International Journal of Progressive Sciences and Technologies (IJPSAT)
ISSN: 2509-0119.
© 2025 Scholar AI LLC.
https://ijpsat.org/
Vol. 53 No. 1 October 2025, pp. 265-275

Activités Biologiques et Flavonoide de Kaliphora Madagascarensis (MONTINIACEAE)

Manoa Rakotofiringa[1], Aina Raharilavitra[1], Dimbiniala Andriamamonjisoa[1], Raominasolo Jesuca Rasolofomanana[1], Stephan Richard Rakotonandrasana[1], Lovasoa Rabesiaka [2], Bernard Anselme Ravelonjato[1]

[1]Centre National d'Application de Recherches Pharamacetiques
Ambodivoanjo-Ambohijatovo, Rue RP, Rahajarizafy Antananarivo, Madagascar
[2]Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Chimie Organique Biologique, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, Madagascar
Auteur correspondant : Aina Raharilavitra. E-mail : fitiiaagape@gmail.com

(cc) BY

Résumé : L'étude de *Kaliphora madagascariensis*, une plante médicinale endémique de Madagascar, rentre dans le cadre de la dynamique de recherche de nouvelles substances bioactives plus particulièrement des composés dotés de propriétés anti-inflammatoire, antioxydante et antibactérienne. Le screening phytochimique menée sur l'extrait hydroalcoolique a révélé la présence d'alcaloïdes à l'état de trace et des stéroïdes du type stérol insaturé, des flavonoïdes du type flavonol en quantité abondante, des tanins et des polyphénols. L'évaluation des activités biologiques des extraits éthanolique (EEt), hexanique (EHex), acétate d'éthyle (EAc) et butanolique (EBu) a montré que les extraits EHex, EAc et EBu présentent tous une activité anti-inflammatoire significative bien que de manière différenciée. De même, EAc et EBu présentent chacun une activité antioxydante modérée mais encourageante. L'extrait EAc, ayant présenté les meilleures activités anti-inflammatoire et antioxydante, a été soumis à un test de toxicité aigüe. L'administration orale à la dose de 180 mg/kg n'a provoqué aucun décès.

L'étude de l'extrait acétate d'éthyle EAc a conduit à l'isolement d'un composé 1 de nature triterpénique et du composé 2 ainsi que du composé 3 tous deux du type flavonoidique puis à l'élucidation de structure du composé 3 comme étant la Quercétine-*3-O-β*-(rhamnopyranosyl-(*1α→2*)-glucopyranoside) par le biais d'une analyse incluant le spectre de masse et les spectres RMN mono et bidimensionnelle.

Mots clés : Substances bioactives, anti-inflammatoire, antioxydant, élucidation de structure, flavonol.

Abstract: The study of *Kaliphora madagascariensis*, a medicinal plant endemic to Madagascar, is part of the ongoing search for new bioactive substances, particularly compounds with anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial properties. Phytochemical screening of the hydroalcoholic extract revealed the presence of trace amounts of alkaloids, unsaturated sterol-type steroids, abundant flavonols, tannins, and polyphenols. The evaluation of biological activities of the ethanolic (EEt), hexane (EHex), ethyl acetate (EAc), and butanolic (EBu) extracts showed that EHex, EAc, and EBu all exhibited significant but distinct anti-inflammatory activities. Similarly, EAc and EBu each demonstrated moderate yet promising antioxidant activity. Since EAc displayed the best anti-inflammatory and antioxidant properties, it was subjected to an acute toxicity test. Oral administration at a dose of 180 mg/kg caused no mortality.

The study of the ethyl acetate extract (EAc) led to the isolation of compound 1 (triterpenoid type) and compounds 2 and 3 (flavonoid type). The structure of compound 3 was elucidated as Quercetin-*3-O-β*-(rhamnopyranosyl-(*1α→2*)-glucopyranoside), based on mass spectrometry and one- and two-dimensional NMR analyses.

Keywords : bioactive substances, anti-inflammatory, antioxidant, structure elucidation, flavonol.

International Journal of Progressive Sciences and Technologies (IJPSAT)
ISSN: 2509-0119.
© 2025 Scholar AI LLC.
https://ijpsat.org/
Vol. 53 No. 1 October 2025, pp. 265-275

I- INTRODUCTION

Une grande majorité de la population mondiale recoure aux plantes médicinales pour se soigner en raison des difficultés d'accès aux médicaments de la médecine moderne notamment dans les pays en développement [1]. Les plantes constituaient les principales composantes des préparations médicinales jusqu'au développement de la chimie de synthèse.

Kaliphora madagascariensis, une plante médicinale endémique de Madagascar pousse dans la forêt sempervirente subhumide et de montagne. Ses feuilles fraiches sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement des céphalées persistantes par une forte inhalation de son odeur [2], les convulsions et les évanouissements puis pour calmer la nervosité [3].

Dans le cadre de la recherche de nouveaux métabolites bioactifs, *Kaliphora madagascariensis,* a été sélectionnée pour le criblage de ressources de la biodiversité végétale visant à évaluer leurs activités biologiques puis isoler et identifier de nouveaux constituants actifs.

