



**HAL**  
open science

# Etude chimiotoxonomique et activité biologique des métabolites secondaires des plantes du genre *Eryngium*

Ameni Landoulsi

► **To cite this version:**

Ameni Landoulsi. Etude chimiotoxonomique et activité biologique des métabolites secondaires des plantes du genre *Eryngium*. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II; Université de Tunis El Manar, 2016. Français. NNT : 2016LIL2S056 . tel-01755125

**HAL Id: tel-01755125**

**<https://theses.hal.science/tel-01755125>**

Submitted on 30 Mar 2018

**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 EN COTUTELLE

Pour obtenir le grade de Docteur délivré par

**L'Université de Lille 2**

École Doctorale BIOLOGIE SANTÉ

et

**L'Université de Tunis El Manar**

École Doctorale Sciences et Technologies du Vivant et Sciences de la Terre

Spécialité : pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

Présentée et soutenue publiquement par

**Ameni LANDOULSI**

## **Etude chimiotaxonomique et activités biologiques des métabolites secondaires des plantes du genre *Eryngium***

Préparé sous la direction du Pr. Thierry HENNEBELLE et Pr. Jeannette BENHAMIDA

Co-Encadrant : Dr. Vincent ROUMY

Soutenue le 20 Décembre 2016

### **Membres du Jury**

Laurence VOUTQUENNE-NAZABADIOKO	Professeur, Université de Reims Champagne-Ardennes	Présidente
Manef ABDERRABBA	Professeur, Université de Carthage	Rapporteur
Pierre CHAMPY	Professeur, Université de Paris Sud	Rapporteur
Thierry HENNEBELLE	Professeur, Université de Lille 2	Directeur de thèse
Jeannette BENHAMIDA	Professeur, Université de Tunis El Manar	Directrice de thèse
Imed REGAYA	Professeur, Université de Carthage	Examineur
Mohamed MAKNI	Professeur, Université de Tunis el Manar	Examineur
Benoît FOLIGNE	Professeur, Université de Lille 2	Examineur

# RÉSUMÉ

Le genre *Eryngium* L. (Apiaceae, Saniculoideae) comprend plus de 250 espèces utilisées en médecine traditionnelle à travers le monde. En Tunisie il existe seulement huit espèces : *E. barrelieri* Boiss., *E. campestre* L., *E. dichotomum* Desf., *E. glomeratum* Lamk., *E. ilicifolium* Lamk., *E. maritimum* L., *E. tricuspdatum* L. et *E. triquetrum* Vahl. ; ces espèces sont en majorité peu étudiées du point de vue phytochimique. La présente étude a été effectuée sur la totalité des *Eryngium* qui poussent en Tunisie dans le but d'évaluer leurs activités biologiques, essentiellement antimicrobienne contre des microorganismes multirésistants et producteurs de bêta-lactamases à spectres étendus (BLSE), mais aussi phototoxique et cytotoxique ainsi que la variabilité chimique par analyse par CPG-FID et CPG-SM des extraits les plus actifs.

Toutes les espèces étudiées étaient dotées d'un pouvoir antimicrobien (CMI de 1,25 à 0,07 mg/ml) et cytotoxique (CI<sub>50</sub> de 24,4 à 0,32 µg/ml) considérable. Le criblage de l'activité phototoxique a permis de mettre en évidence la richesse de ces plantes en composés photoréactifs antimicrobiens potentiellement intéressants pour leur efficacité d'action et l'élargissement du spectre d'activité antimicrobienne.

L'analyse des extraits actifs apolaires a permis d'étudier la variabilité chimique entre les différentes espèces et la mise en évidence de la présence majoritaire de composés antimicrobiens notamment des sesquiterpènes oxygénés tels que le spathuléol, le lédol, l' $\alpha$ -bisabolol et le cubéol, et des sesquiterpènes hydrocarbonés comme le  $\beta$ -bisabolène et le copaène ; et cytotoxiques tel que le falcarinol.

Une étude phytochimique approfondie a été réalisée sur les racines d'*E. triquetrum* afin d'extraire, isoler par des essais bio-guidés et identifier les composés actifs. Le fractionnement a été optimisé par des chromatographies sur colonnes, CPC et CLHP. Parmi les composés identifiés deux polyacétylènes, le panaxydiol et le falcarinol, ont montré un fort pouvoir antimicrobien et une spécificité d'action notamment contre les souches de *Pseudomonas aeruginosa* BLSE et multirésistantes, avec des CMI allant jusqu'à 0,29 ng/ml et une activité en majorité bactéricide.

Mots clés : *Eryngium*, activité antimicrobienne, CPG-SM, activité phototoxique, activité cytotoxique, CPC, CLHP, polyacétylènes.

# ABSTRACT

## **Chemotaxonomic study and biological activity of secondary metabolites of *Eryngium* species:**

The genus *Eryngium* L., (Apiaceae, Saniculoideae) comprises more than 250 flowering plant species, which are commonly used as medicinal plants in different countries. Only eight species are growing in Tunisia: *E. barrelieri* Boiss., *E. campestre* L., *E. dichotomum* Desf., *E. glomeratum* Lamk., *E. ilicifolium* Lamk., *E. maritimum* L., *E. tricuspdatum* L. et *E. triquetrum* Vahl. These species are used in traditional medicine and there are relatively few papers on the phytochemical investigations of most of them. This study was performed on all *Eryngium* species growing in Tunisia in order to evaluate their chemical variability using GC-FID and GC-MS analyses and their biological activities, mainly antimicrobial against multiresistant microorganisms and extended spectrum beta-lactamase producing bacteria (ESBL), and also phototoxic and cytotoxic effects.

All investigated species showed considerable antimicrobial effect with MIC value ranging between 1,25 and 0,07 mg/mL and important cytotoxic activity against J774 tumoral cells with IC<sub>50</sub> from 24,4 to 0,32 µg/mL. Phototoxic investigation demonstrated a significant photoactive inhibitory effect against tested pathogenic microorganisms.

GC-MS analysis of the most active crude extracts (petroleum ether extracts) revealed their high content of antimicrobial agents particularly oxygenated sesquiterpenes such as spathulenol, ledol, α-bisabolol and cubenol, and hydrocarbon sesquiterpenes such as β-bisabolene and copaene; and cytotoxic components such as falcarinol.

The chemical investigation and bio-guided isolation of active compounds of the selected crude extract of *E. triquetrum* roots were performed using column chromatography, centrifugal partition chromatography (CPC) and preparative high-performance liquid chromatography (HPLC). Among purified components, two bioactive polyacetylenes, panaxydiol and falcarinol, showed a great antimicrobial activity mainly against multiresistant and ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* with MIC value up to 0,29 ng/ml and a mostly bactericidal effect.

**Keywords:** *Eryngium*, antimicrobial activity, GC-MS, phototoxic activity, cytotoxic activity, CPC, HPLC, polyacetylenes.

# REMERCIEMENTS

Cette thèse en cotutelle a été effectuée conjointement entre le laboratoire de pharmacognosie de l'Université de Lille 2 et le laboratoire de protéomique fonctionnelle et biopréservation alimentaire de l'Université de Tunis el Manar sous la codirection de Monsieur Thierry HENNEBELLE, Professeur à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille et Madame Jeannette BENHAMIDA, Professeur à l'Institut Supérieur des Sciences Biologiques Appliquées de Tunis.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur Thierry HENNEBELLE qui a tout d'abord accepté la collaboration entre l'Université de Lille 2 et l'Université de Tunis el Manar et ensuite la direction de ma thèse par sa rigueur scientifique, la qualité de ses conseils et suggestions scientifiques et ses encouragements permanents.

Je remercie très sincèrement Madame le Professeur Jeannette BENHAMIDA pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, ses conseils pratiques et ses encouragements.

Mes remerciements vont également aux autres membres du jury : je remercie très sincèrement Monsieur Manef ABDERRABBA, Professeur à l'Institut Préparatoire aux Etudes Scientifiques et Techniques de Tunis et Monsieur Pierre CHAMPY, Professeur à l'Université de Paris Sud qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Je remercie Madame Laurence VOUTQUENNE-NAZABADIOKO, Professeur à l'Université de Reims Champagne-Ardennes ; Monsieur Imed REGAYA, Professeur à l'Université de Carthage ; Monsieur Mohamed MAKNI, Professeur à l'Université de Tunis el Manar et Monsieur Benoît FOLIGNE, Professeur à l'Université de Lille 2, qui ont bien voulu évaluer mon travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance et mes sincères remerciements à Monsieur Vincent ROUMY, Maître de conférences en pharmacognosie et mon codirecteur de thèse. Je le remercie pour son accueil au laboratoire de pharmacognosie, son investissement constant et sa disponibilité.

J'exprime ma profonde gratitude à Madame le Professeur Sevser SAHPAZ, directrice du laboratoire de pharmacognosie de Lille 2 pour son accueil au sein du laboratoire, son aide et sa gentillesse.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Docteur Christel NEUT pour son accueil au laboratoire de bactériologie à l'Université de Lille 2, ainsi que pour son accompagnement et ses conseils. Je remercie également toute l'équipe du laboratoire de bactériologie et particulièrement Isabelle, Severine et Carole pour leur disponibilité et leur aide.

Je remercie d'une façon toute particulière Madame Nathalie DUHAL pour son aide à la réalisation des CPG/SM et les spectrométries de masse des produits isolés et pour sa

disponibilité et sa gentillesse ainsi que toute l'équipe du Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses de l'Université de Lille 2.

Je suis particulièrement reconnaissante à Madame Fathia Skhiri, Professeur en botanique à l'Institut Supérieur de Biotechnologies à Monastir, pour son aide précieuse à l'identification botaniques des différentes espèces du genre *Eryngium*.

Je remercie également Monsieur Kamel Ben Salem, Professeur à la Faculté de Médecine de Monastir pour son aide au niveau des traitements statistiques.

