**, 26-34.
- Mcanuff M.A., Harding W.W., Omoruyi F.O., Jacobs H., Morrison E.Y., Asemota H.N. (2005). Hypoglycemic effects of steroidal sapogenins isolated from Jamaican bitter yam, *Dioscorea polygonoides*. *Food and Chemical Toxicology* **43**, 1667-1672.

- **Mcanuff M.A., Omoruyi F.O., Gardner M.T., Morrison E.Y., Asemota H.N.** (2003). Alterations in intestinal morphology of streptozotocin-induced diabetic rats fed Jamaican bitter yam (*Dioscorea polygonoides*) steroidal sapogenin extract. *Nutrition Research* **23**, 1569-1577.
- **Mcanuff M.A., Omoruyi F.O., Morrison E.Y., Asemota H.N.** (2002). Plasma and liver lipid distributions in streptozotocin-induced diabetic rats fed sapogenin extract of the Jamaican bitter yam (*Dioscorea polygonoides*). *Nutrition Research* **22**, 1427-1434.
- **Mcanuff M.A., Omoruyi F.O., Sotello-Lopez A, Asemota H.N.** (2005). Proximate analysis and some antinutritional factor constituents in selected varieties of Jamaican yam (*Dioscorea* and *Rajana* spp.). *Plant Foods for Human Nutrition* **60**, 93-98.
- **Mcanuff-Harding M.A., Omoruyi F.O., Asemota H.N.** (2006). Intestinal disaccharidases and some renal enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats fed sapogenin extract from bitter yam (*Dioscorea polygonoides*). *Life Sciences* **78**, 2595-2600.
- **Miadokova E., Masterova J., Vlckova V., Duhova V., Toth J.** (2002). Antimutagenic potential homoisoflavonoids from *Muscari racemosus*. *J. Ethnopharmacol.* **81**, 381-386.
- **Mirabel, M.; Glories, Y.; Pianet, I.; Dufourc, E.J.** (1999). Towards high resolution 1H NMR spectra of tannin colloidal aggregates. *J. Chim. Phys.* **96**, 1629-1634.
- **Moodley N., Crouch N.R., Mulholland D.A.** (2007) Bufadienolides from *Drimia macrocentra* and *Urginea riparia* (Hyacinthaceae: Urgineoideae). *Phytochemistry* **68** (19), 2415-2419.
- **Mossman, T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *I. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
- **Mulholland D.A., Crouch N., Decker B., Smith M.T.** (2002). The isolation of the Amaryllidaceae alkaloid crinamine from *Dioscorea dregeana*. *Biochem. Syst. Ecol.* **30**, 183-185.
- **Mulholland D.A., Drewes S.E.** (2004) Global phytochemistry : indigenous medicinal chemistry on track in Southern Africa. *Phytochemistry* **65**, 769-782.
- **Murray R.D.H., Jorge Z.D., Khan N.H., Shanjahan M., Quaisuddin M.** (1984). Diosbulbin D and 8-epidiosbulbin E acetate, norclerodane diterpenoids from *Dioscorea bulbifera* tubers. *Phytochemistry* **23** (3), 623-625.
- **Murray, R.D.H., Jorge, Z.D., Khan, N.H., Shahjahan, M., Quaisuddin, M.** (1984). Diosbulbin D and 8-epidiosbulbin E acetate, norclerodane diterpenoids from *Dioscorea bulbifera* tubers. *Phytochemistry* **23** (3), 623-625.
- **Mutanyatta J., Matapa B.G., Shushee D.D., Abegaz B.M.** (2003). Homoisoflavonoids and xanthones from the tubers of wild and *in vitro* regenerated *Ledebouria graminifolia* and cytotoxic activities of some of the homoisoflavonoids. *Phytochemistry* **65** (5), 797-804.
- **Nakajima, K., Taguchi, H., Endo, T., Yosioka, I.** (1978). The Constituents of *Scirpus fluvialis* (TORR.) A. GRAY. I. : The Structures of Two New Hydroxystilbene Dimers, Scirpusin A and B. *Chem. Pharm. Bull.* **26**, 3050-3057
- **Neuwinger H.D.** (1996). African ethnobotany, poisons and drugs. London-Glasgow-Weinheim-New York-Tokyo-Melbourne-Madras : CHAPMAN and HALL, 421-435.
- **Pascual-Villalobos M.J., Robledo A.** (1999). Anti-insect activity of plant extracts from the wild flora in southeastern Spain. *Biochem. Syst. Ecol.* **27**, 1-10.
- **Pascual-Villalobos, M.J.** (2002). Anti-insect activity of bufadienolides from *Urginea maritima*. p. 564–566. In: J. Janick and A. Whipkey (eds.), Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA

