



RAPPORT DE TRAVAUX DE RECHERCHE POST-DOCTORALE 2013

Présenté par

Madame RALAMBONIRINA RASOARIVELO Tiana Sylvia

Docteur en Chimie Moléculaire des Produits Naturels

Chercheur au Centre National d'Application de Recherches Pharmaceutiques (CNARP)

Bénéficiaire de bourse BGF 2013

Thème de recherche :

Etudes chimique et biologique de quelques plantes médicinales de Madagascar

Résumé :

Nos recherches en 2013 ont permis d'évaluer dix espèces végétales appartenant aux genres *Razafimandimbisonia*, *Hyperacanthus*, *Psychotria*, *Cryptocarya*, *Dilobeia* et *Gymnosporia* : 15 molécules biologiquement actives identifiées dont 4 nouvelles structures, une dizaine de produits de profil intéressant en cours d'identification.

Mots clés :

Plantes médicinales, Phytochimie bioguidée, Principe actif

Introduction

Le Centre National d'Application de Recherches Pharmaceutiques (CNARP), rattaché au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, est un Centre de recherches se focalisant sur l'exploitation des plantes médicinales à travers les disciplines suivantes : botanique et ethnobotanique, chimie, biologie et pharmacologie, clinique, production de phytomédicaments.

La Phytodiversité de Madagascar étant riche constitue un réservoir exceptionnel pour la recherche de substances biologiquement actives.

Dans ce domaine, plusieurs activités phytochimiques sont menées au sein du Département de Chimie du CNARP : extraction et isolement bioguidés de molécules végétales, contrôle de qualité des produits naturels, production de phytomédicaments. Outre la recherche de nouveaux médicaments, la phytochimie à visée thérapeutique contribue à la valorisation des ressources naturelles de Madagascar et à la valorisation de la Pharmacopée Malagasy.

En 2013, quelques recherches phytochimiques effectuées par une équipe de chercheurs du CNARP ont été poursuivies au sein de l'Université Paris Descartes dans le cadre d'un stage post-doctoral. Cette mobilité a été financée par la bourse SCAC. Le séjour à Paris nous a donné l'occasion de réaliser de nombreuses analyses non disponibles à Madagascar, ce qui a permis d'obtenir d'importants résultats et d'avancer de grands pas dans nos recherches. Une autre mission cruciale effectuée lors de ce séjour est la mise au point du projet de collaboration entre le CNARP et l'Université Paris Descartes, dont la rédaction commune est en cours.

I - Recherches réalisées au CNARP (Madagascar) entre Janvier 2013 et Octobre 2013

Les recherches réalisées en 2013 consistent à l'étude d'une dizaine de plantes appartenant aux familles Rubiaceae, Lauraceae, Proteaceae et Celastraceae en vue d'isoler des molécules à potentialité thérapeutique, en procédant par une phytochimie bioguidée.

Ces plantes (liste présentée dans le tableau n°1) ont été choisies selon leur endémicité, leur disponibilité et les résultats biologiques préliminaires, elles ne présentent que peu de données scientifiques disponibles dans la littérature à notre connaissance. L'identité de chaque espèce a été vérifiée par les botanistes du CNARP, et est référencée par des herbiers.

Sur le plan chimique, les matériels et produits existants au CNARP permettent l'isolement de molécules. La stratégie consiste à la mise au point de technique d'isolement par des analyses préliminaires, productions d'extraits à grande échelle par extraction successive à partir de poudre végétale sèche, fractionnement et purification bioguidée, par partage liquide-liquide et par divers méthodes chromatographiques (chromatographie sur colonne de silice et sur LH 20, CCM).

Sur le plan biologique, nous pouvons bioguider les purifications par les tests suivants :

- Activité sur *Plasmodium falciparum* FCM29, souche naturellement résistante à la chloroquine, utilisant la méthode de fluorescence avec SYBR Green I
- Activité sur une dizaine d'espèces bactériennes de référence (Gram négatif et Gram positif) et sur des champignons par antibiogramme (mesure de zone d'inhibition par méthode de disques), par détermination de CMI et CMB (méthode de microdilution en milieu liquide) et par bioautography (technique combinant la CCM et la culture bactérienne en milieu solide)
- Activité antioxydante par CCM pulvérisée au DPPH et par spectrophotométrie UV/visible (quantification de la capacité antioxydante du produit analysé sur le DPPH)

Les extractions à partir de poudre végétale sèche des 10 espèces végétales suivies de fractionnements et purifications bioguidés, en utilisant divers méthodes chromatographiques ont permis de sortir 135 produits isolés (tableau n°1).

