



HAL
open science

Recherche et développement d'extraits antifongiques issus de la flore guadeloupéenne : caractérisations phytochimiques, pharmacologiques et formulation

Murielle Biabiany

► To cite this version:

Murielle Biabiany. Recherche et développement d'extraits antifongiques issus de la flore guadeloupéenne : caractérisations phytochimiques, pharmacologiques et formulation. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2011. Français. NNT : 2011LIL2S007 . tel-00638960

HAL Id: tel-00638960

<https://theses.hal.science/tel-00638960>

Submitted on 13 Jan 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE DE DOCTORAT

Présentée à la



FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE

Ecole Doctorale BIOLOGIE SANTE

Par

MURIELLE BIABIANY

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Mention : SCIENCE DU MEDICAMENT

Spécialité : **Pharmacognosie**

RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT D'EXTRAITS ANTIFONGIQUES ISSUS DE LA FLORE GUADELOUPEENNE :

Caractérisations phytochimiques, pharmacologiques et formulation

Soutenue le 24 Mars 2011, devant le Jury composé comme suit :

Pr. Chantal MENUT	Université de Montpellier 2	Rapporteur
Pr. Joël BOUSTIE	Université de Rennes 1	Rapporteur
Pr. Paul BOURGEOIS	Phytobôkaz, Professeur émérite des Universités	Examineur
Dr. Henry JOSEPH	Phytobôkaz	Examineur
Dr. Murielle NICOLAS	CHRU de Guadeloupe	Examineur
Pr. Sevsen SAHPAZ	Université de Lille 2	Co-directeur
Pr. François BAILLEUL	Université de Lille 2	Co-directeur

A mes grands-parents,

Ba zot ki ja alé é ki ké toujou briyé an fon a kè an mwen, Mèsi

A mes parents,

Ba zot ki ban mwen la vi é lanmou dèpi zyé an mwen wouvè, Mèsi

A mon compagnon,

Ba vou ki koté mwen tou lé jou san janmé bigidi, Mèsi

A ma sœur,

Ba vou TiZétwal an mwen ki ban mwen kouraj, Mèsi

A Wilta et à Cyn,

Ba zot ki ban mwen foss, Mèsi on pil,

A la Guadeloupe,

Ba Pep an mwen, Pep Milflè...

MENTION SPECIALE

Je remercie le Conseil régional de la Guadeloupe, l'Association Nationale Recherche Technologie (ANRT) ainsi que le laboratoire Phytobôkaz pour leurs soutiens financiers essentiels à l'aboutissement de cette thèse.



REMERCIEMENTS AUX MEMBRES DU JURY

Je tiens à remercier le Pr Paul Bourgeois et le Dr Henry Joseph, créateurs du laboratoire Phytobôkaz. Vous avez fait le pari de l'innovation et de la valorisation de notre richesse végétale et traditionnelle. Je vous remercie de m'avoir accordé votre confiance et de m'avoir permis d'intégrer cette belle aventure.

Je tiens à remercier le Pr François Bailleul et le Pr Sevsen Sahpaz de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Lille et d'avoir accepté d'être mes co-directeurs de thèse. Durant ces trois années, vous m'avez également fait confiance et je vous remercie de m'avoir permis de réaliser ce projet.

Mes remerciements vont également au Pr Chantal Menut qui a accepté d'évaluer ce travail. Le domaine des huiles essentielles étant un volet que j'affectionne particulièrement, je suis heureuse de vous compter en tant que rapporteur de ce travail.

Je souhaite également remercier le Pr Joël Boustie pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Je tiens à vous remercier de m'avoir permis de réaliser mes tests de cytotoxicité au sein de votre unité de recherche.

Je tiens à remercier le Dr Murielle Nicolas, qui a tout de suite adopté ce projet en me permettant de collecter toutes les souches provenant du CHRU de Guadeloupe et de Martinique. Je vous remercie tout particulièrement de l'honneur que vous me faites en acceptant de porter votre regard de professionnel sur ce travail.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier l'ensemble des docteurs qui m'ont permis de cadrer mon étude et plus particulièrement: le Dr Nicolas Huc, le Dr Max Renier et le Dr Danila Broussillon qui ont vraiment pris le temps de discuter et de me fournir des données précieuses.

Je tiens à remercier le Pr Daniel Poulain et le Dr Sendid Boualem qui ont accepté de m'ouvrir les portes du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du Centre de Biologie et Pathologie (CHRU) de Lille et m'ont ainsi permis de réaliser mes tests antifongiques. Je remercie également Mme Nadine François pour nos échanges au cours de ces années.

Je tiens à remercier le Dr Aliouat El Mouktar ainsi que Mme Muriel Pottier pour avoir pris le temps de m'initier aux techniques relatives à Pneumocystis, pour la réalisation des tests sur les molécules et pour m'avoir permis de découvrir ce parasite atypique.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr Thierry Hennebelle, le Dr Vincent Roumy et le Dr Racha Al Katib, pour leurs aides et leurs conseils précieux au cours de ces trois années.

Je tiens à remercier le Dr Françoise Lohézic-Le Dévéhat ainsi que Mme Isabelle Rouaud du laboratoire de Pharmacognosie et Mycologie de l'Université de Rennes pour avoir accepté de m'initier aux techniques de cytotoxicité. Je vous remercie de votre gentillesse et de votre encadrement.

Je tiens à remercier le service du CUMA (Centre Universitaire de Mesure et d'Analyse) et notamment le Dr Mostafa Kouach, Mme Nathalie Dual ainsi que Mme Brigitte Callens pour la réalisation des spectres de masse et pour leur gentillesse. De même, je tiens à remercier l'ensemble du Service de Résonance Magnétique Nucléaire, notamment le Dr Vincent Ulte, le Dr Pierre Larzillière, le Dr Christophe Bochu et le Pr Nathalie Azaroual pour l'offre de formation proposée (réalisation autonome des spectres) et leur disponibilité.

Je tiens à remercier le Pr Juergan Siepmann ainsi que le Dr Florence Siepmann du service de Pharmacotechnie Industrielle de l'Université de Lille pour leur aide quant à la formulation des extraits.

Je tiens à remercier le Dr Mike Howsam ainsi que Mlle Stéphanie Quarré du laboratoire de Toxicologie de l'Université de Lille pour la réalisation de l'analyse par ICP-OES.

Je tiens à remercier Ulku Eryuruk et Kevin Knockaert pour leurs aides techniques.

Je tiens à remercier le Pr Francis Trotin pour ses passages furtifs mais toujours enrichissants.

Je tiens à remercier également tous ceux qui ont rendu ces années, loin de mon papillon d'île, plus faciles à vivre. Tout d'abord, les Lilloises du labo : Nadine Popelier, Malika Moreira Da Costa et Jennifer Samaillie mais aussi les Voyageuses et voyageurs du labo : Amin Abedini, Sylvie Morel, Isabelle Kerzaon, Mélanie Phongphaysane et Jaqueline Paredes Choque. Pour finir, je tiens à remercier du fond du coeur Danitza Nebor, Mylène Bride et le cercle Shao Long pour leurs amitiés et leurs soutiens intemporels.

Je remercie tous ceux qui ont croisé ma route tout au long de ces trois années.

Je remercie enfin tous ceux, sur le terrain ou en laboratoire, qui n'ont de cesse de rechercher, de divulguer, de retranscrire et qui nous permettent d'échanger pour avancer.

SOMMAIRE

LISTE DES TRAVAUX	9
LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES	10
LISTE DES ILLUSTRATIONS	12
PRESENTATION DU LABORATOIRE DE PHARMACOGNOSIE DE L'UNIVERSITE LILLE 2	15
PRESENTATION DE L'ENTREPRISE PHYTOBOKAZ	16
INTRODUCTION	17
PARTIE I. MYCOSES CIBLEES ET OBJECTIFS DU PROJET	21
I- MYCOSES SUPERFICIELLES : DEFINITION, CONSTATS ET TRAITEMENTS PHARMACEUTIQUES ACTUELS	22
A- LES DERMATOPHYTIES	23
B- LES PSEUDO-DERMATOPHYTIES à <i>Scytalidium dimidiatum</i>	26
C- LE PITYRIASIS VERSICOLOR (<i>Malassezia</i> sp.)	28
D- LES CANDIDOSES CUTANEEES	29
E- TRAITEMENTS PHARMACEUTIQUES ASSOCIES	31
II- RECAPITULATIF ET OBJECTIFS	36
III- PNEUMOCYSTOSE PULMONAIRE (PcP) : DEFINITION ET TRAITEMENTS	38
A- PRESENTATION	38
B- TRAITEMENTS	39
IV- OBJECTIFS	40
PARTIE II. APPROCHE ADOPTEE ET PLANTES SELECTIONNEES	41
I- NOUVELLE APPROCHE : RECHERCHE D'EXTRAITS ANTIFONGIQUES ISSUS DE LA FLORE GUADELOUPEENNE	42
A- ORIGINE : L'ARCHIPEL GUADELOUPEEN	43
B- UTILISATION TRADITIONNELLE DES PLANTES	45
II- PLANTES SELECTIONNEES	49
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	72
PARTIE III. CARACTERISATIONS PHYTOCHIMIQUES, PHARMACOLOGIQUES ET SELECTION DES EXTRAITS	80
I- REALISATION DES EXTRAITS	81
II- SCREENING PHYTOCHIMIQUE PRELIMINAIRE	83
III- SCREENING D'ACTIVITE ANTIOXYDANTE	85
IV- SELECTION DES EXTRAITS 1 : SCREENING ANTIFONGIQUE	86
A- SCREENING VIS-A-VIS DE <i>Pneumocystis jirovecii</i>	86
B- MYCOSES SUPERFICIELLES	87
V- SELECTION DES EXTRAITS 2 : CYTOTOXICITE	96
VI- SELECTION DES EXTRAITS 3 : BILAN	100
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	101
PARTIE IV. ISOLEMENTS DES COMPOSES ACTIFS	102
I- ACTIVITE ANTIFONGIQUE de <i>Cedrela odorata</i>	103
A- ISOLEMENT DES COMPOSES ACTIFS VIS-A-VIS DE <i>Pneumocystis jirovecii</i>	103
B- TEST ANTIFONGIQUE ANTI-PNEUMOCYSTIS SUR LES MOLECULES ISOLEES OU FRACTIONS ENRICHIES	116
C- ISOLEMENT DES COMPOSES ANTI-DERMATOPHYTES ET ANTI- <i>Candida</i>	117

II - ACTIVITE ANTIFONGUE de <i>Bursera simaruba</i>	118
III - ACTIVITE ANTIFONGIQUE de <i>Pluchea carolinensis</i>	124
A- ISOLEMENT DES COMPOSES	124
B- DETERMINATION STRUCTURALE	125
C- LES FLAVONOIDES SULFATES : Récapitulatif des données antérieures	131
IV - ACTIVITE ANTIFONGIQUE d' <i>Enterolobium cyclocarpum</i>	132
A- ISOLEMENT DES COMPOSES	132
B- DETERMINATION STRUCTURALE	133
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	142
PARTIE V. CONTROLE ET FORMULATION DES EXTRAITS	146
I – CONTROLE DES EXTRAITS ET DES POUDRES	147
A - MISE AU POINT DES METHODES DE DOSAGE DES EXTRAITS	147
B - ETUDE DES POUDRES	150
II - FORMULATION DES EXTRAITS	154
A- SITE D'ACTION DE L'ANTIFONGIQUE : L'EPIDERME	154
B- SITE D'ACTION DE L'ANTIFONGIQUE : L'ONGLE	154
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	156
VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	157
VII. MATERIEL ET METHODES	162
I- MATERIEL VEGETAL ET EXTRACTION	163
II - METHODES CHROMATOGRAPHIQUES DE SCREENING ET FRACTIONNEMENT	164
III - METHODES PHYSICOCHIMIQUES	167
IV- HYDROLYSE ACIDE ET ISOLEMENT DE LA GENINE	169
V - METHODE DE SCREENING ANTIFONGIQUE <i>in vitro</i>	169
A- MYCOSES SUPERFICIELLES	169
B- <i>Pneumocystis</i>	171
VI- METHODE BIOAUTOGRAPHIQUE	171
VII- METHODE D'EVALUATION DE LA CYTOTOXICITE <i>in vitro</i>	171

LISTE DES TRAVAUX

PUBLICATIONS

Roumy V.*, Biabiany M.* , Hennebelle T., Aliouat el M., Pottier M., Joseph H., Joha S., Quesnel B., Alkhatib R., Sahpaz S., Bailleul F., 2010, **Antifungal and cytotoxic activity of withanolides from *Acnistus arborescens***, Journal of Natural Products, 73(7), 1313-1317

*co-auteurs

Alkhatib R., Hennebelle T., Joha S., Roumy V., Güzel Y., Biabiany M., Idziorek T., Preudhomme C., Quesnel B., Sahpaz S., Bailleul F., 2010, **Humulane and germacrane sesquiterpenes from *Ferula lycia***. Journal of Natural Products, 73(4), 780-783

POSTERS

Biabiany M., Roumy V., Hennebelle T., Rouaud I., Lohézic-Le Dévéhat F., Sendid B., Joseph H., Bourgeois P., Bailleul F., **Activité anti-Malassezia de *Pluchea carolinensis*, une Asteracée de l'archipel guadeloupéen**, 4^{èmes} journées internationales de l'AFERP, 16-18 Juillet 2010, Besançon (France)

Nugrahani R., Menut C., Biabiany M., Bailleul F., Sendid B., Joseph H., Bourgeois P., **Neurolaena lobata (L) Cass.: what nature give to your health**, 11^{ème} Symposium d'Aromathérapie et Plantes Médicinales, 17-19 avril 2009, Grasse (France)

CONFERENCE

Corrélation entre usage traditionnel et expérimentation scientifique : propriétés antifongiques des plantes médicinales antillaises, 2010, 6^{ème} CIPAM (Congrès International des Plantes Aromatiques et Médicinales), 3-6 Novembre 2010, Saint-Pierre (Martinique)

LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

> : supérieure

< : inférieure

% : pourcentage

ACN : acétonitrile

AcOEt: acétate d'éthyle

AcOH : acide acétique

bd : broad signal, signal large

BuOH : butanol

CC : chromatographie sur colonne ouverte

CCM : chromatographie sur couche mince

CDCl₃ : chloroforme

CFU : colonie formant unité

Cl₅₀ : concentration inhibitrice de 50% de la population cellulaire

CMI : concentration minimale inhibitrice

CO(CD₃)₂ : acétone

δ : déplacement chimique

DMACA : diméthylaminocinnamaldéhyde

DMSO : diméthylsulfoxyde

DMSO-d₆ : diméthylsulfoxyde deutéré

DO : densité optique

EP : éther de pétrole

Hz : hertz

c-hexane : cyclohexane

Et₂O : diéthyl éther

FeCl₃ : chlorure de fer (III)

HPLC : High Pressure Liquid Chromatography (Chromatographie Liquide Haute Pression ou Performance)

J : constante de couplage

KOH : hydroxyde de potassium

λ : longueur d'onde

l : largeur

L : longueur

L/L : liquide/liquide

MEK : methyl ethyl keton (Méthyléthylcétone)

M&M : matériel et méthode

Me : méthyle

MeOH : méthanol

MPLC : Medium Pressure Liquide Chromatography (Chomatographie Liquide Moyenne Pression)

MtBE: methyl ter-butyl ether (ter-Butylméthyléter)

MTT : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltétrazolium

m/z : masse/charge de l'ion

NP : natural product

ov : overlap, signaux superposés

PEG : polyéthylène glycol

ppm : partie par million

R&D : Recherche et développement

Rf : rapport frontal

RMN : résonance magnétique nucléaire

SM : spectrométrie de masse

UI : unité internationale

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VLC : Vacuum Liquid Chromatography (Chromatographie liquide sous vide)

LISTE DES ILLUSTRATIONS

TABLEAUX

Tableau 1	Clinique de la pneumonie à <i>Pneumocystis jirovecii</i> chez les patients immunosupprimés infectés (VIH+) et infectés (VIH-)
Tableau 2	Plantes et organes sélectionnés
Tableau 3	Rendements d'extraction
Tableau 4	Screening phytochimique des extraits
Tableau 5	Screening anti-oxydant des extraits
Tableau 6	Screening antifongique des extraits vis-à-vis de <i>P. jirovecii</i>
Tableau 7	Screening antifongique des extraits vis-à-vis des mycoses superficielles
Tableau 8	CMI des extraits de <i>B. simaruba</i> et <i>C. odorata</i> vis-à-vis des <i>Candida</i>
Tableau 9	CMI des extraits de <i>B. simaruba</i> et <i>C. odorata</i> vis-à-vis des dermatophytes
Tableau 10	CMI des extraits d' <i>E. cyclocarpum</i> vis-à-vis de <i>Scytalidium</i>
Tableau 11	CMI des extraits de <i>B. simaruba</i> et <i>P. carolinensis</i> vis-à-vis de <i>Malassezia</i>
Tableau 12	Attributions et corrélations des signaux RMN du composé co1
Tableau 13	Constantes de couplages des dimères B1, B2, B2g (galloyl), B3 et B4 ; valeurs mesurées et théoriques
Tableau 14	Attributions et corrélations des signaux RMN du composé co2
Tableau 15	Activités des molécules et fractions vis-à-vis de <i>Pneumocystis jirovecii</i>
Tableau 16	Corrélations et signaux RMN des composés pc2, pc3 et pc4
Tableau 17	Corrélations clefs et signaux RMN du composé ec1
Tableau 18	Matériel végétal
Tableau 19	Méthodes et réactifs utilisés pour le screening phytochimique CCM des extraits bruts

FIGURES

Figure 1	Modalités de développement d'un dermatophyte sur la peau et les phanères
Figure 2	Sites d'action des différentes classes d'antifongiques
Figure 3	Localisation anatomique des mycoses superficielles ciblées dans notre étude
Figure 4	Cycle biologique hypothétique de <i>Pneumocystis</i> spp.
Figure 5	Carte de l'archipel et localisation des points de récolte des plantes sélectionnées
Figure 6	Composé co1
Figure 7	Spectre RMN <i>J</i> -mod
Figure 8	Spectre RMN ¹ H
Figure 9	Tanins condensés
Figure 10	composé co2
Figure 11	Spectre de RMN <i>J</i> -mod du composé co1
Figure 12	Spectre RMN ¹ H du composé co1
Figure 13	Agrandissement 1 du spectre de RMN ¹ H du composé co2
Figure 14	Agrandissement 2 du spectre de RMN ¹ H du composé co2
Figure 15	Agrandissement 3 du spectre de RMN ¹ H du composé co2
Figure 16	TOCSY-sélectif des protons H6't et H6'u

Figure 17	TOCSY-sélectif des protons H _{2u} et H _{3'u}
Figure 18	Agrandissement du spectre HMBC du composé co2
Figure 19	Représentation 3D des rotamères prédominants (<i>compact</i>) observés en mélange hydro-alcoolique
Figure 20	<i>Cedrela odorata</i> : limonoïdes isolés de l'écorce et molécule d'azadirachtine (Neem)
Figure 21	<i>Cedrela odorata</i> : dérivés triterpéniques isolés du bois de cœur
Figure 22	<i>Bursera simaruba</i> : Quelques lignanes isolés de l'écorce et des feuilles
Figure 23	Squelette de base des flavonoïdes <i>stricto sensu</i>
Figure 24	Spectre de RMN ¹ H du mélange pc2 / pc3
Figure 25	Composé pc2
Figure 26	Schéma de fragmentation du composé pc2
Figure 27	Composé pc3
Figure 28	Spectre de RMN ¹ H du mélange pc4
Figure 29	Composé pc4
Figure 30	Composé ec1
Figure 31	Spectre de masse MS ² du composé ec1
Figure 32	Spectre de RMN ¹ H du composé ec1
Figure 33	Spectre de RMN <i>J</i> -mod du composé ec1
Figure 34	Spectre HSQC du composé ec1
Figure 35	Principales corrélations COSY des protons de la génine
Figure 36	Principales corrélations HMBC des protons de la génine
Figure 37	TOCSY-sélectif après irradiation du proton à 5,57 ppm (H _{9'})
Figure 38	Analyse du spectre de masse MS ² de la génine ec1
Figure 39	Gamme étalon de la (+)-catéchine
Figure 40	Gamme étalon des saponosides
Figure 41	Gamme étalon des flavonoïdes sulfatés
Figure 42	Principaux paramètres influençant la qualité des extraits

GRAPHIQUES

Graphique 1	Courbe d'activité antifongique de <i>B. simaruba</i> vis-à-vis des <i>Candida</i>
Graphique 2	Courbe d'activité antifongique de <i>C. odorata</i> vis-à-vis des <i>Candida</i>
Graphique 3	Courbe d'activité antifongique de <i>B. simaruba</i> vis-à-vis des dermatophytes
Graphique 4	Courbe d'activité antifongique de <i>C. odorata</i> vis-à-vis des dermatophytes
Graphique 5	% d'inhibition des extraits sur les cellules HaCat en fonction de leurs concentrations
Graphique 6	% d'inhibition des extraits sur les cellules U937 en fonction de leurs concentrations
Graphique 7	Cytotoxicité des extraits

PHOTOGRAPHIES

Photo A	<i>Trichophyton rubrum</i> (Milieu Sabouraud + chloramphénicol)
Photo B	<i>Scytalidium dimidiatum</i> (Milieu Sabouraud + chloramphénicol)
Photo C	<i>Malassezia</i> sp. (Milieu sabouraud supplémenté d'huile d'olive)
Photo D	<i>Candida albicans</i> (Milieu Sabouraud + chloramphénicol)

Photos AA1 à AA3 *Acnistus arborescens*
Photos BS1 à BS4 *Bursera simaruba*
Photos CO1 à CO4 *Cedrela odorata*
Photos EC1 à EC5 *Enterolobium cyclocarpum*
Photos EA1 à EA3 *Evolvulus alsinoides*
Photos GS1 à GS2 *Gliricidia sepium*
Photos PA1 à PA4 *Pisonia aculeata*
Photos PC1 à PC4 *Pluchea carolinensis*
Photos PO1 à PO4 *Pluchea odorata*
Photos SB1 à SB5 *Senna bicapsularis*

Crédits photos : Murielle Biabiany sauf les photos AA2 et PO2 : Henry Joseph

PRESENTATION DU LABORATOIRE DE PHARMACOGNOSIE DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2



Adresse

Laboratoire de Pharmacognosie
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
3, rue du Professeur Laguesse
B.P. 83, 59006 Lille Cedex

Organisation

Equipe d'accueil

Le laboratoire de Pharmacognosie est rattaché à l'équipe d'accueil E.A. 4481 « Groupe de Recherche Interdisciplinaire Innovation et Optimisation Thérapeutique » GRIIOT sous la responsabilité du Pr Jean-Paul BONTE. Le groupe réunit des équipes reconnues pour leur compétence dans le domaine de la découverte et du développement de « candidats médicaments », de leurs conceptions jusqu'aux études cliniques, que les substances soient d'origine synthétique ou issues du vivant (bactéries, champignons, végétaux supérieurs). Trois thématiques principales sont initialement retenues : Cancer, Inflammation et Maladies neurodégénératives.

Laboratoire de pharmacognosie

Le laboratoire de Pharmacognosie est dirigé par le Pr François BAILLEUL. L'équipe scientifique est composée comme suit :

Pr Sevsen SAHPAZ

Thierry HENNEBELLE (Maître de conférences)

Vincent ROUMY (Maître de conférences)

Sylvie MOREL (ATER)

Jennifer SAMAILLIE (Technicienne de laboratoire)

PRESENTATION DE L'ENTREPRISE PHYTOBÔKAZ

Siège social
Gros Morne Dolé
97113 Gourbeyre
Guadeloupe



Contact
<http://www.phytobokaz.com>

Organisation de l'entreprise :

Direction : Henry JOSEPH
Directeur scientifique : Paul BOURGEOIS
Chef de production : Karine HIERSO
Technicien chimiste : William RAMDINI
Technicien chimiste : Marie-Julie SERIN
Aide laborantin : Yvon JOSEPH

Activités et produits

Le laboratoire *Phytobokaz* produit et propose des formulations intégrant des actifs issus de la biodiversité végétale de la Caraïbe pour des applications de santé et de bien-être. Pour ce faire, le laboratoire maîtrise les différentes étapes de réalisation telles que :

1. La recherche et développement
2. La production et la gestion des matières premières
3. La transformation en produit fini.

Gamme Phytosanté



Virapic: Equilibre des défenses naturelles de l'organisme

Banuline: Anti-stress, confort gastrique et digestif

Rumago: Gel relaxant pour les muscles et articulations

Gamme Phytocosmétiques



Ti Trézo: Gel anti-cellulite

Huile de Galba: Régénérant et purifiant pour la peau et les cheveux

Bioven: Gel rafraîchissant pour soulager et tonifier les jambes lourdes

INTRODUCTION

Né de la passion de ses créateurs, le Dr Henry Joseph et le Pr Paul Bourgeois, pour leur patrimoine végétal et leurs professions respectives de pharmacien et de chimiste, le laboratoire **Phytobôkaz** cherche à intégrer l'innovation à la valorisation des phytoressources du bassin caribéen en vue de répondre aux problématiques de santé rencontrées ici ou ailleurs.

Depuis 30 ans, le Dr Henry Joseph est convaincu de l'intérêt des plantes caribéennes tant sur le plan sanitaire, que culturel et économique. A partir de plantes issues de l'environnement caribéen, le laboratoire Phytobôkaz réalise ainsi des formulations à application cosmétique et de santé en garantissant à la fois innocuité et activité thérapeutique.

Le **laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Lille 2**, sous la direction du Pr François Bailleul, a pour axe de recherche principal la découverte de nouvelles molécules issues de plantes à potentialité thérapeutique intéressante et est rattaché à l'équipe d'accueil E.A. 4481 « Groupe de Recherche Interdisciplinaire Innovation et Optimisation Thérapeutique » GRIIOT.

Autour d'une collaboration entre le laboratoire de Pharmacognosie de Lille et l'entreprise *Phytobôkaz*, il est apparu intéressant de pouvoir mener à bien l'étude pharmacologique et phytochimique de plusieurs plantes en vue de développer de nouveaux extraits adaptés aux pathologies fongiques.

En effet, ces pathologies sont fréquentes et, bien que le traitement des mycoses cutanées bénéficie déjà de molécules antifongiques présentes sur le marché, se posent divers problèmes :

- les résistances sont de plus en plus nombreuses
- les récurrences également (il n'y a pas d'immunité vis-à-vis des champignons, mais plutôt la persistance d'un terrain qui demeure favorable aux mycoses)
- les effets secondaires de certains antimycosiques
- l'absence de traitement efficace pour certaines pathologies comme les scytalidioses

ceci sous un climat tropical dont les caractéristiques d'humidité et de chaleur constituent des facteurs favorisants.

Ces différentes difficultés ont suscité notre intérêt pour la recherche d'autres substances fongitoxiques pouvant être une réponse de traitement ou venir en complément des traitements actuels.

Lors de cette étude, nous nous sommes focalisés sur les mycoses superficielles dues aux dermatophytes, aux moisissures du genre *Scytalidium* et aux levures du genre *Candida* et *Malassezia*. Suite à une enquête menée en Guadeloupe au niveau de professionnels de santé ces mycoses apparaissent comme les pathologies fongiques nécessitant réellement l'élaboration de nouveaux antifongiques. Ces mycoses peuvent toucher toute la population et sont aggravées chez les sujets diabétiques et immunodéprimés.

Nous avons, d'autre part, eu l'opportunité de nous confronter à un autre champignon : *Pneumocystis jirovecii*. Il affecte les immunosupprimés tels les greffés sous immunosuppresseurs et les sidéens chez lesquels il est le plus souvent observé de nos jours. Comme de nombreux pays de par le monde, les DOM demeurent très touchés par le VIH. C'est pourquoi nous avons également été sensibles à cette deuxième problématique.

Dans une première partie, nous découvrirons plus en détail ces champignons et leurs traitements pharmaceutiques actuels ; les objectifs de ce projet seront alors brièvement définis.

La seconde partie sera consacrée à la nouvelle approche appliquée dans ce projet ainsi qu'aux plantes sélectionnées.

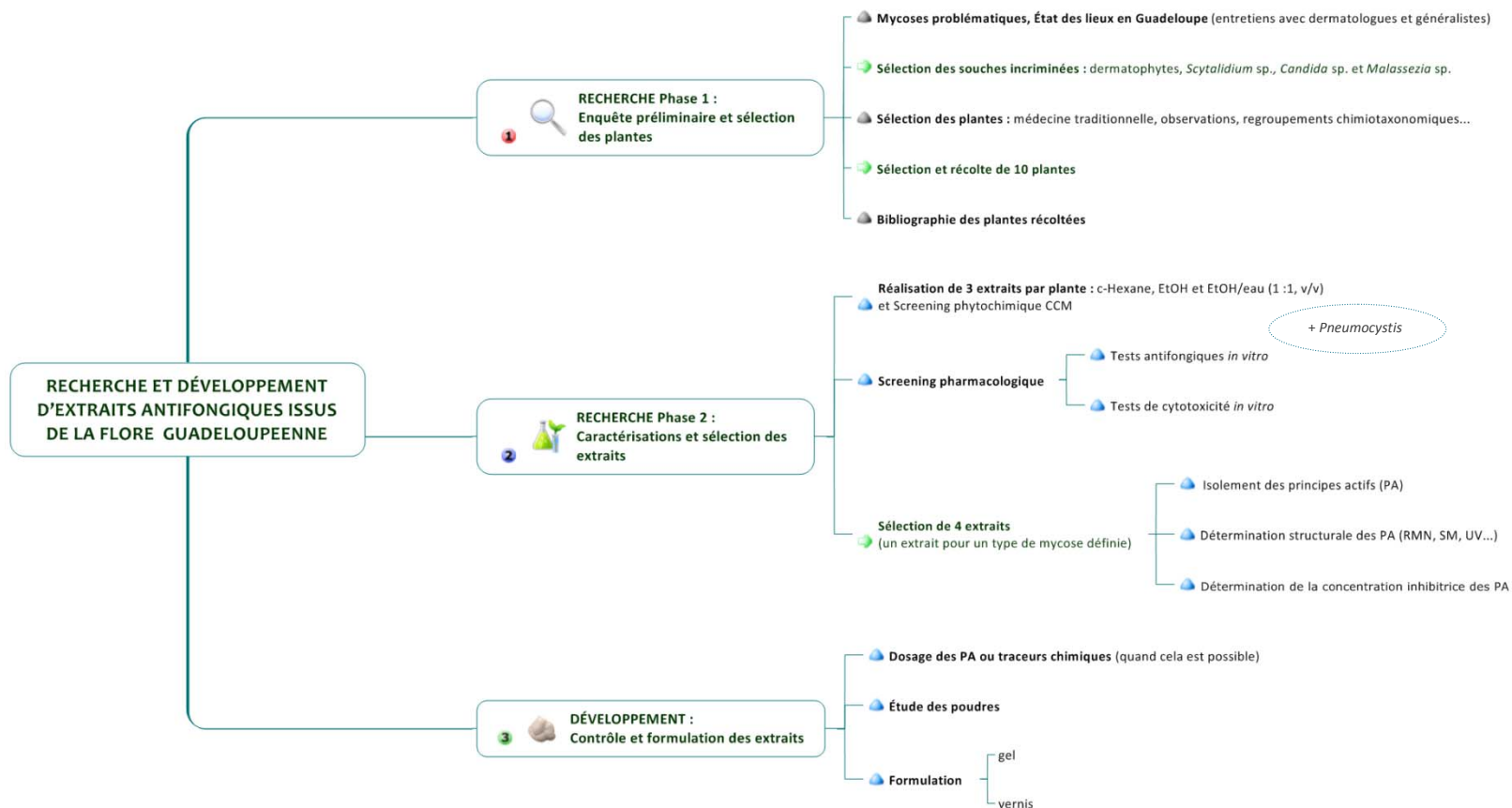
Les caractérisations phytochimiques préliminaires et pharmacologiques permettant la sélection des extraits feront l'objet de la troisième partie de ce mémoire. La quatrième partie présentera l'isolement des composés actifs quand cela a été possible.

Dans une cinquième partie, le contrôle des extraits et des poudres ainsi que la démarche ayant abouti à la formulation seront présentés.

Enfin, les conclusions et perspectives seront abordées dans la sixième partie de ce mémoire.

Dans la dernière partie, le matériel et les méthodes utilisés seront expliqués en détail.

SYNOPTIQUE DE LA DEMARCHE APPLIQUEE



PARTIE I. MYCOSES CIBLEES ET OBJECTIFS DU PROJET

I – MYCOSES SUPERFICIELLES : DEFINITION, CONSTATS ET TRAITEMENTS PHARMACEUTIQUES ACTUELS

Qu'est-ce-qu'une mycose superficielle ?

Elle se définit comme étant une infection touchant l'épiderme et les muqueuses causée par des champignons microscopiques dits **micromycètes**. Ils sont aérobies, vivent entre 0° et 50°C bien que la zone comprise entre 25 et 30°C soit la plus favorable ; l'humidité nécessaire à leur développement se situe entre 70 et 95%, ils supportent des pH très acides et assimilent des molécules soufrées, certaines vitamines, l'azote et le carbone à partir des sucres (Bourée, 2008).

Ces mycoses peuvent être distinguées selon le champignon mis en cause et selon l'atteinte décrite. Elles sont dues à trois types de micromycètes : **les levures, les dermatophytes et les moisissures**. Les levures sont unicellulaires et se reproduisent par bourgeonnement alors que les dermatophytes et moisissures sont dits filamenteux c'est-à-dire qu'ils proviennent d'une spore dont naît un filament (hyphe) qui va se développer et se ramifier pour former un enchevêtrement de filaments, le mycélium. Le diagnostic entre les deux types s'effectue sur les caractères macroscopiques et microscopiques [aspect, morphologie, reproduction sexuée, reproduction asexuée (conidies)...].

Lors de sa pénétration dans l'organisme, le champignon peut rester au stade saprophyte mais sous certains facteurs, cette pénétration va s'accompagner de modifications morphologiques et ces champignons vont alors provoquer chez leurs hôtes des mycoses : il y a passage du stade saprophyte au stade pathogène.

Dans le cadre de cette étude, une enquête préalable menée en Guadeloupe avec plusieurs dermatologues et médecins généralistes a permis de cibler les pathologies difficiles à soigner avec les traitements habituellement prescrits. Suite à cela, les champignons incriminés dans celles-ci ont été identifiés et collectés.

Il apparaît ainsi que dans la Caraïbe et plus particulièrement en Guadeloupe, lieu de l'enquête, les principales mycoses superficielles opposant des difficultés à être soignées sont les **dermatophyties** (dues aux dermatophytes), les **candidoses** (dues aux levures *Candida*), le **Pityriasis versicolor** (dû aux levures *Malassezia*) et les **scytalidioses** (dues aux moisissures *Scytalidium*). Ces dernières, bien que moins présentes que les trois précédentes en Guadeloupe, sont cependant référencées comme la deuxième cause de dermamycoses en milieu tropical (Pihet *et al.*, 2007) et ont surtout la particularité d'être extrêmement compliquées à soigner ... si tant est que le praticien y parvienne.

Présentons maintenant plus en détail les champignons incriminés et leurs pathologies associées ainsi que leurs traitements pharmaceutiques actuels. A noter que ces trois types de micromycètes peuvent provoquer des atteintes profondes touchant les organes internes. La

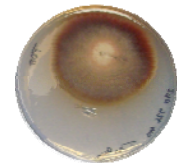
pénétration n'est plus seulement superficielle mais dépassant la lame basale, ces micromycètes envahissent les tissus et les vaisseaux sous-jacents. Ces atteintes ne font pas l'objet de cette étude et ne seront pas explicitées ci-après.

A – LES DERMATOPHYTIES

Agents pathogènes

Les dermatophytes sont des champignons kératinophiles et kératinolytiques. Chez l'Homme, leurs lésions atteignent l'épiderme et les phanères : cheveux, poils et ongles. Sur le plan taxinomique, selon le mode de reproduction sexuée ou asexuée, ils appartiendront à différentes classes. Les dermatophytes peuvent alors être classés dans le Phylum des Deutéromycètes, la classe des Hyphomycètes (champignons filamenteux), l'ordre des Monoliales et la famille des Moniliaceae (forme asexuée) ou encore dans le Phylum des Ascomycètes, la classe des Ascomycètes et l'ordre des Onygnales (forme sexuée). En pratique courante de laboratoire, leur classification repose sur la reproduction asexuée ou conidiogénèse. Selon l'abondance et la morphologie de leurs spores appelées microconidie (spore unicellulaire) et macroconidie (spore pluricellulaire), ils sont classiquement répartis en trois genres anamorphiques : ***Epidermophyton*, *Microsporum* et *Trichophyton***.

Photo A : *Trichophyton rubrum* (Milieu Sabouraud + chloramphénicol)



Epidémiologie

Les dermatophytes peuvent être classés selon leur habitat originel. Ils peuvent être d'origine humaine, animale ou tellurique. Se distinguent :

Les espèces anthropophiles dont la transmission est interhumaine et peut être directe ou indirecte par l'intermédiaire d'objets vecteurs (peigne, linge, chaussures) ou de supports inertes (carrelage, tatamis, tapis, sols des piscines et saunas etc.) contenant des débris de kératine humaine virulente (cheveux, fragments d'ongles et squames parasités).

Ex : *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. tonsurans*, *E. floccosum*...

Les espèces zoophiles parasitent les animaux puis l'Homme par contact direct avec un animal contaminé ou indirect par contact avec des poils parasités (poils virulents sur un coussin par exemple). L'animal contaminé ne présente pas toujours des lésions cliniquement visibles.

Ex : *M. canis*, *T. mentagrophytes* (touchent souvent les animaux domestiques)

Les espèces telluriques saprophytes du sol et transmissibles à l'homme à l'occasion de contacts avec la terre (travaux de jardinage), dans des eaux stagnantes ou par l'intermédiaire d'animaux contaminés (chien par exemple).

Ex : *M. gypseum*, *M. fulvum*, *T. mentagrophytes* (également zoophile)

Répartition géographique

Cosmopolite

Physiopathologie

Différentes pathologies peuvent être observées en fonction de la localisation anatomique :

Dermatophyties de la peau glabre (Herpès circinés)

Les lésions, plus ou moins prurigineuses, débutent par une zone érythémateuse qui s'étale progressivement et forme un anneau dont le bourrelet périphérique est rouge ; il peut être vésiculeux ou squameux alors que le centre donne l'impression de guérir. Les lésions peuvent se situer sur n'importe quelle partie du corps. Elles peuvent être isolées ou multiples. Elles sont le plus souvent dues à *M. canis*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* et *T. rubrum* mais **tous les dermatophytes** peuvent en provoquer.

Intertrigos des grands plis

Les plis inguinaux, le pli interfessier et les plis axillaires peuvent être atteints. Les agents en cause sont des dermatophytes anthropophiles : *T. rubrum*, *E. floccosum* et *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* le plus souvent. La dermatophytose inguino-crurale (eczéma marginé de Hébra) est la plus fréquente. Elle se localise à la racine des cuisses d'un ou des deux côtés, parfois déborde sur le périnée et le pli interfessier et même les fesses. Elle se manifeste par une plaque prurigineuse, qui part du fond du pli, s'étend de façon excentrique sur la face interne des cuisses alors que le centre a tendance à guérir, la périphérie reste active, polycyclique, squameuse et vésiculeuse.

Intertrigos des petits plis

Dénomination en créole guadeloupéen: **Chofi**

Les plis des pieds et des mains peuvent être atteints. Le pli prend un aspect macéré blanchâtre avec une fissure centrale. Le 4^{ème} espace inter-orteil est le plus fréquemment atteint. Les lésions débordent souvent sur la face plantaire et la face dorsale du pied et des orteils sous forme d'un processus vésiculeux et desquamatif pouvant se transformer en plaie et représentant ce qu'on appelle le « Pied d'athlète ». Les agents responsables de ces lésions sont des dermatophytes anthropophiles, généralement: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* et *E. floccosum*.

Onyxis ou onychomycose¹

Les dermatophytes **anthropophiles** sont le plus souvent en cause : *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*. La pathologie débute de façon latéro-distale, elle peut provenir de l'espace interdigital ou de la plante du pied, va pénétrer à la jonction entre la pulpe et le lit de l'ongle puis entraîner une hyperkératose réactionnelle. Le dermatophyte va alors progressivement envahir le lit et la tablette de l'ongle. L'ongle devient épaissi, jaunâtre, friable, ailleurs il est rongé, détruit.

¹ Les onyxis désignent toutes les atteintes d'un ongle par un champignon quel qu'il soit. Elles englobent schématiquement les onyxis à dermatophytes, à levures et à moisissures.

L'onyxis est une complication de l'atteinte du pied, elle commence toujours par son bord libre et ne s'accompagne pas de périonyxis².

Teignes

Ces affections atteignent le cuir chevelu ou les poils de la barbe (sycosis). Elles résultent de l'atteinte du follicule pileux et du poil par les dermatophytes qui pénètrent le cheveu provoquant une cassure totale (teigne tondante), une réaction inflammatoire (teigne suppurée, kérion) ou un décollement du cheveu entraînant de fait une alopecie définitive (teigne favique).

La teigne se manifeste au niveau du cuir chevelu par une tache rouge et arrondie dépourvue de cheveux. La tache est souvent recouverte de squames fines (elle pèle), de croûtes ou parfois même de pus pour le kérion.

Dermatophydies

Ces réactions allergiques cutanées dues à la libération dans le sang de substances allergisantes provenant du métabolisme du dermatophyte se manifestent à distance du foyer et provoquent des symptômes variés. Au niveau de la peau, les lésions simulent souvent un eczéma ou un urticaire.

La prolifération fongique sur la peau et les phanères (poil et cheveu) est résumée par la figure 1 ci-dessous :

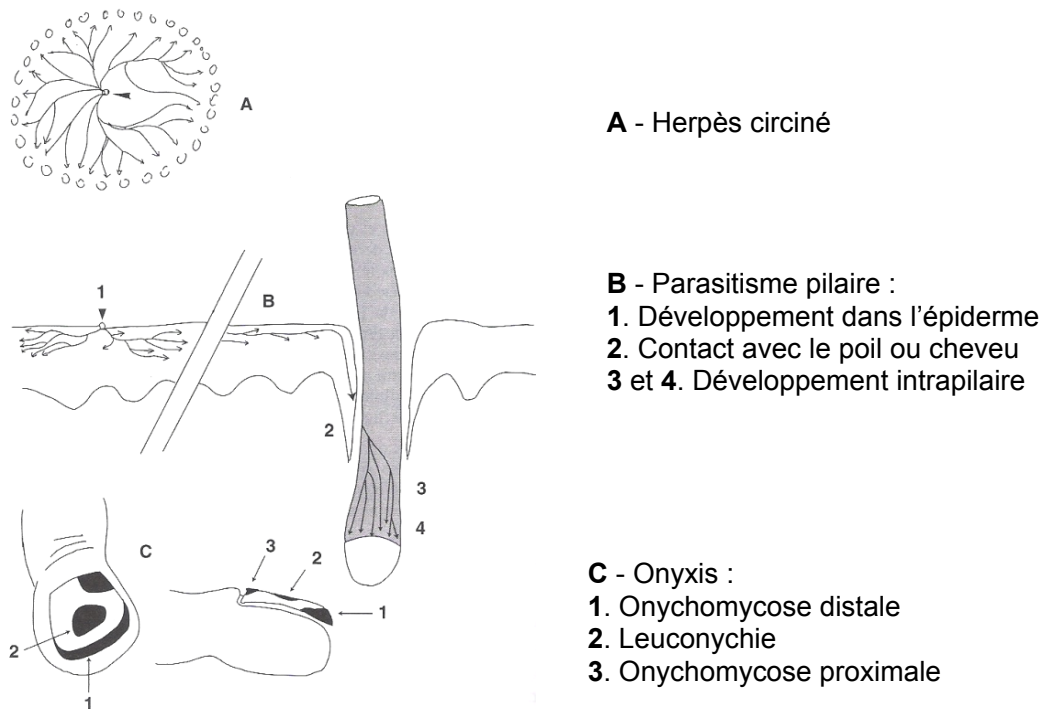


Figure 1 : Modalités de développement d'un dermatophyte sur la peau et les phanères (*d'après Chabasse et al., 1999*)

² Attaque de la peau voisine.

Facteurs favorisants

Parmi eux se retrouvent les facteurs :

- pathologiques (diabète et obésité)
- environnementaux (chaleur, humidité favorisant la macération)
- immunologiques (immunodépression, chimiothérapie, corticothérapie)
- d'hygiène et de mode de vie (marche nu-pieds, chaussures mal aérées comme les baskets, sport en salle, vestiaires communs...)
- professionnels : agriculteurs, éleveurs de bovins, vétérinaires, métiers sportifs

Traitement prescrit

- Antifongiques locaux : dérivés azolés, ciclopiroxolamine, terbinafine
- Antifongiques généraux si la zone est étendue ou en cas de récurrence: griséofulvine, terbinafine et kétoconazole.

CONSTAT - BILAN

Les résistances et les rechutes sont fréquentes et deux cas retiennent particulièrement notre attention. Bien que généralement traitées sans difficulté, une résistance observée de *T. tonsurans* lors du traitement à la terbinafine lors d'un épisode de **teignes** en milieu scolaire a été observé et nécessite un approfondissement des recherches. Le deuxième axe concerne les **onychomycoses** qui opposent le plus de résistance aux traitements qui de plus s'avèrent longs, 3 à 12 mois au moins. Le suivi reste toujours difficile car les patients oublient bien souvent le traitement en raison de sa longue durée. Il est intéressant de noter que dans une même lésion onychomycosique, peuvent se retrouver à la fois un dermatophyte et une moisissure (*Scytalidium dimidiatum*, *Aspergillus* sp., *Scopulariosis brevicaulis*, etc.). (Chabasse *et al.*, 1999)

B – LES PSEUDO-DERMATOPHYTIES à *Scytalidium* sp.

Les lésions sont similaires à celles causées par les dermatophytes mais le pathogène n'en n'est pas un.

Agent pathogène

Le genre *Scytalidium* est classé dans le Phylum des Deutéromycètes, la classe des Hyphomycètes (champignons filamenteux), l'ordre des Moniliales et la famille des Dematiaceae (de couleur noire ou foncée). Deux espèces sont fréquemment rencontrées dans les pathologies humaines :

- *Scytalidium dimidiatum*, synanamorphe de *Nattrassia mangiferae* (ex. *Hendersonula torulordea*). Elle possède des spores pigmentées brunes à noires.

- ***Scytalidium hyalinum***, claire ou hyaline, qui serait peut être un mutant « melanine-less » de *Scytalidium dimidiatum* (Chabasse *et al.*, 1999)

Photo B : *Scytalidium dimidiatum* (Milieu Sabouraud + chloramphénicol)



Epidémiologie

Vivant sur le sol et sur les arbres ou arbustes (citronniers, manioc, orangers, manguiers, bananiers et autres arbres fruitiers) en zone tropicale ou subtropicale, le *Scytalidium* contamine l'Homme lors de marche nu-pieds ou par contact avec ces végétaux lors de travaux de jardinage.

Répartition géographique

- **Zone de haute prévalence** : Amérique latine et Caraïbes, Afrique centrale et de l'Ouest, Madagascar, île Maurice, Inde, Pakistan, Indonésie
- **Zone de faible prévalence** : Nouvelle Zélande, Australie, pays du Maghreb. De rares cas autochtones ont été rapportés au Canada.

Physiopathologie

Les scytalidioses sont responsables de plusieurs types de lésions sur la peau et les phanères : [Hyperkératose et plaques érythrohématosquameuses](#) des mains et des pieds, [Intertrigos](#) des pieds, [Onyxis](#) des mains et des pieds avec parfois un périonyxis.

Facteurs favorisants

- la marche nu-pieds
- les travaux de jardinage, vergers

Traitement prescrit

Contrairement aux dermatophytes, ces espèces bien qu'étant de véritables kératinophiles, sont insensibles à la griséofulvine. Les dérivés azolés (kétoconazole, itraconazole) sont d'**efficacité irrégulière**. Des guérisons sont parfois obtenues avec la terbinafine et l'amphotéricine B sous pansement (Chabasse *et al.*, 2003). L'exérèse chirurgicale de l'ongle est parfois utile et actuellement, il est plutôt **conseillé** d'utiliser des kératolytiques sans autre association.

CONSTAT- BILAN

Aucun traitement spécifique n'existe. Il faut noter que dans les lésions onychomycosiques des moisissures sont parfois associées aux dermatophytes dont *Scytalidium dimidiatum*.

C – LE PITYRIASIS VERSICOLOR (*Malassezia* sp.)

Dénomination en créole guadeloupéen : LOTA

Agent pathogène

Le genre *Malassezia* comprend sept espèces décrites : *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. restricta*, *M. globosa*, *M. furfur*, *M. obtusa* et *M. pachydermis* incriminées dans les lésions humaines ou animales. Classiquement, *Malassezia furfur* était considérée comme agent responsable du Pityriasis versicolor et du Pityriasis capitis. Il est maintenant préférable en l'absence d'identification d'espèce précise par un laboratoire spécialisé d'incriminer plutôt une « levure du genre *Malassezia* » sans indication d'espèce. Ces levures appartiennent au Phylum des Deuteromycètes, la classe des Blastomycètes (levures asexuées) et l'ordre des Cryptococcales.

Photo C : *Malassezia* sp. (Milieu Sabouraud supplémenté d'huile d'olive)



Epidémiologie

Classiquement, les *Malassezia* sont des levures dites lipophiles car leur croissance nécessite la présence d'acides gras à longues chaînes, notamment l'acide linoléique. Elles vivent à l'état commensal sur le revêtement cutané de l'Homme ou des animaux. Le passage à l'état pathogène ainsi que le rôle des différentes espèces dans l'étiologie des différentes maladies cutanées ou de la microflore cutanée normale restent encore incertain. Il semblerait qu'il y ait adhérence aux cornéocytes et sécrétion d'enzymes pro ou anti-inflammatoires. La prolifération anormale des levures perturbe le métabolisme de la mélanogenèse provoquant des troubles de la pigmentation des lésions.

Répartition géographique

Cosmopolite

Physiopathologie

Deux aspects cliniques sont à noter :

Le [Pityriasis versicolor](#) se manifeste par de petites taches arrondies, de couleur jaune chamois, finement squameuses, pouvant confluer et fusionner pour donner des grandes nappes à bordure géographique. Les lésions se localisent sur les zones séborrhéiques : haut du thorax, cou, dos, épaules, bras, visage, pouvant s'étendre à l'ensemble du revêtement cutané même les plis. Le prurit est inconstant. On distingue deux formes cliniques, une forme [pigmentée](#) et une forme [achromiante](#).

Le Pityriasis capitis est une forme particulière, rencontrée chez l'adulte, qui se manifeste par un prurit, une desquamation abondante du cuir chevelu générant des pellicules nombreuses et des croûtes. A noter qu'il n'y a pas de chute de cheveux, ces derniers ne sont pas atteints.

Facteurs favorisants :

- Humidité, chaleur, hypersudation,
- Modification hormonale [grossesse, hypercorticisme, puberté (excès de sébum) etc.],
- Immunodépression

Traitement prescrit

- Antifongique local : imidazolés et sulfure de sélénium,
- Antifongique systémique : pour les formes récalcitrantes très étendues un traitement par voie générale par kétoconazole est prescrit.

CONSTAT - BILAN

Les résultats immédiats sont généralement satisfaisants, mais le taux de rechute est élevé dans les mois suivants et, parfois, une résistance à tout traitement est constatée.

D – LES CANDIDOSES CUTANÉES

Agent pathogène

Le genre *Candida* appartient au Phylum des Deutéromycètes, la classe des Blastomycètes (levures asexuées) et l'ordre des Cryptococcales. Les candidoses sont les mycoses humaines les plus rencontrées dans le monde, elles sont incriminées dans 80% des infections à levures. L'espèce la plus fréquente, *C. albicans*, représente plus de 60% de toutes les levures isolées chez l'Homme. Il s'agit d'un saprophyte du tube digestif, il en existe une dizaine d'autres rencontrés dans les pathologies humaines ; par ordre de fréquence décroissante on trouve : *C. glabrata* dont l'incidence a augmenté ces dernières années sous la pression des antifongiques azolés, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*, qui peuvent se retrouver sur la peau ou dans le tube digestif. Il faut aussi citer *C. kefyr*, issu de produits laitiers fermentés, *C. krusei* dont l'émergence est attribuée à sa résistance primaire au fluconazole, *C. guilliermondii* et *C. famata*.

