

27 MAI 1986

N° :

date :

**PLANTES DE MADAGASCAR, N° XV —  
SUR QUELQUES CHLAENACÉES MALGACHES :  
LEPTOLAENA PAUCIFLORA BAKER,  
L. DIOSPYROIDEA CAVACO VAR. TAMPOKETSSENSIS  
ET SARCOLAENA MULTIFLORA DUP. THOU. ;  
PRÉSENCE D'HÉTÉROSIDES DU MYRICÉTOL**

par R. R. PARIS (\*), H. JACQUEMIN (\*\*) et A. LINARD (\*) (\*\*\*)

**RÉSUMÉ**

Des feuilles de 3 espèces de Chlaenacées malgaches, ont été isolés ou caractérisés par chromatographie des acides-phénols de la série benzoïque (p-hydroxybenzoïque, vanillique, gentisique, gallique) et de la série cinnamique (p-coumarique et caféïque). Les flavonoïdes existent dans les feuilles sèches à l'état d'hétéromonosides (surtout des rhamnosides), de myricétol, quercétol et kaempférol. La composition chimique des 3 espèces est tout à fait analogue. Ces plantes sont douées d'une certaine toxicité, tout au moins par voie parentérale.

**SUMMARY**

From three species of Chlaenaceae from Malagasy were isolated or studied by chromatography phenolic acids of the benzoic series (p-hydroxybenzoic, vanillic, gentisic and gallic acids) as well of the cinnamic series (p-coumaric and caffeic). The flavonoids studied in the dry leaves are glycosides (specially rhamnosides) of myricetol, quercetol and kaempferol. The three species are similar in composition and have a certain toxicity by parenteral way.

Les Chlaenacées (ou Chlénacées) constituent une petite famille (33 espèces et 6 variétés) [1] endémique à Madagascar. Nous avons étudié des échantillons provenant de l'ORSTOM à Tananarive, appartenant aux genres *Leptolaena* et *Sarcolaena* et récoltés par l'un de nous (H. J.) en 1972 dans la région de Fort Dauphin.

— *Leptolaena pauciflora* Baker. Il s'agit d'un arbre de 5 à 10 m de haut, à petites feuilles ovales, longues de 1 à 2 cm, entières et à pétiole court ; les fleurs, peu nombreuses (d'où le nom), sont groupées par 2 à l'extrémité

(\*) Laboratoire de Matière médicale, Faculté de Pharmacie, 4, avenue de l'Observatoire, 75006 Paris.

(\*\*) Centre ORSTOM de Guyane, B. P. 165, 97301 Cayenne

(\*\*\*) Manuscrit reçu le 17 juin 1975.

O. R. S. I. O. M. Fonds Documentaire  
27 MAI 1986  
8679 B. B. V.

des rameaux. Le calice comporte 3 sépales ovales, la corolle est constituée par 5 pétales spatulés ; à l'intérieur se trouvent 10 étamines en 2 verticilles et 1 ovaire trilobulaire ; le fruit est une capsule [1]. D'après DEBRAY, JACQUEMIN et RAZAFINDRAMBAO [2], cette plante est utilisée à Madagascar contre la syphilis et les maux de ventre. Ces auteurs y signalent la présence de leucoanthocyanes et de tanins.

Nous avons examiné les feuilles de cette espèce ; des essais préliminaires (en tube et en chromatographie) suivant les techniques habituelles du laboratoire [6], ont montré l'absence d'alcoïdes, de quinones, de saponines, mais la présence de polyphénols : acides-phénols, tanins, leucoanthocyanes, flavonoïdes. Ont été examinés en particulier les acides-phénols et les flavonoïdes.