II- MATERIELS ET METHODES

2.1. Procédure générale expérimentale

Les analyses UPLC-HRMS^2 ont été réalisées en couplant un système LC à un spectromètre de masse hybride quadripôle à temps de vol Agilent 6546 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 consignés auprès du service commun de RMN de l'Université Paris Saclay sur un spectromètre Bruker Avance 400 MHz avec une sonde triple noyau inverse Proton-Carbone-Azote (TXI 400 S1 1,7 mm) avec gradient Z.

Les logiciels NMR notebook et MestreNova ont été utilisés lors du traitement des données spectrales de RMN mono et bidimensionnelle acquises. Les échantillons ont été dissous dans un solvant déterré CD_3OD contenus 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.

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 nm et 366 nm) avant de pulvériser une solution de vanilline sulfurique dans EtOH suivi d'un chauffage de la plaque à 110 °C ou une solution du réactif de Liebermann-Bruchard suivie d'un chauffage de la plaque de silice à 110 °C puis observée sous lumière UV à 365 nm ou une solution éthanolique de chlorure ferrique à 5 % ou le réactif de Neu suivi d'une observation sous UV à 366 nm. La CCM préparative a utilisé des plaques en verre recouverte de gel de silice 150 A Whatman (Schleicher et Schuel.). La chromatographie sur colonne ouverte a été réalisée sur du gel de silice 60 0,05 -0,2mm/70 -270 mesh ASTM (M N) et sur Sephadex LH-20 (25–100 μm).

2.2. Matériel végétal

Les rameaux feuillés de la plante *Kaliphora madagascariensis* ont été récoltés sur le mont Ambohitrambo, Fokontany Manjakazaza, Commune rurale Ambohitrambo, District Arivonimamo, Région Itasy dans la Province d'Antananarivo (Madagascar) le 02 septembre 2022.

La plante a été identifiée par le Dr HDR Rakotonandrasana Stéphan du Département Botanique et Ethnobotanique du CNARP. Un spécimen d'herbier de référence RTF 104 a été déposé au Centre d'herbier de plantes médicinales de Madagascar du Centre National d'Application de Recherches Pharmaceutiques (CNARP) à Antananarivo (Madagascar).

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.* [4] et Houghton et Raman [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.

International Journal of Progressive Sciences and Technologies (IJPSAT)
ISSN: 2509-0119.
© 2025 Scholar AI LLC.
https://ijpsat.org/
Vol. 53 No. 1 October 2025, pp. 265-275

2.4. Extraction et isolement

300 g de poudre sèche de la plante sont macérées avec agitation dans l'éthanol pendant vingt-quatre heures, Le mélange ainsi obtenu est filtré sur Büchner pour donner une solution éthanolique (filtrat). Le marc est extrait de nouveau deux fois suivant le même procédé. Les filtrats obtenus sont rassemblés et évaporés sous pression réduite à une température de 45 °C avec le rotavap Büchi. Les extraits obtenus sont dissous dans de l'eau distillée afin de former une solution aqueuse qui est par la suite soumise à une séparation liquide-liquide avec l'hexane, l'acétate d'éthyle et le butanol donnant les extraits respectifs EHex (10,825 g), EAc (4,509 g), EBu (18,936 g) et EAq (10,733 g). Ces extraits sont évaporés sous pression réduite et pesés.

L'extrait EAc (m = 4 g) a subi un premier fractionnement par une chromatographie d'adsorption sur colonne ouverte de silice normale éluée en gradient d'éluant avec le mélange Hex/AcOEt (9 : 1 à 5 : 5) puis en mode isocratique avec le système d'éluant AcOEt/MeOH/H_2O (150 : 13,5 : 10) suivi d'un gradient d'éluant avec le mélange MeOH/H_2O (90 : 10 à 70 : 30) donnant treize fractions notées A à M. L'observation de la plaque CCM de la fraction A sous lumière UV à 254 nm et à 365 nm ne montre aucune tache. La pulvérisation du réactif à la vanilline sulfurique suivi d'un chauffage à la température 110 °C a conduit à l'apparition d'une mono tache de couleur violette. Une autre plaque identique pulvérisée avec le réactif de Liebermann-Bruchard et chauffée à 110 °C puis observée sous lumière UV à 365 nm, montre une tache unique fluorescente. La fraction A apparaissant sous forme monotache contient le composé **1** (m = 56,1 mg).

La fraction M éluée sur CCM et pulvérisée avec de la vanilline sulfurique et chauffée à 110 °C montre une tache unique correspondant au composé **2**. Sur une autre plaque CCM la fraction M montre une seule tâche qui réagit avec le réactif de Neu en affichant une fluorescence jaune sous lumière UV à 365 mn.

