

CONTRIBUTION A L'ETUDE CHIMIQUE DE CAESALPINIA SEPIARIA

par

Bernard RAVELONJATO
Département de Chimie

INTRODUCTION

Parmi les maladies courantes dans les pays du Tiers-monde, le paludisme, les maladies infectieuses, les parasitoses et les diarrhées viennent en tête de liste. Les renseignements recueillis auprès de notre Ministère de la Santé confirment d'ailleurs cette constatation (1)

A côté du paludisme, les maladies infectieuses comme la pneumonie, les plaies, les maladies vénériennes surtout sont répandues à Madagascar. Depuis de longue date, les guérisseurs ont déjà utilisé des plantes dont certaines sont réputées efficaces pour soigner ces genres de maladies.

Face à la pénurie actuelle des médicaments importés dans les pays en voie de développement, l'Organisation Mondiale de la Santé, au cours de sa 31^e assemblée qui s'est tenue à Genève en 1978, a pris la résolution relative à l'application d'un programme destiné à évaluer et à employer la médecine traditionnelle de façon à subvenir aux besoins de santé vers la fin de ce siècle.

Répondant aux souhaits de l'O.M.S. et afin de promouvoir la valorisation scientifique de la potentialité de la médecine et de la pharmacopée traditionnelles malgaches, le Centre National de Recherches Pharmaceutiques a inclus dans son programme de travail depuis 1980, la recherche de nouveaux antibiotiques à partir des végétaux supérieurs.

Après les enquêtes pharmacognosiques, un certain nombre de plantes ont été récoltées et soumises à des tests antibactériens systématiques. Caesalpinia sepiaria, qui a donné les premiers résultats encourageants, a été retenu entre autres pour études approfondies.

C'est dans le cadre de ce travail, que le département de Chimie du C. N. R. P. nous a confié la partie chimique, c'est à dire l'isolement du ou des principe(s) actif(s) de la plante et éventuellement la détermination de structure.

MOTIVATIONS DE LA RECHERCHE

Quelles sont les raisons qui nous ont motivé dans le choix de la méthodologie d'approche et du programme de travail ?

D'abord, concernant la méthodologie d'approche, il est à souligner que deux méthodes principales sont utilisées dans la recherche de **nouveaux médicaments** :

- la méthode utilisant l'hémisynthèse et la synthèse organiques
- la méthode extractive

Malgré l'originalité et l'efficacité des produits de synthèse, cette méthode synthétique est longue et coûteuse. Il faut compter près de dix ans pour ~~une mise sur~~ le marché d'un produit synthétique. L'investissement prend alors une importance énorme, au-dessus des possibilités des pays en voie de développement.

Par contre la méthode extractive nécessite moins de temps, car dès le premier abord on connaît les vertus thérapeutiques à étudier par les indications empiriques millénaires. D'ailleurs, on assiste à l'heure actuelle à un regain d'intérêt pour les recherches effectuées sur les plantes médicinales en Europe.

Berceau de plus de dix mille espèces de plantes médicinales, possédant un important potentiel culturel en matière de médecine traditionnelle basée sur l'héritage des récits oraux, et devant faire face aux difficultés inhérentes à sa situation géographique insulaire pour son approvisionnement en médicaments, Madagascar ne fait que suivre ce courant universel.

En ce qui concerne le choix des végétaux supérieurs comme source d'antibiotiques, ceci a été dicté par trois motifs principaux :

- le premier est la tendance actuelle des laboratoires à explorer d'autres matières premières d'antibiotiques comme les végétaux supérieurs (2,3,4,5,6,7). En effet, à part les sulfamides, les antibiotiques classiques comme les Pénicillines, les Céphalosporines etc ... sont isolés à ~~partir~~ des végétaux inférieurs. Malgré leur efficacité incontestée, ils présentent l'inconvénient commun de résistance de germes à leur action.

- le deuxième motif est l'accessibilité relativement facile de ces plantes, ce qui facilite leur approvisionnement.

- il faut également souligner le large éventail de leur choix.

