

Antihypertenseur, Activité Vasorelaxant De Rouppelinia Boivinni (Apocynaceae) Et Etude De Relation Structure-Activité Des Alcaloïdes Indoliques Isolées

[Antihypertensive, Vasorelaxant Activity Of Rouppelinia Boivinni (Apocynaceae) And Structure-Activity Relationship Study Of Isolated Indole Alkaloids]

Rainimanantsoa Jonesusbel^{1,2}, Tiandreniny Jipaty², Fiatoa Barthelemy^{2,4}, Herindrainy Audiat Miller^{1,2},
Andrianjara Charles³, Fatiany Pierre Ruphin^{1,2}

¹Faculté des Sciences de l'Université de Toliara BP Toliara 601, Madagascar

²Ecole Doctorale Géosciences, Physique, Chimie de l'environnement et Système de Haute Pathogène (GPCEHP),
Université de Toliara, Toliara 601 Madagascar

³Institut Malgache de Recherches Appliquée (IMRA) lot AVB 77 BP3833 Antananarivo102

⁴Centre Universitaire Régional d'Androy, l'Université de Toliara BP Toliara 601, Madagascar



Résumé – Dans les régions Sud et Sud-ouest de Madagascar, la médecine traditionnelle tient une place dans leur société. Les enquêtes ethnobotaniques menées dans ces régions ont permis de savoir que la plante connue sous le nom vernaculaire « *Feka (nom Mahafaly, Masikoro) ; Fekambato (Nom Antandroy) ; Fekakely (Nom Sakalava)* » est utilisée par la population locale pour traiter l'hypertension. Les résultats des tests biologiques (*in-vivo* et *in-vitro*) effectués sur l'extrait alcaloïde montrent de meilleure activité vasorelaxante. Ces résultats justifient leurs vertus thérapeutiques. L'application de la technique de fractionnement bioguidé sur l'extrait alcaloïde de la partie aérienne de cette plante a permis d'isoler deux produits purs notés PX-1 et PX-2. Les structures chimiques de ces deux produits purs isolés grâce aux utilisations de méthodes des analyses spectrales. Le spectre de l'ultra-violet de la molécule PX-1 enregistré par LHPC-UV-DAD présente un maximum d'absorption à 240nm et à 317nm signifiant la présence de chromophore d'acylindole dans le PX-1. Le pic à Tr= 2.9min correspond à pic de l'ion moléculaire à m/z =355.20141 [M+H]⁺, correspond à la formule brute C₂₁H₂₆N₂O₃. Le produit PX-2 à pour masse moléculaire m/z = 352.17896 [M+H]⁺, ce qui correspond à la formule brute C₂₁H₂₄N₂O₃ et leur spectre UV enregistré par HPLC-UV-DAD présente un maximum d'absorption à 240nm et 317nm cohérente au chromophore de 2-acyl indole. Les analyses par la spectroscopie de la résonance magnétique nucléaire (RMR 1D et 2D) confirment que les structures de bases de PX-1 et PX-2 sont attribuées aux alcaloïdes indoliques. L'analyse de mécanisme pharmacologique de l'activité vasorelaxante de cette plante montre que l'activité relaxante pourrait résulter du blocage de l'influx calcique à travers des cellules musculaires lisses vasculaires car la contraction produite par le CaCl₂ sur l'aorte en milieu dépolarisant sans calcium a été inhibée par l'extrait alcaloïdique de façon concentration dépendante avec de CE₅₀= 0.061±0.0056mg/ml à n=7. Les études préliminaires de toxicité aiguë et chronique effectuées sur l'extrait alcaloïdique de cette plante n'ont montré aucun signe toxique significatif. En perspective, l'étude de la plante utilisée dans la médecine pour traiter l'HAT permet d'isoler deux alcaloïdes de type indolique et de découvrir leurs mécanismes des activités pharmacologiques. Il est moment pour les chercheurs de tourner vers la médecine traditionnelle car elle est une source inépuisable pour la découverte scientifique.

Mots clés – *Antihypertenseur, vasorelaxant, Rouppelinia boivinni, Médecine traditionnelle, Alcaloïde indolique*

Abstract – In the southern and south-western regions of Madagascar, traditional medicine plays an important role in society. Ethnobotanical surveys carried out in these regions have revealed that the plant known under the vernacular name "Feka (nom Mahafaly, Masikoro); Fekambato (Nom Antandroy); Fekakely (Nom Sakalava)" is used by the local population to treat hypertension. The results of biological tests (in-vivo and in-vitro) carried out on the alkaloid extract show improved vasorelaxant activity. These results justify their therapeutic virtues. Bioguided fractionation of the alkaloid extract from the aerial part of this plant resulted in the isolation of two pure products, PX-1 and PX-2. The chemical structures of these two pure products were isolated using spectral analysis methods. The ultraviolet spectrum of the PX-1 molecule recorded by LHPC-UV-DAD shows an absorption maximum at 240nm and 317nm, indicating the presence of an acylindole chromophore in PX-1. The peak at $T_r = 2.9\text{min}$ corresponds to the molecular ion peak at $m/z = 355.20141 [M+H]^+$, corresponding to the empirical formula $C_{21}H_{26}N_2O_3$. Product PX-2 has a molecular weight of $m/z = 352.17896 [M+H]^+$, corresponding to the molecular formula $C_{21}H_{24}N_2O_3$, and its UV spectrum recorded by HPLC-UV-DAD shows absorption maxima at 240nm and 317nm consistent with the 2-acyl indole chromophore. Analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy (1D and 2D NMR) confirms that the basic structures of PX-1 and PX-2 are attributed to indole alkaloids. Analysis of the pharmacological mechanism of this plant's vasorelaxant activity shows that the relaxant activity may result from blockade of calcium influx through vascular smooth muscle cells, as the contraction produced by $CaCl_2$ on the aorta in a calcium-free depolarizing medium was inhibited by the alkaloid extract in a concentration-dependent manner with $EC_{50} = 0.061 \pm 0.0056\text{mg/ml}$ at $n=7$. Preliminary acute and chronic toxicity studies carried out on the alkaloid extract of this plant showed no significant toxic signs. In perspective, the study of the plant used in medicine to treat TAH enables the isolation of two indole-type alkaloids and the discovery of their mechanisms of pharmacological activity. It's time for researchers to turn to traditional medicine as an inexhaustible source of scientific discovery.

Keywords – Antihypertensive, vasorelaxant, *Rouppelinia boivinni*, Traditional medicine, Indole alkaloid.

INTRODUCTION

L'hypertension artérielle (HAT) touche plus d'un milliard des personnes dans le monde [1-3] et elle constitue de la première cause de la mortalité dans les pays industrialisés [4-5] et après les maladies parasitaires comme le paludisme pour les pays sous-développés comme le continent Africain [6-8]. Ce chiffre ne cesse pas d'augmenter à cause du vieillissement de la population mondiale. Ceci devient un véritable problème de santé publique. En outre, l'HTA constitue des risques graves surtout les conséquences car elle provoque une diminution de la durée de vie, ensuite leurs traitements sont jusqu'à la mort des personnes souffrant de cette maladie [9-13]. Or, le problème qui se pose au traitement de l'HTA réside dans l'observance de traitement par le patient et ensuite, c'est un traitement à longue durée ou/et jusqu'à la mort [14-17]. De plus, le médicament utilisé pour traiter la personne souffrant de l'HTA a été caractérisé par leur mécanisme d'activité pharmacologique pour viser l'effet sur le malade afin de minimiser ou d'éviter les risques sur cette maladie, mais l'accès à ce médicament reste limité aux riches à cause d'un coût très élevé et les facteurs socio-économiques de patient très faibles.

À Madagascar, la prévalence de l'HAT est environ de 29,07%, dont environ de 13% dans la province de Toliara, à une moyenne d'âge de 49ans [6, 8]. Les traitements de cette maladie créent des maux dans cette grande Île à cause de la pauvreté de patient, l'insuffisance de médicaments disponibles sur le marché et des infrastructures manquantes [19]. En outre, cette grande Île est un pays riche en plantes médicinales et nombreuses espèces sont utilisées en médecine traditionnelle [19-25], et ensuite la médecine traditionnelle tient une place importante au niveau de la société malagasy et accessible aux systèmes de soins de la santé publique [18]. Les enquêtes ethnobotaniques qui ont été menées dans les régions Sud et Sud-ouest de Madagascar ont permis de savoir que la partie aérienne de la plante connue sous le nom vernaculaire « *Feka (nom Mahafaly, Masikoro) ; Fekambato (Nom Antandroy) ; Fekakely (Nom Sakalava)* » a été utilisée par les populations dans ces régions pour traiter l'HTA.

En face à l'expansion de cette maladie, dont la prise en charge est très élevée, nous sommes intéressés à cette plante. Notre objectif a été d'essayer de valider scientifiquement les usages traditionnels antihypertenseurs des parties aériennes de cette plante, en utilisant un modèle de l'aorta isolée de rat, d'isoler les molécules bioactives par fractionnement bioguidé, d'élucider le mécanisme d'activité pharmacologique en testant les différents agonistes et antagonistes sur les modèles d'organes isolés et en identifiant les structures chimiques des produits isolés par des méthodes spectrales de la RMN(1D et 2D), la SM-HR en mode 6520 Q-TOF positif et HPLC-UV-DAD.

I. MATERIEL ET METHODES

1.1. Sélection et collecte de la plante

La technique de l'enquête ethnobotanique auprès de la population locale proche de la nature, des guérisseurs et des tradipraticiens a été utilisée choisir la plante connue sous le nom vernaculaire *Feka*. Cette enquête a été réalisée dans le huit (08) différentes communes (Ejeda, Ampanihy, Ambohimahavelo, Manorike, Antanimeva, Ambahikily, Ankiliabo et Andranopasy) de la région sud-ouest de Madagascar.

Les enquêtes se déroulent comme suit : avant de parler des plantes médicinales, nous faisons un exposé clair et détaillé dans le langage local sur la ou/et les maladies qui seront ciblées à la fin de l'exposé. Nous posons des questions concernant les plantes utilisées par la population locale ou par le tradipraticien et le guérisseur pour combattre ces maladies et puis les parties prises pour faire les traitements, les doses et les durées de traitements.

Pour terminer, nous essayons de demander les différents noms vernaculaires suivant les dialectes afin de faciliter les collectes et bien comprendre le mode d'emploi et orienter les tests du criblage biologique et nous sollicitons les tradipraticiens de nous accompagner pendant les collectes des plantes.

Après les enquêtes ethnobotaniques, les parties aériennes de la plante sélectionnée ont été collectées à Ambohimahavelo district de Toliara-II, sous guide d'un guérisseur nommé VELOMIHARY. Elle a été identifiée sous le nom scientifique *Rouppelinia boivinni* (Apocynaceae) par Beja RAKOTONIRINA, botaniste de l'IMRA et par comparaison des herbiers au Parc National Botanique et Zoologique à Tsimbazaza Antananarivo. Un herbier a été déposé au laboratoire de Chimie Appliquée de l'Université de Toliara sous le code RN-7.

1.2. Extraction

2Kg de poudre de l'échantillon plante a été macérée dans l'hexane pendant 24 heures sous l'agitation permanente et après filtration, le marc a été étalé dans la hotte chimique ventilée à 30°C pour éliminer l'hexane, s'il était sec, le marc a été imbibé par l'ammoniaque et puis macéré dans du dichlorométhane pendant quatre heures sous agitation permanente. Cette opération a été effectuée à deux fois. Après la filtration, les solutions obtenues ont été séchées à l'aide Na_2CO_3 anhydre puis évaporées à sec. L'extrait brut obtenu a été repris avec de la solution eau acidifiée (10% de l'acide chlorhydrique concentré) puis filtré. La partie soluble dans cette solution a été alcalinisée à l'aide de l'ammoniaque jusqu'à pH=10, et la solution basique obtenue a été partagée avec du chloroforme puis agité pendant cinq minutes et laissée reposer sur l'ampoule décantée pour faire apparaître deux phases. Après décantation, on a récupéré la phase organique qui a été séchée à l'aide Na_2CO_3 anhydre puis évaporées à sec et on a des alcaloïdes totaux de l'écorce de tige de RN-7.