La fraction G (m= 200 mg) est purifiée par chromatographie sur Gel de Sephadex LH-20 éluée avec le mélange CH_2CL_2 / MeOH (10/90) fournissant huit sous-fractions notées G1 à G8. La fraction G5 sous forme de poudre jaune montre une tache unique après observation sous UV à 254 nm et 366 nm qui réagit avec le réactif de Neu sous UV à 366 nm en présentant une tache de de fluorescense jaune qui correspond au composé **3.**

Quercétine-*3-O-β*-(rhamnopyranosyl-(*1α→2*)-glucopyranoside) (2), poudre jaune **;**

- **RMN ^{1}H (400 MHz, CD3OD, ppm):**

δ_H : 7,77 (1H, d, J=2,2Hz, H-2′) ; 7,66 (1H ,dd ; 8,4 et 2,2, H-6′); 6,95 (1H,dd, J=8,4Hz, H-5') ; 6,46 (1H, d, J=1,9Hz, H-6) ; 6,27 (1H, d, J=1,9Hz, H-8) ; 5,29 (1H, d, J=7,4Hz, H-1"); 4,58 (1H, d, J=1,5Hz H-1'"); 3,58 (1H, m, H-4"); 3,79 (1H, dd, J =11,8 et 2,6Hz, H-6") ; 3,56 (1H,m, H-3'"); 3,49 (1H, dd, J =6,9 et 6,2Hz, H-5"') ; 3,37 (1H, m, H-5") ; 3,35 (1H, m, H-3'') ; 3,31 (1H, dd, J =6,2 et 1,5Hz,H-2'"); 3,34(1H,dd, J =6,9 et 2,6Hz, H-4'"); 1,19 (3H,d, J = 6,2Hz, H-6"').

- **RMN ^{13}C (400 MHz, CD3OD, ppm):**

δ_C : 179,9 (C-4) ; 166,2 (C-7) ; 163,2 (C-5) ; 150,0 (C-4′); 158,7 (C-2 et C-9) ; 146,1 (C-3′) ; 135,8 (C-3) ; 123,7 (C-6′) ; 123,3 (C-1′) ; 117,8 (C-2′) ;; 116,2 (C-5′) ; 104,9 (C-10) ; 102,6 (C-1″) ; 100,1 (C-6) ; 95,0 (C-8) ; 77,4 (C-5″) ; 78,3 (C-2″) ; 75,9 (C-4″) ; 71,4 (C-3″) ; 102,6 (C-1''') ; 72,4 (C-3''') ; 74,1 (C-4''') ; 72,3 (C-2''') ; 69,9 (C-5''') ; 18,0 (C-6''').

- ESIMS [M+H] + m/z 433 uma.

2.5- Activités biologiques

2.5.1. Toxicité aigüe

Il s'agit d'une exposition à court terme et d'une absorption rapide de la substance toxique par voie cutanée, pulmonaire ou orale ne dépassant pas 24 heures pour des doses uniques ou multiples. En général, les symptômes d'empoisonnement apparaissent rapidement et la mort ou la guérison survient.

Le test de toxicité aigüe vise à identifier les concentrations létales du produit à tester sur des souris dans environ 24 h [6]. Elle permet de déterminer :

International Journal of Progressive Sciences and Technologies (IJPSAT)
ISSN: 2509-0119.
© 2025 Scholar AI LLC.
https://ijpsat.org/
Vol. 53 No. 1 October 2025, pp. 265-275

- La dose la plus élevée qui ne provoque pas d'effet mortel (DL0) ;
- La dose qui cause la mort de 50 % des animaux (DL50) ;
- La dose minimale qui tue 100 % des animaux (DL100).

L'extrait d'Acétate d'éthyle obtenu à partir du partage liquide-liquide est analysé lors de l'essai de toxicité aigüe. 180 mg de cet extrait ont été dissous dans 300 µL de DMSO et 3700 µL d'eau distillée. Les souris Swiss utilisées au cours de cette expérience sont divisées en 2 lots de 3 animaux. L'extrait est administré aux souris du lot n° 1 et les souris du lot n° 2 sont utilisées à titre de témoin. Suite à un gavage, les souris du lot n° 1 et du lot n° 2 ont reçu respectivement 0,75 mL de solution d'extrait à l'Acétate d'éthyle puis 0,75 mL de solution contenant 300 µL de DMSO et 3700 µL d'eau distillée. Les comportements des animaux du lot d'essai comparés à ceux des animaux du lot témoin sont observés pendant la première heure suivant l'administration de l'extrait (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 tandis que le taux de mortalité est enregistré tout au long des 3 jours succédant le traitement [7], [8].

2.5.2. Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire des extraits ou des fractions a été évaluée par le biais de l'induction de la carragénine sur l'oedème aigu d'une patte de rat albinos [9]. La carragénine est un inducteur d'une réponse inflammatoire en pharmacologie expérimentale animale.
La solution d'extrait utilisée a été obtenue en dissolvant une masse donnée de l'extrait dans le mélange 1800 µL d'eau et 200 µL de DMSO. Les masses des extraits utilisées sont consignées dans le tableau 1.

Tableau 1. Masses des extraits utilisées.

Extrait	Masse
EtOH	100 mg
Hexanique	95 mg
AcOEt	105 mg
Butanolique	89 mg
Diclofenac	25 mg

Au début de l'expérience, la patte postérieure droite de chaque rat utilisé a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse avant l'administration par gavage de la solution de l'extrait ou de la fraction pour le lot d'essai et du diclofénac pour le lot témoin. Chaque lot est constitué de trois animaux chacun. Trente minutes après cette administration orale, une solution de 100 µL de carragénine 1 % a été injectée sur les pattes mesurées auparavant. Le volume de chaque patte droite traitée a été mesuré toutes les soixante minutes dans les cinq heures qui ont suivi l'injection de carragénine.

