

**SUR UNE HYPÉRICACÉE DE MADAGASCAR,
L'ELIAEA ARTICULATA CAMBESS**

par H. JACQUEMIN, S. DURET et R. R. PARIS *
(Laboratoire de Matière médicale, Faculté de Pharmacie,
4, avenue de l'Observatoire, Paris 6°)

1. — DESCRIPTION BOTANIQUE

Le genre *Eliaea*, monotype endémique de Madagascar, est représenté par *E. articulata* Cambess (1). Cette espèce, assez commune, vit sur les dunes fixées, récentes ou anciennes, du littoral oriental de Sainte-Marie à Fort-Dauphin.

Les échantillons que nous avons récoltés portaient des fruits secs et formaient un peuplement au bord de la route de Manakara sur une colline à 7 km au sud du bac sur le fleuve Namorona dans la zone de Mananjary.

Il s'agit d'un arbuste pouvant atteindre 4,5 m de haut, entièrement glabre et à feuillage persistant. Les feuilles, opposées, entières et elliptiques, mesurent 3 à 7 cm de long sur 1,4 à 3 cm de large. Leur pétiole ne dépasse pas 3 à 6 mm de longueur. Le limbe présente un aspect brillant et possède des points glanduleux petits et denses bien visibles par transparence. La nervure principale est saillante à la face inférieure, les nervures secondaires apparaissent surtout sur la face supérieure.

Les fleurs, hermaphrodites et pentamères, sont disposées en cyme terminale, composée-corymbiforme et multiflore. Les sépales, un peu inégaux, sont rayés de lignes glanduleuses noires. Les pétales, de couleur blanche, possèdent une forme oblancéolée. Les 15 étamines demeurent groupées en 3 phalanges alternant avec trois corps glanduleux et charnus. L'ovaire possède 6 et quelquefois 8 loges incomplètes, contenant chacune un ovule ascendant. Le fruit est une capsule peu aiguë à 6 angles étroits, de dimensions 12 × 8 mm.

A notre connaissance, cette plante ne possède pas d'application thérapeutique.

Il a été procédé tout d'abord à une série d'essais préliminaires nous permettant, par la suite, de nous orienter vers des recherches plus précises. Nous avons ainsi noté chez les feuilles la présence de :

(*) Manuscrit reçu le 30 juin 1969.

— *Tanins catéchiques* : coloration de l'infusé à 10 % : vert foncé avec le chlorure ferrique ; précipité abondant avec la gélatine salée et un précipité abondant avec le réactif de Stiasny (formol-chlorhydrique).

— *Hétérosides flavoniques* et génines : réaction de la cyanidine fortement positive : alcool isoamylique coloré en rouge et soluté inférieur orange.

— *Saponines* : l'indice mousse (méthode de la Pharmacopée française) est inférieur à 100.

Nous avons également procédé, à partir de 100 ml d'infusé à 10 % à trois extractions successives, en ampoule à décanter, par l'éther, l'acétate d'éthyle et le butanol (avec, pour chaque extraction, 20, 20 et 10 ml de chaque solvant). Ces liqueurs extractives sont évaporées au bain-marie et l'extrait sec repris par 1 ou 2 ml de méthanol.

Ces solutions méthanoliques sont étudiées en chromatographie, ainsi que l'infusé épuisé et une teinture au 1/5 dans l'alcool à 60° (préparée par macération de la poudre avec agitation mécanique 4 h.).

Des chromatographies sont faites, sur papier Whatman n° 1, méthode ascendante, solvant : butanol, acide acétique, eau (4-1-5 en volume).

Nous avons employé différents révélateurs soit :

— Chlorure d'aluminium à 2 % dans l'alcool à 95°.

Après examen sous lumière ultraviolette, des taches jaune, jaune vert et ocre ont indiqué la présence de composés flavoniques dans la teinture, l'extrait acétate d'éthyle et le butanol.

— Potasse alcoolique à 5 %.

Taches jaune vert, jaune orange avec la teinture, l'extrait acétate d'éthyle et le butanol.

Il ne s'agit pas de quinones car il n'y a pas de coloration rouge, ceci est confirmé par la réaction de Bornträger négative, effectuée sur la poudre. On obtient cependant, à partir des infusés et après épuisement par le chloroforme, une coloration orangée avec la potasse diluée, ce qui pourrait faire penser à l'existence d'une substance analogue à la fagopyrine [2].

— Chlorure ferrique aqueux à 1 % :

Taches vert foncé et gris noir indiquant la présence de flavonoïdes et d'acides phénols dans la teinture, les extraits étheré, acétate d'éthyle et butanolique.