Je remercie très sincèrement les membres de l'équipe du Laboratoire d'Application de RMN de l'Université de Lille 2 : Professeur Nathalie Azaroual, Docteur Christophe Bochu et Monsieur Vincent Ulte.

Je souhaite également remercier le Docteur Céline RIVIERE pour son aide, ses conseils et sa gentillesse.

Je tiens à remercier Madame le Professeur Joëlle Quetin-Leclercq, le Docteur Joanne BERO et Madame Maude BOURLET du laboratoire « Pharmacognosy Research Group » (GNOS) du « Louvain Drug Research Institute » (LDRI), à Bruxelles, pour leur aide à la réalisation des tests cytotoxiques et pour leur disponibilité et leur accueil au sein du laboratoire.

Je remercie vivement toute l'équipe du Laboratoire de Pharmacognosie : Jennifer SAMAILLIE, Ayano TANAKA, Malika MOREIRA DA COSTA pour leur aide, leur encouragement, leur gentillesse et leur bonne humeur.

Je tiens également à remercier très sincèrement l'ensemble de mes collègues et amis du laboratoire de pharmacognosie mais aussi du laboratoire de protéomique fonctionnelle et biopréservation alimentaire et plus particulièrement Maha, Asma, Ramla, Marie, Daiane, Amine, Laetitia, Rim, Moussa et Fifa.

Enfin, mes forts remerciements s'adressent à mes parents, mon mari et toute ma famille pour leur soutien, leurs encouragements et leur patience.

# TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ.....	1
ABSTRACT .....	2
REMERCIEMENTS.....	3
ABRÉVIATIONS.....	12
LISTE DES TABLEAUX.....	14
TABLE DES FIGURES .....	16
INTRODUCTION GENERALE .....	19
GÉNÉRALITÉS.....	22
I. LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES : UN GRAVE PROBLEME DE SANTE PUBLIQUE.....	23
I. 1. Le phénomène de résistance microbienne .....	23
I. 1.1. La résistance naturelle.....	24
I. 1.2. La résistance acquise .....	25
I. 2. Les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) : agents majeurs de résistance aux antibiotiques.....	25
I. 3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et résistance aux antibiotiques : un pathogène opportuniste et multirésistant .....	28
I. 3.1. Virulence.....	28
I. 3.2. Résistance naturelle .....	29
I. 3.3. Résistance acquise.....	29
I. 4. Stratégies de lutte contre la résistance microbienne.....	30
I. 4.1. Place des produits naturels dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques.....	30
I. 4.2. La photothérapie : un recours contre la résistance microbienne.....	31
I. 4.2.1. Définition .....	31
I. 4.2.2. Historique .....	31
I. 4.2.3. Principe d'action .....	33
i. Les réactions non-photodynamiques .....	33
ii. Les réactions photodynamiques.....	34
I. 4.2.4. Les composés photosensibilisateurs dans le règne végétal.....	35

I. 4.2.5. Les techniques de la photothérapie.....	38
i. Sources lumineuses utilisées .....	38
ii. La Puvatérapie .....	38
iii. La Photothérapie UV.....	39
I. 4.2.6. Sélectivité de la photothérapie.....	40
I. 4.2.7. Domaines d'application .....	40
I. 4.2.8. La thérapie photodynamique antibactérienne (PDTa) .....	41
II. GENERALITES SUR LE GENRE <i>ERYNGIUM</i> .....	42
II. 1. Position taxonomique et richesse spécifique de la famille des Apiacées .....	42
II. 2. Position systématique du genre <i>Eryngium</i> .....	43
II. 3. Diversité botanique et morphologique.....	44
II. 4. Répartition géographique .....	45
II. 5. Utilisations traditionnelles .....	46
II. 6. Intérêt biologique et pharmacologique .....	47
II. 7. Etudes phytochimiques antérieures et principaux métabolites secondaires isolés dans le genre ....	50
II. 7.1. Principales familles de composés .....	50
II. 7.2. Famille des polyacétylènes .....	51
II. 7.2.1. Origine et biosynthèse .....	51
II. 7.2.2. Structure .....	55
II. 7.2.3. Activité biologique des polyacétylènes .....	56
i. Activité cytotoxique.....	56
ii. Activité antibactérienne .....	56
iii. Activité antifongique .....	57
iv. Activité anti-inflammatoire et anti agrégante plaquettaire .....	57
II. 7.2.4. Toxicité.....	57
II. 7.2.5. L'hormèse ou effet bénéfique à faible dose : hormesis.....	58
II. 7.2.6. Mécanismes d'action : relation structure-activité .....	59
II. 7.2.7. Instabilité des polyacétylènes .....	60
II. 7.3. Famille des terpènes.....	60
II. 7.3.1. Monoterpènes .....	60
II. 7.3.2. Sesquiterpènes.....	60
II. 7.3.3. Triterpénoïdes.....	61
II. 7.3.4. Huiles essentielles .....	62
i. Les composés oxygénés non terpéniques .....	62
ii. Les composés hydrocarbonés terpéniques .....	64
iii. Les composés terpéniques oxygénés .....	66
II. 7.3.5. Famille des saponosides.....	67
II. 7.4. Famille des stéroïdes .....	68

II. 7.5.	Composés phénoliques.....	68
II. 7.5.1.	Flavonoïdes .....	68
II. 7.5.2.	Coumarines .....	68
II. 7.5.3.	Autres composés phénoliques .....	69
II. 7.6.	Autres composés des <i>Eryngium</i> .....	70
<b>III.</b>	<b>CONTEXTE DE L'ETUDE DES <i>ERYNGIUM</i> TUNISIENS .....</b>	<b>70</b>
<b>III. 1.</b>	<b>Cadre géographique de l'étude.....</b>	<b>70</b>
<b>III. 2.</b>	<b><i>Eryngium triquetrum</i> Vahl. ....</b>	<b>71</b>
III. 2.1.	Aspect botanique et répartition géographique .....	71
III. 2.2.	Utilisation traditionnelle.....	72
III. 2.3.	Travaux antérieurs.....	73
<b>III. 3.</b>	<b><i>Eryngium dichotomum</i> Desf.....</b>	<b>73</b>
III. 3.1.	Aspect botanique et répartition géographique .....	73
III. 3.2.	Travaux antérieurs.....	74
<b>III. 4.</b>	<b><i>Eryngium tricuspdatum</i> L. ....</b>	<b>76</b>
III. 4.1.	Aspect botanique et répartition géographique .....	76
III. 4.2.	Utilisation traditionnelle.....	77
III. 4.3.	Travaux antérieurs.....	77
<b>III. 5.</b>	<b><i>Eryngium campestre</i> L.....</b>	<b>78</b>
III. 5.1.	Aspect botanique et répartition géographique .....	78
III. 5.2.	Utilisation traditionnelle.....	79
III. 5.3.	Travaux antérieurs.....	79
<b>III. 6.</b>	<b><i>Eryngium ilicifolium</i> Lamk. ....</b>	<b>84</b>
III. 6.1.	Aspect botanique et répartition géographique .....	84
III. 6.2.	Utilisation traditionnelle.....	84
III. 6.3.	Travaux antérieurs.....	85
<b>III. 7.</b>	<b><i>Eryngium maritimum</i> L. ....</b>	<b>85</b>
III. 7.1.	Aspect botanique et répartition géographique .....	85
III. 7.2.	Utilisation traditionnelle.....	86
III. 7.3.	Travaux antérieurs.....	87
<b>III. 8.</b>	<b><i>Eryngium barrelieri</i> Boiss. ....</b>	<b>89</b>
III. 8.1.	Aspect botanique et répartition géographique .....	89
III. 8.2.	Utilisation traditionnelle.....	90
III. 8.3.	Travaux antérieurs.....	90
<b>III. 9.</b>	<b><i>Eryngium glomeratum</i> Lamk.....</b>	<b>90</b>
III. 9.1.	Aspect botanique et répartition géographique .....	90
III. 9.2.	Utilisation traditionnelle.....	91

III. 9.3. Travaux antérieurs .....	91
<b>TRAVAUX PERSONNELS.....</b>	<b>93</b>
<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>94</b>
<b>II. PARTIE I : ACTIVITE BIOLOGIQUE ET INVESTIGATION PHYTOCHIMIQUE DES PARTIES AERIENNES ET DES RACINES DES <i>ERYNGIUM</i> TUNISIENS .....</b>	<b>95</b>
II. 1. Extraction.....	95
II. 2. Evaluation de l'activité antimicrobienne .....	97
II. 3. Evaluation de l'activité phototoxique des extraits.....	102
II. 4. Evaluation de l'activité cytotoxique des extraits .....	108
<b>III. PARTIE II : ETUDE COMPARATIVE DE LA VARIABILITE INTER ET INTRA SPECIFIQUE DES <i>ERYNGIUM</i> TUNISIENS .....</b>	<b>110</b>
<b>III. 1. Extraction et analyse CPG/SM : choix de méthode .....</b>	<b>110</b>
III. 1.1. Extraction.....	110
III. 1.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse .....	111
<b>III. 2. Analyse des extraits éther de pétrole des <i>Eryngium</i> par CPG/SM .....</b>	<b>112</b>
III. 2.1. Etude de la composition chimique des extraits des parties aériennes d' <i>E. dichotomum</i> .....	112
III. 2.2. Etude de la composition chimique des extraits des parties aériennes d' <i>E. campestre</i> .....	114
III. 2.3. Etude de la composition chimique des extraits des parties aériennes d' <i>E. ilicifolium</i> .....	116
III. 2.4. Etude de la composition chimique des extraits des parties aériennes d' <i>E. glomeratum</i> .....	117
III. 2.5. Etude de la composition chimique des extraits des parties aériennes d' <i>E. barrelieri</i> .....	120
III. 2.6. Etude de la composition chimique des extraits des parties aériennes d' <i>E. maritimum</i> .....	122
III. 2.7. Etude de la composition chimique des extraits des parties aériennes d' <i>E. tricuspidatum</i> .....	124
III. 2.8. Etude de la composition chimique des extraits des parties aériennes d' <i>E. triquetrum</i> .....	127
<b>III. 3. Bilan de l'étude de la composition chimique des extraits des huit espèces et évaluation de la variabilité chimique dans le genre <i>Eryngium</i>.....</b>	<b>128</b>
<b>III. 4. Discussion : corrélation entre l'activité biologique et l'investigation phytochimique des extraits des 8 <i>Eryngium</i> .....</b>	<b>132</b>
<b>III. 5. Analyse de l'huile essentielle d'<i>E. barrelieri</i> et <i>E. glomeratum</i> et étude comparative avec les extraits à l'éther de pétrole .....</b>	<b>136</b>
III. 5.1. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles d' <i>E. barrelieri</i> et <i>E. glomeratum</i> par CPG/SM	136
III. 5.2. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d' <i>E. barrelieri</i> et <i>E. glomeratum</i> ....	141