L'équation 1 donne le pourcentage d'augmentation (% AUG) du volume de la patte de rat à l'instant t.

$$(\%\mathrm{AUG}) = \frac{\mathrm{Vt} - \mathrm{Vo}}{\mathrm{Vo}} * 100 \quad \text{(Equation 1)}$$

Vt : volume de la patte à l'instant t après injection

Vo : volume de la patte avant gavage pris pour instant 0

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée selon la formule :

$$(\%\mathrm{INH}) = \frac{\%\mathrm{AUG\ témoin} - \%\mathrm{AUG\ traité}}{\%\mathrm{AUG\ témoin}} * 100 \quad \text{(Equation 2)}$$

International Journal of Progressive Sciences and Technologies (IJPSAT)
ISSN: 2509-0119.
© 2025 Scholar AI LLC.
https://ijpsat.org/
Vol. 53 No. 1 October 2025, pp. 265-275

%INH : pourcentage d'inhibition de l'œdème

2.5.3. Activité antioxydante

La capacité de piégeage du radical DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle) a été évaluée selon deux méthodes : la Bioautographie et le dosage au spectrophotomètre.

2.5.3.1. Test qualitatif : « Bioautography »

La présence d'une activité anti-radicalaire d'un extrait ou d'une fraction a été détectée par la pulvérisation d'une solution méthanolique de DPPH à 2,5 mg/mL sur une plaque de gel de silice 60 F254 sur feuille d'aluminium (Merck) où sont déposés sans développement ou avec développement des produits à tester selon la méthode adaptée de Takao et *al*., 1994 [10]. Ce réactif est un radical stable qui, réduit par des capteurs de radicaux, passe du pourpre au jaune.
Dix à trente minutes après incubation, l'apparition de tache de coloration jaune claire sur la plaque CCM traduit la présence de(s) molécule(s) ayant une propriété antioxydante dans l'extrait ou la fraction.

2.5.3.2. Test quantitatif : Méthode de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) par dosage au spectrophotomètre

Le DPPH est un radical libre connu par sa couleur violette et sa forte absorbance pour la longueur d'onde 517 nm une fois dissous dans le méthanol. Cette couleur caractéristique devient jaune lorsqu'il est réduit en diphénylpicrylhydrazine par un donneur d'hydrogène. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons [11],[12],[13].

La quantification du pouvoir antioxydant est effectuée selon les méthodes de Awika *et al.*[11], et de Brand Williams et *al.*[14] avec quelques modifications. 45 mg de DPPH sont dissous dans 100 mL de méthanol. Cette préparation est gardée à l'abri de la lumière. Dix millilitres de cette solution sont additionnés avec 45 mL de méthanol. Des concentrations en cascade de l'extrait à tester allant de 2 mg/mL à 0,125 mg/mL sont préparées. Dans des tubes secs, 200 µL de chaque concentration sont respectivement mélangées avec 3800 µL de la solution de DPPH à 4,5 %. Des blancs constitués de 3800 µL de la solution de DPPH 4,5 % et de 200 µL de méthanol sont également préparés. Le test est répété en tripliquette et incubé à l'abri de la lumière pendant 60 min. La même procédure est appliquée au témoin constitué par la vitamine C (Acide ascorbique). L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 517 nm. L'activité antioxydante qui exprime la capacité de piéger le radical libre est estimée par le pourcentage de décoloration de DPPH en solution dans le méthanol. La mesure du pourcentage d'inhibition des radicaux libres est donnée par la formule donnée à l'équation 3.

$$\%\text{INH} = \frac{\text{Abs Blanc} - \text{Abs test}}{\text{Abs Blanc}} * 100 \quad \text{(Equation 3)}$$

%INH : pourcentage d'inhibition des radicaux libres
Abs désigne l'absorbance à la longueur d'onde de 517 nm.

La courbe du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration est tracée et son équation de la forme (y = a x +b) est mise à profit pour calculer la valeur de la CI_{50}.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

3.1.- Screening phytochimique

Le screening phytochimique a mis en évidence la présence dans la plante des alcaloïdes à l'état de trace et des stéroïdes du type stérol insaturé, des flavonoïdes du type flavonol en quantité abondante, des tanins et des polyphénols qui sont de classes de métabolites secondaires de différentes polarités.

