

Flavonoïde D'abrahamia Suarezensis Randrian. & Lowry (Anacardiaceae)

[Flavonoid Of Abrahamia Suarezensis Randrian. & Lowry (Anacardiaceae)]

Aina Raharilavitra¹, Dimbiniala Andriamamonjisoa², Raominasolo Jesuca Rasolofomanana³, Maminiaina Christian Randriamboangiarivonisoa⁴, Stephan Richard Rakotonandrasana⁵, Oliver Rakotoarison⁶, Lovasoa Rabesiaka⁷, Mahefarivo Andrianjakaniaina⁸, Bernard Anselme Ravelonjato⁹

^{1, 2, 3, 4, 5, 8, 9}Centre National d'Application de Recherches Pharmacétiques

Ambodivoanjo-Ambohijatovo, Rue RP, Rahajarizafy Antoine de Padoue, BP 702, 101 Antananarivo, Madagascar

⁶Laboratoire de Pharmacodynamie, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo
Madagascar

⁷Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Chimie Organique Biologique, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo
Madagascar



Résumé – Dans le cadre de la valorisation de la flore malagasy, ce travail vise à rechercher par bioguidage des composés biologiquement actifs présents dans les rameaux feuillés d'*Abrahamia suarezensis* (Anacardiaceae) endémique de Madagascar. Le screening phytochimique a révélé la présence dans la plante des stéroïdes lactoniques, stérols insaturés, flavonoïdes du type flavonol, et de tanins condensés ce qui a conduit à un partage liquide-liquide de la solution aqueuse de l'extrait éthanolique successivement avec hexane, acétate d'éthyle et butanol. Le criblage biologique des extraits acétate d'éthyle (ESAc) et butanolique (ESBu) ont permis de mettre en évidence des activités antihistaminique et antioxydante intéressantes de la plante. Les extraits ESAC ($CI_{50} = 6,05 \mu\text{g.ml}^{-1}$) et ESBu ($CI_{50} = 7,19 \mu\text{g.ml}^{-1}$) ont montré une activité antioxydante plus forte que celle du témoin positif, la vitamine E ($CI_{50} = 11,39 \mu\text{g.ml}^{-1}$). L'évaluation de la toxicité aiguë de l'ESAc sur les souris Swiss n'a provoqué aucun décès jusqu'à la dose de 5000 mg.kg⁻¹. Une diminution de l'activité motrice a été constatée à partir de 500 mg.kg⁻¹. Le processus de fractionnement bioguidé de l'extrait ESAC, le plus actif, a permis l'obtention de la fraction E₉ (100% d'inhibition de la contraction en test antihistaminique, $CI_{50} = 3,32 \mu\text{g.ml}^{-1}$ en test antioxydant) dont sa purification a conduit à l'isolement du composé F₄.

La détermination de structure des composés utilisant une combinaison des expériences RMN 1D et 2D incluant COSY, HSQC, HMBIC et spectrométrie de masse, a permis d'identifier le kaempférol-3-O- α -rhamnopyranoside et de déceler par ESI⁺ la présence d'un kaempférol-O-pentoside.

Mots clés – *Abrahamia suarezensis*, fractionnement bioguidé, flavonoïde, antihistaminique, antioxydant.

Abstract – Within the framework of the valorization of the Malagasy flora, this work aims to search by bioguiding for biologically active compounds present in the leafy branches of *Abrahamia suarezensis* (Anacardiaceae) endemic to Madagascar. The phytochemical screening revealed the presence in the plant of lactonic steroids, unsaturated sterols, flavonoids of the flavonol type, and condensed tannins which led to a liquid-liquid partition of the aqueous solution of the ethanolic extract successively with hexane, ethyl acetate and

butanol. Biological screening of ethyl acetate (ESAc) and butanol (ESBu) extracts revealed interesting antihistamine and antioxidant activities of the plant. The ESAC ($IC_{50} = 6.05 \mu\text{g.ml}^{-1}$) and ESBu ($IC_{50} = 7.19 \mu\text{g.ml}^{-1}$) extracts showed stronger antioxidant activity than that of the positive control, vitamin E ($IC_{50} = 11.39 \mu\text{g.ml}^{-1}$). Evaluation of the acute toxicity of ESAC in Swiss mice did not cause any deaths up to the dose of 5000 mg.kg^{-1} . A decrease in motor activity was observed from 500 mg.kg^{-1} . The bioguided fractionation process of the ESAC extract, the most active, made it possible to obtain fraction E₉ (100% inhibition of contraction in antihistamine test, $IC_{50} = 3.32 \mu\text{g.ml}^{-1}$ in antioxidant test) of which its purification led to the isolation of compound F₄.