IV.	<b>PARTIE III : ETUDE PHYTOCHIMIQUE DES RACINES D'<i>ERYNGIUM TRIQUETRUM</i> .....</b>	<b>143</b>
IV. 1.	<b>Introduction : Choix de la plante et résumé du criblage de l'activité biologique .....</b>	<b>143</b>
IV. 2.	<b>Extraction à partir des racines d'<i>Eryngium triquetrum</i> .....</b>	<b>144</b>
IV. 3.	<b>Fractionnement bioguidé de l'extrait éther de pétrole .....</b>	<b>144</b>
IV. 3.1.	Bioautographie de l'extrait brut .....	144
IV. 3.2.	Purification du composé C1.4 à partir de l'extrait brut .....	145
IV. 3.3.	Purification du composé CP7-G3 .....	148
IV. 3.4.	Purification du composé A6 : .....	152
IV. 3.5.	Purification du composé C2.4 : .....	157
IV. 4.	<b>Identification des composés isolés.....</b>	<b>161</b>
IV. 4.1.	Détermination structurale de C1.4 .....	161
IV. 4.1.1.	Spectrométrie de masse .....	161
IV. 4.1.2.	Spectroscopie RMN .....	161
IV. 4.2.	Détermination structurale du composé A6 .....	168
IV. 4.2.1.	Spectrométrie de masse .....	169
IV. 4.2.2.	Spectroscopie RMN .....	169
IV. 4.3.	Identification du composé C2.4 .....	173
IV. 4.4.	Détermination structurale du composé CP7-G3.....	178
IV. 5.	<b>Evaluation de l'activité antibactérienne des composés actifs isolés.....</b>	<b>182</b>
IV. 5.1.	Criblage de l'activité antibactérienne .....	182
IV. 6.	<b>Discussion sur les composés isolés et sur l'activité antimicrobienne.....</b>	<b>187</b>
	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>190</b>
	<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>193</b>
I.	<b>MATERIEL VEGETAL ET EXTRACTIONS.....</b>	<b>194</b>
I. 1.	<b>Matériel végétal : identification, récolte et séchage :.....</b>	<b>194</b>
I. 1.1.	Protocole d'extraction général .....	196
I. 1.2.	Procédure d'extraction des racines d' <i>Eryngium triquetrum</i> .....	196
I. 1.3.	Procédure d'extraction par ultrason à courte durée.....	197
I. 2.	<b>Techniques chromatographiques .....</b>	<b>197</b>
I. 2.1.	Chromatographie sur couche mince (CCM) analytique.....	197
I. 2.2.	Chromatographie sur Colonnes ouvertes (CC) .....	198
I. 2.3.	Chromatographie d'exclusion stérique sur Sephadex LH-20.....	199
I. 2.4.	Chromatographie liquide à haute performance (CLHP) .....	199
I. 2.4.1.	Chromatographie liquide haute performance analytique .....	199

i.	Principe.....	199
ii.	Instrument et méthodologie .....	200
I.	2.4.2. Chromatographie liquide haute performance préparative et semi-préparative.....	201
I.	2.5. Chromatographie de partage centrifuge (CPC) .....	201
I.	2.5.1. Principe de la technique .....	201
I.	2.5.2. Instrument et méthodologie.....	203
I.	2.6. Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG/SM) .....	204
I.	2.6.1. Principe .....	204
I.	2.6.2. Mode opératoire.....	205
II.	<b>TECHNIQUES DE DETERMINATION STRUCTURALE DES COMPOSES ISOLEES.....</b>	<b>205</b>
II.	<b>1. Spectrométrie de Masse Haute Résolution (HRMS).....</b>	<b>205</b>
II.	<b>2. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....</b>	<b>205</b>
II.	2.1. RMN du <sup>1</sup> H .....	206
II.	2.2. RMN du <sup>13</sup> C .....	206
II.	2.3. RMN bidimensionnelle .....	207
II.	2.3.1. Mode opératoire.....	207
III.	<b>OUTILS STATISTIQUES .....</b>	<b>207</b>
III.	<b>1. Analyse en Composante Principale (ACP) .....</b>	<b>208</b>
III.	<b>2. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) .....</b>	<b>208</b>
IV.	<b>TESTS PHARMACOLOGIQUES.....</b>	<b>209</b>
IV.	<b>1. Procédure d'évaluation de l'activité antimicrobienne .....</b>	<b>209</b>
IV.	1.1. Méthode de dilution en milieu solide.....	209
IV.	1.1.1. Criblage de l'activité antimicrobienne des extraits des 8 <i>Eryngium</i> .....	209
IV.	1.1.2. Criblage de l'activité antimicrobienne contre des bactéries hautement résistantes et productrices de BLSE.....	211
IV.	1.2. Bioautographie .....	213
IV.	1.2.1. Préparation des plaques CCM.....	213
IV.	1.2.2. Préparation du milieu et ensemencement des bactéries .....	214
IV.	1.3. Détermination de CMI et CMB en microplaque .....	214
IV.	<b>2. Criblage et évaluation de l'activité phototoxique .....</b>	<b>216</b>
IV.	2.1. Préparation des extraits et culture bactérienne.....	216
IV.	2.2. Appareillage de l'activité phototoxique .....	216
IV.	2.2.1. Source lumineuse.....	216
IV.	2.2.2. Incubateur.....	218
IV.	2.3. Lecture des résultats .....	218

<b>IV. 3. Evaluation de l'activité cytotoxique.....</b>	<b>218</b>
IV. 3.1. Culture des cellules.....	218
IV. 3.2. Mesure de la prolifération cellulaire .....	218
IV. 3.2.1. Test MTT : Principe.....	219
IV. 3.2.2. Mode opératoire.....	219
REFERENCES .....	221
ANNEXES.....	245

# ABRÉVIATIONS

- AcOEt : acétate d'éthyle
- ACP : Analyse en Composante Principale
- BLSE : Bêta-Lactamases à Spectre Etendu
- CAH : Classification Ascendante Hiérarchique
- CCM : Chromatographie sur Couche Mince
- CDCl<sub>3</sub> : chloroforme deutéré
- CI<sub>50</sub> : concentration inhibitrice de 50% de la population cellulaire
- CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Performance
- CMB : Concentration Minimale Bactéricide
- CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
- COSY : *CO*rrrelation *Sp*ectroscopY
- CPC : Chromatographie de Partage Centrifuge
- CPG/SM : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
- DCM : dichlorométhane
- d : doublet
- dd : doublet dédoublé
- ddd : doublet dédoublé dédoublé
- DE<sub>50</sub> : Dose Efficace médiane
- DMSO : diméthylsulfoxyde
- DO : densité optique
- EBLSE : Entérobactéries productrices de Bêta-Lactamases à Spectre Etendu
- EP : éther de pétrole
- ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
- Et<sub>2</sub>O : éther diéthylique
- EtOH : éthanol
- Hep : heptane
- HR-MS : *High-resolution Mass Spectrometry*
- HMBC : *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation spectroscopy*
- HSQC : *Heteronuclear Single-Quantum Correlation spectroscopy*
- Hz : Hertz
- INT : para-iodonitrotétrazolium
- IR : Indice de Rétention
- J : constante de couplage
- m : multiplet
- m/z : masse/charge d'un ion
- Me : méthyle
- MeNO<sub>2</sub> : nitrométhane
- MeOH : méthanol

- MH : bouillon Mueller Hinton
- NOESY : *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*
- OMS : Organisation Mondiale de la Santé
- PDT : thérapie photodynamique
- PDTa : photothérapie dynamique antibactérienne
- ppm : partie par million
- PS : photosensibilisateur
- q : quadruplet
- RC : Ringer cystéine
- Rf : rapport frontal
- RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
- s : singulet
- SM-ESI : Spectrométrie de Masse en mode Electrospray
- t : triplet
- UFC : unité formant colonie
- UV : ultraviolet
- $\delta$  : déplacement chimique