International Journal of Progressive Sciences and Technologies (IJPSAT)
ISSN: 2509-0119.
© 2025 Scholar AI LLC.
https://ijpsat.org/
Vol. 53 No. 1 October 2025, pp. 265-275

3.2. Extraction et isolement

L'extrait hydro éthanolique de poudre sèche de rameaux feuillés de *Kaliphora madagascariensis* a subi un partage liquide – liquide successivement avec des solvants de polarité croissante : hexane, acétate d'éthyle et n-butanol fournissant respectivement les extraits hexanique (EHex), à l'acétate d'éthyle (EAc) et butanolique (EBu). La chromatographie sur colonne de gel de silice de l'extrait EAc a permis d'isoler les composés **1** et **2** apparaissant chacun sous forme mono tache. Le composé **1** réagit avec le réactif de Liebermann Buchard en montrant une tache fluorescente après chauffage à 110° de la plaque CCM suivie de l'observation sous UV à 360 nm indiquant la présence d'un composé probablement de type triterpénique. Le composé **2** réagit avec le réactif de Neu en affichant une tache de fluorescence jaune sous lumière UV à 365 mn.

La chromatographie d'exclusion sur Sephadex LH-20 de la fraction G a conduit à l'isolement du composé **3** qui réagit **avec** le réactif de Neu indiquant la présence d'un polyphénol probablement un composé flavonoïdique du type flavonol en se référant aux résultats du screening phytochimique

Le spectre de masse en ESI^+ du composé **3** montre un ion quasi moléculaire à m/z 611,16 $[M+H]^+$ suggérant une masse moléculaire de 610 uma. Le spectre de masse montre un ion fragment à m/z 465,10 $[M+H–146]^+$**,** correspondant à la perte d'une unité rhamnose, suivi d'un ion à m/z 303,05 $[M+H–Rha–162]^+$**,** indiquant la perte successive d'un hexose (glucose) et identifiant ainsi l'aglycone comme étant la quercétine**.** Ces données suggèrent que le rhamnose est en position terminale de la chaîne osidique.

L'abondance relative de Y_0^+ $[M+H-Rha-162]^+$ est largement supérieure à celle de Y_1^+ $[M+H-146]^+$. L'élimination du disaccharide (formation de l'ion $Y0^+$) est plus favorable pour les isomères liés en 1→2, à cause des répulsions stériques entre le rhamnose terminal et l'aglycone (plus proche l'un de l'autre que lorsque la liaison est 1→6) [15]. L'ensemble de ces données spectrales laisse supposer la présence d'un Quercetine-*O*-diglycoside du type Quercétine-*O*-néohespéridoside (liaison interglycosidique 1⟶2).

Le spectre RMN ^1H enregistré dans CD_3OD indique la présence de deux protons aromatiques formant un doublet à δH = 6,46 ppm (*J* = 1,9 Hz) et 6,27 ppm (*J* = 1,9 Hz), typiques d'un couplage en *meta* attribués aux H-6 et H-8 du cycle A d'un flavonoïde substitué en C-5 et C-7 [16] [17]. La présence de trois protons aromatiques à δH 7,77 ppm (*d*, *J* = 2,2 Hz), 7,66 ppm (*dd*, *J* = 8,4 Hz ; *J* = 2,2 Hz) et 6,95 ppm (*d*, *J* = 8,4 Hz) dont les constantes de couplages indiquent qu'ils forment un système ABX sur le cycle B et que celui-ci est 1', 3', 4'-trisubsititué. Ces protons sont respectivement attribués à H-2', H-6' et H-5'. Ces données spectrales confirment la présence de la Quercétine.

Le signal observé à δH = 5,29 ppm (*d*, *J*= 7,4 Hz) correspond au proton anomérique d'un glucopyranose indiquant une configuration β de la liaison anomérique. Le pic à δH = 4,58 ppm (d, *J*=1,5 Hz) sous forme de doublet est attribué au proton anomérique d'un rhamnose en configuration α attestée par la valeur de la constante de couplage *J*= 1,5Hz. Le proton apparaissant sous forme d'un doublet à δH =1,19 ppm (*d*, *J*= 6,1 Hz) et intégrant pour 3H correspond aux protons du -CH3 du rhamnose [18].

Le spectre RMN ^{13}C du composé 3 dans le CD_3OD montrant la présence de 27 atomes de carbone s'il n'y a pas de chevauchement confirme l'hypothèse d'un Quercétine-*O*-diglycoside. Le signal à δC = 179,7 ppm indique la présence d'un groupement carbonyle. Le signal apparaissant à δC = 104,5 ppm correspond au carbone anomérique C1'' et δC = 102,6 ppm est caractéristique du carbone C1'''. Le signal à δC= 17,85 ppm correspond à un méthyle et est caractéristique d'un rhamnose.

Ces informations ont été complétées par d'autres spectres de corrélations hétéronucléaires HSQC et HMBC qui ont permis de déterminer l'ensemble des positions des carbones et leurs protons associés.

La corrélation HMBC entre le carbone C3 (δC 135,8 ppm) et le proton anomérique H-1'' (δH 5,29 ppm) confirme l'attachement du disaccharide en position 3 de la génine. La corrélation HMBC entre le proton à δH 3,47 ppm (H-2'') et le carbone situé à δC= 102,44 ppm (C1''') met en évidence un lien osidique 1→2 entre le rhamnose et le glucose confirmant que le disaccharide est de type néohespéridose (*rhamnopyranosyl-(1 α →2) -glucopyranose*).