1.3. Isolement des produits purs par fractionnement bioguidé

10g de l'extrait alcaloïde ont été fractionnés à l'aide d'une colonne chromatographique de gel de silice de 60mesh (0.063 à 0.20 mm de diamètre, Merck) élués par dichlorométhane en gradient du méthanol et à la fin de la colonne, on a cinq fractions. Parmi ces fractions, c'est la fraction 3 et 4 présentent des meilleures activités vasorelaxantes sur l'aorte isolée de Rat. 1.75g de F_{III} ($F_{III} = F_3 + F_4$) a été séparé sur une colonne chromatographique de gel de séphadex LH-20 à l'aide d'une phase mobile du mélange de chloroforme /méthanol (V/V) en mode d'éluion isocratique et à la fin de cette colonne, on a six fractions. Après du test biologique, c'est la fraction F_{III-5} qui emporte de l'activité. 450mg de cette fraction ont été éluées sur la colonne chromatographique de gel de silice à l'aide d'un mélange des solvants hexane/acétate d'éthyle/acétone (1/6/3) et chaque préparation de 100ml de la solution de phase mobile ajoutant de 50 μ l de l'ammoniaque. A la fin de la colonne, on a collecté quatre fractions, et les résultats du test biologique qui a été effectué sur ces fractions montrent que la fraction F_{III-52} est la plus active par rapport aux autres fractions. Les analyses par chromatographie sur couche mince qui ont été réalisées sur la fraction F_{III-52} montrent qu'elle n'était encore pure car cette fraction comporte de trois taches cela veut dire qu'elle contient de mélange de trois molécules au minimum. 17mg de F_{III-52} ont été purifiés à l'aide d'une chromatographie sur couche préparative développée dans le mélange des solvants éther diéthylique/chloroforme/méthanol 90° (1.5/8/0.5) plus de 2 μ l de l'ammoniaque. A la fin on a trois produits purs noté PX-1, PX-2 et PX-3 et parmi entre eux, c'est le PX-1 est actif.

1.4. Etudes biologiques

Animaux des expériences

Des rats de race Wistar de sexe mâle ou femelle, ayant un poids moyen de 250±30 grammes, âgé de huit mois ont été expérimentalement utilisés pour les tests biologiques et pharmacologiques. Des souris de race Swiss de sexe mâle ou femelle, pesant en moyenne 25±2 grammes ont été utilisées pour les tests de toxicité aiguë.

Ils sont tous proviennent du laboratoire de l'animalerie de l'Institut Malagache de recherches Appliquées (IMRA) Avarabohitra Itaoso lot AVB 77, BP3833, Antananarivo 102, Madagascar.

Produits utilisés

Les produits utilisés sont : l'extrait hydro-éthanolique (EHA), extrait alcaloïdique total (EA), extrait non alcaloïdique (ENA), fraction F₃ et le prolabo à savoir de : le chlorure de sodium (NaCl), l'hydrure de carbonate de sodium (NaHCO₃), glucose, Chlorure de potassium (KCl), Chlorure de magnésium (MgCl₂), chlorure de calcium (CaCl₂) et eau distillée (H₂O-distillée).

Test in-vivo : mise en évidence de l'activité anti-hypertensif de l'extrait alcaloïdique

Le modèle expérimental de rats hypertendus est obtenu après avoir soumis à un régime enrichi en NaCl PROLABO à 8% pendant cinq semaines. Ces rats ont été conditionnés dans l'appareil de mesure de tension artérielle (appareil IITC) deux heures par jours par animal pendant une période de sept jours. Ensuite ils ont été répartis en cinq lot de cinq individus dont : le lot I, témoin normo-tendu recevait un régime normal de provende (AVITEC 1420), et les autres lots ont reçus un régime enrichi en NaCl PROLABO à 8%.

Au sein des lots hypertendus, le lot II a servi de témoin hypertendu et les trois restants ont été traités avec de l'extrait alcaloïdique par voie intra-gastrique, aux doses respectives de 100mg/kg (lot III), 200mg/kg (lot IV) et 300mg/kg (lot V).

L'extrait alcaloïdique administré a été dissous dans H₂O-distillée, et la pression artérielle des rats a été prise une fois par semaine pendant la période de traitement. La mesure de la pression artérielle des rats est faite au niveau de la queue à l'aide de l'appareil de mesure de tension artérielle (IITC life science).

Test in-vitro

Des tests sur aorte isolée de rat ont été effectués pour déterminer l'effet pharmacologique de l'extrait alcaloïdique et le mécanisme d'action. Pour effectuer ces tests au niveau vasculaire, l'aorte thoracique de rat de race Wistar a été utilisée comme modèle expérimental.

Prélèvement et montage de l'organe isolé.

Les rats de sexe mâle ou femelle, pesant en moyenne 250±30 grammes ont été assommés puis ex-sanguines par section des deux carotides. L'aorte thoracique a été rapidement prélevée, nettoyée et découpée en anneaux de trois millimètres de longueur.

Les anneaux ont été montés dans des cuves à organe isolé contenant vingt millilitres (20 ml) de solution de Krebs-Henseleit, dont la composition en millimole (mM) est la suivante : NaCl (122mM), NaHCO₃ (15mM), glucose (11mM), KCl (5.9mM), MgCl₂ (1.25mM), CaCl₂ (1.25mM) et H₂O-distillée et ensuite maintenu à 37°C à l'aide d'un bai thermostaté et aéré avec du carbogène (95% O₂ et 5% de CO₂), et l'organe a été soumis à une tension isométrique de base de deux grammes (2g).

Pendant deux heures (2H) d'équilibration, la solution de Krebs-Henseleit contenue dans les cuves a été renouvelée toutes les trente minutes. Avant la sensibilisation, les tensions isométriques des anneaux d'aorte ont été réajustées à 2g.

A la fin de cette période d'équilibration, la solution de Krebs-Henseleit enrichie en KCl (100mM) a été utilisée pour sensibiliser l'organe. La présence d'endothélium fonctionnel est mise en évidence par l'effet relaxant de l'Acétylcholine à 10⁻⁶M.

Evaluation de l'activité de l'extrait brute alcaloïdique de la plante codée RN-7

A la suite de la sensibilisation, les anneaux ont été lavés avec de la solution de Krebs-Henseleit normale afin de faire revenir la tension à sa valeur initiale. La phényléphrine (PHE) à 10⁻⁶M a été injectée dans les cuves après 30min du dernier

rinçage en tant qu'agent contracturant. Au plateau de contraction, des concentrations cumulatives et croissantes des extraits testés allant de 0.1 à 1 mg/ml sont injectées afin de mettre en évidence l'activité vasculaire. Les résultats obtenus sont évalués en % afin de calculer la CE_{50} .

Etudes des activités des différentes fractions d'EA

Après l'étape de sensibilisation, la préparation a été lavée au moins trois fois avec de la solution de Krebs-Henseleit normale jusqu'à ce que la tension revienne à sa valeur initiale. Comme pour l'extrait alcaloïdique, la phényléphrine à $10^{-6}M$ incubée dans le bain a été injectée dans les cuves en tant qu'agent de contracturant après 30 min de rinçage. Au plateau de contraction, chaque fraction a été injectée dans les cuves à des concentrations croissantes et cumulatives allant de 0.01 à 0.1 mg/ml.

Elucidation des mécanismes des activités pharmacologiques de la fraction sur les effets vasculaires

Les mécanismes d'activités pharmacologiques de la fraction active a été élucidée grâce aux différents tests des effets inhibiteurs de la fraction vis-à-vis des activités contractiles provoquées par les antagonistes et les agonistes spécifiques.

Effets vasculaires des F_{III} et endothélium ^[28-30].

Dans le but de déterminer l'implication ou non de l'endothélium dans l'effet vasculaire, la fraction F_{III} a été testée sur des aortes pourvues ou non d'endothélium fonctionnel. Pour obtenir les anneaux d'aortes dépourvues d'endothélium fonctionnel, la face luminale des anneaux a été soigneusement grattée avec une tige de coton. Pour ce test, la fraction F_{III} a des concentrations croissantes et cumulatives allant de 0.01 à 0.1 mg/ml a été testée sur des aortes pourvues et non d'endothélium.

Test en présence ou en absence de L-NAME ^[35-36]

Afin de déterminer si l'effet de F_{III} passe par la voie de NO, L-NAME à $10^{-6}M$ a été utilisée en tant qu'inhibiteur spécifique de la NO synthétase endothélium. Pour ce test, la L-NAME a été incubée dans la cuve 30 minutes avant la stimulation des anneaux d'aorte par la phényléphrine $10^{-6}M$ à et au plateau de concentration la fraction F_{III} est injectée avec les concentrations cumulatives et croissantes.

Implication des récepteurs β_2 adrénergiques ^[31-34]

Pour étudier si l'effet de F_{III} implique les récepteurs β_2 -adrénergiques, des tests en absence ou en présence de propranolol ($10^{-5}M$), en tant qu'antagoniste compétitif des récepteurs β_2 -adrénergiques ont été réalisés. L'incubation du Propranolol dans le bin a été effectuée 30min avant la stimulation de l'aorte par la phényléphrine à $10^{-6}M$. Au plateau de contraction, la fraction F_{III} de *R. boivinni* (*Apocynaceae*) a été ajoutée dans la cuve à des concentrations allant de 0.01 à 0.1mg/ml.

Implication des canaux calciques ^[26, 27]

Pour étudier si l'effet de F_{III} implique les canaux calciques membranaires, les anneaux d'aorte ont été soigneusement lavés avec une solution de survie dépolarisante sans calcium et contenant 100mM de KCl jusqu'à l'étape de sensibilisation.

30 minutes après le dernier lavage, la préparation a été lavée avec de la solution de Krebs-Henseleit enrichie en KCl sans calcium, (utilisant l'EGTA pendant 15 minutes dans le bain afin d'éliminer le calcium restant en milieu extracellulaire). Lors du dernier rinçage, l'EGTA n'est plus utilisé. Ensuite, une solution de $CaCl_2$ à différentes concentrations allant de 0.1 à 30 mM a été utilisée pour contracter les aortes. Les aortes sont ensuite lavées par la solution dépolarisante sans calcium pour ramener la tension à base initiale. La fraction F_{III} de 0.025 mg/ml à 0.1mg/ml a été subséquemment incubée dans la cuve 30 minutes avant la contraction des aortes par les mêmes concentrations de $CaCl_2$ (0.1 à 30 mM).

Test de toxicité aiguë

Dans le but de caractériser et quantifier les éventuels effets toxiques de l'extrait alcaloïdique de *R. boivinni*, des tests de toxicité aiguë ont été effectués chez les souris de race Swiss. Ces souris ont été divisées en 5 lots de 5 individus et sont ensuite mises à jeu pendant vingt-quatre heures avant le test mais recevaient de l'eau à volonté. Le lot I servait de témoin et les autres ont reçu les doses respectives : 500mg/kg (lot II), 1000mg/kg (lot III), 1500mg/kg (lot IV) et 2000mg/kg (lot V). Juste après

l'administration de l'extrait et chaque 15 minutes après, pendant trois jours, on va noter le taux de mortalité, et en observant les signes des toxicités.

Analyses statistiques des résultats

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm de l'écart type. L'analyse des résultats a été faite en utilisant le test « t » de Student, pour la valeur de $p < 0.05$, la différence a été considérée comme significative et pour $p < 0.001$, elle a été considérée comme hautement significative.

II. RESULTATS DES ETUDES PHYTOCHIMIQUES

Résultats des enquêtes ethnobotaniques

Les enquêtes ethnobotaniques menées dans le huit (08) différentes communes (Ejeda, Ampanihy, Ambohimahavelo, Manorike, Antanimeva, Ambahikily, Ankiliabo et Andranopasy) de la région sud-ouest de Madagascar ont permis de connaître et de choisir une plante connue sous le nom vernaculaire « *Feka (nom Mahafaly, Masikoro) ; Fekambato (Nom Antandroy) ; Fekakely (Nom Sakalava)* » car elle a été utilisée par les guérisseurs, les tradipraticiens et les populations locales dans cette région pour traiter de l'HTA. Après l'identification botanique, cette plante appartient à la famille de l'Apocynaceae, genre de *Rouppelinia* et espèce de *boivinni* et scientifiquement appelée *Rouppelinia boivinni*. La partie aérienne de cette plante est utilisée très souvent, en pratiquant la méthode de décoction.

Etude phytochimique et détermination structurale des produits isolés

Après l'extraction par macération spécifique en alcaloïde, on a de l'extrait alcaloïdique brut total. L'application de la technique de fractionnement bio-guidé sur l'extrait alcaloïdique, en utilisant la méthode chromatographie (la colonne chromatographique de gel de silice de 60mesh (0.063 à 0.20 mm de diamètre, Merck), de gel de séphadex LH-20, l'analyse par chromatographie sur couche mince et la chromatographie sur couche préparative) répétitif a permis d'isoler trois produits purs notés PX-1, PX-2 et PX-3 et la pureté de ces produits a été justifiée à l'aide des analyses par HPLC analytique, sauf le PX-3 à cause quantité très insuffisante de l'ordre de 0.55mg, toutes les analyses sur lui n'a été pas effectué et il était sous garde au laboratoire comme de produit de référence.