— Vanilline chlorhydrique à 1 %.

Une traînée rose dans l'extrait acétate d'éthyle indique la présence de catéchols ou de leucoanthocyanes. La présence de ces dernières est confirmée par la réaction suivante : une digestion de 3 minutes au bain-marie de la poudre avec du propanol chlorhydrique donne une forte coloration rouge due aux leucoanthocyanes.

— Réactif de Dragendorff :

Aucun précipité avec la teinture et l'infusé, d'où absence d'alcaloïdes confirmée par la réaction suivante : imprégnation de la poudre par ClH au 1/20, 24 h de macération, filtration et addition des réactifs de Mayer, Dragendorff et Bertrand : aucun précipité.

En dehors des feuilles, les essais préliminaires ont été appliqués à d'autres organes, les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Organe	Alca- loïdes	Flavo- noïdes	Tanins	Leuco- anthocyanes	Sapo- nines	Quinones
Feuille	0	+ +	+ +	+ +	+	0
Ec. de tige ...	0	0	+ + +	+ + +	+	0
Bois de tige ..	0	0	+	+ +	+	0
Ec. de racine .	0	0	+ +			0

A la suite de ces premières expériences, nous avons approfondi l'étude des polyphénols des feuilles. La teneur en tanin (technique de la poudre de peau) est de l'ordre de 14 %.

Cette étude a été réalisée suivant deux techniques.

— Méthode des solvants successifs : épuisement de la plante dans un appareil de Soxhlet pendant 5 h, après macération de 4 heures, par les solvants suivants : éther de pétrole — chloroforme — éther — acétate d'éthyle — acétone et éthanol à 96° ; après l'action de chaque solvant le marc est séché 12 heures à l'air libre.

— La deuxième méthode consiste à effectuer un premier dégraissage par le chloroforme dans un Soxhlet pendant 5 h puis une seconde extraction dans les mêmes conditions par le méthanol.

La solution méthanolique est évaporée à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif et le résidu sec est repris par de l'eau bouillante ; cette solution filtrée sur coton puis sur papier est épuisée dans une ampoule à décantation successivement par de l'éther, de l'acétate d'éthyle, de l'acétate d'éthyle additionné de 5 % de méthanol et enfin du butanol.

Les différents extraits obtenus dans les deux méthodes ont été évaporés à sec — soit au bain-marie, soit à l'évaporateur rotatif — puis séchés sous vide en présence d'anhydride phosphorique.

Sur chaque résidu on a effectué la réaction de la cyanidine et noté, en cas de réaction positive, la coloration.

Une partie aliquote de chaque résidu a été également reprise par quelques millilitres de méthanol — à l'aide desquels on a effectué des chromatographies sur papier Whatman n° 1 dans le solvant : butanol — acide acétique — eau (4-1-5 v/v) pendant 8 h (méthode ascendante).

Les chromatogrammes ont été ensuite examinés en lumière ultraviolette après pulvérisation de chlorure d'aluminium.

— La seconde méthode nous a paru meilleure pour la séparation des divers constituants flavoniques.

On a tout d'abord commencé l'étude d'un constituant présent sur tous les chromatogrammes (sauf dans les phases éther de pétrole et chloroforme) sous forme d'une tache orange vif en lumière ultra-violette devenant jaune vif avec les vapeurs ammoniacales et d'un vert intense après pulvérisation de chlorure d'aluminium et examen en lumière ultra-violette (Rf : 0,40 dans le butanol acétique).

La fraction renfermant presque exclusivement cette substance s'est avérée être un précipité recueilli lors de la concentration de la phase éthanolique (solvants successifs).

On a effectué sur ce précipité plusieurs cristallisations successives dans l'alcool à 40°, à la température du laboratoire et on a obtenu après séchage une poudre cristalline jaune de $pF = 287^\circ$ (bloc Maquenne) et 268° (tube capillaire, appareil de Tottoli). La réaction de la cyanidine fortement positive a donné une coloration orange. L'étuve du spectre U.V. (appareil Beckman D. B.) a montré pour la solution alcoolique la présence de 4 maximums : à 240 — 258 — 318 et 369 nm. Après addition de chlorure d'aluminium à 5 %, le spectre est modifié avec effet bathochrome : maximums : 234 — 266 — 338 et 410 nm. Ce spectre est semblable à celui de la *mangiférine* ou *aphloiol* (tétrahydroxy 1-3-6-7 xanthone) déjà étudié dans notre laboratoire (5).