II - Recherche réalisée au Laboratoire de Pharmacognosie et au Laboratoire de Microbiologie de Paris V (France) : Novembre – Décembre 2013

Ayant bénéficiée d'une bourse SCAC, les 135 produits naturels isolés au CNARP ont été apportés au sein du laboratoire de Pharmacognosie en vue de détermination structurale, de purification complémentaire et d'étude biologique. D'autre part, des extraits bruts d'autres plantes de la famille Rubiaceae ont été amenés pour effectuer des études microbiologiques approfondies.

Les analyses spectrales des 135 produits consistent à la spectroscopie de RMN monodimensionnel et bidimensionnel et à la spectrométrie de masse.

En ce qui concerne les purifications, quelques fractions non purifiables par chromatographie sur silice phase normale ont été apportées pour isolement avec une méthode chromatographique récente : la CPC (Centrifugal Partition Chromatography).

Sur le plan biologique, 6 échantillons d'huiles essentielles, 14 extraits bruts et 20 produits purifiés ont été soumis pour analyse antibactérienne avec la méthode de dilution en gélose en milieu solide utilisant l'inoculateur de Steers. Un panel de 68 souches appartenant à 48 espèces bactériennes a été utilisé durant les screenings et les déterminations de CMI des extraits et des molécules purifiées : 30 souches (18 espèces) à Gram positif et 38 souches (31 espèces) à Gram négatif.

III – Résumé des résultats obtenus à Madagascar et en France en 2013

Résultats chimiques

Pour l'ensemble des plantes, 15 molécules ont été identifiées dont 4 nouvelles structures (pyrones, coumarines, flavonoïdes, iridoïdes). Une dizaine d'autres molécules de familles chimiques variées sont en cours d'identification.

Résultats biologiques

Les études des produits purifiés ont conduit à la découverte de nouvelles pyrones et flavonoïdes à potentialité antibactérienne large spectre. D'autre part, les études des extraits de Rubiaceae nous ont donnés des résultats servant pour orienter la suite de la recherche.

Les résultats obtenus au CNARP et à Paris V sont résumés dans le tableau n°1.