L'ensemble de ces données spectrales conduit à l'identification d'une **Quercétine-*3-O-β*-(rhamnopyranosyl-(*1α→2*)-glucopyranoside)** pour le composé 3

La comparaison des déplacements chimiques du composé 3 avec ceux des données de la littérature [19] présentée dans le tableau 2 confirme sa structure comme étant Quercetine-*3-O*-neohesperidoside [20]

International Journal of Progressive Sciences and Technologies (IJPSAT)
ISSN: 2509-0119.
© 2025 Scholar AI LLC.
https://ijpsat.org/
Vol. 53 No. 1 October 2025, pp. 265-275

Tableau 2. Comparaison des données spectrales RMN ^{1}H et RMN ^{13}C du composé 3 isolé avec celles de la littérature.

	Composé 3 dans CD_3OD		**Quercetine-3-O-neohesperidoside dans CD_3OD (Littérature [19])**	
	RMN ^{1}H	**RMN ^{13}C**	**RMN ^{1}H**	**RMN ^{13}C**
Position	δ_H (ppm), multiplicité, *J*(Hz), intégration	δ_C (ppm)	δ_H (ppm), multiplicité, *J* (Hz) intégration	δ_C (ppm)
Aglycone				
2	-	158,7	-	156.0
3	-	135,8	-	132.8
4	-	179,9	-	177.2
5	-	163,2	-	161.2
6	6,46 (d ; 1,9 Hz ; 1H)	100,1	6.17, *d*, 1.8 Hz	98.3
7	-	166,2	-	164.3
8	6,27 (d ; 1,9 Hz ; 1H)	95,0	6.37, *d*, 1.8 Hz	93.5
9	-	158,7	-	156.2
10	-	104,9	-	103.9
1’	-	123,3	-	121.1
2’	7,77 (d ; 2,2 Hz ; 1H)	117,8	7.51, *d*, 2.1 Hz	115.9
3’	-	146,1	-	144.9
4’	-	150,0	-	148.4
5’	6,95 (dd ; 8,4 Hz ; 1H)	116,2	6.81, *d*, 8.5 Hz	115.1
6’	7,66 (dd ; 8,4 Hz et 2,2 Hz ;1H)	123,7	7.59, *dd*, 2.1, 8.5 Hz	121.0
3 Glucosyl				
1’’	5,29 (d ; 7,4 Hz)	104,5	5.64, *d*, 7.4 Hz	100.5
2’’	3,47 (m ; 1H)	78,3	3.60	79.3
3’’	3,35(m ; 1H)	71,4	3.53	77.4
4’’	3,58 (m ; 1H)	75,9	3.53	70.6
5’’	3,37 (m ; 1H)	77,4	3.24	77.2
6’’	3,50 (m ; 1H) 3,79(dd ; 11,8 Hz et 2,6 Hz ; 1H)	62,8	3.52	60.9
2’’ Rhamnosyl				
1’’’	4,58 (d ; 1,5 Hz ; 1H)	102,6	5.06, *br s*	103.0
2’’’	3,31 (dd ; 6,2 Hz et 1,5 Hz ; 1H)	72,3	3.96, *br d*, 3.1 Hz	71.8
3’’’	3,56 (m,1H)	72,4	3.76, *dd*, 3.1, 8.9 Hz	71.7
4’’’	3,34 (dd ; 6,9 Hz et 2,6 Hz ; 1H)	74,1	3.33	73.0
5’’’	3,49 (dd ; 6,9 Hz et 6,2 Hz ; 1H)	69,9	3.99 *m*	68.2
6’’’	1,19 (d ; 6,2 Hz ; 3H)	18,0	0.75, *d*, 6.1 Hz	17.2

International Journal of Progressive Sciences and Technologies (IJPSAT)
ISSN: 2509-0119.
© 2025 Scholar AI LLC.
https://ijpsat.org/
Vol. 53 No. 1 October 2025, pp. 265-275

3.3. Tests d'activités biologiques

3.3.1.- Test anti-inflammatoire

Dans le but d'identifier les principes actifs potentiellement responsables de l'activité biologique, les extraits obtenus ont été soumis à une évaluation de leur activité anti-inflammatoire, en utilisant le diclofénac comme substance de référence. Les résultats, présentés dans le **Tableau 3** et illustrés dans la **Figure 1**, mettent en évidence des différences notables entre les extraits testés.

Tableau 3. Activités anti-inflammatoires des extraits obtenus exprimée en pourcentage d'inhibition

	T0	T1	T2	T3	T4	T5
Durée (mn)	0	30	60	90	120	150
EEt	0	73,52	47,38	25,71	18,44	23,05
ESHex	0	34	60,74	58,66	47,23	36,56
ESAc	0	61,76	68,92	61,69	56,92	50,65
ESBu	0	26,49	54,07	49,94	46,01	44,76
Diclo	0	92,15	95,39	96,2	96,17	94,12

Les tests biologiques ont montré que les extraits EHex, EAc et EBu présentent tous une activité anti-inflammatoire notable bien que de manière différenciée. L'extrait EAc, de polarité intermédiaire, s'est révélé le plus actif, avec un pourcentage d'inhibition élevé et relativement constant durant les trois premières heures, avant de diminuer progressivement jusqu'à la cinquième heure. Par ailleurs les extraits EHex et EBu affichent des pourcentages d'inhibition faibles au cours de la première heure, qui augmentent sensiblement et atteint le maximun à la deuxième heure, puis diminuent progressivement au cours du temps d'expérimentation.