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des principales molécules de $\beta$ -lactamines .....	26
Tableau 2 : Classification du genre <i>Eryngium</i> .....	44
Tableau 3 : Activités biologiques des <i>Eryngium in-vitro</i> .....	47
Tableau 4 : Activités biologiques des <i>Eryngium in-vivo</i> .....	49
Tableau 5 : Structure de quelques polyacétylènes retrouvés chez les <i>Eryngium</i> .....	55
Tableau 6 : Composés majoritaires oxygénés non terpéniques (%) identifiés dans les huiles essentielles des espèces du genre <i>Eryngium</i> .....	63
Tableau 7: Composés majoritaires hydrocarbonés terpéniques (%) identifiés dans les huiles essentielles du genre <i>Eryngium</i> .....	64
Tableau 8 : Composés majoritaires oxygénés terpéniques (%) identifiés dans les huiles essentielles du genre <i>Eryngium</i> .....	67
Tableau 9 : Rendement d'extraction des <i>Eryngium</i> par différents solvants (g/100g MS).....	96
Tableau 10 : Les principaux composés que pourraient contenir les différents extraits .....	97
Tableau 11 : Concentrations minimales inhibitrices des différents extraits contre 36 souches microbiennes .....	99
Tableau 12 : Activité phototoxique des 8 espèces sur les bactéries à Gram <sup>+</sup> .....	104
Tableau 13 : Activité phototoxique des 8 espèces sur les bactéries à Gram- et la levure ....	105
Tableau 14 : Valeurs des CI <sub>50</sub> pour les différentes lignées cellulaires après traitement avec les extraits des <i>Eryngium</i> .....	109
Tableau 15 : Valeurs des CI <sub>50</sub> pour les différentes lignées cellulaires après traitement avec les extraits des <i>Eryngium</i> .....	109
Tableau 16 : Composition (%) des quatre extraits de l' <i>E. dichotomum</i> analysés par CPG/SM .....	113
Tableau 17 : Composition (%) des trois extraits d' <i>E. campestre</i> analysés par CPG/SM .....	115
Tableau 18 : Composition (%) des trois extraits de l' <i>E. ilicifolium</i> analysés par CPG/SM .	117
Tableau 19: Composition (%) de l'extrait d' <i>E. glomeratum</i> analysé par CPG/SM.....	118
Tableau 20 : Composition (%) de l'extrait d' <i>E. barrelieri</i> analysé par CPG/SM .....	121
Tableau 21 : Composition (%) des trois extraits de l' <i>E. maritimum</i> analysés par CPG/SM	123
Tableau 22 : Composition (%) des trois extraits de l' <i>E. tricuspidatum</i> analysés par CPG/SM .....	126
Tableau 23 : Composition (%) des trois extraits de l' <i>E. triquetrum</i> analysés par CPG/SM.	127
Tableau 24 : Composition (%) des huiles essentielles d' <i>E. barrelieri</i> et <i>E. glomeratum</i> analysés par CPG/SM.....	137
Tableau 25 : Activité antimicrobienne des huiles essentielles des parties aériennes d' <i>Eryngium glomeratum</i> Lamk. et <i>Eryngium barrelieri</i> Boiss.....	142
Tableau 26 : Rf des composés d'intérêt.....	149
Tableau 27: Coefficient de partage des systèmes V, W et X.....	152

Tableau 28 : Coefficient de partage des composés A5 et A4 dans les systèmes T, U, V et le système adapté .....	154
Tableau 29 : caractérisation des sous-fractions contenant les principes actifs de C1.14 après son passage en CPC .....	156
Tableau 30 : systèmes de solvant testés pour la séparation des composés actifs de la fraction C1.3 :.....	158
Tableau 31 : RMN <sup>1</sup> H du C1.4.....	167
Tableau 32 : RMN <sup>13</sup> C du C1.4 .....	168
Tableau 33 : RMN <sup>1</sup> H du C1.4.....	173
Tableau 34 : RMN <sup>13</sup> C du C1.4 .....	173
Tableau 35 : RMN <sup>1</sup> H du CP7-G3 .....	181
Tableau 36 : RMN <sup>13</sup> C du C1.4 .....	182
Tableau 37 : Caractéristiques des souches sélectionnées .....	183
Tableau 38 : Activité antibactérienne des produits testés, CMI (µg/ml) .....	185
Tableau 39 : CMI et CMB des composés C1.4 et A6 (µg/ml) .....	186
Tableau 40 : Origine et date de récolte des <i>Eryngium</i> .....	195
Tableau 41 : Gradient des solvants majoritairement utilisés pour l'analyse en CLHP des fractions et produits purs d' <i>Eryngium triquetrum</i> Vahl.....	200

# TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Structure d'une pénicilline avant et après l'action d'une $\beta$ -lactamase.....	27
Figure 2 : Plante 1 : <i>Ammi majus</i> , plante 2 : <i>Psoralea corylifolia</i> .....	32
Figure 3 : Psoralène .....	32
Figure 4 : Lupus vulgaris : manifestation cutanée de la tuberculose.....	33
Figure 5 : Diagramme de Jablonski et réactions photochimiques de type I et II.....	35
Figure 6 : Photosensibilisants retrouvés chez les végétaux. ....	36
Figure 7 : furanoquinoline et furocoumarine ayant le même mode d'action photosensibilisante. .....	37
Figure 8 : Dérivés d'anthraquinone retrouvés chez <i>Hypericum perforatum</i> .....	37
Figure 9 : Recours à la thérapie photodynamique (PDTa) pour le traitement des parodontopathies chez l'homme .....	41
Figure 10: L'ombelle des Apiacées.....	44
Figure 11 : Répartition géographique des <i>Eryngium</i> . ....	45
Figure 12 : Biosynthèse du falcarinol et des polyacétylènes de type falcarinol.....	53
Figure 13: Origine des des polyacétylènes : exemples et cas particulier des composés soufrés. .....	54
Figure 14 : Structure de polyacétylènes extrêmement toxiques isolés à partir d'Apiacées non comestibles.....	57
Figure 15 : L'éventuelle réaction des polyacétylènes de type falcarinol avec les biomolécules .....	59
Figure 16 : Photo de l'espèce <i>Eryngium triquetrum</i> (Vahl.).....	72
Figure 17 : Photo de l'espèce <i>Eryngium dichotomum</i> (Desf.).....	74
Figure 18 : Photo de l'espèce <i>Eryngium tricuspdatum</i> (L.).....	77
Figure 19: Photo de l'espèce <i>Eryngium campestre</i> (L.).....	79
Figure 20 : Photo de l'espèce <i>Eryngium ilicifolium</i> (Lamk.).....	84
Figure 21 : Photo de l'espèce <i>Eryngium maritimum</i> (L.).....	86
Figure 22 : Photo de l'espèce <i>Eryngium barrelieri</i> (Boiss.).....	90
Figure 23 : Photo de l'espèce <i>Eryngium glomeratum</i> (Lamk.).....	91
Figure 24 : procédure d'extraction de la drogue sèche des <i>Eryngium</i> avec macération.....	95
Figure 25 : Photo de boîtes de pétri d'un extrait photoactif .....	103
Figure 26 : Spectre d'inhibition photoactive : effet des irradiations UV sur le nombre de souches inhibées.....	106
Figure 27 : Pourcentage d'inhibition moyen des extraits irradiés calculé par rapport aux témoins non irradiés.....	108
Figure 28 : CCM de l'huile essentielle (HE) et de l'extrait à l'éther de pétrole (EP) des parties aériennes d' <i>E. glomeratum</i> . ....	111
Figure 29 : Chromatogramme de la composition chimique de l'extrait d' <i>E. ilicifolium</i> .....	116
Figure 30 : Chromatogramme de la composition chimique de l'extrait d' <i>E. glomeratum</i> ...	118

Figure 31 : Chromatogramme des composés volatils de l'extrait d' <i>E. maritimum</i> .....	122
Figure 32 : Chromatogramme de la composition chimique de l'extrait d' <i>E. tricuspidatum</i> .....	125
Figure 33 : Dendrogramme des extraits des <i>Eryngium</i> de Tunisie en fonction de leurs composés chimiques volatils .....	129
Figure 34 : ACP des compositions chimiques des extraits des <i>Eryngium</i> tunisiennes.....	131
Figure 35 : CCM de l'extrait à l'éther de pétrole des racines d' <i>E. triquetrum</i> , .....	144
Figure 36 : CCM et bioautographie de l'extrait brut (B) des racines d' <i>E. triquetrum</i> .....	145
Figure 37 : Schéma de fractionnement et bilan massique de l'extrait éther de pétrole (20 g). .....	147
Figure 38:CCM (254 et 365 nm) et bioautographie d'immersion des fractions C1.10, C1.11, C1.12, C1.13 et C1.14.....	149
Figure 39 : CCM récapitulatives des systèmes de solvant testés.....	151
Figure 40 : Profil CCM (éluant toluène/acétate d'éthyle 1,5 : 28,5) et chromatogramme obtenu à 254 et 205 nm de la fraction C1.14.....	153
Figure 41: CCM récapitulatives des systèmes de solvant testés pour séparer les composés A4 et A5.....	153
Figure 42 : profil CLHP (longueurs d'onde 205) de la phase organique (V mob) et la phase aqueuse (V stat) du système V de la fraction C1.14.....	154
Figure 43: Chromatogramme du fractionnement de la fraction C1.14 des racines d' <i>E. triquetrum</i> obtenu par CPC (205 nm).....	155
Figure 44 : CCM (à 254 nm et révélées à l'anisaldéhyde sulfurique) et bioautographie d'immersion des fractions C1.1, C1.2, et C1.3.....	157
Figure 45 : Schéma de fractionnement de 5,7 g de la fraction C1.2 et de purification du composé C2.4 (240 mg).....	158
Figure 46 : CCM récapitulatives des systèmes de solvant testés pour la séparation de C1.3.....	159
Figure 47 : Schéma de fractionnement par CPC de la fraction C1.3 (870 mg) par le système Arizona Z. ....	159
Figure 48 : CCM récapitulatives (UV : 254 nm et anisaldéhyde sulfurique respectivement) de la fraction CP10.G2. ....	160
Figure 49 : CCM récapitulatives de la fraction CP10.G4.....	160
Figure 50 : Composé C1.4 .....	161
Figure 51: Spectre de RMN du <sup>13</sup> C en <i>J-modulé</i> du composé C1.4 (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	162
Figure 52 : Spectre du <sup>1</sup> H du composé C1.4 (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	163
Figure 53: Spectre COSY du composé C1.4 (CDCl <sub>3</sub> ). ....	163
Figure 54 : couplages du système ABX de H-1, H-2 et H-3 .....	164
Figure 55: couplage des protons du groupement oléfinique.....	164
Figure 56 : position de l'hydroxyle en C-3.....	165
Figure 57 : Spectre HSQC du produit C1.4 (CDCl <sub>3</sub> ).....	166
Figure 58: Principales corrélations HMBC du C1.4.....	167
Figure 59 : Structure du composé A6 .....	168