Tableau n°1 – Résumé des résultats obtenus au CNARP et à Paris V en 2013

Plantes étudiées	Résultats chimiques	Résultats biologiques
<i>Razafimandimbisonia sambiranensis</i> (Rubiaceae)	45 produits sortis au CNARP : 5 produits identifiés : une nouvelle coumarine , 2 iridoïdes et 2 flavanols 11 produits de profil intéressant en cours d'identification (analyses réalisées) : dont 5 de profil iridoïdes et 6 de profil phénolique,	Activités antibactériennes des flavanols de <i>R. sambiranensis</i> meilleures activités (vers 25 mg/l) ont été observées sur <i>Bacillus cereus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Razafimandimbisonia humblotii</i> et <i>Razafimandimbisonia orientalis</i> (Rubiaceae)	Préparation d'extraits bruts Fractionnement grossier des extraits : obtention de fraction hexanique, fraction acétate d'éthyle et fraction aqueuse pour chaque plante	Meilleures activités biologiques observées pour extraits et/ou fractions : IC ₅₀ sur <i>P. falciparum</i> 3,47 µg/ml Halo d'inhibition (mm) : sur <i>S. aureus</i> 11±0,5 et sur <i>K. pneumoniae</i> 14±0,0 Extraits et fractions inhibent 27 espèces bactériennes sur les 48 testés, actifs notamment sur <i>Aeromonas hydrophila</i> , les <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> et <i>Bacillus cereus</i>
<i>Hyperacanthus talangnignia</i> (Rubiaceae)	9 produits sortis au CNARP : 5 produits identifiés : un nouvel flavonoïde , un autre flavonoïde, 2 iridoïdes et un stérol 4 produits de profil intéressant en cours d'identification	Activités des iridoïdes : les espèces les plus sensibles sont des bactéries à Gram négatif dont <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Comamonas acidovorans</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Achromobacter xylosoxidans</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .
<i>Hyperacanthus mangoroensis</i> , <i>Hyperacanthus thouvenotii</i> et <i>Hyperacanthus poivreii</i> (Rubiaceae)	Préparation d'extraits bruts Fractionnement grossier des extraits : obtention de fraction hexanique, fraction acétate d'éthyle et fraction aqueuse pour chaque plante	Les extraits de feuilles de <i>Hyperacanthus poivreii</i> et <i>Hyperacanthus thouvenotii</i> inhibent une dizaine d'espèces bactériennes pathogènes (<i>Achromobacter xylosoxidans</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Comamonas testosteroni</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Enterococcus gallinarum</i> , <i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , <i>Bacillus cereus</i> <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas mosselii</i>)
<i>Psychotria bridsoniae</i> et <i>Psychotria oreothrephes</i> (Rubiaceae)	27 produits sortis au CNARP : 2 iridoïdes identifiés 6 molécules isolées en cours d'identification dont 2 de profil alcaloïde, 2 de profil iridoïde et 2 de profil phénolique	IC ₅₀ sur <i>P. falciparum</i> 18,41 µg/ml Halo d'inhibition (mm) : sur <i>S. aureus</i> 11±0,1 et sur <i>K. pneumoniae</i> 12±0,1 Les produits de <i>P. bridsoniae</i> inhibent 36 sur 48 et ceux de <i>P. oreothrephes</i> 29 sur 48 ; les espèces bactériennes les plus sensibles sont : <i>Shigella sonnei</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Flavimonas oryzihabitans</i> , les <i>Staphylococcus</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Providencia stuartii</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Comamonas acidovorans</i> , <i>Pseudomonas mosselii</i>
<i>Cryptocarya dealbata</i> et <i>Cryptocarya retusa</i> (Lauraceae)	40 produits sortis au CNARP : 2 nouveaux pyrones identifiés, 2 autres pyrones connus et un flavonoïde connu Molécules en cours d'identification : 9 produits de profil pyrone, 5 produits de profil triterpène	Produits triterpéniques actifs à partir de 50 mg/l sur : <i>Brevundimonas diminuta</i> , <i>Comamonas acidovorans</i> , <i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus gallinarum</i> , <i>Pseudomonas monteilii</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus haemolyticus</i> , <i>Staphylococcus lugdunensis</i> , et <i>Staphylococcus saprophyticus</i> Pyrones actif à 25 mg/l sur : <i>Enterococcus avium</i> , <i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>Enterococcus durans</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , et <i>Enterococcus gallinarum</i>
<i>Dilobeia thouarsii</i> (Proteaceae)	13 produits sortis au CNARP : 4 composés phénoliques en cours d'identification	Evaluation biologique en cours
<i>Gymnosporia polyacantha</i> (Celastraceae) :	1 produit sorti au CNARP : un nouvel flavonoïde identifié	IC ₅₀ sur <i>P. falciparum</i> <0,39 µg/ml Halo d'inhibition (mm) : sur <i>S. aureus</i> 8±0,5 et sur <i>K. pneumoniae</i> 10±0,5

IV – Suite de recherche envisagée

Une partie de ces résultats nous permettent de rédiger cinq articles pour publications internationales ; les titres provisoires et les auteurs sont les suivants :

Sylvia T. Ralambonirina Rasoarivelo, Sylvie Michel, M. Ratsimbason, B. Deguin, « Iridoïdes de *Razafimandimbisonia sambiranensis* (Rubiaceae) »

Sylvia T. Ralambonirina Rasoarivelo, Sylvie Michel, M. Ratsimbason, R. Grougnet, Vahinalahaja Razafintsalama, M. Lecsö, B. Deguin, « Etude chimique et biologique des composés phénoliques de *Razafimandimbisonia sambiranensis* (Rubiaceae)»

Sylvia T. Ralambonirina Rasoarivelo, Faliarivony Randriamialinoro, Lalasoanirina Ranarivelo, Sylvie Michel, M. Ratsimbason, R. Grougnet, B. Deguin, « Nouveaux pyrones isolés de deux espèces de *Cryptocarya* (Lauraceae) de Madagascar »

Faliarivony Randriamialinoro, Vahinalahaja Razafintsalama, Sylvia T. Ralambonirina Rasoarivelo, Lalasoanirina Ranarivelo, Sylvie Michel, M. Ratsimbason, M. Lecsö, R. Grougnet, B. Deguin, « Activité biologique des molécules de deux espèces de *Cryptocarya* (Lauraceae) de Madagascar »