II) ETUDE CHIMIQUE

a) Matériel végétal

Nous avons utilisé les tiges et leur écorce. Elles ont été préalablement séchées et broyées.

b) Screening phytochimique

Dans le but de déterminer les différentes catégories de substances



naturelles présentes dans la plante, nous avons fait un screening phytochimique. Pour cela des extraits aqueux et hydroalcoolique ont été soumis à des tests analytiques classiques.

Les résultats sont consignés dans le tableau I

Substances naturelles	Techniques	Résultats	
		Extrait aqueux	Extrait hydro-alcoolique
Saponines	Indice de mousse	-	-
Alcaloïdes	Mayer	-	-
	Wagner	-	-
Stérols et triterpènes	Test de Liebermann-Buschard	-	-
	Test de Salkowski	+	+
Flavonoïdes et leucoanthocyanes	Test de Molle	-	-
	Test de Bathe-Smith	+	++
Tanins	Pyrogallols -Gélatine 1 %	+	++
	Catéchols -Gélatine salée	-	-
Polyphénoles	-FeCl ₃	++	++
Anthraquinone	Test de Bornträger	-	-

c) Choix de mode d'extraction

Il nous a fallu faire trois essais pour arriver à une méthode d'extraction convenable des principes actifs :

1. premier essai

La plante sèche broyée est extraite directement par l'hexane, par le chloroforme, par le méthanol et par l'eau. Les différents extraits ont été soumis aux tests microbiologiques pour localiser le (s) principe(s) actif(s). Les résultats et l'opération sont résumés dans le Schéma I.