Figure 60 : Spectre de RMN du $^{13}\text{C}$ en <i>J-modulé</i> du composé A6 (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	169
Figure 61 : Spectre du $^1\text{H}$ du composé A6 (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	170
Figure 62 : Corrélations proton-proton (H-8, 9 et 10) du spectre COSY .....	171
Figure 63 : Spectre HMBC du produit A6 ( $\text{CDCl}_3$ ) .....	172
Figure 64 : structure du composé C2.4 .....	174
Figure 65 : CCM du composé C2.4 (élution EP/AcOEt 20 :2) révélé à l'anisaldéhyde sulfurique. ....	174
Figure 66 : représentation du spectre RMN- $^1\text{H}$ montrant les signaux caractéristiques du triglycéride .....	175
Figure 67 : Spectre RMN- $^1\text{H}$ du composé C2.4. (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	176
Figure 68 : Structure du composé C2.4 .....	178
Figure 69 : composé CP7-G3.....	178
Figure 70 : spectre RMN- $^1\text{H}$ du composé CP7-G3 (en haut) et spectre RMN- $^1\text{H}$ du composé C2.4 (en bas). (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	179
Figure 71 : Structure de l'acide linoléique montrant les fragments (A, B, C et D) ayant des signaux spécifiques en RMN- $^1\text{H}$ .....	180
Figure 72 : Spectre de RMN du $^{13}\text{C}$ en <i>J-modulé</i> du composé CP7-G3 (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	180
Figure 73 : Photo de l'activité antimicrobienne du falcarinol contre <i>P. aeruginosa</i> 10278 dans la microplaque.....	187
Figure 74: mécanisme d'action proposé pour le falcarinol. RSH : résidu thiol d'une biomolécule .....	188
Figure 75 : carte des stations de prélèvements des <i>Eryngium</i> .....	194
Figure 76 : photo des racines d' <i>Eryngium triquetrum</i> Vahl. utilisées pour cette étude.....	196
Figure 77 : Photographie d'un appareil CPC (Armen® instruments) et détail d'un des disques constitutifs de la colonne .....	201
Figure 78 : photos de la préparation de bioautographie d'immersion représentant la mise en place de la CCM dans les boîtes de pétri carrée, l'ajout du milieu de culture contenant les souches à tester et la révélation de la plaque par le réactif INT. ....	214
Figure 79 : Schéma représentant la préparation de microplaques (96 puits) permettant de déterminer la CMI des produits purifiés .....	215
Figure 80 : Situation des irradiations UV émises par la lampe BLB (nm).....	217
Figure 81 : Schéma de plaque utilisée pour préparer les dilutions pour l'activité cytotoxique. ....	219

# INTRODUCTION GENERALE

La résistance aux antibiotiques est devenue un problème de santé publique d'amplitude croissante, notamment avec l'accroissement des maladies infectieuses de plus en plus difficiles à traiter. Cette résistance augmente à un rythme alarmant, particulièrement suite à l'apparition de multirésistances parmi les bactéries à Gram négatif associées à la production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE), qui sont devenues une préoccupation dans le monde entier.

Par conséquent, la découverte et le développement d'agents antimicrobiens ou de stratégies de lutte efficaces contre cette antibiorésistance sont devenus d'une extrême importance.

Les plantes ont constitué et constituent encore la base de nombreuses thérapeutiques dans plusieurs pays, et de nombreux principes actifs ont été retrouvés chez les plantes médicinales. Par ailleurs, de nombreuses publications s'intéressent également à la recherche et au développement d'alternatives face à la résistance multiple aux antibiotiques (phagothérapie, apithérapie, nanoparticules d'antibiotiques, ...), cependant, ces alternatives ne sont pas toutes de qualité équivalente et n'ont pas forcément une activité similaire à celle des antibiotiques.

Parmi les voies thérapeutiques alternatives qui ont prouvé leur efficacité, on distingue la photothérapie qui a été utilisée depuis de nombreuses décennies dans le traitement de plusieurs maladies dermatologiques comme le psoriasis et le vitiligo. En revanche, la photothérapie dynamique est actuellement en plein essor et l'idée d'appliquer cette alternative au traitement de pathologies infectieuses est apparue récemment grâce aux découvertes du potentiel d'éradication de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM).

Dans ce contexte, les deux objectifs suivants sont principalement fixés pour ce présent travail :

- i. La recherche d'extraits et de molécules antimicrobiens efficaces contre des microorganismes multirésistants aux antibiotiques et plus particulièrement à des formes évolutives de l'antibiorésistance comme les bactéries productrices de BLSE.
- ii. La mise en place d'une méthodologie et le criblage de plantes à activité phototoxique intéressante notamment contre les bactéries à Gram négatif qui sont généralement résistantes à la photoinhibition.

Les plantes choisies pour notre étude appartiennent au genre *Eryngium* L. (Apiaceae, Saniculoideae). Ce genre comprend plus de 250 espèces dont plusieurs sont connues et utilisées en médecine traditionnelle dans de nombreux pays, cependant, il y a uniquement une vingtaine d'espèces qui ont été plus ou moins étudiées du point de vue phytochimique et biologique.

En Tunisie il existe 8 espèces d'*Eryngium* : *E. campestre*, *E. dichotomum*, *E. glomeratum*, *E. ilicifolium*, *E. tricuspdatum*, *E. triquetrum*, *E. maritimum* et *E. barrelieri* ; ces espèces sont utilisées en médecine traditionnelle et sont en majorité peu étudiées. Notre recherche portera alors sur la totalité des *Eryngium* qui poussent en Tunisie.

Dans ce travail, nous nous attarderons également sur l'analyse de la variabilité chimique de ces espèces et la corrélation entre l'activité biologique et la composition chimique des extraits et des huiles essentielles étudiés.

Le premier chapitre de cette thèse est consacré à l'étude bibliographique du phénomène de la résistance microbienne en expliquant ses différentes formes et les stratégies de lutte contre l'antibiorésistance. La photothérapie et son application dans le domaine de la microbiologie y seront également détaillées.

Les généralités sur le genre *Eryngium* et les études phytochimiques antérieures effectuées sur ce genre seront aussi développées dans ce 1<sup>er</sup> chapitre. Finalement, la description botanique, les utilisations traditionnelles et les études précédentes des espèces qui font l'objet de ce présent travail seront également décrites.

Le deuxième chapitre est consacré à la présentation des résultats obtenus au cours des investigations phytochimiques et biologiques effectuées sur les 8 *Eryngium*. Une première partie est accordée à l'étude des activités antimicrobienne, phototoxique et cytotoxique de toutes les espèces. Ensuite, la deuxième partie comporte l'identification par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse des composés volatils des extraits et huiles essentielles, ainsi que la comparaison de la variabilité chimique entre les différentes espèces par des outils de statistique descriptive.

La 3<sup>ème</sup> partie de ce chapitre est consacrée à l'étude phytochimique approfondie d'*E. triquetrum*, la séparation bioguidée des composés actifs et l'étude de l'activité antimicrobienne des composés isolés.

Les résultats obtenus sont présentés, analysés et discutés à la fin de chaque chapitre. La conclusion de ce travail avec les différentes perspectives envisageables seront évoquées à la fin de la thèse.

# GÉNÉRALITÉS

# I. La résistance aux antibiotiques : un grave problème de santé publique

## I. 1. Le phénomène de résistance microbienne

La résistance aux antimicrobiens est devenue une menace sérieuse pour la santé publique, constituant l'un des plus importants défis sanitaires mondiaux du 21<sup>ème</sup> siècle.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), "la résistance aux antibiotiques est en train de devenir une urgence de santé publique en des proportions encore inconnues". À l'heure actuelle, il existe au moins 25 000 décès par an en Europe par septicémie à cause des infections bactériennes non traitables avec les antibiotiques disponibles, et des coûts de traitements estimés à plus de 1,5 milliard d'euros par an [1][2].

L'un des principaux facteurs d'émergence de la résistance microbienne était l'utilisation abusive des antibiotiques.

La découverte des antibiotiques était considérée au départ comme un progrès en médecine humaine et animale qui a réalisé un réel tournant pour la thérapeutique des maladies infectieuses bactériennes, ce qui a permis de réduire de manière spectaculaire la mortalité associée aux maladies infectieuses au cours du 20<sup>ème</sup> siècle [3]. Cependant, leur utilisation excessive et répétée a conduit à l'apparition de bactéries résistantes à ces médicaments. Ponctuelles au départ, elles sont devenues massive et préoccupante [4]. Leur perpétuelle évolution est la résultante d'interactions complexes entre la bactérie et son environnement [5]. En effet, les antibiotiques exercent une pression de sélection face à laquelle les microorganismes utilisent des parades leur permettant de s'adapter aux conditions hostiles de leur environnement [6].

Certaines souches sont multirésistantes, d'autres sont même devenues toto-résistantes, c'est-à-dire résistantes à tous les antibiotiques disponibles. Ce dernier cas est heureusement encore rare, mais le phénomène est en accroissement ce qui place les médecins dans une impasse thérapeutique totale puisqu'ils ne disposent plus d'aucune solution pour lutter contre l'infection [4]. Certaines résistances posent plus spécifiquement problème en milieu hospitalier. C'est par exemple le cas des souches de *Pseudomonas aeruginosa*, responsable de nombreuses infections nosocomiales, et qui présente plus de 20 % de résistance aux carbapénèmes. Certaines souches toto-résistantes sont notamment retrouvées chez les patients atteints de mucoviscidose, une maladie héréditaire grave et fréquente qui atteint les voies respiratoires et le système digestif [4].

*Acinetobacter baumannii* est également redoutée à l'hôpital. Les infections nosocomiales liées à cette bactérie résistante à l'imipénème sont passées de 2 ou 3 % en 2008 à 11,1 % en 2011. Le phénomène est d'autant plus préoccupant que la résistance de cette bactérie dans l'environnement est impressionnante et qu'elle se développe préférentiellement chez des malades immunodéprimés et vulnérables.