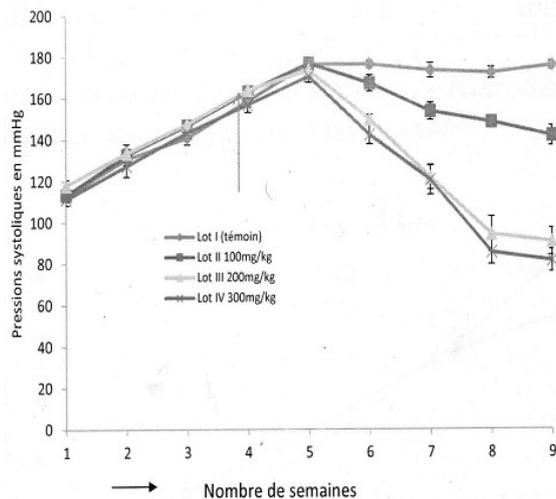
L'application de la technique d'analyse par de différentes méthodes spectrales : spectrométrie de masse à haute-résolution en mode Q-TOF Agilent (MS-HR), spectrophotométrie d'ultra-violet visible (HPLC-UV-DAD) et la spectroscopie de la résonance magnétique nucléaire (mono- et bi-) dimensionnelle (RMN1D, 2D) ont permis d'élucider les structures chimiques complètes avec la stéréochimie spécifique pour le(s) carbone(s) asymétriques du PX-1 et PX-2.

III. RESULTATS DES ETUDES BIOLOGIQUES

Résultats des tests in-vivo

Induction de HTA par le régime enrichi en NaCl à 8% chez le rat.

Les résultats (fig.9) montrent que chez le rat ayant reçu de la provende enrichie en NaCl, la pression artérielle systolique augmente en fonction du temps. Cette pression passe de 112.8 mmHg (pression avant reçoit de la provende enrichie de NaCl à 8%) à 176.4 mmHg (après cinq semaines de régime en NaCl à 8%). Ces résultats indiquent une différence hautement significative ($p < 0.001$).

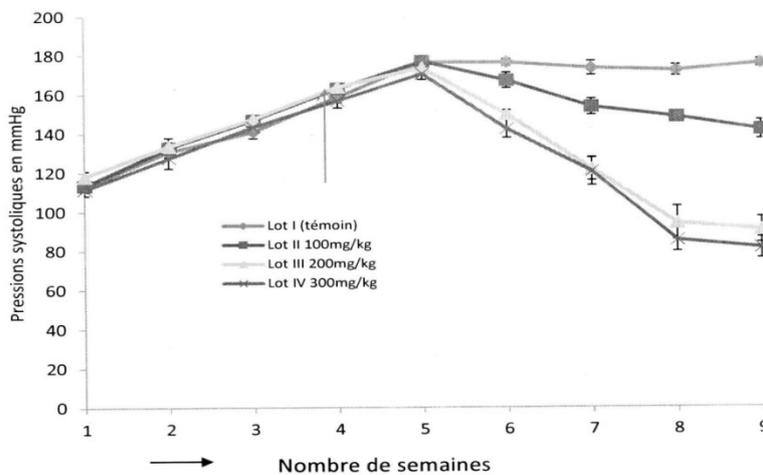


Effet antihypertenseur de l'extrait alcaloïdique (EA) chez les rats hypertendus.

Au début du traitement avec l'extrait EA, la différence des valeurs de la pression artérielle des rats hypertendus n'est pas significative. Ces valeurs varient entre 168 et 170 mmHg.

Les résultats rapportés sur la figure. 10 montrent qu'une semaine après le traitement avec l'extrait EA de *Rouppelinia boivini*, une diminution de la pression artérielle chez les rats hypertendus a été observée. Alors, l'extrait EA provoque une diminution de la pression artérielle de façon dose-dépendante.

Par rapport au lot témoin hypertendu, les résultats obtenus sur les rats traités avec l'EA de *Rouppelinia boivini* montrent une différence hautement significative ($p < 0.001$). L'EA présente d'un effet antihypertenseur avec une valeur de $DE_{50} = 75.12 \pm 3.5$ mg/kg.



Résultats des tests in-vitro

Activités vasorelaxantes des différents extraits : hydro-alcoolique (EHA), alcaloïdique (EA) et non alcaloïdique (ENA) de *Rouppelinia boivini* sur l'aorte isolée de rat.

Les résultats obtenus sont rapportés sur la figure. 11 et les valeurs de CE50 sont présentées dans le Tableau. IV. D'après la figure.11, les résultats montrent que le pourcentage de relaxation provoqué par l'ENA n'atteint pas 20% et par contre les relaxations provoquées par l'EA et l'EHA sont environ de 90%. En effet, l'EHA et l'EA provoquent un effet vasorelaxant de la concentration dépendante et EAN n'est pas statistiquement significative.

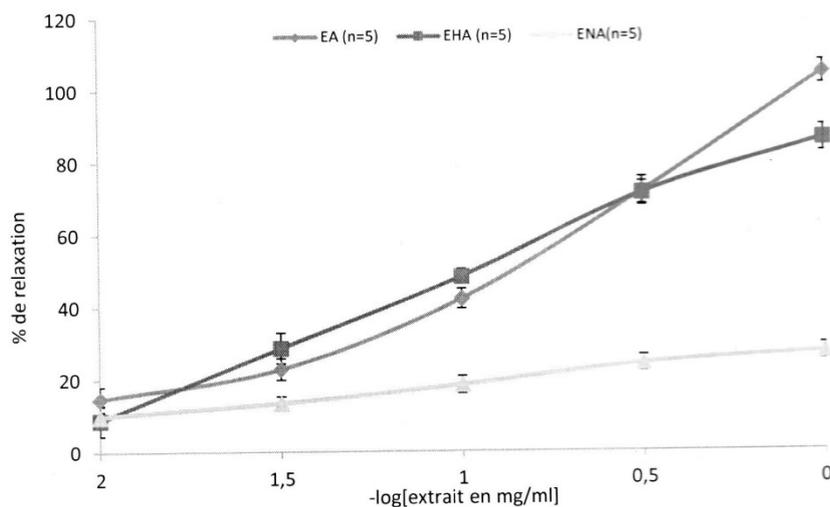


Figure.

Tableau. IV : les valeurs des CE₅₀ de relaxation des extraits EHA, EA et ENA et les pourcentages de relaxations.

Différentes extraits testés	EHA	EA	ENA
CE ₅₀ de relaxation en mg/ml	0.22 ± 0.013	0.20 ± 0.033	-
Pourcentages de relaxation(%) à 1mg/ml	86.13	91.22	19.02

Les valeurs des CE₅₀ (Tableau. IV) montrent que les extraits EHA et EA sont actifs et par contre, l'ENA est inactive, alors les effets vasorelaxants de *Rouppelinia boivinni* sont dus à la famille chimique des alcaloïdes présente dans cette plante.

Activité vasorelaxante des différentes fractions de l'extrait alcaloïdique

Les résultats du test obtenu sur les cinq fractions issues de l'extrait alcaloïdique qui été réalisées sur l'aorte isolée de rat précontractée avec de la phényléphrine à 10⁻⁶M sont représentées sur la figure. 12 et les valeurs de CE₅₀ et le pourcentage des relaxations ont été consignées dans le tableau. V.

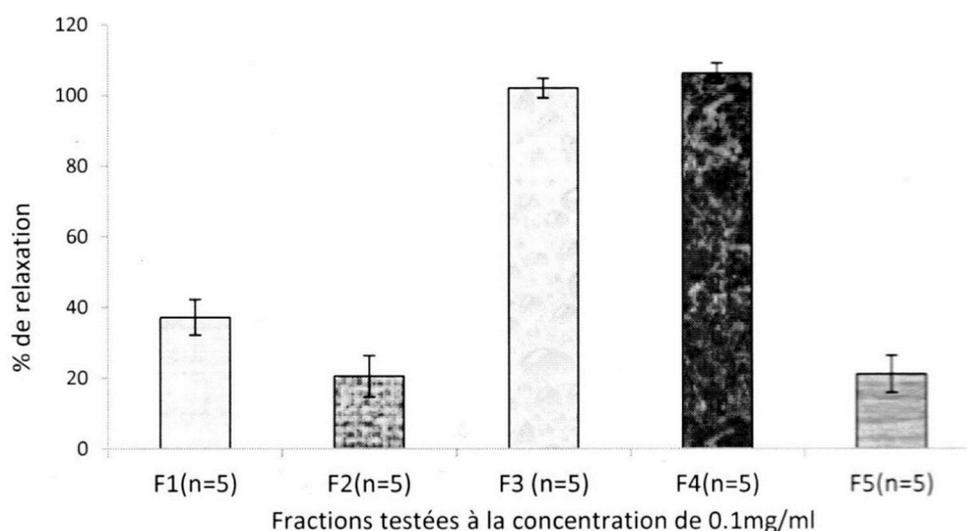


Figure.

Tableau. V : Les pourcentages de relaxation des fractions alcaloïdiques et leurs CE₅₀ respective

Fractions	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅
Pourcentages de relaxation (%) à 0.1mg/ml	37.19	20.53	100	100	21.11
CE ₅₀ de relaxation en mg/ml	-	-	0.045±0.02	0.046±0.03	-

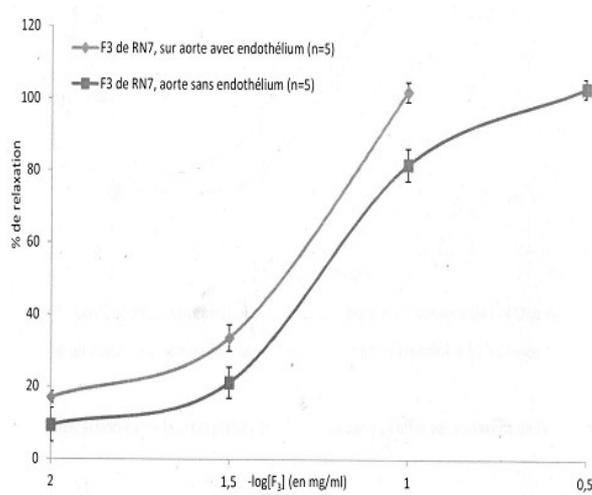
Les pourcentages de relaxation provoquée par les fractions F₁, F₂ et F₅ à la concentration 0.1mg/ml sont inférieures à 38 %, par contre les deux fractions F₃ et F₄ à la même concentration provoquent des effets relaxant à 100 % de relaxation. Alors que, ces deux fractions contiennent des ou de la molécule(s) responsable(s) des activités vasorelaxantes de la plante *Rouppelinia boivinni*.

Les résultats des analyses par CCM réaliser sur ces deux fractions montrent qu'elles présentent du même profil chromatographique, ces résultats m'ont permis de ressembler les deux fractions notée F_{III}.

Etude des mécanismes d'activités pharmacologiques

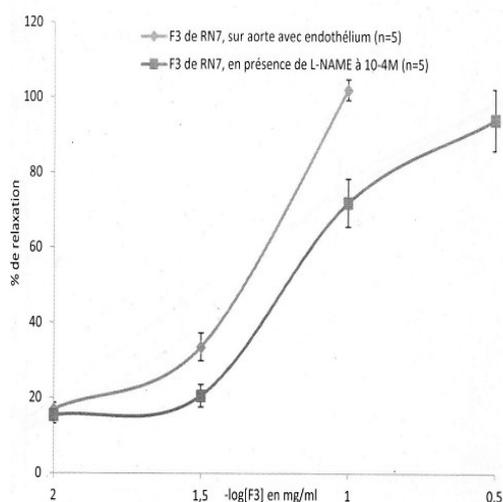
Effet vasorelaxant de F_{III} sur les aortes pourvues et dépourvues d'endothélium.

La figure.6, suivante montre les résultats obtenus avec la fraction F_{III} sur l'aorte de rat précontractée avec 10⁻⁶M de phényléphrine en présence ou en absence d'endothélium. Sur l'aorte avec endothélium, la fraction F_{III} de *Rouppelinia boivinni* provoque un effet relaxant de concentration-dépendant atteignant 100% de relaxation avec une CE₅₀ = 0.045±0.02 mg/ml. En absence d'endothélium fonctionnel, la fraction F_{III} de l'EA produit aussi un effet relaxant concentration-dépendant avec CE₅₀ = 0.059 ± 0.06 mg/ml. Ces résultats montrent que l'effet relaxant de la fraction F_{III} sur l'aorte dépourvue d'endothélium (CE₅₀ = 0.059 ± 0.06 mg/ml) n'est pas significativement différent de son effet sur l'aorte présent un endothélium fonctionnel (CE₅₀ = 0.045±0.02 mg/ml) p> 0.01.



Test en présence et en absence de L-NAME de l'effet vasorelaxant de F_{III}.

La fraction F_{III} produit un effet relaxant concentration-dépendant sur l'aorte isolée de rat précontractée par la phényléphrine à 10⁻⁶M, avec une valeur de CE₅₀ = 0.046±0.03 mg/ml. La présence de L-NAME à 10⁻⁴M dans la cuve a déplacé la courbe vers la droite avec une augmentation de la CE₅₀ = 0.073±0.05 mg/ml (P<0.001) traduisant une inhibition de l'effet de F_{III}.