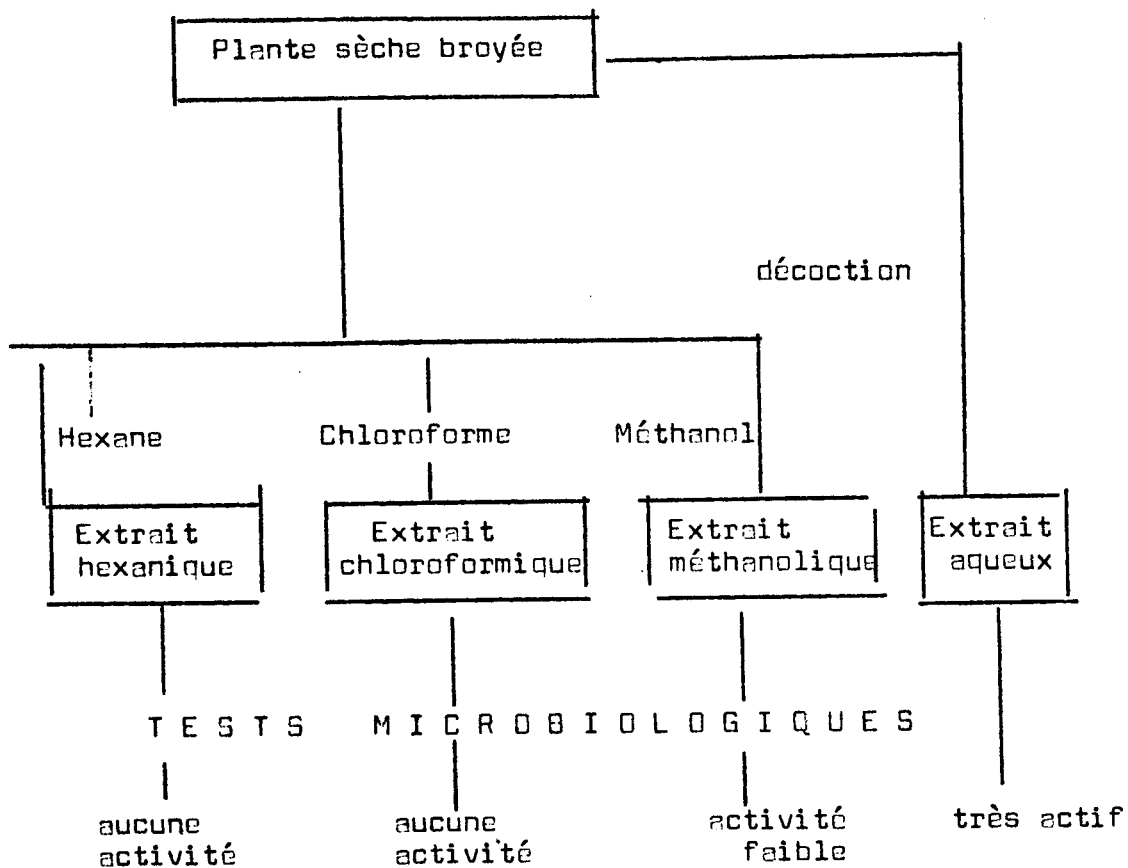


Schéma I

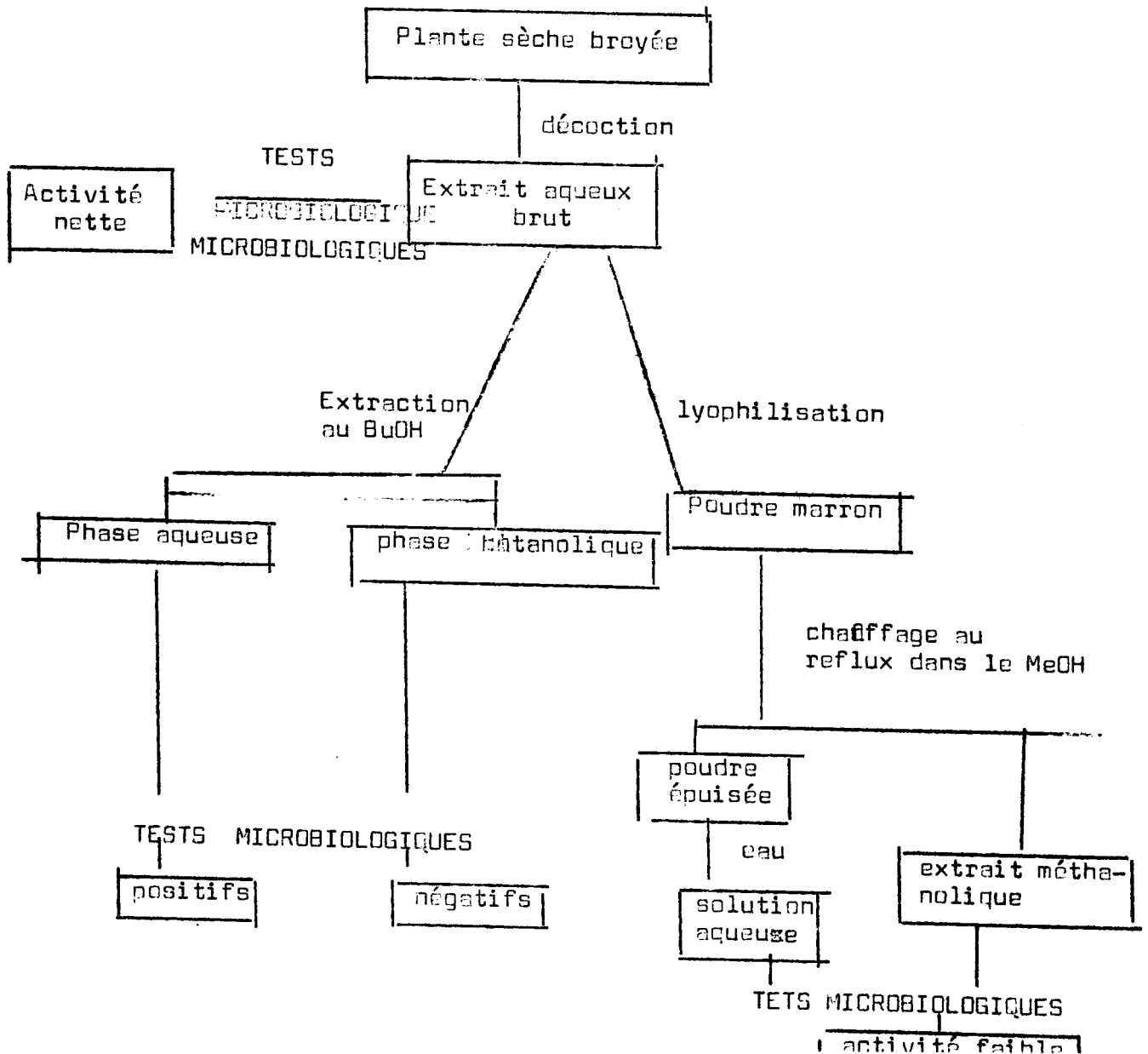
2) deuxième essai

L'extrait aqueux brut obtenu par décoction de la plante broyée, s'avérant actif, est ensuite extrait par du butanol dans une ampoule à décanter. Les phases aqueuse et butanolique ont subi ensuite des tests pharmacologiques. Le schéma II résume le protocole et les résultats.

3) troisième essai

Ce dernier essai est basé sur la technique d'extraction par polarité décroissante.

La plante sèche broyée est extraite à deux reprises par de l'eau bouillante. La solution aqueuse obtenue après filtration est lyophilisée directement nous obtenons ainsi l'extrait aqueux brut qui est traité par le ~~méthode~~ reflux pour séparer les substances polycondensées des produits légers. Les tests antibactériens effectués sur l'extrait aqueux initial se sont révélés positifs, tandis que ceux de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux obtenu en dissolvant la poudre, épuisée par le méthanol, dans l'eau ont montré une activité faible. Le schéma II résume ces résultats.



4) Extraction adoptée

Compte tenu des résultats précédents, nous avons choisi la décoction, méthode employée par les gardiens de la médecine traditionnelle c'est à dire les guérisseurs, comme mode d'extraction des principes actifs. D'autant plus que c'est une technique simple et peu coûteuse.

La plante sèche broyée est extraite à deux reprises par de l'eau bouillante. La solution aqueuse obtenue après filtration est directement lyophilisée. Nous obtenons ainsi l'extrait aqueux brut contenant le (s) principe (s) actif(s).

d) Recherche du nombre de constituants de l'extrait aqueux brut :