*Acides-phénols libres* : un infusé à 10 % est préparé à partir de 5 g de feuilles sèches pulvérisées. On acidifie par l'acide sulfurique au 1/10<sup>e</sup> ; la liqueur aqueuse est épuisée par de l'éther sulfurique, celui-ci est agité avec du carbonate acide de sodium (à 2 %). Cette phase aqueuse, acidifiée par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, est de nouveau épuisée par l'éther. Le résidu éthéré est examiné en chromatographie sur couche mince de cellulose avec comme solvants : l'acide acétique à 2 %, ou HCl 0,1 N ; la révélation est effectuée par la p-nitraniline diazotée (ou encore Cl<sub>3</sub>Fe), en présence de témoins de divers acides-phénols. On a ainsi mis en évidence 4 acides : 3 de la série benzoïque : p-hydroxybenzoïque, gentisique et vanillique et 1 de la série cinnamique : l'acide p-coumarique.

Pour les *acides-phénols combinés*, l'infusé est au préalable soumis à une saponification (soude N pendant 4 h à une température de 20°, et à l'obscurité), puis on acidifie et épuise à l'éther comme précédemment. De cette façon, ont été décelés 7 acides : 5 de la série benzoïque : p-hydroxybenzoïque, syringique (hydroxy-4 diméthoxy-3,5 benzoïque), vanillique (hydroxy-4 méthoxy-3 benzoïque), gentisique (dihydroxy-2,5 benzoïque), gallique (trihydroxy-3,4,5 benzoïque) et 2 de la série cinnamique : p-coumarique (hydroxy-4 cinnamique) et caféique (dihydroxy-3,4 cinnamique) ; nous n'avons pas trouvé d'acide sinapique (rencontré surtout chez les plantes herbacées).

*Flavonoïdes*. Des essais préliminaires ayant montré qu'il s'agissait de dérivés de flavonols (coloration rose-rouge avec le magnésium chlorhydrique) : il a été procédé à leur dosage par spectrophotométrie dans l'ultraviolet après chélation avec AlCl<sub>3</sub> [3]. Les feuilles sont traitées par l'alcool à 90° bouillant (pendant 30 mn) ; après filtration et pulvérisation, elles sont de nouveau épuisées 2 fois par de l'alcool pendant 1 h ; le marc, essoré sur entonnoir de Buchner, est lavé à l'alcool chaud. Les colatures sont concentrées sous pression réduite à l'évaporateur rotatif, le résidu est repris par du méthanol à 70 %. Le filtrat, convenablement dilué, additionné d'AlCl<sub>3</sub> et de CH<sub>3</sub>COONa, est examiné au spectrophotomètre Beckman DB. On détermine la D. O. à 430 nm. Les résultats sont exprimés en rutoside ; la teneur en flavonoïdes totaux est d'environ 3,20 %.

La caractérisation des hétérosides flavoniques a été faite à partir de 250 g de feuilles broyées suivant la technique habituelle du laboratoire (méthode de CHARAUX-PARIS) : épuisement à l'alcool bouillant, reprise de l'extrait par l'eau bouillante. Le filtrat encore tiède est épuisé successivement par l'éther éthylique, l'acétate d'éthyle et le butanol. Les résidus de ces 3 solvants sont repris par de l'alcool à 90° et examinés d'abord en chromatographie sur papier (méthode ascendante), en utilisant comme solvant le butanol acétique de Partridge (4-1-5) ou B. A. E. et l'acide acétique à 15 %, et comme révélateurs l'ammoniac, le trichlorure d'Al, le chlorure ferrique, le sous-acétate de plomb. Dans ces conditions, sont obtenues au moins 6 taches de flavonoïdes, dont 4 principales. On a ensuite essayé la chromatographie sur couche mince avec divers supports.

I. — *cellulose* : a) solvant : acide acétique à 15 % ; révélateurs : chlorure d'aluminium ou diphénylborate de 2-aminoéthyle (R. de NEU), ou sous-acétate de plomb. On obtient avec les 3 extraits 3 taches principales de Rf 0,30-0,60-0,70, brun mat en UV ; l'extrait éthéré fournit une tache supplémentaire de faible Rf (voisin de 0,05), à fluorescence jaune (génines libres) ;

b) avec le butanol acétique : taches de Rf 0,55-0,65 et 0,80.

II. — *silice* : a) acétate d'éthyle-méthanol-eau ; solvant A. M. E. (100-16,5-13,5) : 3 taches de Rf 0,68-0,75 et 0,90 ;

b) acétate d'éthyle-méthyléthylcétone-acide formique-eau : solvant A. M. F. E. (5-3-1-1) : 2 taches assez allongées : Rf 0,78 et 0,86.