Determination of the structure of compound using a combination of 1D and 2D NMR experiments including COSY, HSQC, HMBC and mass spectrometry, made it possible to identify it as kaempferol-3-O- α -rhamnopyranoside and to detect by ESI⁺ the presence of a kaempferol-O-pentoside.

Keywords – *Abrahamia suarezensis*, bioguided fractionation, flavonoid, antihistaminic, antioxidant.

I. INTRODUCTION

Les allergies dues à certains allergènes présents dans l'air, surtout pollué ou dans les aliments sont devenues de plus en plus importantes, plus particulièrement dans les pays développés [1]. Les feux de brousse, les fumées émanant des véhicules et des industries constituent des facteurs favorisant des allergies respiratoires. Les antihistaminiques en vente libre et sur ordonnance sont efficaces pour soulager les symptômes, mais ils peuvent provoquer des effets secondaires, telles que la somnolence et la nausée. En conséquence, certaines personnes souhaitent essayer des alternatives naturelles. Les radicaux libres sont impliqués dans l'étiologie de bon nombre de désordres métaboliques (hypertension, rhumatismes, cancers, etc.) [2]. Les antioxydants naturels suscitent de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires. L'étude phytochimique et biologique d'*Abrahamia suarezensis*, une Anacardiaceae endémique de Madagascar, a pour objectif l'isolement et la caractérisation chimique et biologique de composés dotés d'activité(s) antihistaminique et/ou antioxydante prometteuses pouvant être une réponse de traitements ou venir en complément aux traitements actuels. A notre connaissance, cette plante n'est pas utilisée en tant que plante médicinale et n'a pas encore fait l'objet d'une étude biologique et phytochimique approfondie.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Procédure générale expérimentale

Les analyses en chromatographie en phase liquide couplée avec un spectromètre de masse ont été réalisées en couplant le système LC à un spectromètre de masse hybride quadripolaire à temps de vol Agilent 6546 (Agilent Technologies, Massy, France) équipé d'une source ESI, fonctionnant en mode ions positifs. L'acquisition et le traitement des données LC-UV et MS ont été effectués à l'aide du logiciel MassHunter Workstation (Agilent Technologies, Massy, France).

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance 400 MHz avec une sonde triple noyau inverse Proton-Carbone-Azote (TXI 400 S1 1,7mm) avec gradient Z. Les échantillons ont été solubilisés dans le solvant deutéré CD₃OD dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) ; les constantes de couplage sont exprimées en Hz. Les logiciels NMR notebook et MestreNova ont été utilisés pour l'analyse des spectres. La CCM analytique a été réalisée sur des plaques de Si gel 60 F254 pré-enduites (Merck). Les composés ont été détectés sous UV (254 et 366 nm) avant de pulvériser soit une solution de vanilline sulfurique dans EtOH suivi d'un chauffage de la plaque à 110 °C ou avec 5 % de réactif chlorure ferrique éthanolique. La CCM préparative a utilisé des plaques en verre recouverte de gel de silice 150 A Whatman (Schleicher et Schuel.). La chromatographie sur colonne a été réalisée sur du gel de silice 60 0,05 -0,2mm/70 -270 mesh ASTM (M N).

2.2. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué par les rameaux feuillés d'*Abrahamia suarezensis* récoltés dans la forêt sèche dégradée d'Ampasimena, District d'Antsiranana II, Région de DIANA. Elle ne pousse que dans la région de DIANA et de SAVA dans l'extrême Nord et Nord-Est de Madagascar. La plante a été identifiée par le Dr HDR Stephan Richard RAKOTONANDRASANA du Département Botanique et Ethnobotanique du Centre National d'Application de Recherches Pharmaceutiques (CNARP) et un spécimen d'herbier de référence ST 1026 a été déposé au Centre d'herbier de plantes médicinales de Madagascar du CNARP.

Les rameaux feuillés ont été séchés dans une chambre climatisée à la température de 55°C jusqu'à ce qu'ils soient secs puis broyés avec un broyeur mécanique WILLEY MILL modèle 2 et stockés dans des sachets poreux.

2.3. Screening phytochimique

Le criblage phytochimique, utilisant les méthodes préconisées par Fong *et al.* [3], Houghton et Raman [4], Koffi *et al.* [5], a été entrepris sur un extrait hydroéthanolique pour déceler les familles chimiques présentes dans la plante. Il est basé sur des réactions de précipitation et des réactions de coloration spécifiques à chaque classe de substances naturelles effectuées.