Dans le but d'isoler le(s) principe (s) actif (s) de Caesalpinia Seph-aria, nous avons commencé par déterminer le nombre de constituants de l'extrait aqueux.

Une analyse chromatographique sur couches minces a été effectuée dans les systèmes d'éluant utilisés habituellement au département de Chimie du C.N. R.P. dans l'étude des extraits aqueux des plantes:

Système Butanol-Acide acétique-Eau (4-1-5) ; Acétate d'éthyle-Méthanol-Eau (65-45-10) ; Chloroforme-Méthanol-Eau (65-35-10) .

Elle a montré la présence d'un seul constituant majoritaire et d'une traînée indéchiffrable au-dessus et au-dessous de la tâche intense après révélation à l' H_2SO_4 à 50 %. L'essai d'autres systèmes de solvant et de révélation comme UV, $FeCl_3$ à 5 %, vanilline sulfurique n'a donné aucun résultat satisfaisant.

Pour vérifier ces résultats, deux chromatographies bidimensionnelles sur couches minces ont été effectuées, mais aucun renseignement supplémentaire n'est apporté.

e) Localisation du (des) principes(s) actif(s)

1) Isolement du produit majoritaire :

Dans la recherche du (des) principe(s) actif(s), nous nous sommes d'abord attachés à l'isolement du produit majoritaire.

Pour cela, nous avons effectué une séparation par chromatographie sur colonne de silice G par élution avec le système Acétate d'éthyle-Méthanol-Eau (65-45-10) de l'extrait aqueux brut. Nous avons alors obtenu trois lots : une fraction de tête, une fraction intermédiaire et la fraction contenant le produit majoritaire pur mais encore coloré. Par filtration sur colonne de silice G avec le système chloroforme - Méthanol (70-30), nous avons obtenu le produit majoritaire pur sous forme de cristaux blancs.