III. — *polyamide* : a) benzène-méthyléthylcétone-méthanol : solvant B. M. M. (100-50-50) : 3 taches de Rf 0,12-0,22-0,32 ;

b) eau-éthanol-méthylcétone-acétylacétone (13-3-3-1) solvant E. E. M. A. de EGGER [4] : 1 seule tache assez allongée, Rf voisin de 0,20.

Il résulte de ces essais que les feuilles sèches de *Leptolaena pauciflora* renferment des génines libres (flavonols) et au moins 4 flavonosides qui, d'après les Rf en acide acétique à 15 % et le solvant de EGGER, doivent être surtout des hétéromonosides.

On a ensuite réalisé une hydrolyse acide ( $H_2SO_4N$  pendant 2 h. au bain-marie bouillant) afin d'identifier les génines.

Les liqueurs d'hydrolyse provenant des extraits éthéré, éthéroacétique et butanolique ont été extraits à l'éther ; le résidu a été soumis à la chromatographie sur couche mince de cellulose avec comme solvant le butanol acétique ou l'acide acétique à 60 %, et de silice avec comme solvant : toluène-formiate d'éthyle-acide formique (5-4-1) et en présence de divers témoins. On a ainsi identifié par co-chromatographie le kaempférol (trihydroxy-5,7,4' flavonol), le quercétol (tétrahydroxy-5,7,3',4' flavonol) et le myricétol (penta-hydroxy-5,7,3',4',5' flavonol).

En ce qui concerne les hétérosides, un premier essai de caractérisation a été tenté par chromatographie sur couche mince chez divers extraits éthéré,

éthéroacétique et butanolique après examen en UV et révélation par le chlorure d'aluminium, le réactif de NEU et l'acétate basique de plomb (pour mettre en évidence les dérivés diphenols en ortho) ; sur couche mince de cellulose, avec comme solvant l'acide acétique à 15 % ou le butanol acétique, ont été mis en évidence, dans l'extrait étheré, une génine (Rf 0,05 dans l'acide acétique à 15 %) et 3 hétérosides principaux de Rf : 0,30, 0,58 et 0,70 dans ce même solvant et 0,55-0,65 et 0,80 dans le butanol acétique ; les mêmes hétérosides (taches brun mat avec le trichlorure d'aluminium) se retrouvent dans les extraits éthéroacétiques, d'où la génine est absente.

Des résultats analogues (présence de 3 hétérosides) ont été obtenus sur couche mince de silice (solvant A. M. E. et A. M. F. E.), ainsi que sur couche mince de polyamide : 3 taches avec le mélange B. M. M. (100-50-50) et une seule tache allongée avec le solvant E. E. M. A. de EGGER, indiquant que les hétérosides seraient en majeure partie des hétéromonosides.

Dans un premier temps, a été utilisé comme moyen de séparation une colonne de polyamide (avec l'extrait éthéroacétique), l'éluant étant le mélange B. M. M. (100-50-50) décrit précédemment, la composition des diverses fractions étant suivie par chromatographie sur cellulose avec l'acide acétique à 15 % ; on a ainsi pu séparer 4 fractions A, B, C et D qui ont été purifiées par chromatographie préparative sur cellulose (avec l'acide acétique à 15 %).

Ces différents hétérosides ont été identifiés par leur Rf dans 3 solvants (butanol acétique de Partridge, acide acétique à 15 % et eau distillée) ; pour A : respectivement 0,78-0,49 et 0,28 ; pour B : 0,72-0,49 et 0,19 ; pour C : 0,60-0,44 et 0,15 ; pour D : 0,47-0,25 et 0,05, ainsi que par les spectres ultraviolets dans le méthanol additionné de  $Cl_3Al$  anhydre, d'acétate de Na et d'acide borique.