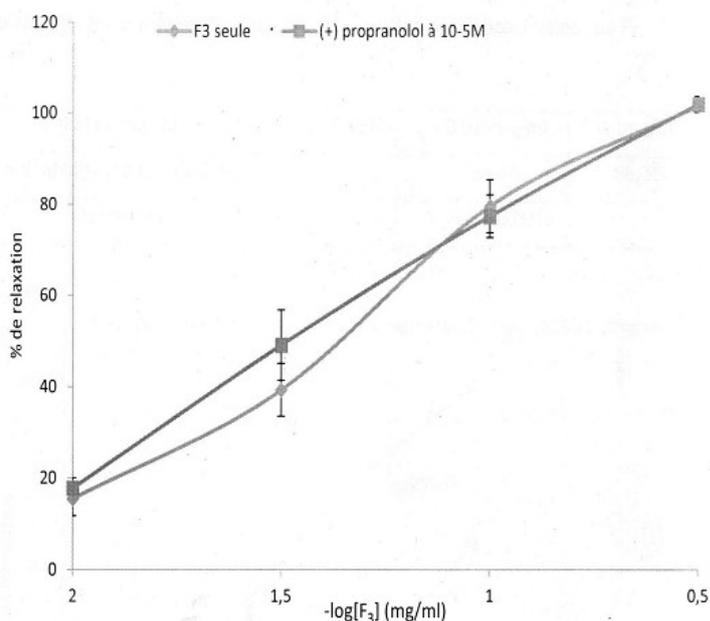


Interaction entre les récepteurs β_2 -adrénergiques et l'effet vasorelaxant de F_{III}

Pour caractériser le mécanisme moléculaire de l'effet vasorelaxant de la fraction F_{III} sur l'aorte isolée de rat, le F_{III} a été testée sur l'aorte isolée de rat en présence et en absence de propranolol à 10⁻⁵M.

- En absence de propranolol, la valeur de CE₅₀ est égale à 0.049 ± 0.05 mg/ml,
- Elle est de 0.051 ± 0.03 mg/ml, en présence de propranolol à 10⁻⁵M.

L'effet relaxant de la fraction F_{III} n'est pas du tout modifié par le propranolol car la différence des valeurs des CE₅₀ obtenues n'est pas statistiquement significative (p>0.05).



Implication des canaux calciques membranaires dans l'effet de F_{III}

Pour déterminer si l'effet relaxant de la fraction F_{III} sur l'aorte isolée de rat interfère avec les canaux calciques ou non, l'effet contractile provoqué par le chlorure de calcium en absence et en présence de la fraction F_{III} a été étudiée.

- En absence de fraction F_{III}, CaCl₂ induit une contraction de concentration-dépendante sur l'aorte isolée de rat,
- En présence de la fraction F_{III}, l'effet contractile de CaCl₂ a diminué proportionnellement avec les concentrations de la F_{III}. La fraction F_{III} diminue donc la contraction provoquée par CaCl₂ sur l'aorte isolée de rat de façon concentration-dépendante avec une valeur de CI₅₀ est égale à 0.061 ± 0.0056 mg/ml (tableau. VI). L'activité vasorelaxante de F_{III} pourrait impliquer l'inhibition des canaux calciques membranaires voltage-dépendants.

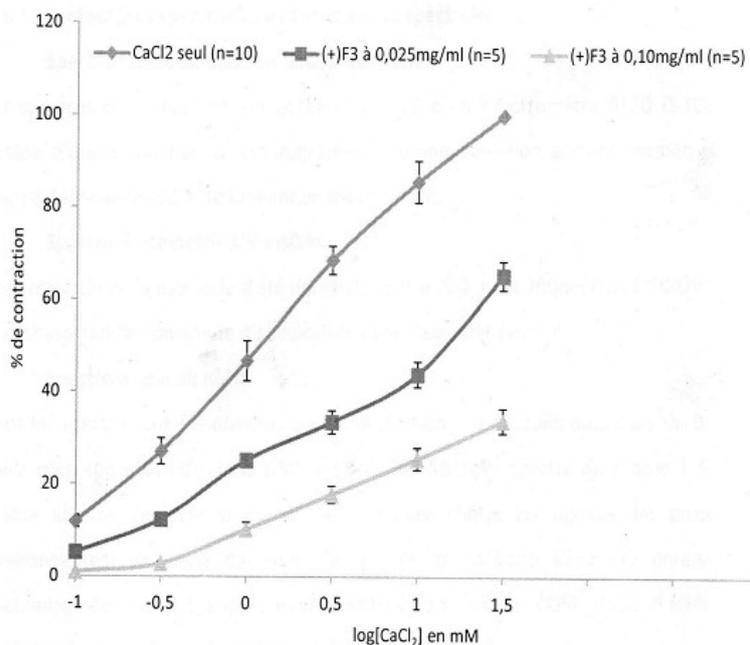


Tableau. VI : Pourcentage d'E_{max} de CaCl₂ en fonction des concentrations de F_{III}

[F _{III}] en mg/ml	0.00	0.025	0.1
% d'inhibition d'E _{max} de CaCl ₂	0	34.70	66.1
CI ₅₀ mg/ml	0.061 ± 0.0056		

Résultat de test de toxicité aiguë

Chez les souris traités, l'administration des doses de l'extrait alcaloïdique de la plante codée RN7 allant de 500mg/kg jusqu'à 2000mg/kg par voie orale n'entraîne aucune mortalité. Par ailleurs des signes d'hyperexcitation et de somnolence ont été observés quinze minutes après l'administration de l'EA à la dose de 1500mg/kg et trente minutes plus tard les souris retrouvent leur état initial.

IV. ANALYSES SPECTRALES DES PRODUITS PURS

Détermination de structure de PX-1

Spectrométrie de masse à haute-résolution et spectrophotométrie UV-visible

Le résultat du produit PX-1 à l'aide d'un spectromètre 6520 Q-TOF Agilent, équipé d'une séparation chromatographique, une détection par spectromètre et une source d'ionisation electron-sprite (ESI) fonctionnant en mode positif montre que le pic sort à Tr = 2.96 min (temps de rétention) correspond à pic parent de l'ion moléculaire à m/z = 355.20141 [M+H]⁺ (fig.1). Cet ion moléculaire a permis de poser une hypothèse de la formule brute de PX-1 correspond à C₂₁H₂₆N₂O₃.

Le spectre UV-visible de la molécule PX-1 enregistré par HPLC-UV-DAD présente un maximum d'absorption à 240 nm à 317 nm (fig.2). Cette bande d'absorption maximale signifiant que le chromophore d'acylindole est présent dans la molécule PX-

1. A l'issue de la littérature écrite par Mei Ling et al, 2012 (*Study on the alkaloids from Voacanga Africana*) a mentionnée que cette bande d'absorption maximale est similaire à celle de la Vobasine. Or l'hypothèse de la formule brute de PX-1 diffère de celle Vobasine par deux protons (2H) plus, ce qui suggère qu'il y ait une double liaison de moins par rapport à la Vobasine, ensuite la détermination de nombre d'insaturation et de cycle (NIC) donnée par l'expression $NIC = X - Y/2 + Z/2 + 1$ ($C_xH_yN_zO_t$), après le calcul montre que la structure exacte de molécule de PX-1 doit comporter dix (10) insaturation. Alors que l'analyse de la structure chimique de la Vobasine, nous a conduits rapidement à une deuxième hypothèse sur la structure chimique de PX-1 car la double liaison entre C19 et C20 de la Vobasine peut être saturée dans la molécule de PX-2.

Spectroscopie de la résonance magnétique nucléaire

Spectre de la RMN monodimensionnelle

L'allure générale de spectre de RMN 1D du proton permet d'avoir une idée et de savoir les renseignements importants concernant les propriétés chimiques sur les protons présents dans la molécule PX-1. En effet, les déplacements chimiques des protons du PX-1 sortent dans la bande spectrale entre 0.9 ppm à 11 ppm (fig.3). Cette spectrale, nous a permis de noter sans ambiguïté les caractères et les attributions sur chaque signaux de ces protons dont : la présence de trois signaux de protons sortant sous forme de singulet respectivement à δH 10.94 attribué à un proton labile de propriété acide lié avec à un hétéroatome comme l'azote et deux signaux à δH 2.51 (3H) et à δH 2.58 (3H) sont attribués respectivement aux protons du groupe N-CH₃ et du groupe méthoxyle -OCH₃, ensuite, on observe quatre signaux de protons correspond sortaient respectivement à δH 7.72 (d, $J_H = 8Hz$), à δH 7.39 (d, $J_H = 8Hz$), à δH 7.24 (d-d, $J_H = 1Hz$ et $8Hz$) et à δH 7.05 (d-d, $J_H = 1Hz$ et $8Hz$) sont tous attribués ambiguïté aux protons du noyau benzénique et à δH 0.94 (t, $J_H = 7Hz$) est attribué à un proton de groupement méthyl, enfin, il y a des signaux de protons sortant respectivement δH 1.148 (m), δH 1.49 (m), δH 2.45 (d, $J_H = 3Hz$), δH 2.49 (m), δH 2.57 (m), δH 2.58 (m), δH 2.91 (t, $J_H = 3.5Hz$), δH 3.23 (d-d, $J_H = 3Hz$ et $13Hz$), δH 3.29 (d-d, $J_H = 8.5Hz$ et $14.5Hz$), δH 3.48 (m), δH 3.49 (d) et δH 3.78 (t-d, $J_H = 3.5Hz$ et $8.5Hz$) sont attribués aux protons du groupe d'alkyl cyclique.

Le spectre de la RMN de carbone 13 (¹³C) de la molécule de PX-1 a été effectué en mode d'enregistrement Broad Band (BB) et les signaux de carbones observés apparaissent sous forme de trait verticaux (fig.4). Dans ce spectre, on a identifié deux signaux sortant respectivement à δC 171.1 et δC 190.2 sont tous attribués sans ambiguïté aux carbones de groupe carbonyle. Ensuite, on observe aussi une série des signaux de carbones alcéniques du radical phényl qui caractérisent le noyau du groupe indolique de la molécule PX-1 à savoir de : à δC 112.2 (CH), à δC 119.2 (Cq), à δC 119.25 (CH), à δC 120.66 (CH), à δC 125.41 (CH), à δC 128.8 (Cq), à δC 133.53 (Cq) et à δC 136.34 (Cq). De plus, on observe trois signaux très caractéristiques (fig.5) qui sortent à δC 12.3, à δC 42.6 et à δC 49.6 correspondant respectivement aux groupes de : -CH₃, N-CH₃ et O-CH₃. Enfin, on a identifié huit signaux de carbones qui sortent respectivement aux : à δC 18.3, à δC 25.5, à δC 31.7, à δC 43.1, à δC 45.8, à δC 46.3, à δC 56.7. Ces signaux possèdent de propriétés différentes. Les attributions et les caractéristiques de ces carbones ont été présentées dans la figure.6.

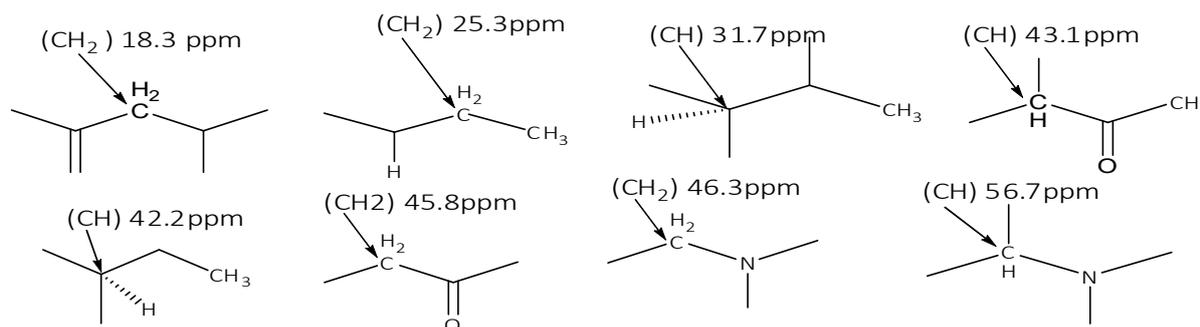


Figure. 6 : Les attributions de huit carbones identifiés au BB

Par comparaison des informations obtenues par les résultats des analyses de : SM-HR, HPLC-UV-DAD et la RMN monodimensionnelle de ¹H et ¹³C avec les données publiées dans les littératures décrites par : MANSOOR et al, (J. Bioorg. Med. Chem. Letter, 2009), NUGROHO et al, (J. Nat. Prod, 2009) et HENRIQUE et al, (J. Ethnopharmacol, 1996), ont permis de

proposer une hypothèse de la structure de base de la molécule de PX-1, de type de l'alcaloïde indolique présentée dans la figure. 7 ci-jointe.