Le Rf a été déterminé par rapport à un témoin de mangiférine en chromatographie sur papier Whatman n° 1 (méthode ascendante) dans les solvants suivants :

Solvant A : butanol acétique de Partridge.
— B : acide acétique 60 — eau 40 (v/v).
— C : — — 15 — 85 —

Les chiffres obtenus sont comparables à ceux donnés par la mangiférine soit : Solvant A : Rf : $0,50 \pm 0,1$; Solvant B : Rf : $0,62 \pm 0,1$; Solvant C : Rf : $0,36 \pm 0,1$. Il s'agit bien d'un C-hétéroside car il n'y a pas d'hydrolyse après action de l'acide sulfurique N pendant 2 heures au bain-marie bouillant.

L'étude a porté ensuite sur la phase d'extraction par l'acétate d'éthyle (2° méthode), l'attention ayant été attirée sur cette fraction par la coloration rose violet de la cyanidine.

On a réalisé une hydrolyse de 100 mg d'extrait par 10 ml de H_2SO_4 N pendant 2 h au bain-marie bouillant. Après refroidissement, il se produit un précipité. Celui-ci, séparé par centrifugation, lavé à l'eau et séché, a été repris par l'éther. La solution a été évaporée à sec et le résidu repris par de l'alcool purifié pour spectres.

La réaction de la cyanidine est positive et donne une coloration orange. En solution alcoolique, le spectre présente 2 maximums (374-255 nm). Par addition de chlorure d'aluminium on observe un effet bathochrome et un dédoublement des 2 pics (max 430 — inflexions à 356 — et 300

et maximum à 268). Le spectre est semblable à celui du *quercétol* ou tétrahydroxy 5-7-3'-4'-flavonol. Le Rf, déterminé en chromatographie sur papier Whatman n° 1 (méthode ascendante) dans les mêmes solvants que précédemment, a donné des chiffres comparables à ceux d'un témoin de quercétol.

Solvant A : Rf : 0,66 ; Solvant B : Rf : 0,35

Il n'y a pas de migration dans le solvant C.

D'autre part, le liquide hydrolysé séparé du précipité précédent est épuisé par l'éther et la solution étherée est évaporée sur des plaques de cellulose de 1 mm d'épaisseur ; et le liquide migrateur est le solvant B (acide acétique à 60 p. 100).

On repère en lumière ultra-violette une bande nette à Rf : 0,80.

Après grattage de l'adsorbant par l'alcool pour spectre, la solution obtenue donne une réaction de la cyanidine fortement positive avec une coloration violet intense.

L'étude du spectre ultra-violet a montré le spectre caractéristique des flavanones, soit un épaulement entre 332 — 320 nm et un maximum à 288 ; par addition de chlorure d'aluminium — un pic étalé entre 372-380 et un maximum à 310 nm. L'identification de cette flavanone existant en petite quantité est en cours.

Sur la solution aqueuse d'hydrolyse précédemment épuisée par l'éther, la recherche des sucres a été effectuée après neutralisation par du carbonate de baryum, centrifugation pour éliminer le sulfate de baryum formé et rinçage du précipité à 3 reprises avec de l'eau ; la solution a finalement été évaporée à sec sous vide et le résidu repris par 3 ml d'eau froide.

On dépose ensuite la solution obtenue sur une plaque de Kieselgel avec des témoins de sucres.

Le solvant migrateur est le mélange :

Butanol-isopropanol-eau (5, 3, 1, (v/v))

et le révélateur le phosphate d'aniline. Après 15' à l'étuve à 100°, on a noté la présence d'une seule tache importante correspondant au rhamnose.

— On a épuisé ensuite l'extrait acétonique (solvants successifs) présentant sur les chromatogrammes une tache jaune à Rf : 0,82 (Solvant A).

Une solution méthanolique de l'extrait est chromatographiée sur des plaques de cellulose de 1 mm d'épaisseur en utilisant le solvant B.

Après examen sous lumière ultra-violette, on isole une bande jaune (Rf : 0,60). Après récupération de l'adsorbant et élution par l'alcool pour spectre, la solution obtenue, examinée au spectrophotomètre, présente des maximums à 366 et 266 nm et un déplacement bathochrome par le chlorure d'aluminium : maximums à 422 — 340 — 266 et inflexion à 302 nm.

Ce spectre est comparable à celui du *kaempférol* ou tétrahydroxy 3, 5, 7, 4' flavonol. Le Rf, déterminé comparativement à un témoin en chromatographie sur papier Whatman n° 1, méthode ascendante dans

les solvants A et B a donné des chiffres comparables soit : Solvant A : Rf : 0,86 ; Solvant B : 0,50.