- **Perrier de la Bâthie H.** (1938). Flore de Madagascar (Plantes vasculaires) – 40ème famille Liliacées. Imprimerie Officielle, Tananarive, 147 pages.
- **Pfossor, M., Speta, F.** (1999). Phylogenetics of Hyacinthaceae based on plastid DNA sequences. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **86**, 852-875.
- **Pohl T., Koorbanally C., Crouch N.R., Mulholland D.A.** (2001). Bufadienolides from *Drimia robusta* and *Urginea altissima* (Hyacinthaceae). *Phytochemistry* **58**, 557-561.
- **Raju J., Bird R.P.** (2007). Diosgenin, a naturally occurring furostanol saponin suppresses 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase expression and induces apoptosis in HCT-116 human colon carcinoma cells. *Cancer Letters* **255**, 194-204.
- **Randriamahatody Z.** (2003). Détermination de la valeur nutritionnelle de trois espèces de *Dioscorea* consommées pendant la période de soudure dans la région de Menabe. *DEA Biochimie*. Université d'Antananarivo.
- **Rasoanaivo P., Petitjean A., Conan J.Y.** (1993). Toxic and poisonous plants of Madagascar : an ethnopharmacological survey. *Fitoterapia LXIV* (2), 114-129.
- **Reed, L.J., Muench, H.** (1938). A simple method of estimating fifty per cent points. *Am. J. Hyg.* **27**, 493p.
- **Rivera D., Obon C.** (1995) The ethnopharmacology of Medeira and Porto Santo Islands, a review. *J. Ethnopharmacol.* **46**, 73-93.
- **Sautour M., Mitaine-Offer A.C., Miyamoto T., Dongmo A.** (2004). A new steroidal saponin from *Dioscorea cayenensis*. *Chem. Pharm. Bull.* **52** (11), 1353-1355.
- **Sautour M., Mitaine-Offer A.-C., Lacaille-Dubois M.-A.** (2007). The *Dioscorea* genus : a review of bioactive steroid saponins. *J. Nat. Med.* **61**, 91-101.
- **Sautour M., Miyamoto T., Lacaille-Dubois M.A.** (2006). Steroidal saponins and flavan-3-ol glycosides from *Dioscorea villosa*. *Biochem. Syst. Ecol.*
- **Sautour, M., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Wagner, H., Lacaille-Dubois, M.-A.** (2004). A new phenanthrene glycoside and other constituents from *Dioscorea opposita*. *Chem. Pharm. Bull.* **52** (10), 1235-1237.
- **Savikin-Fodulovic, K., Grubisic, D., Culafic, L., Menkovic, N., Ristic, M.** (1998). Diosgenin and phytosterols content in five callus lines of *Dioscorea balcanica*. *Plant Science* **135**, 63-67.
- **Shriram, V. Jahagirdar, S., Latha, C., Kumar, V., Puranik, V., Rojatkhar, S., Dhakephalkar, P.K., Shitole, M.G.** (2008). A potential plasmid-curing agent, 8-epidiosbulbin E acetate, from *Dioscorea bulbifera* L. against multidrug-resistant bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents* **32**, 405-410.
- **Silayo A., Ngadjui B.T., Abegaz B.M.** (1999). Homoisoflavonoids and stilbenes from the bulbs of *Scilla nervosa* subsp. *rigidifolia*. *Phytochemistry* **52** (5), 947-955.
- **Sparg, S.G., van Staden, J., Jager, A.K.** (2002). Pharmacological and phytochemical screening of two Hyacinthaceae species: *Scilla natalensis* and *Ledebouria ovatifolia*. *J. Ethnopharmacol.* **80**, 95-101.
- **Steyn P.S., Van Harden F.R.** (1998). Bufadienolides of plant and animal origin. *Nat. Prod. Rep.*, 397 – 413
- **Sunder, R., Rangaswami, S., Reddy, G. C. S.** (1978). A new dihydrophenanthrene from *Dioscorea decipiens*. *Phytochemistry* **17**, 1067.