Les tests antibactériens se sont révélés négatifs sur le produit majoritaire, tandis que la fraction de tête a présenté une activité antibactérienne notable. Ainsi nous nous sommes orientés à l'étude de la fraction de tête.

2) Etude de la fraction de tête

2a - Chromatographie sur colonne d'alumine

Nous avons essayé une séparation sur colonne ~~d'alumine~~. Mais le produit se colore en rouge au cours de son passage dans la colonne, montrant sa dégradation. En fait les fractions recueillies n'ont pas présenté l'activité attendue.

2b- Chromatographie sur colonne de silice G par gradient d'éluant

Afin d'obtenir une meilleure séparation, nous avons chromatographié l' l'extract aqueux brut sur colonne de silice par gradient d'éluant ; et il nous a fallu ~~faire~~ ~~des~~ essais pour pouvoir localiser le (s) principe(s) actif (s).

Le premier consiste à utiliser l'Acétate d'éthyle-Méthanol (80-20) comme éluant de départ. Après avoir groupé les fractions en fonction de leur similitude de sur CCM, nous en avons obtenu sept. Les fractions II et III présentent une activité notable au cours des tests microbiologiques. Et sur CCM, nous avons pu éliminer la traînée avec Acide acétique - Benzène- Ether- Butanol (8-60-25-12).

Mais pour mieux cerner le (s) principe(s) actif(s), nous avons diminué la polarité du système d'éluant de départ en utilisant l'acétate d'éthyle pur, et réduit le volume de chaque fraction recueillie. Les testant ont montré que les fractions (1 à 10), qui présentent une seule tâche dans le système de solvant précédent sont actives. Mais il est à noter que cette tâche se décompose en trois au cours d'une deuxième migration de la plaque précédente dans Acétate d'éthyle-Méthanol-Eau (65-45-10).

Pour confirmer ces résultats, nous avons diminué davantage la polarité de l'éluant de départ en partant de l'Acétate d'éthyle-Hexane (80-20). Les fractions (27-48), qui présentent une similitude sur CCM avec les fractions (1-10) précédentes s'avèrent actives. Aussi ~~adornées~~ ~~elles~~ chacune à $\lambda_{\max} = 279$ nm en spectrophotométrie U.V.

f) Analyse structurale du produit de Caesalpinia Seplaria

Les tests pharmacologiques ont montré que les holosides sembleraient posséder des activités intéressantes et variées. Aussi, ~~avancés~~ nous essayé de déterminer la structure chimique du produit majoritaire, même s'il ne présente pas d'activité antibactérienne. Nous essayons d'apporter quelques éclaircissements ne serait-ce que minime à la relation structure activité dans ce domaine.

Comme les tests phytochimiques n'ont pas pu attribuer aux constituants de l'extract aqueux brut une famille chimique classique, seuls les spectres RMN de ^1H et de ^{13}C du produit majoritaire nous ont permis d'avancer une hypothèse quant à sa famille et à sa structure chimique. Cette partie comprend trois points essentiels.

1) Analyse spectrale préliminaire

En RMN¹H enregistré dans le DMSO, les pics se situent dans la région comprise entre 3,0 ppm et 4,8 ppm. Entre 3 et 4,2 ppm, les pics peuvent être attribués aux protons portés par des C ayant des substituants oxygénés.

A 4,6 ppm apparaît un doublet caractéristique d'un proton hémiacétalique. En RMN¹³C, le spectre de découplage total enregistré dans le DMSO montre la présence de 12 signaux, caractéristique d'un diholoside.

2) Hydrolyse acide

A l'issue de cette étude spectrale préliminaire, nous avons effectué l'hydrolyse acide du produit majoritaire par une solution de H₂SO₄ 3N pendant deux heures à 85°C. Nous avons pu caractériser comme produit d'hydrolyse le glucose, identifié par chromatographie sur papier ~~et par P.C.V.R.V.~~

Dans les mêmes conditions d'hydrolyse, le saccharose a donné le même résultat.