Lors de l'extraction par l'éther de la phase aqueuse dans la méthode n° 2, un précipité jaune formé à la surface de séparation des deux liquides a été recueilli. Soumis à la chromatographie sur papier dans le solvant A, et après pulvérisation au chlorure d'aluminium, il donne, sous lumière ultra-violette, une tache jaune à Rf 0,74.

On a donc déposé sur plaque de cellulose une solution méthanolique de ce précipité, effectué une migration dans le solvant A, recueilli la bande correspondante et élué l'adsorbant avec de l'alcool pour spectre.

La solution donne une cyanidine positive couleur rose rouge.

Le spectre U. V. a été étudié : on obtient 2 maximums ; à 354 et 254 nm et un effet bathochrome et dédoublement du pic 1 par addition de chlorure d'aluminium : 400 — 350 — 268 nm et une inflexion à 298 nm.

Ce spectre est semblable à celui du *quercitroside* ou rhamnoside en 3 du quercétol. Le Rf déterminé comparativement en chromatographie sur papier Whatman n° 1, méthode ascendante dans les solvants A — B — C et eau a donné des chiffres comparables à ceux obtenus avec le quercitroside ou quercitrine, soit :

Solvant A : 0,76 ; Solvant B : 0,72 ; Solvant C : 0,42 ; Eau : 0,15

Après les flavonoïdes (1), il a été procédé à la recherche et l'identification des *acides-phénols* ; ceci a été réalisé de 2 façons différentes.

— D'une part, on a prélevé sur les chromatographies préparatives sur cellulose, à partir de l'extrait de la phase acétate d'éthyle (méthode 2), et après migration dans l'eau, une large bande bleue intense sous lumière ultra-violette. Une chromatographie effectuée sur papier Whatman n° 1 (méthode ascendante) dans les solvants A — B et acide acétique à 6 %, en présence de divers témoins, a donné des Rf comparables à ceux de l'acide chlorogénique (acide 3 caféylquinique) avec et sans témoins internes soit :

Solvant A : Rf : 0,59 ; Solvant B : Rf : 0,73 ;

Ac. acétique à 6 % : Rf : 0,58

— D'autre part, on a fait l'extraction suivante : un infusé à 10 % préparé extemporanément, est additionné de soude, alcalinisé de façon à assurer une alcalinité de 2 N. Après 4 h à la température ambiante, on réacidifie par HCl et extrait par l'éther. La solution obtenue est évaporée à sec et le résidu repris par du méthanol.

Cette solution est déposée sur une plaque de cellulose (0,5 mm d'épaisseur). Après migration dans l'eau, on recueille une large bande bleue intense sous U.V. Le spectre U.V. est étudié sur le liquide d'éluion par l'alcool ; on obtient 2 maximums : à 320 et 232 et une inflexion à 292 nm.

(1) Dans les extraits méthanoliques et acétoniques a été caractérisé un flavonoïde ayant les mêmes Rf que le rutoside.

Ce spectre est identique à celui de l'acide caféique.

L'examen chromatographique sur papier Whatman n° 1 (méthode ascendante dans les solvants A-B et ac. acétique à 6 %) a donné les résultats suivants :

Solvant A : Rf : 0,83
— B : Rf : 0,67
— ac. acétique à 6 % : Rf : 0,29

Ces chiffres sont semblables à ceux obtenus avec de l'acide caféique témoin.

Nous avons essayé ensuite d'isoler et d'identifier les leucoanthocyanes décelées au cours des essais préliminaires.

Lors de l'extraction des feuilles par la méthode des solvants successifs, ce sont les extraits acétoniques qui, d'après les réactions colorées (vaniline chlorhydrique) se sont montrés les plus riches en proanthocyanes. Afin de procéder à une première purification, des extraits ont été évaporés à sec et repris soit par du méthanol, soit par de l'acétate d'éthyle déshydraté et additionné d'éther de pétrole (5 à 10 volumes). On obtient ainsi, après centrifugation et dessiccation dans le vide phosphorique, une poudre gris rougeâtre contenant les leucoanthocyanes à l'état brut. Cette substance à saveur astringente, de $pF = 282$, insoluble dans l'éther de pétrole, le benzène, le chloroforme, peu soluble dans l'éther, est soluble dans l'acétate d'éthyle, l'acétone et l'alcool. Elle fournit une coloration verte avec le chlorure ferrique, elle réduit à chaud la liqueur de Fehling et le nitrate d'argent ammoniacal.