2.4. Extraction et isolement

La plante séchée et broyée (450 g) est extraite par macération dans l'éthanol (1,35 l) à température ambiante (3 x 24h). Après filtration et évaporation du solvant à pression réduite, l'extrait éthanolique ESEtOH (56 g) est repris avec de l'eau et soumis à un partage liquide-liquide successivement avec de l'hexane, l'acétate d'éthyle et du butanol pour donner des extraits hexanique ESHex (20,56 g), acétate d'éthyle ESAc (8,70 g) et butanolique ESBu (4,5 g). ESAc (3,5 g) a été séparé par chromatographie sur colonne de silice éluée en gradient d'éluant avec le mélange Hexane / EtOAc suivie du mélange EtOAc / MeOH puis MeOH à 100% pour donner 18 fractions notées E₁ à E₁₈. La fraction E₉ (500 mg) a été ensuite purifiée sur colonne de silice éluée en gradient d'éluant avec Hexane /EtOAc puis EtOAc / MeOH fournissant 10 sous fractions notées F₁ à F₁₀. F₄ (30,1 mg) a été purifiée sur CCM préparative utilisant le mélange CH₂Cl₂ / MeOH /H₂O (50 :18 :1) puis après avec le même mélange (45 :25 :1) pour donner le composé **2**. L'analyse LC-MS de la sous fraction F₄ a révélé la présence du composé **1** minoritaire et du composé **2**.

Kaempferol-3-O- α -rhamnoside (2), poudre jaune ; ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD, ppm) : δ_H 7,76 (2H, d, J=8,8Hz, H-2' et H-6') ; 6,94 (2H, d, J = 8,8 Hz, H-3' et H-5') ; 6,29 (1H, d, J=2 Hz, H-8) ; 6,14 (1H, d, J=2 Hz, H-6) ; 5,36 (1H, d, J=1,6 Hz, H-1'') ; 4,22 (1H, dd, J=3,3 Hz, J=1,6 Hz, H-4'') ; 3,71 (1H, dd; J=9,1 Hz, J= 3,3 Hz, H-3'') ; 3,31 (m, H-4'') ; 3,33 (m, H-5'') et 0,92 (d, J = 6,0 Hz, H-6''). ¹³C RMN (400 MHz, CD₃OD, ppm) : δ_C 179,36 (C-4) ; 169,64 (C-7) ; 163,15 (C-5) ; 161,82 (C-4') ; 158,99 (C-9) ; 158,95 (C-2) ; 136 ;12 (C-3) ; 131,97 (C-2' et C-6') ; 122,89 (C-1') ; 116,72 (C-3' et C-5') ; 105,05 (C-10) ; 103,66 (C-1'') ; 101,22 (C-6) ; 95,78 (C-8) ; 73,41 (C-5'') ; 72,31 (C-2'') ; 72,14 (C-4'') ; 72, 09 (C-3'') et 17,79 (C-6). ESIMS [M+H]⁺ m/z 433 uma.

2.5. Activités biologiques

2.5.1. Activité Antihistaminique

Le test antihistaminique a été entrepris suivant la technique générale de Magnus [6]. Cette méthode évalue l'effet inhibiteur de l'extrait sur la contraction de l'iléon induite par l'histamine. Les variations de l'amplitude des contractions pendant les tests ont été enregistrés par un enregistreur " UGOBASILE UNIRECORD 7050".

Le principe est basé sur la variation de la contraction de l'iléon isolé de cobaye maintenu à une tonicité constante, placé dans la cuve à organe rempli de liquide physiologique.

Les cochons d'Inde utilisés ont été de même âge, de sexe mâle ou femelle, pesant entre 200 g et 350 g.

Les produits à tester ont été administrés dans la cuve avec un volume de 50 μ L. Ensuite, l'organe est pré-contracté par l'histamine de concentrations cumulatives : 3.10⁻⁹ M, 3.10⁻⁸ M, 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶M.

Une concentration de 1 mg.ml⁻¹ de l'extrait préalablement dissous dans le DMSO a été administrée dans la cuve à organe suivie de l'histamine de même concentration que la solution précédente.

L'amplitude maximale de la contraction de chaque test est mesurée et utilisée pour calculer la variation par rapport à la normale.