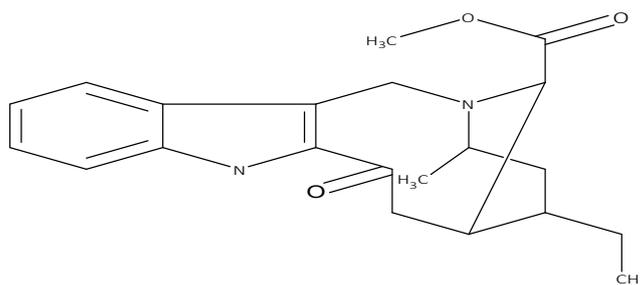


Figure.7 : Proposition de la structure chimique complète de la molécule de PX-1

Pour confirmer, la proposition de la structure complète de la molécule de PX-1, on exploite les informations et les données sur les analyses spectrales de la RMN bidimensionnelle de la molécule PX-1.

Analyse spectrale par la résonance magnétique nucléaire bidimensionnelle

Spectre de corrélation spectroscopy(COSY)

Il permet d'identifier les protons qui sont reliés par des couplages scalaires. Il s'agit de spectre de corrélation de proton-proton en position vicinale et/ou en position géminée qui s'inscrit dans un carré (fig.8).

En effet, le proton à δ H 7.24 corrèle avec les protons qui sortent respectivement à δ H 7.05 et à δ H 7.39, ensuite, le proton sort à δ H 7.05 corrélé avec les protons sortant à δ H 7.72 et à δ H 7.24, de plus le proton à δ H 7.72 se corrèle avec le proton à δ H 7.05 et enfin le proton à δ H 7.39 corrèle avec le proton sort à δ H 7.24. L'ensemble des corrélations identifiées sur le spectre de COSY a été consignée dans le tableau. I.

Spectre de PX-1 enregistré par Hétéroatome Spectroscopy Quantum Corrélation (HSQC)

L'exploitation de spectre HSQC de la molécule PX-1 a permis de relever les corrélations directes entre les protons et les carbones qui sont l'emportés. Les résultats obtenus ont été consignées dans le tableau. I.

Tableau. I : Corrélation HSQC ($^{13}\text{C} - ^1\text{H}$) et COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) de la molécule PX-1

δ (1H) [ppm]	Multiplicité	Couplage (Hz)	δ [^{13}C] [ppm]	COSY
0.94	t	7	12.3	1.48 et 1.68
3.29	d-d	14.5 et 8.5	18.3	3.78 et 3.48
3.48	m			3.78 et 3.29
1.48	m		25.0	0.94, 1.69 et 3.23
1.69	m			0.94 et 1.48
2.57	m		31.7	2.58 et 2.91
2.49	m		42.2	2.45
2.51	s		42.6	-
2.91	t	3.5	43.1	3.78 et 2.57
2.58	m		45.8	3.49 et 2.57
3.49	d			2.58

2.45	m	13.0	46.3	2.49 et 3.23
3.23	d-d	13.0 et 3.0		2.45
2.58	s		49.6	-
3.78	t-d	8.5 et 3.5	56.7	3.29, 3.48 et 2.91
7.39	d		112.2	7.24
7.05	d-d	8.0 et 1.0	119.2	7.05 et 7.24
7.72	d	8.0	120.7125.4	7.05
7.42	d-d	8.0 et 1.0		7.05 et 7.39

Spectre de PX-1 enregistré par Hetero-Molecular Band Corrélation (HMBC)

Le spectre de HMBC de molécule PX-1 a permis de relever les corrélations entre les protons avec les carbones et de justifier la connectivité de la molécule. En premier, on identifie les corrélations concernant le cycle indole présent dans la molécule de PX-1 à savoir de :

- Le proton à δH 7.72 (d) corrèle avec les carbones sortant respectivement à 136.3ppm (Cq) et à 125.4 ppm (CH) ;
- Le proton qui sort à 7.39ppm (d) présente une tâche des corrélations avec des carbones à δC 128.2 (Cq) et à δC 119.25 (CH) ;
- Le proton sort à δH 7.24 (t-d) porté par le carbone à δC 125.5 se corrèle avec les carbones qui sortent respectivement à 120.7ppm (CH) et à 136.3ppm (Cq);
- Le proton à δH 7.05 (t-d) se corrèle avec les carbones sortant respectivement à δC 128.2 (Cq) et à 112.2 ppm (CH) et enfin, les deux protons qui sortent respectivement à δH 3.29 (d-d, $J_H = 8.5\text{Hz}$ et 14.5Hz) et à δH 3.48 (m) portés par le même carbone sort à 18.3ppm corrélerent avec les carbones sortaient respectivement à 119.20ppm et à 133.5 ppm. De plus, le proton à δH 3.29 (d-d) se corrèle aussi avec le carbone qui sort à 128.20ppm.

L'ensemble de cette connectivité a permis d'obtenir la première séquence de la molécule de PX-1 présentée sur la figure. 9 ci-jointe.

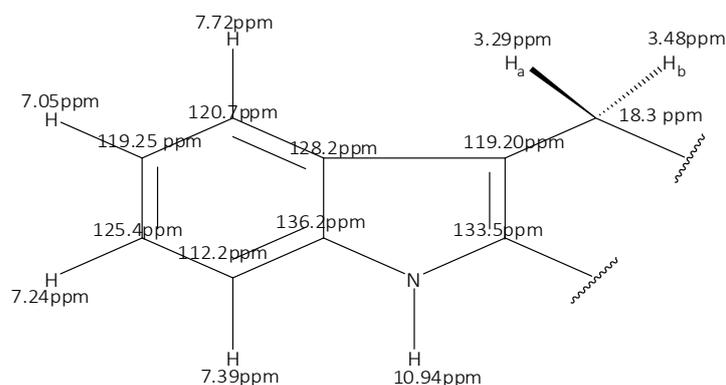


Figure.9 : La première séquence de la molécule PX-1

La deuxième séquence de la molécule PX-1 a été identifiée à partir des corrélations ci-jointes :

- Les signaux de protons sortant respectivement à δH 3.29 et à δH 3.48 portés par le même carbone sort à 18.3 ppm corrélerent avec les carbones à δC 56.7 et à δC 43.1. Or le spectre HSQC, montre que le carbone sort à 56.7ppm est un CH lié avec N-CH₃ et le carbone à δC 43.1 est attribué à CH lié avec un groupe carbonyle. Ensuite, le spectre de COSY affirme que les deux protons portés par ces deux carbones ont été couplés avec la constante du couplage $J_{H-H} = 3.5\text{Hz}$,

Tableau. II : Données spectrales de la RMN (¹H et ¹³C et 2D) de PX-1 et leur attribution

Atome ¹	δ (1H) [ppm]	Multiplicité	J _{H-H} (Hz)	δ [¹³ C] [ppm]	HMBC	COSY
1	10.94	s	-	-		-
2	-	-	-	133.5	6a	-
3	-	-	-	190.3	14a et 14b	-
5	3.78	td	8.5 et 3.5	56.7	6a, 21a et 22	6a, 6b et 16
6a	3.29	dd	14.5 et 8.5	18.3	-	5 et 6b
6b	3.48	m	-			5 et 6a
7	-	-	-	119.2	6a et 6b	-
8	-	-	-	128.5	6a, 6b et 10	-
9	7.72	d	8.0	120.7	11	10
10	7.05	td	8.0 et 1.0	119.2	-	9 et 11
11	7.24	td	8.0 et 1.0	125.4	9	10 et 12
12	7.39	d	8.0	112.2	10	11
13	-	-	-	136.3	11	-
14a	2.58	m	-	45.8	-	14b et 15
14b	3.49	m	-			14a
15	2.57	m	-	31.7	14a et 21a	14a et 16
16	2.91	t	3.5	43.1	6a, 6b et 15	5 et 15
17	-	-	-	171.1	23	-
18	0.94	t	7.0	12.3	-	19a et 19b
19a	1.48	m	-	25.0	18	18, 19b et 21b
19b	1.69	m	-			18 et 19a
20	2.49	m	-	42.2	18 et 19a	21a
21a	2.45	d	13.0	46.3	22	20 et 21b
21b	3.23	dd	13.0 et 3.0			21a
22	2.51	s	-	42.6	-	
23	2.58	s	-	49.6	-	

Détermination de structure de la molécule PX-2

La masse moléculaire de la molécule PX-2 obtenue à l'aide d'un spectromètre 6520 Q-TOF Agilent, en mode positif est m/z = 355.20141 [M+H]⁺, ce qui correspond à la formule brute C₂₁H₂₄N₂O₃. Le spectre UV de la molécule PX-2 enregistré par HPLC-UV-DAD présente un maximum d'absorption à 240nm et 317nm, cohérente au chromophore de 2-acyle indole [Girardot et al,

2012]. Les analyse par RMN 1D, 2D et ^{13}C présentent les signaux attendus et cohérents avec les littératures [37, 41, 42]. La connectivité du noyau est entièrement soutenue par le spectre 2D homo- et hétéro-nucléaire corrélation.

La corrélation à longue distance entre H-15 et CH_3 -18 ; H-9 et H-21a a bien montré la configuration E de la chaîne éthylidène. La configuration S du C-16 a été prouvée par le déplacement chimique hautement blindé du groupe méthoxy (CH_3 -23). Ce qui peut être expliqué par un effet anisotropique du cycle indole. D'autre part, la corrélation NOESY entre N-H et du groupe méthoxy a soutenu également la configuration S du C-16. L'ensemble de ces interprétations des résultats des analyses spectrales (tableau. III) et les données des littératures a permis de conclure que la molécule PX-2 est une Vobasine (fig.12).

Tableau. II : Données spectrales de la RMN (^1H et ^{13}C et 2D) de PX-2 et leur attribution

Atome ¹	δ (1H) [ppm]	Multiplicité	$J_{\text{H-H}}$ (Hz)	δ [^{13}C] [ppm]	HMBC
1	11.37	s	-	-	2, 7, 8 et 13
2	-	-	-	134.5	1, 6a et 14a
3	-	-	-	190.0	14a et 14b
5	3.76	m	14.5 et 8.0	57.1	21a et 22
6a	3.35	dd		20.1	16
6b	3.57	m	-		
7	-	-	-	120.3	1 et 6a
8	-	-	-	128.5	1, 6a, 10 et 12
9	7.78	d	8.0	121.4	11
10	7.05	td	8.0 et 1.2	119.8	12
11	7.24	td	8.0 et 1.2	126.1	9 et 10
12	7.36	d	8.0	112.6	10
13	-	-	-	137.4	1, 9 et 11
14a	2.43	dd	13.2 et 6.4	43.4	-
14b	3.44	dd	13.2 et 11.5		
15	2.53	m	-	30.5	19 et 21a
16	2.73	t	2.4	46.5	6a, et 14
17	-	-	-	171.1	23
18	1.65	dd	6.8 et 1.2	12.4	19
19	5.37	q	6.8	119.1	18 et 21a
20	-		-	137.5	18 et 21a
21a	2.89	d	14.0	51.7	19 et 22
21b	3.81	m	-		
22	2.48	s	-	42.5	-
23	2.57	s	-	50.4	-

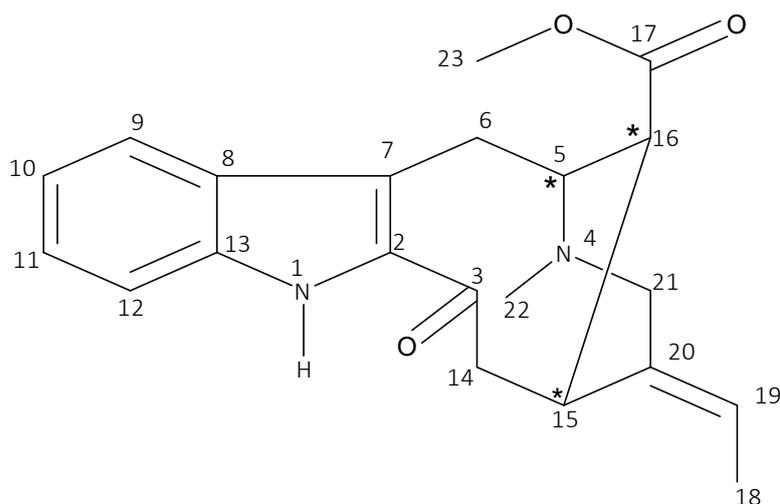


Figure. 12 : Structure chimique de la molécule PX-2

V. ETUDE DES RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE DE Px.1 ET Px.2

D'après l'analyse spectrale de la molécule PX-1, le spectre de masse sort à $T_r = 2.96$ min (temps de rétention) correspond à pic parent de l'ion moléculaire à $m/z = 355.20141$ $[M+H]^+$ est cohérent avec la formule brute $C_{21}H_{26}N_2O_3$ confirmant la structure chimique de la molécule PX-1. Or, le spectre UV-visible de la molécule PX-1 enregistré par HPLC-UV-DAD présente un maximum d'absorption à 240 nm à 317 nm qui étaient similaire à celle de Vobasine. La différence structurale entre la molécule PX-1 et la Vobasine est le degré d'insaturation de la liaison entre les carbones C-19 et C-20 ; Par conséquent, le spectre de la RMN 1H et ^{13}C des molécules devraient être similaires sauf pour le H-18, H-19, H-20 et leur ^{13}C correspondants. Les spectres RMN des H-15 et H-21 ainsi que leur ^{13}C correspondant devraient légèrement modifiés. Le spectre de la RMN de proton montre clairement la disparition des signaux du groupe éthylène (C19-C20) dans le Vobasine et l'apparition des signaux du groupe éthyle dans la zone hautement blindée, ce qui entraîne que le carbone C20 devient asymétrique. A cause de ce carbone asymétrique (C-20), le produit PX-1 est constitué d'un mélange de deux énantiomères non racémiques. Les deux molécules sont identiques quant à la formule brute, la masse moléculaire et la formule développée, cependant elles diffèrent au niveau de la configuration absolue du carbone asymétrique C-20.