Photo D : *Candida albicans* (Milieu Sabouraud + chloramphénicol)



Epidémiologie

Seuls *C. albicans* et *C. glabrata* vivent en commensaux dans le tube digestif et les vois génitales de l'homme et de la femme. Les autres espèces, issues le plus souvent du milieu extérieur, peuvent se retrouver occasionnellement sur la peau ou dans l'intestin lorsqu'il s'agit d'une origine alimentaire. Devenant pathogènes sous l'influence de divers facteurs favorisants, leur

dissémination est généralement d'origine endogène et se fait à partir du tube digestif par contiguïté vers la peau ou d'autres organes. Ce sont des levures opportunistes c'est-à-dire qu'elles vont profiter d'un dysfonctionnement du système immunitaire ou d'autres facteurs favorisant pour provoquer des candidoses.

Répartition géographique

Cosmopolite

Physiopathologie

Intertrigos des grands plis

Ils concernent les plis inguinaux, axillaires, abdominaux, sous-mammaires, interfessiers etc. et donnent lieu à des lésions érythémateuses, suintantes, fissurées au fond du pli et recouvertes d'un enduit blanchâtre. La lésion se localise longtemps au fond du pli puis, secondairement, s'étend de part et d'autre de celui-ci. Les contours de la lésion, habituellement érythémateux, sont en général mal limités (diagnostic différentiel avec une dermatophytie). Parfois, il existe une bordure en forme de collerette plus ou moins squameuse, dont le bord libre interne est flottant et le bord externe est adhérent à la peau.

Intertrigos des petits plis

L'intertrigo interdigital est fréquent et donne également lieu à des lésions érythémateuses, suintantes, fissurées au fond du pli et il est recouvert d'un enduit blanchâtre. Il se rencontre habituellement chez le sujet dont les mains sont soumises, de façon répétitives, à l'humidité ou aux lavages fréquents (ménage, coiffure), à des substances sucrées (confiseries), mais aussi à de multiples traumatismes d'origine mécanique. Il affecte surtout le 3^{ème} espace, parfois le 2^{ème} et le 4^{ème}, mais rarement le premier. Les intertrigos à *Candida* au niveau des pieds sont plus rares. A ce niveau, ils sont surtout dus à des dermatophytes anthropophiles. La confusion est toujours possible. Par ailleurs, comme pour les dermatophytes, les lésions candidosiques débordent souvent au niveau du dos et de la plante des pieds.

Candidoses unguéales

L'atteinte débute souvent par un péri-onyxis, tuméfaction douloureuse de la zone matricielle et du repli sous-unguéal. L'ongle est parasité secondairement et prend une teinte jaune, marron ou noire. Ce type d'atteinte siège surtout au niveau des mains mais peut être plantaire plus rarement, contrairement aux dermatophytes qui envahissent plus volontiers les ongles des pieds. Les espèces le plus souvent isolées d'ongles infectés sont *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondi*, *C. tropicalis*, et *C. krusei*.

Facteurs favorisant

- physiologiques (nouveau né et sujet âgé, grossesse),
- locaux (contacts prolongés et répétés avec l'eau, port de gants de protection, macération, humidité, traumatismes, brûlures),

- relatifs à la maladie (diabète, immunodéprimé),
- iatrogènes (prise de médicaments comme les antibiotiques, contraceptifs oraux, corticoïdes, immunosuppresseurs),
- professionnels (agents de surface, métiers de la restauration et de l'alimentation).

Traitement prescrit

- Antifongique local tels que des polyènes, imidazolés, amorolfine
- Antifongique systémique en cas d'infection étendue ou récidivante (azolés et terbinafine).

CONSTAT - BILAN

Là encore, le taux de rechute est important. Il est intéressant de noter que, dans de rares cas, dans une même lésion onychomycosique, dermatophytes et *Candida* peuvent se retrouver.

E – TRAITEMENTS PHARMACEUTIQUES ASSOCIES

Le traitement doit tenir compte de l'étendue des lésions et de la tolérance du patient. En effet, les micromycètes étant des eucaryotes, les produits antifongiques peuvent être actifs sur le métabolisme des cellules humaines et causer des effets secondaires.

Historiquement, parmi les plus anciens antifongiques, rappelons l'existence de l'iode (1903), qui n'est plus utilisé dans le traitement des mycoses superficielles, des produits soufrés (pyrithione, tolnaftate, sulfure de sélénium) et des acides organiques (benzoïque, salicylique, undécylénique) encore employés aujourd'hui. A partir des années 50, les nouveaux antifongiques ont révolutionné le traitement des mycoses. Ces produits se repartissent en 2 catégories : les antifongiques d'origine naturelle et les antifongiques de synthèse. Les antifongiques naturels appartiennent à deux familles, les polyènes et les benzohydrofuranes. Les principales familles et molécules thérapeutiques utilisées actuellement dans le traitement des mycoses superficielles sont présentées ci-après :

- **Les azolés** (ex: kétoconazole, fluconazole, itraconazole, éconazole, isoconazole, miconazole...)
Ils interviennent dans les dermatophyties, candidoses, scytalidioses et malassezioses.
Formes galéniques : Ketoderm®, Nizoral®, Sporanox®, Triflucan®, Pevaryl®, Fazol®, Daktarin® ...
- **les polyènes** (ex: amphotéricine B, nystatine)
Ils interviennent dans les dermatophyties, scytalidioses et candidoses.
Ils sont isolés des actinomycètes du genre *Streptomyces*.
Formes galéniques : Fungizone®, Mycostatine® ...
- **la morpholine** (unique composé de cette classe, l'amorolfine)
Elle intervient dans les onychomycoses.

Forme galénique : Lorecyl®...

- **l'hydroxypyridone** (ex: cyclopiroxolamine)

Son spectre d'activité *in vitro* est large : dermatophytes, *Candida*, moisissures dont *Scytalidium dimidiatum* (activité inconstante).

Forme galénique : Mycoster®...

- **les benzohydrofuranes** (ex: griséofulvine)

Ils interviennent dans les dermatophyties à peau glabre et phanères.

Ils sont isolés de *Penicillium griseofulvum*.

Formes galéniques : Griséfulvine®, Fulcine®...

- **les allylamines** (ex: terbinafine)

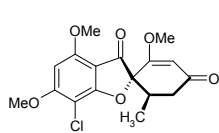
Elles interviennent dans les dermatophyties cutanées et phanériennes, candidoses (forme filamenteuse), scytalidioses.

Forme galénique : Lamisil®...

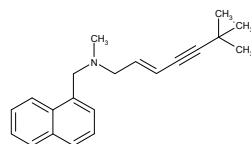
- **le disulfure de sélénium**

Il intervient dans les pathologies à *Malassezia* sp.

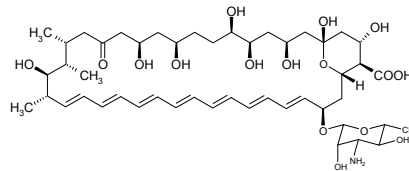
Forme galénique : Selsun®



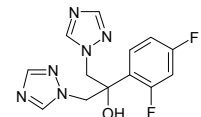
Griséofulvine



Terbinafine



Amphotéricine B



Fluconazole

Les composés antifongiques peuvent interagir différemment avec la cellule fongique selon leur mode d'action.

MECANISME D'ACTION D'UN ANTIFONGIQUE (Vigui-Vallanet, 2001 ; Garnier, 2003)

Selon leur structure chimique, les antifongiques ont des sites d'action différents au niveau de la cellule fongique. Selon la molécule, cela peut être la paroi cellulaire, la membrane plasmique ou le métabolisme cellulaire :

- les polyoxines, les nikkomycines, les papulacandines, les echinocandines, ces antifongiques sont encore à l'étude : Action sur la paroi fongique,
- Les allylamines, azolés, terbinafine, thiocarbamate et morpholine : Action sur la synthèse de l'ergostérol, constituant spécifique de la membrane plasmique des cellules fongiques; le réticulum endoplasmique est le lieu d'action des inhibiteurs de la biosynthèse de

l'ergostérol ; les allylamines et le thiocarbamate agissent sur la squalène époxydase, les azolés sur la 14-déméthylase du cytochrome P450, les morpholines sur la 14-réductase et la 7-8 isomérase,

- les polyènes : Action sur la membrane plasmique, par formation de complexe avec l'ergostérol des membranes fongiques, augmentant la perméabilité membranaire aux protons et cations monovalents aboutissant à la mort cellulaire,
- La griséofulvine : Action sur les microtubules intervenant dans la division cellulaire (métaphase) et blocage de la croissance des champignons,
- La flucytosine : Inhibition de la synthèse des acides nucléiques (ADN, ARN) et donc de la synthèse protéique.
- La ciclopiroxolamine : Inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale.

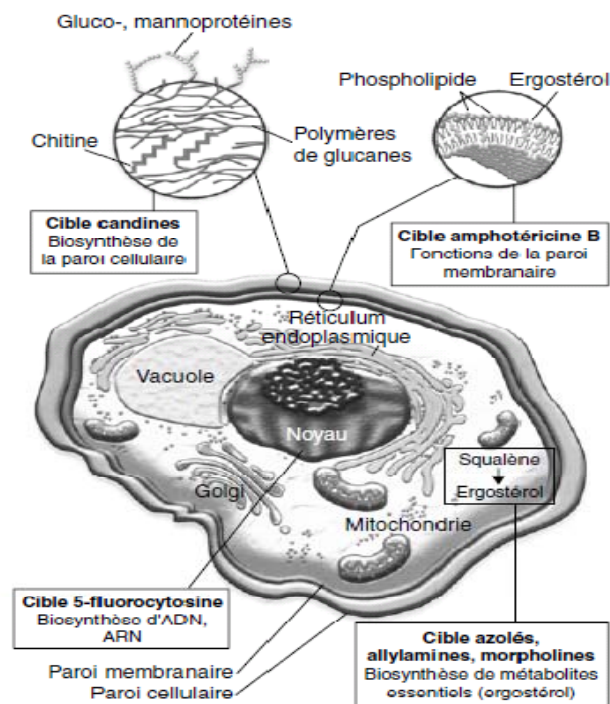


Figure 2 : Sites d'action des différentes classes d'antifongiques (Hulin *et al.*, 2005)

Mais malgré cet arsenal thérapeutique, comment expliquer tant de difficulté à traiter ces mycoses?

Le nombre de facteurs favorisant les mycoses a évolué. Ils dépendent à la fois de l'hôte, de son environnement, de la maladie sous-jacente mais aussi de facteurs extrinsèques, essentiellement iatrogéniques. S'y rajoute l'augmentation des résistances aux antifongiques.

Les facteurs liés à l'hôte peuvent être les suivants (Chabasse *et al.*, 1999):

Les âges extrêmes de la vie prédisposent aux mycoses cutané-muqueuses. Le nouveau-né est facilement touché probablement à cause de la finesse de la peau et l'absence de réaction immunitaire locale efficace. Le sujet âgé est plus fréquemment colonisé par les levures en raison de troubles trophiques qui entraînent une sécheresse de la muqueuse buccale. Les candidoses sont les mycoses les plus rencontrées. Par ailleurs, l'insuffisance vasculaire des membres inférieurs prédispose à d'autres infections fongiques comme les onychopathies à dermatophytes, à moisissures et à levures.

Les teignes disparaîtraient à la puberté suite à un changement substantiel dans la composition des cheveux.

De nombreux états pathologiques favorisent la survenue d'une mycose, notamment lors de perturbations immunitaires. Le diabète entraîne une diminution de la capacité d'élimination du *Candida*. La malnutrition est aussi un facteur favorisant.

Certaines professions exposent particulièrement aux mycoses. Les sportifs, agriculteurs, pêcheurs, soumis à de multiples traumatismes cutanés, sont exposés aux espèces fongiques telluriques. Les éleveurs et les vétérinaires seront plus réceptifs aux mycoses d'origine animale telles que les teignes inflammatoires. D'une manière générale, les pratiques agricoles, l'élevage des animaux qu'ils soient de rente (bovins, ovins) ou de compagnie (chats, hamsters, etc.) favoriseront l'implantation des mycoses zoophiles. La fréquentation des salles de sport, des piscines, saunas, jacuzzis collectifs et la pratique des sports pieds nus (sports de combats et arts martiaux) sont à l'origine de nombreuses mycoses localisées aux pieds (dermatophytoses surtout).

Les facteurs extrinsèques à l'hôte (Chabasse *et al.*, 1999)

Ils ne cessent d'augmenter depuis plus de 40 ans. Les progrès de la médecine en antibiothérapie, en chimiothérapie anticancéreuse et en anti-rejet, de greffes ont multiplié selon les cas par 3 à 10 le risque fongique.

Prenons l'exemple des antibiotiques à large spectre. Ils inhibent la flore bactérienne intestinale et le bouleversement de l'écologie du tractus digestif permet aux espèces fongiques commensales de coloniser de la bouche au rectum. La disparition de certaines bactéries anaérobies et cocci Gram+, qui possèdent le même site d'attachement épithélial que les levures, rompt l'équilibre bactéries/champignons et favorise l'adhérence fongique. Les réactions en cascade s'enchaînent conduisant à une diminution de l'immunité chez les individus et permet un terrain favorable à l'installation des champignons mais aussi aux phénomènes de résistances.

Les résistances des champignons

La résistance innée ou acquise des champignons contribue de plus en plus aux difficultés de traitement. La résistance des champignons aux médicaments peut provenir d'une modification du champignon par :

- l'existence de biotypes différents,
- la modification de la perméabilité membranaire par changement de la composition en phospholipides et en stérols, ce qui entraîne une diminution de la pénétration de l'antifongique,
- la modification de la cible de l'antifongique, une mutation sur une enzyme du cytochrome P450 qui entraîne une diminution de son affinité pour les azolés par exemple, etc.

BILAN

Ainsi, de nos jours, parallèlement à l'amélioration du niveau de vie qui a permis la diminution de la propagation de certaines mycoses telles que la plupart des teignes en milieu scolaire, l'allongement de la durée de vie, les changements des habitudes de vie (animaux de compagnie, sports et associés...), l'augmentation des maladies diabétiques et cholestérolémiques suite en partie aux mutations des habitudes alimentaires, favorisent l'augmentation des mycoses « modernes » telles que les onychomycoses qui représentent de plus en plus un motif de consultation.

De plus, les traitements antibiotiques modifient la flore intestinale, permettant la croissance de bactéries résistantes et de champignons. Ces phénomènes de résistance sont en nette progression et conduisent les laboratoires à poursuivre activement la recherche de nouveaux antifongiques. Nous nous inscrivons dans cette dynamique.

II- RECAPITULATIF ET OBJECTIFS

En résumé :

- Absence de traitement efficace (*Scytalidium* sp.)

De plus en plus de :

- Résistances aux traitements
- Rechutes
- Patients (facteurs favorables ↗)

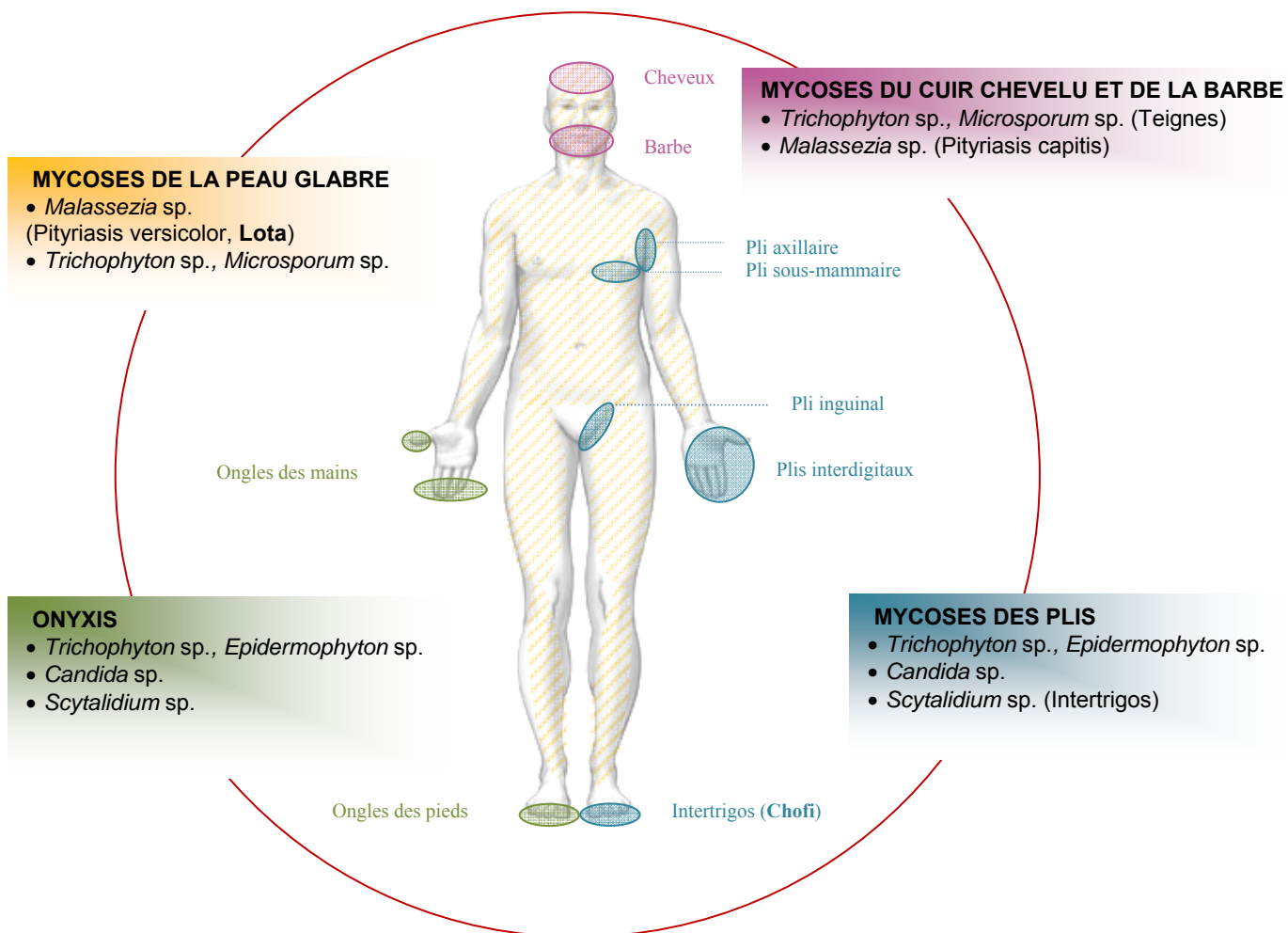


Figure 3 : Localisation anatomique des mycoses superficielles ciblées dans notre étude

OBJECTIFS

A la suite de ce constat, les objectifs du projet ont été les suivants:

- Répondre à un besoin en trouvant de nouveaux extraits antifongiques en mettant l'accent sur les scytalidioses, les onychomycoses et intertrigos (chofi), les résistances de certaines teignes à *T. tonsurans* et le Pityriasis versicolor (Lota)

- **Caractérisation des extraits : concentration minimale inhibitrice (CMI) et détermination structurale des principes actifs**
- **Contrôle-qualité : méthode de dosage (traceur chimique ou principes actifs) quand cela est possible et étude des poudres**
- **Elaboration des formulations (vernis, gel) intégrant les extraits.**

III – PNEUMOCYSTOSE PULMONAIRE (PcP) : DEFINITION ET TRAITEMENTS

A - PRESENTATION

Définition et agent pathogène

Le microorganisme *Pneumocystis jirovecii* se retrouve dans les poumons d'individus sains mais provoque une affection opportuniste au sein d'individus immunosupprimés. Il peut conduire à des pneumonies mortelles chez les sujets traversant des situations de profonde immunodépression en l'absence de traitement. Ce micromycète adhère aux cellules épithéliales alvéolaires du poumon et est retrouvé sous forme de kystes (sporocytes et kyste mature) ou de formes végétatives, les trophozoïtes. Le genre *Pneumocystis* est classé dans le Phylum des Ascomycètes et la classe des Pneumocystidomycètes. La classification de ce micromycète est encore soumise à controverse.

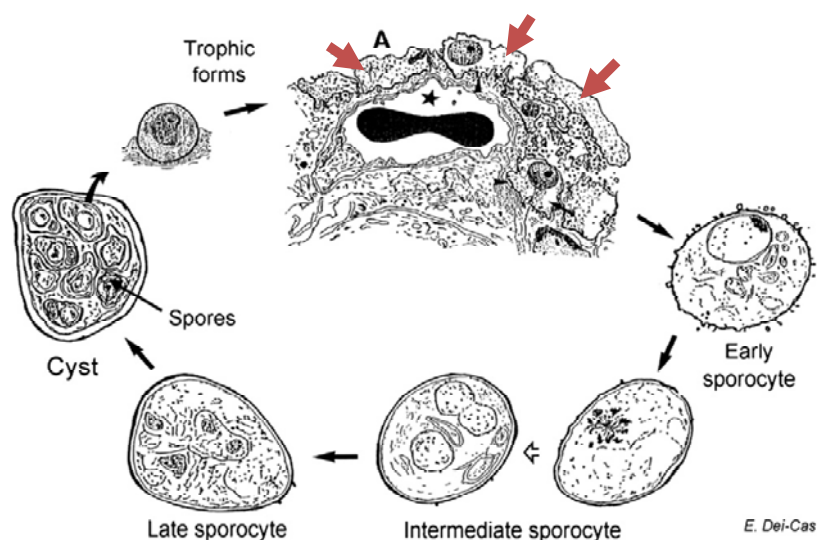


Figure 4 : Cycle biologique hypothétique de *Pneumocystis* spp. [Les trophozoïtes (flèches rouges) possèdent de fins prolongements cytoplasmiques ou filopodes et se lient aux pneumocytes de type 1 (pointes des flèches noires). Ils évoluent en sporocytes puis en kystes matures contenant huit spores, qui deviendront à leur tour des trophozoïtes. A : lumière alvéolaire ; * : lumière capillaire contenant une hématie.] (Chabé *et al.*, 2009)

Epidémiologie

C'est une espèce ubiquitaire (prévalence moyenne autour de 70% [Alder *et al.*, 2008]), dont la présence est signalée sous tous les climats et toutes les latitudes. Son épidémiologie reste mal connue, cependant, les techniques moléculaires ainsi que les modèles animaux ont permis de répondre à de nombreuses questions concernant les modes de transmission des *Pneumocystis* spp. Ainsi, la transmission de *Pneumocystis* par voie aérienne entre hôtes de la même espèce a

été prouvée expérimentalement chez l'animal et aurait également lieu chez l'homme. La transmission *in utero* de *Pneumocystis* semble être un autre moyen utilisé par le champignon pour circuler dans les écosystèmes. Enfin, des études récentes renforcent l'hypothèse d'une transmission nosocomiale de la pneumocystose sur le mode inter-humain (Chabé *et al.*, 2009). La forme infectante demeure inconnue.

Répartition géographique

Cosmopolite

Physiopathologie

La présentation clinique et paraclinique de la pneumocystose du patient immunosupprimé non VIH diffère singulièrement de celle rencontrée chez le patient sidéen. Le tableau 1 illustre les différences essentielles.

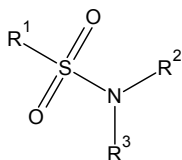
Tableau 1 : Clinique de la pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* chez les patients immunosupprimés infectés (VIH+) et infectés (VIH-) (d'après Adler *et al.*, 2008)

VM : ventilation manuelle ; AA : air ambiant ; LBA : lavage bronchoalvéolaire

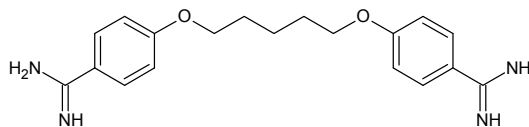
Présentation	VIH +	VIH -
Durée des prodromes	28 jours	< 7 jours
Mode de début	Progressif	Brutal
Clinique	Non spécifique (toux sèche, dyspnée, fièvre)	Non spécifique (toux sèche, dyspnée, fièvre)
PaO ₂ moyenne à l'AA	69 mmHg / 9,2 kPa	50 mmHg / 6,6 kPa
Recours à la VM	+	+++ (60-70% des cas)
Charge en <i>Pneumocystis jirovecii</i>	Importante	Faible
Mortalité	Environ 10% (si pas de VM)	Environ 30 à 60%
Sensibilité diagnostique du LBA	Excellente (environ 95%)	Faible
Neutrophilie au LBA	Faible	Elevée

B- TRAITEMENTS

- L'administration de sulfamides permet la guérison. Un traitement d'attaque doit être administré durant 3 semaines et poursuivi à plus faibles doses aussi longtemps que subsiste l'immunodépression.
- La prévention, chez les sujets immunodéprimés, fait surtout appel aux sulfamides ou à des aérosols de pentamidine administrés à intervalles réguliers.
- Il n'existe aucune recommandation officielle pour guider l'emploi d'une prophylaxie chez les patients immunosupprimés non sidéens.



Sulfamides



Pentamidine

CONSTAT – BILAN

Malgré la diminution de l'incidence de cette maladie en Europe, suite à l'utilisation de la chimioprophylaxie instaurée depuis les années 1990 et des multithérapies antirétrovirales hautement actives, la pneumocystose reste néanmoins une infection sévère en particulier chez les patients ne se sachant pas encore infectés par le VIH, c'est l'infection indicatrice de SIDA la plus fréquente en France et dans d'autres pays européens (Chabé *et al.*, 2009). A l'opposé de cette diminution d'incidence chez les patients infectés par le VIH, un nombre sans cesse croissant de pneumonies à *Pneumocystis jirovecii* est rapporté chez des patients immunosupprimés par d'autres facteurs. Les sujets à risque, incluant les patients souffrant d'hémopathies malignes ou recevant des chimiothérapies pour des cancers, ceux ayant subi une transplantation de moelle ou d'organe solide, ainsi que tout autre patient sous traitement de corticostéroïdes et/ou autre traitement immunosuppresseur prescrit pour un nombre d'indications médicales, sont en constante augmentation (Alder *et al.*, 2008).

IV – OBJECTIFS

A la suite de ce constat, les objectifs du projet ont été les suivants:

- **Trouver de nouvelle(s) molécule(s) antifongique(s)**
- **Déterminer leur structure et leur concentration inhibitrice (CI₅₀).**

Notons que la souche utilisée lors des tests *in vitro* est *Pneumocystis carinii*, elle provient de poumons de rat.

PARTIE II. APPROCHE ADOPTÉE ET PLANTES SÉLECTIONNÉES

I – NOUVELLE APPROCHE : RECHERCHE D'EXTRAITS ANTIFONGIQUES ISSUS DE LA FLORE GUADELOUPEENNE (Petites Antilles – CARAÏBE)



Guadeloupe : 16°15 N, 61°35 W
1705 km²

3800 espèces de plantes
625 plantes répertoriées comme médicinales³

Entre Océan Atlantique et Mer des Caraïbes, les Petites Antilles font partie des 34 régions du monde (UICN) dont la biodiversité est la plus riche mais aussi la plus menacée...

Fort de valoriser un savoir traditionnel et/ou une richesse végétale locale, le laboratoire Phytobôkaz a voulu apporter une réponse aux problèmes des mycoses superficielles rencontrées sous ces latitudes par la recherche d'un ou de plusieurs extraits végétaux. Afin d'y parvenir, plusieurs données ont été prises en compte dont :

L'origine géographique des plantes : il s'agit ici de l'archipel guadeloupéen.

L'utilisation en médecine traditionnelle : les informations sont collectées auprès des populations pour pouvoir comprendre et retranscrire leur système de santé, c'est l'ethnobotanique, ou encore de poursuivre des travaux scientifiques d'isolement de composés et de tests biologiques, c'est l'ethnopharmacologie.

Les regroupements chimiotaxonomiques : les plantes peuvent être classées selon leurs cartes moléculaires, certaines familles auront le même type de métabolites secondaires et pourraient ainsi posséder une activité similaire.

L'observation des plantes dans leur milieu naturel : dans un climat chaud et humide, une plante sera attaquée par de nombreux micro-organismes et insectes. L'observation d'une plante apparaissant comme saine peut laisser espérer qu'elle ait développé des molécules efficaces de lutte que l'on tentera ensuite d'exploiter.

Le manque de connaissance : Le fait qu'une plante ait été peu étudiée jusque-là suscite un intérêt de recherche afin de contribuer à sa caractérisation.

Ces différents critères ont permis de sélectionner dix plantes (cf. II). Dans un souci pédagogique, présentons tout d'abord l'archipel guadeloupéen et sa flore, lieu de récolte des plantes choisies ainsi qu'un bref aperçu de la phytothérapie populaire créole.

³ Compte-rendu du 6^e Symposium international d'aromathérapie et plantes médicinales (1^{ère} partie), Phytothérapie, 2004, vol 2 (5) 162-169.

A – ORIGINE : L'ARCHIPEL GUADELOUPEEN

Présentation

Élément de l'arc insulaire des Petites Antilles, l'archipel de la Guadeloupe se compose de 5 (7) îles et îlots principaux : La Basse-Terre et la Grande-Terre en sont les plus importants en termes de superficie ; s'y rajoutent La Désirade, Marie-Galante et Les Saintes. St-Martin et St-Barthélemy sont depuis 2007 devenus des collectivités territoriales, juridiquement autonomes par rapport à l'archipel de la Guadeloupe bien que rattachés pour certains aspects.

L'histoire géologique des Petites Antilles permet de distinguer deux arcs : la Grande-Terre ainsi que La Désirade et Marie-Galante sont des îles à sous-bassement volcanique et à recouvrement sédimentaire récent ; elles sont calcaires à faible relief et à tendance sèche, issues de l'arc externe des Petites Antilles. La Basse-Terre, île volcanique plus montagneuse et humide comporte un volcan actif, la Soufrière. Comme le petit archipel des Saintes, elle provient de l'arc interne des Petites Antilles ayant donné naissance au chapelet de volcans encore actifs ou subactifs de la Caraïbe.

Cette diversité de sols et de milieux permet l'expression d'une grande richesse végétale accentuée par l'exposition aux vents dominants, les Alizés, qui définissent de part et d'autre de la chaîne montagneuse de la Basse-Terre, une *côte au vent* globalement plus humide et arrosée et une *côte sous le vent* côté Mer des Caraïbes, plus sèche et chaude.

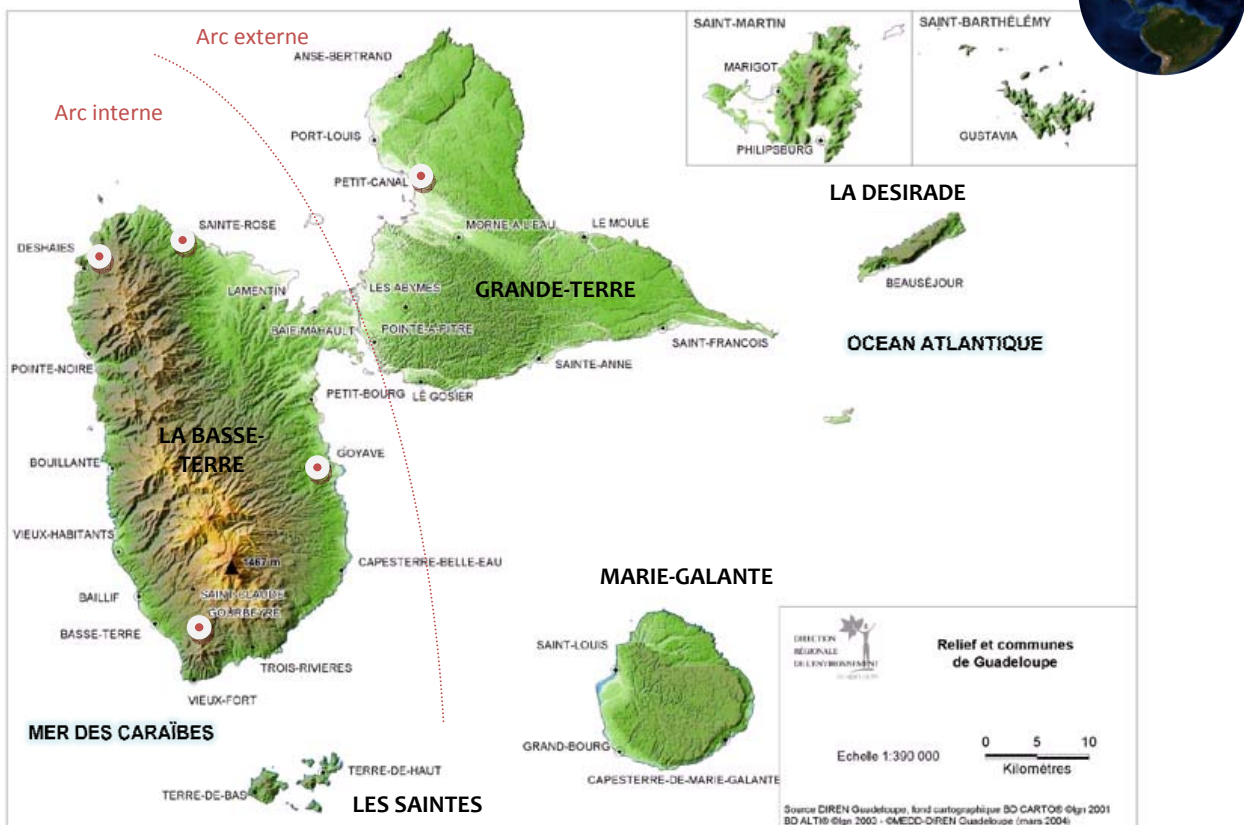


Figure 5 : Carte de l'archipel et localisation des points de récolte des plantes sélectionnées.

La flore : origine et évolution (Sainton *et al.*, 2004 ; Degras, 2005 ; Sastre et Breuil, 2007)[nom **créole** (Ludwing *et al.*, 1990)/français]

- Végétation originelle

Zone tampon entre les Grandes Antilles et l'Amérique du Sud, les Petites Antilles possèdent des végétaux provenant de ces deux aires. Le transfert de diaspores (graines, fruits, fragments végétaux...) ou bois flottés à la dérive s'est fait probablement par le biais de la faune tels que les oiseaux migrateurs et de la dynamique atmosphérique et marine : vents, ouragans, courants marins, etc. Cependant, consécutivement à leur isolement, les îles sont des sites propices à la spéciation et les Petites Antilles n'y échappent pas. Toutes les séries végétales possèdent des espèces endémiques de la Caraïbe, des Petites Antilles et même d'une seule île; les plus riches étant les séries hygrophile et de montagne.

- Introduction d'espèces et évolution actuelle

Au cours des siècles, malgré les différences d'intensité et de fréquence, l'anthropisation a fortement modifié le milieu naturel et sur plus de 3000 espèces recensées en Guadeloupe, 1260 ont été introduites. Entre l'*ichali*⁴ Kalina⁵ ante 1492 et le *jaden bôkaz*⁶ créole mêlant tous deux usage médicinal, alimentaire, utilitaire et spirituel, nombre d'espèces ont été introduites. Le XV^e siècle s'accompagne de l'arrivée des Européens et la flore de la Guadeloupe est totalement revisitée, passant d'une forêt s'étendant du littoral aux sommets à l'instauration des défrichements systématiques et des « grandes plantations » intensives de végétaux importés. Par la suite, les Africains et Indiens apportent dans une bien moindre mesure d'autres espèces végétales. Aujourd'hui, à l'image du jardin créole nous retrouvons, en Guadeloupe, outre les espèces caribéennes et sud-américaines présentes ou introduites⁷, d'autres espèces provenant des diverses régions du monde⁸. Ces plantes se sont adaptées et « mêlées » à la flore de l'île. Au sortir de l'aire coloniale et jusqu'à nos jours, l'organisation des tapis végétaux est sans cesse revue à la baisse face désormais à l'urbanisation croissante, au mitage dû aux défrichements/aménagements et au manque de respect collectif de l'environnement. La faible superficie de l'île fait que de nombreuses pressions qui peuvent sembler peu importantes ailleurs

⁴ Jardin Kalina.

⁵ ou Kali'Na : Peuple Amérindien des Petites Antilles présents en 1492 (Civilisation du manioc amer, originaire du bassin de l'Orénoque arrivés au VII^{ème} s.). *Les premières traces de présence humaine (amérindienne) en Guadeloupe se situeraient vers 3000 ans avant J.C. Différentes vagues de peuples amérindiens s'en sont ensuite suivies.*

⁶ Jardin créole.

⁷ **zannanna**/ananas (*Ananas comosus*), **gouyav**/goyave (*Psidium goyava*), **mannyòk**/manioc (*Manihot esculenta*), **patat**/patate douce (*Ipomoea batatas*), **malanga** (*Xanthosoma sagittifolium*), **papay**/papayer (*Carica papaya*), **toupinanbouk**/topinambour (*Calathea allouia*), **ziyanm kouskouch**/igname cousse-couche (*Diocorea trifida*), **diktanm**/dictame (*Maranta arundinacea*), **koton**/coton (*Gossypium barbadense*) etc.

⁸ **bannann**/banane (*Musa x paradisiaca*, originaire d'Asie), **kann**/canne à sucre (*Saccharum officinale*, originaire d'Asie), **gonbo** (*Hibiscus esculentus*, originaire d'Afrique), **kafé**/café (*Coffea arabica*, originaire d'Ethiopie), **pawoka** (*Momordica charantia*, originaire d'Inde), **ti-konkonm** (*Cucumis anguria*, originaire d'Afrique), **karanbòl**/carambole (*Averrhoa carambola*, originaire d'Indonésie), **fouyapen**/arbre-à-pain (*Artocarpus altilis*, originaire d'Asie), **kikima** (*Curcuma longa*, Inde) etc.

ont un impact important ici, car elles affectent un grand nombre d'espèces. L'archipel compte 263 plantes vasculaires menacées (530 menacées à moyen terme aux Antilles françaises ; Gargominy, 2003), la protection des espaces naturels reste donc d'une grande importance.

La flore et les plantes médicinales

Les enquêtes ethnopharmacologiques menées dans les pays du bassin caribéen selon la méthodologie TRAMIL (*TRAditionnal Medicine of the IsLand*) ont permis de mettre en évidence l'usage courant de nombreuses espèces médicinales dont 325 espèces différentes de plantes font l'objet d'études intervenant dans près de 50 symptômes ou problèmes de santé validés. Il est intéressant de noter que de nombreuses convergences d'utilisation thérapeutique ont pu être mises en évidence et révèlent que les plantes les plus utilisées sont souvent communes aux différentes îles et pays de la région. En Guadeloupe, 625 plantes médicinales ont été répertoriées par le Dr H. Joseph (Compte-rendu 6^{ème} Symposium International d'Aromathérapie et Plantes Médicinales, 2004).

B – UTILISATION TRADITIONNELLE DES PLANTES

La médecine traditionnelle est un art de vivre pour 80% de l'Humanité⁹

Origine – Evolution – Modèles

La médecine créole est indissociable de l'origine de son peuple qui est intrinsèquement plurielle... y compris dans sa manière d'aborder les soins. C'est naturellement qu'encore aujourd'hui la médecine en Guadeloupe se traduit par la présence en parallèle mais surtout croisée, d'une médecine dite occidentale moderne et d'une médecine dite traditionnelle créole.

Cette dernière tire ses racines de la jonction de trois influences majeures : amérindienne, européenne, africaine et auxquelles se rajoute plus récemment (XIX^{ème} siècle) un axe indien. Il s'agit d'une médecine globalisante qui cherche à rétablir l'équilibre, à entretenir le corps afin d'éviter les maladies ultérieures mais aussi à soulager et guérir des maux ciblés. Cette médecine est basée sur différents modèles : opposition chaud / froid, humoral antillais et latino-américain¹⁰, corps démonté ... Certaines techniques correspondent à un schéma unique, d'autres ne correspondent à aucun de ces schémas ou d'autres encore à plusieurs à la fois (Vilayleck, 2002). C'est une médecine qui n'est pas figée.

⁹ <http://archive.idrc.ca/books/reports/1997/22-01f.html> (TRAMIL).

¹⁰ Ce modèle existe dans un grand nombre de sociétés à travers le monde. Son origine est toujours controversée dans la Caraïbe, plusieurs chercheurs y voient un modèle Hippocratique qui a influencé tout l'ancien monde alors que d'autres pensent que les Précolombiens utilisaient déjà ce concept.

Praticiens - Transmission

Deux sphères sont à distinguer : la transmission des connaissances et vertus des plantes dans le cercle familial et associé (amis, voisins...) et le cercle des tradipraticiens : guérisseurs¹¹, matrones¹² et frotteurs¹³. La situation a évolué avec l'arrivée de la médecine dite moderne et, hormis quelques rares personnes bien souvent âgées, il s'agit pour la population actuelle d'une connaissance réduite concernant les affections courantes. Ceci s'explique par l'histoire de la Guadeloupe et des DOM d'une façon générale; en effet, les anciens n'ont presque pas su transmettre cet héritage car considéré comme « non acceptable »¹⁴. A l'heure actuelle, il faut cependant noter une réelle volonté de réappropriation de la phytothérapie traditionnelle et ceci est rendu possible grâce au travail du réseau TRAMIL, des associations locales ou de particuliers qui ont entrepris de transmettre à nouveau afin de combler cette rupture de communication intergénérationnelle.

Féyaj¹⁵ & formulation

Concernant les soins internes, selon l'atteinte, différentes techniques peuvent être mises en place notamment de **réchofmen**/réchauffement ou de **nétoyaj**/nettoyage et utilisent les **té**, **rafréchi**, **tizann**, purge et éventuellement le lavement. Le **té**, le **rafréchi** et la **tizann** sont actuellement les plus employés en automédication.

Le **té** correspond à une infusion ou décoction bue chaude prise en petite quantité (une tasse) une à deux fois par jour dont la fonction est de « réchauffer », il est réalisé avec des plantes dites « chaudes ». Il est utilisé pour soigner un excès de « froid » dans le corps, lors d'affections respiratoires (rhume, bronchite, grippe...) par exemple. *A contrario*, les plantes dites « rafraîchissantes » permettent de « nettoyer » le corps par un enchaînement de techniques faisant intervenir le **rafréchi** ou la **tizann**. Le **rafréchi** est une décoction ou infusion prise froide alors que la **tizann** est bue chaude, tout au long de la journée sur plusieurs jours ou semaines. Un individu se rafraîchit après une situation qui a encrassé le sang (maladie, « foie sale », etc.). Ces techniques permettent essentiellement de *nettoyer le sang* pour le restaurer, le débarrasser de tout ce qui le rend « sale » et rétablir l'équilibre interne des fluides (sang, bile, sueur...) et du corps. Le **nétoyaj** allié à une diététique appropriée est à la fois curatif et préventif, c'est pourquoi une cure peut être faite plusieurs fois dans l'année, avant la rentrée des classes, la plupart des enfants n'y échappaient pas voilà encore une génération. La purge intervient après le **rafréchi**.

La thérapeutique interne est complétée par des sirops et des extraits alcooliques (technique réchauffante) d'une ou d'un mélange de plante(s) selon les affections.

¹¹ Thérapeute traditionnel doté d'un don et de connaissances thérapeutiques transmises (aujourd'hui rare).

¹² Accoucheuse traditionnelle qui connaît les troubles de la femme, de la femme enceinte et des nouveau-nés (aujourd'hui disparues).

¹³ Technicien qui remet les membres cassés en place, il masse et traite des maux en rapport (aujourd'hui rare)

¹⁴ Renvoi aux interdits et endoctrinements dus à l'histoire coloniale de la Caraïbe.

¹⁵ Désigne les simples ou herbes médicinales.

La thérapeutique externe utilise des jus et sucs de plantes en application locale, des bains de feuillages associés à la vapeur ou non, des cataplasmes directs [ex : **zèb mal tèt** / *Kalenchoe pinnata*, Crassulacées] ou en préparation sous forme d'onguents à base de chandelle molle, d'huile de **karapate** (*Ricinus communis*, Euphorbiacées) et de plantes « gragées »¹⁶. Tout ceci peut être associé à des massages, le but recherché étant de réharmoniser le corps du malade tant à l'intérieur qu'à l'extérieur.

Quel devenir ? Préservation, codification, vente...

Face à l'inégalité d'accès aux soins dans les différents pays de la Caraïbe, il y a eu un réel intérêt d'encadrement et de recherche de cette médecine qui peut représenter l'unique système de santé en zone rurale ou dans les pays sans protection sociale (Robineau et Weniger, cf. sites internet).

De plus dans un monde où le désir de profit semble supplanter le devoir de santé, il apparaît logique de tenter de sauvegarder ces usages traditionnels uniquement ancrés dans des valeurs de soins (tout en les validant scientifiquement).

La médecine populaire dans la Caraïbe demeure encore présente et, comme ailleurs, sa préservation est un engagement au quotidien. Elle a la particularité complexe d'être jeune et de présenter de nombreuses variantes locales dues aux nombreux pays qui composent l'aire circum-caraïbienne et à leurs spécificités historiques.

Ce travail de codification, d'enquêtes alliées à des travaux scientifiques, a été notamment entrepris *via* un vaste programme de recherche scientifique appliquée aux plantes médicinales : TRAMIL regroupant plus de 200 chercheurs de disciplines complémentaires et ayant pour but l'amélioration et la rationalisation des pratiques médicales populaires fondées sur l'emploi de plantes médicinales. Point intéressant, malgré les nombreuses îles et pays du bassin caribéen, ces enquêtes révèlent que les plantes les plus utilisées y sont souvent communes. Ainsi le programme TRAMIL a permis de compiler la Pharmacopée végétale du bassin caribéen dont la 1^{ère} édition est parue en 1999. Il s'agissait là, du premier pas permettant aux usagers d'avoir des plantes médicinales issues de leur propre environnement et tradition validées pour leurs usages ou d'être avertis de leur toxicité le cas échéant. Le groupe des scientifiques réunis autour du programme a été en mesure d'exprimer, dans 60 % des cas, des propositions de recommandations relatives aux usages considérés. Dans 47 % des cas, ces avis allaient dans le sens d'une recommandation d'utilisation (catégorie C), dans 13 % des cas, par contre, ces avis préconisaient la prudence et l'abandon du remède (catégorie A). (Robineau et Weniger, cf. sites internet ; TRAMIL, 1999).

Grâce aux particuliers eux-mêmes usagers ou qui se font échos des connaisseurs et de tradipraticiens, la phytothérapie populaire en Guadeloupe reste encore présente par simple échange entre particuliers ou *via* des journées-conférences. Quelques jardins de plantes

¹⁶ Râpées presque en bouillie.

médicinales à but éducatif et de conservation ont ainsi été mis sur pied (Raizet, Ste-Rose, Moule, Gourbeyre...).

Concernant les départements d'Outre-Mer, la vente des Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM) relève du monopole pharmaceutique. Afin de permettre la distribution de certaines de ces plantes par les pharmaciens localement, il est nécessaire de les inscrire dans le cadre législatif français à savoir la Pharmacopée Française publiée par l'AFSSAPS, en tant que Plantes Médicinales ou en tant que Monographies (contrôle-qualité établi). Cette démarche d'inscription a été entreprise en 1999 et grâce au travail de l'APLAMEDAROM (Association pour les PLantes MEdicinales et AROMatiques), du Maître I. Robard et des volontés politiques, deux espèces *Senna alata* (**datyé**) et *Lippia alba* (**twa tas**) ont ouvert la voie par l'inscription de leurs monographies en 2005. En avril 2009, une étape majeure est franchie grâce à la réforme du Code de la Santé Publique permettant la reconnaissance officielle et l'intégration des plantes de la Pharmacopée TRAMIL au sein de la liste des Plantes Médicinales de la Pharmacopée française. Elles sont bien entendu classées en liste A (plantes couramment utilisées) ou en liste B (plantes présentant un risque de toxicité). L'étape suivante demeure l'élaboration de monographies complètes afin d'en valider la qualité et l'absence de falsification éventuelle.

II – PLANTES SÉLECTIONNÉES

Sur la base des usages traditionnels⁽¹⁾, de regroupements chimiotaxonomiques⁽²⁾, d'observations naturalistes⁽³⁾ ou encore d'autres critères⁽⁴⁾ tels que de précédentes études, le ressenti ou le manque de connaissance, le laboratoire Phytobôkaz a ainsi retenu dix plantes afin de mener cette étude. Celles-ci sont présentées dans le tableau 2 ci-dessous :

Tableau 2 : Plantes et organes sélectionnés

Nom scientifique	Nom vernaculaire Créole et Français	Partie(s) récoltées)	Usage trad. ⁽¹⁾	Regpt chim. ⁽²⁾	Obs. nat. ⁽³⁾	Autres ⁽⁴⁾
<i>Acnistus arborescens</i>	Cr. Siwyo Fr. Surio	Feuilles	x	x*		
<i>Bursera simaruba</i>	Cr. Gonmyé wouj Fr. Gommier rouge	Ecorce de tige	x			
<i>Cedrela odorata</i>	Cr. Kajou wouj Fr. Acajout rouge	Écorce de tige	x		x	
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	Cr. Zorey a milat' Fr. Oreille à mulâtre	Écorce de tige Ecorce de racine				x
<i>Evolvulus alsinoides</i>	Cr. Bléhé Fr. Bleuet	Parties aériennes		x**		x
<i>Gliricidia sepium</i>	Cr. Glycéria Fr. Gliciridia	Feuilles	x			
<i>Pisonia aculeata</i>	Cr. Kwok chyen Fr. Croc de chien	Parties aériennes				x
<i>Pluchea carolinensis</i>	Cr. Tabakajaco Fr. Tabac à jacot	Feuilles	x			
<i>Pluchea odorata</i>	Cr. Soj wouj Fr. sauje rouge	Feuilles Racines	x			
<i>Senna bicapsularis</i>	Cr. Soumaké	Feuilles	x	x***		x

* *Acnistus* appartient à la famille des Solanacées qui comprend par exemple la tomate, connue pour posséder des composés à propriétés antifongiques.

** *Evolvulus arbuscula* Poir. (Convolvulaceae) est utilisé notamment dans le traitement des mycoses et des infections au Pérou (Duke et al., 2009).

*** *Senna alata* L. Roxb. (ou *Cassia alata* L.) (Fabaceae) est utilisé dans la Caraïbe dans le traitement des mycoses cutanées dans divers pays : Caraïbes et Amérique centrale, Nigeria, Ghana, Indonésie (H. Joseph, non publié ; TRAMIL, 1999 ; Hennebelle, 2009).

Après avoir établi leurs positions systématiques, une fiche descriptive sera établie pour les 10 plantes sélectionnées. Les récapitulatifs bibliographiques inclus ne comprennent pas forcément l'ensemble des études mais uniquement celles susceptibles de nous intéresser.

Position systématique des plantes sélectionnées selon la classification phylogénétique APG III-2009

Règne : **PLANTAE**

Division : **MAGNOLIOPHYTA (ANGIOSPERMES)**

Classe : **MAGNOLIOPSIDA (DICOTYLEDONES)**

Clade : **EUDICOTYLEDONES SUPERIEURES**

Ordre : **CARYOPHYLLALES**

Famille : **NYCTAGINACEAE**

 ***Pisonia aculeata***

Clade : **FABIDEES OU EUROSIDEES I**

Ordre : **FABALES**

Famille : **FABACEAE**

Sous-famille : **MIMOSOIDEAE**

Tribu : **INGEAE**

 ***Enterolobium cyclocarpum***

Sous-famille : **FABOIDEAE**

Tribu : **ROBINIEAE**

 ***Gliricidia sepium***

Sous-famille : **CAESALPINIOIDEAE**

Tribu : **CASSIEAE**

 ***Senna bicapsularis***

Clade : **MALVIDEES OU EUROSIDEES II**

Ordre : **SAPINDALES**

Famille : **BURSERACEAE**

 ***Bursera simaruba***

Famille : **MELIACEAE**

 ***Cedrela odorata***

Clade : **LAMIIDEES OU EUASTERIDEES I**

Ordre : **SOLANALES**

Famille : **SOLANACEAE**

 ***Acnistus arborescens***

Famille : **CONVOLVULACEAE**

 ***Evolvulus alsinoides***

Clade : **CAMPANULIDEES ou EUASTERIDEES II**

Ordre : **ASTERALES**

Famille : **ASTERACEAE**

 ***Pluchea carolinensis***

 ***Pluchea odorata***

***Acnistus arborescens* (Schott)**

Famille Solanaceae

Synonyme *Atropa arborescens* (L).
Dunalia arborescens (L). Sleumer
Pederlea arborescens (L). Raf

Noms vernaculaires

Guadeloupe: Siwyo (cr.), Surio (fr.)

Autres (Amériques et Caraïbes): wild tobacco, Gallinero, Palo de gallinera, Galán arboreo...

Usage médicinal populaire (Barata L. *et al.*, 1970 ; Duke J. *et al.*, 2009 ; H. Joseph, non publié)

Fleurs : sudorifiques, contre la toux et les maux d'estomac

Feuilles : hémorroïdes (décoction des feuilles, Argentine ; feuilles écrasées ou sève des jeunes tiges, Costa Rica), maux de gorge, toux, coup de froid et fièvre (décoction des feuilles, Costa Rica, Dominique, Antilles françaises), émollient (dans du saindoux, contre les douleurs rhumatismales, Pérou), migraine, névralgie, fièvre, oreillons (cataplasme des feuilles, Trinidad), [maladies de la peau](#) (eczéma) (feuilles, Brésil).