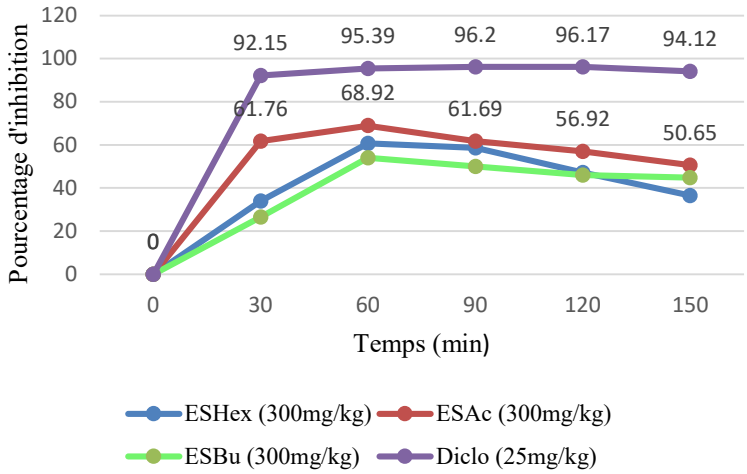

Figure 1. Courbe représentative de l'activité anti-inflammatoire des quatre extraits

3.3.2.-Tests antioxydants

Le criblage phytochimique de l'extrait EEt a mis en évidence la présence des flavonoïdes du type flavonol en quantité abondante, des tanins et des polyphénols. Le test qualitatif effectué sur les extraits EEt, EHex, EAc et EBu suivant le protocole de Takao [6] a montré des taches de couleur jaune claires sur fond violet pour après pulvérisation à la DPPH sauf pour l'extrait EHex indiquant qu'ils sont capables de piéger les radicaux libres de la DPPH.

Les résultats du test quantitatif consignés dans le tableau 2 utilisant comme témoin positif la vitamine C ont montré que les extraits acétate d'éthyle EAc et butanolique EBu présentent chacun une activité antioxydante modérée mais encourageant due probablement à la présence de composés phénoliques tels que les flavonoïdes L'extrait acétate d'éthyle est le plus actif. L'activité antioxydante

International Journal of Progressive Sciences and Technologies (IJPSAT)
ISSN: 2509-0119.
© 2025 Scholar AI LLC.
https://ijpsat.org/
Vol. 53 No. 1 October 2025, pp. 265-275

de EEt s'est révélée très faible. L'extrait hexanique EHex n'a présenté aucune activité antioxydante ce qui signifie que les principes antioxydants ne sont pas des composés apolaires.

Tableau 4. Activités antioxydantes des extraits obtenus

Extraits	EEt	EHex	EAc	EBu
CI_{50} (µg/mL)	82,84 ± 5	Néant	26,9 ± 1,53	42,9 ± 1,94

3.3.3. Test de toxicité aigue

L'extrait EAc, ayant présenté les meilleures activités anti-inflammatoire et antioxydante, a été soumis à un test de toxicité. Ce dernier consiste à évaluer la mortalité provoquée par l'administration en une seule fois de doses croissantes de l'extrait brut EAc à des lots de souris « SWISS ». Chaque animal d'un même lot reçoit une dose identique.
Deux lots de trois souries chacun ont été utilisés, le lot 1 a servi de lot témoin et le lot 2 comprend les animaux testés.
Après l'administration par voie orale de 180 mg d'extrait à l'AcOEt dissous dans un mélange de 300 µL de DMSO et 2700 µL d'eau distillée, les souris sont surveillées pendant 5 mn, 10 mn, 20 mn, 30 mn, 45 mn, 1 h, 2 h. Deux symptômes ont été observés sur les souris du lot 2 :

- Toutes les 3 min, une souris du lot 2 a sauté au plafond et a fait un mouvement circulaire pendant 40 s indiquant un signe clinique [21].
- 30 min après l'administration de la dose, deux souris mordent la troisième, celle-ci n'a montré aucune réaction et reste inoffensive démontrant que l'extrait possède une propriété anesthésique.

Un tel signe laisse supposer la possibilité d'une dépression du système nerveux central.
A la dose de 180 mg/kg, le résultat du test n'a montré aucun signe de toxicité sur la souris testée. Les souris ont survécu après 3 jours d'expérimentation. L'extrait EAc n'est pas toxique à la dose administrée.