- **Swanson-Mungerson, M., Ikeda, M., Lev, L., Longnecker, R., Portis, T.** (2003). Identification of latent membrane protein 2A (LMP 2A) specific targets for treatment and eradication of Epstein-Barr virus (EBV)-associated diseases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52 (2), 152-154.
- **Takasugi, M., Kawashima, S., Monde, K., Katsui, N., Masamune, T., Shirata, A.** (1987). Antifungal compounds from *Dioscorea batatas* inoculated with *Pseudomonas cichorii*. *Phytochemistry* 26 (2), 371-375.
- **Taylor J.L.S., van Staden J.** (2001). COX-1 inhibitory activity in extracts from *Eucomis* L'Herit. species. *J. Ethnopharmacol.* 73 (2-3), 257-265.
- **Tempone A.G., Pimenta D.C., Lebrun I., Sartorelli P., Taniwaki N.N., De Andrade Jr H.F., Antoniazzi M.M., Jared C.** (2008). Antileishmanial and antipyransomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. *Toxicon* 52, 13-21.
- **Teponno, R.B., Tapondjou, A.L., Abou-Mansour, E., Stoekli-Evans, H., Tane, P., Barboni, L.** (2008). Bafoudiosbulbins F and G further clerodane diterpenoids from *Dioscorea bulbifera* L. var *sativa* and revised structure of Bafoudiosbulbin B. *Phytochemistry* 69, 2374-2379.
- **Teponno, R.B., Tapondjou, A.L., Gatsing, D., Djoukeng, J.D., Abou-Mansour, E., Tabacchi, R., Tane, P., Stoekli-Evans, H., Lontsi, D.** (2006). Bafoudiosbulbins A and B two anti-salmonellal clerodane diterpenoids from *Dioscorea bulbifera* L. var *sativa*. *Phytochemistry* 67, 1957-1963.
- **Teponno, R.B., Tapondjou, A.L., Gatsing, D., Djoukeng, J.D., Abou-Mansour, E., Tabacchi, R., Tane, P., Stoekli-Evans, H., Lontsi, D.** (2007). Corrigendum to "Bafoudiosbulbins A and B two anti-salmonellal clerodane diterpenoids from *Dioscorea bulbifera* L. var *sativa*". *Phytochemistry* 68, 1480.
- **Teponno, R.B., Tapondjou, A.L., Ju-Jung, H., Nam, J.-H., R., Tane, P., Park, H.-J.** (2007). Three new clerodane diterpenoids from the bulbils of *Dioscorea bulbifera* L. var *sativa*. *Helv. Chim. Acta* 90, 1599-1605.
- **Terrac M.-L.** (1947). Contribution à l'étude de plantes médicinales de Madagascar, de la Réunion et de l'île Maurice. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de Paris, Imprimerie Vuibert, Paris, 246 pages.
- **Tewtrakul S., Itharat A.** (2007). Nitric oxide inhibitory substances from the rhizomes of *Dioscorea membranacea*. *J. Ethnopharmacol.* 109, 412-416.
- **Tewtrakul S., Itharat A., Rattanasuwan P.** (2006). Anti-HIV-1 protease and HIV-1 integrase activities of Thai medicinal plants known as Hua-Khao-Yen. *J. Ethnopharmacol.* 105, 312-315.
- **Tewtrakul, S., Itharat, A.** (2007). Characterisation of steroidal saponins in crude extract from *Dioscorea nipponica* Makino by liquid chromatography tandem multi-stage mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 599, 98-106.
- **Timbrell J.A.** (1995). Introduction to toxicology. 2nd Ed, Taylor & Francis, London, 167 p.
- **Trager, W., Jensen, J.B.** (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193, 673-677.
- **Udoessien E.I., Ifon E.T.** (1992). Chemical evaluation of some antinutritional constituents in four species of yam. *Trop. Sci.* 32, 115-119.
- **Van Wyk B.E., van Oudtsboom B., Gericke N.** (1997). Medicinal plants of South Africa. 2nd Ed, Briza Publications