Description botanique

Arbuste ou petit arbre pouvant atteindre 4 à 8 m voire 12 m, plus ou moins tortueux aux branches horizontales nombreuses ou inclinées. L'écorce est grise ou blanchâtre, rugueuse, au bois cassant. Les rameaux et les feuilles sont souvent à pubescence laineuse ferrugineuse. Le pétiole atteint 1-3 cm et les feuilles, alternes, elliptiques à lancéolées atteignent une dimension de L 5-30 cm x l 3-14 cm. Cet arbre est remarquable pour sa cauliflorie. Le bouton floral vert pâle laisse place aux fleurs de couleur blanche à grisâtre puis aux fruits charnus oranges, non comestibles, de 5-8 mm de diamètre disposés en grappes nombreuses.

Biogéographie

Alt 20-700 m

Forêt mésophile et hygrophile dégradée ou secondaire

Répartition géographique

Amérique du Nord et du Sud, Caraïbes

Travaux antérieurs (Cordero *et al.*, 2008 ; Morantes *et al.*, 2006 ; Usubillaga *et al.*, 2005)

- Feuilles : flavonoïdes (chalcone), lactones stéroïdiques (acnistine, withaphysalines, withanolides), triterpénoïdes, esters d'acides gras.



AA1



AA2

Acnistus arborescens

Photo AA1 : feuilles d'*A. arborescens*

Photo AA2 : fleurs et fruits d'*A. arborescens*

Photo AA3 : feuilles séchées d'*A. arborescens*



AA3

***Bursera simaruba* (L.) Sarg.**

Famille Burseraceae

Synonyme *Pistachia simaruba* L.
Terebinthus brownei Jacq.
Bursera gummiifera L. (Duss)
Elaphrium simaruba (L.) Rose

Noms vernaculaires

Guadeloupe: Gonmyé wouj (cr.), Gommier rouge (fr.), Gommier barrière (fr.)

Autres (Amériques et Caraïbes): Aceito, red gumbolimbo, almacigo, red birch...

Usage médicinal populaire (Duke J. *et al.*, 2009 ; Zúñiga *et al.*, 2005 ; H. Joseph, non publié)

Piqûres, démangeaisons (décoction de l'écorce, Belize), [cicatrisation des plaies](#), ecchymoses, foulures (suc aromatique de l'écorce, utilisé par les Kalinas de Dominique et en Guadeloupe), [dermatoses](#) (écorce, Guatemala), insecticide (suc aromatique de l'écorce, Haïti), infection, [rougeurs de la peau](#), plaies (décoction de l'écorce, utilisée par les Garifunas du Nicaragua), diurétique, diarrhée, dysentérie, infections intestinales (infusion de l'écorce, Mexique).

Description botanique

Arbre pouvant atteindre 5 à 15 m de hauteur au large tronc (Ø 20-80 cm), brillant, brun-rougeâtre. L'écorce brun-rouge est caractéristique par son exfoliation, se détachant en très fins lambeaux. Les feuilles de 10-25 cm de long possèdent (3-)7(-9) folioles glabres, papyracées, elliptiques ou obovales de dimension suivante, L (4-)6-7(-13) cm x l (2,5-)3,5-4(-6) cm et odorantes par écrasement. Les fleurs blanches sont disposées en panicules axillaires.

Biogéographie

0-350 m

Héliophile des bosquets secs, présent dans la forêt xérophile dégradée ou secondaire, plus rarement en forêt mésophile

Répartition géographique

Amérique du sud et centrale, Caraïbes

Travaux antérieurs (Maldini *et al.*, 2009 ; Peraza-Sanchez *et al.*, 1992 ; Carretoro *et al.*, 2008 ; Noguera *et al.*, 2004)

- Ecorce de tige : tanins (épicatechine, polymères d'épicatechines et formes glycosylées), lignanes (yatéine, picropolygamaine, β -peltatine-O-D-glucoïde, hinokinine, bursehernine, formes sulfatées)
- Résine : triterpènes de type lupane, α et β -amyrine, lupéol, épilupéol, épiglutinol et lignane (picropolygamaine)
- Feuilles : ergostérol, stigmastérol, néophytadiène, méthyle-néophytadiène, β -peltatine A



Bursera simaruba

Photo BS1 : exfoliation de l'écorce de *B. simaruba*

Photo BS2 : *B. simaruba*

Photo BS4 : feuilles et fruits de *B. simaruba*

Photo BS4 : écorce de tige séchée de *B. simaruba*



***Cedrela odorata* L.**

Famille Meliaceae

Synonyme *Cedrela mexicana* M. Roemer

Noms vernaculaires

Guadeloupe : Kajou (cr.), Kajou wouj (cr.), Kajou senti (cr.), Kajou anmè (cr.), Kajou péyi (cr.), Acajou (fr.), Acajou rouge (fr.)

Autres (Amériques et Caraïbes) : Cedar, West Indian Cedar, Cedro

Usage médicinal populaire (Longuefosse et Nossin, 1996 ; H. Joseph, non publié)

Cicatrisation des plaies (poudre d'écorce), **problèmes de peau** (macération de l'écorce et des feuilles, Antilles françaises), odeur désagréable des feuilles chassant les puces (Antilles françaises)

Observation : Cet arbre est utilisé comme bois d'œuvre et n'est jamais attaqué par les insectes.

Description botanique

Arbre imposant atteignant généralement 15 m de hauteur mais pouvant aller jusqu'à 40 m avec un large tronc (Ø 0,30-2 m). L'écorce est grise à marron et fissurée. Le bois est de couleur rougeâtre à odeur plus ou moins agréable. Les feuilles sont alternes composées atteignant jusqu'à 45 cm de long. Les pétioles et les rachis sont glabres. Les folioles entre 10-12 voire 16 sont verts clairs. Les fruits sont capsulaires contenant des graines ailées.

Biogéographie

Mornes inférieurs, bois et halliers, forêt mésophile.

Répartition géographique

Amérique du sud et centrale, Caraïbes

Travaux antérieurs

(Kipassa *et al.*, 2008 ; Campos *et al.*, 1991, De Paula, 1997 ; Mackinnon, 1997)

- Ecorce : tanins (catéchine, proanthocyanidines) ; sesquiterpènes, dérivés stéroliques (stigmastérol, campestérol, sitostérol), dérivés triterpéniques (limonoïdes et dérivés de squelette de type dammarane).



Cedrela odorata

Photo C01 : *C. odorata*

Photo C02 : écorce de tige et résine de *C. odorata*

Photo C03 : capsule vide de *C. odorata*

Photo C04 : écorces de tiges séchées de *C. odorata*



***Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.**

Famille Mimosaceae

Synonyme *Mimosa cyclocarpa* Jacq.
Inga cyclocarpa Jacq.

Noms vernaculaires

Guadeloupe : Zorèy a milat (cr.), Oreille d'éléphant (fr.)

Autres (Amériques et Caraïbes) : Monkey soap, elephant ear, guanacaste

Description botanique

Très grand arbre, pouvant atteindre 10 à 25 m de hauteur. L'écorce peut prendre différentes typologies sur un même arbre, elle peut être assez lisse ou présenter de très nombreuses lenticelles. Les branches sont largement étalées. Les pennes atteignent 4 à 15 m de long. Le pétiole (L 2-6 cm), porte en général une glande sessile sous le milieu. Les folioles sont présents au nombre de 20 à 30 paires/penne. Les fleurs sont petites, associées en glomérules multiflores (en forme de pompon) blanc jaunâtre. Les gousses sont aplaties, lustrées, de couleur marron foncé, (Ø8-10 cm), en forme d'oreille.

Biogéographie

Forêt décidue sèche à tropicale humide

Travaux antérieurs

(Hess, 2003 ; Abed El Kader *et al.*, 2003 ; De Pinto *et al.*, 1994)

- Fruit : saponosides triterpéniques
- Résine : tanins, polysaccharides (β -1,3-galactane)



Enterolobium cyclocarpum

Photo EC1 : feuilles d'*E. cyclocarpum*

Photo EC2 : écorce de tige d'*E. cyclocarpum*

Photo EC3 : écorce de tige d'*E. cyclocarpum*

Photo EC4 : écorces de tiges séchées d'*E. cyclocarpum*

Photo EC5 : écorces de racines séchées d'*E. cyclocarpum*



***Evolvulus alsinoides* L.**

Famille Convolvulaceae

Synonyme *Convolvulus alsinoides* L.

Noms vernaculaires

Guadeloupe : Bléhé (cr.), Bleuet (fr.)

Autres (Amériques et Caraïbes) : Speedwell

Usage médicinal populaire (Austin, 2008 ; Gupta, 2007)

Asthme (Vénézuéla, Inde), bronchite (les feuilles sont fumées), anorexie, bronchite, épilepsie, anti-stress, anthelminthique (médecine ayurvédique, Inde), fièvre, maux d'estomac chroniques (décoction, Cuba), diarrhée (décoction, Inde)

Description botanique

Herbe subérigée et ramifiée dès la base, à tiges velues. Les feuilles sont elliptiques, alternes, à pétiole court. Elles mesurent jusqu'à L 16 mm x l 9 mm. Les poils sont apprimés, souvent plus denses en dessous. Les fleurs sont de couleur bleue à mauve clair.

Répartition géographique

Caraïbes, du Mexique au Brésil, Afrique du Nord, Inde et sud de l'Asie

Travaux antérieurs

(Austin, 2008 ; Gupta *et al.*, 2007 ; Kumar *et al.*, 2010 ; Baveja *et al.*, 1969)

- Plante entière : acides phénols [acide caféique et dérivés (évolvoïdes A et B), ester d'acide quinique, 6-MeO-7-O- β -glucopyranosyl-coumarine], polyol (méthylérythritol), flavonoïdes (vitéxine, glycosides de kaempférol et de quercétine), alcaloïdes tropaniques (tropine, pseudotropine, tropinone, merresectine), alcaloïdes pyrrolidiniques [hygrine, norhygrine, 5-(2'-oxopropyl)-hygrine, 5-(2'-hydroxypropyl)-hygrine, 5-(2'-hydroxypropyl)-hygroline, 2',3'-N-méthylpyrrolidinylhygrine, 2',4'-N-méthylpyrrolidinylhygrine, cuscohygrine, évolvine].



Evolvulus alsinoides

EA1 : parties aériennes d'*E. alsinoides*

EA2 : parties aériennes séchées d'*E. alsinoides*

EA3 : zoom parties aériennes séchées d'*E. alsinoides*



***Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Steud**

Famille Fabaceae

Synonyme *Robinia sepium* (Jacq.)

Noms vernaculaires

Guadeloupe : Glysérya (cr.), Gliricidia (fr.)

Autres (Amériques et Caraïbes) : Gliricidia, Mexican lilac, mother of cocoa, quick stick, St-Vincent plum, tree of iron, Immortelle

Usage médicinal populaire (Duke *et al.*, 2009 ; Giron L.M *et al.*, 1991 ; Longuefosse et Nossin, 1996 ; H. Joseph, non publié)

Teigne (décoction des feuilles, Guatémala), **problèmes de peau dont les chofi** (décoction et feuilles écrasées, Antilles françaises), diarrhée, gastroentérite (décoction des feuilles, Guatémala, Jamaïque), impétigo (Guatémala), malaria (bains des feuilles, Mexique), varicelle, fièvre miliaire (décoction des pousses, Venezuela),

Description botanique

Arbre pouvant atteindre 4 à 10 m de hauteur, possédant de jeunes rameaux pubescents et une écorce lisse, grise à rouge brun. De longues feuilles imparipennées, caduques sont composées de (7-)9-15 folioles atteignant L 3-8 cm x l 2 cm. Des stipules ovales, de ± 2 mm de long, caduques, sont rarement visibles. Les fleurs à corolles roses et blanches sont groupées en grands racèmes (jusqu'à 15 m de long). Le calice est campanulé, taché de rouge (5-6 mm), la corolle rose-mauve ou blanche comporte un étendard émarginé, rose, à centre jaune et des ailes roses. La floraison a lieu durant la période sèche aux Antilles (Carême). Le fruit est une gousse glabre (10-15 x 1,6 cm).

Biogéographie

0-400 m

Répartition géographique

Originaire du nord de l'Amérique du sud, d'Amérique centrale et du Mexique. Il est largement cultivé dans les pays tropicaux. Il est naturalisé dans les régions tropicales d'Afrique et d'Asie.

Travaux antérieurs (Rastrelli *et al.*, 1999 ; Kojima *et al.*, 1997 ; Ramamoorthy et Paliwal, 1993)

- Feuilles : dérivés coumariniques (acide coumarique, acide mélilotique, coumarine), flavonoïdes et isoflavonoïdes [glycosides de kaempférol, myrcétine, isoflavanes, ptérocarpane (nédicarpine)]
- Tige : isoflavonoïdes [vestitol, méthylvestitol, roténoïdes (gliricidol, méthoxygliricidol et gliricidine)]
- Fruit : saponosides
- Racines : saponosides triterpéniques (gliricidosides A et B)



Gliricidia sepium

GS1 : feuilles et fleurs de *G. sepium*

GS2 : feuilles séchées de *G. sepium*



***Pisonia aculeata* (L.)**

Famille Nyctaginaceae

Synonyme *P. helleri* Standl.

Noms vernaculaires

Guadeloupe : Kwok chyen (cr.), Mapou blan (cr.), Croc-de-chien (fr.), Mapou blan (cr.)

Autres (Amériques et Caraïbes) : Blackthorn, Prickly mampoo, Cockspur, Una de gato

Description botanique

Arbuste scandent ou liane ligneuse, à longues tiges portant généralement de grosses épines de 3 à 11 mm, recourbées. L'écorce est lisse et rougeâtre. Le pétiole atteint (0,5-)1-2(-4) cm de long et les feuilles, elliptiques ou ovales, décidues, sont assez coriaces et atteignent L (1,8-)2,5-8(-14) cm x l (1,3-)2-5(-6) cm.

Biogéographie

0-300 m

Répartition géographique

Tropiques et subtropiques américains, Océanie et Asie méridionale

Travaux antérieurs

Aucune donnée trouvée



Pisonia aculeata

PA1 : épines de *P. aculeata*

PA2 : feuilles de *P. aculeata*

PA3 : coupe transversale de tige de *P. aculeata*

PA4: Parties aériennes de *P. aculeata*



***Pluchea carolinensis* (Jacq.) G. Don**

Famille Asteraceae

Synonyme *Conyza carolinensis* Jacq.

P. odorata auct. (A ne pas confondre avec *P. odorata* (L.) Cass.)

P. symphytifolia Gillis (A ne pas confondre avec *Conyza symphytifolia*)

Noms vernaculaires

Guadeloupe : Tabak a jako (cr.), Tabak dyab (cr.), Gran sòj (cr.), Guérit tout (fr.)

Autres (Amériques et Caraïbes): Sweet scent, Cattle tongue, Cure-for-all, Tabak zonbi, Salva de playa, Siguapate, Salvia olorasa, Sweet scent, Tabak djab, Zowey mouton, Bitter tobacco

Usage médicinal populaire (Duke *et al.*, 2009 ; Hodges et Bennett, 2006 ; Zabel *et al.*, 1982 ; Gupta, 1995 ; H. Joseph, non publié)

Problèmes de peau (bain des feuilles, Antilles), états grippaux, fièvre, sinusite (décoction ou infusion des feuilles, Belize, Dominique, Cuba, République dominicaine, Antilles françaises, Panama, Yucatane, Mexique, Nicaragua, Panama), douleurs gastro-intestinales (décoction des feuilles, Cuba, Guatemala), antirhumatismal (cataplasmes des feuilles, Cuba). Les espèces de *Pluchea* du Mexique, d'Amérique centrale et Colombie sont utilisées pour le traitement des tumeurs en médecine traditionnelle.

Description botanique

Arbrisseau ou arbuste odorant pouvant atteindre 1 à 4 m de hauteur couvert d'un duvet blanchâtre. Les branches sont striées-cannelées, étalées et divariquées. Les feuilles sont alternes et mesurent L 6-20 cm x l 2,5-8 cm. Les feuilles, elliptiques à lancéolées, sont entières ou faiblement dentées avec une odeur caractéristique assez forte due au fait que le limbe est couvert sur les deux faces d'une pubescence dense. Les fleurs sont réunies en capitules hémisphériques et forment une corolle d'abord pourpre puis blanche. *P. carolinensis* fleurit presque toute l'année.

Biogéographie

Altitude : 0-500 m et parfois 1000 m

Espèce rudérale, pousse surtout sur les sols calcaires décapés, sur tuf rapporté.

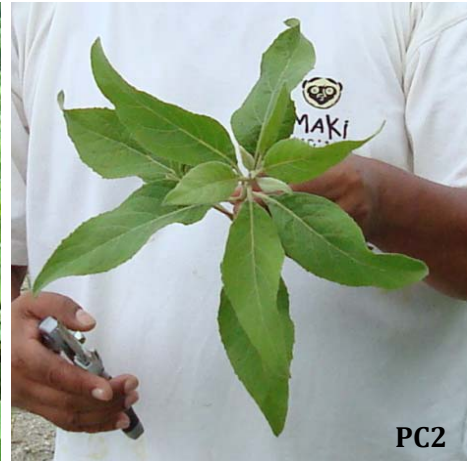
Répartition géographique

Caraïbe, Amérique centrale, Mexique, Nord de l'Amérique du Sud, naturalisé en Océanie

Travaux antérieurs *P. carolinensis*

(Perera *et al.*, 2006 et 2007; Ahmed A. Ahmed, 1998 ; Gupta, 1995)

- Feuilles : flavonoïdes (eupalitine, isorhamnétine-SO₃), sesquiterpènes (dérivés d'eudesmane : les pluchènes caractéristiques du genre *Pluchea*, acide eudesmanoïque, eudesmanolides et autres sesquiterpènes).



Pluchea carolinensis

PC1 : *P. carolinensis*

PC2 : feuilles de *P. carolinensis*

PC3 : fleurs de *P. carolinensis*

PC4 : feuilles séchées de *P. carolinensis*



***Pluchea odorata* (L) Cass.**

Famille Asteraceae

Synonyme *Conyza odorata* (L) Cass.
Pluchea purpurascens (Sw.)
Conyza cortezii Kunth.
Conyza purpurascens (Sw.)
Pluchea cortesii (Kunth) DC
Placus purpurascens (Sw.) M. Gomez

Noms vernaculaires

Guadeloupe : Soj wouj (cr.), Géri tou (cr.), Guérit tout (fr.), Tabak a jako (cr.), Tabak dyab (cr.)
 Autres (Amériques et Caraïbes): Sweet scent, salt marsh fleabane

Usage médicinal populaire (Duke *et al.*, 2009 ; Zabel *et al.*, 1982 ; H. Joseph, non publié)

Problèmes de peau (bain des feuilles, Antilles), diarrhée, grippe, coups de froid, rhumatismes, douleurs corporelles (décoction des feuilles, Guatémala). Les espèces de *Pluchea* du Mexique, d'Amérique centrale et Colombie sont utilisées pour le traitement des tumeurs en médecine traditionnelle.

Description botanique

Arbre ou arbrisseau annuel ou bisannuel, pouvant atteindre 1,50 m, souvent stolonifère. Les tiges sont vertes-rouges à noires, les feuilles lancéolées d'un vert pâle à odeur assez forte, plus agréable que *P. carolinensis*. Les fleurs sont violettes.

Biogéographie

Altitude : 0-300 m basse altitude

Pousse dans les endroits humides et les marécages voire les endroits légèrement salés (arrière-plage).

Répartition géographique

Caraïbe, Amérique centrale, Amérique du Sud, Etats-Unis, naturalisé en Océanie

Travaux antérieurs

(Wollenberg *et al.*, 1985 ; Dominguez *et al.*, 1972 ; Arriaga *et al.*, 1983 et 1985)

- Feuilles : flavonoïdes (artémétine, herbacétine, 6-méthoxyflavones), sesquiterpènes (dérives d'eudesmane : pluchènes caractéristique du genre *Pluchea*), triterpénoides (acétate de β -amyrine, campesterol, cuauhtémone et dérivés).



P01

Pluchea odorata

- P01 : racine séchée de *P. odorata*
- P02 : parties aériennes de *P. odorata*
- P03 : parties aériennes séchées de *P. odorata*
- P04 : zoom fleurs séchées de *P. odorata*



P02



P04



P03

Senna bicapsularis* (L.) roxb.var. *bicapsularis

Famille Fabaceae

Synonyme *Cassia bicapsularis* L.
Cassia emarginiata L.
C. berteri Colla
Adipera bicapsularis (L.) Britt & Rose ex Britt & Wils

Noms vernaculaires

Guadeloupe : Soumaké (cr.)

Autres (Amériques et Caraïbes): Monkey tamarind, money bush, flor de san josé

Usage médicinal populaire (Longuefosse et Nossin, 1996 ; Bussmann *et al.*, 2010 ; H. Joseph, non publié)

Problèmes de peau, érythème fessier des bébés (macération des feuilles et bain des feuilles, Antilles françaises), « purification du sang » (Pérou)

Description botanique

Arbrisseau parfois sarmenteux, le plus souvent droit, pouvant atteindre 1 à 4 m de hauteur, à écorce grise et lisse. Les feuilles possèdent 3 paires de folioles longues de 1 à 4 cm ; les faces inférieures sont glauques. Les fleurs possèdent 5 pétales jaunes de 10 à 13 cm de longueur. Les gousses subcylindriques, longues de 6-15 cm sont toujours pendantes. Les graines sont entourées d'une pulpe légèrement sucrée et comestible.

Biogéographie

0-10-(400) m

Halliers, falaises, friches et décombres. Rudérale de l'étage inférieur.

Répartition géographique

Caraïbes, zones côtières d'Asie, d'Afrique et de l'Océanie

Travaux antérieurs

(Torrenegra *et al.*, 2002 ; Valiente *et al.*, 2003)

- Feuilles et fleurs : flavonoïdes (lutéoline), alcool aliphatique (éicosanol), stérols (stigmastérol, déhydrostigmastérol).
- Racines : anthraquinones (physcion, chrysophanol)



Senna bicapsularis

SB1 : *S. bicapsularis*

SB2 : feuilles de *S. bicapsularis*

SB3 : fleurs de *S. bicapsularis*

SB4 : gousses de *S. bicapsularis*

SB5 : feuilles séchées de *S. bicapsularis*



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

MYCOSES ET TRAITEMENTS PHARMACEUTIQUES

ADLER D., CHENIVESSE C., SIMILOWSKI T., SOCCAL P.M., 2008

Pneumocystose chez le patient immunosupprimé non VIH

Revue Médicale Suisse, vol.4, 2525-2530

ALIOUAT-DENIS C.M., CHABÉ M., DEMANCHE C., ALIOUAT E.M., VISCOGLIOSI E.,
GUILLOT J., DELHAES L., DEI-CAS E., 2008

***Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power**

Infection, Genetics and Evolution, 8(5), 708-726

BOURREE P., 2008

Aide-mémoire de parasitologie et de pathologie tropicale

Ed° Flammarion médecine-sciences, Paris, 247-260

CHABASSE D. et CAUMES E., 2003

Parasites et mycoses courantes de la peau et des phanères - Guide Medibio

Ed° Elsevier, Issy-les-Moulineaux, France

CHABASSE D., DELEROUX M., CHANDENIER J., CONTET-AUDONNEAU N., 2003

Mycoses d'importation - Guide Medibio

Ed° Elsevier, Issy-les-Moulineaux, France

CHABASSE D., GUIGUEN CI., CONTET-AUDONNEAU N., 1999

Mycologie médicale

Ed° Masson, Paris, France

CHABE M., NEVEZ G., TOTET A., FREALLE E., DELHAES L., ALIOUAT E.M., DEI-CAS E.,
2009

Transmission de *Pneumocystis*

Journal de Mycologie Médicale, 19(4), 276-284

GARNIER F., 2003

Antifongiques: classes thérapeutiques, mécanismes d'action, problèmes de résistance

Antibiotiques, 5(1), 39-48

HULIN A., DEGUILLAUME A. M., BRETAGNE S., BEZIE Y., 2005

Bon usage des antifongiques dans le traitement des candidoses et aspergilloses invasives

Journal de Pharmacie Clinique, 24(3), 125-138

JANG-JIH L., CHAO-HUNG L., 2008

***Pneumocystis* Pneumonia**

Journal of the Formosan Medical Association, 107(11), 830-842

MASLIN J., MORAND J.J., 2002

Les scytalidioses

Medicine Tropicale, 62, 132-134

PIERARD G.E., CAUMES E., FRANCHIMONT C., ESTRADA J.A., 1993

Dermatologie tropicale

Universités Francophones UREF

Ed° de l'Université de Bruxelles / AUPELF, 273-286

PIHET M.D., DUBOIS D., LE CLEC'H C., CROUE A., REBOUL P., DE GENTILE L., CHABASSE D., 2007

Phaeohyphomycose cutanée à *Scytalidium dimidiatum* chez une transplantée rénale

Journal de Mycologie Médicale, 17, 109-113

STRINGER J.R., 2002

Pneumocystis

International Journal of Medical Microbiology, 292(5-6), 391-404

VIGUIE-VALLANET C., 2001

Traitements antifongiques en dermatologie - Encyclopédie Médico-Chirurgicale

Dermatologie, 98-906-A-10, 1-16

Site internet

<http://www.em-consulte.com/article/11906> Infections à *Pneumocystis carinii* : biologie

Date de consultation : 20/08/2010

GUADELOUPE, MEDECINE TRADITIONNELLE et PLANTES SELECTIONNEES

6^{ème} symposium international d'aromathérapie et plantes médicinales (1^{ère} partie), 2004

Compte-rendu

Phytothérapie, 2(5), 162-169

DEGRAS L., 2005

Le jardin créole repères culturels, scientifiques et techniques

Ed° Jasor, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe

FELDMANN P., 2006

Dix neuf espèces d'orchidées sauvages de Guadeloupe protégées en 2006

L'Orchidophile, n° 171

FOURNET J., 2002

FLORE illustrée des phanérogames de Guadeloupe et Martinique, Tome 1 et 2

Ed° Gondwana, Trinité, Martinique

GARGOMINY O., 2003

Biodiversité et conservation dans les collectivités françaises d'outre-mer

Collection Planète Nature

Ed° Comité français pour l'UICN, Paris, France.

JOSEPH H., 1988

Médecine traditionnelle aux Antilles, ressources médicinales de la flore locale

Phytotherapy, 25, 4-6

LUDWING R., MONTBRAND D., POULLET H., TELCHID S., 1990

Dictionnaire créole français (Guadeloupe)

Ed° SERVEDIT-JASOR, Paris-Pointe-à-Pitre, France-Guadeloupe

MORENTIN-BIABIANY C., 2003

Quel est le visage de la médecine traditionnelle en Guadeloupe ?

Mémoire Euronature, Guadeloupe

ROBARD I., 2009

La pharmacopée ultramarine enfin réhabilitée : entre histoire et modernité

Phytothérapie, 7, 133-134

SAINTON J.P., BOUTIN R., CHATEAU-DEGAT R., HO-FONG-CHOY CHOUCOUTOU L., MAUVOIS G., 2004

Histoire et civilisation de la Caraïbe (Guadeloupe, Martinique, Petites Antilles), Tome 1, Le temps des genèses

Ed° Maisonneuve et Larose, Paris, France

SASTRE C. ET BREUIL A., 2007

Plantes, milieux et paysages des Antilles françaises - (collection Parthénopé)

Ed° Biotope, Mèze, France

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2009

An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III

Botanical Journal of the Linnean Society, 161, 105-121

TRAMIL, 1999

Pharmacopée Caribéenne

Ed° DESORMAUX, Fort-de-France, Martinique

VILAYLECK E., 2002

Ethnobotanique et médecine traditionnelle créoles - Guide de Langues et cultures créoles

Ed° IBIS ROUGE, Matoury, Guyane

Sites internet

Ethnopharmacologia http://www.ethnopharmacologia.org/pdf/textes/weniger_robineau.pdf
 Robineau I. et Weniger B. **Naissance d'une pharmacopée caraïbe : fruit d'une interdisciplinarité et d'une continuité entre le recensement, l'évaluation et la diffusion de la médecine traditionnelle.**

Date de consultation : 10/02/2010

<http://archive.idrc.ca/books/reports/1997/22-01f.html>

Date de consultation : 10/12/2010

Entretien

Henry Joseph (Dr en pharmacognosie, Pharmacien, Phytobôkaz)

Darius Siwsanker (personne ressource)

BIBLIOGRAPHIE DES PLANTES SELECTIONNEES

ABED EL KADER D., MOLINA E., COLINA G., MONTERO L., LEON DE PINTO G., 2003
Cationic composition and the tannin content of five gums from Venezuelan Mimosaceae species

Food Hydrocolloids, 17(3), 251–253

ARRIAGA F., BORGES-DEL-CASTILLO J., 1983

Salvadorian Compositae. Part 9. A new eudesmane derivative from *Pluchea odorata*

Planta Medica, 51(3), 290-290

ARRIAGA F., BORGES-DEL-CASTILLO J., 1985

Carbon-13 NMR spectra of plucheinol and its ester derivatives

Magnetic Resonance in Chemistry, 23(6), 487-488

AUSTIN D.F., 2008

***Evolvulus alsinoides* (Convolvulaceae): An American herb in the Old World**

Journal of Ethnopharmacology, 117(2), 185–198

BARATA L., MORS W.B, KIRSON I., 1970

A new withanolide from *Acnistus arborescens* (L.) Schlecht. (Solanaceae) from the state of Guanabara

Anais Academia Brasileira Ciências, 42, 401-407

BAVEJA S.K. ET SINGLA R.D., 1969

Investigation of *Evolvulus alsinoides* Linn. (shankpushpi)

Indian Journal of Pharmacy, 31(4), 108–110

BUSSMANN R.W., MALCA-GARCIA G., GLENN A., SHARON D., CHAIT G., DIAZ D., POURMAND K., JONAT B., SOMOGY S., GUARDADO G., AGUIRRE C., CHAN R., MEYER K., KUHLMAN A., TOWNESMITH A., EFFIO-CARBAJAL J., FRIAS-FERNANDEZ F., BENITO M., 2010

Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies, 2010

Journal of Ethnopharmacology, 132(1),101-108

CAMPOS A.M., OLIVEIRA F.S., MACHADO M.I.L., MATOS F.J.A., BRAZ-FILHO R., 1991

Triterpenes from *Cedrela odorata*

Phytochemistry, 30(4), 1225-1229

CARRETERO M.E., LOPEZ-PEREZ J.L., ABAD M.J, BERMEJO P., TILLET S., ISRAEL. A, NOGUERA-P. B., 2008

Preliminary study of anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves

Journal of Ethnopharmacology, 116(1), 11-15

CORDERO C.P., J. MORANTES S.J., PÁEZ A., RINCÓN J., ARISTIZÁBAL F.A., 2009

Cytotoxicity of withanolides isolated from *Acnistus arborescens*

Fitoterapia, 80(6), 364–368

DOMINGUEZ X.A., ZAMUDIO A., 1972

β-Amyrin acetate and campesterol from *Pluchea odorata*

Phytochemistry, 11(3), 1179-1179

DUKE J., BOGENSCHUTZ-GODWIN M.J, OTTESEN A.R, 2009

Duke's handbook of medicinal plants of Latin America

Ed° CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida

GIRON L.M., FREIRE V., ALONZO A., CACERES A., 1991

Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala

Journal of Ethnopharmacology, 34(2-3), 173-187

GUPTA M.P., 1995

270 plantas medicinales iberoamericanas, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, (CYTED) - Convenio Andrés Bello (SECAB).

Ed° Convenio Andres Bello, Santafé de Bogotá, Colombia

GUPTA P., AKANKSHA, SIRIPURAPU K.B., AHMAD A., PALIT G., ARORA A., MAURYA R., 2007

Anti-stress constituents of *Evolvulus alsinoides*: an ayurvedic crude drug

Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 55(5), 771-775

HESS H.D., KREUZER M., DIAZ T.E., LASCANO C.E., CARULLA J.E., SOLIVA C.R., MACHMÜLLER A., 2009

Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid

Animal Feed Science and Technology, 109(1-4), 79–94

HODGES S. ET BENNETT B.C., 2006

The Ethnobotany of *Pluchea carolinensis* (Jacq.) G. Don (Asteraceae) in the Botánicas of Miami, Florida

Economic Botany, 60(1), 75–84

KIPASSA N.T., IWAGAWA T., OKAMURA H., DOE M., MORIMOTO Y., NAKATANI M., 2008

Limonoids from the stem bark of *Cedrela odorata*

Phytochemistry, 69(8), 1782–1787

KOJIMA K., ZHU X.B., OGIHARA Y., 1998

Saponins from *Gliricidia sepium*

Phytochemistry, 48(5), 885-888

KUMAR M., AHMAD A., RAWAT P., KHAN M.F., RASHEED N., GUPTA P., SATHIAMOORTHY B., BHATIA G., PALIT G., MAURYA R., 2010

Antioxidant flavonoid glycosides from *Evolvulus alsinoides*

Fitoterapia, 81(4), 234-242

LONGUEFOSSE J.L., NOSSIN E., 1996

Medicinal ethnobotany survey in Martinique

Journal of Ethnopharmacology, 53(3), 117-142

MACKINNON S., DURST T., ARNASON J.T., 1997

Antimalarial activity of tropical meliaceae extracts and gedunin derivatives

Journal of Natural Products, 60(4), 336-341

MALDINI M., MONTORO P., PIACENTE S., PIZZA C., 2009

Phenolic compounds from *Bursera simaruba* Sarg. Bark : Phytochemical investigation and quantitative analysis by tandem mass spectrometry

Phytochemistry, 70(5), 641-649

MALDINI M., MONTORO P., PIACENTE S., PIZZA C., 2009

ESI-MS, ESI-MS/MS fingerprint and LC-ESI-MS analysis of proanthocyanidins from *Bursera simaruba* Sarg bark.

Natural Product Communications, 4(12),1671-4

MORANTES S.J., PAEZ A., CORDERO C.P., RINCON J., ARISTIZABAL F.A., 2006

Actividad citotóxica y análisis fitoquímico de fracciones aisladas del extracto etanólico total de *Acnistus arborescens*

Acta Farmaceutica Bonaerense, 25(4), 491-496

NOGUERA B., DIAZ E., GARCIA M.V., SAN FELICIANO A., LOPEZ-PEREZ J.L., ISRAEL A., 2004

Anti-inflammatory activity of leaf extract and fractions of *Bursera simaruba* (L.) Sarg (Burseraceae)

Journal of Ethnopharmacology, 92(1), 129-133

de PAULA J.R., VIEIRA I.J.C., DAS G. F., da SILVA M.F., FO E.R., FERNANDES J.B., VIEIRA P.C., PINHEIRO A.L., VILELA E.F., 1997

Sesquiterpenes, triterpenoids, limonoids and flavonoids of *Cedrela odorata* graft and speculations on the induced resistance against *Hypsipyla grandella*

Phytochemistry, 44(8), 1449-1454

PERERA W., NOGUEIRAS C., PAYO A., DELGADO G., QUEIROZ B., SARDUY R., OQUENDO M., 2007

Flavonols from leaves of *Pluchea carolinensis* (Jacq.) G. Don (Asteraceae)

Revista Latinoamericana de Química, 35 (3), 68-73

PERERA CORDOVA W.H, MESA L.G., PAYO HILL A.L., NOGUEIRAS LIMA C., DELGADO LAMAS G., OQUENDO SUAREZ M. , SARDUY DOMINGUEZ R., 2006

Antimicrobial activity of crude extracts and flavonoids from leaves of *Pluchea carolinensis* (Jacq.) G. DON

Pharmacologyonline, 3, 757-761

PERAZA-SANCHEZ S.R., PENA-RODRIGUEZ L.M., 1992

Isolation of picropolygamain from the resin of *Bursera simaruba*

Journal of Natural Products, 55(12), 1768-1771

de PINTO G.L., MARTINEZ M., de CORREDOR A.L., RIVAS C., OCANDO E., 1994

Chemical and ¹³C NMR studies of *Enterolobium cyclocarpum* gum and its degradation products

Phytochemistry, 37(5),1311-5

RAMAMOORTHY M., PALIWAL K., 1993

Allelopathic compounds in leaves of *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. and its effect on *Sorghum vulgare* L.

Journal of Chemical Ecology, 19(38), 1691-1701

RASTRELLI L., CACERES A., DE SIMONE F., AQUINO R., 1999

Studies on the constituents of *Gliricidia sepium* (Leguminosae) leaves and roots: isolation and structure elucidation of new triterpenoid saponins and aromatic compounds

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(4), 1537-1540

SVETAZA L., 2010

Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries

Journal of Ethnopharmacology, 127(1), 137–158

USUBILLAGA A., KHOURI N., BAPTISTA J., BAHSAS A., 2005

New acnistins from *Acnistus arborescens* (L.)

Revista Latinoamericana de Quimica, 33(3), 121-127

WOLLENWEBER E., MANN K., ARRIAGA F.J., YATSKIEVYCH G., 1985

Flavonoids and terpenoids from the leaf resin of *Pluchea odorata*,

Zeitschrift für Naturforschung, 50(5), 321-324

ZABEL V., WATSON W. H., SILVA M., 1982

Plucheinol and (3 α H)-plucheinol

Acta Crystallographica, 38(B), 584-588

ZÚÑIGA B., GUEVARA-FEFER P., HERRERA J., CONTRERAS J.L., VELASCO L., PÉREZ F.J., ESQUIVEL B., 2005

Chemical composition and anti-inflammatory activity of the volatiles fractions from the bark of eight Mexican *Bursera* species.

Planta medica, 71(9), 825-828

Site internet :

<http://www.fs.fed.us/global/iitf/Enterolobiumcyclocarpum.pdf>

FRANCIS J., 1998, **Enterolobium cyclocarpum (Jacq.) Griseb. Guanacaste**, SO-ITF-SM-15. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station.

**PARTIE III. CARACTERISATIONS
PHYTOCHIMIQUES, PHARMACOLOGIQUES ET
SELECTION DES EXTRAITS**

I – REALISATION DES EXTRAITS

Choix des solvants extractifs

Le choix du solvant pour la réalisation des extraits est primordial car l'extraction des composés actifs en dépend. Dans une démarche classique d'étude phytochimique, une plante est soumise successivement à plusieurs solvants de polarité croissante (ex : Hexane > Acétate d'éthyle > Alcool > Mélange hydroalcoolique). Dans cette thèse, trois objectifs ont été ciblés :

1. Le laboratoire Phytobôkaz développe des produits issus des plantes et valorise le patrimoine naturel caribéen. Soucieuse de conserver cette éthique jusqu'à la formulation des extraits, la société a été guidée par l'utilisation de solvants « verts » et disponibles localement. Cette démarche réduit la liste des solvants d'extraction principalement à l'éthanol et à l'eau. En intégrant cette donnée dès le départ et en réalisant les extraits à tester à partir de ces derniers, nous assurons une meilleure garantie de l'activité des extraits, ultérieurement, à l'échelle de la production. En effet, le rendement d'extraction des molécules actives peut varier sensiblement en passant d'un solvant à un autre et en passant de l'échelle du laboratoire de recherche à l'échelle de la production. Nous minimisons les écarts éventuels, en choisissant dès le départ les solvants utilisés par le laboratoire Phytobôkaz à l'échelle de la production.

2. Le deuxième objectif a été de partir des solvants utilisés en phytothérapie traditionnelle et de chercher à s'en rapprocher en tentant de les reproduire ou de les transposer.

- Pour la macération alcoolique qu'elle quelle soit, une transposition dans de l'EtOH a été appliquée.

- Pour un « jus » obtenu par expression des feuilles, il n'y a malheureusement pas de transposition réelle possible avec des solvants.

- Pour une infusion ou une décoction, une transposition EtOH/Eau a été adoptée bien que nous soyons conscients qu'il ne s'agit pas d'une reproduction à l'identique, un système uniquement constitué d'eau n'étant pas transposable, dans notre cas, à l'échelle de la production.

3. Le troisième objectif consistait à couvrir toutes les polarités possibles des composés d'un même extrait et ainsi obtenir l'ensemble des composés caractéristiques de chaque plante notamment les composés de nature plus apolaire (pouvant être libérés dans le « jus »), plus faiblement extraits avec les deux systèmes retenus ci-dessus. Un solvant apolaire a donc été rajouté : le c-hexane.

Ainsi, trois solvants ont été retenus : un système polaire, EtOH/Eau (1:1), un solvant moyennement polaire, EtOH 100% et un solvant apolaire, c-hexane. Ce dernier ne rentre pas dans la liste des solvants utilisés par le laboratoire Phytobôkaz et serait alors remplacé par la suite par une autre stratégie.

Chaque organe de plante sélectionné est extrait indépendamment par ces trois solvants afin de préserver une éventuelle synergie de composés. En effet, outre ses propriétés électrostatiques permettant des interactions soluté-solvant (forces de Keesom, forces de Debye, liaisons hydrogènes, forces de London), qui confèrent au solvant sa propriété d'extraire des molécules de nature chimique similaire, s'adjoint le paramètre « effet de masse » dû au volume de solvant nettement supérieur à la quantité de plante extraite (de l'ordre de 10 fois) et qui permettra quand même d'extraire des métabolites de nature chimique différente. Nous obtenons ainsi 3 extraits bruts de polarités globales différentes mais se recoupant et préservant une éventuelle synergie.

Rendements extractifs

Les rendements extractifs sont présentés dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3 : Taux d'extraction

Plantes sélectionnées	Organe(s) récolté(s)	EtOH/Eau (1:1)		EtOH 100%		c-hexane	
		m (g)	%	m (g)	%	m (g)	%
<i>Acnistus arborescens</i>	Feuilles	6,45	21,5	3,12	10,4	0,60	2,0
<i>Bursera simaruba</i>	Ecorce de tige	4,94	16,4	2,15	7,16	0,52	1,7
<i>Cedrela odorata</i>	Ecorce de tige	3,99	13,3	1,83	6,1	0,25	0,8
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	Ecorce de tige	3,84	12,8	1,24	4,1	0,21	0,7
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	Ecorce de racine	1,64	18,2	0,58	6,4	0,03	0,3
<i>Evolvulus alsinoides</i>	Parties aériennes	4,00	13,3	2,34	7,8	0,65	2,1
<i>Gliricidia sepium</i>	Feuilles	8,11	27,0	4,27	14,2	0,69	2,3
<i>Pisonia aculeata</i>	Parties aériennes	3,03	10,1	0,80	2,6	0,17	0,5
<i>Pluchea carolinensis</i>	Feuilles	7,71	25,7	2,20	7,3	0,93	3,1
<i>Pluchea odorata</i>	Parties aériennes	5,39	17,9	1,74	5,8	0,60	2,0
<i>Pluchea odorata</i>	Racines	1,15	12,8	0,47	5,2	0,12	0,4
<i>Senna bicapsularis</i>	Feuilles	6,01	20,0	2,69	8,9	0,62	2,0

(m/v cf. M&M)

Les taux d'extraction des extraits c-hexane varient entre 0,3 et 3,1%. Les valeurs les plus élevées sont logiquement obtenues pour les parties aériennes et les feuilles, généralement, plus riches en composés apolaires tels que les cires et pigments chlorophylliens.

Les taux d'extraction des extraits EtOH varient entre 2,6 et 10,4%. Ils sont plus élevés que ceux obtenus en traitant les plantes au c-hexane mais de moindre valeur que ceux obtenus avec le solvant hydroalcoolique. Ce dernier, plus polaire permet l'extraction en plus grande quantité de molécules plus hydrophiles telles que les polymères de sucres, de protéines, de tanins de masses moléculaires plus importantes. Les rendements varient entre 10 et 27%.

Le taux d'extraction ne doit pas être considéré comme un critère d'efficacité mais permettra d'estimer les rendements ultérieurs à l'échelle de la production. Le choix du solvant d'extraction dépendra de l'activité antifongique (cf. IV).

II – SCREENING PHYTOCHIMIQUE PRELIMINAIRE

Un screening phytochimique a été mené afin de visualiser les classes de métabolites secondaires présentes et potentiellement antifongiques des dix plantes sélectionnées.

En effet, les composés antifongiques majeurs chez les végétaux peuvent appartenir à différentes classes de métabolites secondaires telles que : les acides phénols, les quinones, les flavonoïdes, les tanins, les coumarines, les terpenoïdes, les alcaloïdes, les saponosides, les lectines ou encore les polypeptides.

Grâce aux révélateurs plus ou moins spécifiques (voir M&M), l'analyse des extraits par CCM sur plaque de silice a permis de mettre en évidence la présence de 7 classes ou familles de composés différentes :

- les anthraquinones/anthrones/coumarines
- γ -lactones α,β insaturées
- les flavonoïdes
- les acides phénols/tanins hydrolysables
- les tanins condensés
- les saponosides/terpènes glycosylés
- les composés apolaires : triterpènes et stérols, acides gras (AG), autres terpènes et dérivés

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4. L'interprétation de l'intensité des taches est la suivante : (+) présent en petite quantité, (++) en quantité intermédiaire, (+++) en grande quantité, (-) absence ou présence en dessous du seuil de détection, (nt) non testé.

Tableau 4 : Screening phytochimique des extraits

Plantes (Organe, nom, extraits) ↓	Composés détectés →	Anthraquinones Anthrones Coumarines	Flavonoïdes	Acides phénols et tanins hydrolysables	Tanins condensés	Saponosides Terpènes glycosylés	Alcaloïdes (bases puriques exclues)	Composés apolaires : AG, triterpènes & stérols, Terpènes et dérivés	
Feuilles	<i>Acnistus arborescens</i>	EtOH/Eau	anthrone ?	+	-	-	nt	+	
		EtOH	anthrone ?	+	-	-	+*	++	
		c-hexane	nt	nt	nt	nt	-	+*	++
Ecorce de tige	<i>Bursera simaruba</i>	EtOH/Eau	-	+	-	+++	+	nt	+
		EtOH	-	+	-	++	-	-	++
		c-hexane	nt	nt	nt	+	nt	-	+++
Ecorce de tige	<i>Cedrela odorata</i>	EtOH/Eau	anthraquinone	+	-	+++	-	nt	+
		EtOH	anthraquinone	+	-	+++	nt	+	++
		c-hexane	nt	nt	nt	+	nt	+?	++
Ecorce de tige	<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	EtOH/Eau	-	+	-	-	+	nt	+
		EtOH	-	+	+	-	-	-	+
		c-hexane	nt	nt	nt	nt	-	-	+
Ecorce de racine	<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	EtOH/Eau	anthraquinone	+	-	+++	+	nt	+
		EtOH	anthraquinone	+++	-	+++	-	+	++
Parties aériennes	<i>Evolvulus alsinoides</i>	EtOH/Eau	anthrone	+++	++	-	+	nt	+
		EtOH	-	+++	+	-	-	+	+
		c-hexane	nt	nt	nt	nt	-	+	++
Feuilles	<i>Gliricidia sepium</i>	EtOH/Eau	anthrone	+++	+	-	-	nt	+
		EtOH	-	++	+	-	-	+	+
		c-hexane	nt	nt	nt	nt	-	-	++
Parties aériennes	<i>Pisonia aculeata</i>	EtOH/Eau	anthrone	+	-	-	+	nt	+
		EtOH	anthrone	+	-	-	-	-	+
		c-hexane	nt	nt	nt	nt	-	-	++
Feuilles	<i>Pluchea carolinensis</i>	EtOH/Eau	anthrone ?**	+++	++	-	-	nt	+
		EtOH	-	+++	++	-	-	++	+
		c-hexane	nt	nt	nt	nt	nt	+?	++
Parties aériennes	<i>Pluchea odorata</i>	EtOH/Eau	-	++	+	-	-	nt	+
		EtOH	-	++	+	-	-	++	+
		c-hexane	nt	nt	nt	nt	nt	+?	++
Racines	<i>Pluchea odorata</i>	EtOH/Eau	-	+++	++	-	-	nt	+
		EtOH	-	+++	+	-	-	+	+
		c-hexane	nt	nt	nt	nt	nt	-	++
Feuilles	<i>Senna bicapsularis</i>	EtOH/Eau	anthrone	++	-	-	-	nt	+
		EtOH	anthrone	++	-	-	-	++	+
		c-hexane	nt	nt	nt	nt	nt	-	++

* faux + pour *Acnistus arborescens*, withanolides (composés stéroïdiques azotés).

** faux + pour *Pluchea*, flavonoïdes sulfatés

III – SCREENING D'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

Les extraits de plantes possédant des composés antioxydants pourraient avoir indirectement une action de protection vis-à-vis des cellules, en stimulant le système immunitaire (Favier, 2006). L'activité anti-oxydante des extraits a donc, pour cette raison, été pré-évaluée.

Le screening est réalisé après migration des extraits sur CCM par pulvérisation d'une solution de DPPH à 0,2%. Cette technique repose sur la neutralisation du radical stable, le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle), par les composés antioxydants. Initialement de couleur violette, il est réduit en diphénylpicrylhydrazine de couleur jaune après interaction.

Tableau 5 : Screening antioxydant des extraits

Plantes		Réaction au DPPH
<i>Acnistus arborescens</i> (Feuilles)	EtOH/Eau	+++
	EtOH	-
	c-hexane	-
<i>Bursera simaruba</i> (Ecorce de tige)	EtOH/Eau	+++
	EtOH	++
	c-hexane	-
<i>Cedrela odorata</i> (Ecorce de tige)	EtOH/Eau	+++
	EtOH	++
	c-hexane	+
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Ecorce de tige)	EtOH/Eau	+
	EtOH	-
	c-hexane	-
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Ecorce de racine)	EtOH/Eau	+++
	EtOH	+++
<i>Evolvulus alsinoides</i> (Parties aériennes)	EtOH/Eau	+++
	EtOH	+
	c-hexane	-
<i>Gliricidia sepium</i> (Feuilles)	EtOH/Eau	+++
	EtOH	-
	c-hexane	-
<i>Pisonia aculeata</i> (Parties aériennes)	EtOH/Eau	+
	EtOH	-
	c-hexane	-
<i>Pluchea carolinensis</i> (Feuilles)	EtOH/Eau	+++
	EtOH	+
	c-hexane	-
<i>Pluchea odorata</i> (Parties aériennes)	EtOH/Eau	+++
	EtOH	+
	c-hexane	-
<i>Pluchea odorata</i> (Ecorce de racine)	EtOH/Eau	+++
	EtOH	+
	c-hexane	-
<i>Senna bicapsularis</i> (Feuilles)	EtOH/Eau	+++
	EtOH	-
	c-hexane	-

Composés antioxydants absents : - ; Composés antioxydants présents en grande : +++, moyenne : ++ et faible : + quantité.

Les extraits EtOH/Eau présentent la plus grande activité anti-radicalaire. Ce résultat n'a rien de surprenant car cette activité est généralement corrélée aux groupements phénols, amines aromatiques etc. des composés polaires d'une plante.

IV– SELECTION DES EXTRAITS ① : SCREENING ANTIFONGIQUE

Afin de rechercher et de sélectionner les extraits antifongiques les plus actifs dans le traitement des mycoses cutanées ou de la pneumocystose, l'activité des 33 extraits a été évaluée *in vitro*. Les méthodes employées varient en fonction de la souche testée.

A- SCREENING VIS-A-VIS DE *Pneumocystis carinii*

Les 33 extraits ont été testés vis-à-vis de ce champignon suivant le protocole établi par le laboratoire de Parasitologie de Lille 2. Pour cela, les champignons, provenant de broyats de poumons de rats filtrés, sont mis en contact avec les extraits et cultivés dans du milieu DMEM additionné de 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) durant 4 jours à 37°C, 5% CO₂. Les extraits ont été dissous dans du DMSO (choix cf. §B) et été testés à 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml et 1 µg/ml. A la fin de la culture, les parasites sont collectés puis colorés au RAL-555. Les parasites sont alors dénombrés grâce à une grille standardisée sous microscope. Les résultats sont rendus en % d'inhibition *versus* contrôle (DMEM + 10% SVF + DMSO).