L'effet antihistaminique de l'extrait a été exprimé en pourcentage d'inhibition selon la formule :

$$\% \text{ relaxation} = 100 \times \frac{(AH - AE)}{AH}$$

AH : amplitude de contraction induite par l'histamine seul dans la cuve.

AE : amplitude de contraction induite par l'histamine en présence d'une concentration de l'extrait dans la cuve.

Les courbes d'inhibition en fonction des concentrations de la fraction E₉ testée ont été tracées sur une échelle semi-logarithmique.

2.5.2. Activité Antioxydante

La capacité de piégeage du radical DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle) a été évaluée selon deux méthodes. La première est la méthode qualitative « bioautographie », les extraits ont été évalués par chromatographie sur couche mince selon la méthode adaptée de Takao [7]. La seconde méthode est la quantification du pouvoir antioxydant des échantillons par dosage au spectrophotomètre UV selon Awika [8]. La concentration des extraits à tester et le témoin positif (vitamine E) est de 1 mg.ml⁻¹. Dans des tubes secs, 3800 µl de la solution DPPH à 4,5% sont versées et additionnées de 200 µl d'extrait à tester de différentes dilutions (1 mg.ml⁻¹ à 6,251 mg.ml⁻¹). En parallèle, une solution dénommée blanc ou témoin négatif est préparée en additionnant 3800 µL de la solution DPPH à 4,5% et 200 µL de méthanol. L'opération s'est réalisée en tripliquette. Après incubation (30 à 60 min), l'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Visible à la longueur d'onde 517 nm. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition utilisant la formule suivante [9] :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\text{Abs Blanc} - \text{Abs Test}}{\text{Abs Blanc}} \times 100$$

Abs : absorbance à la lon

La courbe du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration est tracée et son équation est mise à profit pour calculer la valeur de la CI₅₀.

2.5.3. Toxicité aigüe

La toxicité aigüe a pour but de déterminer les concentrations létales du produit à tester sur des souris dans environ 24h, les essais ont été effectués suivant la méthode de « l'ajustement des doses » de la ligne 425 de l'OECD [10].

Des souris Swiss pesant entre 25 g et 30 g âgées de 12 semaines ont été utilisées. Elles ont été mises à jeun 12 heures avant le début de l'expérience et réparties en 5 lots de 3 souris pour chaque lot. Les animaux du premier lot, qui servent de témoins, ont reçu chacun 0,5 ml d'une solution de DMSO à 20% dans de l'eau distillée. Des solutions de concentration 200 mg.kg⁻¹, 500 mg.kg⁻¹, 2000 mg.kg⁻¹ et 5000 mg.kg⁻¹ d'extrait acétate d'éthyle dissout dans du DMSO 20% ont été administrés par voie orale respectivement sur 4 lots de trois souris chacun. Les animaux ont eu ensuite accès libre à l'eau et à la nourriture après 6 h de l'administration des produits [11]. Les comportements des animaux traités par rapport aux témoins ainsi que le taux de mortalité ont été observés et notés après 5 min, 10 min, 15 min, 30 min et 60 min puis après 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 24 h et à 48 h de l'administration de l'extrait [12].

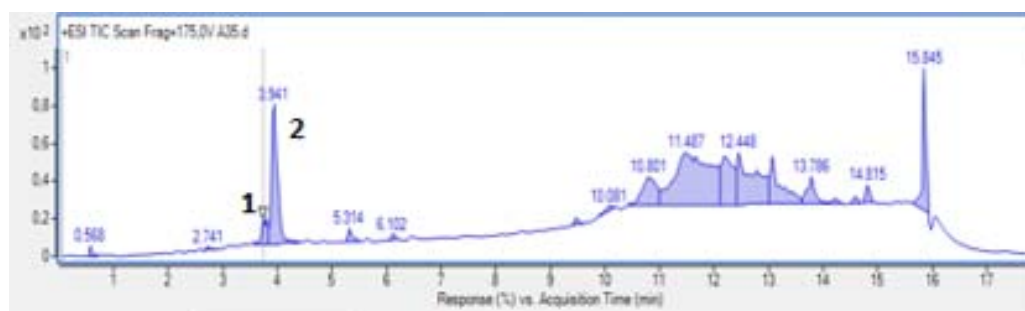
III. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Extraction et isolement

L'extrait éthanolique de poudre sèche des rameaux feuillés d'*Abrahamia suarezensis* a été soumis à un partage liquide - liquide successivement avec du n-hexane, EtOAc et n BuOH. La chromatographie sur colonne répétée utilisant du gel de silice suivie d'une chromatographie sur couche mince préparative de l'extrait EtOAc a conduit à l'isolement du composé **2**. La structure de ce composé isolé a été déterminée par les méthodes spectroscopiques incluant la RMN 1D, 2D et ESI-TOFMS. A notre connaissance, le composé **2** a été isolé d'*Abrahamia. suarezensis* pour la première fois.