La substance C possède un pF de 190° (microscope chauffant de RECHERT) ; après hydrolyse sulfurique, elle fournit du myricétol et du glucose (identifié par co-chromatographie sur silice avec le solvant B. I. E. : butanol-isopropanol et eau (5-3-1) (révélateur : phtalate d'aniline). Rham no. 3

A la suite de ces essais, les substances A, B, C et D ont été respectivement identifiées au kaempférol-3 rhamnoside, quercétol-3 rhamnoside, myricétol-3 rhamnoside et myricétol-3 glucoside ou myricitrin. Cette substance C s'est montrée tout à fait comparable à du mycitrin (oside) provenant de la collection du laboratoire et de l'*Anthospermum emirnense* [5].

Des essais de toxicité (\*) (par voie intrapéritonéale chez la souris) ont montré que ces feuilles étaient douées d'une certaine toxicité : 100 % de mortalité en 24 h pour une dose de 20 g/kg et 100 % en 48 h pour une dose de 5 g/kg.

— *Leptolaena diospyroidea* Cavaco var. *tampoketsensis*. Arbuste à feuilles persistantes, à jeunes rameaux tomenteux, elliptiques (25-40 mm de long,

(\*) Essais réalisés avec la collaboration de M<sup>m</sup>e GEDOVIVUS et de M<sup>m</sup>e HOEHMESSER, que nous remercions.

15-20 mm de large), pétiole assez long (6-7 mm), inflorescence en courte cyme de 2-6 fleurs, à sépales obovales, 5 pétales, nombreuses étamines (30 à 40), ovaire à 3 loges.

Les essais préliminaires ont montré l'absence d'alkaloïdes, de quinones, de saponosides, de cardénolides, mais la présence de tanins, de léucoanthocyanes et de flavonoïdes du groupe des flavonols. La teneur, évaluée par spectrophotométrie et exprimée en rutoside, suivant la méthode décrite précédemment est, pour les feuilles, voisine de 3,60 %.

*Les acides-phénols* libres et combinés ont été étudiés suivant la technique indiquée à propos de *Leptolaena pauciflora*. 6 acides ont été caractérisés : d'une part les acides p-hydroxybenzoïque, vanillique, gentisique et gallique (série benzoïque) ; d'autre part les acides p-coumarique et caféique. Les résultats sont donc comparables ; à noter cependant l'absence d'acide syringique.

La caractérisation des hétérosides flavoniques a été faite comme pour l'espèce précédente à l'aide de la chromatographie sur couche mince avec divers supports (silice, polyamide) et solvants (mélanges B. M. M. et E. E. M. A.), sur des extraits étheré, éthéroacétique et butanolique, obtenus suivant la méthode de CHARAUX-PARIS. Les résultats sont tout à fait analogues à ceux obtenus avec l'espèce précédente : dans la phase étherée, présence d'une génine libre à fluorescence jaune vif (Rf 0,05 dans l'acide acétique à 15 %) et de 2 hétérosides de Rf 0,42 et 0,67 dans ce même solvant ; dans la phase éthéroacétique, existence de 4 taches principales de Rf 0,55-0,60-0,68 et 0,77 avec le butanol acétique (sur couche de cellulose) et avec le solvant A. M. E. sur couche de silice. Par contre, avec le solvant E. E. M. A. de EGGER sur polyamide, 2 taches seulement de Rf faible entre 0,15 et 0,25 indiquant que, dans cette seconde espèce aussi, il s'agit surtout d'hétéromonosides.

L'hydrolyse acide des divers extraits a fourni les mêmes génines, c'est-à-dire le quercétol, le kaempférol et le myricétol, identifiés par chromatographie et par les spectres ultraviolets.