Tableau 6 : Screening antifongique des extraits vis-à-vis de *P. carinii*

Plantes		Concentration de l'extrait et % d'inhibition associé			
		100 µg/ml	50 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
<i>Acnistus arborescens</i> (Feuilles)	c-hexane	97%	88%	58%	-
	EtOH	99%	100%	99%	41%
	EtOH/Eau	100%	99%	97%	35%
<i>Bursera simaruba</i> (Ecorce de tige)	c-hexane	*	99%	-	-
	EtOH	*	44%	2%	-
	EtOH/Eau	*	17%	-	-
<i>Cedrela odorata</i> (Ecorce de tige)	c-hexane	100%	99%	98%	99%
	EtOH	100%	95%	99%	99%
	EtOH/Eau	100%	100%	100%	100%
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Ecorce de tige)	c-hexane	99,5%	83%	11%	22%
	EtOH	99,8%	66%	43%	45%
	EtOH/Eau	85%	34%	37%	35%
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Ecorce de racine)	EtOH	99,9%	70%	63%	48%
	EtOH/Eau	98,7%	84%	33%	34%
<i>Evolvulus alsinoides</i> (Parties aériennes)	c-hexane	*	95%	7%	7%
	EtOH	*	81%	-	-
	EtOH/Eau	*	36%	2%	2%
<i>Gliricidia sepium</i> (Feuilles)	c-hexane	*	19%	-	-
	EtOH	*	6%	-	-
	EtOH/Eau	*	10%	-	-
<i>Pisonia aculeata</i> (Parties aériennes)	c-hexane	99%	97%	-	-
	EtOH	78%	71%	-	-
	EtOH/Eau	38%	57%	32%	-
<i>Pluchea carolinensis</i> (Feuilles)	c-hexane	99%	81%	52%	19%
	EtOH	75%	62%	43%	5%
	EtOH/Eau	38%	25%	13%	31%
<i>Pluchea odorata</i> (Parties aériennes)	c-hexane	94%	51%	43%	54%
	EtOH	97%	64%	34%	27%
	EtOH/Eau	71%	70%	44%	37%
<i>Pluchea odorata</i> (Racines)	c-hexane	85,7%	66%	19%	22%
	EtOH	84%	58%	35%	50%
	EtOH/Eau	89%	45%	53%	46%

<i>Senna bicapsularis</i> (Feuilles)	c-hexane	*	20%	-	-
	EtOH	*	98%	4%	33%
	EtOH/Eau	*	65%	57%	44%
Molécule de référence :	pentamidine		CI ₅₀ = 0,08 µM		100%

* Compte-tenu de la lourdeur du protocole (voir M&M), les extraits ont été regroupés et testés sur 3 séries. Suite à l'examen des résultats obtenus à 100 µg/ml pour les 2 premières séries, la dernière série d'extraits n'a été testée qu'à partir de 50 µg/ml.

- : Non inhibiteur

BILAN & DISCUSSION :

Deux plantes présentent des activités biologiquement intéressantes présageant peut être d'une activité moléculaire comparable à celle de la pentamidine : les extraits de *Cedrela odorata* et l'extrait EtOH d'*Acnistus arborescens*. L'extrait c-hexane des parties aériennes de *Pluchea odorata*, l'extrait EtOH des racines de *Pluchea odorata* et les extraits EtOH des écorces de racine et de tige d'*Enterolobium cyclocarpum* présentent des activités intermédiaires moins intéressantes à exploiter comparativement aux deux plantes citées précédemment.

Compte-tenu du temps imparti à la réalisation de ce projet, l'extrait le plus actif a été sélectionné, il s'agit de l'extrait EtOH/Eau (1:1, v/v) de *Cedrela odorata* qui inhibe la croissance du parasite à 100% même à 1 µg/ml.

La seconde plante intéressante est *Acnistus arborescens*, notamment l'extrait EtOH qui inhibe la croissance du parasite à 99% entre 100 et 10 µg/ml et à 41% à 1 µg/ml. Le fractionnement bioguidé de cet extrait a été réalisé au sein du laboratoire et est résumé dans la publication suivante : Roumy V., Biabiany M., Hennebelle T., Aliouat el M., Pottier M., Joseph H., Joha S., Quesnel B., Alkhatib R., Sahpaz S., Bailleul F., 2010, **Antifungal and cytotoxic activity of withanolides from *Acnistus arborescens***, Journal of Natural Products, 73(7), 1313-1317.

B- MYCOSES SUPERFICIELLES

Une mini-banque de souches provenant d'isolats cliniques et de souches de collection est obtenue grâce au concours des CHU de Guadeloupe, de Martinique et de Lille. Un représentant de chaque souche est sélectionné afin de mener à bien le screening antifongique.

Les 12 souches testées sont les suivantes :

- **5 souches de *Candida*** : *Candida krusei*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* étant des souches de collection, *Candida glabrata* et *Candida kefyr* provenant d'isolats cliniques.
- **1 souche de *Malassezia*** : *Malassezia* sp. provenant d'isolat clinique
- **1 souche de *Scytalidium*** : *Scytalidium dimidiatum* provenant d'isolat clinique
- **5 souches de dermatophytes** : *Microsporium canis*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*, *Trichophyton rubrum* et *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* provenant d'isolats cliniques.

Les 33 extraits réalisés sont mis en contact avec les différentes souches suivant les méthodes de référence du laboratoire de mycologie et CLSI (NCCLS) M38-A2 supplémentée de glucose en milieu liquide sur microplaque ou suivant une méthode de diffusion dans la gélose (milieu Sabouraud) avec des concentrations comprises entre 50 et 500 µg/ml selon la méthode utilisée et la souche testée :

- Extraits testés sur les souches de *Candida* : 50 et 200 µg/ml (microméthode)
- Extraits testés sur la souche de *Malassezia* : 200 et 500 µg/ml (gélose)
- Extraits testés sur la souche de *Scytalidium* : 200 et 400 µg/ml (microméthode)
- Extraits testés sur les souches de dermatophytes : 200 et 400 µg/ml (microméthode)

Le solvant de dilution des extraits ne doit en aucun cas intervenir sur le pourcentage d'inhibition potentiel puisque la réponse observée serait celle du couple extrait-solvant et non uniquement celle de l'extrait. Cependant tous les extraits doivent être dissous dans le même solvant, ce dernier doit donc avoir un pouvoir de dissolution important allant des composés apolaires aux composés polaires. Nous évitons pour ces deux raisons de solubiliser les extraits dans les solvants classiquement utilisés pour l'extraction mais dans du DMSO qui est couramment utilisé lors d'expérimentations biologiques. Celui-ci a la propriété de dissoudre une très large gamme de polarités de molécules de façon stable. Lors du test, le pourcentage final de DMSO est calculé afin d'être inférieur à 1% et ainsi garantir l'absence d'interférence entre le DMSO et la croissance des souches. Au préalable, avant d'effectuer les tests antifongiques avec différentes concentrations de DMSO (0,001 à 1%), une vérification a été réalisée comparativement à un témoin de croissance contenant uniquement du milieu de culture. Aucune différence de croissance n'a été observée.

Tous les tests sont dupliqués (gélose) ou tripliqués (microplaque). Un extrait est considéré comme actif si l'ensemble des tubes/micropuits sont actifs sur la souche. La lecture des résultats est directe à l'œil nu (gélose) et à la loupe binoculaire (microméthode). Une estimation relative du pourcentage d'inhibition est obtenue par comparaison avec le contrôle de croissance. Le résultat observé est classé comme suit : 0%, 25%, 50%, 80% et 100% d'inhibition. La moyenne des 3 puits est calculée.

En ce qui concerne les champignons filamenteux, les méthodes de références utilisent des suspensions de spores permettant une utilisation en routine. Or, certaines études *in vitro* tendent à montrer que les résultats diffèrent selon que l'on utilise des spores ou des filaments (cf. Ouraïni *et al.*, 2007). L'agent pathogène est sous forme de filaments et de conidies chez le malade. C'est pourquoi, pour les 2 extraits sélectionnés (voir tests par la suite), la sensibilité des dermatophytes aux extraits a été confirmée sur boîte de Pétri (mélange extrait + gélose) en y apposant un carré de mycélium. Les extraits ont été testés à 2,5 mg/ml, les concentrations utilisées pour les milieux solides sont nettement supérieures, estimées de 3 à 70 fois par Niewerth. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'en milieu liquide la surface de contact entre la substance antifongique et le microorganisme est plus grande. Les résultats sont exposés dans le tableau 7 ci-après.

Tableau 7 : Screening antifongique des extraits - Mycoses Superficielles [concentration minimale permettant le maximum d'inhibition en µg/ml (% d'inhibition associé)]

Plantes ↓	Souches →	<i>C.kr</i>	<i>C.a</i>	<i>C.p</i>	<i>C.g</i>	<i>C.ke</i>	<i>M.sp</i>	<i>S.dim</i>	<i>M.canis</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>T.interdigitale</i>	<i>T.rubrum</i>	<i>T.mentag</i>
<i>Acnistus arborescens</i> (Feuilles)	c-hexane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EtOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EtOH/Eau	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bursera simaruba</i> (Ecorce de tige)	c-hexane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EtOH	50 (100%)	50 (80%)	200 (100%)	200 (50%)	50 (100%)	500 (100%)	-	200 (100%)	200 (100%)	200 (100%)	200 (100%)	200 (100%)
	EtOH/Eau	50 (100%)	50 (80%)	200 (80%)	200 (50%)	50 (100%)	500 (50%)	-	-	200 (100%)	200 (100%)	200 (100%)	200 (100%)
<i>Cedrela odorata</i> (Ecorce de tige)	c-hexane	-	-	200 (50%)	200 (80%)	200 (80%)	-	-	-	200 (50%)	-	-	-
	EtOH	50 (100%)	200 (80%)	200 (80%)	200 (80%)	200 (80%)	-	-	-	200 (80%)	200 (100%)	200 (80%)	200 (80%)
	EtOH/Eau	50 (100%)	200 (80%)	200 (80%)	200 (80%)	200 (80%)	500 (50%)	-	-	200 (100%)	200 (100%)	200 (100%)	200 (100%)
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Ecorce de tige)	c-hexane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EtOH	-	-	-	50 (80%)	-	-	200 (90%)	-	-	200 (50%)	400 (80%)	-
	EtOH/Eau	-	-	-	50 (80%)	-	-	200 (80%)	-	-	-	400 (100%)	-
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Ecorce de racine)	EtOH	200 (80%)	200 (50%)	200 (80%)	200 (80%)	200 (80%)	-	200 (80%)	-	200 (50%)	200 (80%)	400 (80%)	-
	EtOH/Eau	-	-	-	-	-	-	200 (80%)	-	200 (50%)	200 (50%)	400 (50%)	-
<i>Evolvulus alsinoides</i> (Parties aériennes)	c-hexane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EtOH	200 (50%)	-	-	200 (50%)	-	-	-	-	200 (50%)	-	-	-
	EtOH/Eau	50 (100%)	-	200 (80%)	200 (50%)	200 (50%)	-	-	-	200 (50%)	-	400 (50%)	-
<i>Gliricidia sepium</i> (Feuilles)	c-hexane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EtOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EtOH/Eau	-	-	-	-	-	-	-	-	400 (80%)	-	400 (50%)	-
<i>Pisonia aculeata</i> (Parties aériennes)	c-hexane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EtOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EtOH/Eau	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pluchea carolinensis</i> (Feuilles)	c-hexane	200 (50%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EtOH	200 (100%)	-	200 (75%)	200 (80%)	200 (50%)	-	-	-	-	-	-	-
	EtOH/Eau	200 (100%)	200 (80%)	200 (80%)	200 (80%)	200 (100%)	500 (100%)	-	-	200 (50%)	400 (100%)	400 (100%)	400 (100%)
<i>Pluchea odorata</i> (Parties aériennes)	c-hexane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EtOH	-	-	-	200 (50%)	-	500 (50%)	-	-	-	-	-	-
	EtOH/Eau	200 (100%)	-	-	200 (50%)	-	500 (50%)	-	-	-	-	-	-
<i>Pluchea odorata</i> (Racines)	c-hexane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EtOH	200 (100%)	-	200 (80%)	200 (80%)	200 (50%)	-	-	-	200 (100%)	200 (50%)	-	-
	EtOH/Eau	200 (100%)	-	200 (80%)	200 (80%)	200 (80%)	-	-	-	-	-	-	-
<i>Senna bicapsularis</i> (Feuilles)	c-hexane	200 (50%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EtOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EtOH/Eau	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Griséofulvine ¹						Nt	-	8(100%)	0.25(100%)	4(100%)	16(100%)	4(100%)	
Fluconazole ¹		62,5(100%)	8(100%)	8(100%)	62,5(80%)	1(80%)	12,8(100%)	16(100%)	62,5(80%)	62,5(80%)	62,5(50%)	16(100%)	62,5(100%)

C.kr: *Candida krusei*, **C.a**: *Candida albicans*, **C.p**: *Candida parapsilosis*, **C.g**: *Candida glabrata*, **C.ke**: *Candida kefyr*, **M.sp**: *Malassezia* sp., **S.dim**: *Scytalidium dimidiatum*, **M.canis**: *Microsporium canis*, **T.tonsurans**: *Trichophyton tonsurans*, **T.interdigitale**: *Trichophyton interdigitale*, **T.mentag**: *Trichophyton mentagrophytes* - : Aucune inhibition observée à une concentration C ≤ 200 µg/ml pour les dermatophytes, 500 µg/ml pour *Malassezia* sp., 200 µg/ml pour les *Candida* sp. ¹: molécule de référence

BILAN & DISCUSSION

Parmi les 10 plantes testées, 8 d'entre elles ont révélé une activité *in vitro* sur plusieurs souches et confirment la qualité de la sélection. Parmi ces 8 plantes, 4 présentent une activité biologiquement intéressante à exploiter. Les plantes ne révélant que trop peu ou pas d'activité *in vitro*, incluent des plantes utilisées en médecine traditionnelle avec des résultats probants, nous pensons notamment au cas de *Senna bicapsularis* dont, contre toute attente, les extraits ne se sont pas révélés actifs lors de ce screening. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées quant à cette absence de réponse lors des tests *in vitro* :

1. La médecine traditionnelle utilise le jus des feuilles, dont la composition chimique est impossible à reproduire expérimentalement par solvant ainsi que les éventuelles associations et synergies de composés qui peuvent s'opérer naturellement.
2. La plante est utilisée fraîche en médecine traditionnelle. Lors de cette étude, pour des raisons de conservation, nous avons pris le parti de sécher les plantes. Cette étape préliminaire de séchage peut engendrer des altérations chimiques des composés et provoquer la perte de l'activité.
3. Les concentrations testées sont insuffisantes pour visualiser une activité. Nous avons pris le parti de sélectionner les extraits les plus actifs et la concentration maximale testée n'est pas suffisante pour cet extrait.
4. Les principes actifs apolaires ne sont que partiellement solubles dans ce test en milieu liquide. Il n'est pas exclu que la concentration nécessaire à l'activité d'un composé relativement apolaire ait été suffisante. Il s'agit d'une des limites de ce test. Cette remarque est applicable à tous les extraits c-hexaniques.

Bien souvent critiquée pour son manque de rationalité (doses non définies selon les calibres standardisés « modernes », potentielle toxicité, manque de cohérence, manque de concordance d'un lieu à un autre...) la médecine traditionnelle n'est guère valorisée dans le cadre de la recherche. Cette absence de validation *in vitro* des usages traditionnels est intéressante à souligner et permet, selon moi, de garder également un œil critique vis-à-vis de la validation scientifique, certes essentielle à l'aboutissement de projet tel que celui-ci mais qui en démontre aussi ses limites. En effet, l'absence d'activité *in vitro* n'est pas synonyme d'absence d'activité réelle chez le patient et *a contrario*, l'activité *in vitro* n'est pas garante d'une activité ultérieure chez le patient. Il est totalement impossible de reproduire dans leur intégralité les facteurs impliqués dans une interaction peau/champignon/antifongique ; nous ne pouvons que nous en approcher en élaborant des modèles (solvants et tests pharmacologiques) et il convient de toujours garder un œil critique vis-à-vis de nos résultats. Un résultat positif devra par conséquent toujours être validé par la suite sur le patient par la mise en place de tests cliniques. De plus, au cours de tests *in vitro*, d'une façon générale, dans un extrait brut, des interactions peuvent se produire et des phénomènes notamment de précipitation ou d'émulsion, peuvent interférer dans le résultat (faux positifs/négatifs). En conclusion, les caractéristiques de la technique d'analyse sont essentielles, l'opérateur devant s'assurer de sa sensibilité, de sa spécificité et de sa

reproductibilité. La fiabilité des résultats en dépend. De plus, l'isolement des composés actifs lorsque cela est possible permet de caractériser et de corroborer l'activité observée (*in vitro* ou sur l'Homme).

Parmi les 33 extraits testés, 18 extraits (correspondant à 7 plantes) se sont révélés actifs sur le genre *Candida*, 4 extraits (correspondant à 1 plante, 2 organes) se sont révélés actifs sur la souche de *Scytalidium*, 6 extraits (correspondant à 4 plantes) se sont révélés actifs sur la souche de *Malassezia* et 14 extraits (correspondant à 7 plantes) se sont révélés actifs sur les dermatophytes.

Analysons maintenant plus en détail les résultats biologiquement intéressants en fonction de la souche inhibée :

- **Activité « anti-*Candida* »**

4 plantes ressortent au vu des résultats obtenus :

- *Bursera simaruba* : Les extraits EtOH et EtOH/Eau permettent entre 80 et 100% d'inhibition dès 50 µg/ml sauf pour *C. parapsilosis* obtenus à 200 µg/ml.

- *Cedrela odorata* : Les extraits EtOH et EtOH/Eau permettent 80 à 100% d'inhibition de la souche à 200 µg/ml sauf pour *C. krusei* à 50 µg/ml.

- *Enterolobium cyclocarpum*-racines : L'extrait EtOH inhibe 50 à 80% de la croissance de la souche à 200 µg/ml.

- *Pluchea carolinensis* : Les extraits EtOH et EtOH/Eau, avec 80 à 100% d'inhibition obtenue à 200 µg/ml.

- **Activité « anti-dermatophytes »**

2 plantes ressortent au vu des résultats obtenus :

- *Cedrela odorata* : Les extraits EtOH et EtOH/Eau, avec 80 à 100% d'inhibition selon la souche hormis *M. canis* dont la croissance n'est pas inhibée.

- *Bursera simaruba* : extraits EtOH et EtOH/Eau, avec 80 à 100% d'inhibition selon la souche. Seul l'extrait EtOH de *Bursera simaruba* a permis d'inhiber la croissance de la souche *M. canis*.

- **Activité « anti-*Scytalidium* »**

Une seule plante révèle une activité contre cette moisissure : *Enterolobium cyclocarpum* que ce soit l'écorce de racine ou l'écorce de tige. L'inhibition est plus élevée avec l'écorce de tige, avec une inhibition de 90% pour l'extrait EtOH.

- **Activité « anti-*Malassezia* »**

2 plantes ressortent au vu des résultats obtenus :

- *Bursera simaruba* : L'extrait EtOH inhibe totalement la croissance de cette souche à 500 µg/ml.

- *Pluchea carolinensis* : Les extraits EtOH et EtOH/Eau inhibent la croissance fongique à 100% à 500 µg/ml.

Avant d'affiner les résultats par le calcul des concentrations minimales inhibitrices (CMI), deux remarques sont intéressantes à noter :

1. L'échelle de « résistance/sensibilité » qui correspond au classement des souches en fonction de leur résistance à un antifongique est différente selon les extraits. Ceci pourrait peut être s'expliquer par un mode d'action.

2. L'échelle de « résistance/sensibilité » des souches vis-à-vis du fluconazole généralement observée en routine, au niveau du laboratoire de mycologie du CHU de Lille, est dans l'ordre décroissant 1) *C. krusei*, 2) *C. glabrata* puis 3) *C. albicans* ou *C. kefyr* ou *C. parapsilosis*. Dans notre screening, *C. glabrata* et *C. kefyr* sont les souches les plus résistantes, ceci s'expliquant par le fait que les souches directement isolées de patients sont plus virulentes que les souches de collection. Les repiquages successifs de routine en laboratoire induisent la perte du caractère pathogène de virulence des différentes souches de microorganismes. Dans un screening d'activité de molécules ou d'extraits, la sélection de souches directement isolées de patients doit ainsi être privilégiée pour une détermination, non pas du caractère actif/non actif d'un extrait en soit, mais plutôt pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices réelle des extraits.

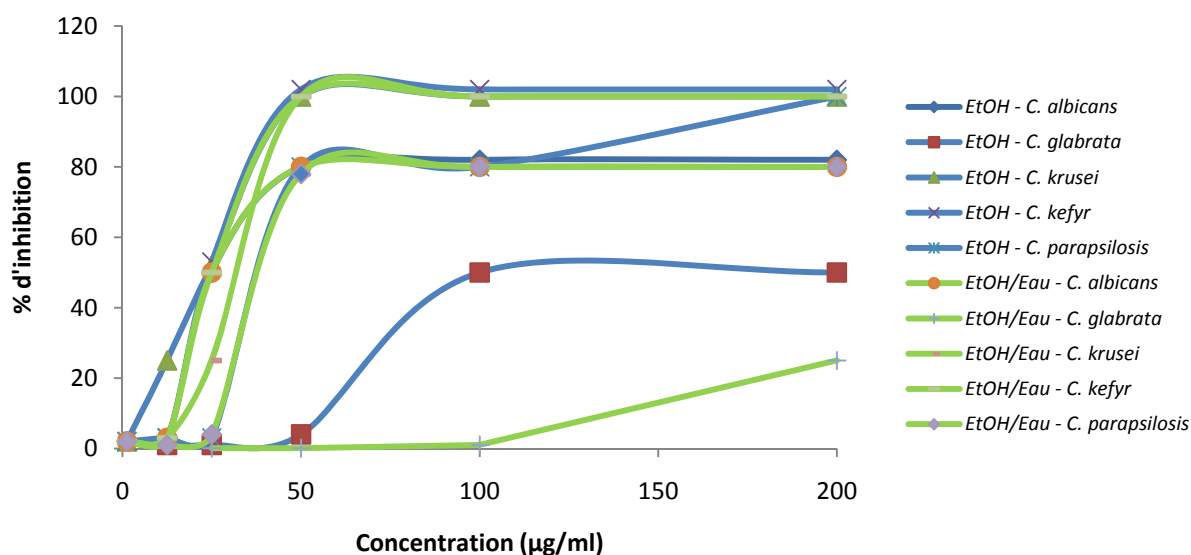
Afin de caractériser « pharmacologiquement » les extraits et de permettre à la fois la sélection du solvant d'extraction à savoir EtOH ou EtOH/Eau (1 :1, v/v) et de la concentration à laquelle l'extrait devra être intégré dans les formulations (dose efficace), les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont déterminées pour les extraits de *B. simaruba* et *C. odorata* vis-à-vis des dermatophytes et des *Candida*, pour les extraits d' *E. cyclocarpum* vis-à-vis de *Scytalidium* et pour les extraits de *P. carolinensis* et *B. simaruba* vis-à-vis de *Malassezia*. Afin de visualiser et comparer plus facilement l'activité en fonction du solvant d'extraction (EtOH ou EtOH/Eau), les courbes d'activités ont été établies quand cela était nécessaire.

CMI des extraits de *B. simaruba* et *C. odorata* vis-à-vis des *Candida* et des dermatophytes

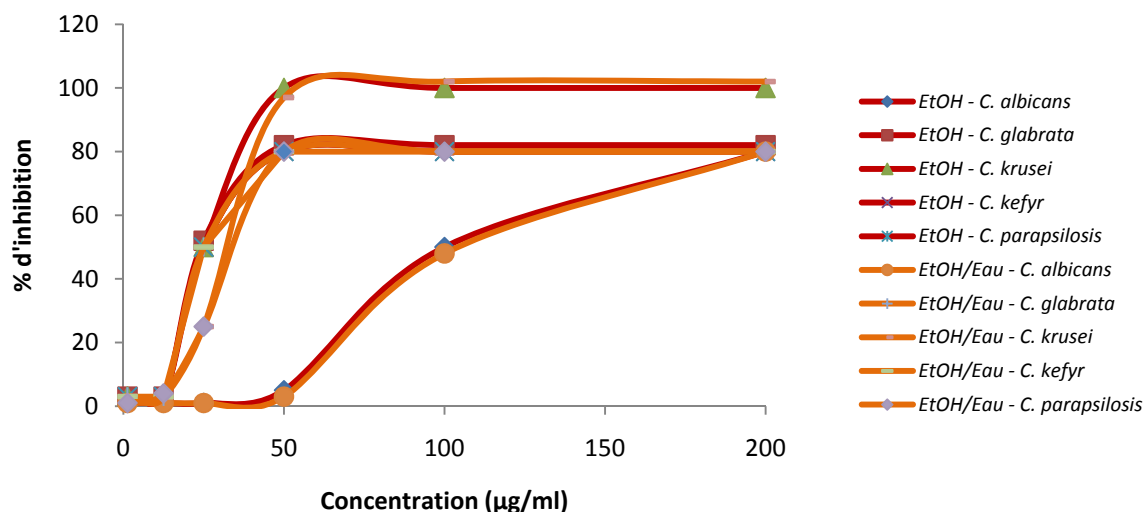
Tableau 8 : CMI des extraits de *B. simaruba* et *C. odorata* vis-à-vis des *Candida*

Souches	Plantes		Concentration (µg/ml) et % d'inhibition associé					
			200	100	50	25	12,5	1,25
<i>C. albicans</i>	<i>Bursera simaruba</i>	EtOH	80%	80%	80%	50%	NI	NI
		EtOH/Eau	80%	80%	80%	50%	NI	NI
	<i>Cedrela odorata</i>	EtOH	80%	50%	NI	NI	NI	NI
		EtOH/Eau	80%	50%	NI	NI	NI	NI
<i>C. glabrata</i>	<i>Bursera simaruba</i>	EtOH	50%	50%	NI	NI	NI	NI
		EtOH/Eau	50%	25%	NI	NI	NI	NI
	<i>Cedrela odorata</i>	EtOH	80%	80%	80%	50%	NI	NI
		EtOH/Eau	80%	80%	80%	50%	NI	NI
<i>C. krusei</i>	<i>Bursera simaruba</i>	EtOH	100%	100%	100%	50%	25	NI
		EtOH/Eau	100%	100%	100%	25%	NI	NI
	<i>Cedrela odorata</i>	EtOH	100%	100%	100%	50%	NI	NI
		EtOH/Eau	100%	100%	100%	25%	NI	NI
<i>C. kefyr</i>	<i>Bursera simaruba</i>	EtOH	100%	100%	100%	50%	NI	NI
		EtOH/Eau	100%	100%	100%	50%	NI	NI
	<i>Cedrela odorata</i>	EtOH	80%	80%	80%	50%	NI	NI
		EtOH/Eau	80%	80%	80%	50%	NI	NI
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Bursera simaruba</i>	EtOH	100%	80%	80%	NI	NI	NI
		EtOH/Eau	80%	80%	80%	NI	NI	NI
	<i>Cedrela odorata</i>	EtOH	80%	80%	80%	50%	NI	NI
		EtOH/Eau	80%	80%	80%	25%	NI	NI

NI : non inhibiteur



Graphique 1 : Courbe d'activité antifongique de *B. simaruba* vis-à-vis des *Candida*



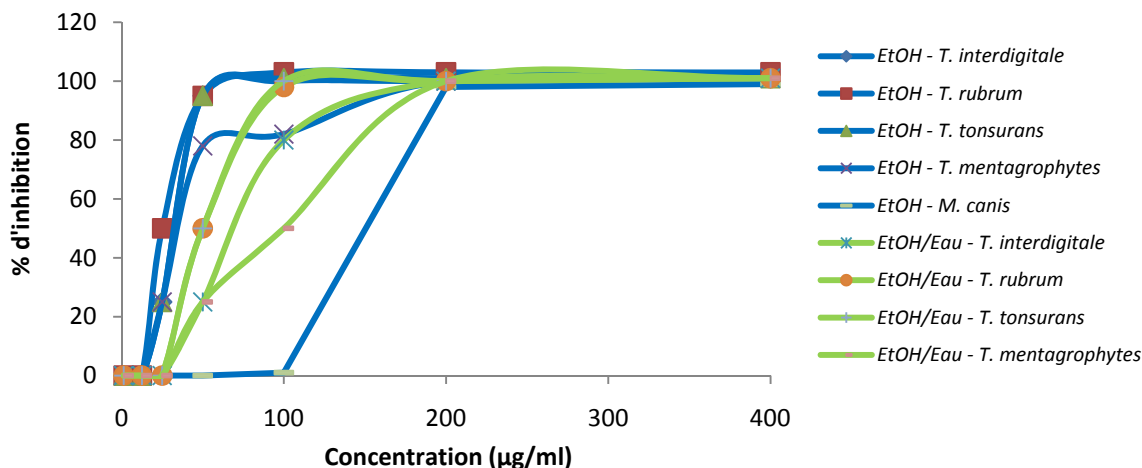
Graphique 2 : Courbe d'activité antifongique de *C. odorata* vis-à-vis des *Candida*

Que ce soit pour *B. simaruba* ou *C. odorata*, grâce aux courbes d'activités (graphiques 1 et 2) qui se superposent les unes aux autres, nous nous rendons compte que vis-à-vis des *Candida*, les extraits EtOH et EtOH/Eau ont globalement la même activité. La sélection sera fonction des activités vis-à-vis des dermatophytes.

Tableau 9 : CMI des extraits de *B. simaruba* et *C. odorata* vis-à-vis des dermatophytes

Souches	Plantes		Concentration (µg/ml) et % d'inhibition associé						
			400	200	100	50	25	12.5	1.25
<i>T. interdigitale</i>	<i>Bursera simaruba</i>	EtOH	100%	100%	100%	100%	25%	NI	NI
		EtOH/Eau	100%	100%	80%	25%	NI	NI	NI
	<i>Cedrela odorata</i>	EtOH	100%	100%	25%	NI	NI	NI	NI
		EtOH/Eau	100%	100%	25%	NI	NI	NI	NI
<i>T. rubrum</i>	<i>Bursera simaruba</i>	EtOH	100%	100%	100%	100%	50%	NI	NI
		EtOH/Eau	100%	100%	100%	50%	NI	NI	NI
	<i>Cedrela odorata</i>	EtOH	80%	80%	80%	50%	25%	NI	NI
		EtOH/Eau	100%	100%	80%	50%	NI	NI	NI
<i>T. tonsurans</i>	<i>Bursera simaruba</i>	EtOH	100%	100%	100%	100%	25%	NI	NI
		EtOH/Eau	100%	100%	100%	50%	NI	NI	NI
	<i>Cedrela odorata</i>	EtOH	80%	80%	50%	25%	NI	NI	NI
		EtOH/Eau	100%	100%	25%	NI	NI	NI	NI
<i>T. mentag*</i>	<i>Bursera simaruba</i>	EtOH	100%	100%	80%	80%	25%	NI	NI
		EtOH/Eau	100%	100%	50%	25%	NI	NI	NI
	<i>Cedrela odorata</i>	EtOH	80%	80%	50%	NI	NI	NI	NI
		EtOH/Eau	100%	100%	25%	NI	NI	NI	NI
<i>M. canis</i>	<i>Bursera simaruba</i>	EtOH	100%	100%	NI	NI	NI	NI	NI
		EtOH/Eau	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
	<i>Cedrela odorata</i>	EtOH	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
		EtOH/Eau	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

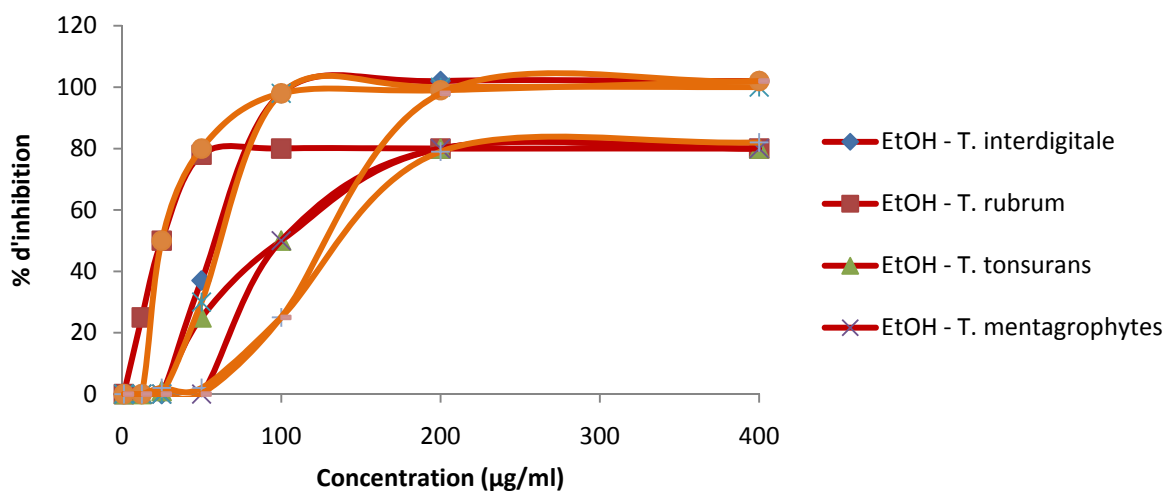
NI : non inhibiteur ; * *T. mentagrophytes*



Graphique 3 : Courbe d'activité antifongique de *B. simaruba* vis-à-vis des dermatophytes

L'extrait EtOH de *B. simaruba* (lignes bleues) est plus actif avec une CMI = 50 µg/ml que l'extrait EtOH/Eau (1 :1, v/v) (lignes vertes) ayant une CMI comprise entre 100 et 200 µg/ml selon les souches. De plus, seul l'extrait EtOH inhibe la souche de *M. canis* CMI = 200 µg/ml.

Bilan : L'extrait **EtOH** de *B. simaruba* est retenu avec une dose efficace de **200 µg/ml** pour une formulation ultérieure, celle-ci permettant à la fois une activité sur tous les *Candida* et dermatophytes.



Graphique 4 : Courbe d'activité antifongique de *C. odorata* vis-à-vis des dermatophytes

Contrairement à *B. simaruba*, c'est l'extrait EtOH/Eau (lignes oranges) qui permet d'obtenir le plus d'activité (entre 80 et 100%) et ce malgré une cinétique d'activité parfois plus lente que celle de l'extrait EtOH. Les CMI₈₀₋₁₀₀ varient entre 100 et 200 µg/ml en fonction des souches.

Bilan : L'extrait **EtOH/Eau** de *C. odorata* est retenu avec une dose efficace de **200 µg/ml** pour une formulation ultérieure, celle-ci permettant une activité à la fois sur tous les *Candida* et dermatophytes.

CMI des extraits d'*E. cyclocarpum* (racines et tiges) vis-à-vis de *Scytalidium dimidiatum*

Tableau 10 : Détermination des CMI des extraits d'*E. cyclocarpum* vis-à-vis de *Scytalidium*

Souche	Plantes et extraits	Concentration (µg/ml) et % d'inhibition associé									
		1000	800	600	400	200	100	50	10	1	
<i>Scytalidium</i>	<i>E. cyclocarpum</i> (Ecorce de tige)	EtOH	100%	100%	100%	90%	90%	80%	50%	25%	NI
		EtOH/Eau	nt	nt	nt	80%	80%	50%	50%	25%	NI
	<i>E. cyclocarpum</i> (Ecorce de racine)	EtOH	nt	nt	nt	80%	80%	50%	50%	NI	NI
		EtOH/Eau	nt	nt	nt	80%	80%	25%	25%	NI	NI

NI : non inhibiteur ; nt : non testé

Les extraits d'écorce de tige sont légèrement plus actifs que ceux réalisés à partir de l'écorce de racine permettant d'observer une faible activité (25%) à une concentration de 10 µg/ml. L'extrait le plus actif est l'extrait EtOH de l'écorce de tige avec une CMI₈₀ = 100 µg/ml et une CMI₁₀₀ = 600 µg/ml.

Bilan : L'extrait **EtOH** de l'**écorce de tige** est retenu avec une dose efficace de **600 µg/ml**.

CMI des extraits de *B. simaruba* et *P. carolinensis* vis-à-vis de *Malassezia* sp.

Tableau 11 : Détermination des CMI vis-à-vis de *Malassezia* des extraits de *B. simaruba* et *P. carolinensis*

Souche	Plantes	Concentration (µg/ml) et % d'inhibition associé						
		500	400	300	200	100	50	
<i>Malassezia</i>	<i>Bursera simaruba</i>	EtOH	100%	50%	NI	NI	NI	NI
	<i>Pluchea carolinensis</i>	EtOH/Eau	100%	100%	80%	50%	25%	NI

NI : non inhibiteur

L'extrait ayant la CMI la plus faible est l'extrait **EtOH/Eau** de ***P. carolinensis*** avec une CMI égale à **400 µg/ml**. De plus l'extrait montre une réponse dose-dépendante classique contrairement à l'extrait de *B. simaruba* dans lequel d'autres facteurs (synergie, cytotoxicité etc...) interviennent probablement.

Bilan : L'extrait EtOH/Eau de *P. carolinensis* est retenu avec une dose efficace = 400 µg/ml.

V- SELECTION DES EXTRAITS ②: CYTOTOXICITE DES EXTRAITS

Concernant les mycoses superficielles, les formulations antifongiques qui seront développées à partir des extraits seront à application topique. Nous nous sommes donc axés sur des tests *in*

in vitro basés sur des lignées cellulaires de peau avec une première lignée cellulaire HaCat de type kératinocytes, les cellules majoritaires de l'épiderme ainsi qu'une deuxième lignée cellulaire U937, correspondant à des monocytes, cellules circulantes du derme. Les tests de cytotoxicité ont été réalisés au sein de l'équipe du laboratoire de Pharmacognosie et Mycologie de l'Université de Rennes 1.

Les cytotoxicités des extraits choisis à savoir, les extraits EtOH de *B. simaruba*, EtOH/Eau de *C. odorata*, EtOH d'*E. cyclocarpum* et EtOH/Eau de *P. carolinensis* sont déterminées.

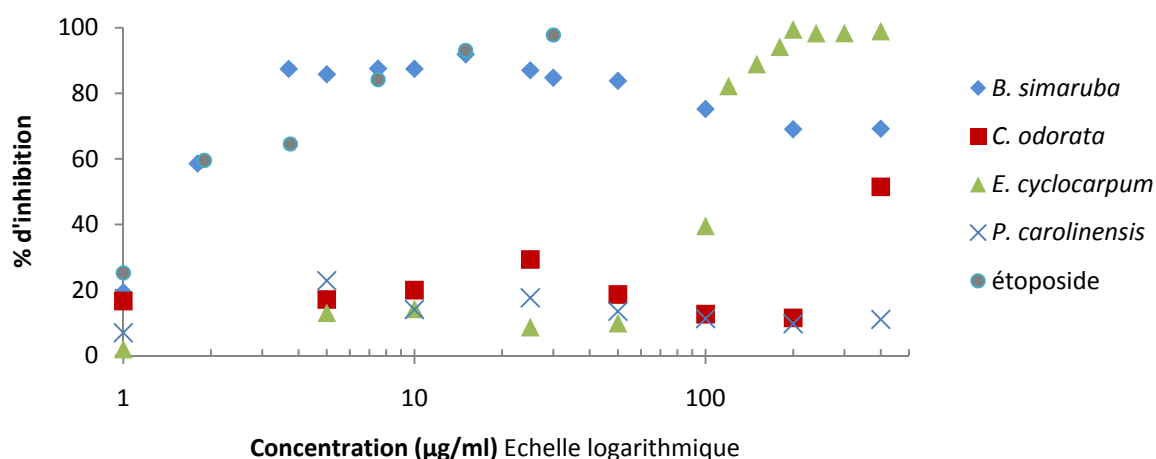
Pour cela, les cellules HaCat et U937 sontensemencées respectivement à 12 000 et 120 000 cellules/ml dans du milieu DMEM complet ou RPMI complet. Les extraits sont déposés en triplicate à différentes concentrations, entre 1 et 400 µg/ml, puis les microplaques sont incubées durant 48h. Le MTT, un sel de tétrazolium plus précisément le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, à l'origine de couleur jaune, est transformé par les deshydrogénases mitochondriales des cellules viables en formazan de couleur violette (cristaux insolubles). Cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules viables et mesurée par spectrophotométrie à 540 nm. Le % d'inhibition est alors calculé grâce au logiciel Biolise par la formule suivante : $\% \text{ cytotoxicité} = 100 - (\text{DO}_{\text{extrait}} / \text{DO}_{\text{témoin de croissance}}) \times 100$.

Grâce aux résultats, nous pouvons alors établir les courbes d'activité cytotoxique et déterminer la CI_{50} , concentration requise pour une inhibition à 50% des cellules *in vitro*, pour chaque extrait puis par comparaison avec les normes du laboratoire et la molécule de référence : l'étoposide, évaluer leurs caractères cytotoxiques. Le pourcentage d'extrait intégré dans la formulation finale doit permettre de conserver l'activité tout en étant le moins toxique possible.

RESULTATS & DISCUSSION

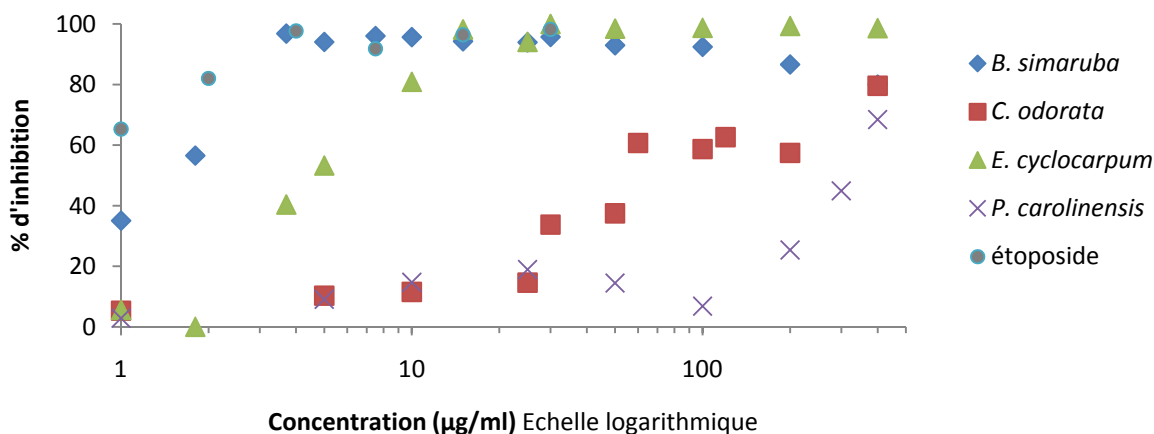
Les courbes d'activité cytotoxique sur les cellules HaCat et U937 sont présentées ci-après.

Graphique 5 : % d'inhibition des extraits sur les cellules HaCat en fonction de leurs concentrations



Les extraits ne présentent pas du tout la même cinétique d'activité. L'extrait de *B. simaruba* est le plus cytotoxique des quatres, observant une cinétique proche de la molécule de référence. L'extrait d'*E. cyclocarpum* est 100 fois moins cytotoxique. L'extrait de *C. odorata* présente quant à lui une faible cytotoxicité et celui de *P. carolinensis* est considéré comme non cytotoxique.

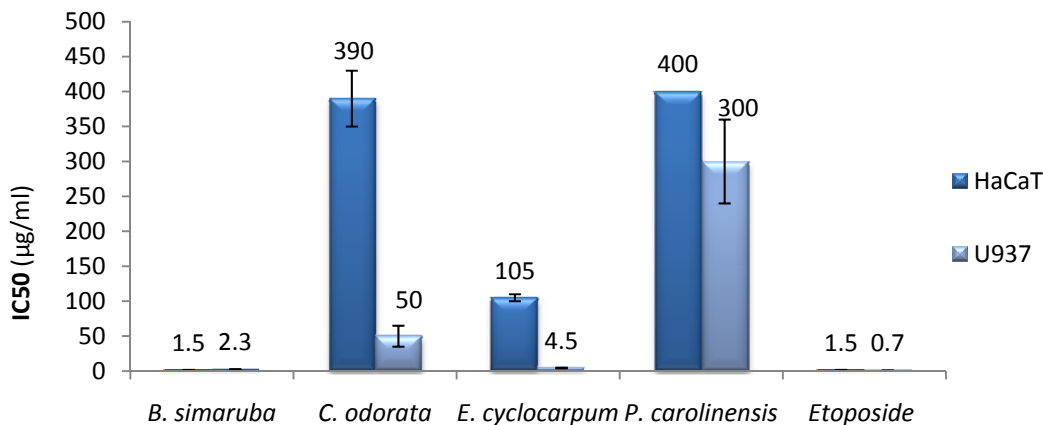
Graphique 6 : % d'inhibition des extraits sur les cellules U937 en fonction de leurs concentrations



De même, *B. simaruba* est l'extrait le plus cytotoxique ayant une courbe effet/dose proche de la cinétique de l'étoposide. Suit *E. cyclocarpum* 10 fois moins cytotoxique. Les extraits de *C. odorata* et *P. carolinensis* sont cette fois moyennement cytotoxiques sur les cellules U937.

Grâce à ces courbes d'activités, nous pouvons alors en déduire les CI_{50} de chacun des extraits :

	HaCat CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)		U937 CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
<i>B. simaruba</i>	1,5	0,3	2,3	0,5
<i>C. odorata</i>	390,0	40,0	50,0	15,0
<i>E. cyclocarpum</i>	105,0	5,0	4,5	0,5
<i>P. carolinensis</i>	400,0	-	300,0	60,0
Etoposide	1,5	0,3	0,7	0,2



Graphique 7 : Cytotoxicité des extraits

Deux éléments permettent de conclure : l'échelle de cytotoxicité et l'index thérapeutique.

Echelle de cytotoxicité

Selon les normes adoptées au sein du laboratoire de Pharmacognosie et Mycologie de Rennes, un extrait peut être classé selon sa CI_{50} comme suit :

$CI_{50} < 25 \mu\text{g/ml}$: extrait cytotoxique

$25 < CI_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$: extrait à activité intermédiaire

$50 < CI_{50} < 75 \mu\text{g/ml}$: extrait de faible activité

$CI_{50} > 75 \mu\text{g/ml}$: extrait non cytotoxique

En fonction des lignées cellulaires utilisées les bornes peuvent être modulées.

Index thérapeutique

L'index thérapeutique est une comparaison de la dose d'un agent thérapeutique qui cause l'effet actif, à celle qui cause l'effet toxique. Le calcul est établi par le rapport de la dose toxique d'une drogue pour 50% de la population cellulaire (CI_{50}) divisé par la dose minimale efficace vis-à-vis de 50% de la population fongique (DE_{50}). Cet index thérapeutique (IT) permet d'apprécier la sélectivité de l'extrait vis-à-vis des champignons et des cellules HaCat. Plus l'index thérapeutique est important plus le produit est sélectif de la cellule fongique par rapport à la cellule « humaine ».

Extrait EtOH de *B. simaruba* vis-à-vis des *Candida* et dermatophytes

La cytotoxicité reste élevée pour un extrait brut ; elle est comparable à celle obtenue avec la molécule de référence. L'extrait EtOH est considéré comme ayant une cytotoxicité intermédiaire par comparaison aux normes définies. Ce résultat confirme l'élimination de cet extrait comme traitement contre le Pityriasis versicolor (LOTA), la formulation devant être étalée de façon répétée sur une peau glabre. Cependant, il est un bon candidat pour le traitement des onychomycoses très difficiles à soigner. Les *Candida* et le genre *Trichophyton* sont responsables de ces dernières. La dose efficace DE_{50} est égale à $100 \mu\text{g/ml}$ ¹⁷. L' IT_{HaCat} et l' IT_{U937} sont proches de 0. Il n'y a aucune sélectivité entre la cellule fongique et les cellules « humaines ». Il s'agit d'un extrait à application topique, ce qui n'en fait pas un résultat dommageable en soit mais une certaine vigilance, quant à d'éventuels effets secondaires et à la fréquence d'utilisation, devra être étudiée plus en détail lors des tests cliniques.

Extrait EtOH/Eau de *C. odorata* vis-à-vis des *Candida* et dermatophytes

Cet extrait n'est pas considéré comme toxique pour les cellules de la peau, c'est donc un bon candidat antifongique. La DE_{50} varie selon les espèces entre 50 et $100 \mu\text{g/ml}$, soit un IT_{HaCat} compris entre 3,9-7,8 et IT_{U937} compris entre 0,5-1. Cet extrait présente une très faible sélectivité pour les cellules HaCat. La cytotoxicité sur les cellules circulantes est supérieure à celle sur cellules adhérentes.

¹⁷ *M.canis* présente la DE_{50} la plus élevée, cette valeur a été retenue pour le calcul de l'IT.

Extrait EtOH d'*E. cyclocarpum* (écorce de tige) vis-à-vis de *Scytalidium*

La DE_{50} est égale à 50 µg/ml soit un IT égal à 50 pour les cellules HaCat et 0,09 pour les cellules U937. La cytotoxicité sur les cellules circulantes est également supérieure à celle sur cellules adhérentes. Cet extrait présente ainsi une sélectivité pour les cellules HaCat, ce qui est une bonne caractéristique et qui confirme la sélection de cet extrait pour sa caractérisation ultérieure.

Extrait EtOH/Eau de *P. carolinensis* vis-à-vis de *Malassezia*

Cet extrait ne présente aucune cytotoxicité vis-à-vis des cellules testées. Le **LOTA** étant une maladie de la peau glabre, cette caractéristique est excellente pour l'élaboration d'un antifongique à passer sur l'ensemble du corps.

VI – SELECTION DES EXTRAITS ③ : BILAN

Au regard des résultats, nous avons sélectionné quatre extraits correspondant aux plantes suivantes :

MYCOSES SUPERFICIELLES

- ***Bursera simaruba* L. et *Cedrela odorata* L.** pour leurs spectres d'activité anti-*Candida* et anti-dermatophytes
- ***Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.** pour son activité anti-*Scytalidium*
- ***Pluchea carolinensis* (Jacq.) G. Don.** pour son activité anti-*Malassezia*

PNEUMOCYSTOSE

- ***Cedrela odorata* L.**

Pour conclure ce chapitre, une réflexion s'impose. Malgré la détection de nombreux composés potentiellement biologiquement actifs en CCM et l'évaluation de l'activité biologique, il est important d'être conscient que l'activité d'un extrait brut dépend de deux paramètres : l'activité intrinsèque des produits actifs et leur quantité relative dans l'extrait. L'activité d'un extrait brut peut aussi bien être le reflet d'une faible quantité de constituants très actifs que d'une grande quantité de constituants peu actifs. L'isolement des composés actifs peut donc s'avérer fastidieux voire non productif et ne garantit pas forcément d'observer une activité antifongique moléculaire importante une fois les composés isolés. Cette démarche d'isolement est développée dans le chapitre suivant.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) - **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi** - Approved standard-second edition. CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2008.

FAVIER, 2006

Stress anti-oxydant et pathologies humaines

Annales Pharmaceutiques Françaises, 64, 390-396

NIEWERTH M., SPLANEMANN V., KORTING HC., RING J., ABECK D., 1998

Antimicrobial susceptibility testing of dermatophytes-comparison of the agar macrodilution and broth microdilution tests

Chemotherapy, 44(1), 31-35

OURAINI D., AGOUMI A., ISMAILI-ALAOUI M., ALAOUI K., CHERRAH Y., ALAOUI M.A., BELABBAS M.A., 2007

Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Mentha pulegium* L., comparée aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques

Phytothérapie, 5(1), 6-14

**PARTIE IV. ISOLEMENT DES COMPOSES
ACTIFS**

I- ACTIVITE ANTIFONGIQUE de *Cedrela odorata*

A- Isolement des composés actifs vis-à-vis de *Pneumocystis jirovecii*

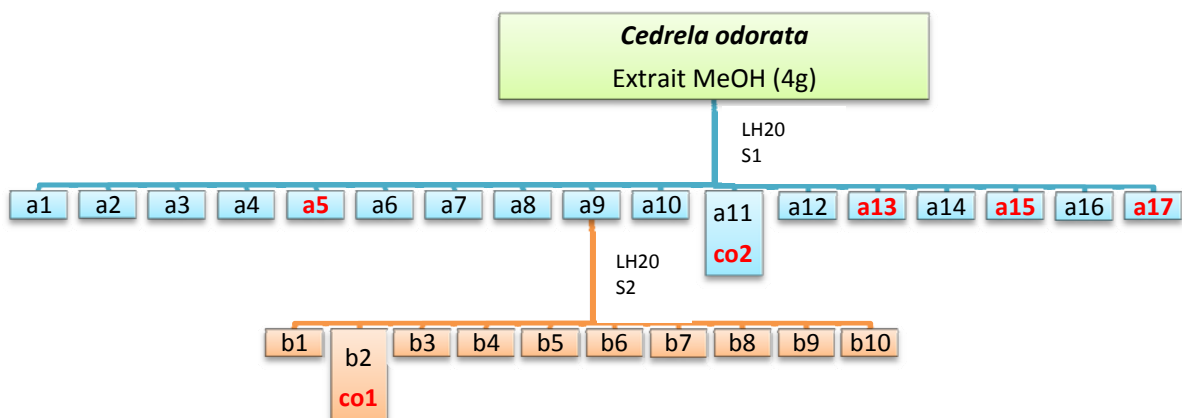
Le screening phytochimique des extraits c-hexane, EtOH et EtOH/Eau (1:1, v/v) sur CCM permet de constater la présence en grande quantité de tanins dont probablement des momomères de catéchine ou son isomère l'épicatéchine dont le Rf des solutions témoins correspond. Le pourcentage d'inhibition de l'extrait est constant de 99 à 100% quel que soit le solvant d'extraction, parallèlement, la présence de ce type de composés tanniques est constatée dans les 3 extraits y compris dans l'extrait c-hexanique et pourrait être responsable de l'activité. Pour étudier cette hypothèse nous procédons à l'extraction en plus grande quantité de la plante puis à son fractionnement.