Le screening phytochimique a révélé la présence dans la plante de stérols insaturés à l'état de trace, de stéroïdes lactoniques, des flavonoïdes du type flavonol et polysaccharides à l'état de trace, des polyphénols et tanins condensés en grande quantité.

L'analyse LC-MS de la sous fraction F₄ a révélé la présence du composé **1** minoritaire et du composé **2**.


 Fig 1 : Chromatogramme ESI⁺ de la sous fraction F₄

Le spectre de masse en ESI⁺ (mode positif) du composé **1** correspondant au pic à $t_r=3,74$ min (Fig. 1) montre un ion quasi-moléculaire à m/z 419[M+H]⁺ indiquant une masse moléculaire de 418 uma. L'ion fils à m/z 287 [M+H -132]⁺ démontre la perte d'une unité pentose et peut correspondre à un aglycone du type Kaempférol [13], [14]. Le fragment à m/z 441 m/z [M+Na]⁺ révèle la présence d'un ion adduit sodique et l'ion à m/z 859 correspond à [2M+Na]⁺. Ces données spectrales conduisent à envisager la présence d'un Kaempférol-*O*-pentoside.

 Tableau 1 : LC-MS des produits obtenus à partir de la sous fraction F₄

Pic	t_r (min)	Masse molaire	M+H	Ions fragments	Formule brute	Identité
1	3,74	418	419	859 [2M+Na] ⁺ 441 [M+Na] ⁺ 287 [M+H -pent] ⁺	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	Kaempférol - <i>O</i> -pentoside

La structure du composé **2** connu a été déterminée par les méthodes spectroscopiques incluant la RMN 1D, 2D et ESI-TOFMS et sur la base de la comparaison des données spectrales avec les valeurs de la littérature (Tableau 2). Le composé **2** a été isolé et purifié sous forme de poudre jaune. Son spectre de masse en ESI mode positif donne un ion quasi-moléculaire à m/z 433 [M+H]⁺ suggérant une masse moléculaire de 432 uma et correspondant à une formule brute de C₂₁H₂₀O₁₀ avec 12 degrés d'insaturation. Le fragment le plus abondant à m/z 287 [M+H-146]⁺ observé sur le spectre révèle la perte d'une unité desoxyhexose correspondant au rhamnose et peut être attribué à un aglycone de type kaempférol [13], [14]. Le composé **2** correspond à un kaempférol-rhamnoside.

Le spectre RMN montre la présence d'une génine du type flavonoïdique et d'une unité sucre. L'analyse approfondie des expériences de RMN 2D (¹H-¹H COSY, HSQC et H MBC) établit que la génine est le kaempférol. La présence du groupe méthyle à 0,92 ppm (3H, d, J = 6,0 Hz) et l'absence d'un méthylénoxy à la position C-5'' de l'unité sucre laisse suggérer la présence d'un rhamnose. Le proton anomérique apparaissant à δ_H 5,36 ppm (d, J = 1,6 Hz) sous forme de doublet caractérisé par sa constante de couplage J=1,6 Hz indique la présence d'un sucre de configuration α en H1''. Dans le spectre HMBC, la corrélation à longue distance du proton anomérique H-1'' (δ_H 5,36 ppm) du sucre avec le carbone C-3 (δ_C 136,12 ppm) de la génine a permis de situer la liaison du sucre sur la génine en position C-3.

 Tableau 2 : Comparaison des données des spectres RMN ¹H, ¹³C, HMBC du composé 2 avec la littérature

Position du carbone	Composé 2			Littérature [15]	
	δ^1H (ppm)	$\delta^{13}C$ (ppm)	HMBC	δ^1H (ppm)	$\delta^{13}C$ (ppm)
2		158,95			157,8
3		136;12			134,8
4		179,36			178,2
5		163,15			161,8
6	6,14; d; J=2 Hz	101,22	C-7, C-8, C-10	6,22; d; J = 2,1 Hz	98,6