La séparation des hétérosides a été effectuée à partir de l'extrait éthéroacétique (qui est de beaucoup le plus riche en flavonoïdes). Les meilleurs résultats ont été obtenus par chromatographie sur colonne de polyamide, avec élution par le mélange B. M. M. (100-50-50). On a ainsi séparé 7 hétérosides désignés par les nos 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 qui, d'après leur Rf dans l'acide acétique à 15 % et le solvant E. E. M. A. de EGGER, seraient tous des hétéromonosides, où le sucre serait fixé, en position 3 (avec disparition de la fluorescence) ; l'hétéroside 1 est un dérivé du kaempférol (vraisemblablement le kaempférol 3-rhamnoside) ; les substances 2, 3, 4 fournissent du quercétol après hydrolyse, tandis que les composés 5, 6 et 7 sont des dérivés du myricétol. Le dérivé le plus important est le n° 6 qui a été identifié au myricétol-3 rhamnoside ; le n° 3 est également assez abondant, il s'agirait du quercétol-3 rhamnoside. Ce sont donc les rhamnosides qui dominent. Les autres substances, existant en faible quantité, seraient des glucoside et

galactoside de myricétol (n<sup>os</sup> 5 et 7) et des glucoside et galactoside de quercétol (n<sup>os</sup> 2 et 4).

Au point de vue pharmacologique, cette plante est assez toxique. Chez la souris, par voie intrapéritonéale, avec une dose de 5 g/kg, il y a 80 % de morts en 24 h et 100 % en 48 h à partir d'un extrait alcoolique (avec un extrait aqueux la dose 100 % mortelle est voisine de 20 g/kg, ce qui semblerait indiquer que les principes toxiques sont peu solubles dans l'eau). La mort s'accompagne d'hypothermie et d'hypotonie.

— *Sarcolaena multiflora* Dup. Thou. [1]. Il s'agit d'un arbre de 10 à 12 m, à feuilles entières coriaces, ovales, à base arrondie et sommet aigu, assez grandes (15-18 cm de long × 5-7 cm de large), à 2 sillons longitudinaux bien marqués de chaque côté de la nervure médiane. Fleur en panicules, avec coupe réceptaculaire de 8 cm de haut ; 3 sépales, 5 pétales, nombreuses étamines (± 25), ovaire triloculaire. Fruit capsulaire dont le péricarpe se dissocie en soies à maturité.

D'après M. L. TERRAC [7], les feuilles aromatiques sont employées contre les maux de dents. Les essais préliminaires ont montré l'absence d'alcoïdes, de quinones, de saponines, d'hétérosides cyanogénétiques, d'anthocyanes, mais la présence de tanins galliques et catéchiques, de leucoanthocyanes, d'acides-phénols et de flavonoïdes.

Les acides-phénols totaux (libres et combinés) sont caractérisés comme indiqué précédemment après hydrolyse alcaline de l'infusé, acidification par l'acide sulfurique et extraction à l'éther.

La chromatographie sur couche mince de cellulose avec 2 solvants (acide acétique à 2 % et HCl 0,1 N) a permis de mettre en évidence, après révélation par la p-nitraniline, 6 acides-phénols, 4 de la série benzoïque : acides p-hydroxybenzoïque, vanillique, gallique et gentisique (le plus abondant) et 2 de la série cinnamique : caféique et p-coumarique (le plus abondant).

Un dosage spectrophotométrique des flavonoïdes totaux (exprimés en rutoside) a indiqué une teneur voisine de 0,90 %, donc nettement inférieure à celle des deux espèces de *Leptolaena* étudiées. Une hydrolyse acide des extraits étheré, éthéroacétique et butanolique provenant des extraits alcooliques repris par l'eau, a fourni 3 génines du groupe des flavonols, identifiés par leur Rf en chromatographie sur couche mince de cellulose avec l'acide acétique à 5 % et leur spectre ultraviolet au myricétol, au kaempférol et au quercétol (dans l'ordre d'intensité décroissante).

L'étude des hétérosides a été effectuée à partir de ces mêmes extraits (surtout l'extrait éthéroacétique qui est le plus riche en flavonoïdes). La chromatographie sur couche mince avec différents supports (cellulose, silice, polyamide), avec divers solvants (butanol acétique, acide acétique à 15 % ; solvants E. E. M. A., A. M. E., A. M. F. E., B. M. M.) a permis de mettre en évidence 3 hétérosides principaux, de Rf 0,50-0,60 et 0,75 sur couche de cellulose avec le butanol acétique (B. A. E.).