Extraction

L'écorce de tige de *Cedrela odorata* (1,2 kg) est broyée et extraite à température ambiante successivement avec du dichlorométhane (3 x 5 L) et du méthanol (3 x 5 L). L'extrait au dichlorométhane est mis à sec (m = 21,4 g soit un rendement de 1,8%). L'extrait méthanolique est alors réduit au maximum sous vide puis lyophilisé (m = 84,0 g, soit un rendement de 6,7%).

Fractionnement

L'extrait méthanolique est dans un premier temps fractionné sur une CC de silice mais des réactions de fixations irréversibles sont constatées ; 4 g sont alors fractionnés sur gel de Sephadex LH-20 (40 x 4 cm) qui est mieux adapté aux composés de nature polaire et évite ces phénomènes. Le solvant d'élution S1 est un gradient MeOH/Eau 30% à 100% (tubes 1 à 104) puis acétone 70% (tubes 105 à 201). Après regroupement, 18 fractions sont obtenues grâce à ce support. La fraction a11 contient **co2** pur (166 mg). La fraction a9 (316,6 mg) est séparée par CC sur Sephadex LH-20 (32 x 2,5 cm) pour donner 10 fractions dont la fraction b2 (227,5 mg) contenant **co1** pur (227,5 mg). Le gradient d'élution S2 utilisé est le suivant : EtOH 100%, puis EtOH/MeOH 80:20 (v/v), EtOH/MeOH 50:50 (v/v), MeOH 100 %.



Composé **co1**

Le composé **co1** est isolé sous forme de poudre de couleur beige clair, il se colore en vert lorsqu'il est révélé sur CCM avec le réactif spécifique des tanins, le DMACA et rouge-orangé par l'anisaldéhyde. Le spectre ESI-MS en mode négatif définit un ion pseudomoléculaire à m/z 289 $[M-H]^-$. D'après le spectre de RMN J -mod, ce composé contient 15 carbones dont 7 quaternaires, 7 CH et 1 CH_2 . L'analyse des spectres de RMN 1H , J -mod, HSQC, COSY et HMBC nous permet d'élucider cette structure comme étant la (+)-catéchine.

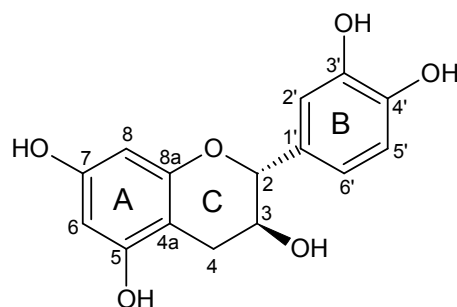


Figure 6 : composé **co1**

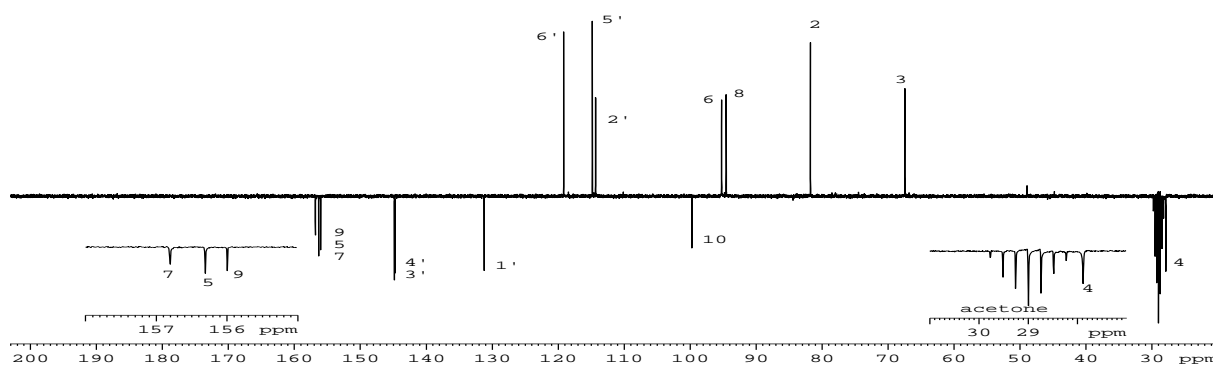


Figure 7 : Spectre de RMN J -mod $[CO(CD_3)_2, 300\text{ MHz}]$

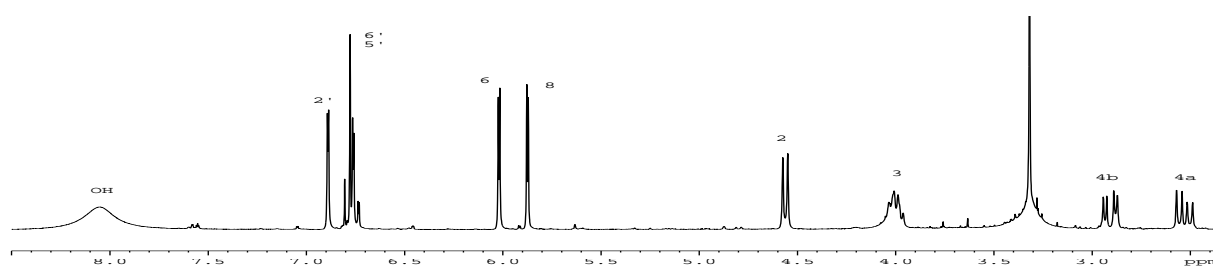


Figure 8 : Spectre de RMN 1H $[CO(CD_3)_2, 75\text{ MHz}]$

Le spectre de RMN 1H révèle 2 régions distinctes :

La première correspond aux protons aliphatiques allant de 2,53 à 4,56 ppm. Les signaux à δ_H 4,56 (1H ; d ; 7,6 Hz), δ_H 4,00 (1H ; m), δ_H 2,53 (1H ; dd ; 8,6 ; 16,0 Hz) et δ_H 2,90 (1H ; dd ; 5,7 ; 16,0 Hz) sont caractéristiques du noyau C des structures de type flavan-3-ol. La région aromatique s'étalant de 5,87 à 6,84 ppm, nous révèle un système ABX : δ_H 6,84 (1H ; d ; 1,9 Hz) ; δ_H 6,76 (1H ; d ; 8,2 Hz) et δ_H 6,72 (1H ; dd ; 1,9 ; 8,2 Hz) nous orientant vers une double

substitution du cycle B en C₃ et C₄. Un système de doublets à δ_H 5,87 (1H ; d ; 2,3 Hz) et δ_H 6,01 (1H ; d ; 2,3 Hz) suggère une double substitution du cycle A en C₅ et C₇.

L'analyse des spectres *J*-mod, HSQC, COSY et HMBC nous suggère deux hypothèses structurales : la (+)-catéchine ou son isomère la (-)-épicatéchine. La valeur de la constante de couplage ³J des protons H₂ et H₃ permet de discriminer les deux structures. Dans le cycle pyrane C, une constante de couplage *J*₂₋₃ *trans* est comprise entre 7 et 10 Hz, bien plus élevée qu'une *J*₂₋₃ *cis*.

Cette règle est valable pour les catéchines ainsi que pour la plupart des flavanes substitués en C₄, pour lesquels le noyau catéchol B se trouve en position équatoriale (la plus probable selon Porter *et al.*, 1986).

En effet, l'introduction d'un substituant en C₄ augmente fortement la préférence pour une disposition équatoriale du cycle B. Elle favorise également la conformation *sofa* pour la (+)-catéchine (Porter *et al.*, 1986). Cependant une inversion du cycle pyrane C, si le noyau catéchol B a une disposition axiale préférentielle, peut induire des constantes de couplage *trans* sensiblement proches de celles de la stéréochimie *cis*.

Dans notre cas, le doublet à 4,56 ppm possède une *J*₂₋₃ = 7,6 Hz, ce qui nous permet de conclure à la (+)-catéchine.

Tableau 12 : Attributions et corrélations des signaux de RMN du composé **co1** [CO(CD₃)₂]

n°	δ_c (ppm),mult.		δ_H en ppm (mult., J(Hz))	COSY corr
2	81,9	CH	4,56 (d; 7,6 Hz)	4,00; 6,84
3	67,6	CH	4,00 (m)	4,56; 2,53; 2,90
4	28,8	CH ₂	4a : 2,53 (dd; 8,6; 16,0 Hz) 4b : 2,90 (dd; 5,7; 16,0 Hz)	2,90; 4,00 2,53; 4,00
5	156,3	Cq		
6	95,2	CH	6,01 (d; 2,3 Hz)	
7	156,8	Cq		
8	94,6	CH	5,87 (d; 2,3 Hz)	
9	156,0	Cq		
10	99,74	Cq		
1'	131,5	Cq		
2'	114,9	CH	6,84 (d; 1,9 Hz)	4,56
3'	144,8	Cq		
4'	144,8	Cq		
5'	114,3	CH	6,76 (d; 8,2 Hz)	
6'	119,2	CH	6,72 (dd; 1,9; 8,2 Hz)	

Composé co2

Ce composé réagit également au DMACA par une coloration bleu-vert sur CCM. Il est de couleur plus foncée que **co1** tirant vers un marron rougeâtre. Ceci nous suggère l'existence d'un degré de condensation chez ce composé, les tanins condensés étant de plus en plus rougeâtres en se polymérisant.

La classe des tanins est composée de monomères (cf. **co1**), d'oligomères (2 à 3 unités) et de polymères pouvant être très complexes. Les tanins condensés sont appelés proanthocyanidols ou proanthocyanidines. Leur classification dépend du nombre d'unités et du type de liaisons engagées.

Deux types de dimères sont à distinguer selon la nature de la liaison interflavanique.

- Les proanthocyanidines de type B ($C_{30}H_{26}O_{13}$), constitués de deux unités de (+)-catéchine et/ou (-)-épicatéchine liés en C₄-C₈ (B1 à B4) ou C₄-C₆ (B5 à B8).
- Les proanthocyanidines de type A ($C_{30}H_{24}O_{12}$), dimères possédant en plus de la liaison interflavanique, une liaison éther C₅-C₂ ou C₇-C₂.

De même, deux types de trimères sont à distinguer :

- Les proanthocyanidines de type C, constituées de deux liaisons interflavanes de type B
- Les proanthocyanidines de type A, constituées d'une liaison interflavane de type B et l'autre de type A.

Les polymères peuvent compter jusqu'à 50 unités complémentaires. Les plus répandus étant des poly-épicatéchols et des co-polymères de procyanidol-prodelphinidol.

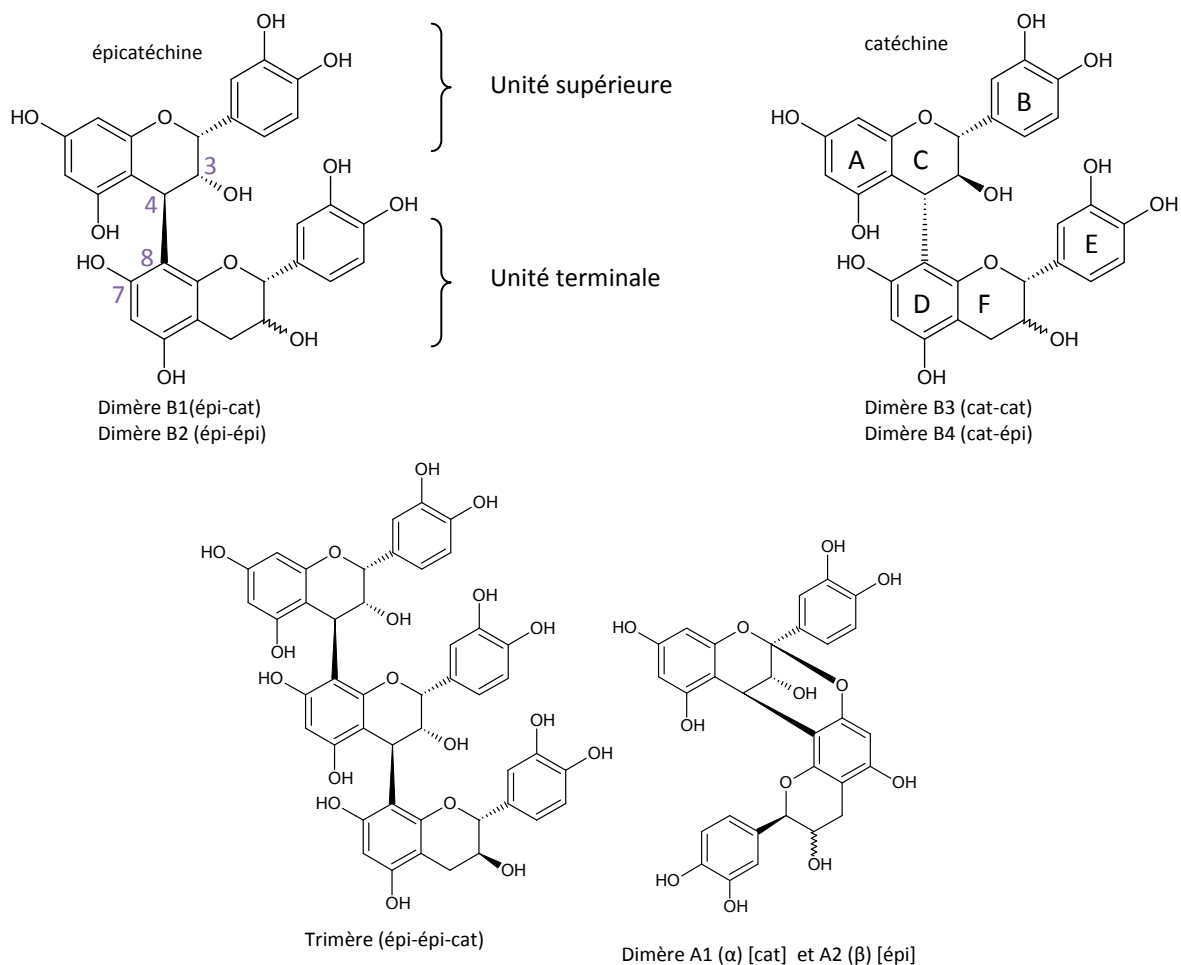
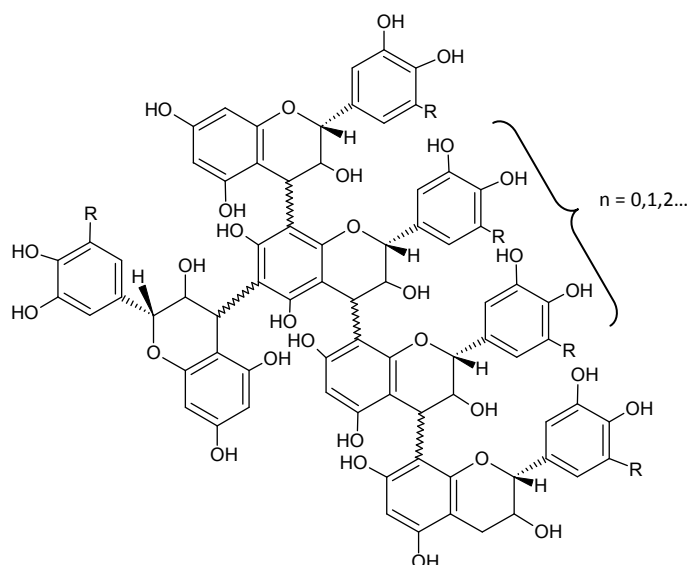


Figure 9 : Tanins condensés



Proanthocyanidines condensées R = OH: Prodelphidine ; R = H: Procyanidine

Figure 9 (suite) : Tanins condensés

Le spectre ESI-MS du composé **co2**, nous permet de nous orienter vers un dimère de proanthocyanidine de type B avec un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à $m/z = 577$ est en accord avec une formule brute $C_{30}H_{26}O_{13}$.

Les dimères de proanthocyanidines présentent en solution des isoméries de rotation autour de la liaison interflavane C_4-C_6 ou C_4-C_8 , caractérisées par l'angle dièdre $C_3-C_4-C_8-C_7$ (Foo et Porter, 1983 ; Fletcher *et al.*, 1977). Ceci se traduit par l'existence de signaux dupliqués ou superposés sur les spectres de RMN.

Concernant les dimères B1 à B4, deux mécanismes de conformation influent sur leurs structures 3D :

- La conformation du cycle catéchol (C ou F) oscille entre 2 états où le groupement 2-aryl est en position pseudo-équatoriale ou axiale. Il a été montré que la position pseudo-équatoriale est largement favorisée pour l'unité supérieure lorsque l'unité terminale adopte une position équatoriale dans les dimères étudiés à l'état natif ou une position axiale dans les dérivés acétylés.

- La liaison interflavanique (C_4-C_8) diminue les échanges de rotation à cause des interactions stériques. Deux rotamères sont observés à l'échelle du temps nécessaire à l'enregistrement des spectres de RMN, une conformation compacte où les deux groupes aryle se font face [caractérisé par un angle dièdre $C_{4a}(A)-C_4(C)-C_8(D)-C_{8a}(D)$ de $+98^\circ$] et une autre étendue où les deux groupes sont opposés [caractérisés par un angle dièdre $C_{4a}(A)-C_4(C)-C_8(D)-C_{8a}(D)$ de -81°], dans un ratio différent selon le dimère. Dans la plupart des cas, la conformation compacte est privilégiée (cf. figure 19). L'énergie nécessaire à cette rotation est plus ou moins haute et se traduit par des échanges entre les deux formes plus ou moins rapides. Les échanges sont plus rapides avec les dimères B1 et B2 qui possèdent une unité supérieure épicatechine (liaison 2,3 *cis*), contrairement aux dimères B3 et B4 qui possèdent une unité supérieure catéchine (liaison

2,3 *trans*). Le ratio entre les deux formes est également dépendant de la nature du dimère et du solvant.

La structure du composé **co2** a été mise en évidence par l'étude des spectres de RMN ^1H , *J*-mod, HSQC, COSY et HMBC et par comparaison avec les données de la littérature (de Bruyne *et al.*, 1996 ; Tarascou *et al.*, 2006), il s'agit du dimère B3.

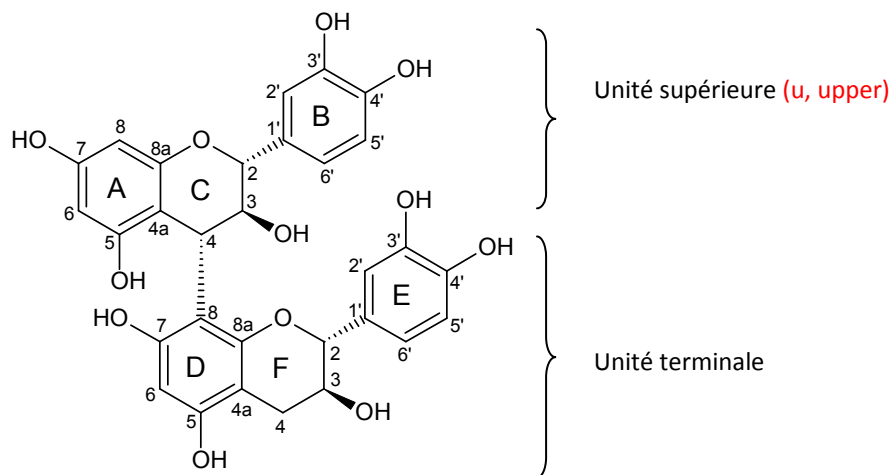


Figure 10 : composé **co2**

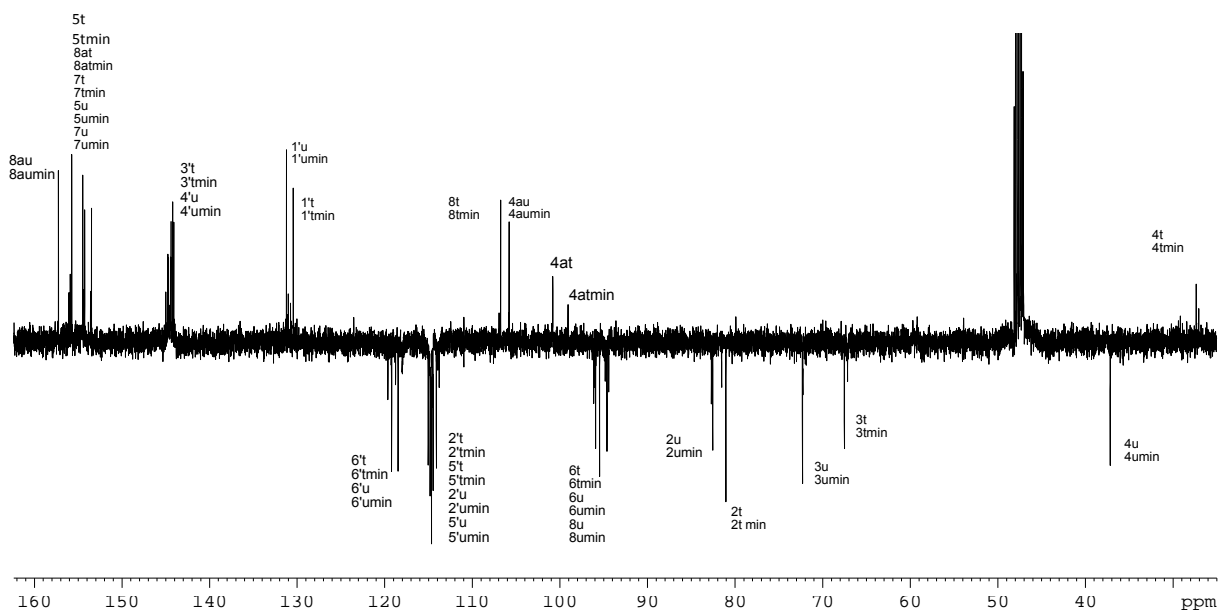


Figure 11 : Spectre de RMN *J*-mod (CD_3OD , 125 MHz)

Pour l'isomère minoritaire l'abréviation (min) est rajoutée aux signaux associés.

Sur le spectre *J*-mod, 12 signaux allant de 27,1 à 82,7 ppm sont dus aux carbones aliphatiques : C_2 , C_3 et C_4 des unités supérieure et terminale du rotamère majoritaire et du rotamère minoritaire. Les 2 carbones CH_2 correspondant aux C_4 des unités terminales (t) auront le déplacement chimique le plus faible. Les signaux à 27,1 et 27,4 ppm sont ainsi attribués aux C_4 des unités

terminales (t) des deux rotamères. Par déduction, les signaux à 37,1 et 37,2 sont attribués aux C₄ des unités supérieures (u) de chacun des rotamères.

Les signaux les plus déblindés sur le spectre *J*-mod, δ_C allant de 144,1 à 144,7 et δ_C allant de 153,5 à 157,3 correspondent aux carbones phénoliques 3', 4' et 5, 7 de chaque unité flavanyl, respectivement, exception faite des 2 carbones 8a de chaque rotamère.

Le reste des signaux quaternaires, δ_C allant de 99,0 à 106,9 et δ_C allant de 130,4 à 131,2 correspondent aux carbones 1', 4a et le carbone 6 ou 8 intervenant dans la liaison flavanique. En conséquence, les résonances des CH aromatiques se trouvent à δ_C 94,4-96,1 ; 113,8-115,0 et 118,5-119,6 et correspondent aux carbones C₆, C₈, C_{2'}, C_{5'} et C_{6'}.

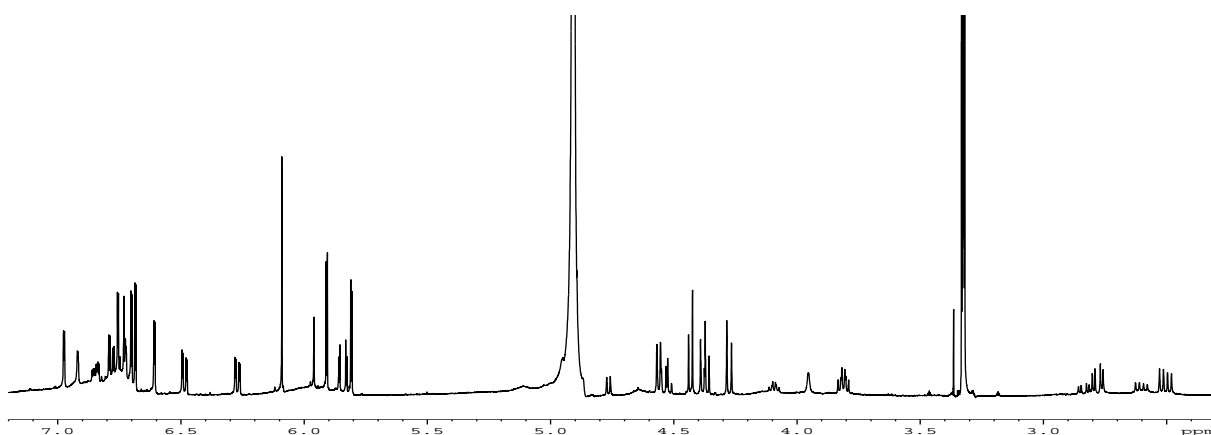


Figure 12 : Spectre de RMN ¹H du composé **co2** (CD₃OD, 500 MHz)

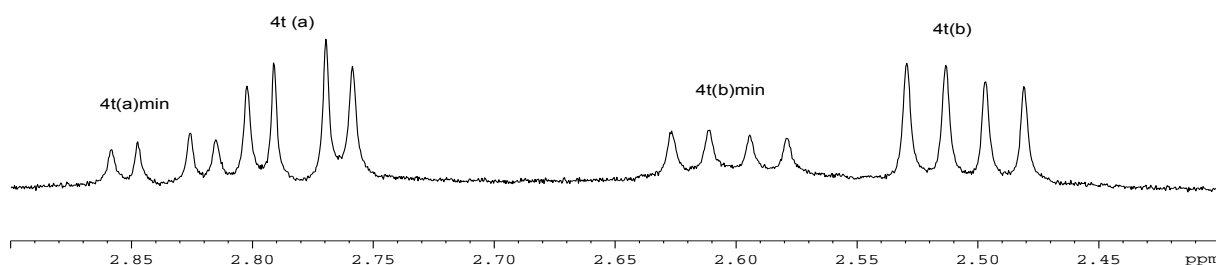


Figure 13 : Agrandissement 1 du spectre de RMN ¹H du composé **co2** (CD₃OD, 500 MHz)

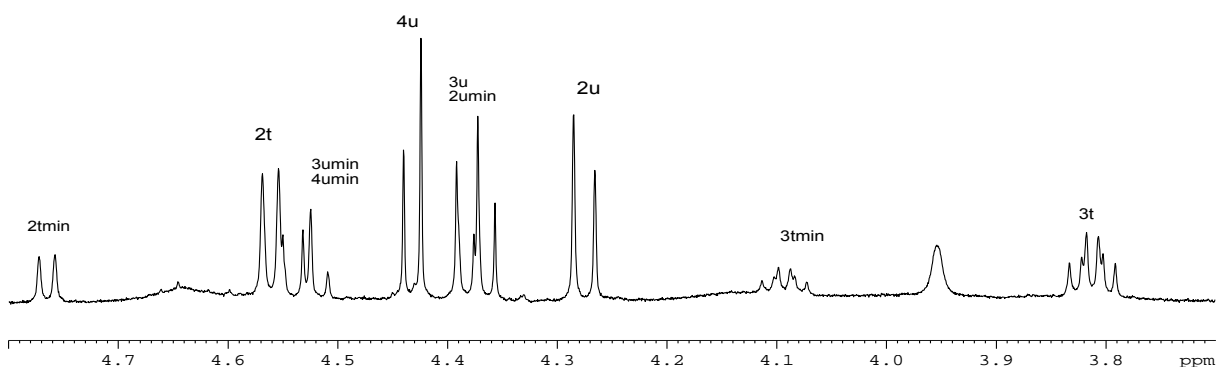


Figure 14 : Agrandissement 2 du spectre de RMN ¹H du composé **co2** (CD₃OD, 500 MHz)

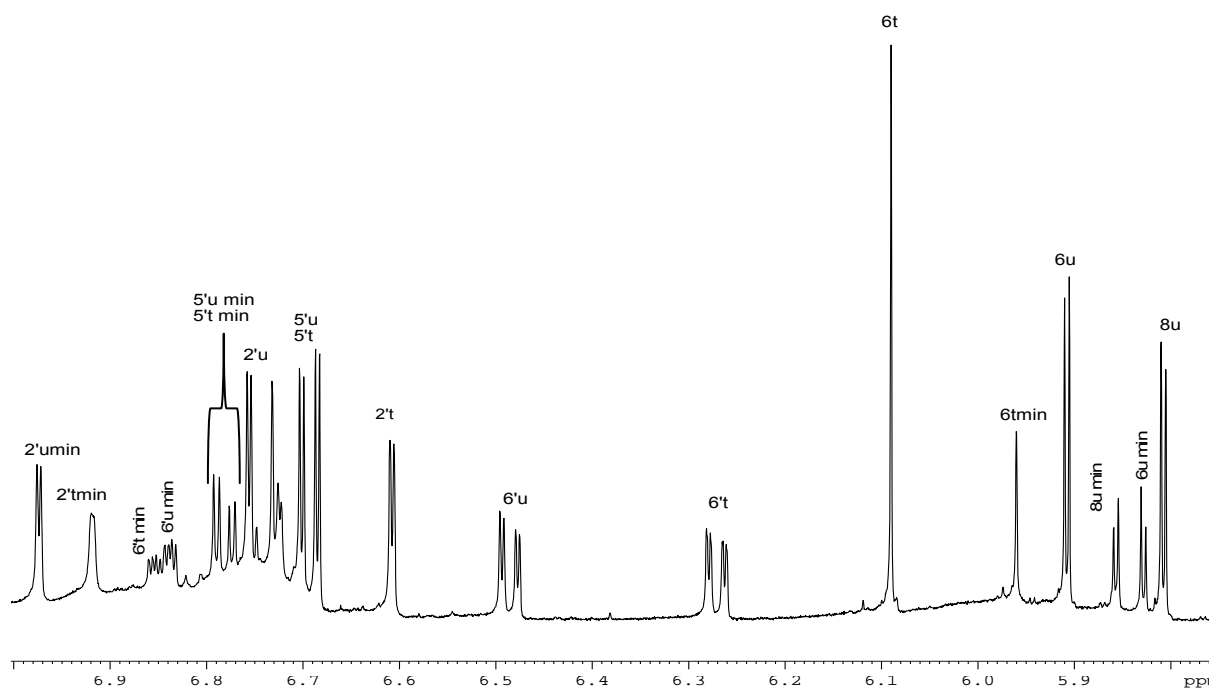


Figure 15 : Agrandissement 3 du spectre de RMN ^1H du composé **co2** (CD_3OD , 500 MHz)

Sur le spectre de RMN ^1H , tous les signaux vont par paires ; dans les régions riches en signaux, ils ne sont pas toujours voisins. Il y a un ratio constant d'intensité 70 : 30 entre les paires de pics validant l'existence de deux rotamères.

Les données HSQC, COSY, HMBC et TOCSY sélectif ont été employées afin de permettre l'élucidation structurale de **co2**.

Le spectre HSQC montre les corrélations :

- entre le C4t du rotamère minoritaire à δ_{C} 27,1 avec deux doublets dédoublés à δ_{H} 2,60 ($J = 8,2$ Hz et 16,3 Hz) et 2,84 ($J = 5,6$ et 16,3 Hz), il s'agit des deux protons α et β H4t min.
- entre le C4t du rotamère majoritaire à δ_{C} 27,4 avec les deux doublets dédoublés à 2,77 ($J = 5,8$ et 16,3 Hz) et 2,51 ($J = 8,2$ et 16,3 Hz)), il s'agit des deux protons α et β H4t.

Sur le spectre COSY :

- H4t α δ_{H} 2,51 corrèle avec H4t β δ_{H} 2,77. L'ensemble corrèle avec un ddd à δ_{H} 3,82 (5,8 ; 7,8, 13,0 Hz) qui corrèle lui-même avec un signal à δ_{H} 4,57 ($J = 7,8$ Hz). Le signal à δ_{H} 3,82 correspond à H3t et le doublet à δ_{H} 4,57 à H2t.
- De la même manière les signaux à δ_{H} 2,62 ; 2,84 ; 4,1 (ddd, $J = 5,8$; 7,8 ; 13,0 Hz) et δ_{H} 4,77 (d, $J = 7,8$ Hz) sont attribués à H4t α , H4t β , H3t et H2t du rotamère minoritaire respectivement.

Les signaux des carbones associés sont attribués grâce à l'HSQC pour C4t min à δ_{C} 27,09 ; C4t à δ_{C} 27,4 ; C2t min à δ_{C} 81,5 ; C2t δ_{C} 81,0.

Les spectres TOCSY sélectif (figures 16 et 17) nous permettent d'assigner les signaux des protons des deux systèmes monomériques suivants : H5't/H2't/H6't ; H5'u/H2'u/H6'u ;

H2u/H3u/H4u ; H2t/H3t/H4t et d'en déduire les systèmes rotamériques. Les carbones porteurs de ces protons sont attribués par HSQC :

- Rotamère majoritaire : C5't (δ_C 114,8), C2't (δ_C 114,1), C6't (δ_C 118,5), C3t (δ_C 67,5), C5'u (δ_C 114,74), C2'u (δ_C 114,65), C6'u (δ_C 119,2), C2u (δ_C 82,5), C3u (δ_C 72,30), C4u (δ_C 37,2).
- Rotamère minoritaire : C5't (δ_C 114,5), C2't (δ_C 113,8), C6't (δ_C 118,7), C3t (δ_C 67,2), C5'u (δ_C 114,5), C2'u (δ_C 115,0), C6'u (δ_C 119,6), C2u (δ_C 82,7), C3u (δ_C 72,25), C4u (δ_C 37,1).

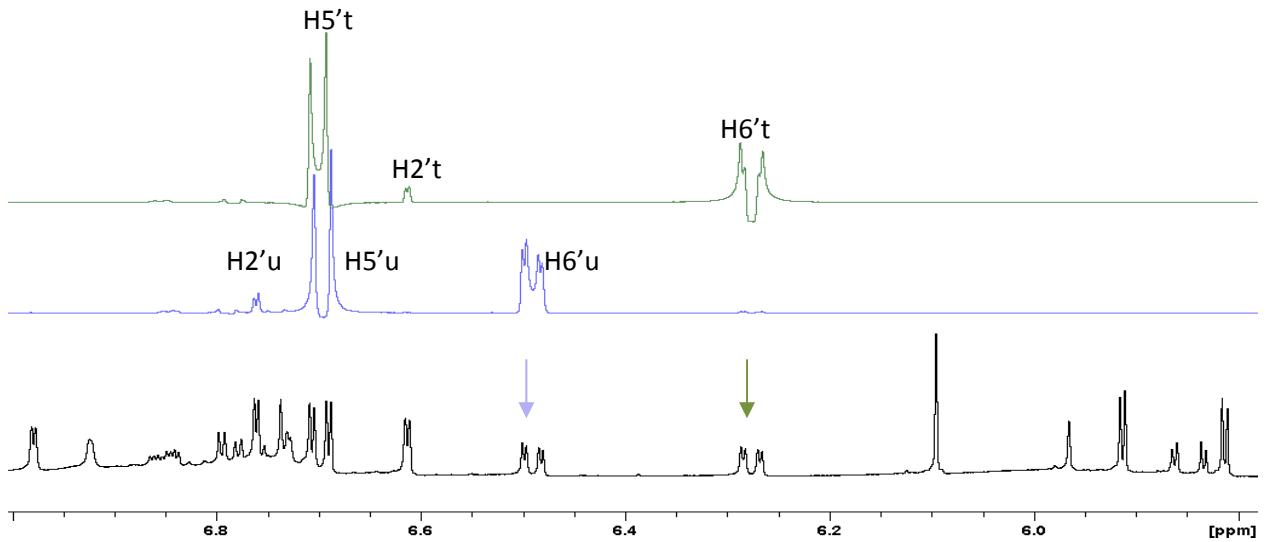


Figure 16 : TOCSY sélectif des protons H6't et H6'u (temps de mélange : 60 s)

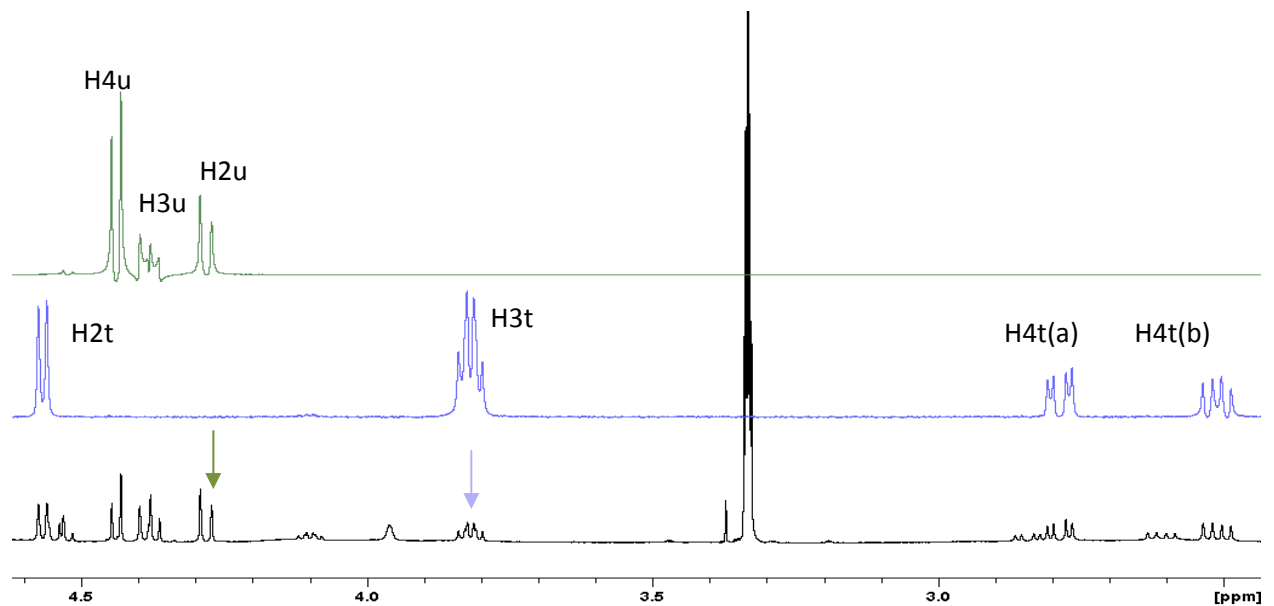


Figure 17 : TOCSY-sélectif des protons H2u et H3'u (temps de mélange : 60 s)

Le spectre HMBC est très riche en signaux. Les corrélations sont reportées dans le tableau 14. Nous pouvons ainsi confirmer l'attribution des C3t et C3t min par les corrélations des protons H4t et H4t min. De la même façon, les corrélations suivantes apportent des preuves supplémentaires des attributions citées : C2t/H4t; C2t min/H4t min ; C3u/H4u ; C3u/H2u ; C3u min/H4u min.

Toutes ces données, comparativement aux données précédemment décrites nous orientent vers le dimère B3. Il faudrait pour cela avoir la preuve de la liaison interflavanique C4-C8 notamment sur le spectre HMBC afin de visualiser les tâches de corrélations (H4u- C8at) et (H4u-C7t). Cette dernière corrélation est impossible à vérifier car sur notre spectre (enregistré dans le MeOD), il nous est impossible de localiser le C7t avec précision.

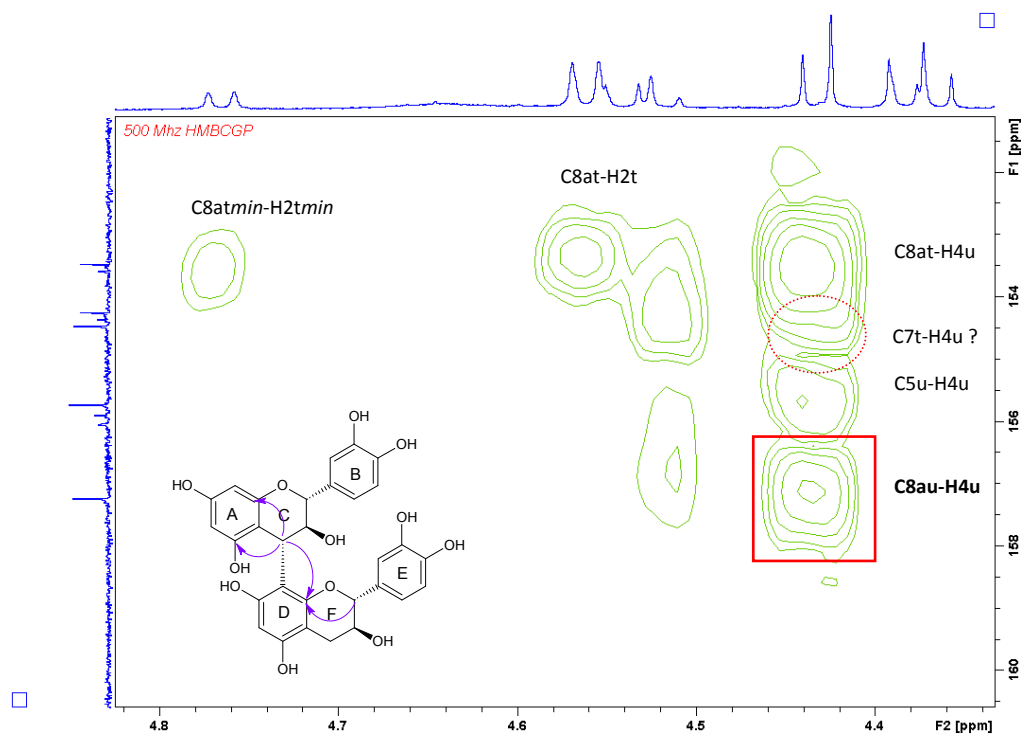


Figure 18 : Agrandissement du spectre HMBC du composé **co2** (CD₃OD, 500 MHz)

Grâce à une étude récente de Tarascou *et al.* (2006) reportant les valeurs mesurées et théoriques des constantes de couplages des dimères B1, B2, B2g (galloyl), B3 et B4, nous parvenons cependant à confirmer notre hypothèse.

En effet, cette étude détermine les configurations 3D des rotamères majoritaires des dimères en mélange hydroalcoolique et rapporte notamment les valeurs théoriques des constantes de couplage pour les deux conformations possibles : lorsque les deux unités supérieure (*upper*) et terminale (*lower*) sont en conformation équatoriale [*th (eq)*] et lorsque l'unité terminale est en conformation axiale [*th (ax)*]. La moyenne théorique en est déduite et comparée aux valeurs mesurées. Voir tableau 13.

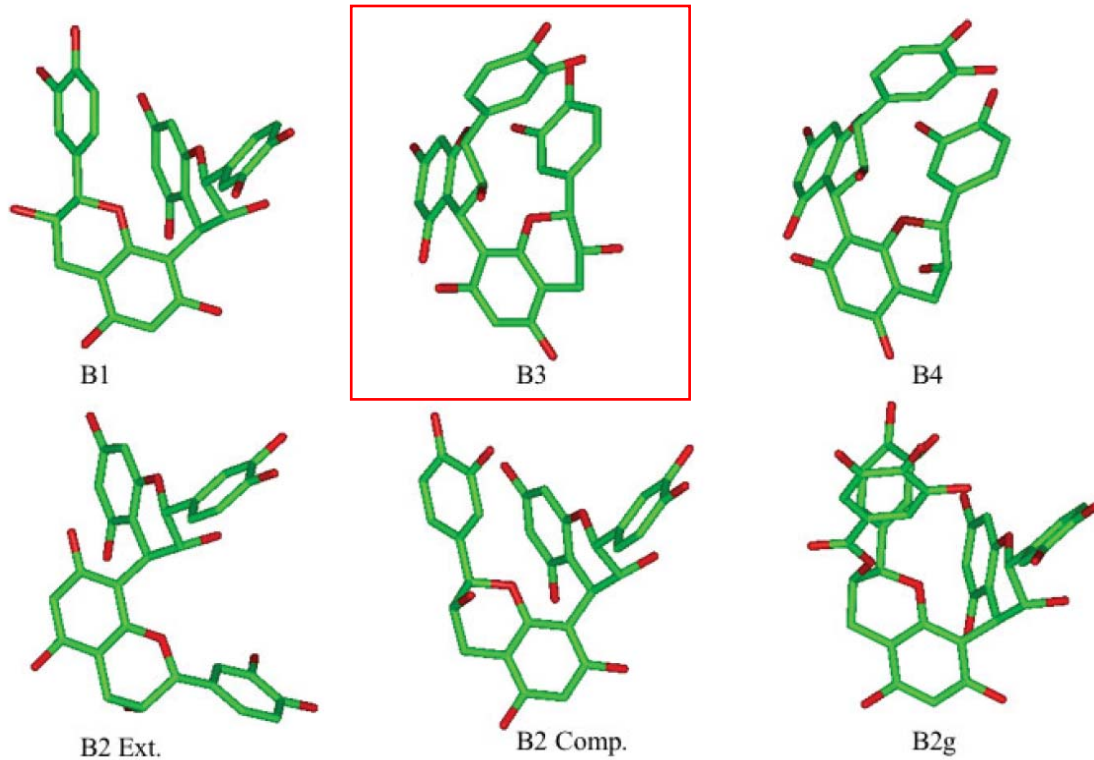


Figure 19 : Représentation 3D des rotamères prédominants (*compact*) observés en mélange hydro-alcoolique (Tarascou *et al.*, 2006).

Tableau 13 : Constantes de couplages des dimères B1, B2, B2g (galloyl), B3 et B4 ; valeurs mesurées et théoriques (Tarascou *et al.*, 2006).

J(Hz)	2C-3C	3C-4C	2F-3F	3F-4F	3F-4F
B1 th. (Ax)	3.9	10.5	1.5	2.4	4.1
B1 th. (Eq)	0.6	1.0	9.0	10.5	5.8
B1 th mean	0.7	1.3	9.0	10.5	5.8
B1 meas.	<1	<1	9.1	9.8	5.6
B2 th. (Ax)	3.7	10.5	4.5	5.3	10.8
B2 th. (Eq)	0.6	1.0	0.7	4.5	2.1
B2 th mean	0.8	1.6	0.6	4.4	2.1
B2 meas.	<1	<1	<1	4.5	<1
B2g th. (Ax)	3.8	10.6	4.3	5.0	11.0
B2g th. (Eq)	0.6	1.1	0.7	4.4	2.1
B2g th. mean	0.6	1.2	0.6	4.2	2.2
B2g meas.	<1	<1	<1	4.0	≈2
B3 th. (Ax)	1.9	1.3	1.6	2.5	3.7
B3 th. (Eq)	9.2	9.7	9.0	10.6	5.7
B3 th. mean	9.1	9.5	9.0	10.5	5.8
B3 meas.	10.0	7.8	7.9	8.5	5.6
B4 th. (Ax)	1.9	1.3	4.3	5.0	11.0
B4 th. (Eq)	9.2	9.7	0.7	4.2	2.2
B4 th mean	9.1	9.7	0.7	4.1	2.2
B4 meas.	9.7	8.5	~0	4.7	<1

Valeurs (co2) : 9,6 7,8 7,8 8,2 5,8

Tableau 14 : Attributions et corrélations des signaux de RMN du composé **co2** (CD₃OD, 500 MHz)

	¹³ C	¹ H (J en Hz)	COSY	HMBC (C→H)
<i>4t min</i>	27,1	CH ₂ H α 2,84 dd (16,3 ; 5,6 Hz)	2,6 4,10	4,77
		H β 2,60 dd (16,3 ; 8,2 Hz)	2,84 4,10	
<i>4t</i>	27,4	CH ₂ H α 2,77 dd (16,4 ; 5,8 Hz)	2,51 3,82	4,57
		H β 2,51 dd (16,3 ; 8,2)	2,77 3,82	
<i>4u min</i>	37,1	CH 4,54 d (7,6 Hz)	4,38	
<i>4u</i>	37,2	CH 4,43 d (7,8 Hz)	4,28	4,28
<i>3t min</i>	67,2	CH 4,10 ddd (5,8 ; 7,8 ; 13 Hz)	2,6 2,84 4,77	4,77 2,60 2,84
<i>3t</i>	67,5	CH 3,82 ddd (5,8 ; 7,8 ; 13 Hz)	2,51 2,77 4,57	4,57 2,51 2,77
<i>3u min</i>	72,25	CH 4,52 m		4,54
<i>3u</i>	72,30	CH 4,37 m		4,43 4,28
<i>2t</i>	81,0	CH 4,57 d (7,8 Hz)	3,82	6,61 6,28 2,77 2,51
<i>2t min</i>	81,5	CH 4,77 d (7,8 Hz)	4,1	6,92 2,84 2,6
<i>2u</i>	82,6	CH 4,28 d (9,6 Hz)	4,43	6,49 4,37
<i>2u min</i>	82,7	CH 4,38 d (9,6 Hz)	4,54	6,84
<i>6t min</i>	94,4	CH 5,96 s		
<i>6t</i>	94,6	CH 6,1 s		
<i>8u</i>	95,5	CH 5,81 d (2,5 Hz)	5,91	5,91
<i>6u</i>	95,9	CH 5,91 d (2,5 Hz)	5,81	5,81
<i>6u min</i>	96,1	CH 5,83 d (2,5 Hz)		
<i>8u min</i>	96,1	CH 5,86 d (2,5 Hz)		
<i>4at min</i>	99,0	Cq		5,96 2,84 2,6
<i>4at</i>	100,8	Cq		6,1 2,77 2,51
<i>4au</i>	105,7	Cq		5,91 5,81 4,43
<i>4au min</i>	105,8	Cq		5,91 5,86 5,83 4,54 4,43
<i>8t</i>	106,8	Cq		6,61
<i>8t min</i>	106,9	Cq		
<i>2't min</i>	113,8	CH 6,92 d (2,0 Hz)		4,77
<i>2't</i>	114,1	CH 6,61 d (2,0 Hz)	6,28	6,69 6,28 4,57
<i>5'u min</i>	114,5	CH 6,78 d (8,2 Hz)	6,49	
<i>5't min</i>	114,5	CH 6,78 d (8,1 Hz)		
<i>2'u</i>	114,65	CH 6,76 d (2,0 Hz)	6,49	
<i>5'u</i>	114,74	CH 6,69 d (8,3 Hz)		
<i>5't</i>	114,8	CH 6,69 d (8,1 Hz)	6,28	
<i>2'u min</i>	115,0	CH 6,97 d (2 Hz)	6,84	6,49
<i>6't</i>	118,5	CH 6,28 dd (8,2 ; 2,0 Hz)	6,61 6,69	6,92 6,61 4,57
<i>6't min</i>	118,7	CH 6,85 m		4,77
<i>6'u</i>	119,2	CH 6,49 dd (8,1 ; 2,0 Hz)	6,76 6,69	6,76 4,28
<i>6'u min</i>	119,6	CH 6,84 m	6,97	4,43 4,38

Tableau 14 (Suite) : Attributions et corrélations des signaux de RMN du composé **co2** (CD₃OD, 500 MHz)

	¹³ C	mult.	HMBC(C→H)
<i>1t</i>	130,4	Cq	4,57
<i>1t min</i>	130,8	Cq	4,77
<i>1'u min</i>	131,0	Cq	
<i>1'u</i>	131,2	Cq	4,43
<i>3t</i>	144,1	Cq	
<i>3'u</i>	144,2	Cq	
<i>4t</i>	144,38	Cq	
<i>4'u</i>	144,43	Cq	
<i>3t min</i>	144,66	Cq	
<i>3'u min</i>	144,69	Cq	
<i>4t min</i>	144,7	Cq	
<i>4'u min</i>	144,9	Cq	
<i>8at</i>	153,5	Cq	2,77 2,51 4,57 4,43
<i>8at min</i>	153,6	Cq	2,60 2,84 4,77
<i>7t ou 7u ou 5t</i>	154,2	Cq	6,1
<i>7t min</i>	154,4	Cq	5,96
<i>7t ou 7u ou 5t</i>	154,5	Cq	
<i>5u+ 7t ou 7u ou 5t</i>	155,7	Cq	5u : 5,81 5,91 4,43
<i>5u min + 7umin</i>	155,9	Cq	5,86
<i>5t min</i>	156,0	Cq	
<i>8au</i>	157,2	Cq	4,28 4,43 5,81
<i>8au min</i>	157,3	Cq	5,86

Analyse ESI-MS des fractions a13, a15 et a17 :

Le degré de polymérisation des proanthocyanidines B : dimères, trimères et tétramères est établi par spectrométrie de masse. Les fragments caractéristiques en ESI-MS en mode négatif sont m/z $[M-H]^- = 577$ pour les dimères, m/z $[M-H]^- = 865$ pour les trimères et m/z $[M-H]^- = 1153$ pour les tétramères.

a13 : trimère m/z $[M-H]^- = 865$

a15 : tétramère m/z $[M-H]^- = 1153$

a17 : polymères probables (pic non détectable de façon stable avec notre appareillage, ne migrant pas en CCM).