7		169,64			165,1
8	6,29; d; J=2 Hz	95,78	C-6, C-8, C-10	6,40; d; J = 2,1 Hz	93,5
9		158,99			157,2
10		105,05			104,4
1'		122;89			121,2
2'	7,76; d; J=8,8Hz	131,97	C-2, C-4'	7,79; d; J = 8,8 Hz	130,5
3'	6,94; J= 8;8Hz	116,72	C-1', C-4'	6,96; d; J = 8,8 Hz	115,1
4'		161,82			160,2
5'	6,94; J= 8;8Hz	116,72	C-1', C-4'	6,96; d; J = 8,8 Hz	115,1
6'	7,76; d; J=8,8Hz	131,97	C-2, C-4'	7,79; d; J = 8,8 Hz	130,5
1''	5,36;d; J=1,6 Hz	103,66	C-3, C-2'', C-3'', C-4''	5,40; d; J = 1,6 Hz	102,1
2''	4,22;dd; J=3,3; 1,6 Hz	72,31		4,24; dd; J = 3,3; 1,6 Hz	70,5
3''	3,71; dd; J=9,1; 3,3 Hz	72, 09		3,73; dd; J = 9,3; 3,3 Hz	70,7
4''	3,31; m	72,14		3,35; m	71,8
5''	3,33; m	73,41		3,35; m	70,7
6''	0,92; d ; J = 6,0 Hz	17,79	C-5''	0,94; d; J = 5,6 Hz	16,3

3.2. Tests biologiques

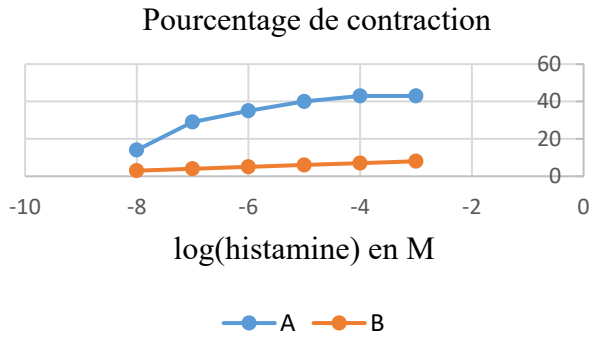
3.2.1. Test antihistaminique

Un test préliminaire antihistaminique par la technique générale de Magnus [5] a été effectué sur les quatre extraits bruts (ESEtOH, ESHex, ESAC, ESBu) et sur la fraction E₉ avec une concentration de 1 mg.ml⁻¹. L'administration de l'histamine dans la cuve provoque des contractions de l'iléon d'amplitude équivalente à 100%. Après ajout de chaque extrait, il y a réduction progressive de cette amplitude signifiant l'inhibition de la contraction due à l'histamine (Tableau 3).

Tableau 3: Résultats des tests antihistaminiques

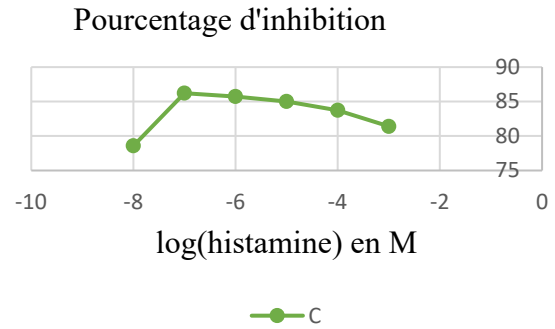
Extrait	ESEtOH	ESHex	ESAc	ESBu	E ₉
Pourcentage d'inhibition %	44,9	47,6	96	95	100

L'administration de la fraction E₉ dans la cuve entraîne une diminution progressive de l'amplitude de la contraction jusqu'à 0 mm indiquant une inhibition complète de la contraction provoquée par l'histamine de l'iléon isolé (Fig. 2).



A: contraction avec histamine seul;
B: contraction en présence d'extrait à 1 mg.ml⁻¹

Fig. 2. Contraction de l'iléon isolé de cobaye en fonction de la concentration de l'histamine ajoutée de façon cumulative et de l'extrait dans la cuve.



C: pourcentage d'inhibition de la contraction.

Fig. 3. Inhibition de la contraction de l'iléon isolé de cobaye en fonction de la concentration de l'extrait.

La fraction E₉ a une action qui déprime l'effet contracturant de l'histamine (Fig. 3). E₉ et les extraits ESAC et ESBu peuvent être qualifiés d'agents antihistaminiques.