La molécule majoritaire du PX-1 identifiée soit la tabernaemontanine à 70% et la dregamine à 30% ou l'inverse. Son spectre de RMN fait état de signaux intense (H-18 et H-19) pour la molécule majoritaire à 0.94ppm ; 1.48ppm et 1.69ppm (tableau. I). Le spectre HSQC montre clairement un signal à δH 1.28 correspondant à un CH_2 (H-19). Le spectre de COSY indique une corrélation entre ce CH_2 et le signal à δH 0.88 (H-18) correspondant probablement à un méthyle. L'ensemble de ces informations confirme la présence d'un deuxième éthyle en minoritaire. De plus la présence de ces deux séries de signaux due à la double configuration (R ou S) de carbone asymétrique (C-20). L'ensemble de ces résultats semblent d'indiquer que le produit PX-1 contient une molécule à la tabernaemontanine en majoritaire avec la configuration de $^*C-20$ est (R) et le groupe éthyle lié à C-20 est devant « en position β » le dregamine en minoritaire avec la configuration de C-20 est (S) et le groupe éthyle lié à C-20 était derrière « en position α » (fig.13).

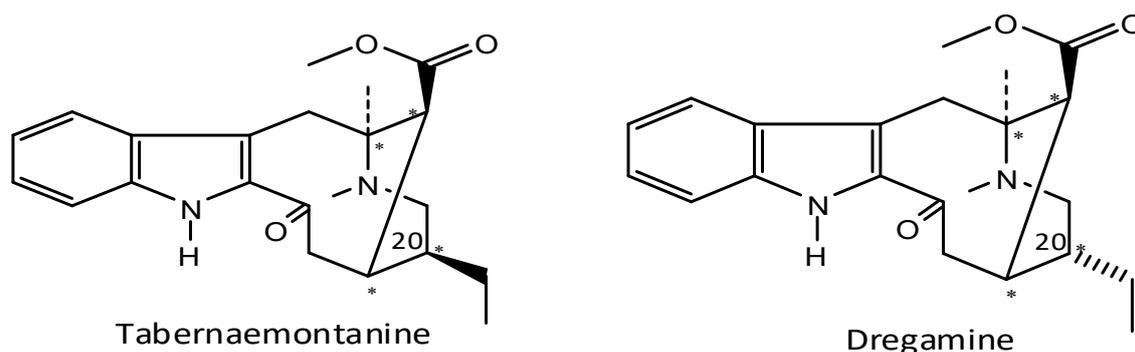


Figure.13 : Les différentes énantiomères de la molécule PX.1

Sur le plan d'activité biologique, le Dregamine a présenté des effets stimulant convulsifs et en même temps il était utilisé en cas de difficulté respiratoire et de la fatigue générale, mais interdit pour la fatigue musculaire [43] car les résultats des tests *in-vivo* et *in-vitro* effectués sur cette molécule ont été semblables aux activités de l'Ibogamine avec de la mécanisme d'action des arcs réflexes affectés ni pro-synaptique ni la transmission neuromusculaire [44], mais avaient probablement passé par le via bloquant de récepteurs de nicotine à la transmission neuromusculaire [45]. Ce qui explique l'importance de Dregamine comme anticonvulsif [46] et aussi sur le traitement d'asthénie musculaire, une activité de dépression sur le système nerveux central et la dépression respiratoire [47, 48].

En ce qui concerne la Tabernaemontanine, cette molécule a montré un effet vasodilatateur sur des chiens [49]. Il est utilisé pour traiter les vaisseaux sanguins dans des humains après les cas des artérioscléroses, le trauma cérébral et des irrégularités circulatoires [50]. Ces cas d'application de cette molécule expliquent que le Tabernaemontanine présente des activités antihypertenseurs. Les bibliographies de ces deux molécules ont permis de montrer que le produit PX.1 est constitué de 70% de tabernaemontanine et 30% de dregamine.

Quant à la molécule PX-2 attribuée à la Vobasine, c'est un alcaloïde typiquement pour la tribu des Tabernaemontaneae (Bulletin de Acad. Mal. Tome 53/1-2 p 162 1975).

Cette molécule a été isolée la première fois sur *Hanzuta modesta*, et le réarrangement intramoléculaire de Vobasine a permis d'identifier une série d'alcaloïde indolique comme « *ervatamine* » qui était douée de propriétés hallucinogènes [P. Potier et al 1973].

Les recherches bibliographiques qui ont été effectuées sur cette molécule, plusieurs auteurs ont mentionné que la Vobasine possède différentes propriétés biologiques, par exemple une activité Antiplasmodial [51], un effet cytotoxique, elle réagit sur l'apoptose dans la cellule cancéreuse HuH-7 [38].

L'administration de Vobasine à 300mg/kg dans des souris présente un effet sur le système nerveux central [52], elle montre également une activité anti-cholinergique [53]. De ce fait Vobasine possède des propriétés biologiques variées suivant les plantes étudiées.

Les résultats des études qui ont été réalisées sur *Rouppelinia boivinni*, montrent que l'extrait alcaloïdique de la partie aérienne de cette plante présente un effet antihypertenseur *in-vitro* et *in-vivo* de dose dépendante de nos modèles, et ces résultats des études scientifiques ont justifié les données ethnobotaniques à propos les utilisations traditionnelles de cette plante. Les principes responsables de cette activité sont le mélange de Tabernaemontanine (70%), avec de Dregamine (30%) et le Vobasine. Les résultats des études biologiques montrent qu'ils sont tous actifs et le mécanisme d'activité pharmacologique de ces molécules sont NO-dépendent et aussi passent par la via canaux calcique de type VOC. Nos résultats des études phytochimiques corroborent sur les données des littératures qu'on a trouvées. Ceux-ci expliquent l'importance de la flore de Madagascar.

Si on observe les relations structure-activité, les molécules actives PX.1 et PX.2 qui ont été isolées de *Rouppelinia boivinni* sont des alcaloïdes indoliques possédant des squelettes de type 2-acyle indole et caractérisés par le radical sur le carbone C-20 (fig.14).

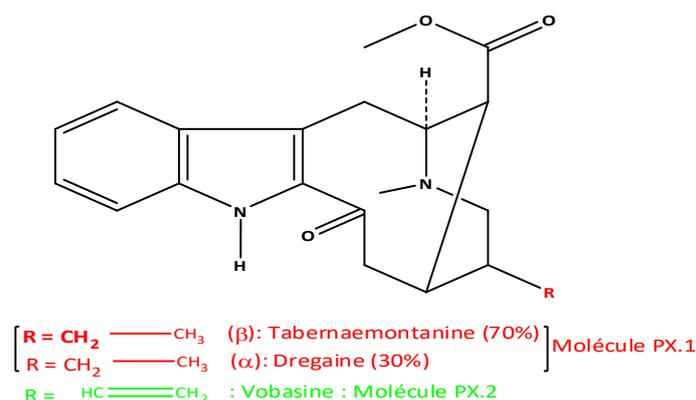


Figure.14 : Les différentes structure des molécules isolées de *Rouppelia boivinni*

D'après Christophe Auge, Ces alcaloïdes indoliques issus de la même voie biogénétique. Dans le cas général, elles possèdent des activités intéressantes et particulier les activités antitumorales comme la vinblastine, la vincristine et la cantharatine isolées de genre *Cantharatus* de Madagascar.

Les clefs des formations biosynthétiques des alcaloïdes indoliques sont qui dérivent de la condensation de la tryptamine avec le sécologonoside un aldéhyde monoterpénique (fig.15), obtenu par une rupture de liaison C.1 – N.2 dans loganoside pour former un secologonosidique oxydation en aldehyde.

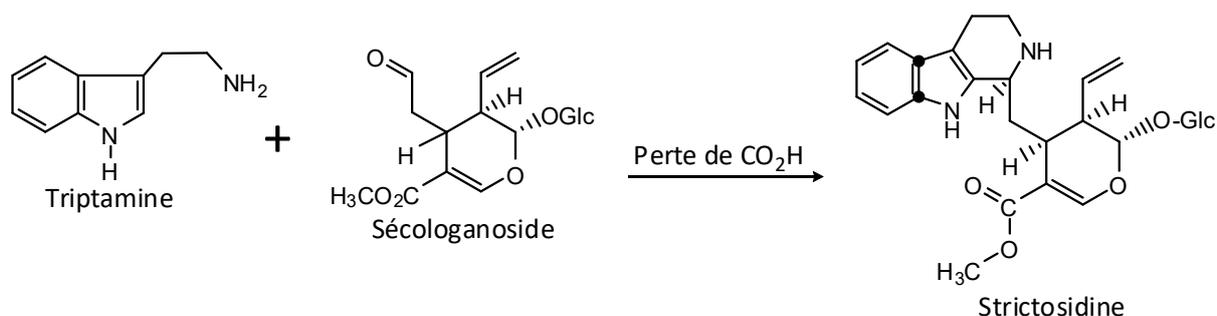


Figure.15 : Première étape de la formation biogénétique des alcaloïdes indoliques

Ce type de réaction est notamment retrouvé dans la biogenèse des alcaloïdes du gelsemium^[54] (fig. 16).

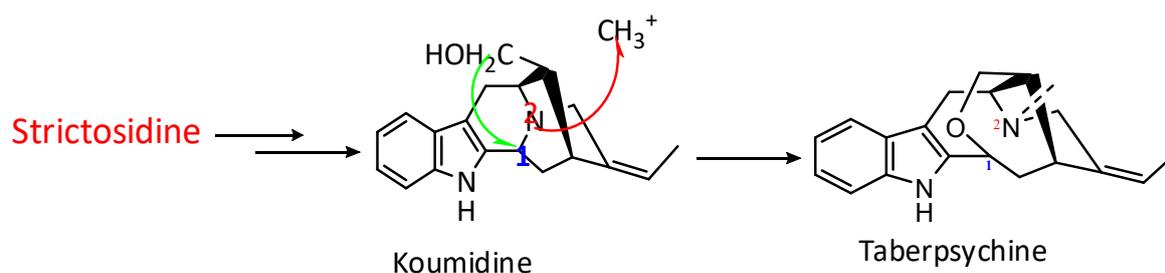


Figure.16 : Voie biosynthèse d'alcaloïdes indoliques du *gelsemium elegans*

Dans cette séquence, l'attaque de l'atome de carbone 1 de la tétrahydro- β -carboline par l'alcool est assistée par la méthylation concomitante de l'atome d'azote 2 qui polarise la liaison. Une voie passant par une oxydation « réversible » de la liaison C₁-N₂ de la tétrahydro- β -carboline est également envisageable. Dans ce cas, l'amide est transformé en amidium qui est hydrolysé en 2-acylindole et ce dernier se cyclise. Tous les alcaloïdes indoliques dérivent de la strictosidine par divers jeux de réarrangements, cyclisations et ajustement des degrés d'oxydation (fig.17). Des formes oxydées de la double liaison C₁-N₂ ont donné naissance à

différentes familles d'alcaloïdes. Cette voie nécessite l'oxydation de l'atome d'azote en 2 de la tétrahydro- β -carboline et ceci paraît difficilement envisageable s'il est engagé dans une liaison peptidique amide.