- **Van Wyk, B.-E., Gericke, N.** (2000). People's Plants: a guide to useful plants of Southern Africa. 1st ed. Briza Publications, Pretoria.
- **Verbiscar, A.J., Patel, J., Banigan, T.F., Schatz, R.A.** (1986). Scilliroside and other scilla compounds in red squill. *J. Agric. Food Chem.* **34**: 973-979
- **von Wartburg, A. et Renz, J.** (1959). Die Konstitution des Scillirosidins. *Helv. Chim. Acta* **174**, 1620-1642.
- **Wang G., Chen H., Huan M., Wang N., Zhang J., Zang Y., Bai G., Fong W-F., Yang M., Yao X.** (2006). Methyl protoneodioscin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in Hep G2 liver cancer cells. *Cancer Letters* **241**, 102-109.
- **Watson A.A., Nash R.J., Wormald M.R., Harvey D.J., Dealler D., Lees E., Asano N., Kizu H., Kato A., Griffiths R.C., Cairns A.J., Fleet G.W.J.** (1997). Glycosidase-inhibiting pyrrolidine alkaloids from *Hyacinthoides non-scripta*. *Phytochemistry* **46** (2), 255-259.
- **Watt, J.M., Breyer-Brandwyk, M.G.** (1962). Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa. 2nd ed. E. & S. Livingstone, Edinburgh
- **Wilkin, P., Schols, P., Chase, M. W., Chayamarit, K., Furness, C. A., Huysmans, S., Rakotonasolo, F., Smets, E., Thapayai** (2005). A plastid gene phylogeny of the yam genus, *Dioscorea*: roots, fruits of Madagascar. *Systematic Botany* **30** (4), 736-749.
- **Wolter, F., Clausnitzer, A., Akoglu, B., Stein, B.** (2002). Piceatannol, a natural analog of resveratrol, inhibits progression through the S phase of the cell cycle in colorectal cancer cell lines. *J. Nutr.* **132**, 298-302.
- **World Health Organization (WHO)** (1996). Users' manual for the IPCS (International Programme on Chemical Safety) health and safety guides, Geneva, 127 p.
- **Yamamoto, T.** (1975). Stages in development ; In: Yamamoto, T. (Ed.), Medaka (Killfish): Biology and strains. *Keigaru Publ. Co: Tokyo*, pp.30-58.
- **Yang, D.-J., Lin, J.-T.** (2008). Effects of different storage conditions on steroidal saponins in yam (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto) tubers. *Food Chem.* **110**, 670-677.
- **Yin J., Kouda K., Tezuka Y., Le Tran Q., Miyahara T., Chen Y., Kadota S.** (2003). Steroidal glycosides from the rhizomes of *Dioscorea spongiosa*. *J. Nat. Prod* **66**, 646-650.
- **Yin J., Tezuka Y., Kouda K., Le Tran Q., Miyahara T., Chen Y., Kadota S.** (2004). *In vivo* antiosteoporotic activity of a fraction of *Dioscorea spongiosa* and its constituents 22-O-methylprotodioscin. *Planta Med.* **70**, 220-226.
- **Zhao G., Kan J., LI Z., Chen Z.** (2005). Structural features and immunological activity of a polysaccharide from *Dioscorea opposita* Thunb roots. *Carbohydrate Polymers* **61**, 125-131.
- <http://www.food-info.net/fr/products/rt/intro.htm> (consulté en mai 2007)
- <http://www.kew.org/scihort/madagascar/projects/yams/Yams.html> (consulté en mai 2007)
- <http://www.amessi.org/La-quercetine-des-proprietes> (consulté en juin 2009)
- <http://www.kew.org/scihort/madagascar/projects/yams/Yams.html> (consulté en mai 2007)
- <http://www.menabe.gov.mg> (consulté en juin 2007)
- <http://tolweb.org/Hyacinthaceae> (consulté en juin 2009)

RESUME

Deux plantes endémiques de Madagascar, *Dioscorea antaly* Jum. et Perr., une Dioscoreaceae consommée après traitement pendant la période de soudure et *Rhodocodon madagascariensis* Baker, une Hyacinthaceae utilisée comme raticide ont été étudiées du point de vue chimique et toxicologique.

Quinze composés, dont cinq diterpénoïdes de type clérodane, quatre flavonoïdes, une catéchine et cinq stilbénoides ont été isolés des tubercules de *Dioscorea antaly*. Quatre des diterpénoïdes, les antadiosbulbines A et B et les 8-épidiosbulbines E et G sont originaux tandis que les onze autres composés avaient déjà été décrits dans d'autres espèces, soit de Dioscoreaceae, soit d'autres plantes. L'extrait brut des tubercules est toxique pour diverses espèces animales à sang chaud tels la souris, le rat, le cobaye et le poulet et aussi pour le poisson. Chez la souris, les DL50 24 h, par voie orale et par voie intrapéritonéale sont respectivement de 5 g/kg et 1 g/kg. Chez cet animal, l'extrait provoque au niveau de différents organes (cerveau, cœur, foie, poumons, reins, estomac et intestin) des lésions comprenant notamment des congestions vasculaires, des réactions inflammatoires et des œdèmes. La nature et l'importance de ces dommages tissulaires varient selon la voie d'administration, la dose administrée et la durée de l'exposition. L'extrait brut ne provoque pas de modifications anatomopathologiques évidentes chez le poisson médaka (*Oryzia latipes*), à l'exception du foie qui présente une augmentation de la largeur et de l'épaisseur des capillaires sinusoïdaux. L'extrait brut est toxique pour *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio fischeri*, *V. harveyi*, mais inactif sur *Salmonella typhi* et *Candida tropicalis*. Il n'est pas cytotoxique et ne possède pas d'activité anti-malariale, ni de propriété anti-inflammatoire. Les tubercules de *D. antaly* doivent être correctement détoxiqués avant consommation.