Faliarivony Randriamialinoro, Vahinalahaja Razafintsalama, Sylvia T. Ralambonirina Rasoarivelo, Lalasoanirina Ranarivelo, Sylvie Michel, M. Ratsimbason, R. Grougnet, B. Deguin, « Nouvel flavonoïde isolé de *Gymnosporia polyacantha* (Celastraceae): étude chimique et biologique »

D'autre part, les résultats obtenus pour les Rubiaceae nous servent de guide pour la suite de notre recherche : les intérêts chimiques et biologiques des genres végétaux *Razafimandimbisonia* et *Hyperacanthus* ont été mis en évidence par le biais des résultats suivants :

- de nouvelles structures chimiques et des produits à potentialité antibactérienne ont été isolés de *Razafimandimbisonia sambiranensis* et de *Hyperacanthus talangnignia*.
- les extraits de *Razafimandimbisonia humblotii*, *Razafimandimbisonia orientalis*, *Hyperacanthus mangoroensis*, *Hyperacanthus thouvenotii* et *Hyperacanthus poivreii* sont actifs sur plusieurs bactéries

Ainsi nous souhaitons approfondir les études sur les genres végétaux *Razafimandimbisonia* et *Hyperacanthus*. Vu que ces plantes ne présentent que très peu de données dans la littérature, nous envisageons de sortir leurs principes actifs ainsi que de nouvelles structures chimiques.

V-Remerciements

C'est avec une grande émotion et beaucoup de sincérité que je voudrais exprimer ma gratitude à toutes les personnes ayant participé à la réalisation de ce travail. Pour cela, je tiens à exprimer ma reconnaissance et mes remerciements :

- au SCAC/Ambassade de France pour la Bourse postdoctorale qui m'a été octroyée et qui m'a permis le séjour en France
- au Laboratoire de Pharmacognosie de Paris V et son équipe, particulièrement le Professeur Brigitte DEGUIN, qui a accepté avec un grand enthousiasme d'être ma responsable scientifique durant mon stage, le Professeur Sylvie MICHEL qui m'a accueilli et m'a permis de travailler dans une ambiance motivante, et le Docteur Raphaël GROUGNET pour ses conseils dans les analyses en CPC et en RMN
- au Directeur du CNARP, Docteur Michel RATSIMBASON, pour m'avoir donné l'opportunité de postuler à la Bourse du Gouvernement Français (BGF) et pour ses conseils
- au Docteur Marylin LECSO - BORNET (Laboratoire de Microbiologie de l'Université Paris Descartes) pour sa collaboration dans les analyses biologiques.
- A toutes les équipes du CNARP, du Département Botanique au Département Clinique

VI-Références bibliographiques

- Siegfried E. Drewes, Marion M. Horn, Joseph D. Connolly and Barry Bredenkamp, "Enolic iridolactone and other iridoids from *Alberta magna*", *Phytochemistry*, vol 47, n°6, p 991 – 996, 1998
- S. E. Drewes, Marion M. Horn and C. Saroja Wijewardene- « Alpha-pyrone from *Cryptocarya latifolia* - A structural isomer of umuravumbolide" - (1996) *Phytochemistry* **41** N°1 pp 333-334
- V. Dumontet, Christiane Gaspard, Nguyen Van Hung, Jacques Fahy, Luba Tchertanov, Thierry Sévenet and Françoise Guéritte – « New cytotoxic flavonoids from *Cryptocarya infectoria*"- (2001) *Tetrahedron* **57** pp 6189-6196
- M. B. Sehlapelo, Siegfried E. Drewes and Robert Scott-Shaw –« A 6-substitutes 5,6-dihydro-alpha-pyrone from two species of *Cryptocarya*" - (1994) *Phytochemistry* **37**- N°3 - pp 847-849
- Weimin Zhao, Genjin Yang, Rensheng Xu and Guowei Qin, "Three monoterpenes from *mussaenda pubescens*", *Phytochemistry*, vol 41, n°6, p 1553 – 1555, 1996
- Yoshio Takeda, hircshni Nishimura and Hiroyuki Inouye, "Two new iridoid glucosides from *Mussaenda parviflora* and *Mussaenda shikokiana*", *Phytochemistry*, vol 16, p 1401 – 1404, 1977