3) Hypothèse de structure

A l'issue de cette étude spectrale et chimique préliminaire, le produit majoritaire possède des analogies structurales avec le saccharose. Alors, en premier lieu, il nous a semblé nécessaire d'enregistrer et d'interpréter le spectre RMN¹³C du saccharose à l'aide des données de la littérature (8). L'examen des spectres des deux produits montre en particulier qu'ils diffèrent par le point d'attache.

Pour confirmer cette remarque, nous avons soumis "le produit majoritaire" au test de la liqueur de Fehling. Les précipités rouges briques ainsi obtenus prouvent que notre "produit majoritaire" possède une fonction hémiacétalique libre, ce qui n'est pas le cas du saccharose.

Pour mieux cerner le point d'attache, nous avons effectué une étude comparative des spectres RMN¹³C des diholosides connus possédant une molécule de glucose. Nous avons remarqué qu'une liaison osidique entraîne une augmentation du déplacement chimique du carbone impliqué dans la fonction.

Dans le spectre RMN¹³C du produit majoritaire, les déplacements chimiques sont affectés par rapport à ceux du saccharose, sauf pour le C₄'. En ayant recours aux spectres RMN de ¹³C du ribofuranose et du saccharose (8), la valeur 104,97 ppm correspond au déplacement chimique du carbone hémiacétalique d'un ~~fructose~~.

En RMN de ¹H, la faible valeur de la constante de couplage (J=3,76 Hz) du proton porté par C₄' indique un couplage cis, assignant au glucose la configuration α .

En définitive, une hypothèse de structure suivante est proposée pour le produit majoritaire.

Les déplacements chimiques du saccharose et du produit majoritaire après enregistrement avec l'appareil Bruker type VW80 du spectre RMN de ^{13}C exprimés en ppm sont consignés dans le tableau II suivant :

Numéro des carbones	1	1'	2	2'	3	3'	4	4'	5	5'	6	6'
Saccharose	62,5	92	104,9	73,1	82,6	73,1	77,5	70,25	74,6	72	62,5	60,75
Produit majoritaire	63,52	93,32	104,9	73,71	82,79	72,45	77,94	75,36	73,91	70,66	62,89	61,58

CONCLUSION

Malgré sa concentration élevée, le produit majoritaire n'a pas présenté l'activité antibactérienne. Une hypothèse de sa structure a été proposée et sera confirmée par quelques réactions chimiques.

Le principe actif de *Cassalpinia seniaria* se trouve dans la fraction de tête. L'isolement à l'état pur et la détermination de sa structure fera l'objet de la suite du travail. Elle nous renseignera si la structure de notre produit actif est voisine ou complètement différente de celles rencontrées dans les végétaux inférieurs.

Face à la pénurie d'antibiotiques, l'exploitation et l'amélioration des résultats ne seront pas négligés au profit d'une recherche trop académique.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - D. RABESON, Thèse de Doctorat d'Etat en Médecine, avril 1982
- 2 - M. IKRAM and INAMUL-HAQ, Screening of Medicinal Plants for Antimicrobial Activity, Part I, Fitoterapia, 1980, 6, 281
- 3 - M. IKRAM and INAMUL-HAQ, Screening of Medicinal Plants for Antimicrobial Activity, Part II, Fitoterapia, 1980, 5, 231
- 4 - S. A. MALCOLM, E. A. SOFOWORA, Antimicrobial Activity of Selected Nigerian Folk Remedies and their Constituent Plants, Lloydia, 1969, 32, 512
- 5 - L. VANHOOF, D. A. VANDEN BERGHE, E. PETIT and A. J. VLTENTINCK, Antimicrobial and Antiviral Screening of Oryophyta, 1981, 5, 223
- 6 - S. A. ROSS, N. E. EL-KJLIANY et S. E. MEGALLA, Antimicrobial activity of some Egyptian Aromatic Plants, Fitoterapia, 1980, 4, 201
- 7 - L. A. MITSCHER, RUEY-PINGUEU, M. S. BATHALA, WU-NAN WU, J. L. BEAL, Antimicrobial Agents from Higher Plants, Lloydia, 1972, 35, 157
- 8 - E. BREITMAIER, W. VOETTER, ^{13}C NMR Spectroscopy, 1978