B- Test antifongique anti-*Pneumocystis* sur les molécules isolées ou fractions enrichies

Le même protocole que celui utilisé pour le screening des extraits est employé afin de déterminer l'activité anti-*Pneumocystis* des molécules isolées ou fractions enrichies avec des concentrations comprises entre 0,1 et 50 µg/ml.

Tableau 15 : Activités des molécules et fractions vis-à-vis de *Pneumocystis jirovecii*

Molécules et fractions ↓	Concentration testée et % d'inhibition associé			
	50 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	0,1 µg/ml
a5	39%	7%	NI	NI
b2 : co1	22%	20%	10%	NI
a11 : co2	NI	NI	NI	NI
a13	NI	NI	NI	NI
a15	NI	NI	NI	NI
a17	NI	NI	NI	NI

DISCUSSION

La (+)-catéchine est bien responsable en partie de l'activité. Seul le monomère porte l'activité puisque les dimère, trimère, tétramère et polymères testés sont inactifs. La fraction a5 présentant un mélange complexe de composés minoritaires non tanniques est également active. L'extrait présente donc plusieurs composés actifs de classes chimiques différentes produisant une activité anti-*Pneumocystis* globale.

Il est intéressant de noter que l'extrait de *B. simaruba* également riche en tanins ne s'est pas révélé actif vis-à-vis de ce champignon. Une étude récente sur l'extrait MeOH de l'écorce a montré la présence d'épicatéchine et de polymères d'épicatéchine (Maldini *et al.*, 2009). Le profil HPLC des extraits EtOH et EtOH 50% de *B. simaruba* montre une faible quantité d'épicatéchine. Deux explications peuvent être avancées : la quantité d'épicatéchine est insuffisante ou la configuration en C₂₋₃ *trans* est nécessaire à cette activité.

C – Isolement des composés anti-dermatophytes et anti-*Candida*

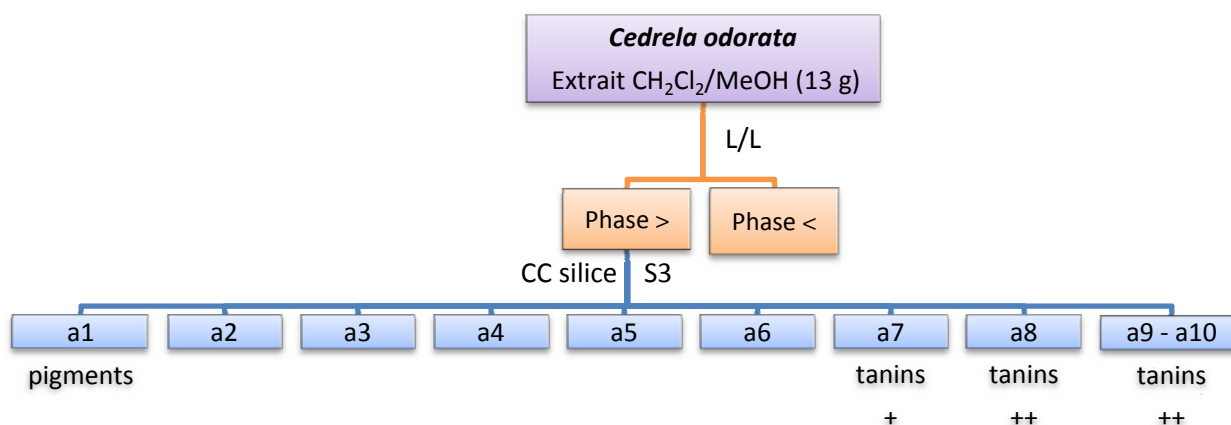
La démarche mise en place pour le ciblage de cette activité est différente puisqu' elle consiste en un test bioautographique sur plaque de CCM. Le principe de cette technique consiste à déposer les fractions obtenues sur une plaque de CCM puis à la développer dans le solvant approprié ou non selon la nature des fractions. Celui-ci est évaporé sous la hotte. Un gel pré-ensemencé de *Candida albicans* est alors coulé en fine épaisseur (1 mm) puis la plaque est incubée une nuit à 30°. Elle est ensuite vaporisée avec du MTT, molécule précédemment utilisée lors des tests de cytotoxicité afin de visualiser les taches blanches d'inhibition sur fond violet, après incubation de la plaque pendant quelques heures.

Les composés **co1** et **co2** ainsi que les fractions a13, a15 et a17 ont été testés. Aucune activité n'a été révélée. La fraction a5 n'étant obtenue qu'en très faible quantité (6 mg) n'a pu être testée pour cette activité. Ce résultat a donc conduit à émettre l'hypothèse que les composés minoritaires (présents dans la fraction a5) étaient probablement responsables de cette activité. L'extrait brut a été obtenu et fractionné différemment afin d'obtenir moins de tanins, ceux-ci représentant en effet près de 90% de l'extrait brut méthanolique.

Extraction et Fractionnement :

L'écorce de tige broyée de *Cedrela odorata* (m = 560 g) est extraite à température ambiante par un mélange CH₂Cl₂/MeOH (1:1, v/v), 3 x 4 L, 3 x 24h. L'extrait est mis à sec (m = 13,0 g, soit un rendement de 2,3 %).

L'extrait brut est partagé par une extraction L/L afin d'éliminer la fraction des tanins et principalement les formes condensées. Les monomères sont impossibles à éliminer par un tel procédé, ils ont la propriété de se partager dans les deux phases. Le mélange biphasique est le suivant : c-hexane/MEK/ACN/Eau (1:2:0,5:1, v/v/v/v).



La phase organique et la phase organo-aqueuse sont testées par bioautographie à 400 µg/ml (sans migration). La phase organique révèle une tache d'inhibition et est fractionnée sur CC de silice avec un solvant isocratique S3, EP/AE (1:1, v/v) pour obtenir 10 fractions. Elles sont à

nouveau testées par bioautographie après migration à l'aide du solvant S3 à 400 µg/ml. Aucune activité n'est révélée.

DISCUSSION

Au cours du fractionnement, une perte d'activité de l'extrait est observée. Ceci indique probablement qu'une synergie est responsable de l'activité de cet extrait et reflète la difficulté d'isolement des principes actifs dans certains extraits. (Voir commentaire groupé avec *Bursera simaruba* au paragraphe suivant).

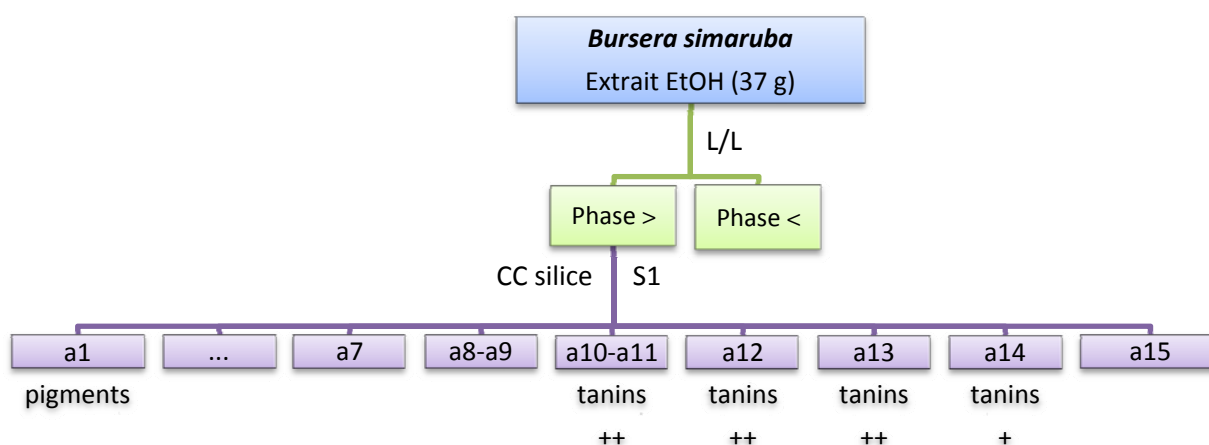
II- ACTIVITE ANTIFONGIQUE de *Bursera simaruba*

Extraction

L'écorce de tige de *Bursera simaruba* (900 g) est broyée et extraite à température ambiante avec de l'éthanol absolu (3 x 4 L). L'extrait est réduit à 200 ml et partagé en L/L avec le solvant c-hexane/MEK/ACN/Eau (1:2:0,5:1 v/v/v/v). Les deux phases sont concentrées. La phase supérieure est mise à sec puis mise sous vide en présence de P₂O₅ afin d'ôter les dernières traces d'eau (m = 37,1 g soit 4,1%). La phase inférieure organo-aqueuse est concentrée au maximum afin d'évaporer tous les solvants organiques puis est lyophilisée (m = 52,0 g soit 5,8%).

Fractionnement

La phase supérieure est fractionnée par VLC sur colonne de silice (44 x 380 mm) à l'aide d'un gradient S1 : EP (3 x 500 ml), EP/AcOEt 4:1 (3 x 500 ml), EP/AcOEt 3:2 (2 x 500 ml), EP/AcOEt 1:1 (2 x 500 ml), AcOEt (4 x 500 ml), EtOH (2 x 500 ml), MeOH (2 x 500 ml) et ACN (1 x 500 ml) et donne 15 fractions après regroupement.



L'ensemble des fractions issues de la VLC ainsi que la phase inférieure regroupant le « totum tannique » est testée en bioautographie afin de cibler l'activité. Et pour la deuxième fois, une

perte de l'activité est constatée. Aucune fraction ne cause d'halo d'inhibition. Nous décidons de tester les fractions à l'aide d'une autre technique, il s'agit de la méthode des disques. Elle consiste à déposer 2,5 mg de fraction par disque (le solvant est évaporé) puis à les déposer à la surface d'un milieu de Sabouraud sur lequel a été préalablement coulé un inoculum de *Candida albicans*. Un contrôle positif, ici, l'amphotéricine B (AmB) permet de valider la méthode.

RESULTATS

Là encore, aucune fraction ne développe d'inhibition fongique. Cependant, autour du disque contenant la phase inférieure possédant le « totum tannique », il se produit une réaction particulière. Contrairement à une tâche d'inhibition classique obtenue avec le contrôle positif, l'amphotéricine B, il semble se produire une réaction de « complexation » qui induit clairement une modification au niveau du champignon.



Témoin AmB



Totum

BILAN & DISCUSSION (*Cedrela odorata* et *Bursera simaruba*)

En résumé, deux extraits, tous les deux issus d'écorce et riches en tanins, perdent leurs activités au cours du fractionnement. De plus, il y a clairement une interaction des tanins avec le champignon visible grâce au test des disques. Comment expliquer cela ?

Une hypothèse peut être avancée. Il s'agirait d'une réaction, tout d'abord, non spécifique, due aux interactions des tanins avec la paroi fongique. Certains tanins sont connus pour se lier aux protéines (salivaires, etc.); ils pourraient donc probablement induire une modification de perméabilité membranaire et permettre alors l'entrée dans la cellule fongique d'autres composés qui possèderaient une activité cytotoxique et donc antifongique. Ces molécules peuvent être des monomères de flavan-3-ols telle que la catéchine ou appartenir à d'autres classes phytochimiques.

Il serait intéressant d'adopter une démarche différente pour ce type d'extraits telle que tester différentes associations de fractions comprenant une fraction sans tanins et une fraction tannique (« totum tannique » obligatoire ou monomère ou dimère...), afin d'essayer de déterminer les composants à l'origine de cette synergie. Bien entendu, il se pourrait que cela ne soit pas aussi simple et que d'autres paramètres puissent intervenir tel que le pourcentage relatif de chaque fraction, etc. Des études portant sur les phénomènes de complexation des tanins et de protéines ont montré qu'un tanin condensé doit avoir au moins trois sous-unités flavanol pour pouvoir précipiter les protéines. Les dimères sont moins efficaces tandis que les monomères sont généralement incapables de précipiter les protéines (Bate-Smith, 1973 ; Artz *et al.* 1987 ; Abi Azar, 2007).

Cette hypothèse est corroborée par le fait qu'il y ait une activité de la catéchine et de composés minoritaires sur *Pneumocystis* qui est un champignon particulier ne possédant pas d'ergostérol dans sa paroi et donc ayant probablement une perméabilité membranaire plus fluide et une barrière moins protectrice.

Ceci expliquerait aussi pourquoi il peut y avoir perte d'activité notamment pour les organes riches en tanins, tels que les écorces, au cours du fractionnement d'une façon générale. Les limites de l'expérimentation scientifique telles que celles-ci, ayant des conséquences directes sur le résultat *in vitro* et par conséquent sur la validation d'extraits végétaux pour les activités décrites par la tradition sont à prendre en compte. En phytochimie, la démarche classique consiste à extraire la plante à l'aide de plusieurs solvants en cascade ce qui a pour effet de diminuer voire rompre l'action synergique des composés lorsque celle-ci est indispensable à l'activité. Ce sont les fractions issues de ce protocole qui sont généralement testées et étudiées.

S'il est capital de rechercher les différents principes actifs pris isolément afin de mettre au point des médicaments pharmaceutiques essentiels, il apparaît également que disséquer une plante pour isoler les principes actifs ne suffit pas toujours à expliquer comment elle agit. Le choix de l'utilisation du « totum » plutôt que des fractions plus ou moins purifiées ou encore des molécules isolées peut s'avérer être indispensable afin de produire un effet thérapeutique global important pour certaines plantes. Une plante entière peut être plus efficace que la somme de ses composants. Une plante contient des centaines voire des milliers de substances biologiquement actives, déterminer l'action en détail d'une plante (même si son effet médical est indéniable) est, comme nous venons de le démontrer, difficile voire impossible dans certains cas *via* une stratégie d'isolement phytochimique classique. Il convient alors de mettre en place une approche différente pour ce type d'extrait comme suggéré plus haut.

L'étude bibliographique de *Cedrela odorata* montre la présence de composés de type limonoïdes (tétranortriterpénoïdes) et triterpéniques connus pour posséder des activités cytotoxiques. Un grand intérêt s'est porté ces dernières années sur le « neem » (*Azadirachta indica* A. Juss, Meliaceae) pour ses activités insecticide, anti-parasitaire etc. dues à des diterpènes (dérivés de l'abiétane) et à plus de 50 tétranortriterpénoïdes notamment à l'azadirachtine. Il en est de même avec *Bursera simaruba* qui possède des lignanes, composés connus pour posséder une activité anti-inflammatoire telle que la méthyl- β -peltatine A (Noguera *et al.*, 2004) mais également une activité cytotoxique (Wickramaratne *et al.*, 1995 ; Jutiviboonsuk *et al.*, 2009). Ces lignanes ou triterpènes, en synergie avec les tanins sont probablement à l'origine de l'activité antifongique de ces deux extraits.

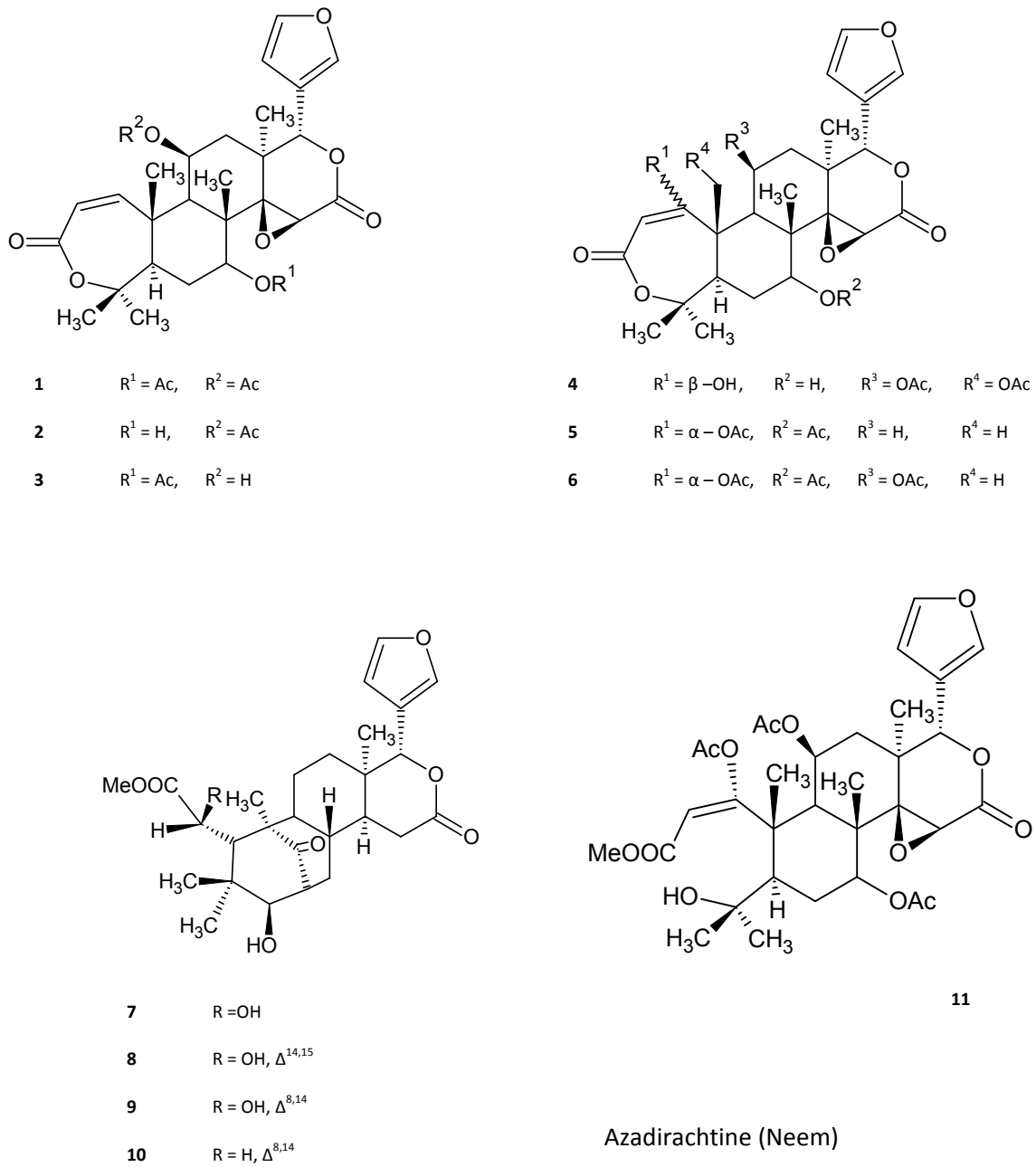


Figure 20 : *Cedrela odorata* : limonoïdes isolés de l'écorce (Kipassa *et al.*, 2008) et molécule d'azadirachtine (Neem).

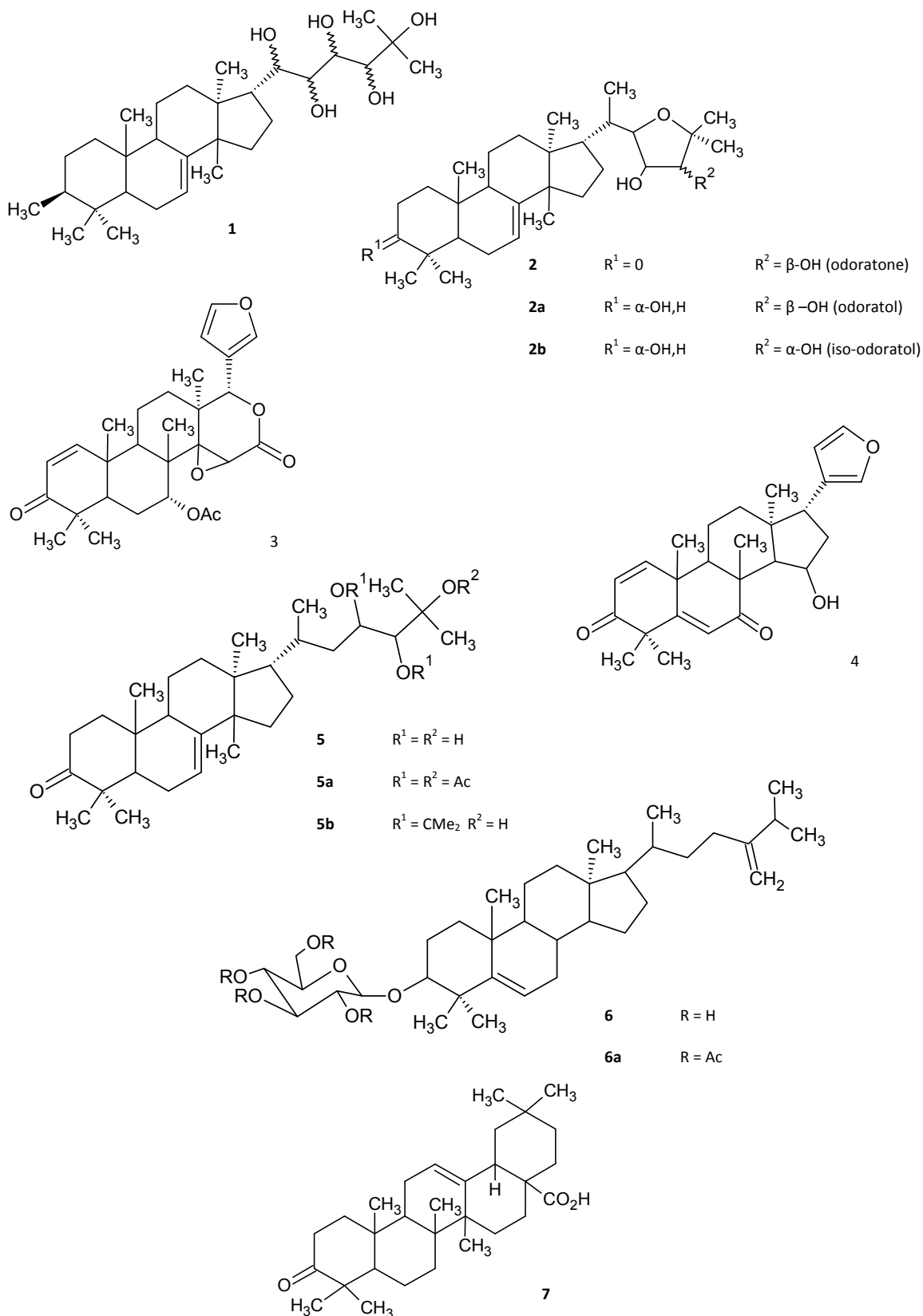
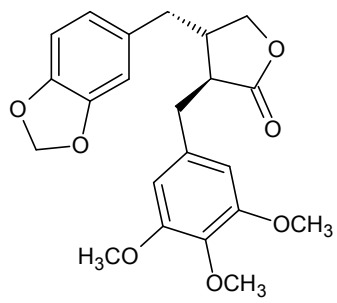
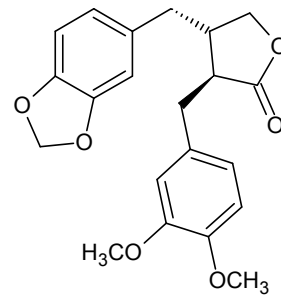


Figure 21 : *Cedrela odorata*, quelques dérivés triterpéniques (squelette de type dammarane) isolés du bois de cœur (Campos *et al.*, 1991).

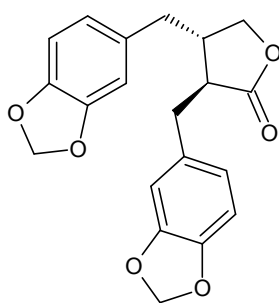
Ecorce :



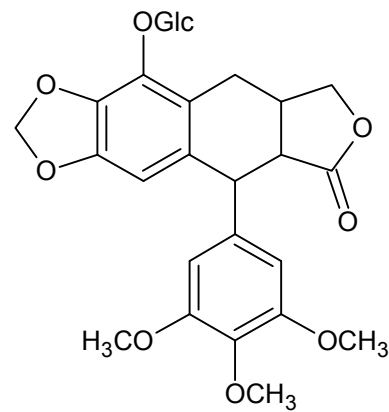
1 - yatéine



2 - bursehernine



3 - hinokinine

4 - β -peltatine-O- β -D-glucopyranoside

Feuilles :

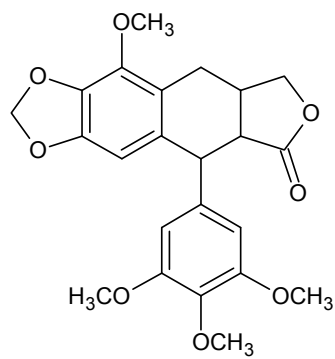
méthyl- β -peltatine A

Figure 22 : *Bursera simaruba*, quelques lignanes isolés de l'écorce (Ciccio *et al.*, Maldini *et al.*, 2009) et des feuilles (Noguera *et al.*, 2004)

III- ACTIVITE ANTIFONGIQUE de *Pluchea carolinensis*

A- Isolement des composés

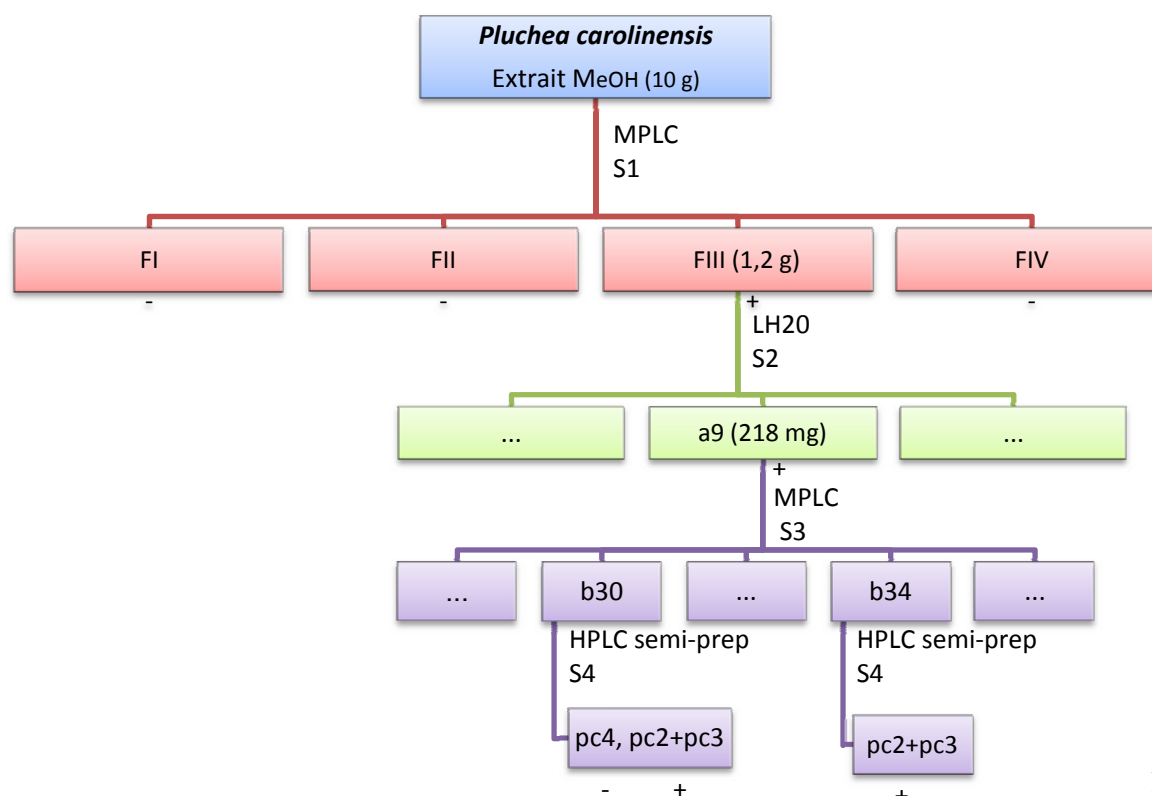
Extraction

Les feuilles de *Pluchea carolinensis* (1,1 kg) sont broyées et extraites à température ambiante avec du dichlorométhane afin de les dégraisser (3 x 5 L). Le marc est extrait par du méthanol (3 x 5 L). La chlorophylle étant encore présente en grande quantité l'extrait est réduit à 200 ml et partitionné avec du c-hexane. La phase méthanolique est évaporée sous vide. Un précipité blanc **pc1** se forme lors de cette étape, 13,2 g (1,2%) de ce dernier sont récupérés. Le reste de la phase est réduit au minimum puis lyophilisé (m = 125,5 g soit 11,4%).

Fractionnement

10 g d'extrait méthanolique sont chromatographiés sur une colonne Lichroprep[®] RP-18 (460 x 35 mm ; 25-40 µm) par MPLC en mode gradient : MeOH 30% à 100% ce qui permet d'obtenir après regroupement 4 fractions. Ces dernières ainsi que le précipité **pc1** sont alors testés par bioautographie pour leur activité anti-*Malassezia*.

La fraction III (1,2 g) est active et permet de cibler deux spots juxtaposés en CCM apparaissant en jaune après révélation à l'anisaldéhyde. Elle est fractionnée sur gel de Sephadex LH20 avec du méthanol 100% puis sur une colonne Lichroprep[®] RP-18 (460 x 35 mm ; 25-40 µm) à l'aide d'un gradient MeOH/Eau 20 à 50% et sur une colonne Interchrom[®] RP-18 (250 x 10 mm ; 5 µm) à l'aide d'un gradient MeOH/Eau 30-40% (5 min), 40-55% (10 min), 55-100% (5 min), lavage 100%. Les deux composés pc2 et pc3, ciblés lors de la bioautographie sont isolés en mélange (6,0 mg) ainsi qu'un troisième inactif pc4 (1,6 mg).



Suite au screening phytochimique et aux études antérieures, nous savons que *Pluchea carolinensis* est riche en flavonoïdes. Ces composés sont reconnus pour de nombreuses activités pharmacologiques : résistance et perméabilité capillaire, protection vis-à-vis des radicaux libres, inhibiteurs enzymatiques, anti-inflammatoires, anti-allergiques, hépatoprotecteurs mais aussi comme antibactériens, antifongiques et anti-viraux *in vitro* (Bruneton, 2009). La bioautographie de la fraction III active cible les spots juxtaposés correspondant à des flavonoïdes (couleur jaune dans le visible et après révélation à l'anisaldéhyde et au réactif de NEU).

Un flavonoïde *stricto sensu* se définit comme étant une structure dite en C₆-C₃-C₆. Le squelette de base est composé de 15 carbones constituant 2 cycles phényles A et B connectés par un pont à 3 carbones qui peut être cyclisé et former le cycle C ou non.

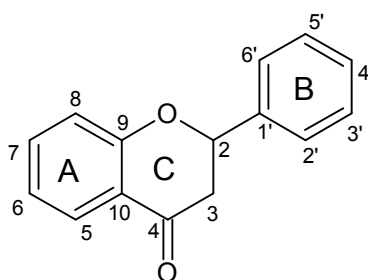


Figure 23 : Squelette de base des flavonoïdes *stricto sensu*

Les diverses classes diffèrent en fonction de la cyclisation, du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C. Ainsi les principales classes ayant un squelette C cyclisé sont les suivantes : les flavones, flavonols, dihydroflavonols, flavanones alors que les aurones, chalcones et dihydrochalcones auront un squelette C non cyclisé. Les substitutions des cycles A et B définissent quant à elles la molécule au sein de sa classe. Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Ces hydroxyles peuvent être glycosylés, méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés.

B- Détermination structurale

Les composés **pc2** et **pc3** sont isolés en mélange avec un ratio 1:1. Le mélange des composés **pc2** et **pc3** est de couleur jaune-vert et ils se colorent en jaune voire jaune-orangé par l'anisaldéhyde sur CCM. L'élucidation structurale de **pc2** et **pc3** est réalisée par analyse des spectres MS, MS² et RMN ¹H, *J*-mod, HSQC, COSY et HMBC.

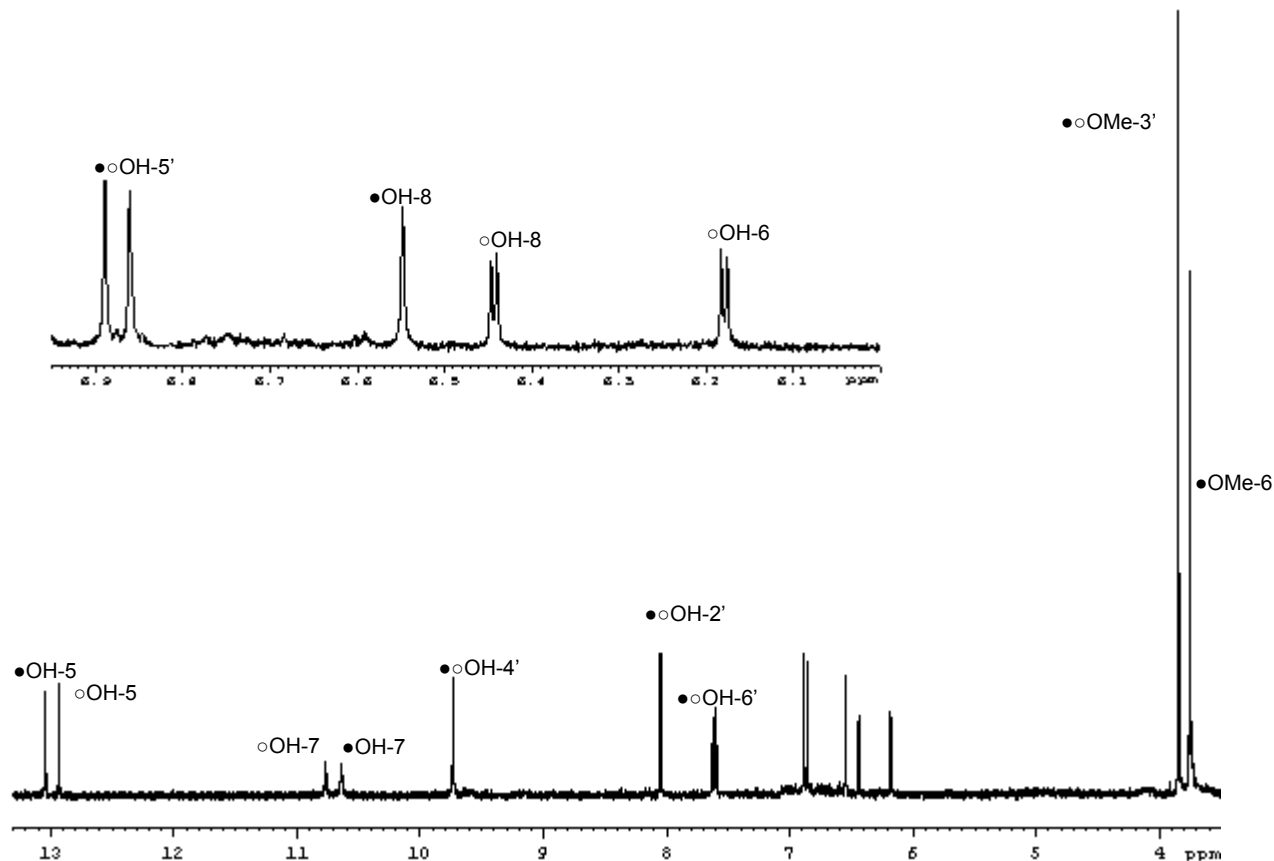


Figure 24 : Spectre de RMN ^1H du mélange **pc2** / **pc3** (DMSO, 500 MHz) ; ○pc2 ; ●pc3

Les corrélations des spectres bidimensionnels permettent d'identifier sans difficulté les 2 composés.

Composé **pc2**

Ce composé est identifié comme étant l'isorhamnétine-3-sulfate.

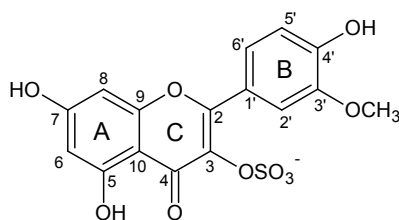


Figure 25 : composé **pc2**

Le spectre de RMN ^1H révèle trois régions distinctes : un groupement méthoxy à 3,84 ppm, une région aromatique s'étalant de 6,18 à 8,05 ppm et trois signaux de groupements hydroxyles à 9,73, 10,76 et 12,93 ppm. Le groupement le plus déblindé à 12,93 ppm est dû au 5-OH qui forme un pont hydrogène intramoléculaire avec le groupement carbonyle en C4 du cycle C.

Le spectre HSQC nous permet d'attribuer les signaux ^{13}C aux ^1H correspondants. La région aromatique du spectre de RMN ^1H permet d'identifier 2 systèmes de doublets caractéristiques. Dans le premier système, deux doublets à 8,05 ppm (1H ; 2,2 Hz) et 6,87 ppm (1H ; 8,5 Hz) sont couplés avec un doublet déboublé à 7,62 ppm (1H ; 8,5 Hz, 2,2 Hz) nous révélant un système ABX typique et nous orientant vers une double substitution du cycle B en C3' et C4'.

Le second système fait intervenir le doublet à 6,18 ppm (1H ; 2,1 Hz) couplant avec le doublet à 6,45 ppm (1H ; 2,1 Hz) correspondant aux protons H6 et H8 du cycle A respectivement. Le spectre HMBC, nous permet de définir les positions relatives des carbones C6, C8, C4' et C3' des cycles A et B, mais aussi celles des carbones quaternaires : C2 (δ_C 156,6); C5 (δ_C 156,0) et C10 (δ_C 104,6).

Le seul signal non attribué correspond au groupement du cycle C en C3 à 132,0 ppm. Il ne correspond ni à un groupement OH (environ 135 ppm), ni à un groupement OMe (environ 133 ppm). Il est attribué à l'aide du spectre ESI-MS² en mode négatif, à un groupement sulfate. En effet, la fragmentation du composé **pc2** en ESI-MS² (-35eV) génère un ion pseudomoléculaire à $m/z = 395$ puis un fragment $[M-H-80]^-$ caractéristique, appelé M_1^* à $m/z = 315$ consécutivement à la perte du groupement SO₃. Grâce aux données de la littérature concernant la fragmentation des flavonols (aglycone), nous pouvons suggérer le schéma de fragmentation (figure 26) du composé **pc2**. Le fragment M_1^* donne 3 voies réactionnelles :

- ❶ la perte d'un CO₂ générant un fragment à $m/z = 271$
- ❷ $[M_1^* - 15]$ à $m/z = 300$ dû à la perte d'un méthyle génère 2 fragments. Un fragment à $m/z = 255$ peut être dû à la perte d'un -CO₂-H et autre fragment à $m/z = 243$ dû à la perte d'un -CO.
- ❸ $m/z = 151$ dû à la perte d'un important fragment comprenant le cycle B.

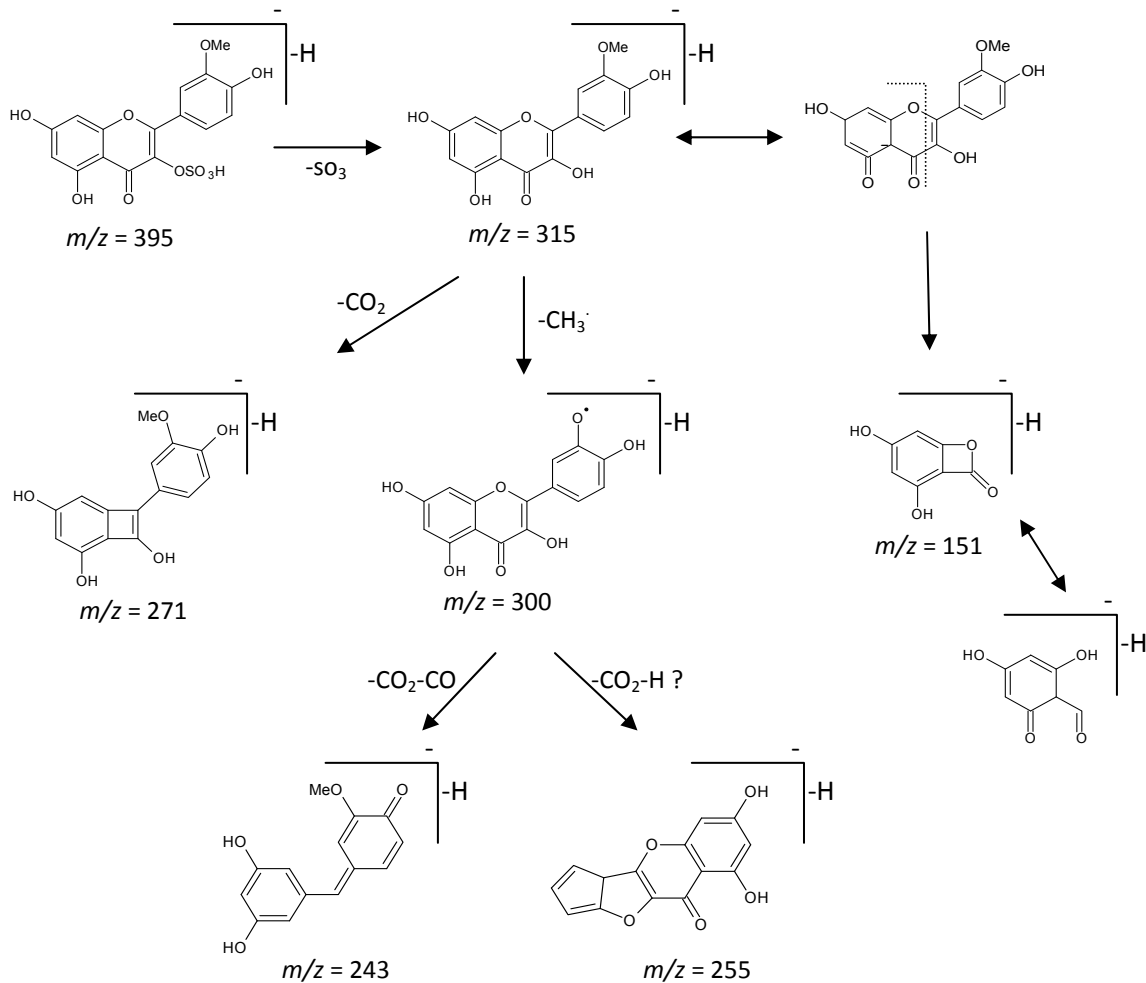


Figure 26 : Schéma de fragmentation du composé **pc2**

Ce composé a été récemment isolé des feuilles de *Pluchea carolinensis* (Perera, 2008).

Composé pc3

La même approche est adoptée afin d'élucider cette structure. Le spectre RMN ^1H est similaire à celui du composé **pc2** mais nous constatons un groupement methoxy supplémentaire à 3,75 ppm qui corrèle en HSQC avec le carbone situé à 60,5 ppm correspondant au C6 du cycle A.

L'ensemble des attributions des signaux RMN est reporté dans le tableau16.

Le spectre ESI-MS² (-30 eV) génère un ion pseudo-moléculaire $[\text{M-H}]^-$ à $m/z = 425$ puis la perte immédiate du groupement sulfate $[\text{M-H-80}]^- = \text{M}_2^*$ à $m/z = 395$. De la même façon, nous pouvons proposer un schéma de fragmentation du composé **pc3**. Le fragment M_2^* perd un groupement méthyle ($m/z = 330$) puis donne trois fragments : $m/z = 302$, $m/z = 287$ et $m/z = 259$ dus à la perte successive des groupements -CO, -Me et -CO et un fragment à $m/z = 273$ probablement dû à la perte d'un groupement -COH du fragment à $m/z = 302$.

Ce composé est identifié comme étant la spinacétine-3-sulfate et est isolé pour la première fois de *Pluchea carolinensis* mais a été initialement isolé d'une autre Asteraceae, *Flaveria chloraefolia* (Barron et Ibrahim, 1987).

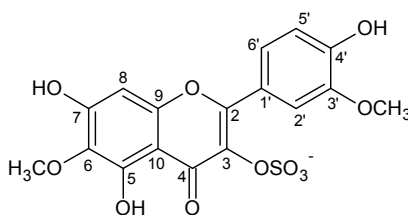


Figure 27 : composé pc3

Composé pc4

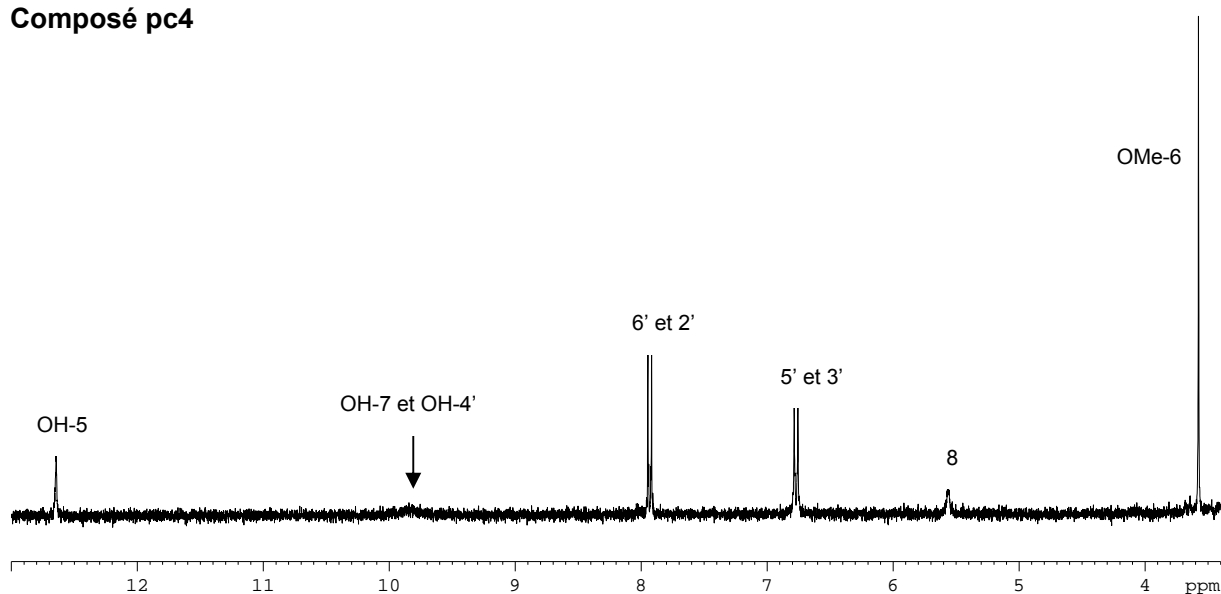


Figure 28 : Spectre de RMN ^1H du composé pc4 (DMSO, 300 MHz)

Ce composé est de couleur jaune. Son spectre UV laisse apparaître un pic d'absorbance à $\lambda = 287$ nm (bande II) dû au cycle A et un deuxième pic d'absorbance à 336 nm (bande I) dû au cycle B.

Au regard des spectres RMN et notamment du spectre de RMN ^1H trois régions se distinguent : un groupement méthoxy à 3,58 ppm corrélant avec le carbone à 59,3 ppm, un système aromatique avec un singulet à 5,57 ppm, 2 doublets à 6,77 et 7,93 ppm et enfin le signal caractéristique du groupement hydroxyle à 12,68 ppm (liaison hydrogène intramoléculaire du 5-OH avec le groupement carbonyle en C₄ du cycle C à δ_{C} 151,5 ppm).

Sur le spectre de RMN ^1H , les doublets à δ_{H} 7,93 ($J = 8,9$ Hz) and δ_{H} 6,77 ppm ($J = 8,9$ Hz) sont couplés et intègrent pour deux protons chacun. Ceci révèle une configuration de type AA'BB' dans le cycle B.

De la même façon, grâce à l'étude des mécanismes de fragmentation des aglycones flavonoliques nous pouvons proposer un schéma de fragmentation du composé **pc4**.

Le spectre ESI-MS² (-35 eV) montre un ion pseudomoléculaire $[\text{M-H}]^-$ à $m/z = 395$ puis la perte classique $[\text{M-H-80}]^- = \text{M}_3^*$ à $m/z = 315$ dû à la perte du groupement SO_3 . Le fragment M_3^* donne comme le composé **pc2**, deux voies de fragmentation probables:

❶ $m/z = 271$ puis $m/z = 243$ dus à la perte respective d'un $-\text{CO}_2$ et d'un $-\text{CO}$

❷ $m/z = 300$ dû à la perte d'un $-\text{Me}$, $m/z = 255$ dû à la perte d'un $-\text{CO}_2$ et $m/z = 272$ dû à la perte d'un $-\text{CO}$.

Ce composé est identifié comme étant le 6-méthoxykaempférol-3-sulfate et est isolé pour la première fois de *Pluchea carolinensis* et a été initialement isolé de *Flaveria chloraefolia* (Barron et Ibrahim, 1987).

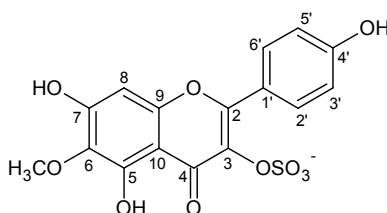


Figure 29 : composé **pc4**

Tableau 16 : Corrélations et signaux de RMN des composés pc2, pc3 et pc4 (DMSO-d₆)

N°	Composé pc2			Composé pc3			Composé pc4		
	δC, mult.	δH (mult.); J(Hz)	HMBC corr.	δC, mult.	δH (mult.); J(Hz)	HMBC corr.	δC, mult.	δH (mult.); J(Hz)	HMBC corr.
2	156,6 Cq		6,45; 7,62; 8,05	156,6 Cq		6,45; 7,62; 8,05	153,4 Cq		7,93
3	132,0 Cq			132,0 Cq			132,0 Cq		
4	178,1 Cq		6,45 (petit)	178,5 Cq		6,55	178,5 Cq		
5	161,8 Cq		6,18; 12,95	153,0 Cq		13,04	151,5 Cq		12,68
6	98,9 CH	6,18 (d; 2,1 Hz)	6,45; 10,76; 12,93	131,5 Cq		3,75; 6,55; 10,64; 13,04	134,9 Cq		3,58
7	164,2 Cq		6,18; 6,45; 10,76	157,4 Cq		6,55	157,4 Cq		
8	93,9 CH	6,45 (d; 2,1 Hz)	6,18; 10,76	94,2 CH	6,55 (s)	10,64	97,0 CH	5,57 (s)	
9	156,0 Cq			151,6 Cq		6,55	151,6 Cq		
10	104,6 Cq		6,18; 6,45; 12,93	105,2 Cq		6,55; 13,04	105,2 Cq		
1'	122,0 Cq		6,87	122,0 Cq		6,87	121,6 Cq		
2'	114,0 CH	8,05 (d; 2,2 Hz)	7,62	114,0 CH	8,05 (d; 2,2Hz)	7,62	130,9 CH	7,93 (d; 8,9 Hz)	
3'	147,4 Cq		3,84; 9,87; 8,05; 9,73	147,4 Cq		3,84; 9,87; 8,05; 9,73	116,7 CH	6,77 (d; 8,9 Hz)	
4'	149,9 Cq		6,87; 7,62; 8,05; 9,73	149,9 Cq			159,3 Cq		6,77; 7,93
5'	115,6 CH	6,87 (d; 8,5 Hz)	9,73	115,6 CH	6,87 (d; 8,5Hz)		116,0 CH	6,77 (d; 8,9 Hz)	
6'	122,5 CH	7,62 (dd; 8,5 Hz; 2,2Hz)	8,05	122,5 CH	7,62 (dd; 8,5 Hz; 2,2Hz)	8,05	130,9 CH	7,93 (d; 8,9 Hz)	
OH-5		12,93 (s)			13,04 (s)			12,68 (s)	
OH-7		10,76 (s)			10,64 (s)				
OH-4'		9,73 (s)			9,73 (s)				
OCH₃-3'	56,1	3,83 (s)		56,1	3,83 (s)				
OCH₃-6				60,5	3,75 (s)		59,3	3,58 (s)	

C- Les flavonoïdes sulfatés : Récapitulatif des données antérieures

Le premier flavonoïde sulfaté a été rapporté en 1937 (Kawaguchi et Kun, 1937) et c'est en 1975, que les flavonoïdes sulfatés ont été érigés en tant que classe à part entière (Harbone, 1975).

Variations structurales

La plupart de ces composés sont des esters de flavones et flavonols hydroxylés, méthoxylés et/ou glycosylés. Une récente étude a recensé 134 flavonoïdes sulfatés dont 74 flavonols, 57 flavones auxquels se rajoutent 2 anthocyanes et 1 dihydroflavonol (Op de Beck, 1999).