En dehors des hôpitaux, on rencontre d'autres problèmes comme celui du pneumocoque résistant à la pénicilline, retrouvé dans de nombreuses infections ORL. Cette résistance qui était quasiment nulle il y a vingt ans, a atteint en 2002 un pic à 48 %. Aujourd'hui, elle concerne 27 % des souches.

Tous les jours de nouvelles formes de résistance apparaissent, laissant les médecins de plus en plus dépourvus de solutions pour lutter contre les infections. Cependant, le cas le plus préoccupant, en ville comme à l'hôpital, est celui des bactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) et principalement celui des entérobactéries (EBLSE). L'émergence d'entérobactéries résistantes à l'ensemble des antibiotiques de la classe des  $\beta$ -lactamines, en particulier aux carbapénèmes, risque de devenir un problème de santé publique majeur. Il existe plusieurs types de résistances aux carbapénèmes qui s'associent souvent à d'autres mécanismes de résistance, et peuvent conduire à terme à une impasse thérapeutique totale [4].

Cependant, malgré le besoin reconnu de développer de nouvelles armes antibiotiques, seules deux nouvelles classes de médicaments ont été mises sur le marché ces 30 dernières années.

En 2011, dans son plan d'action contre les menaces croissantes de la résistance microbienne aux antibiotiques, la Commission Européenne a appelé à une "recherche collaborative sans précédent et à un effort de développement de nouveaux antibiotiques" [2]. L'OMS a appelé aussi l'attention de tous sur la nécessité de mettre au point de nouveaux produits diagnostic, de nouveaux antibiotiques et d'autres outils pour permettre aux professionnels de la santé de garder leur avance sur la progression des résistances [7].

La résistance aux antibiotiques peut s'exprimer au travers de plusieurs mécanismes : production d'une enzyme modifiant ou détruisant l'antibiotique, modification de la cible de l'antibiotique ou encore, l'imperméabilisation de la membrane bactérienne [4].

Certaines bactéries sont naturellement résistantes à des antibiotiques. Leur patrimoine génétique les rend insensibles à un certain nombre d'agents antimicrobiens. On parle alors de résistance innée. C'est par exemple le cas d'*Escherichia coli* face à la vancomycine, ou encore de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis de l'ampicilline.

Le phénomène de résistance acquise est plus préoccupant, il entraîne l'apparition subite d'une résistance à un ou plusieurs antibiotiques auxquels la bactérie était auparavant sensible.

## I. 1.1. La résistance naturelle

La résistance bactérienne aux antibiotiques peut être une caractéristique intrinsèque de l'organisme (par exemple les particularités structurales des parois cellulaires de certaines bactéries) qui les rendent naturellement résistantes. La résistance naturelle peut également être obtenue au moyen d'une mutation dans son propre ADN chromosomique [8].

Il existe différentes formes de résistances naturelles, comme le manque d'un système de transport intrinsèque à un antibiotique, l'absence de récepteur pour un antibiotique donné, ou, comme dans

le cas des bactéries Gram-négatives, la paroi cellulaire est recouverte d'une membrane externe qui établit une barrière imperméable contre certains antibiotiques de poids moléculaire élevé comme les glycopeptides [9].

La résistance naturelle peut être également due à des particularités métaboliques spécifiques de certaines bactéries comme le bacille de la tuberculose dont le métabolisme original lui confère une insensibilité à la plupart des antibiotiques [10].

Finalement, certaines résistances naturelles peuvent être dues à des processus d'échappement spécifiques ou l'expression constitutive ou induite d'une enzyme d'inactivation des antibiotiques [11].

La résistance naturelle définit les phénotypes « sauvages » de la résistance bactérienne [8].

## **I. 1.2. La résistance acquise**

Une résistance acquise se produit quand un microorganisme particulier acquiert une aptitude à résister contre un agent antimicrobien auquel il était déjà sensible auparavant. Elle peut provenir d'une mutation chromosomique de gènes impliqués dans les processus physiologiques normaux ou les structures cellulaires de la bactérie [12], d'une acquisition de gènes de résistance étrangers à partir d'une autre source au moyen de plasmides, de bactériophages ou de transposons [13] ; ou d'une combinaison de ces deux mécanismes.

Contrairement à la résistance naturelle, la résistance acquise ne concerne que certaines souches ou sous-populations d'une espèce bactérienne particulière. Elle est imprévisible sur le plan individuel. Une fois acquise, ce type de résistance peut diffuser rapidement dans une population notamment par la transmission horizontale d'éléments mobiles comme les plasmides [14-16] .

Certaines résistances ne sont pas liées à une modification génétique, elles se traduisent par une augmentation de la concentration minimale inhibitrice d'un antibiotique donné ou une diminution de la vitesse de mort des bactéries, dans ce cas la résistance est dite adaptative. Elle est réversible à la disparition de l'antibiotique dans le milieu. On trouve par exemple ce type de résistance dans les cellules d'un biofilm [15].

## **I. 2. Les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) : agents majeurs de résistance aux antibiotiques**

Les  $\beta$ -lactamines constituent une famille majeure d'antibiotiques répartie en quatre principaux groupes : les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes (Tableau 1).

Ces molécules sont très largement utilisées en clinique, elles agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par fixation aux protéines liant pénicillines (PLC), enzymes impliquées dans la

synthèse du peptidoglycane. Ce sont des antibiotiques à large spectre et leur intérêt réside principalement dans leur activité sur les bacilles à Gram négatif [17].

Tableau 1 : Classification des principales molécules de  $\beta$ -lactamines [17].

Groupes	Sous-groupes	Principales Molécules
Carbapénèmes		imipénème <sup>a</sup> , ertapénème <sup>a</sup>
Céphalosporines	première génération (C1G) deuxième génération (C2G) troisième génération (C3G) quatrième génération (C4G)	céfalexine <sup>a</sup> , céfalotine <sup>a</sup> , cefalonium <sup>a</sup> céfoxitine <sup>a</sup> , céfamandole <sup>a</sup> , céfuroxime <sup>a</sup> céfotaxime <sup>a</sup> , céfopérazone <sup>ab</sup> , ceftiofur <sup>b</sup> , cefpodoxime <sup>a</sup> , céfixime <sup>a</sup> céfépime <sup>a</sup> , céfpirome <sup>a</sup>
Monobactames		aztréonam <sup>a</sup>
Pénicillines	pénicillines aminopénicillines carboxypenicillines	pénicilline G et V <sup>a</sup> , cloxacilline <sup>a</sup> , oxacilline <sup>a</sup> ampicilline <sup>ab</sup> , amoxicilline <sup>ab</sup> pipéracilline <sup>a</sup> , ticarcilline <sup>a</sup>

<sup>a</sup> molécule utilisée en médecine humaine ; <sup>b</sup> molécule utilisée en médecine vétérinaire

Les bêta-lactamases à spectre étendu sont un groupe d'enzymes variées, complexes et en perpétuelle évolution, produites par certaines bactéries résistantes. Elles sont capables d'engendrer des résistances à la majorité des bêta-lactamines telles que les pénicillines, les céphalosporines de première, deuxième et troisième génération et les monobactames, par hydrolyse de l'anneau  $\beta$ -lactame commun à cette classe d'antibiotiques (Figure 1).

Les gènes responsables de la production des BLSE sont principalement transmis par le biais de plasmides qui sont transférables d'une souche à l'autre et même entre des espèces bactériennes différentes [18].

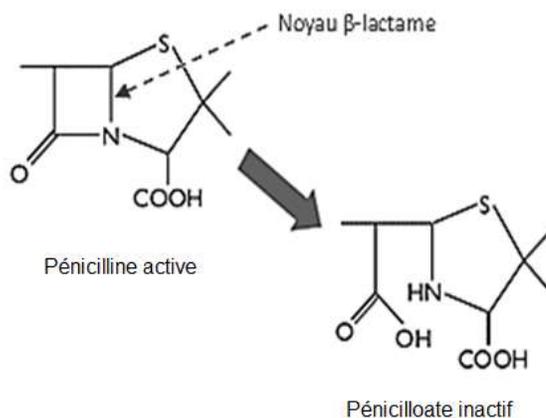


Figure 1 : Structure d'une pénicilline avant et après l'action d'une  $\beta$ -lactamase [19].

Actuellement, plus de 400  $\beta$ -lactamases dont plus de 200 BLSE sont décrites, et malgré que leur origine soit encore inconnue, ces enzymes sont de plus en plus abondantes partout dans le monde à cause de leur forte capacité de dissémination. Actuellement, 10 à 40% des souches d'*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* produisent des BLSE.

Les infections dues aux bactéries productrices de BLSE varient d'une simple infection urinaire à une septicémie potentiellement mortelle, elles peuvent également être portées et transmises par des individus en apparence sains. Ces enzymes posent actuellement un défi thérapeutique majeur particulièrement pour le traitement d'infections nosocomiales et communautaires au niveau local, régional et international. Leur présence est souvent liée à des taux de morbidité et de mortalité élevés [20].

Le choix de molécules antimicrobiennes pour lutter contre ces résistances est souvent compliqué à cause de l'association de plusieurs résistances comme la résistance aux fluoroquinolones ou à l'aminoglycoside.

Actuellement, les carbapénèmes sont considérés comme les antibiotiques de choix pour le traitement des infections causées par des bactéries productrices de BLSE. Malheureusement, l'utilisation des carbapénèmes a été associée à l'apparition de nouvelles espèces bactériennes résistantes à ces antibiotiques telles que *Stenotrophomonas* sp. ou *Pseudomonas aeruginosa*.

L'augmentation de la diversité et de l'ubiquité des gènes codant ces enzymes particulièrement chez les entérobactéries et *Pseudomonas*, ainsi que l'endémicité progressive de ces souches chez les patients atteints de ces bactéries ont rendu la prise en charge du problème des bactéries productrices de BLSE un véritable défi [21].

### I. 3. *Pseudomonas aeruginosa* et résistance aux antibiotiques : un pathogène opportuniste et multirésistant

Parmi les bactéries multirésistantes les plus redoutées on distingue particulièrement *Pseudomonas aeruginosa* qui est considérée comme l'exemple type des bactéries pathogènes opportunistes.