3.2.2. Tests antioxydants

Le criblage phytochimique de l'extrait ESEtOH a permis de mettre en évidence la présence des composés phénoliques et flavonoïdiques ainsi que des tanins. Le test qualitatif effectué sur les extraits ESHex, ESAC, ESBu et E₉ suivant le protocole de Takao [6] a montré des taches de couleur jaune claires sur fond violet pour après pulvérisation à la DPPH indiquant qu'ils sont capables de piéger les radicaux libres de la DPPH. Le test quantitatif [7] utilisant comme témoin positif la vitamine E montre une augmentation du pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction de l'augmentation de la concentration autant pour le témoin de référence que pour les différents extraits de la plante (Fig. 4).

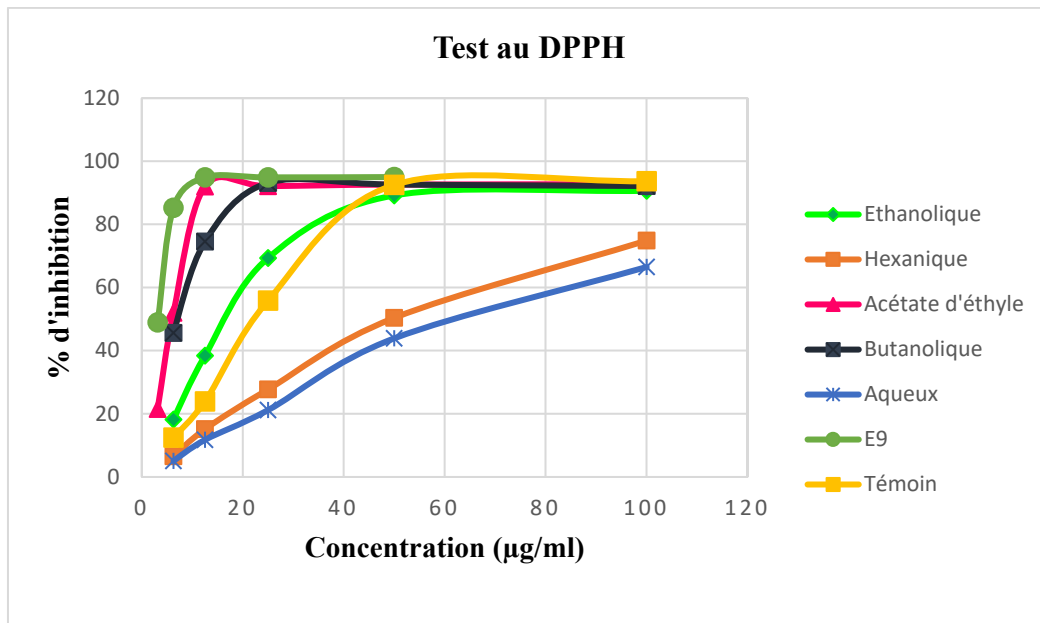


Fig. 4. Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les extraits testés

La lecture des valeurs de CI_{50} (Tableau 4) amène à conclure que le partage liquide-liquide a conduit à l'obtention de deux extraits ESAC et ESBu ainsi que la fraction E₉ possédant chacun une forte capacité de piéger les radicaux libres par rapport à celle du témoin de référence, la Vitamine E.

Tableau 4: CI_{50} des extraits

Extrait	EtOH	ESH ₆	ESAc	ESBu	E ₉	Témoin
CI_{50} ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	22,56	48,92	6,05	7,19	3,22	11,39
Inhibition radicalaire à 50 %	89,15	50,40	92,61	92,61	94,97	92,52

Le (s) principe (s) antioxydant(s) de la plante se trouve(nt) parmi les composés moyennement polaires et/ou polaires.

3.2.3. Toxicité aigüe

ESAc, le plus actif, a été soumis à un test de toxicité aigüe. Aucune mortalité n'a été observée aux doses allant de 200 mg.kg^{-1} à 5000 mg.kg^{-1} . Néanmoins des symptômes ont été notés à partir de la dose 500 mg.kg^{-1} . Juste après chaque gavage de la solution ESAC, une diminution de l'activité motrice a été notée chez les souris avec les doses allant de 500 à 5000 mg.kg^{-1} . Le test montre qu'à partir de la dose 500 mg.kg^{-1} , l'extrait pourrait exercer une dépression sur le système nerveux central.

L'administration du produit à la dose de 2000 mg.kg^{-1} entraîne une diminution de l'activité motrice qui est suivie après 5 min d'une augmentation de la curiosité et d'une érection de la queue à 90°C.

La diminution de l'activité motrice à la dose 5000 mg.kg^{-1} est accompagnée par un comportement à plat ventre chez les souris : contorsion abdominale, signe d'une douleur abdominale. Cependant dès la cinquième minute à la soixantième minute, il y a apparition d'effet analgésique chez ces animaux traités par 5000 mg.kg^{-1} .