Les flavonoïdes sulfatés sont généralement isolés sous forme de sels de potassium ; ceci s'explique puisque c'est l'ion majoritaire de la cellule végétale. D'autres cations peuvent intervenir : Na et Ca. Il y a peu d'informations concernant la localisation au niveau des organites.

Distribution naturelle

La dernière étude réalisée a permis de retrouver des flavonoïdes sulfatés dans plus de 250 espèces correspondant à 20 familles de dicotylédones et 15 monocotylédones (Op de Beck, 1999). Ces composés ont ainsi une distribution large qui ne leur permet pas d'être utilisés comme traceur chimiotaxonomique, leur répartition fait plutôt référence à l'habitat en milieux salins et marécageux des végétaux dans lesquels ils sont retrouvés. Il semble qu'il s'agisse cependant de familles herbacées et/ou avancées d'un point de vue morphologique (Barron *et al.*, 1988). Les flavonoïdes sulfatés se retrouvent aussi chez des Ptéridophytes mais aucun n'a encore été retrouvé chez les Bryophytes ou les Gymnospermes.

Fonction

Le rôle physiologique de la sulfatation des composés n'est pas clair. Cependant, différentes hypothèses peuvent être avancées :

Inactivation : Comme les mécanismes de glycosylation, la sulfatation permettrait l'inactivation des molécules hydroxylées et éviterait les interactions enzymatiques (Harbone, 1975 ; Barron *et al.*, 1988).

Transfert d'ions : La sulfatation peut être un moyen de séquestrer les ions sulfates et ainsi réguler la balance ionique. La plupart des plantes synthétisant ces dérivés vivent dans un environnement écologique aquatique et/ou salin. Ce système permettrait à la plante de stocker l'excès d'ions sulfates présents dans son environnement (Harbone, 1975 ; Barron *et al.*, 1988).

Propriétés biologiques connues des flavonoïdes sulfatés

Elles sont diverses et comprennent notamment des activités antiallergique, mutagène, inhibitrice enzymatique (déshydrogénases, aldose réductase), antiradicalaire et anti-oxydante (Op de Beck, 1999).

Détermination du minéral **pc1**

Le composé **pc1** correspond à un précipité de type minéral. Les composés isolés ayant un groupement sulfate, nous avons pensé qu'il pourrait s'agir d'un précipité de sulfate ou de sulfite. La réaction de caractérisation consiste en l'adjonction de quelques gouttes de BaCl₂ à une solution aqueuse de **pc1**. L'apparition d'un faible précipité blanc en confirme la présence en faible quantité. Afin de déterminer d'autres minéraux présents, le composé **pc1** est analysé par le laboratoire de Toxicologie par ICP-OES et permet de révéler la présence d'ions Na (62,7 mg/g) et K (15,4 mg/g) majoritairement.

BILAN & DISCUSSION

A notre connaissance, il s'agit du premier rapport de flavonoïdes sulfatés à activité antifongique. Le test d'une molécule commerciale d'isorhamnétine pure n'a pas montré d'inhibition de croissance fongique et permet de conclure que la présence du groupement sulfate est impliquée dans l'activité. Nous avons isolé deux flavonoïdes responsables de l'activité antifongique, l'isorhamnétine-3-sulfate et la spinacétine-3-sulfate. Le mélange présente en bioautographie une CMI [ou MAC (minimal amount concentration)] égale à 100 µg/ml. Grâce à l'isolement d'un troisième composé, le 6-MeO-kaempferol-3-sulfate, nous pouvons également établir que la présence du groupement méthoxy en C3' du cycle B est nécessaire à l'activité antifongique.

IV- ACTIVITE ANTIFONGIQUE d'*Enterolobium cyclocarpum*

A- Isolement des composés

Extraction

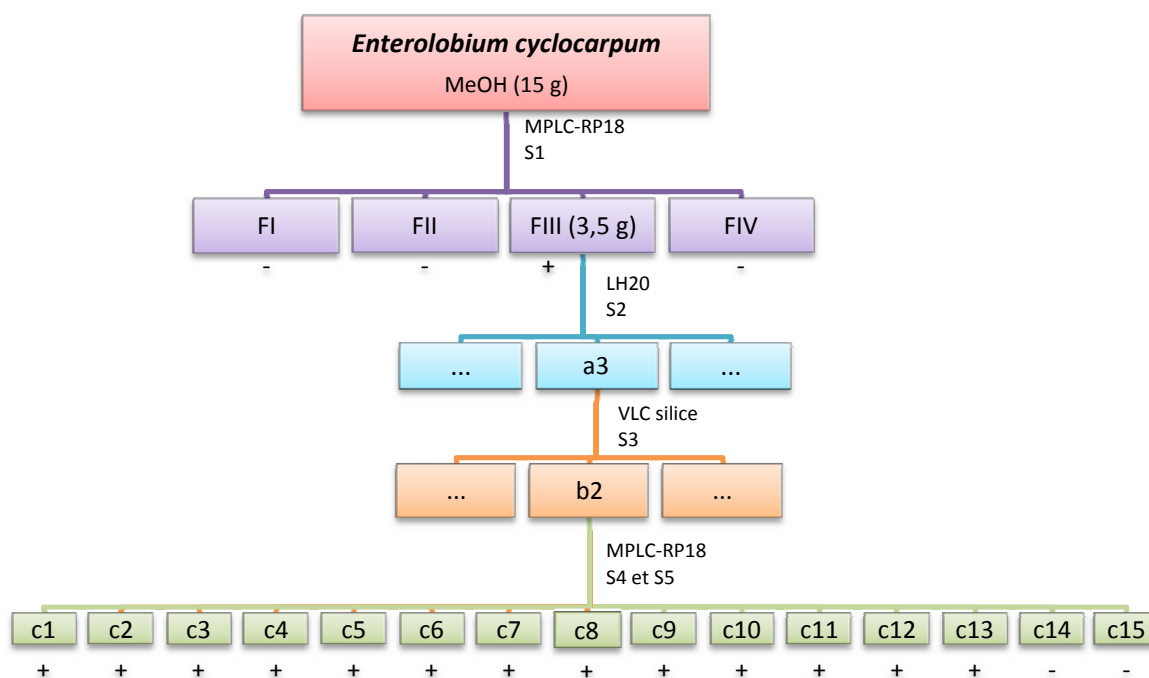
L'écorce d'*Enterolobium cyclocarpum* (514 g) est broyée et extraite à température ambiante avec du méthanol (3 x 3 L). Le filtrat est évaporé sous vide jusqu'à 100 ml puis 150 ml de MeOH/Eau (90:10) sont rajoutés et le mélange est partagé en L/L avec 100 ml de c-Hexane (m = 5,1 g soit 1,0 %). La phase méthanolique est concentrée puis lyophilisée (m = 31,0 g soit 6,0 %).

Fractionnement

15 g (3 x 5 g) d'extrait méthanolique sont chromatographiés sur une colonne Lichroprep[®] RP-18 (44 x 4 cm ; 25-40 µm) par MPLC en mode gradient par le solvant S1: MeOH 50% à 70% et permettent d'obtenir après regroupement 4 fractions. Ces dernières sont alors testées par bioautographie pour leur activité anti-*Scytalidium* grâce à un gelensemencé du champignon.

La fraction III (3,5 g) est active et permet de cibler un spot en CCM de couleur brunâtre après révélation à l'acide sulfurique et gris-violacé à l'anisaldéhyde et laissant apparaître une légère fluorescence bleu-violacée sous UV_{366nm}. Elle est débarrassée des sucres et chlorophylles par

fractionnement sur gel de Sephadex LH20 (38 x 335 mm) avec le solvant S2 : MeOH 100% puis sur une colonne de silice par VLC à l'aide du solvant S3 suivant : CHCl₃/MeOH/Eau (20:10:0 ; 20:10:1 ; 70:40:10 ; 60:40:10 ; 0:0:100). Les fractions sont testées par bioautographie. La fraction active est purifiée par MPLC sur colonne Lichroprep[®] RP-18 (35 x 460 mm ; 25-40 µm) à l'aide d'un gradient S4 MeOH/Eau 20 à 50% et un solvant isocratique S5 : Acétonitrile + TFA 0,05% / eau + TFA 0,05% (70 : 30) sur une colonne Interchrom[®] RP-18 (35 x 460 mm). Nous obtenons 95 fractions regroupées en 15 fractions d'intérêt et testées par bioautographie.

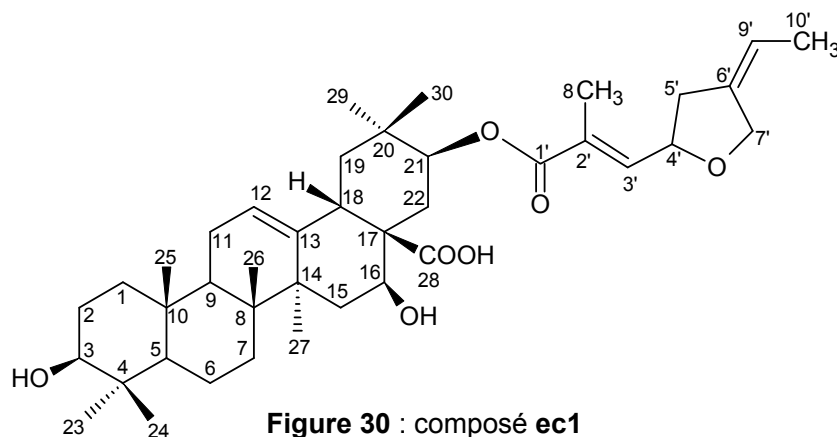


Les fractions sont comparées en RMN et permettent de confirmer qu'il s'agit de mélange de saponosides pour les fractions 1 à 12 mais les signaux des oses et de la génine très complexes superposés les uns aux autres ne permettent pas l'identification. Les fractions 14 et 15 comportent un acide gras non actif. Au vu des résultats, nous décidons de procéder à l'hydrolyse des saponosides afin d'en déterminer la génine (l'isolement des saponosides n'ayant pas été possible). L'hydrolyse acide des fractions c1 à c12 (regroupées) a permis l'isolement de la génine **ec1**.

B- Détermination structurale

Composé ec1

L'identification de ce composé a été réalisée d'après l'analyse des spectres mono- et bidimensionnels de RMN et de masse MS/MS et HRMS. Le composé **ec1** est identifié comme étant l'acacigénine B :



Les spectres HRMS révèlent la formule brute : $C_{40}H_{60}O_7$ et le spectre MS^2 , une partie aglycone ayant une masse de 487 Da et un groupement acyle de 164 Da.

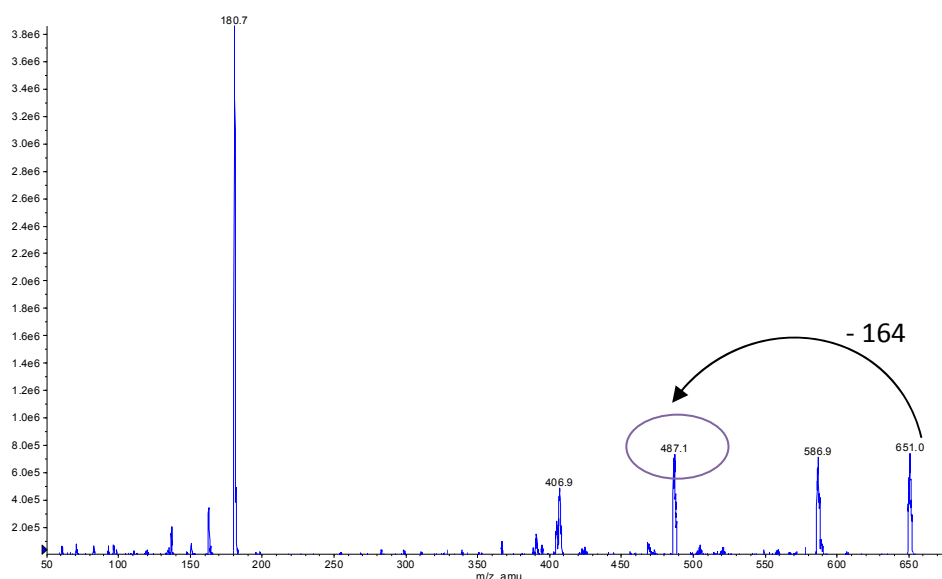


Figure 31 : Spectre de masse du composé ec1 (MS^2 , mode négatif, EC -50V)

Les spectres de RMN 1H et J -mod sont les suivants :

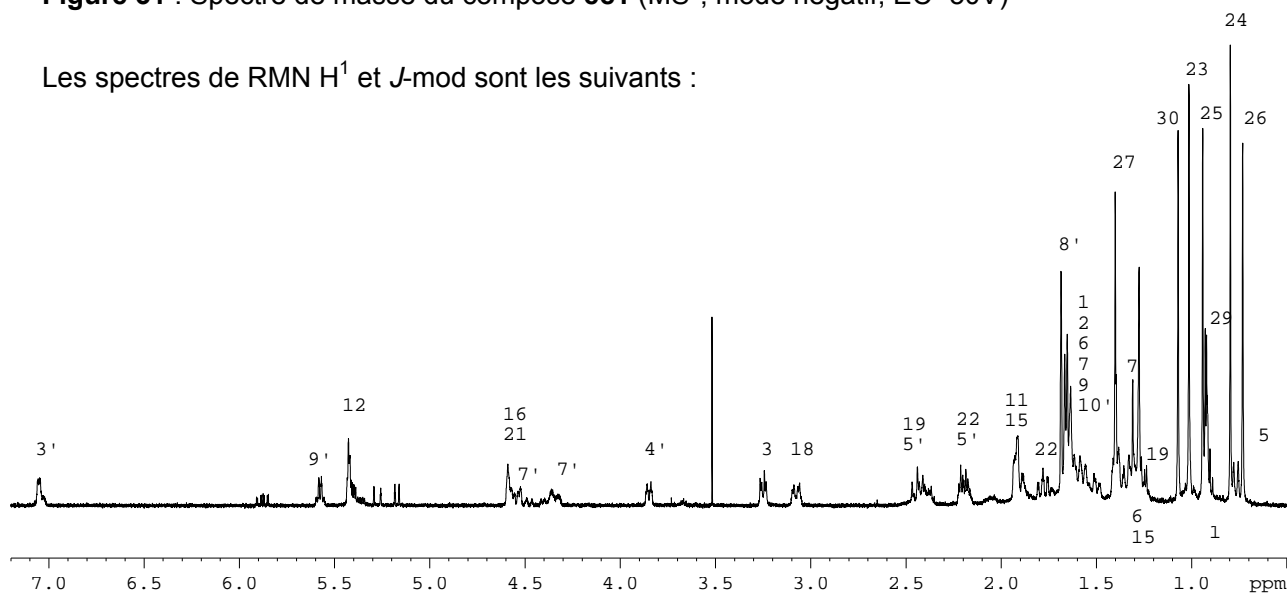


Figure 32 : Spectre de RMN 1H du composé ec1 ($CDCl_3$, 500 MHz)

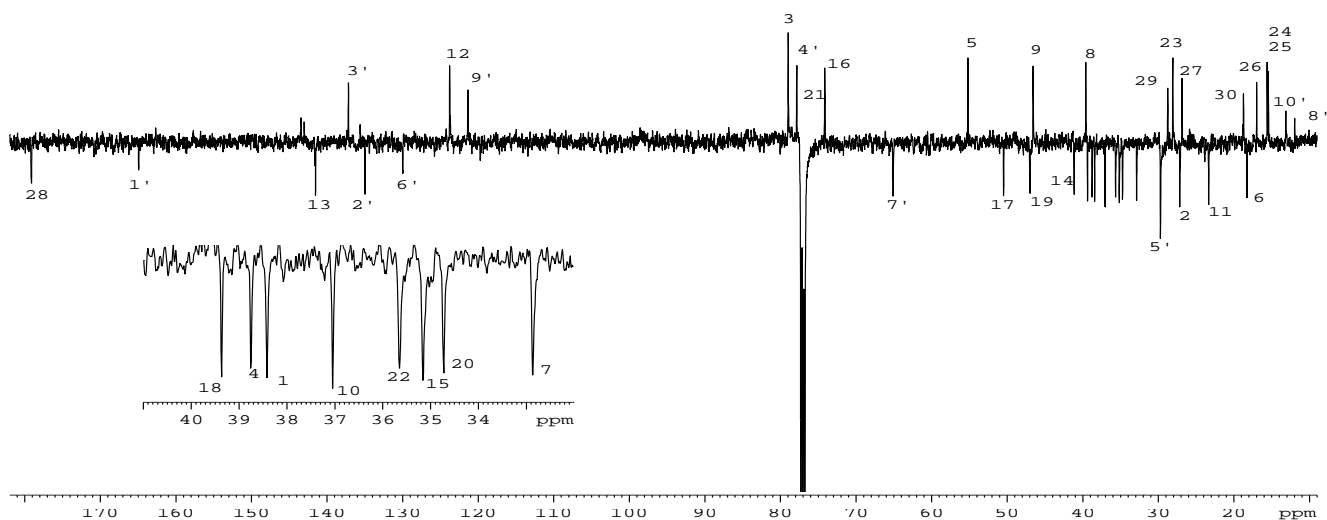


Figure 33 : Spectre de RMN J -mod du composé **ec1** (CDCl_3 , 125 MHz)

Identification de la partie aglycone

Le spectre de RMN ^1H montre la présence de :

- 7 méthyles résonnant sous la forme de 6 singulets et un doublet
- Entre 0,75 et 2,43 ppm les signaux correspondent aux signaux des CH, CH_2 des 5 cycles
- Un proton éthylénique H12 caractéristique à 5,43 ppm
- Un doublet dédoublé à 3,07 ppm ($J = 4,53 \text{ Hz}$; 14,46 Hz) correspondant au proton H18 dont le signal est déblindé consécutivement à sa position en face du cône d'anisotropie du carbonyle 28.
- Un doublet dédoublé, déblindé, situé à 3,25 ppm ($J = 11,1$; 4,2 Hz) correspondant au H3 dont le carbone C3 porte un groupement hydroxyle. ($J_{\text{ax-ax}} = 11,1 \text{ Hz}$ et $J_{\text{ax-eq}} = 4,2 \text{ Hz}$).

Le spectre de RMN ^{13}C montre la présence de :

- 6 méthyles dont les C23, C27 et C30 sont déblindés ($> 25 \text{ ppm}$) du fait de leurs positions équatoriales sur les cyclohexanes : C23 ($\delta_{\text{C}} 28,1$), C27 ($\delta_{\text{C}} 26,9$) et C29 ($\delta_{\text{C}} 28,7$)
- Un ensemble des carbones résonnant entre 18,3 et 55,2 ppm qui correspondent aux CH_2 , CH et Cq
- Les carbones C12 et le carbone quaternaire C13 de la double liaison intracyclique qui résonnent à 123,7 et 141,5 ppm respectivement.
- Le carbonyle C28 résonnant à 179,1 ppm correspond à un acide libre
- Le C3 résonnant à 78,9 ppm

L'analyse des corrélations du spectre HSQC-dept et du spectre COSY permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones et protons 1/2/3 ; 5/6/7 ; 9/11/12 ; 18/19 regroupés dans le tableau 17.

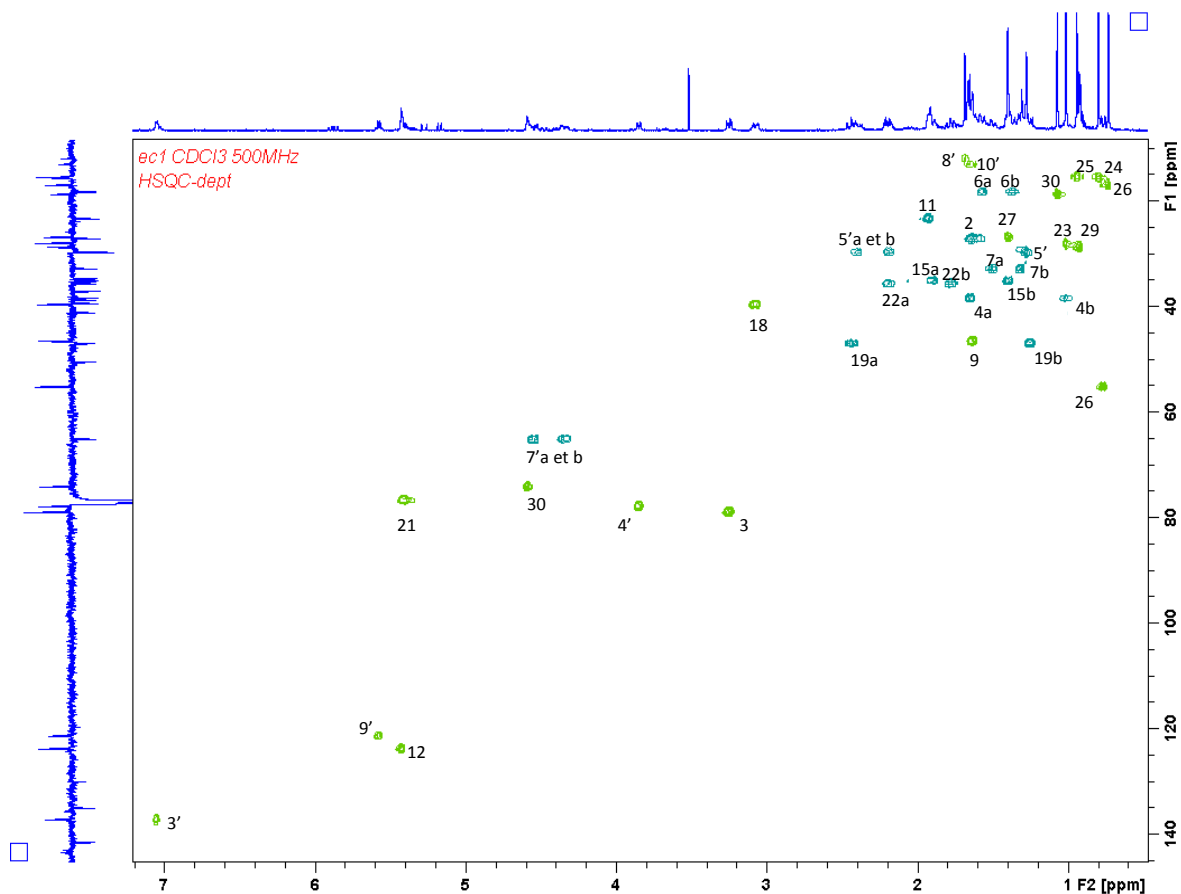


Figure 34 : Spectre HSQC-dept du composé **ec1** (CDCl_3 , 500MHz)

Analyse des spectres HMBC :

Les corrélations $^2J_{\text{H-C}}$, $^3J_{\text{H-C}}$ voire $^4J_{\text{H-C}}$ et $^5J_{\text{H-C}}$ permettent les attributions des méthyles C24 (δ_{C} 15,6), C25 (δ_{C} 15,4), C26 (δ_{C} 16,9), C30 (δ_{C} 18,7) ainsi que les positions des carbones tertiaires et quaternaires 4 et 5 (δ_{C} 38,7 et 55,1 respectivement) ; 9 et 10 (δ_{C} 46,5 ; 37,0 respectivement) ; 8 et 14 (δ_{C} 39,4 et 41,2 respectivement) ; 16 et 17 (δ_{C} 74,2 et 50,4 respectivement) ; 21 et 22 (δ_{C} 76,9 et 35,6 respectivement). Les corrélations du spectre HSQC permettent d'assigner les signaux des protons aux carbones correspondants.

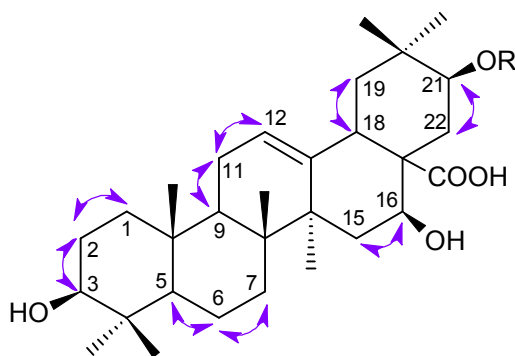


Figure 35 : Principales corrélations COSY des protons de la génine

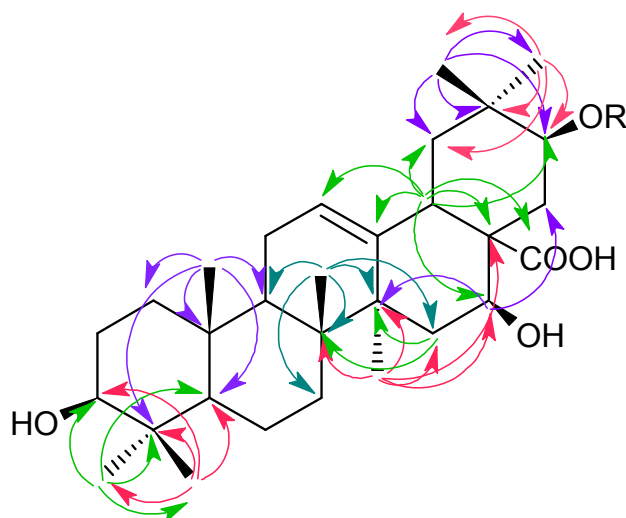


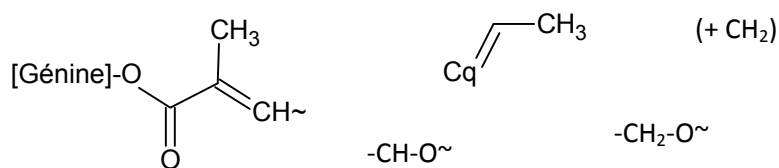
Figure 36 : Principales corrélations HMBC des protons de la génine

La génine triterpénique du composé **ec1** correspond à l'acide acacique.

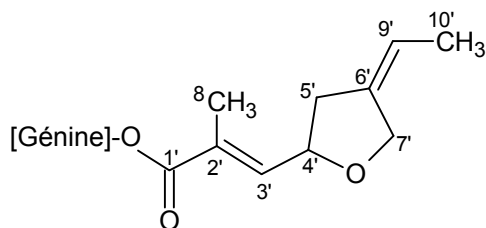
La corrélation HMBC entre le proton H21 à 5,42 ppm et le signal du carbone à 164,9 ppm permet d'attribuer le carbone C1' du groupement acyle.

Identification du groupement acyle

La génine a une formule brute égale à $C_{30}H_{47}O_5$, ce qui nous permet d'en déduire la formule brute du groupement comme étant $C_{10}H_{23}O_2$. Le spectre HSQC-dept (voir figure 33) nous permet de définir 2 CH_3 , 3 CH_2 , 3 CH et 3 Cq. L'analyse du spectre COSY ne permet pas d'avancer une structure complète et montre l'existence de corrélations provenant indéniablement de corrélations supérieures à 2 liaisons. Cependant nous pouvons établir de façon certaine 4 chaînons et un groupement $-CH_2-$:



Nous formulons l'hypothèse suivante :



Par comparaison avec les données RMN ^{13}C et ^1H de la littérature (Anjaneyulu *et al.*, 1979), le groupement est identifié comme le 6'-éthylidène-4'-méthacryloyltétrahydrofurane. Il s'agit d'un dérivé monoterpénique.

Afin de confirmer notre structure nous procédons à des analyses TOCSY sélectives, qui permettent de sélectionner et d'irradier un proton puis par cascade, d'observer les signaux des protons qui corrélient les uns aux autres. L'irradiation des protons à 7,05 ; 3,85 ; 4,34 et 2,19 n'apportent pas de validation du fait des couplages très intenses entre ces derniers (déjà observés en COSY) mais l'irradiation du proton H9' à 5,57 permet de confirmer la présence du branchement méthacryloyle : =CH-CH₃ en C6' et précise la multiplicité des signaux et leur constante de couplage : CH (q, $J = 6,6$ Hz) et CH₃ (d, $J = 6,6$ Hz).

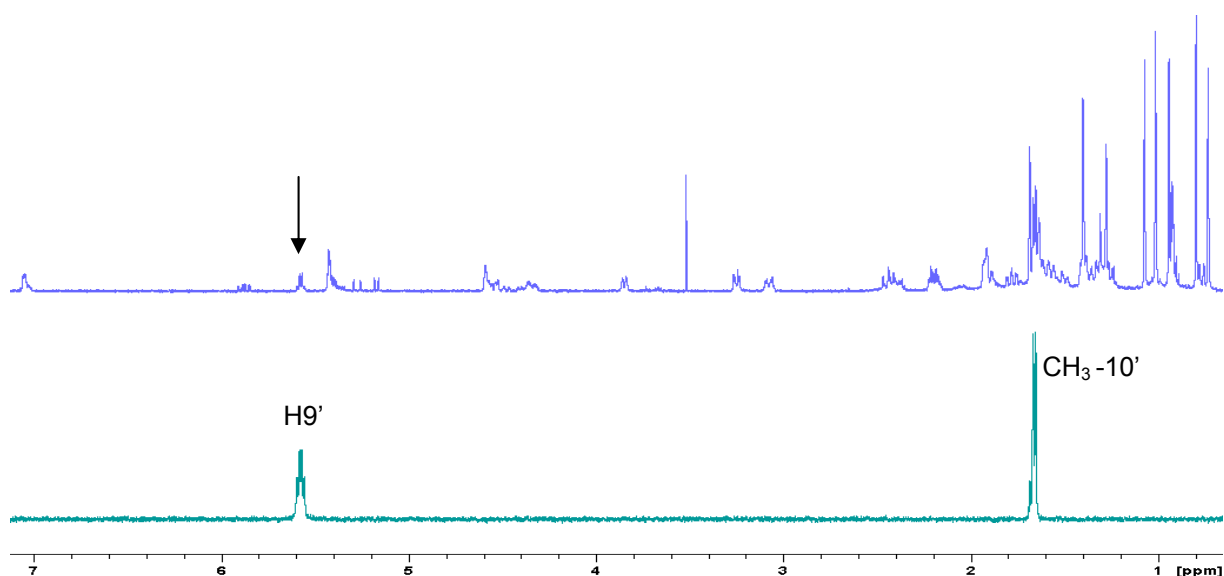


Figure 37 : TOCSY-sélectif après irradiation du proton à 5,57 ppm (H9') temps de mélange : 90s

Remarque :

Le signal du méthyle 29 résonne sous forme d'un doublet contrairement au signal attendu sous forme de singulet. Cependant les couplages, HSQC, COSY, HMBC ne laissent pas envisager d'autres structures possibles telles qu'un CH₃ en position 19 ou encore un CH en position 29 porteur du groupement méthyle. Le spectre NOESY a été réalisé et montre un couplage du méthyle 29 avec le proton en position 21. Les couplages très intenses et non classiques observés dans cette structure nous laisseraient penser qu'il puisse s'agir de ce couplage.

Nous proposons l'analyse suivante du spectre de masse :

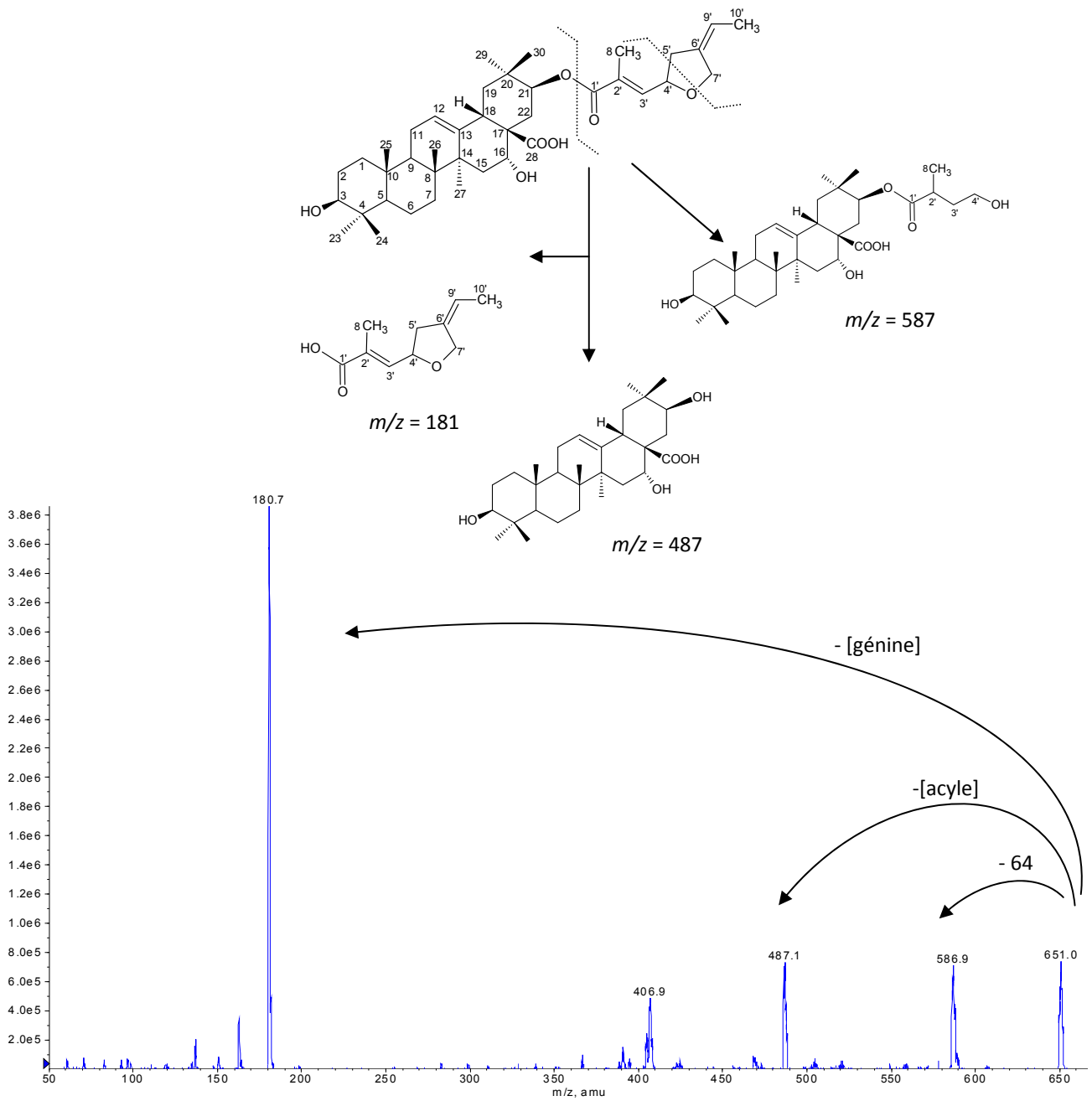


Figure 38: Analyse du spectre de masse MS² de la génine **ec1**

CONCLUSION & DISCUSSION

Enterolobium cyclocarpum n'ayant pas encore fait l'objet d'une étude approfondie de ses composés triterpéniques, il s'agit du premier rapport quant à la nature de la génine de ses saponosides. Il s'agit de l'acacigénine B, déjà isolée d'*Acacia concinna* (Anjaneyulu *et al.*, 1979) et d'*Albizzia julibrissin* (Woo et Kang, 1984), également deux Mimosoideae.

L'activité anti-*Scytalidium* d'*Enterolobium cyclocarpum* est due à des composés triterpéniques glycosylés dont la génine, l'acacigénine B est estérifiée par un acide monoterpénique à structure furanique. Ces premiers résultats permettent d'envisager ces derniers comme marqueurs chimiotaxonomiques de cette espèce afin de la différencier d'*Enterolobium contortisiliquum* dont les saponosides présentent une génine qui ne comporte pas d'hydroxyle en position 16, il s'agit de l'acide oléanolique qui est, de plus, estérifié par un groupement cinnamoyle.

La génine seule testée en bioautographie ne présente pas d'activité entre 1 et 100 µg/ml, les formes glycosylées sont donc indispensables à l'activité.

La fraction enrichie en saponosides a été testée par la méthode NCCLS M38-A2 entre 1,25 et 200 µg/ml et montre une CMI₁₀₀ égale à 25 µg/ml. L'utilisation de la fraction enrichie peut être une piste plus intéressante à exploiter en termes d'efficacité pour cet extrait.

Tableau 17: Corrélations clefs et signaux RMN du composé **ec1** (CDCl₃)

	¹³ C	mult.	¹ H	COSY	HMBC (H → C)
1	38,5	CH ₂	1,65 (ov) 1,01 (ov)	1,64	
2	27,4	CH ₂	1,64 (ov) 1,62 (m)	1,01 ; 3,25	
3	78,9	CH ₂	3,25 (dd, 11,1 ; 4,2 Hz)	1,64 ; 1,62	
4	38,7	Cq	-		
5	55,1	CH ₂	0,76 (d, 11,9 Hz)	1,38 ; 1,55	
6	18,3	CH ₂	1,55 (m) 1,38 (m)	0,76 ; 1,30 ; 1,49	
7	32,9	CH ₂	1,30 (m) 1,49 (m)	1,38 ; 1,55	
8	39,4	Cq	-		
9	46,5	CH	1,63 (m)	1,92	
10	37,0	Cq	-		
11	23,3	CH	1,92 (m)	5,43 ; 1,63	
12	123,7	CH	5,43 (bd s)	1,92	
13	141,5	Cq	-		
14	41,2	Cq	-		
15	35,2	CH ₂	1,40 (ov) 1,90 (m)	4,59	
16	74,2	CH	4,59 (bd s)	1,4 ; 1,90	41,2 ; 35,6
17	50,4	Cq	-		
18	39,6	CH	3,07 (4,53 ; 14,6 Hz)	1,24 ; 2,43	39,6 ; 46,9 ; 50,4 ; 74,2 ; 123,7 ; 141,5 ; 179,1
19	46,9	CH ₂	1,24 (m) 2,43 (m)	3,07	
20	34,7	Cq	-		
21	76,9	CH	5,42 (ov)	1,78 ; 2,49	
22	35,6	CH ₂	1,78 (m) 2,19 (m)	5,42	50,4 ; 74,2
23	28,1	CH ₃	1,01 (s)		15,7 ; 38,5 ; 55,1 ; 78,9
24	15,6	CH ₃	0,79 (s)		28,1 ; 38,5 ; 55,1 ; 78,9
25	15,4	CH ₃	0,94 (s)		35,2 ; 37,04 ; 38,4 ; 46,5 ; 55,1
26	16,9	CH ₃	0,73 (s)		32,8 ; 39,4 ; 41,1 ; 46,5
27	26,9	CH ₃	1,40 (s)		35,2 ; 39,4 ; 41,2 ; 50,4
28	179,1	Cq	-		
29	28,7	CH ₃	0,92 (d)		18,7 ; 34,7 ; 46,9 ; 76,9
30	18,7	CH ₃	1,07 (s)		28,73 ; 34,7 ; 46,9 ; 76,9
1'	164,9	Cq	-		
2'	134,9	Cq	-		
3'	137,1	CH	7,05 (bd s)	2,20 ; 2,39 ; 4,37 (fc) ; 4,52 (fc)	
4'	77,8	CH	3,85 (td, - ; -)	2,19 ; 2,39	
5'	29,7	CH ₂	2,19 (m) 2,39 (m)	4,34 ; 4,54 ; 7,05	
6'	129,9	Cq	-		
7'	65,2	CH ₂	4,34 (m) 4,54 (m)	2,19 ; 2,39 ; 7,05 (fc)	
8'	11,9	CH ₃	1,68 (s)		
9'	121,3	CH	5,57 (q, 6,6 Hz)	1,65	
10'	13,1	CH ₃	1,65 (d, 6,6 Hz)*	5,57	

bd s : broad signal ; ov : overlap ; * voir TOCSY sélectif, signal ov sur le spectre brut ; fc : faible corrélation

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABI AZAR R., 2007

Complexation des protéines lactières par les extraits de gousses vertes de caroubier : Propriétés technologiques des coagulums obtenus

Thèse d'université, AgroParisTech, Paris

ANJANEYULU A.S.R., BAPUJI M., RAMACHANDRA ROW L., SREE A., 1979

Structure of Acacigenin-B, a novel triterpene ester isolated from *Acacia concinna*

Phytochemistry, 18(3), 463-466

ARTZ W.E., BISHOP P.D., DUNKER A.K., SCHANUS E.G., SWANSEN B.G., 1987

Interaction of synthetic proanthocyanidin dimer and trimer with bovine serum albumin and purified beanglobulin fraction

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 35(3), 417-421

BARRON D. et IBRAHIM R.K., 1987

6-Methoxyflavonol 3-monosulfates from *Flaveria chloraefolia*

Phytochemistry, 26(7), 2085-2088

BARRON A.D., VARIN L., IBRAHIM R.K., HARBORNE J.B. WILLIAMS C.A., 1988

Sulfated flavonoids - an update,

Phytochemistry, 27(8), 2375-2395

BATE-SMITH E.C., 1973,

Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency

Phytochemistry, 12(4), 907-912

BRANCO A., PINTO A.C., IFA D.R., BRAZ-FILHO BRANCO R., 2002

Two 8C-methylated Flavonols from the Leaves of *Vellozia candida* Mikan (Velloziaceae)

Journal of Brazilian Chemical Society, 13(3), 318-323

de BRYUNE T., PIETERS L. A. C., DOMMISSE R. A., KOLODZIEJ H., WRAY V., DOMKE T., VLIETINCK A. J., 1996

Unambiguous assignments for free dimeric proanthocyanidin phenols from 2D NMR

Phytochemistry, 43(1), 265-272

CAMPOS A.M., OLIVEIRA F.S, MACHADO M.I.L., BRAZ-FIHO R., MATOS F.J.A., 1991

Triterpenes from *Cedrelea odorata*

Phytochemistry, 30(4), 1225-1229

CORDERO C.P., MORANTES S.J., PAEZ A., RINCON J., ARISTIZABAL F.A., 2009

Cytotoxicity of withanolides isolated from *Acnistus arborescens*

Fitoterapia, 80(6), 364-368

CUYCKENS F., CLAEYS M., 2004

Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids

Journal of Mass Spectrometry, 39(1), 1-15

FABRE N., RUSTAN I., DE HOFFMANN E., QUETIN-LECLERCQ J., 2001

Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry

Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 12(6), 707-715

FAVIER A., 2006

Stress oxydant et pathologies humaines

Annales Pharmaceutiques Françaises, 64(6), 390-396

HARBONE J.B., 1975

Flavonoid sulfates : a new class of sulfur compounds in higher plants

Phytochemistry, 14 (5-6), 1174-1155

HARBONE J.B., 1994

The flavonoids advances in research since 1986

Ed° Chapman & Hall, London, UK

IBRAHIM R.K., ANANVORANICH S., VARIN L. AND GULICK P.J., 1995

The flavonol sulfotransferase family : from metabolites to genes

Polyphenols 94, INRA, Paris, 79-87

JUSTESEN U., 2000

Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy collision activation mass spectrometry for the characterisation of flavonoids in extracts of fresh herbs

Journal of Chromatography A, 902(2), 369-379

JUSTESEN U., 2001

Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry

Journal of Mass Spectrometry, 36(2), 169-178

JUTIVIBOONSUK A., ZHANG H., TAN G.T., MA C., VAN HUNG N., MANH CUONG N., BUNYAPRAPHATSARA N., SOEJARTO D.D., FONG H.S.H., 2005

Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*

Phytochemistry, 66(23), 2745-2751

KAWAGUCHI R. et KUN K.W., 1937

The constituents of *Persicaria hydropiper*

Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 57, 767-769

- KIPASSA N.T, IWAGAWA T., OKAMURA H., DOE M., MORIMOTO Y., NAKATANI M., 2008
Limonoids from the stem bark of *Cedrela odorata*
Phytochemistry, 69(8), 1782-1787
- MA Y.L., LI Q.M., VAN DER HEUVEL H., CLAEYS, 1997
Characterisation of flavones and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry
Rapid Communication in Mass Spectrometry, 11(12), 1357-1364
- MALDINI M., MONTORO P., PIACENTE S., PIZZA C., 2009
Phenolic compounds from *Bursera simaruba* Sarg. Bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by tandem mass spectrometry
Phytochemistry, 70(5), 641-649
- MALDINI M., MONTORO P., PIACENTE S., PIZZA C., 2009
ESI-MS, ESI-MS/MS fingerprint and LC-ESI-MS analysis of proanthocyanidins from *Bursera simaruba* Sarg bark.
Natural Product Communications, 4(12), 1671-1674.
- MIMAKI Y., HARADA H., SAKUMA C., HARAGUCHI M., YUI S., KUDO T., YAMAZAKI M., SASHIDA Y., 2004,
Contorsiliosides A-G: Isolation of seven new triterpene bidesmosides from *Enterolobium contortisiliquum* and their cytotoxic activity
Helvetica Chimica Acta, 87(4), 851-865
- MIMAKI Y., HARADA H., SAKUMA C., HARAGUCHI M., YUI S., KUDO T., YAMAZAKI M., SASHIDA Y., 2003,
Enterolosaponins A and B, novel triterpene bidesmosides from *Enterolobium contortisiliquum*, and evaluation for their macrophage-oriented cytotoxic activity
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 13(4), 623-627
- NOGUERA B., DIAZ E., GARCIA M.V, SAN FELICIANO A., LOPEZ-PEREZ JL., ISRAEL A., 2004
Anti-inflammatory activity of leaf extract and fractions of *Bursera simaruba* (L.) Sarg (Burseraceae)
Journal of Ethnopharmacology, 92(1), 129-133
- OP de BECK P., 1999
Etude phytochimique et biologique de *Leea guineensis* G. DON (Leeaceae)
Thèse d'université, Joseph Fournier, Pharmacie, Grenoble I
- PERERA W., NOGUEIRAS C., PAYO A., DELGADO G., QUEIROZ B., SARDUY R., OQUENDO M., 2007
Flavonols from leaves of *Pluchea carolinensis* (Jacq.) G. Don (Asteraceae)

Revista Latinoamericana de Química, 35(3), 68-73

PORTER L., 1986

Number- and weight-average molecular weights for some proanthocyanidin polymers (condensed tannins)

Australian Journal of Chemistry, 39(4), 557-562

de RIJKE E., OUT P., NIESSEN W.M.A., ARIESE F., GOOIJER C., BRINKMAN U.A.T., 2006

Analytical separation and detection methods for flavonoids

Journal of Chromatography A, 1112(1-2), 31-63

SATHIAMOORTHY B., GUPTA P., KUMAR M., CHATURVEDI A.K., SHUKLA P.K., MAURYA R., 2007,

New antifungal flavonoid glycoside from *Vitex negundo*

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 17(1), 239-242

TARASCOU I., BARATHIEU K., SIMON C., DUCASSE M.A., ANDRE Y., FOUQUET E., DUFOURC E.J., de FREITAS V., LAGUERRE M., PIANET I., 2006

A 3D structural and conformational study of procyanidin dimers in water and hydroalcoholic media as viewed by NMR and molecular modeling

Magnetic Resonance in Chemistry, 44(9), 868-80

WOO W.S., KANG S.S., 1984

Isolation of new monoterpene conjugated triterpenoid from the stem bark of *Albizzia julibrissin*

Journal of Natural Products, 47(3), 547-549

WU W., YAN C., LI L., LIU Z., LIU S., 2004

Studies on the flavones using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry

Journal of Chromatography A, 1047(2), 213-220

YASUNAKA K., ABE F., NAGAYAMA A., OKABE H., LOZADA-PREZ L, LOPEZ-VILLAFRANCO E., MUÑIZ E.E, AGUILAR A., REYES-CJILPA R., 2005

Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes

Journal of Ethnopharmacology, 97(2), 293-299

V. CONTROLES ET FORMULATIONS DES EXTRAITS

I- CONTROLE DES POUDRES ET DES EXTRAITS

A- MISE AU POINT DES METHODES DE DOSAGE DES EXTRAITS

Le dosage des principes actifs ou traceurs chimiques permet le contrôle des extraits et assure aux patients un produit standardisé de qualité constante.

Nous avons réalisé la mise au point des méthodes de dosage pour trois des extraits :

① Dosage HPLC de la (+)-catéchine dans l'extrait de *Cedrela odorata*.

Les conditions retenues sont les suivantes :

Colonne : Kromasil® RP18 (150 x 4,6 mm)

Débit : 0,1 ml/min

Détection à 365 et 260 nm

Gradient : *solvant A* : Eau + 2% AcOH / *solvant B* : ACN

Temps (min)	% du solvant B
0	8
25	10
30	100
35	0

Une gamme étalon est réalisée à partir d'une référence commerciale de (+)-catéchine (Sigma) entre 0 et 60 µg/µl. Chaque concentration est injectée trois fois puis la moyenne des aires des pics est calculée. La droite étalon est la suivante :

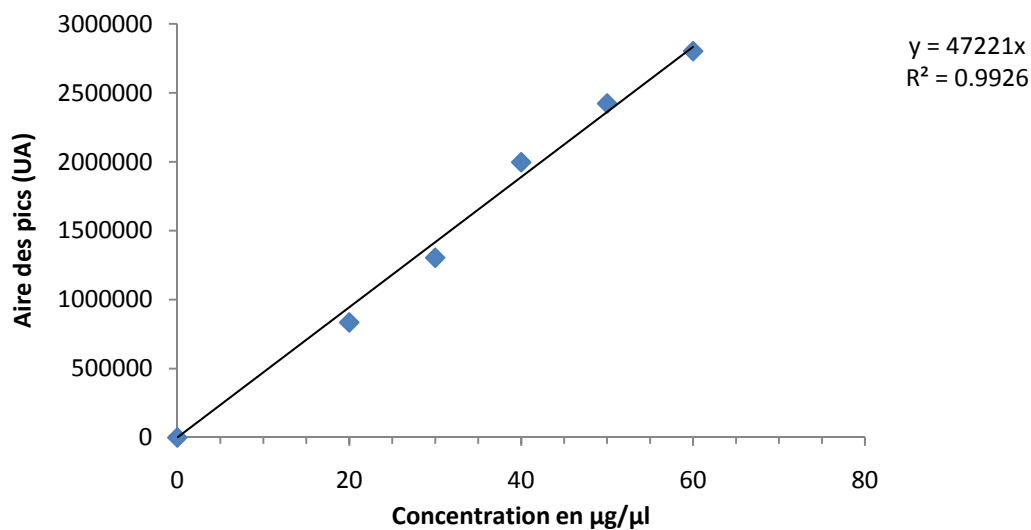


Figure 39 : Gamme étalon de la (+)-catéchine

L'extrait EtOH/Eau (1:1, v/v) de *Cedrela odorata* est dosé à partir d'une solution à 1 mg/ml et contient 2,4 mg de (+)-catéchine par g d'extrait brut.

② Dosage spectrophométrique des saponosides de l'extrait d'*Enterolobium cyclocarpum*

Il s'agit d'une méthode qui permet de déterminer la teneur totale en saponosides triterpéniques adaptée d'une méthode décrite par Ebrahimzadeh et Niknam. Ce dosage peut être réalisé à partir d'une référence commerciale de saponosides telle que la « saponin white pure » (Merck) ou grâce à la fraction de saponosides purifiée.

Le protocole est le suivant :

Une solution mère de saponosides est préparée à l'aide de méthanol (20 mg dans 100 ml) puis 4 ml, 2 ml, 1 ml, 0,5 ml, 0,25 ml et 0,125 ml sont prélevés et mis dans des tubes à sceller. Le méthanol est évaporé et nous permet d'avoir 800, 400, 200, 100, 50, 25 µg de saponosides dans chaque tube respectivement.

5 ml d'une solution de vanilline à 0,7% dans de l'acide sulfurique à 65% (EtOH) sont rajoutés à chaque tube. Le réactif doit être préparé extemporanément. Après avoir vortexé et scellé les tubes, ils sont mis au bain marie à 60°C pendant 1h. Les tubes sont refroidis dans un bain de glace pendant 10 min puis l'absorbance est lue à 545 nm.

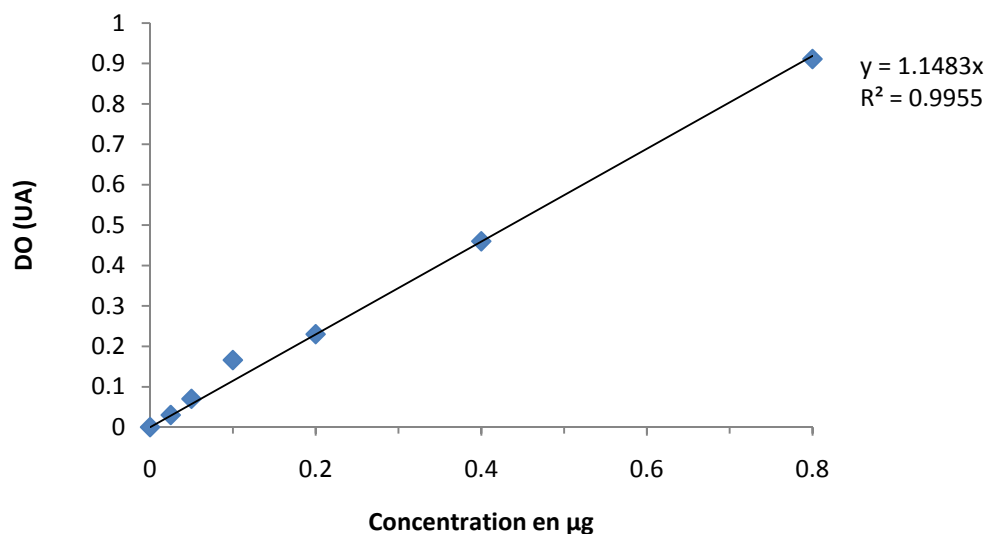


Figure 40 : Gamme étalon des saponosides (545 nm)

En suivant le même protocole, l'extrait est dosé à 400 µg. L'extrait brut EtOH d'*Enterolobium cyclocarpum* contient 300 mg de saponosides par g d'extrait.