C'est un bacille à Gram négatif, ubiquitaire et saprophyte, qui se développe dans un milieu humide sous forme de microcolonies entourées d'exopolysaccharides [22].

Cette bactérie est pathogène et opportuniste, elle se caractérise par sa virulence, ses multiples mécanismes de résistance, et son adaptabilité à l'hôte et l'environnement.

*P. aeruginosa* est responsable d'un grand nombre d'infections nosocomiales et communautaires, et n'est naturellement sensible qu'à un nombre limité d'antibiotiques. C'est pourquoi l'émergence récente de souches multirésistantes, voire « toto-résistantes », cumulant tout un ensemble de mécanismes de résistance, constitue un sujet d'inquiétude en milieu hospitalier. Par conséquent, sa prise en charge est devenue actuellement de plus en plus problématique [23].

En l'absence de réelle innovation thérapeutique, le traitement des infections dues à cette bactérie repose encore sur des antibiotiques anciens qui nécessitent une optimisation selon des critères pharmacologiques et pharmacocinétiques [24]. Ceci nous oriente donc vers de nouvelles recherches de molécules spécifiques contre ce germe et ses formes résistantes, ou encore vers d'autres pistes thérapeutiques ciblées, d'où le but du présent travail.

#### I. 3.1. Virulence

L'importante pathogénicité de *P. aeruginosa* est liée à son arsenal important en facteurs de virulence [25]. A la fois invasif et toxigène, *P. aeruginosa* possède une forte capacité à interagir avec son environnement. Ainsi, grâce à ses structures superficielles et les récepteurs cellulaires présents chez l'hôte, la bactérie s'attache spécifiquement à sa cible. Elle sécrète des composés toxiques variables qui peuvent déclencher des processus inflammatoires en cas de lyse [26].

Comme la plupart des bactéries Gram-négatives pathogènes, *P. aeruginosa* présente à sa surface des structures qui participent à sa mobilité comme le flagelle, un appendice polaire unique associé à la nage, des pili et des appendices multiples responsables d'un mécanisme d'extension-rétraction. Ces structures permettent le déplacement des bactéries sur des surfaces plus ou moins solides. D'autres appendices filamenteux permettant à la bactérie de s'ancrer à des récepteurs cellulaires pendant la phase de colonisation et de développement des biofilms, ont été également identifiés.

D'autres facteurs de virulence ont été aussi mis en évidence chez *P. aeruginosa*, comme l'exotoxine ExoU, un facteur de pathogénicité important, qui favorise la survenue de pneumopathies nosocomiales, particulièrement chez les patients intubés-ventilés de réanimation [25].

Parmi les molécules relarguées par *P. aeruginosa* dans le milieu extracellulaire, on trouve les sidérophores (pyochéline et pyoverdine) qui ont pour fonction de capter le fer nécessaire à la croissance de la bactérie et lui permettant de produire ses cytochromes.

Finalement, *P. aeruginosa* est capable de sécréter dans son environnement un glycolipide (rhamnolipides) ayant une action lytique vis-à-vis des érythrocytes et des leucocytes ce qui permet le développement des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique [25].

### I. 3.2. Résistance naturelle

*P. aeruginosa* présente une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques, restreignant les possibilités thérapeutiques à un nombre limité d'agents antimicrobiens [26]. Il est naturellement résistant aux aminopénicillines, aux inhibiteurs de bêta-lactamases, aux céphalosporines de première et deuxième génération. Le phénotype sauvage reste sensible aux autres bêta-lactamines (uréidopénicillines, carboxypénicillines, certaines céphalosporines de troisième génération, carbapénèmes et monobactames) [22]. Les autres antibiotiques non actifs sur le phénotype sauvage sont : le cotrimoxazole, les macrolides, les cyclines, le chloramphénicol, les quinolones de première génération, la kanamycine, la rifampicine, les glycopeptides et l'acide fusidique [27] [28].

Cette bactérie a toujours été considérée comme un microorganisme difficile à traiter, sa résistance naturelle résulte de la superposition complexe de plusieurs processus qui tendent, soit à inactiver les antibiotiques, soit à les empêcher d'atteindre leur cible intracellulaire [29].

### I. 3.3. Résistance acquise

*P. aeruginosa* est un germe dont les résistances acquises sont fréquentes. Il s'agit de résistances parfois associées entre elles, transitoires et adaptatives, c'est-à-dire favorisées par la pression de sélection de l'antibiothérapie [22].

*P. aeruginosa* peut utiliser tout un ensemble de mécanismes pour échapper à l'action des antibiotiques auxquels il est habituellement sensible. Certains mécanismes qualifiés d'intrinsèques (propres à l'espèce) apparaissent sous l'effet de mutations spontanées. Ces mutations qui surviennent à des fréquences allant de  $10^{-5}$ , pour les plus fréquentes, à  $10^{-9}$ , pour les plus rares, confèrent une résistance dite « stable » qui, selon le mécanisme en cause, concerne un nombre plus ou moins important d'antibiotiques anti-*Pseudomonas*, à des degrés divers. L'émergence de mutants résistants sous traitement est fréquemment constatée dans les infections à *P. aeruginosa*. Parfois, l'expression de ces mécanismes ne dépend pas de mutations mais s'intègre dans un phénomène adaptatif, complexe et transitoire, conditionné par un mode de vie particulier comme le biofilm. Par ailleurs, l'apparition de nouvelles résistances chez *P. aeruginosa* est fréquemment

liée à l'acquisition de matériel génétique étranger (plasmide, transposon et intégron) récupéré d'autres bactéries à Gram négatif voire à Gram positif [29].

Une infection par des souches résistantes augmente de trois fois la mortalité, de neuf fois le risque de bactériémie secondaire, de deux fois la durée d'hospitalisation et entraîne une inflation des coûts [30].

Les résistances aux  $\beta$ -lactamines sont également très évolutives. De nombreux types de BLSE ont été décrits chez *P. aeruginosa*, notamment les BLSE de type VEP et PER, très largement répandues particulièrement en Asie et en Turquie respectivement. Ces enzymes contribuent à une résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération [31-32].

## **I. 4. Stratégies de lutte contre la résistance microbienne**

### **I. 4.1. Place des produits naturels dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques**

L'évolution constante de la résistance bactérienne aux antibiotiques et l'émergence de nouvelles maladies infectieuses justifient l'urgence de disposer de nouvelles molécules antimicrobiennes pouvant agir soit directement sur les microorganismes, soit indirectement en inhibant un ou plusieurs mécanismes de résistance.

Les composés actifs peuvent être recherchés dans les plantes médicinales. En effet, pour se protéger contre les bactéries, les champignons et les virus, les plantes élaborent naturellement un système de défense approprié, qui leur permet de lutter efficacement contre les microorganismes pathogènes. Elles synthétisent, de manière constitutive ou induite, une multitude de molécules antimicrobiennes ce qui explique la rareté des maladies chez les plantes sauvages [33]. L'originalité de ce système de défense réside dans l'exceptionnelle variabilité chimique des molécules produites. Ces dernières constituent, de par la diversité des groupements structuraux et fonctionnels qu'elles arborent, un vaste réservoir de substances actives [34-35].

Les plantes, qui ont déjà fourni à la médecine des molécules thérapeutiques majeures, comme l'aspirine, la morphine, la quinine ou le taxol, offrent un véritable potentiel pour la recherche de molécules à activité antibactérienne. Elles constituent une source éventuelle de composés antimicrobiens et/ou inhibiteurs des mécanismes de résistances aux antibiotiques [36].

De nombreux composés d'origine végétale ont déjà démontré des propriétés antimicrobiennes ; ces composés agissent suivant plusieurs mécanismes : formation de complexes avec des macromolécules telles que les protéines et les polysaccharides, inhibant ainsi leurs fonctions (polyphénols) ; rupture de membranes microbiennes (flavonoïdes lipophiles, terpénoïdes) et inhibition de l'adhésion de protéines microbiennes aux récepteurs polysaccharidiques de l'hôte (polypeptides). Les plantes médicinales fournissent également des composés qui n'ont pas nécessairement un effet direct sur les microorganismes, mais qui augmentent ou restaurent

l'activité des antibiotiques en inhibant les mécanismes de résistance. Ces composés appartiennent à diverses classes phytochimiques et agissent comme inhibiteurs des pompes à efflux (flavonoïdes, terpénoïdes, alcaloïdes), inhibiteurs des PBP 2a (quinones, terpénoïdes), et comme inhibiteurs des bêta-lactamases (gallates d'alkyle) [37].

## **I. 4.2. La photothérapie : un recours contre la résistance microbienne**

### **I. 4.2.1. Définition**

La photothérapie est une approche et modalité de traitement prometteuse, basée sur l'action sélective des irradiations lumineuses sur des molécules photoactivables appelées « photosensibilisateurs » (PS) [38]. Ces molécules, non toxiques en absence d'une lumière vont être activées par une irradiation lumineuse, de longueur d'onde appropriée (dépendante du PS), soit en formant des photoproduits actifs indépendants de l'oxygène soit en générant des espèces réactives de l'oxygène entraînant la destruction du tissu cible [39].

### **I. 4.2.2. Historique**

Les effets thérapeutiques de la lumière sont connus depuis l'Antiquité. Les égyptiens, les indiens et les chinois utilisaient déjà la lumière solaire combinée à des substances naturelles pour traiter certaines maladies de peau [39]. Dans la médecine traditionnelle indienne, vers 1400 avant J.C., il a été préconisé de prendre des graines de *Psoralea corylifolia* et d'effectuer de nombreuses expositions au soleil afin de guérir le vitiligo, une maladie caractérisée par une forte dépigmentation de la peau causée par la mort ou le dysfonctionnement des mélanocytes [40]. Les égyptiens ingéraient les feuilles d'une plante qui pousse le long du Nil, l'*Ammi majus* (Figure 2), puis s'exposaient au soleil afin de traiter cette maladie. Au XIe siècle de notre ère, un traitement similaire a été proposé par Ibn El Bitar, préconisant des expositions au soleil répétées ainsi que la prise de graines d'*Ammi majus* [40].