En chromatographie sur papier (Arches 302), elle fournit une tache principale de Rf 0,48 (solvant de Forestal), 0,30 avec l'acide acétique à 2 p. 100 et 0,28 (avec le mélange acide formique, HCl 12 N, eau (5-2-3), révélée en rose par les vapeurs d'acide chlorhydrique et virant au bleu par l'ammoniaque.

En chromatographie sur couche mince (Kieselgel), le Rf est de 0,70 (acétate d'éthyle-hexane : 95,5) et de 0,65 (acétate d'éthyle-éther : 30-70).

Le spectre ultra-violet (solution alcoolique) présente un maximum à 280 nm, tandis que le spectre infrarouge montre des bandes à 2,9 (hydroxyle) 6,2-6,6 (doubles liaisons benzéniques).

Comme il est maintenant classique pour les leucoanthocyanes, la caractérisation est effectuée par une méthode indirecte après transformation en anthocyanidine. Celle-ci est obtenue par chauffage de la solution aqueuse en milieu acide (10 minutes au bain-marie bouillant en présence de propanol qui se colore en rouge). L'identification de l'anthocyanidine formée est faite à l'aide de trois méthodes : 1) spectrophotométrie dans le visible ; 2) détermination du Rf en chromatographie ; 3) réactions colorées différentielles.

1) Dans le visible, le spectre présente un maximum à 546 nm.

2) En chromatographie sur papier, l'anthocyanidol présente un Rf de 0,50 (butanol-acide acétique-eau 4-1-5), 0,62 (acide acétique à 60 p. 100),

0,48 (solvant de Forestal) et 0,28 (acide formique, acide chlorhydrique 12 N, eau distillée : 5-3-2).

3) Ces résultats pouvaient faire hésiter entre le cyanidol et le pétunidol. Les réactions suivantes sont en faveur du cyanidol : a) la solution chlorhydrique, lavée au benzène est additionnée du mélange cyclohexanol-benzène (1-5) il y a passage de la coloration rose dans la phase supérieure ; b) la solution chlorhydrique est alcalinisée par 1/2 volume de soude à 10 % ; après acidification par de l'acide chlorhydrique on ajoute de l'alcool amylique qui se colore en rose (dans le cas de la pétunidine, il y aurait destruction du pigment).

La substance isolée des feuilles d'*Eliaea* est donc une leucoanthocyane fournissant en milieu acide du cyanidol.

EN RÉSUMÉ, des feuilles d'*Eliaea articulata* Cambess, ont été séparées dans le groupe des polyphénols : un C-hétéroside de la série des xanthonés, la mangiférine ou aphloiol, des flavonols libres (en petite quantité) quercétol et kaempférol et à l'état d'O-hétérosides (quercitroside ou 3 rhamnoside de quercétol) une flavanone (à l'état de traces), des acides-phénols (caféique et chlorogénique) et comme flavanne une proanthocyane fournissant du cyanidol. Au point de vue chimiotaxinomique, la leucocyanidine a déjà été trouvée dans de nombreuses Hypéricacées (1-3), il en est de même pour les flavonols (3) (quercitroside, quercétol, kaempférol) (nous n'avons pas trouvé d'hypéroside) et les acides-phénols (3-4) (caféique et chlorogénique). Par contre, à notre connaissance, n'ont pas été signalées les flavanones, ni de C-hétéroside xanthonique comme la mangiférine. Celle-ci se rencontre dans des familles très variées : chez les Monocotylédones, Liliacées (*Anemarrhena*) et Iridacées (*Crocus*, *Iris*) ; chez les Dicotylédones Dialypétales, Bixacées (*Aphloia*), Malpighiacées (*Hiptage*), Anacardiées (*Mangifera*), Légumineuses (*Hedysarum*) et des Ombellifères (*Colladonia*) ; chez les Gamopétales : Gentianacées (*Swertia*). Il serait intéressant de rechercher si cette mangiférine est spécifique du genre *Eliaea* ou si au contraire elle existe dans d'autres Hypéricacées.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BATE-SMITH (E. C.) et METCALFE (C. R.). — *J. Lin. Soc. London (Botany)*, 1957, 55, n° 362, p. 682.
- [2] MATHIS (C.) et OURISSON (G.), *Phytochem.*, 1963, 2, p. 157.
- [3] MICKALUK (A.). — *Dissertation. pharm. Polon.*, 1960, 12, p. 311 et 1961, 13, p. 73 et 81.
- [4] NETIEN (G.) et LEBRETON (Ph.). — *Annal. pharm. fr.*, 1964, 22, p. 69.
- [5] PARIS (R. R.) et M^{lle} ETCHEPARE (S.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1964, 258, p. 5277.