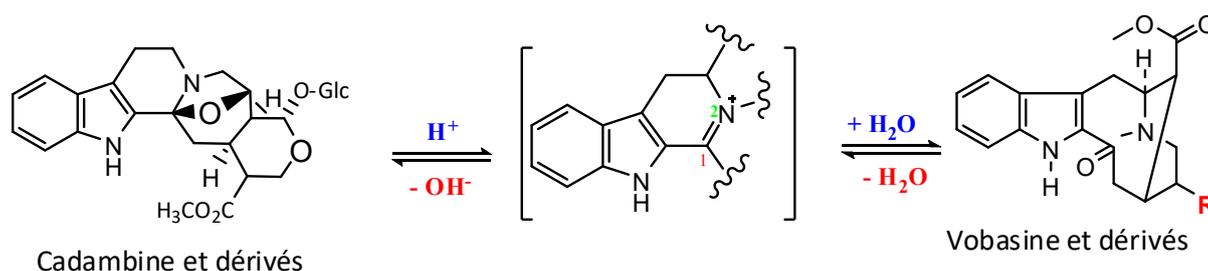


Figure. 17 : Voie d'accès à divers alcaloïdes indoliques via une oxydation de la liaison C₁-N₂

A la comparaison des résultats des tests biologiques effectués sur les composés PX.1 et PX.2, on constate que le PX.1 est plus actif que le PX.2.

Or les deux composés ont le même squelette de base 2-acylindole sauf au niveau de radical R sur le C-20.

On peut conclure alors que les activités antihypertenseurs de *Rouppelinia boivinii* sont liées aux structures de ces composés surtout le radical R sur le C-20, car si R est un éthyle, le produit pur est très actif (PX.1) et si R est un éthylène, elle était moins active comme le PX.2, de plus, l'activité de la molécule PX.1 dépend aussi à la stéréochimie du radical R c'est-à-dire la configuration absolue du carbone asymétrique C-20 car l'éthyle en position β est plus meilleur que l'éthyle en α .

VI. DISCUSSION GENERALE

A Madagascar, la maladie de l'HAT touche environ de 29,07% de la population Malagache à une moyenne d'âge de 49 ans [6]. Les traitements de cette maladie créent majeurs dans cette grande Île à cause de la pauvreté de patient, l'insuffisance de médicaments disponibles sur le marché et des infrastructures manquantes [19]. En face à l'expansion de cette maladie, les hommes chercher des moyens nécessaires à son vie pour avoir les belles vies et les techniques plus simples sont les utilisations des plantes ou appelée aussi « la médecine traditionnelle » pour se soigner et d'éliminer leurs souffrances.

Dans cette grande Île, la médecine traditionnelle tient une place importante au niveau de la société en particulier Sud et Sud-ouest de Madagascar et accessible aux systèmes de soins de santé publique [18, 22, 24].

Les enquêtes ethnobotaniques qu'ont été réalisées dans les Sud et Sud-ouest de Madagascar ont permis de savoir que la décoction de la partie aérienne *Rouppelinia boivinii* (Apocynaceae) et connue sous le nom vernaculaire « Feka » a été utilisée par la population locale pour traiter la maladie de l'hypertension.

Les résultats obtenus de test obtenus sur l'aorte isolée de rat précontractée avec le phényléphrine de 10⁻⁶M montrent que l'extrait alcaloïde et la fraction de cet extrait sont doués d'activités vasorelaxants aussi bien sur l'aorte avec que sur celle dépourvue d'endothélium.

Les études in vivo réalisées ont montrés que l'extrait alcaloïdique (EA) provoque un effet antihypertenseur dose-dépendant sur des rats hypertendus avec une valeur de DE₅₀=75.12 \pm 3.5 mg/kg. Cet effet antihypertensif de l'extrait alcaloïdique pourrait être dû à une action de l'EA au niveau cardiaque et/ou vasculaire.

L'activité relaxante de la fraction F_{III} de l'extrait alcaloïdique n'emprunte pas le mécanisme de relaxation via NO, elle présente un effet vasorelaxant sur l'aorte isolée de rat en présence et en absence de l'endothélium précontractée avec la phényléphrine de 10⁻⁶M avec de CE₅₀ (mg/kg) respective 0.045 \pm 0.001 et 0.046 \pm 0.006. Ce mécanisme a été confirmé par l'utilisation de L-NAME à 10⁻⁴M.

Pour la voie de NO, ce monoxyde d'azote est produit par les cellules endothéliales et agit après diffusion dans les cellules musculaires lisses en se fixant à la guanylate cyclase soluble GCs pour entraîner son activation [32, 57]. Cette dernière a pour effet d'augmenter la concentration en GMPc qui à son tour va stimuler la protéine kinase G qui favorise la sortie de Na⁺ et inhibe l'entrée de Ca²⁺ en réduisant le flux calcique intracellulaire. Cette réduction entraîne la diminution de la formation du complexe

calcium-calmoduline d'où la relaxation des muscles lisses vasculaires [57]. En outre, les résultats du screening phytochimique montrent la présence en teneur élevée des familles alcaloïdiques et en teneur moyen des familles triterpéniques et stéroïdiques. Ces résultats m'ont poussé de rechercher un autre mécanisme pharmacologique.

Le test de l'effet vasorelaxant sur l'inhibiteur de récepteur β_2 -adrénergiques sur l'aorte isolée de rat sans endothélium précontractée avec la phényléphrine à 10^{-6} M en utilisant le propranolol à 10^{-5} M en tant que β -bloquant, montrent que les récepteurs β_2 -adrénergiques ne sont pas impliqués sur l'activité provoquée par la fraction alcaloïdique parce qu'elle a été toujours à relâchée sur l'aorte isolée de rat sans endothélium précontractée.

Dans les conditions physiologiques normales, l'augmentation de la concentration extracellulaire en Ca^{2+} augmente le courant calcique entrant par les canaux calciques de type VOC membranaires lors de la phase de dépolarisant ainsi que sa concentration cytoplasmique active le processus contractile du complexe calcium-calmoduline [58].

Le CaCl_2 a été donc utilisé en milieu dépolarisant sans calcium pour contracter l'aorte isolée de rat. Les ions Ca^{2+} entrent dans les cellules aortiques à travers les canaux calciques voltages-dépendants (VOC) par gradient de concentration. L'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} entraîne ainsi la contraction d'aorte isolée de rat.

Les résultats de tests effet-concentration de CaCl_2 en absence et en présence de la fraction F_{III} ont montré que cette fraction est capable d'inhiber la concentration provoquée par le calcium.

En outre, un anticalcique est une substance capable de bloquer une des étapes de vague calcique [27]. Tenant compte du résultat, la fraction F_{III} est capable d'inhiber la concentration provoquée par le CaCl_2 . F_{III} agirait donc en bloquant les canaux calciques types VOC. De plus, les résultats du criblage phytochimique ont montré une forte présence des alcaloïdes dans la plante *Rouppelinia boivinni*. Ils exercent leurs activités pharmacologiques dans le domaine cardiovasculaires en intervenant au niveau des propriétés électrophysiologiques de cellules vasculaires [59].

Beaucoup de facteurs sont impliqués dans l'hypertension artérielle notamment la paroi vasculaire, sa perméabilité mais aussi l'intégrité de la membrane des cellules vasculaires. Les criblages phytochimiques montrent la présence en teneur moyenne des stéroïdes qui pourraient interférer avec les stérols membranaires à l'origine de l'effet vasorelaxant de la fraction F_{III} . Alors la fraction de l'extrait alcaloïdique inhibe la contraction produite CaCl_2 de façon non-compétitive avec de $CE_{50} = 0.061 \pm 0.056$ mg/ml.

Les résultats de tests de toxicité montrent la présence de signe de la somnolence après quinze minutes de l'administration de l'extrait alcaloïde mais après trente minutes, elle est disparue et aucune mortalité. Ceux qui pourraient être les origines des utilisations dans la médecine traditionnelle de cette plante en cas de la maladie de l'hypertension artérielle.

L'application de la technique de fractionnement bioguidé sur l'extrait alcaloïde de la partie aérienne de cette plante a permis d'isoler deux principes actifs purs notés PX-1 et PX-2 et leurs structures chimiques ont été identifiées, grâce aux utilisations de différentes méthodes spectrales. D'après la détermination de structures, le produit PX-1 est constitué de deux isomères de 70% de Tabernaemontanine et 30% de Dregamine. Les deux molécules sont identiques (formule brute, masse moléculaire et la formule développée), sauf au niveau de la configuration absolue du carbone asymétrique C-20. Pour la tabernaemontanine, le groupe éthyle lié au C-20 est devant « en position β » et elle était derrière « en position α » dans le dregamine. Sur le plan d'activité biologique, le Dregamine a présente des effets stimulant convulsifs et en même temps il était utilisé en cas de difficulté respiratoire et de la fatigue générale, mais interdit pour la fatigue musculaire [43] car les résultats des tests in-vivo et in-vitro qui ont été effectués sur cette molécule ont été semblables aux activités de l'Ibogamine et puis le mécanisme d'action des arcs réflexes affectés ni pro-synaptique ni la transmission neuromusculaire [44], mais avaient probablement passé par le via bloquant de récepteurs de nicotine à la transmission neuromusculaire [45]. Ce qui explique l'importance de Dregamine comme anticonvulsif [46] et aussi sur le traitement d'asthénie musculaire, une activité de dépression sur le système nerveux central et la dépression respiratoire [47, 48].

En ce qui concerne la tabernaemontanine, cette molécule a montré un effet vasodilatateur sur des chiens [49]. Il est utilisé pour traiter les vaisseaux sanguins dans des humains après les cas des artérioscléroses, le trauma cérébral et des irrégularités circulatoires [50]. Ces cas d'application de cette molécule expliquent que la tabernaemontanine présente des activités antihypertenseurs.

A propos de la molécule de PX-2, elle attribuée à la Vobasine, c'est un alcaloïde typiquement pour la tribu des Tabernaemontaneae [Bulletin de Acad. Mal. Tomes 53/1-2p 162, 1975]. Cette molécule a été isolée la première fois sur l'*Hanzuta modesta*, et le réarrangement intramoléculaire de Vobasine a permis d'identifier une série d'alcaloïde indolique comme « ervatamine » qui était doué aux propriétés hallucinogènes [P. Potier et al, 1973]. D'après les recherches bibliographiques qui ont été effectuées sur cette molécule, plusieurs auteurs à mentionnés que la Vobasine possède de différentes propriétés biologiques, citons par exemple qu'elle présente une activité antiplasmodial ^[51], effet cytotoxique et réagit sur l'apoptose dans la cellule cancéreuse HuH-7 ^[38] et l'administration de Vobasine à 300mg/kg dans des souris présente un effet sur le système nerveux central ^[52] et elle montre une activité anti-cholinergique ^[53]. Alors, la Vobasine possède des propriétés biologiques variées suivant les plantes à étudier.

VII. CONCLUSION

A Madagascar, la médecine traditionnelle tient une place importante au niveau de la société en particulier Sud et Sud-ouest de Madagascar et accessible aux systèmes de soins de santé publique. Les enquêtes ethnobotaniques qu'ont été réalisées dans les Sud et Sud-ouest de Madagascar ont permis de savoir que la décoction de la partie aérienne *Rouppelinia boivinni* (*Apocynaceae*) et connue sous le nom vernaculaire « *Feka* » a été utilisée par la population locale pour traiter la maladie de l'hypertension.

Les résultats des études biologiques (in vivo et in vitro) qui ont été réalisées sur le *Rouppelinia boivinni* (*Apocynaceae*), montrent que l'extrait alcaloïdique de la partie aérienne de cette plante présente d'un effet antihypertenseur de dose dépendante de nos modèles. Le mécanisme d'activité pharmacologique de la fraction active de l'extrait alcaloïde de cette plante est NO-dépendante et aussi passé par la via canaux calcique de type VOC.

L'application de la technique de fractionnement bioguidé sur l'extrait alcaloïdique a permis d'isoler trois produits purs. Les structures chimiques de ces deux produits purs ont été identifiées grâce aux applications des méthodes spectrales. Les deux purs ont le même squelette de base attribué à 2-acylindole mais ils diffèrent au niveau de radical R sur le C-20.

Si le radical R est un éthyle, c'est le produit PX-1 et R est un éthylène attribué à la deuxième produit appelée Vobasine. Sur le premier produit (PX-1), le C-20 devient un carbone asymétrique et PX-1 constitue de deux énantiomères non racémiques due à la stéréochimie de radical R c'est-à-dire la configuration absolue du carbone asymétrique C-20.

Si l'éthyle est en position β , c'est la tabernaemontanine (70%) et s'il en position α c'est le Dregamine (30%), ensuite moins actif que l'autre isomère. Parmi ces trois molécules, c'est la tabernaemontanine plus active que les deux, et ensuite le Dregamine afin le Vobasine, alors l'activité vasorelaxante de cette plante dépend le radical R.

L'ensemble des résultats de nos études ont permis de prouver les utilisations traditionnelles de *Rouppelinia boivinni* comme antihypertenseur et d'isoler les principes trois principes actifs de cette plante : Tabernaemontanine, Dregamine et Vobasine.