③ Dosage spectrophométrique des flavonoïdes sulfatés de *Pluchea carolinensis*

Contrairement aux deux dosages précédents, il n'y a pas de molécules de référence commerciale pour cet extrait. Une méthode rapide en vue de l'isolement de la fraction des flavonoïdes sulfatés a été élaborée.

L'extrait brut est séparé par partage grâce à un solvant triphasique : n-Heptane/MtBE/ACN/Eau (1:1:1:2, v/v/v/v). La phase intermédiaire est récupérée puisque la supérieure apolaire concentre les pigments et les composés apolaires alors que la phase inférieure concentre les composés hydrophiles. La phase intermédiaire est passée sur une résine XAD 7HP. Une purification sur CCM préparative sur plaque de gel de silice à l'aide du solvant suivant : AcOEt/Acide formique/Eau (10:1:4, phase supérieure) permet d'isoler les flavonoïdes sulfatés ($0,27 < R_f < 0,42$).

Le principe du dosage repose sur l'addition d' $AlCl_3$. La gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère de la fraction purifiée entre 6,25 et 100 $\mu g/ml$ dans du méthanol.

1 ml d'une solution d' $AlCl_3$ à 2% dans du méthanol est rajouté à 1 ml de solution puis la solution est vortexée et mise sous agitation à l'obscurité pendant 10 min. La DO est mesurée à 355 nm.

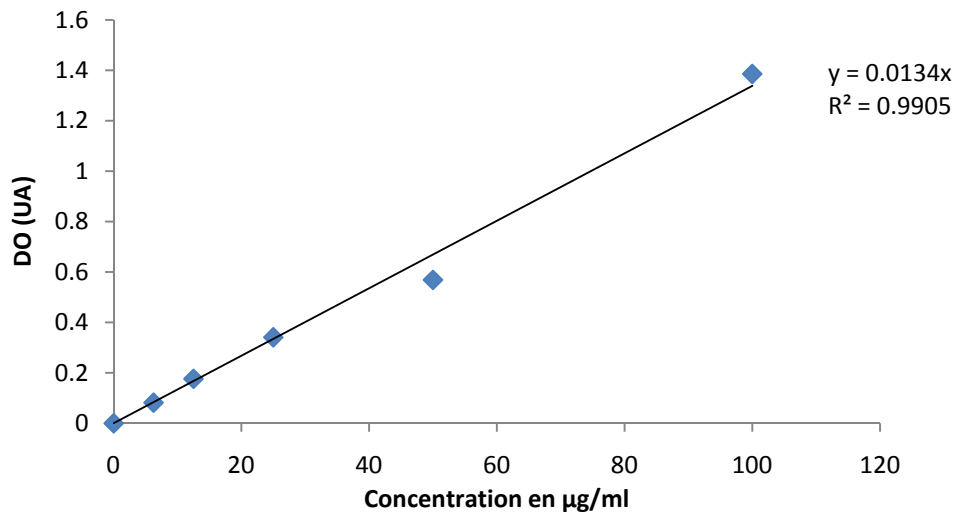


Figure 41 : Gamme étalon des flavonoïdes sulfatés

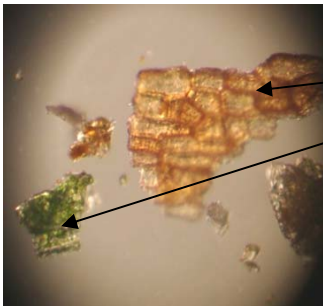
L'extrait est testé à 150 $\mu g/ml$ (15 mg dans 100 ml). L'extrait brut EtOH/Eau (1:1, v/v) de *Pluchea carolinensis* contient 5,7 mg de flavonoïdes sulfatés par g.

B- ETUDE DES POUDRES

Bursera simaruba

Couleur : brun-rouge avec quelques fragments verts.

Odeur : aromatique



Objectif x10 : suber



Objectif x10 : fibres



Objectif x40 : Présence de quelques grains d'amidon

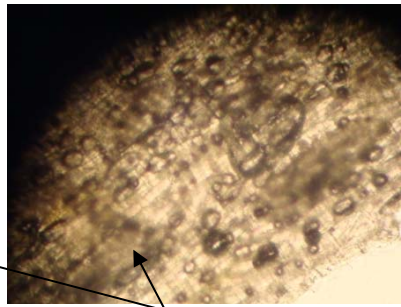
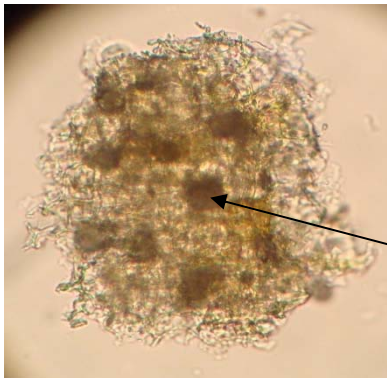
Cedrela odorata

Couleur : brun-orangé

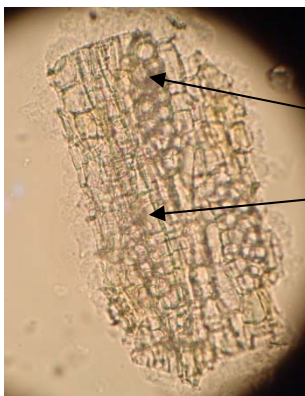
Odeur : forte, surtout à l'état frais



Objectif x10 : vaisseaux



Objectif x10 : contenu organique



Objectif x10 : vaisseaux

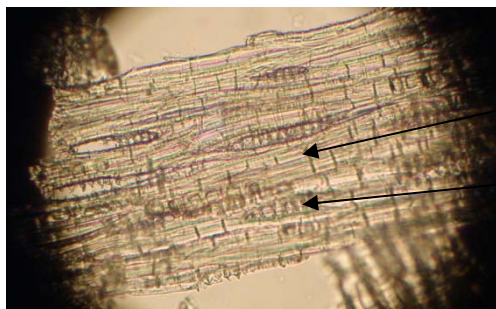
Faisceaux

Fibres du liber

Enterolobium cyclocarpum

Couleur : beige avec quelques fragments marrons foncés

Odeur : végétale, classique



Objectif x10 : vaisseaux

Fibres du liber

Faisceaux



Objectif x10 : cellules pigmentées ou résine

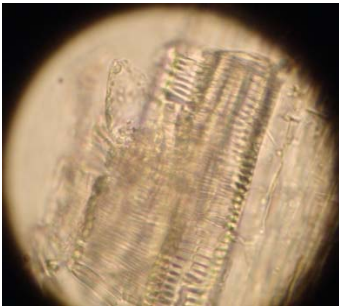


Objectif x10 : contenu organique

Pluchea carolinensis

Couleur : vert kaki

Odeur : caractéristique forte



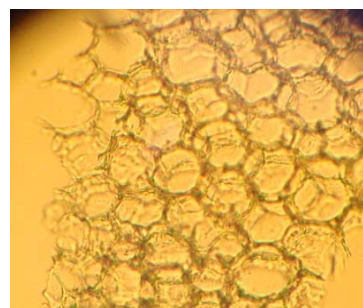
Objectif x40 : vaisseaux réticulés



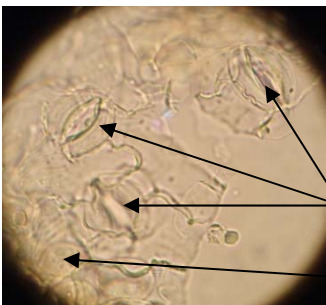
Objectif x40 : poils tecteurs pluricellulaires unisériés



Objectif x10 : fragment de limbe
(cellules palissadiques)



Objectif x40 : moelle



Objectif x40 :
stomates
cuticule striée

II- FORMULATION DES EXTRAITS

La forme galénique est un critère important de choix : crème, gel, pommade, poudre, lait, solution filmogène... les formes sont variées.

Les crèmes et pommades sont préférées sur les peaux sèches, hyperkératosiques ; les gels et les poudres sont plutôt utilisés dans les intertrigos et pour les lésions suintantes ; les lotions, gels, crèmes peuvent s'appliquer pour le Pityriasis versicolor ; enfin les solutions filmogènes sont réservées aux onyxis.

Afin de permettre une formulation adéquate et une efficacité optimale de la substance active, chaque extrait a été pensé en fonction de son site d'action.

A - SITE D'ACTION DE L'ANTIFONGIQUE : L'EPIDERME

La peau représente environ 2 m² soit 13% du poids du corps chez l'adulte (Wehrle, 2007). Elle est composée de 3 compartiments principaux : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Notre site d'action antifongique principal est l'épiderme.

L'épiderme pluricellulaire, pluristratifié et différencié est en renouvellement constant. La partie la plus externe, couche cornée ou *stratum corneum*, par sa composition lipidique et son organisation cellulaire, joue un rôle majeur dans la fonction barrière de la peau. Les kératinocytes sont les cellules principales de l'épiderme. Les cellules de Langerhans sont responsables de son immunité cellulaire, les mélanocytes de sa pigmentation et de sa protection contre les rayons ultraviolets du soleil.

Lorsqu'une préparation médicamenteuse est appliquée sur la peau, la première étape biopharmaceutique aboutit à la libération totale ou partielle de la substance active, dans un milieu de dissolution complexe qui comprend :

- les constituants du véhicule ;
- les constituants du site d'application (eau, sébum, électrolytes, flore bactérienne...).

Il est donc important de définir une forme qui limite la diffusion des molécules actives dans les couches profondes et qui permette parallèlement une diffusion rapide sur la surface de la peau.

Nous avons opté pour un gel pour les extraits de *Pluchea carolinensis* dans le traitement du Pityriasis versicolor (lota), ainsi que pour les extraits d'*Enterolobium cyclocarpum*, de *Cedrela odorata* et *Bursera simaruba* dans le traitement des intertrigos et hyperkératoses.

B - SITE D'ACTION DE L'ANTIFONGIQUE : L'ONGLE

Les formes galéniques classiques, de type crème ou gel, ne peuvent pas pénétrer de façon satisfaisante la lame unguéale. L'ongle est formé de plusieurs couches de kératine qui lui

confèrent un caractère dur et résistant. Les solutions filmogènes sont mieux adaptées à cette structure.

Nous avons choisi ce type de formule pour l'extrait d'*Enterolobium cyclocarpum* dans le traitement des onyxis à *Scytalidium* et pour les extraits de *Bursera simaruba* et de *Cedrela odorata* dans le traitement des onyxis à dermatophytes et *Candida*. Ces formulations sont encore en cours.

Pour des raisons de confidentialité, le contenu des formules ne sera pas explicité plus en détail.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

HEBRAHIMZADEH H. et NIKNAM V., 1998

A revisited spectrophotometric method for determination of triterpenoid saponins

Indian Drugs, 35(6), 379-381

WEHRLE P. (sous la direction), 2007

Pharmacie Galénique : formulation et technologie pharmaceutique

Ed° Maloine, Paris, France

MARTINI M.C ET SEILLIER M., 2006

Actifs et additifs en cosmétologie, 3^{ème} édition

Ed° TEC & DOC, Paris, France

MAUTRAIT C. et RAOULT R., 1997

Les excipients exclusifs et partiels en pharmacie

Collection Porphyre, 2^{ème} édition

Ed° GROUPE LIAISONS, Reuil-Malmaison, France

VI. CONCLUSION & PERSPECTIVES

Au travers de deux axes : la pneumocystose et les mycoses superficielles, nous avons pu sélectionner et caractériser différents extraits grâce à la détermination des concentrations minimales inhibitrices et à l'isolement des principes actifs quand cela a été possible.

AXE 1 : PNEUMOCYSTOSE

Alors que l'on dispose de prophylaxies très efficaces et bien tolérées, la **pneumocystose** reste une affection fréquente, grave et avec un taux de mortalité élevé chez de nombreux patients immunosupprimés (oncologie, maladies inflammatoires, transplantation de moelle ou d'organe solide, VIH). A l'heure actuelle, la pneumocystose reste la maladie qui permet d'établir le plus fréquemment le diagnostic du SIDA en France et en Europe.

Deux plantes ont été sélectionnées et étudiées pour leurs activités anti-*Pneumocystis in vitro* au niveau du laboratoire de Lille, *Cedrela odorata* et *Acnistus arborescens*.

Les problématiques liées au traitement interne (toxicité interne, notion de « produits », biodisponibilité...) nécessitent des études complémentaires poussées. Cependant, l'activité d'une molécule aussi facile à isoler ou synthétiser que la (+)-catéchine peut être une nouvelle perspective de modèle moléculaire pour la recherche par la chimie combinatoire dans le traitement de cette maladie.

De plus, grâce à la comparaison différentielle des résultats entre la pneumocystose et les mycoses superficielles, nous avons pu comprendre en partie la synergie d'action impliquant le rôle premier des tanins et le pouvoir antifongique de la (+)-catéchine dans l'extrait de *Cedrela odorata*.

De même, le fractionnement d'*Acnistus arborescens*, a permis de mettre en lumière l'activité antifongique de deux withanolides mais également leurs cytotoxicités. Ce dernier point ne permet pas la poursuite de la recherche sur ces molécules en tant que telles mais apporte à d'autres domaines tels que l'étude des relations structures/activités ou encore des perspectives de modèles moléculaires dans les thérapies anticancéreuses.

AXE 2 : MYCOSES SUPERFICIELLES

Dans la Caraïbe et notamment en Guadeloupe, lieu de l'enquête réalisée, les mycoses superficielles posant le plus de difficultés de traitement sont les **onychomycoses** et **intertrigos (chofi)** à dermatophytes, *Scytalidium* et *Candida*. Les onychomycoses sont également reportées lors d'études chiffrées en Europe, comme représentant près de 40% de la pathologie unguéale. Ces dernières sont donc en passe de devenir une pathologie importante au cours des prochaines années et nécessite la poursuite de la recherche de nouveaux antifongiques.

Nous nous sommes également intéressés à deux autres pathologies superficielles : le **Pityriasis versicolor** appelé Lota et les **teignes**.

Il convient de souligner que dans la pathologie fongique, ces trois types de mycoses sont fréquents et universels. Nous nous sommes inscrits dans cette dynamique de recherche de nouveaux antifongiques afin d'apporter une réponse originale et efficace à ce besoin.

Le screening antifongique que nous avons réalisé nous permet ainsi de proposer dans un premier temps une liste de 7 plantes actives *in vitro* vis-à-vis de ces pathologies : *Bursera simaruba*, *Cedrela odorata*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Evolvulus alsinoides*, *Gliricidia sepium*, *Pluchea carolinensis* et *Pluchea odorata*.

Les tests de cytotoxicité menés sur les extraits EtOH ou EtOH/Eau (1:1, v/v) des quatre plantes les plus actives tant au niveau de leur spectre d'action que des concentrations minimales inhibitrices, à savoir : *Bursera simaruba*, *Cedrela odorata*, *Enterolobium cyclocarpum* et *Pluchea carolinensis*, ont permis de montrer l'innocuité des extraits testés de *Pluchea carolinensis* et *Cedrela odorata* vis-à-vis de la lignée cellulaire dérivée de kératinocytes HaCat. Les extraits d'*Enterolobium cyclocarpum* et de *Bursera simaruba* révèlent respectivement une moyenne et une forte activité cytotoxique vis-à-vis de ces cellules HaCat. L'application à usage externe de tels extraits nous permet de relativiser ce résultat en préconisant des recommandations quant à la fréquence d'utilisation. Il est bien entendu, que la poursuite de telles pistes en termes de formulation nécessitera la mise en place de tests cliniques.

L'étude phytochimique bioguidée de ces quatre extraits a permis d'aboutir à l'isolement des principes actifs pour deux plantes. *Pluchea carolinensis* renferme des flavonoïdes sulfatés : l'isorhamnétine-3-sulfate et la spinacétine-3-sulfate alors qu'*Enterolobium cyclocarpum* contient des saponosides à génine triterpénique de type acacigénine B, responsable de l'activité. Les extraits de *Bursera simaruba* et *Cedrela odorata*, nous auront permis de nous confronter aux conséquences éventuelles du fractionnement phytochimique et à la perte d'activité induite. Les différentes classes de composés ont des propriétés complémentaires et agissent en synergie, pour un effet totum. Ceci rend compte de la complexité organisée de la Nature.

Grâce à ces presque 3 années d'expérimentations qui m'ont permis d'avoir une vision plus globale du processus, il m'apparaît intéressant de souligner, d'une part, les étapes à améliorer :

- ❶ La réalisation des extraits traditionnels à l'identique (décoction, jus...) parallèlement à la réalisation des extraits à l'aide de solvants organiques puis les tests antifongiques et cytotoxiques.
- ❷ Pour un screening primaire des extraits, quelques souches de genres distincts suffisent. Une fois les extraits intéressants sélectionnés, un nombre de souches beaucoup plus important peut être utilisé.

Et d'autre part, de souligner les points mis en œuvre qui me paraissent importants de considérer dans une telle démarche :

- ❶ La prise en compte des éventuelles synergies de composés dans la plante
- ❷ La définition des limites des modèles utilisés *in vitro* ou lors du fractionnement afin de valider correctement les résultats
- ❸ Les souches utilisées doivent provenir d'isolats cliniques en priorité afin de se rapprocher au plus près des conditions *in vivo*

Le dosage des principes actifs ou traceurs chimiques des extraits (3/4) ainsi que la caractérisation macroscopique de leurs poudres ont été réalisés et s'inscrivent dans le processus du contrôle-qualité réalisé par le laboratoire Phytobôkaz. Les extraits standardisés assurent une qualité de production constante. De plus, ceci permettra d'éventuels points d'amélioration pour la suite tels que les opérations qui concernent la récolte (date, stade physiologique) et les élaborations nécessaires (séchage, stockage, etc.). De nombreux paramètres influent sur la qualité d'un extrait, comme le représente la figure 42.

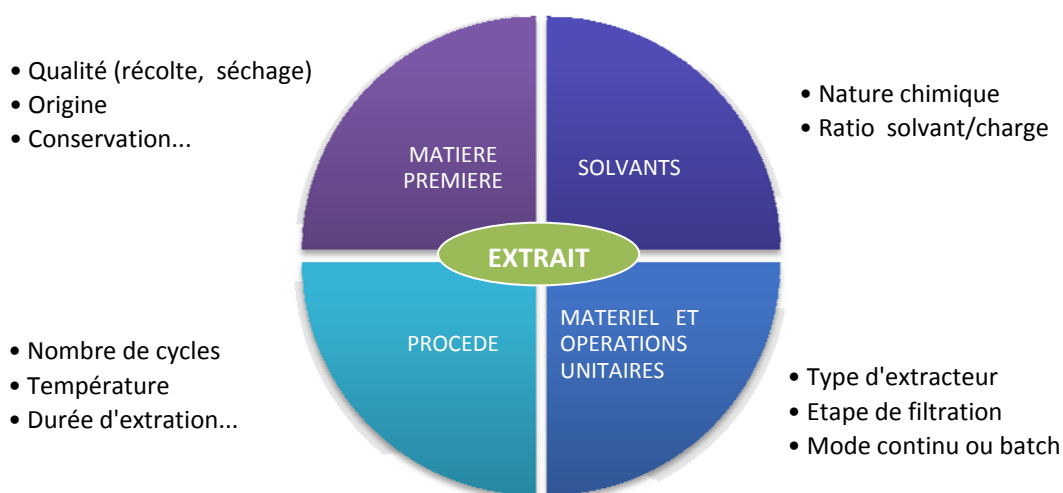


Figure 42 : Principaux paramètres influençant la qualité des extraits

Faisant suite aux tests d'activité antifongique, de cytotoxicité, d'isolement des principes actifs et à la mise au point de méthodes de dosage des extraits, nous avons abordé leur mise en formulation. Les formes retenues (gel ou solution filmogène) dépendent des atteintes et de leurs localisations.

Les dermatophytes sont des champignons très résistants qui sont encore présents après un an dans une paire de chaussures non utilisées. Les molécules dites idéales devront donc avoir une diffusion et une rémanence importante dans la peau et l'ongle. De plus, dans la pathologie fongique et pour l'élaboration de formulations adéquates, il est important de noter que les lésions peuvent être co-infectées c'est à dire que l'on rencontre à la fois un dermatophyte mais aussi une

moisissure. C'est pourquoi, l'optimisation des formulations est une de nos perspectives à court terme.

L'optimisation du protocole en vue de l'obtention de fractions enrichies notamment pour *Enterolobium cyclocarpum* peut être une perspective en termes de développement industriel.

Pour finir, la sélection et la validation des extraits par les tests antifongique et cytotoxique *in vitro* puis la formulation demeurent des étapes clef de la R&D de nouveaux antifongiques, cependant, elles ne sont pas garantes des étapes ultérieures. Un bon produit, devra pour être apprécié des patients, être bien toléré (pas de gênes, démangeaisons, facile à appliquer etc.). Le « feed-back produit » et les tests sur l'Homme sont donc très importants. C'est pourquoi, l'autre volet de nos perspectives sera la mise en place d'essais cliniques afin de les valider au niveau du patient avant d'envisager les « scale-up » ultérieurs.

VII. MATERIEL ET METHODES

I- MATERIEL VEGETAL ET EXTRACTION

COLLECTE DES PLANTES

Les plantes ont été collectées dans leur milieu naturel ou dans le jardin Phytobôkaz puis séchées sur place. Un échantillon d'herbier des plantes étudiées est référencé à l'Herbier de l'INRA, Petit-Bourg (Guadeloupe).

Tableau 18 : Matériel végétal

Nom scientifique	Organe récolté	Lieu et Date de récolte	Masse fraîche (kg)	Masse sèche (kg)	% d'eau**
<i>Acnistus arborescens</i>	Feuilles	Gourbeyre, Déc. 2007	1,93	0,34	82
<i>Bursera simaruba</i>	Ecorce de tige	Deshaies, Juill. 2007 - Août 2008	0,85	0,22	74
<i>Cedrela odorata</i>	Écorce de tige	Gourbeyre, Déc. 2007 - Août 2008	4,22	1,43	66
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	Écorce de tige	Gourbeyre, Déc. 2007- Août 2008	1,32	0,61	54
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	Ecorce de racine	Gourbeyre, Fév. 2008	0,22	0,09	65
<i>Evolvulus alsinoides</i>	Parties aériennes	Gourbeyre, Déc. 2007	1,18	0,30	75
<i>Gliricidia sepium</i>	Feuilles	Goyave, Déc. 2007	2,15	0,46	79
<i>Pisonia aculeata</i>	Parties aériennes	Gourbeyre, Déc. 2007	5,46	2,47	55
<i>Pluchea carolinensis</i>	Feuilles	Petit-Canal, Déc. 2007- Août 2008	3,05	0,60	80
<i>Pluchea odorata</i>	Feuilles	Ste-Rose, Jan. 2008	*	0,24	*
<i>Pluchea odorata</i>	Racines	Ste-Rose Fév. 2008	*	0,03	*
<i>Senna bicapsularis</i>	Feuilles	Gourbeyre, Déc. 2007	0,69	0,12	82

* La masse fraîche n'a pu être pesée

** $100 - [(Masse\ fraîche/masse\ sèche) \times 100]$

Les 4 plantes sélectionnées : *C. odorata*, *B. simaruba*, *E. cyclocarpum* et *P. carolinensis* ont été à nouveau récoltées en Août 2008 et broyées sur place grâce à un broyeur à couteaux (non disponible au laboratoire de pharmacognosie).

REALISATION DES EXTRAITS BRUTS EN VUE DU SCREENING PHYTOCHIMIQUE ET DU SCREENING ANTIFONGIQUE

Les plantes sont broyées à l'aide d'un blender puis extraites par trois solvants indépendamment : c-hexane, EtOH ou EtOH/Eau (1:1) à température ambiante par macération sous agitation pendant 24h et ce, à trois reprises. Pour cela, 30 g de plante sont extraits par 200 ml de solvant (sauf pour les racines de *P. odorata* et les racines d'*E. cyclocarpum* où 9 g de plante ont été

extraits en gardant le même ratio plante/solvant) puis filtrés. Le marc est à nouveau repris deux fois dans les mêmes conditions. Les filtrats sont réunis, évaporés au moyen d'un évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor®) et mis à sec pour les extraits c-hexane et EtOH alors qu'ils sont réduits au maximum jusqu'à évaporation de l'EtOH puis lyophilisés pour les extraits EtOH/Eau (1:1, v/v). La température maximale atteinte à l'aide de l'évaporateur rotatif est de 40°C. Le lyophilisateur permet quant à lui de sublimer (passage de l'état solide à l'état vapeur) l'extrait après congélation (-20°C) et d'obtenir un extrait EtOH/Eau à l'état sec sous forme de poudre.

REALISATION DES EXTRAITS BRUTS EN VUE DE L'ISOLEMENT DES PRINCIPES ACTIFS

Chaque plante a été broyée et extraite selon un protocole adapté et explicité dans la quatrième partie de ce manuscrit.

II- METHODES CHROMATOGRAPHIQUES DE SCREENING ET DE FRACTIONNEMENT

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM)

Les CCM des extraits ou fractions sont analysés en lumière visible et sous UV (254 et 366 nm), avant et après révélation par des réactifs appropriés. En effet, ces derniers sont plus ou moins spécifiques et sont utilisés afin de mettre en évidence les classes chimiques de constituants présentes dans un extrait ou une fraction. Lors du screening général d'un extrait brut, on cherchera à diversifier le nombre de réactifs spécifiques alors que lors d'une purification un réactif polyvalent sera utilisé pour visualiser la séparation et vérifier le degré de pureté.

Les CCM du screening phytochimique ont été réalisées sur des plaques d'aluminium recouvertes de silice avec un indicateur de fluorescence (Merck®) et mises à migrer dans le solvant approprié :

- Extrait c-hexane : Ether de pétrole / Acétate d'éthyle (1:1, v/v)
- Extraits EtOH : Acétone / Toluène / Acide formique (3:3:1, v/v/v)
- Extraits EtOH/Eau (1:1, v/v) : Acétate d'éthyle / Acide acétique / Acide Formique / Eau (100:11:11:27, v/v/v/v) et également Ether de pétrole / Acétate d'éthyle (1:1, v/v) pour la recherche des composés apolaires

Tableau 19 : Méthodes et réactifs utilisés pour le screening phytochimique CCM des extraits bruts

		METHODE DE MISE EN EVIDENCE						
		Composés	Révélateur	Préparation du révélateur	Visualisation	Couleur des tâches		
Extrait c-hexane	Extrait EtOH*	EtOH/Eau (1 :1, v/v)*	Oses simples	Phtalate d'aniline	Solution de phtalate d'aniline à 1% (v/v) + mélange n-BuOH/Et ₂ O/Eau (49:49:2, v/v/v)	En lumière visible	Diverses couleurs	
			γ-lactones α-β insaturées	Kedde	1% acide dinitro-3,5-benzoïque dans EtOH	En lumière visible	Rouge à violet	
			Anthraquinones Anthrone Coumarines	KOH	Solution à 5% dans l'EtOH à 50°	Visible Sous UV _{366nm}	} Rouge, violet Blanc, bleu	
			Flavonoïdes	NEU (NP + PEG)	NP : 1 g de β-aminodiphénylborate + 100 ml de MeOH + PEG : 5 g de PEG 4000 + 100 ml d'EtOH	Sous UV _{366nm}	Jaune, orange ou vert	
				Anisaldéhyde	5 ml de p-anisaldéhyde + 100 ml de MeOH/Acide acétique/Eau (85:10:5) Chauffage à 150°C	En lumière visible	Jaune	
			Acides phénols et tanins hydrolysables	FeCl ₃	FeCl ₃ à 10% dans mélange MeOH/eau (1 :1)	En lumière visible	Diverses couleurs	
			Catéchines et tanins condensés	DMACA	1 g de DMACA + 100 ml MeOH + 3,5 ml HCl 37%	En lumière visible	Vert, bleu	
			Saponosides et terpènes glycosylés	Primuline	1 mg de primuline + 80 ml acétone + 20 ml d'eau	Sous UV _{366nm}	Blanc sur fond bleu ciel	
				MOOLISH	1 g de 1-naphtol + 50 ml EtOH absolu + 50 ml acide sulfurique à 5% dans EtOH absolu Chauffage à 110°C	En lumière visible	Violet, Fuchsia	
			Faux positifs	Alcaloïdes	Dragendorff	1 : 17 g de sounitrate de bismuth + 200 ml d'acide tartrique + 800 ml d'eau 2 : 160 g d'iodure de potassium + 400 ml d'eau. Mélanger 1+2. Diluer extemporanément 50 ml dans 500 ml d'eau + 100 g d'acide tartrique.	En lumière visible	Orange
				Composés apolaires : triterpènes et stérols, acides gras, autres terpènes et dérivés	Primuline	1 mg de primuline + 80 ml acétone + 20 ml d'eau	Sous UV _{366nm}	Bleu clair/blanc
					H ₂ SO ₄	20 ml d'acide sulfurique qsp 100 ml EtOH	En lumière visible	Violet, fuchsia, bleu...
		Anisaldéhyde	5 ml de p-anisaldéhyde + 100 ml de MeOH/Acide acétique/Eau (85:10:5) Chauffage à 150°C	En lumière visible	Violet, fuchsia, bleu...			

* Selon la nature des composés présents dans l'extrait, il peut n'y avoir que peu de différences entre ces deux solvants mais globalement, l'extrait hydroalcoolique permettra d'extraire des

composés plus polaires en plus grande quantité (flavonoïdes sulfatés, flavonoïdes ayant un degré de glycosylation plus important, sucres, etc.). De même, par l'effet de masse (rapport volume de solvant sur masse de plante) les extraits c-hexane peuvent contenir des composés à polarité intermédiaire et les extraits EtOH/Eau (1 :1, v/v) peuvent contenir quelques composés apolaires.

Par la suite, lors des étapes de purification, les systèmes ont évolués en fonction des gradients utilisés et des supports. Les fractionnements sont suivis par CCM sur des plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice avec un indicateur de fluorescence UV_{254 nm} (Merck® ; 0,2 mm) ou de silice greffée en phase inverse RP-18 avec indicateur de fluorescence UV_{254 nm} (Merck® et Macherey-Nagel® ; 0,15 mm).

CCM PREPARATIVE

Les CCM sont réalisées sur des plaques de verre recouvertes de silice Macherey-Nagel® (Pre-coated TLC-plates SIL G-200 ; 2 mm de gel de silice). Les fractions sont déposées à une concentration comprise entre 50 et 90 mg/ml.

CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE OUVERTE (CC)

Les chromatographies sont effectuées sur gel de silice (Kieselgel 60, 0,063-0,200 mm, 70-230 Mesh ASTM, MERCK ref. 1.07734.1000 ou MACHEREY-NAGEL Ref. 815330.25) ou sur gel de Sephadex® LH-20 (Pharmacia, Ref. 17-0090-02).

CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE MOYENNE PRESSION (MPLC, Medium Pressure Liquid Chromatography)

Nous avons utilisé un système Büchi composé d'une pompe C-605 et d'un contrôleur de pression C-615. Les colonnes pré-packées, d'une longueur de 460 mm et d'un diamètre interne de 15, 25 ou 35 mm sont conditionnées avec de la silice RP-18, 15-25 ou 25-40 µm (Merck). L'élution est réalisée à l'aide de mélange MeOH/Eau ou ACN/Eau avec ou sans addition d'acide en mode gradient ou isocratique.

CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE « semi-préparative »

Les séparations ont été réalisées sur une colonne Interchim Modulo-cart Strategy 5RP (250 x 10 mm, 5 µm). La phase éluante est un gradient MeOH/Eau ou ACN/Eau en mode gradient. Le débit est de 5 ml/min. Injections répétées de 100 µl d'une solution concentrée à 3 mg/ml à chaque fois.

CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC, High Pressure Liquid Chromatography)

Les analyses sont réalisées sur une colonne Interchim Modulo-cart Strategy 5RP (250 x 4 mm, 5 µm). La phase éluante est un gradient MeOH/Eau ou ACN/Eau en mode gradient avec ou sans

addition d'acide. Le débit est de 1 ml/min. Injection de 20 µl d'une solution concentrée à 0,5 mg/ml.

III- METHODES PHYSICOCHIMIQUES

SPECTROPHOTOMETRIE UV-VISIBLE

Les spectres sont enregistrés sur un spectrophotomètre Biochrom WPA Lightwave II UV-Visible. Les échantillons sont dissous dans du méthanol ou le réactif approprié.

SPECTROMETRIE DE MASSE

La spectrométrie de masse est fondée sur la mesure directe du rapport entre la masse et le nombre de charges élémentaires (m/z), positives ou négatives, d'ions obtenus à partir de la substance à analyser. Ce rapport est exprimé en daltons (1 Da = masse de l'atome d'hydrogène). Les ions sont formés dans la source de l'appareil, séparés par l'analyseur et envoyés dans le détecteur. Le spectre obtenu représente l'abondance relative des différentes espèces ioniques présentes, comme une fonction de m/z .

Les spectres réalisés lors de cette étude ont été effectués au sein du CUMA (Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses de l'Université Lille 2) grâce à deux appareillages :

- le spectromètre API3000 (Perkin-ELMER Sciex) possède un analyseur à triple quadripôle couplé à une source d'ionisation ionspray-turbo (electrospray). La solution à analyser (0,001 à 0,01 mg/ml) est introduite dans la source *via* un capillaire à la sortie duquel un champ électrique intense de 5000 V est appliqué. La nébulisation de la solution à pression atmosphérique est ainsi obtenue. Les gouttelettes solvatées sont alors chargées soit positivement (mode positif) soit négativement (mode négatif). La désolvatation des gouttelettes s'effectue grâce à l'application d'un flux d'azote chaud à contre-courant.

Une tension appelée « declustering potential » (DP) de 30, 60 ou 90 eV est appliquée en fonction des échantillons à l'entrée du spectromètre lors des mesures.

Cet appareillage permet également de travailler en mode SM² afin de refragmenter un ion moléculaire par passage dans une chambre de collision et par l'application d'une énergie de collision (EC) de 30 ou 35 eV pour les flavonoïdes sulfatés par exemple pour l'étude plus approfondie du schéma de fragmentation, profil caractéristique, de la molécule.

- le spectromètre de masse de très haute résolution EXACTIVE™ (Thermo scientific) permet d'établir les masses exactes des molécules. Il est constitué d'une source d'ionisation ionspray-turbo couplée à un analyseur OrbiTrap. Chaque ion entrant aura à la fois un mouvement de rotation autour de l'électrode, ainsi qu'un mouvement axial le long de celle-ci. Ce mouvement axial génère un courant induit qui est enregistré par deux électrodes. Un calcul de Transformée

de Fourier permet d'établir la fréquence axiale des ions, (ω), elle-même dépendante du rapport m/z . La SM-HR permet d'établir la formule brute d'une molécule.

RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C mono et bidimensionnels ont été réalisés sur un spectromètre Bruker Avance à 500 ou 300 MHz au Laboratoire d'Application de RMN (LARMN) de l'Université de Lille 2 et traités par le logiciel Topspin (Bruker).

Les spectres ont été réalisés dans différents solvants deutérés : DMSO- d_6 , CDCl_3 , Acétone- d_6 , CD_3OD . Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm), par rapport au tétraméthylsilane (TMS), utilisé comme référence interne. Les constantes de couplages (J) sont exprimées en hertz (Hz). La multiplicité des signaux est indiquée comme suit : s (singulet), bs (*broad signal*, signal large), d (doublet), dd (doublet dédoublé), ddd (doublet de doublets dédoublés), t (triplet), m (multiplet), q (quadruplet), ov (*overlapped*, signal superposé). Plusieurs expériences ont été utilisées :

Corrélations homonucléaires

- COSY (*CO*rrelation *S*pectroscopY) : visualisation du voisinage immédiat des atomes d'hydrogène, par interactions scalaires (à travers les liaisons chimiques). Cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires $2J$ et $3J$.
- TOCSY (*TO*tal *C*orrelation *S*pectroscopY) : indique, en plus des voisins immédiats, les voisins plus éloignés ce qui permet de reconstituer plus facilement l'enchaînement des protons sur le squelette carboné.
- NOESY (*N*uclear *O*verhauser *E*ffect *S*pectroscopY) : cette technique permet d'observer, dans l'espace, les corrélations à longue distance $^1\text{H} - ^1\text{H}$ entre protons (effets Overhauser) d'une même molécule.

Corrélations hétéronucléaires

- HSQC (*H*eteronuclear *S*ingle *Q*uantum *C*oherence) : Cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux.
- HMBC (*H*eteronuclear *M*ultiple *B*ond *C*oherence) : montre la corrélation entre un atome de carbone et un proton situé à plusieurs liaisons de distance ($2J_{\text{H-C}}$, $3J_{\text{H-C}}$). Cette technique complète très bien le COSY pour l'établissement de l'enchaînement des atomes d'une molécule.

ICP-OES (Inductively Coupled Plasma- Optical Emission Spectrometry)

Cette expérimentation a été réalisée par le laboratoire de Toxicologie de l'Université Lille 2. Il s'agit d'une technique d'analyse multi-élémentaire. Pour cela, l'échantillon est solubilisé et dilué

afin d'avoir une gamme comprise entre 2,6 mg et 1 g dans 10 ml d'un mélange eau + 1% HNO₃. Les échantillons sont analysés et comparés à une base de 69 éléments référencés. Une méthode semi-quantitative utilisée par le laboratoire de toxicologie dans le dosage des sols et lichens a été appliquée.

IV- HYDROLYSE ACIDE ET ISOLEMENT DE LA GENINE

144 mg de fraction sont placés dans 3 ml de 0,7M HCl (Dioxane:Eau, 1:1, v/v) pendant 1h30 à 95°C. Après refroidissement, 2 ml d'eau sont rajoutés puis lavés avec 3 ml d'AcOEt, pendant 3 fois. La phase organique est chromatographiée sur colonne de silice à l'aide du mélange CHCl₃ : MeOH (98:2).

V- METHODES DE SCREENING ANTIFONGIQUE *in vitro*

A- MYCOSES SUPERFICIELLES

Champignons criblés

Candida albicans ATCC 10231 (collection CHRU Lille)

Candida parapsilosis ATCC 22019 (collection CHRU Lille)

Candida kefyr (prélèvement CHRU Lille)

Candida glabrata (prélèvement CHRU Lille)

Candida krusei ATCC 6258 (collection CHRU Lille)

Trichophyton mentagrophytes var. *mentagrophytes* (prélèvement CHRU Guadeloupe)

Trichophyton mentagrophytes var. *interdigitale* (prélèvement CHRU Guadeloupe)

Trichophyton rubrum (prélèvement CHRU Guadeloupe)

Trichophyton tonsurans (prélèvement CHRU Guadeloupe)

Microsporum canis (prélèvement CHRU Guadeloupe)

Malassezia sp (prélèvement CHRU Lille)

Scytalidium dimidiatum (prélèvement CHRU Martinique)

Préparation des milieux de culture

Milieu RPMI₁₆₄₀ stérile

Reconstituer le flacon de RPMI₁₆₄₀ (Sigma Ref. R6504) avec 900 ml d'eau distillée

Rajouter le D(+)-Glucose anhydre (Euromedex ref.UG3050) et le MOPS (0,165 mol/L ; Sigma Ref. M6270). Ajuster le pH à 7 puis le volume à 1L.

Stériliser par filtration (0,22 µm)

Conserver à +4°C, à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

Milieu SDA (Sabouraud Dextrose Agar) stérile

Pour 1L, peser :

20 g de peptone (BD Ref.211681)

10 g de D(+)-Glucose anhydre (Euromedex ref.UG3050)

20 g d'agar (BD Ref.214530)

Compléter avec 1L d'eau

(NB : 5 ml /extrait si tubes -15ml / extrait si boîte de Pétri)

Autoclaver 10 min à 116°C et maintenir au bain marie à 50°C jusqu'à utilisation.

Rajouter 3% d'huile d'olive au milieu directement puis mélanger lorsqu'il s'agit de *Malassezia* sp.

Mise en culture des champignons

Les souches sont conservées en chambre froide avant leur utilisation. Nous évitons volontairement de les repiquer chaque semaine afin qu'elles conservent au mieux leur caractère pathogène tout au long des expérimentations. Le repiquage s'effectue comme suit :

Candida sp. et *Malassezia* sp., 24 à 48h avant sur milieu Sabouraud, étuve à 30°C.

Scytalidium sp, 48 à 72h avant sur milieu Sabouraud, étuve à 35°C.

Dermatophytes, 2 à 3 semaines avant sur milieu Sabouraud, étuve à 30°C.

Préparation de l'inoculum

Dermatophytes et *Scytalidium* sp.

La partie aérienne de chaque colonie est mise en contact avec 6 ml d'eau stérile, puis grattée délicatement à l'aide d'un coton-tige ou d'une oese à usage unique. La suspension est transférée dans un tube stérile, vortexée puis laissée au repos 15 min afin de s'affranchir des molécules les plus lourdes (hyphe) par simple gravité. Le surnageant est alors prélevé délicatement et quantifié à la cellule de Thomas (objectif x10), la solution est ajustée pour avoir une densité initiale de l'inoculum entre 1 et $5 \cdot 10^6$ CFU/ml puis une dilution au $1/1000^{\text{ème}}$ est effectuée ($1/50^{\text{ème}}$ puis $1/20^{\text{ème}}$) pour avoir une densité cellulaire de $1-5 \cdot 10^3$ CFU/ml.

Levures (*Candida* sp. et *Malassezia* sp.)

Quelques colonies sont prélevées à l'aide d'une oese et suspendues dans 3 ml d'eau stérile puis la densité cellulaire est alors mesurée grâce à un densitomètre afin d'obtenir 0,5 MacFarland (correspond à 10^6 CFU/ml). Une dilution au $1/100^{\text{ème}}$ est réalisée afin d'obtenir une densité cellulaire de 10^4 CFU/ml.

Préparation des extraits

Les extraits sont dilués dans du DMSO (100 mg dans 1 ml), laissés en contact durant 24h (effet stérilisant pour les extraits) puis dilués dans du RPMI₁₆₄₀ pour obtenir une solution mère à 10 mg/ml (1% DMSO). A partir de la solution mère, une solution intermédiaire est préparée puis par dilutions successives la gamme de concentrations testée est réalisée selon les souches.

Test, plaque 96 puits

Les protocoles suivis sont ceux de la méthode NCCLS M38-A2 (dermatophytes et *Scytalidium*) et du laboratoire de mycologie (*Candida*). Les tests sont réalisés en triplicate. Les extraits sont

déposés puis l'inoculum. Pour chaque test, nous incluons un *contrôle positif* : l'antifongique de référence avec une gamme de concentrations allant de 0,12 à 64 µg/ml pour la griséofulvine et allant de 0,12 à 62,5 µg/ml pour le fluconazole ; un *témoin de croissance* contenant uniquement l'inoculum et un *contrôle de stérilité* contenant uniquement du milieu de culture RPMI₁₆₄₀. Les microplaques sont incubées à 30°C pendant 48h pour les *Candida*, à 30°C pendant 7j pour les dermatophytes et à 35°C pendant 72h pour le *Scytalidium*.

La CMI est la plus petite concentration avec absence de croissance visible et correspond correspond au 1^{er} puits optiquement clair.

Test en boîte de Pétri

Les extraits et l'inoculum de *Malassezia* (testé à 10⁴ CFU/ml) sont coulés dans un gel d'agar additionné d'huile d'olive et mis à incuber 48h à 30°C. De même, un contrôle positif, le fluconazol (gamme de concentration), un témoin de croissance et un contrôle de stérilité sont inclus afin de valider l'expérimentation.

B- *Pneumocystis carinii*

Les parasites sont dénombrés par réalisation de gouttelettes de diamètre défini séchées puis colorées au RAL-555 (dilution 1/5^e, 1/10^e et 1/20^e) sur une lame au microscope grâce à une grille qualifiée. La dilution est réalisée dans du DMEM additionné de 10% de SVF (sérum de veau fœtal) de façon à avoir 1,5.10⁶ UI/ml. Les extraits ont été dilués dans du DMSO et du DMEM + 10% SVF et testés à 100, 50, 10 et 1 µg/ml ou encore à 50, 10, 1 et 0,1 µg/ml pour les fractions enrichies et les composés purs. Les extraits dilués sont déposés sur les microplaques puis la solution parasitaire est rajoutée. Un témoin de croissance, un contrôle avec la pentamidine et un contrôle avec 0,5% de DMSO (car tous les extraits contiennent 0,5% de DMSO) sont également réalisés. Les microplaques sont incubées durant 4 jours à 37°C, 5% de CO₂. Le test est arrêté par prélèvement du contenu de chaque puits dans un microtube puis centrifugé. Le surnageant est prélevé et le culot est repris dans du DMEM sans SVF. Les lames sont réalisées pour comptage selon une procédure interne. Les résultats sont rendus en % d'inhibition par comparaison au témoin (DMEM + 10% SVF + DMSO).

VI- METHODE BIOAUTOGRAPHIQUE

Sur une plaque CCM de silice 10x10 cm, les extraits et fractions sont mis à migrer dans le solvant approprié. Le solvant est totalement séché sous la hotte puis la plaque est placée dans une boîte de Pétri carrée (12x12 cm) 30 min sous lampe UV. 10 ml de milieu Sabouraud + chloramphénicol (tube Pasteur liquéfié au bain marie)ensemencé avec une suspension fongique sont coulés très finement (1 à 2 mm d'épaisseur) et incubés la nuit à la température de culture de la souche. Pour la souche *Malassezia*, 1% d'huile d'olive sont rajoutés au gel. Une solution de MTT (2,5 mg/ml) est pulvérisée à la surface de la plaque puis celle-ci est remise à incuber 4h. Les tâches d'inhibition apparaissent sur fond violet. Le même protocole peut être appliqué sans migration préalable de la plaque. Le contrôle positif est l'amphotéricine B (Roth, Ref. 0246.1).

VII- METHODE D'EVALUATION DE LA CYTOTOXICITE

Les lignées cellulaires utilisées sont de deux types :

- lignée cellulaire dérivée de kératinocytes humains HaCat
- lignée cellulaire dérivée de monocytes U937

La lignée cellulaire HaCat est cultivée dans du milieu DMEM additionné de 10% de SVF et 5% d'un mélange d'antibiotiques (streptomycine/pénicilline). Le milieu de culture de la lignée cellulaire U937 est constitué de RPMI complet c'est-à-dire additionné de L-Glutamine, 10% de SVF et 5% d'un mélange d'antibiotiques (streptomycine/pénicilline). Les deux lignées sont incubées à 37°C, 5% de CO₂.

Ensemencement des cellules

Les cellules HaCat sont ensemencées à J0 dans des plaques 96 puits à raison de 1200 cellules par puits et les cellules U937 à J1 à raison de 12000 cellules par puits. Pour les cellules adhérentes HaCat, afin de récupérer les cellules et de procéder au comptage, le tapis cellulaire est lavé au PBS puis décollé grâce à de la Trypsine EDTA. La réaction est arrêtée par l'ajout de DMEM complet. Pour les cellules U937, en suspension, le comptage peut s'effectuer directement.

Dépôt des produits

Les produits sont mis en solution dans le DMSO à la concentration de 60 mg/ml. Une gamme de concentrations allant de 1 à 400 µg/ml (concentrations testées) est réalisée à partir de la solution mère par dilutions successives dans du DMEM complet. A J1, 10 µL d'extrait sont déposés dans chaque puits en triplicate. Les puits à la périphérie sont remplis de PBS stérile pour éviter les phénomènes d'évaporation au niveau des puits contenant les produits.

Mesure de la cytotoxicité

A J3, 10 µl d'une solution de MTT sont rajoutés et les plaques sont placées pendant 3h à l'incubateur. Après centrifugation de la plaque à 1200 t/min et aspiration du surnageant, les cristaux de formazan sont remis en solution par l'ajout de 150 µl de DMSO.

La DO est ensuite lue au spectrophotomètre à 570 nm grâce au logiciel BIOLISE. La CI₅₀ (concentration inhibant 50% de la population cellulaire) est calculée graphiquement sur la courbe d'activité. Quatre séries d'essais ont réalisées par lignée.



ॐ

RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT D'EXTRAITS ANTIFONGIQUES ISSUS DE LA FLORE GUADELOUPEENNE :

Caractérisations phytochimiques, pharmacologiques et formulation

Malgré l'arsenal antifongique existant aujourd'hui, les mycoses superficielles sont en constante progression de par le monde et notamment dans le bassin caribéen. Nous nous sommes focalisés sur les pathologies qui posent, en Guadeloupe, de nombreux problèmes de résistance ou de rechute vis-à-vis des antifongiques actuels, à savoir : les dermatophyties, le Pityriasis versicolor (*Malassezia* sp.), les candidoses et les scytalidioses. Suite à ce constat, nous nous sommes tournés vers la flore guadeloupéenne où ont été sélectionnées dix plantes sur des critères ethnobotaniques, chimiotaxonomiques ou encore d'observations naturalistes avec un double objectif : trouver de nouveaux extraits antifongiques d'une part et, d'autre part, étudier leur composition et vérifier leur innocuité. Le screening antifongique *in vitro* des extraits c-hexane, EtOH et EtOH/eau (1:1, v/v) a été réalisé vis-à-vis de 4 dermatophytes, 1 *Malassezia* sp., 5 *Candida* spp. et 1 *Scytalidium* sp. Les extraits ont également été testés vis-à-vis d'un autre pathogène, *Pneumocystis jirovecii* responsable de la pneumocystose pulmonaire. Quatre plantes : *Bursera simaruba*, *Cedrela odorata*, *Enterolobium cyclocarpum* et *Pluchea carolinensis* ont été retenues afin de définir leurs cytotoxicités puis de procéder à l'isolement des composés responsables de leur activité antifongique par bioguidage. *Cedrela odorata* a montré une activité significative vis-à-vis de *Pneumocystis jirovecii* due en partie à la (+)-catéchine. Concernant les mycoses superficielles, *Bursera simaruba* et *Cedrela odorata* présentent une activité due à une synergie de composés non identifiés par bioguidage alors que *Pluchea carolinensis* et *Enterolobium cyclocarpum* doivent respectivement leurs activités à des flavonoïdes sulfatés et à des saponosides triterpéniques. Faisant suite à cette étude phytochimique et pharmacologique, la formulation des extraits sous forme de gels et vernis a été développée. Ainsi, cette étude permet d'apporter une réponse originale et efficace aux pathologies ciblées.

RESEARCH AND DEVELOPMENT OF ANTIFUNGAL EXTRACTS FROM THE GUADELUPIAN FLORA :

Phytochemical, pharmacological studies and pharmaceutical formulation

Despite the existing arsenal of antifungals today, superficial fungal infections have increased over the world and especially in the Caribbean basin. We focused our work on diseases that rise, in Guadeloupe, many problems of resistance or recurrence to current antifungals: dermatophytosis, Pityriasis versicolor (*Malassezia* sp.), Candidosis and Scytalidiosis. Following this observation, we were interested in the flora of Guadeloupe where ten plants were selected on natural observation, ethnobotanical or chemotaxonomical criteria with a dual purpose: to find new antifungal extracts on the one hand, and secondly, to study their composition and verify their safety. The *in vitro* screening of c-hexane, EtOH and EtOH/water (1:1, v/v) extracts, was made towards four dermatophytes, one *Malassezia* sp., five *Candida* spp. and one *Scytalidium* sp. The extracts were also tested on another pathogen, *Pneumocystis jirovecii* which is responsible for pneumonia. Four plants: *Bursera simaruba*, *Cedrela odorata*, *Enterolobium cyclocarpum* and *Pluchea carolinensis* were chosen to define their cytotoxicities and then to proceed to the isolation of active compounds by bioguiding. *Cedrela odorata* showed significant activity on *Pneumocystis jirovecii* and (+)-catechin was found to be partly responsible of this activity. Concerning the research on the superficial mycosis, *Bursera simaruba* and *Cedrela odorata* show activities were due to a synergy of compounds not identified by bioguiding while *Pluchea carolinensis* and *Enterolobium cyclocarpum* owe their activities respectively to sulfated flavonoids and triterpene saponins. Following to these phytochemical and pharmacological studies, the drug formulation of the extracts has been developed. Thus, this study can be considered as an original and effective response to the targeted disease.