IV- CONCLUSION

L'examen du spectre de masse en ESI^+ ainsi que des spectres RMN mono et bidimensionnels ont permis d'identifier le composé 3 comme étant la **Quercétine-*3-O-β*-(rhamnopyranosyl-(*1α→2*) -glucopyranoside)**.
Les extraits EHex, EAc et EBu présentent chacun une activité anti-inflammatoire intéressante. L'extrait EAc moyennement polaire est le plus actif et montre un pourcentage d'inhibition assez élevé presque similaire pendant les trois premières heures puis connaît une diminution progressive jusqu'à la cinquième heure.
Les extraits acétate d'éthyle EAc et butanolique EBu présentent chacun une activité antioxydante modérée mais encourageante.
Un test de toxicité aiguë a été mené sur des souris de souche Swiss afin d'évaluer la tolérance de l'extrait EAc. L'administration orale à la dose de 180 mg/kg n'a provoqué aucun décès, suggérant que cette concentration se situe en dessous de la dose létale médiane (DL_{50}) pour cette espèce et cette voie d'administration. Par ailleurs, l'extrait a montré une activité anesthésique, indiquant une possible action dépressive sur le système nerveux central. Cette hypothèse mérite toutefois d'être confirmée par des évaluations complémentaires, notamment comportementales et électrophysiologiques, afin de préciser le mécanisme d'action et l'ampleur de l'effet.

REMERCIEMENT

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

REFERENCES

[1]. Pelt J.M. (2001). Les nouveaux actifs naturels. Marabout. Paris.

[2]. Razafindrambao R. (1971). Contribution à l'inventaire des plantes medicinales des Hauts-Plateaux de Madagascar. Contribution to the list of medicinal plants of Malagasy highlands. Paris : ORSTOM, Travaux et Documents 8 : p 67.

[3] Boiteau P., Allorge-Boiteau L. (1999). Dictionnaire des noms malgaches des vegetaux (Dictionary of Malagasy plant name). Grenoble: Editons Alzieu. 3: 187.

[4] Fong H.H.J., Tin W.A.M. and Farnsworth N.R. (1977). Phytochemical. Screening. University of Illinois, *Chicago Review,* p 73-126.

[5]. Houghton P.J. et Raman A. (1998). Laboratory Handbook for the Fractionation of Naturals Extracts. Editions Chapman and Hall first collection, New York, NY USA,

[6]. OECD, (2008). OECD test guideline 425-National Toxicology Program.

[7]. Bulgheroni A., Kinsner-Ovaskainen A., Hoffmann S., Hartung T, Prieto P**.,** (2008)**.** Estimation of acute oral toxicity using the No Observed Adverse Effect Level (Noael) from the 28 days repeated dose toxicity studies in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 53:16–19,

[8] Onifade A. O., Ouedraogo M., Zongo F. E., Kafando E., Lompo M. E., Guissou I.P**.** (2011) Acute toxicity and antiinflammatory activity of aqueous ethanol extract of root bark of *Ximenia americana*. *Afr. J. Pharm. Pharmacol*., 5 (7), 806-811.

[9] Winter C.A., Risley E.A. et Nuss G.W. (1962). Carragenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflamatory drugs. *Experimental biology and medicine*. 111 (3) :544-547, http: //doi.org/10.3181/00379727-111-27849.

[10] Takao T., Kitatami F., Watanabe N., Yagi A. and Sakata K. (1994). 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.

[11] Awika J.M., Rooney L.W., WU X., Prior R.L., Cisneros-Zevallos L**.** (2003)**.,** Screening method to measure antioxidant activity of sorghum (Sorghum bicolor) and sorghum products. *Journal Agricultural and Food chemistry,* 51(23): 6657-6662.

[12] Molyneux P. (2004). The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 26 (2): 211-219.

[13] Meddour A., Yahia M., Benkiki N., Ayachi A. (2013). Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *Capparis spinosa* L. *Lebanese Science Journal.* 14(1): 49-60.

[14] Brand-Williams W., Cuvelier M. E. and Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*. https ://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5. 1: 25-30.

[15] Abad-Garcia B., Garmon-Lobato S., Berrueta L., Gallo B. and Vicente F. (2009). Practical guidelines for characterization of *O*-diglycosyl flavonoid isomers by triplequadrupole MS and their applications for identification of some fruit juices flavonoids, *Journal of Mass Spectrometry.* 44: 1017-1025.

[16] Markham K.R. (1982). Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press. London.

[17] Markham K.R. and Ternai B. (1976). Carbon-13 NMR of flavonoids-II: Flavonoids other than flavone and flavonol aglycones. *Tetrahedron.* 32 : 2607-2612.

[18] Muhammad D. (2013). Etude phytochimique et Biologique des trois *Alphitonia* (Rhamnaceae) endémiques à la Nouvelle-Calédonie. Phytochimie. Unité de Formation et de Recherche de Pharmacie. Université de Reims Champagne- Ardenne. Thèse.p 318.

[19] Fico G., Rodondi G., Flamini G., Passarella D., Tome F., (2007). Comparative phytochemical and morphological analyses of three Italian *Primula* species. *Phytochemistry*. 68: 1683–1691.

[20] Kazuma1 K., Noda1 Noda1 N., Suzuki M. (2003) Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry*. 62 : 229–237.

[21] G.B., Adeoti M.F., Djaman A.J., Guede-Guina F. et Sess E.D. (2010). Evaluation de la toxicité aigüe de l'extrait total aqueux d'écorces de *Mansonia altissima* (BOIS BETE) chez les souris. *Journal scientifique*. Pharmaco-biochimie. UFR Biosciences. Université de Cocody. Abidjan. Côte d'Ivoire p 13-20.