IV. CONCLUSION

Les composés 1 et 2 extraits des rameaux feuillés d'*Abrahamia suarezensis* ont été identifiés respectivement comme étant un kaempférol-*O*-pentoside et le kaempférol-3-*O*- α -rhamnopyranoside (2) ou afzéline. ESAC ($CI_{50} = 6,05 \mu\text{g.ml}^{-1}$), ESBu ($CI_{50} = 7,19 \mu\text{g.ml}^{-1}$) et F4 ($CI_{50} = 3,33 \mu\text{g.ml}^{-1}$) ont montré une activité antioxydante meilleure que celle du témoin positif, la vitamine E ($CI_{50} = 11,39 \mu\text{g.ml}^{-1}$).

Les extraits ESAC et ESBu ainsi que la fraction E₉ sont dotés chacun d'une activité antihistaminique prometteuse présentant un pourcentage d'inhibition de la contraction due à l'histamine respectivement de 97%, 96% et 100%.

Le test de toxicité aigüe de l'extrait acétate d'éthyle effectué sur les souris de race Swiss n'a provoqué aucun décès cependant à une certaine dose une diminution de l'activité motrice est observée.

REMERCIEMENT

Nous remercions Monsieur le Pr Erwan POUPON et Monsieur Alexandre Nguyen du Groupe scientifique BIOCIS de l'Université Paris –Saclay pour l'enregistrement des spectres de masse et des spectres RMN ainsi que le Centre National d'Application de Recherche pharmaceutique (CNARP) de Madagascar.

RÉFÉRENCES

- [1] Saxon A, Diaz-Sanchez D. Air pollution and allergy: you are what you breathe. *Nat. Immunol.*, 6: 223-6, 2005.
- [2] Favier A. Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann Pharm Fr* 2006, 64 : 390-396.
- [3] Fong H.H.S., Tin-wa M., Farnsworth N.R. Phytochemical screening. *Rev. College of pharmacy, University of Illinois, Chicago (USA)*, 1977, 275 –277.
- [4] Houghton P.J. et Raman A. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. Editions Chapman and Hall first collection, New York, NY USA, 1998.

- [5] **Koffi N., Beugré K., Guédé N.Z., Dossahoua T., Laurent A.** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire), *Science et Nature*, Vol.N°1 :1-15, 2009.
- [6] **Randriantsoa A., Andriantsiferana R.** Activité pharmacodynamique du T.K.S. i - action sur le bronchospasme in vivo et effet sur organe isole. *Arch. C. N. R. P.*, **3**, 15 – 22, 1984.
- [7] **Takao T., Kitatami F., Watanabe N., Yagi A. and Sakata K.** A simple screening method for antioxidants and isolation of several antiradicalaires produced by marine bacteria from fish and shell fish. *Bioscience, Biotechnologie and biochemistry*, **58**: 1780-1783, 1994.
- [8] **Awika J.M., Rooney L.W., WU X., Prior R.L., Cisneros-Zevallos L.,** Screening method to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal Agricultural and Food chemistry*, **51**(23): 6657-6662, 2003.
- [9] **Yoo M., Lee H.C., Lee H., Moon B.K., Lee Y.C.** Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*, **106**: 929-936, 2008.
- [10] **OECD, (2008).** OECD test guideline 425-National Toxicology Program.
- [11] **Bulgheroni A., Kinsner-Ovaskainen A., Hoffmann S., Hartung T, Prieto P.,** Estimation of acute oral toxicity using the No Observed Adverse Effect Level (Noael) from the 28 day repeated dose toxicity studies in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **53**:16–19, 2008.
- [12] **Onifade A. O., Ouedraogo M., Zongo F. E., Kafando E., Lompo M. E., Guissou I.P.** Acute toxicity and anti-inflammatory activity of aqueous ethanol extract of root bark of *Ximenia americana*. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, **5** (7), 806-811, 2011.
- [13] **Vukics V. and Guttman A.** Structural characterization of flavonoid glycosides by multi stage mass spectrometry, *Mass spectrometry reviews*, **29** (1), 1-16, 2010.
- [14] **Cuyckens F. and Claeys M.,** Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* **39**: 1–15, 2004.
- [15] **Lhuillier A.,** Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hooft ex oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla baker* (Monimiaceae) et *Embelia concinna Baker* (Myrsinaceae). Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse. 46-48, 189, 2007.