Trois bufadiénolides, le scilliroside, la scillirosidine et l'hellébrigénine ont été isolés des bulbes de *Rhodocodon madagascariensis* Baker ; ils avaient été caractérisés chez d'autres espèces de Hyacinthaceae et chez le crapaud. L'extrait aqueux brut de cette plante est toxique pour la souris, le rat, le cobaye et le poulet, ainsi que pour les têtards de grenouille et le poisson. Chez la souris, il provoque des lésions anatomopathologiques au niveau de nombreux organes : cerveau, cœur, foie, poumons, reins, estomac et intestin. Comme pour l'extrait de *D. antaly*, la nature et l'importance des lésions qui sont essentiellement des réactions inflammatoires, des congestions vasculaires et des œdèmes varient selon la dose, la voie d'administration et le temps d'exposition à l'extrait. Le cerveau, le foie, les poumons et le cœur sont les plus atteints. Chez *Oryzia latipes*, l'extrait de *R. madagascariensis* retarde le développement embryonnaire. L'extrait n'a pas présenté d'activité antimicrobienne. L'utilisation comme pesticide de *R. madagascariensis* devrait être accompagnée de précautions.

Mots-clés: *Dioscorea antaly*, Dioscoreaceae, *Rhodocodon madagascariensis*, Hyacinthaceae, diosbulbines, diterpènes, bufadiénolides, toxiques, lésions tissulaires, propriétés antimicrobiennes, raticide, appâts empoisonnés.

SUMMARY

Two malagasy plants, *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. (Dioscoreaceae), which is consumed during food shortage after detoxification process and *Rhodocodon madagascariensis* Baker (Hyacinthaceae), which is used as rat poison was studied from chemical and toxicological points of view.

Five clerodane diterpenoids, four flavonoids, one catechin and five stilbenoids were isolated from *Dioscorea antaly* Jum. & Perr. tubers. Among the diterpenoids four compounds, antadiosbulbins A and B and 8-epiosbulbins E and G have new structures. The other substances were previously isolated either from other *Dioscorea* species or from other plants. The crude aqueous extract of the tubers was shown to be toxic to various warm blood animal species, such as mouse, rat, guinea pig and chicken and also to fish. In mouse, the LD₅₀ (24 h) by oral and intraperitoneal routes were 5 g/kg and 1 g/kg, respectively. In this animal, the crude extract provoked various lesions in different organs (brain, heart, liver, lungs, kidneys, stomach and intestine), which essentially included vascular congestions, inflammatory reactions and edemas. The nature and the importance of the lesions varied accordingly to the administration route, dose levels and exposure time. The crude extract did not cause obvious anatomopathological lesions on the medaka fish *Oryzia latipes*, except on the liver for which an increase in sinusoidal capillary width and thickness was observed. This crude extract was shown also toxic to *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio fischeri*, *V. harveyi*, but not toxic to *Salmonella typhi* and *Candida tropicalis*. It was not cytotoxic and had neither anti-malarial nor anti-inflammatory activities. *D. antaly* tubers must be properly detoxified before consumption.

Three bufadienolids, scilliroside, scillirosidin and hellebrigenin, were isolated from the bulbs of *Rhodocodon madagascariensis* Baker. They were previously described from other Hyacinthaceae or Liliaceae species. The plant crude extract was shown to be toxic to mouse, rat, guinea pig and chicken, and also to frog tadpoles and fish. In mouse it caused anatomopathological lesions in brain, heart, liver, lungs, kidneys, stomach and intestine. The nature and the importance of the lesions varied accordingly to the administration route, the dose levels and the exposure times. The lesions were mostly vascular congestion, inflammatory reactions and edemas. Brain, liver, lungs and heart were the most concerned. With *Oryzia latipes*, the crude extract delayed the embryonic development. No antimicrobial activity on various microorganisms was observed for the extract. The use of *R. madagascariensis* tubers as pesticide should be done with proper cautions.

Keywords: *Dioscorea antaly*, Dioscoreaceae, *Rhodocodon madagascariensis*, Hyacinthaceae, diosbulbins, bufadienolids, toxic, organ lesions, anti-microbial activity, rat poison, poisonous baits.