REFERENCES

- [1] Chobanian AV, 2001. Control of hypertension, an important national priority. *New England Journal of Medicine*, 345(7) : 534-538.
- [2] Chamontin Bernard, 1997. HAT de l'adulte : Epidémiologie, étiologie, physiopathologie, diagnostic, évolution, pronostic, traitement de l'hypertension essentielle. *Revue du praticien Paris France* ; 122 – 132p.
- [3] Bouvenot G, Devulder B, Guillevin L, Queneau P, Schaeffer A, 1994. *Abrégés de Pathologie médicale. Pneumologie, Néphrologie, Cancérologie, Nutrition* ; Edition Masson, Paris ; 506 p.
- [4] Arama Remi Erè, 1988. Contribution au traitement traditionnel de l'HTA. Thèse de Pharmacie, Bamako, 88p.
- [5] Mancia G, 2007. Guidelines for the management of arterial hypertension: the task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J. Hypertens.* 25 : 1105 – 1187.
- [6] Rabarijaona LMPH, Rakotomalala DP, Rakotonirina, ELCJ, Rakotonirina S, 2009.

Prévalence et sévérité de l'HTA de l'adulte en milieu urbain à Antananarivo. Revue d'urgence; 1: 24-27.

[7] Keqrmey PM, Whelton M, Reynolds K, 2005. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. Lancet ; 365, N° 9455 :217-23.

[8] OMS, 1983. Prévention primaire de l'hypertension essentielle. OMS Rapport d'un groupe scientifique ; Bulletin de l'OMS : Série des rapports techniques N° 683 Genève ; 45p.

[9] Mounier Vehier.C, 2002. Evaluation stratification du risque cardiovasculaire selon les recommandations de l'ANAES 2000, dans une population hypertensive. Archives des maladies et des vaisseaux, 95 (7-8) : 667 – 672.

[10] Nghonguia Madeliene, 2001. Exploration de HTA maligne chez les insuffisantes rénales chroniques dans le service de néphrologie de l'hôpital National de Point « G ». Thèse de Médecine: Bamako, 66p.

[11] Redwood H, 2007. Hypertension, society and public policy. Eur Heart. J. Suppl. 9 :13-18.

[12] Delbarre B, Delbarre G, 1993. Abrégé de l'HTA : Physiopathologie et pharmacologie. Edition Masson Paris, 102p.

[13] Dahlöf B, 2000. Cardiovascular Intervention for Endpoint Reduction in Hypertension study (LIFE). A randomised trial against atenolol; Lancet 359: 995-1003.

[14] Hamburger J, Grünfeld JP, Auvert J, Lhermitte F, Pascal VR, 1966. Collection médico-chirurgicale : Néphrologie et urologie 3^{ème} édition vol. 7, Flammarion Médecine Sciences ; 20 Rue de Vaugirard Paris ; 669p

[15] Fourcade L, 2007. Arterial hypertension in Sub-Saharan Africa; update and perspective Medecine tropicale: Revue du corps de santé colonial, 67(6): 559-567.

[16] Meyer Philippe, 1978. HTA : mécanismes, cliniques et traitement, Edition Flammarion, Paris France ; 174p.

[17] Leon Perlemuter, Gabriel Perlemuter, 2006. Guide thérapeutique 5^{ème} édition Publié par Elsevier Masson : 933.

[18] Fatiany Pierre Ruphin, Robijaona Baholy, Randrianarivo Emmanuel, Raharisololalao Amelie, Marie Therese-Martin, Ngbolua Koto-te Nyiwa, 2014. Isolation and structural elucidation of cytotoxic compound from the root bark of *Diospyros quercinia* (Baill.) endemic to Madagascar. Asian Pacific Journal of tropical Biomedicine, 4(3): 780-784.

[19] Fatiany Pierre Ruphin, Fiatoa Barthelemy, Raoelson Guy, Randrianirina Aubin Oscar, Randriantsoa Adolph, Andrianjara Charles, Minjée Zhao, Eric Marchioni, Robijaona Baholy, Solofonirina Marchelin, Ngbolua Koto-te Nyiwa, 2016. Effects of *Cymbopogon pruinus* (Poaceae) from Madagascar on isolated rat thoracic aorta and structural elucidation of its two bioactive compounds. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry; 5(1): 46-55. Available online at www.phytojournal.com

[20] Fatiany Pierre Ruphin, 2015. Recherche de molécules Bioactives sur les extraits et les mélanges complexes volatiles issus de quelques espèces de plantes médicinales et aromatiques du Sud-ouest de Madagascar. Mémoire d'habilitation à diriger de Recherches, Faculté des Sciences, Université de Toliara-Madagascar, p 63.

[21] Chhabra SC, Mahunnah RLA, Mshiu EN, 1998. Plant used in traditional Medecine in Eastern Tanzania. J. of Ethnopharmacology; 25(3): 339 – 359.

[22] Dandouau D, Schripsema J, Verpoorte R, 1994. Charms and Remedies. Bulletin de l'Académie Malagasy-XI.

[23] Pousset JL, 2004. Plantes Médicinales d'Afriques. Comment les utiliser. Secum/Edisud, 287p.

[24] Rabesandratana R, 1986. Résultats des enquêtes et localisation des plantes médicinales de la région de Toliara. Annales des Universités de Madagascar, série de la Nature et Mathématique, 13 ; 131.

[25] Boullard Bernard, 2001. Dictionnaires des plantes médicinales du monde. Réalités et croyances ; Edition ESTEM, Paris, 636 p.

[26] Clapham DE, 1995. Calcium signaling. Cell I; 80:259 – 268.

- [27] Dietz JD, 2008. A number of marketed dihydropyridine calcium channel blockers have mineralocorticoid receptor antagonist activity. *Hypertension*; 51:742 – 748.
- [28] Corder R, Doutwaile JA, Khan NQ, Lees DM, Santos VD, 2006. Endothelium-1 synthesis reduced by red wine; *Nature*, 414 (6866): 863 – 864.
- [29] Flesh M, Scwaez A, Bolum M, 1998. Effect of red and white wine on endothelium dependent vasorelaxant of rat aorta and human coronary arteries. *Am J Physiol Heart Cire Physiol*; 275:1183.
- [30] Fitzpatrick DF, Hirschfield SI, Coffey RG, 1993. Endothelium dependent vasorelaxant activity of wine and other grape product; *Am J Physiol*; 265:11774.
- [31] Grassi-kassisse DM, Wolf-Nunes V, Miotto AM, Farias SE, Brito ARMS, Nune DS, Spadari-Bratfisch RC, 2003. Sensivity to β -adrenoceptor agonist of adipocytes from rats treated whit an aqueous extract of croton cajucara benth. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 55: 253 – 257.
- [32] Lincoln TM, Cornewll TL, 1993. Intracellular cyclic GMP receptor protein. *Faseb J*, 7: 328 – 338.
- [33] Pandey KN 2011. Guanylylcyclase/peptide receptor-A: role in the pathophysiology of cardiovascular regulation. *Can. J. Physiol. Pharmacol*; 89: 557-573
- [34] Reboldi, 2008. Comparison between Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptors blockers. *Journal of hypertension*; 26(1):1282-1286.
- [35] Maeda H, Akaike T, Yoshida M, Sunga M, 1994. Multiple function of nitric oxide in pathophysiology and microbiology: analysis by a new nitric oxide scavenger. *Journal of leucocyte Biology*; 56: 588 – 592.
- [36] Moncada S, Higgs EA, 1993. The l-arginine nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 329: 2002
- [37] Mei L, Deng Y, Li F, Dale G, Chongyu L, 2012. Study on the alkaloids constituents from voacanga Africana. *Zhongyaocai* ; 35(2) : 226-229.
- [38] Mansoor TA, Ramalho RM, Mulhovo S, Rodrigues CMP, Ferreira MJU, 2009. Induction of apoptosis in HuH-7 cancer cells by monoterpène and carboline indole alkaloids isolated from the leaves of *Tabernaemontanae elegans*. *Bio. Org. Med. Chem. Letters*; 19: 4255 – 4258.
- [39] Nugroho AE, Hirasawa Y, Kawaraha N, Goda Y, Awang K, Hadi AHA, Morita H, 2009. Bisnicalayerine A, a Vobasine bisindole Alkaloid from *Hunteria zelanica*. *Journal Natural Product* 72: 1502 – 1506.
- [40] Henriques AT, Melo A, Moreno PRH, Ene L, Henriques JAP, Schapoval ESE, 1996. *Ervatamia coronaria*: chemical constituents and some pharmacological activities. *Journal Ethnopharmacology*; 50, 19 – 25.
- [41] Lane D A, Shah S, Beevers DG, 2007. Low-dose spironolactone in the management of resistant hypertension: a surveillance study. *J. Hypertension*, 25: 891 – 894.
- [42] Liang S, Chen H, Jin Y, Jin L, Jia L, Jingling D, 2007. Chemical constituents from twigs and leaves of *Ervatamia hainanensis* *Zhongguo Zhongyao Zazhi*; 32(13): 1296 – 1299.
- [43] Schripsema J, Dagnino D, Santos RD, Verpoorte R, 1994. Breakdown of indole Alkaloids in suspension cultures of *Tabernaemontanana divaricate* and *Cantharanthus roseus*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*; 38:299-305.
- [44] Schneider JA, Sigg EB, 1957. Neuropharmacological studies on Ibogamine, an indole alkaloid with central stimulant properties. *Ann. N Y Acad Sci*; 66: 756-6.
- [45] Pace CJ, Glick SD, Maisonneuve IM, 2004. Novel iboga alkaloids congeners block nicotinic receptors and reduce drug self-administration. *European Journal Pharmacology*; 492: 159-67.
- [46] Mehrotra PK, Kamboj VP, 1978. Hormonal profile of coronaridine hydrochloride –an antifertility agent of plant origin. *Planta Med*; 33: 345-9.

- [47] Chen G, Bohner B, 1958. A study of central nervous stimulant. *J Pharmacol Exp Ther*; 123: 215-5.
- [48] Goutared R, Gollnhofer O, Sillans R, 1993. Pharmacodynamic and therapeutic applications of iboga and ibogaine in psychotherapy and for controlling narcotic dependence. *Psychedelic Monograph Essays*; 6: 70 – 111.
- [49] Dagnino D, Schripsema J, Verpoorte R, 1993. Comparison of terpenoid indole alkaloid production and degradation in two cell lines of *Tabernaemontana divaricata*. *Plant. Cell. Rep*; 13: 95-8.
- [50] Van-Beek TA, Verpoorte R, Kinh PQ, 1985. Pseudovobparicine, a new dimeric indole Alkaloid from *Tabernaemontana divaricata*. *Planta Medica*; 3: 227-9-79.
- [51] Marion G, Christiane D, Alexandre D, Lionel D, Roger J, Lucile A, Rasoanaivo P, 2012. Indole alkaloids from *Muntafara sessilifolia* with antiplasmodial and cytotoxic activities. *Phytochemistry*; 73: 65 – 73.
- [52] Wasana P, Anchalee P, Nipon C, Siriporn C, 2006. Ethnobotany and Ethnopharmacology of *Tabernaemontana divaricata*. *Indian J. Med Res*; 127: 317 – 335
- [53] Taesotikul T, Panthong A, Kajanapothi D, Verpoorte R, Scheffer JJ, 2003. Cardiovascular effects of *Tabernaemontana pandacaqui*. *J. Ethnopharmacology*; 27: 107-
- [54] Ponglux D, Wongseripipatana S, Sudhahirasakui S, Takayma H, Yokota M, Ogata K, 1988
Studies on the indole alkaloid of *gelsemium elegans* (Thailand): Structure elucidation and proposal of biogenetic route. *Tetrahedron* ; 44: 5075-5094.
- [55] Marion G, Laval-Jeantet, 2006. *Iboga : invisible et guérison, une approche ethno-psychiatrique*. Edition CQFD, Paris; 15: 216-219.
- [56] Scheffers IJ, 2010. Novel baroreflex activation therapy in resistant hypertension: results of a European multi-center feasibility study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 56: 1254-1258.
- [57] Sarbanes K, Kruse MN, Gazinski A, Kuhn M, 2009. Chronic endothelium-dependent regulation of arterial blood pressure by atrial natriuretic peptide: role of nitric oxide and endothelin-1. *Endocrinology*; 150: 2382 – 2387.
- [58] Akizuki O, 2008. Blockade of T-type voltage-dependent Ca²⁺ channels by benidipine, a dihydropyridine calcium channel blocker, inhibits aldosterone production in human adrenocortical cell line NCI-H295R. *Eur. J. Pharmacol.* 584 : 424 – 434.
- [59] Bruneton J, 2002. *Pharmacognosie, Phytochimie des plantes médicinales*, Edition 3, Lavoisier, Paris ; 242 p.