La séparation des flavonoïdes a été réalisée, soit par chromatographie sur colonne de polyamide avec le solvant B. M. M., soit par chromatographie

préparative sur couche de cellulose avec l'acide acétique à 15 % ou de silice avec l'A. M. E. 4 fractions ont été obtenues : la première dénommée K est révélée en jaune par le sous-acétate de plomb (dérivé monophénolique du phényle latéral), d'après ses Rf faibles dans l'acide acétique à 15 % et le solvant de EGGER (E. E. M. A.), il s'agit d'un monoside, fournissant du rhamnose à l'hydrolyse acide : il a été identifié au kaempférol 3-rhamnoside.

La deuxième fraction dénommée Q est un monoside de quercétol (coloration orangée avec le sous-acétate de plomb), et, d'après le spectre UV, il est identique au quercétol 3-rhamnoside. Les deux dernières fractions (3 et 4) n'existent qu'en très faible quantité. La génine de 3 possède les caractères chromatographiques et spectrophotométriques du myricétol et l'hétéroside serait le myricétol 3-rhamnoside. La substance 4, existant à l'état de traces, est sans doute le myricétol 3-glucoside.

Au point de vue physiologique, la toxicité du *Sarcolaena multiflora* est plus faible que celle de *Leptolaena diospyroidea*. A la dose de 5 g/kg, par voie intrapéritonéale, la mortalité est de 50 % en 24 h ; elle est de 100 % pour 20 g/kg. Là aussi, les extraits alcooliques sont, à dose égale, plus toxiques que les extraits aqueux.

*En résumé*, la composition chimique des feuilles des 3 espèces de Chlaenacées est assez analogue, surtout en ce qui concerne les polyphénols. Les acides-phénols sont sensiblement les mêmes : acides p-hydroxybenzoïque, vanillique, gentisique, gallique, syringique d'une part et acides p-coumarique et caféique d'autre part. Signalons cependant que l'acide syringique n'a été trouvé que chez *Leptolaena pauciflora* et que, chez cette espèce, il n'y a que des traces d'acide gallique.

Les flavonoïdes sont très voisins, cependant beaucoup moins abondants chez *Sarcolaena multiflora* que chez les *Leptolaena*. Les génines sont toutes de la série des flavonols : kaempférol, quercétol et surtout myricétol. La présence de ce dernier est importante au point de vue chimiotaxinomique. En effet, la place des Chlaenacées en systématique est assez incertaine ; la présence de myricétol renforce la position des botanistes qui rangent cette petite famille à côté des Malvacées, chez lesquelles le myricétol est assez fréquent.

On est un peu étonné de n'avoir isolé que des hétéromonosides de flavonols ; mais, d'une part, d'après les résultats des chromatogrammes, il semble qu'il y ait des traces de biosides et, d'autre part il faut rappeler que l'étude chimique n'a pu être réalisée que sur des plantes sèches. Il est possible que dans la plante fraîche existent des biosides et même des triosides.

Enfin, ces plantes sont assez toxiques, tout au moins par voie intrapéritonéale et avec des extraits alcooliques ; il serait intéressant de préciser la nature des ces principes toxiques, qui sont peu solubles dans l'eau et qui sont différents des flavonoïdes.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] CAVACO (A.). — 126<sup>e</sup> famille : Chlénacées dans HUMBERT (H.) : Flore de Madagascar et des Comores. Muséum nat. Hist. Nat., Paris, 1952.
- [2] DEBRAY (M.), JACQUEMIN (H.) et RAZAFINDRAMBAO (R.). — Travaux et Documents de l'ORSTOM, n° 8, Paris, 1971.
- [3] DURET (S.) et PARIS (R. R.). — *Pl. méd. et Phyto.*, 1970, 4, 158.
- [4] EGGER (K.). — *Planta medica*, 1964, 3, 271.
- [5] PARIS (R. R.) et JACQUEMIN (H.). — *Pl. méd. et Phyto.*, 1975, 9, 118.
- [6] PARIS (R. R.) et NOTHIS (A.). — *Pl. méd. et Phyto.*, 1970, 4, 63.
- [7] TERRAC (M. L.). — *Thèse Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1947.