Figure 2 : Plante 1 : *Ammi majus*, plante 2 : *Psoralea corylifolia*

Ce n'est qu'en 1911 que les psoralènes (Figure 3) ont été identifiés comme principes actifs dans ces deux plantes [41].

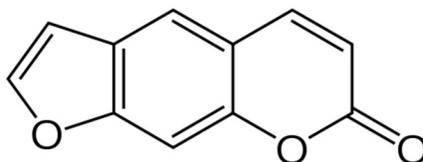


Figure 3 : Psoralène

A la fin du XIXe siècle, les patients atteints de lupus vulgaris (Figure 4) étaient encore traités par héliothérapie, c'est-à-dire exposés de façon contrôlée, aux rayons du soleil. La principale limite à cette thérapie était la nécessité d'avoir un bon ensoleillement. C'est ainsi qu'un médecin danois nommé Niels R. Finsen, développa en 1901 la première source de lumière artificielle. Il reçut le prix Nobel de médecine en 1903 pour ses travaux. L'utilisation de lumière artificielle marque le début de la photothérapie moderne [42].



Figure 4 : Lupus vulgaris : manifestation cutanée de la tuberculose

La « photochimiothérapie » a évolué en 1974 et l'utilisation de psoralènes en combinaison avec une irradiation UVA a été décrit comme traitement efficace contre le psoriasis et le vitiligo, ce traitement a été dénommé PUVA [43].

Les travaux d'Oscar Raab, qui a mis en place le concept de photosensibilisation, de H. von Tappeiner et d'A. Jesionek ont permis de mettre en évidence le rôle de l'oxygène dans ce concept et d'introduire par la suite le terme d'«action photodynamique» [44-45].

### **I. 4.2.3. Principe d'action**

D'un point de vue photochimique, plusieurs voies peuvent être utilisées pour exercer un effet phototoxique sur un substrat biologique. En général, on subdivise ces réactions phototoxiques en photodynamiques, qui requièrent de l'oxygène, et non-photodynamiques indépendantes de l'oxygène [46].

#### **i. Les réactions non-photodynamiques**

Ce sont des réactions directes qui induisent la formation de photoproduits stables indépendants de l'oxygène. Le principal exemple de cette phototoxicité non photodynamique est celle induite par des furocoumarines. A l'obscurité, cette dernière molécule s'intercale dans l'ADN, elle se lie à une des bases après irradiation d'un de ses sites photolabiles (mono-addition), puis si le rayonnement se poursuit, elle se lie à une autre base de l'autre brin d'ADN par le deuxième site thermolabile (bi-addition).

Les furocoumarines sont capables de produire des photomodifications de différentes biomolécules. Contrairement à la plupart des autres composés, elles exercent leur phototoxicité, pour la plus

grande part, à travers une photoréaction indépendante de l'oxygène. Toutefois des réactions photodynamiques peuvent s'ajouter. La cible cellulaire des réactions phototoxiques dépend des caractéristiques physicochimiques de l'agent phototoxique.

Ce mécanisme est à l'origine de plusieurs activités biologiques dont une action antiproliférative, ce qui explique l'emploi de ces molécules dans la Puvathérapie. Cette dernière est utilisée dans le traitement des patients atteints de psoriasis, de lymphomes cutanés épidermotropes ainsi que plusieurs autres maladies inflammatoires cutanées [47-49].

## ii. Les réactions photodynamiques

La thérapie photodynamique (PDT) est basée sur un concept attractif : la combinaison d'un agent photosensibilisant et de la lumière obtenue à partir de laser de faible énergie ou de diodes électroluminescentes qui sont relativement inoffensifs par eux-mêmes. L'agent photosensibilisant peut être injecté, ingéré ou appliqué localement, puis il est activé par un laser émettant une longueur d'onde spécifique. Ces agents photosensibilisants sont des composés chimiques qui absorbent l'énergie lumineuse et qui sont alors capables d'utiliser cette énergie pour induire des cascades de réactions photochimiques classiques, conduisant à la production de dérivés oxygénés réactifs, qui sont les acteurs majeurs du processus photodynamique. Après excitation par la lumière, l'agent photosensibilisant acquiert de nouvelles propriétés physicochimiques [50].

La photo-activation du photosensibilisateur, définie par le changement d'état de celui-ci par absorption de la lumière ( $h\nu$ ) lui permet d'acquérir de l'énergie et de passer d'un état fondamental  $S_0$  à un état excité  $S_2$  de courte durée de vie. Il va être stabilisé par conversion interne au niveau d'excitation singulet le plus bas  $S_1$ . Cet état étant très instable ( $10^{-9}$ s), il va rapidement laisser place à un état intermédiaire dit « triplet » ( $T_1$ ) par passage inter-système. Dans son état triplet de durée de vie plus longue ( $10^{-6}$  à 1s en fonction de son environnement), le photosensibilisateur devient un agent très réactif pouvant intervenir dans deux types de réactions photochimiques (Diagramme de Jablonski, Figure 5) :

- La réaction photochimique de type I : cette réaction implique l'interaction directe du PS à l'état excité triplet avec les substrats biologiques se trouvant à proximité. Elle se traduit par la formation d'ERO et de radicaux libres comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) et le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ), reconnus comme de puissants oxydants d'une grande variété de biomolécules.
- La réaction photochimique de type II : le PS à l'état triplet réagit avec l'oxygène moléculaire ( $^3O_2$ ) conduisant à la formation d'une espèce particulièrement réactive de l'oxygène, l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ). De par sa forte réactivité, l'oxygène singulet réagit avec un grand nombre de substrats biologiques provoquant des dommages oxydatifs aboutissant à la mort cellulaire.

Les réactions de type I et de type II peuvent se produire simultanément. Cependant, la réaction de type II apparaît majoritairement en PDT antitumorale. La cytotoxicité induite par la PDT est donc principalement le résultat de phénomènes d'oxydation entraînant la dégradation des acides aminés (histidine, tryptophane, méthionine), et des lipides (cholestérol, phospholipides) composant les membranes cellulaires et les mitochondries [51-52].

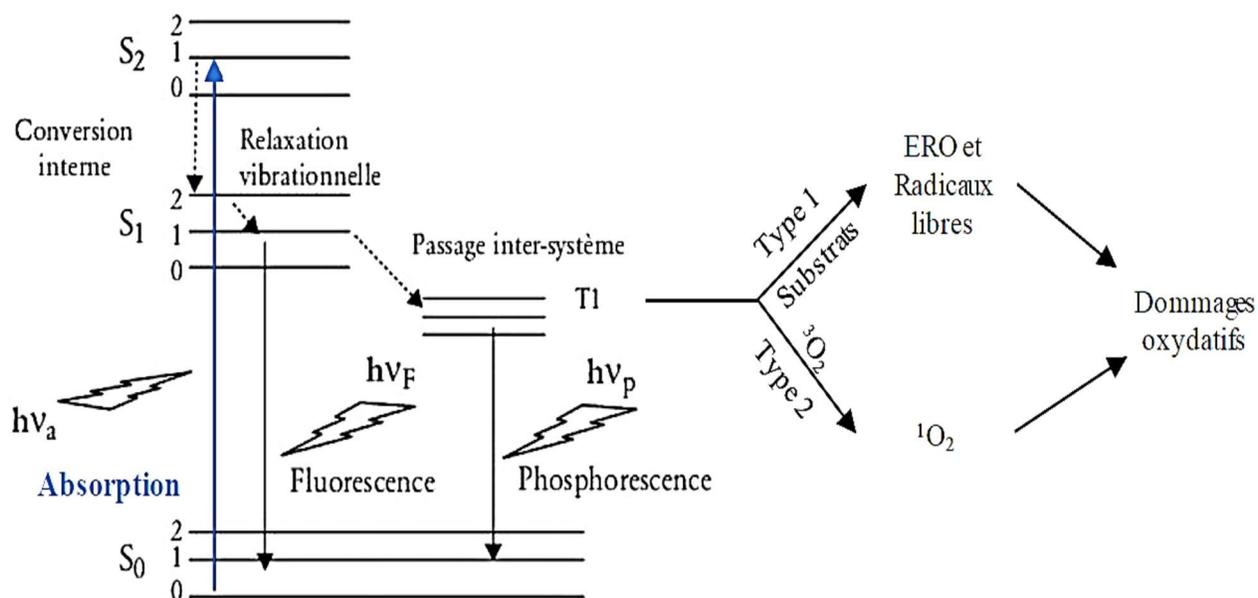


Figure 5 : Diagramme de Jablonski et réactions photochimiques de type I et II [38]

#### I. 4.2.4. Les composés photosensibilisateurs dans le règne végétal

On peut définir un composé photosensibilisateur ou agent photosensibilisant (PS) comme une entité moléculaire qui absorbe des radiations causant le processus, suivant lequel, un changement photochimique ou photophysique se manifeste au niveau d'une autre entité moléculaire. Ces composés photosensibilisateurs, jouent un rôle déterminant dans le succès d'un traitement de photothérapie. Il existe des centaines de molécules naturelles ou synthétiques, des extraits de plantes ou des macrocycles synthétiques, pouvant être utilisés en photothérapie [53].

Les plantes comportant des molécules photosensibilisantes appartiennent essentiellement à deux familles botaniques : les Apiacées, et les Rutacées.

Parmi les photosensibilisants d'origine naturelle (Figure 6), on trouve des polyacétylènes (a), des thiophènes (b), des quinones (Figure 7), des chromènes, des coumarines, des furocoumarines, des alcaloïdes, des furanoquinoléines, des porphyrines (précurseurs et produits de dégradation des chlorophylles), des sesquiterpénoïdes (2,7-dihydroxycadalène) et des isoflavonoïdes [54].

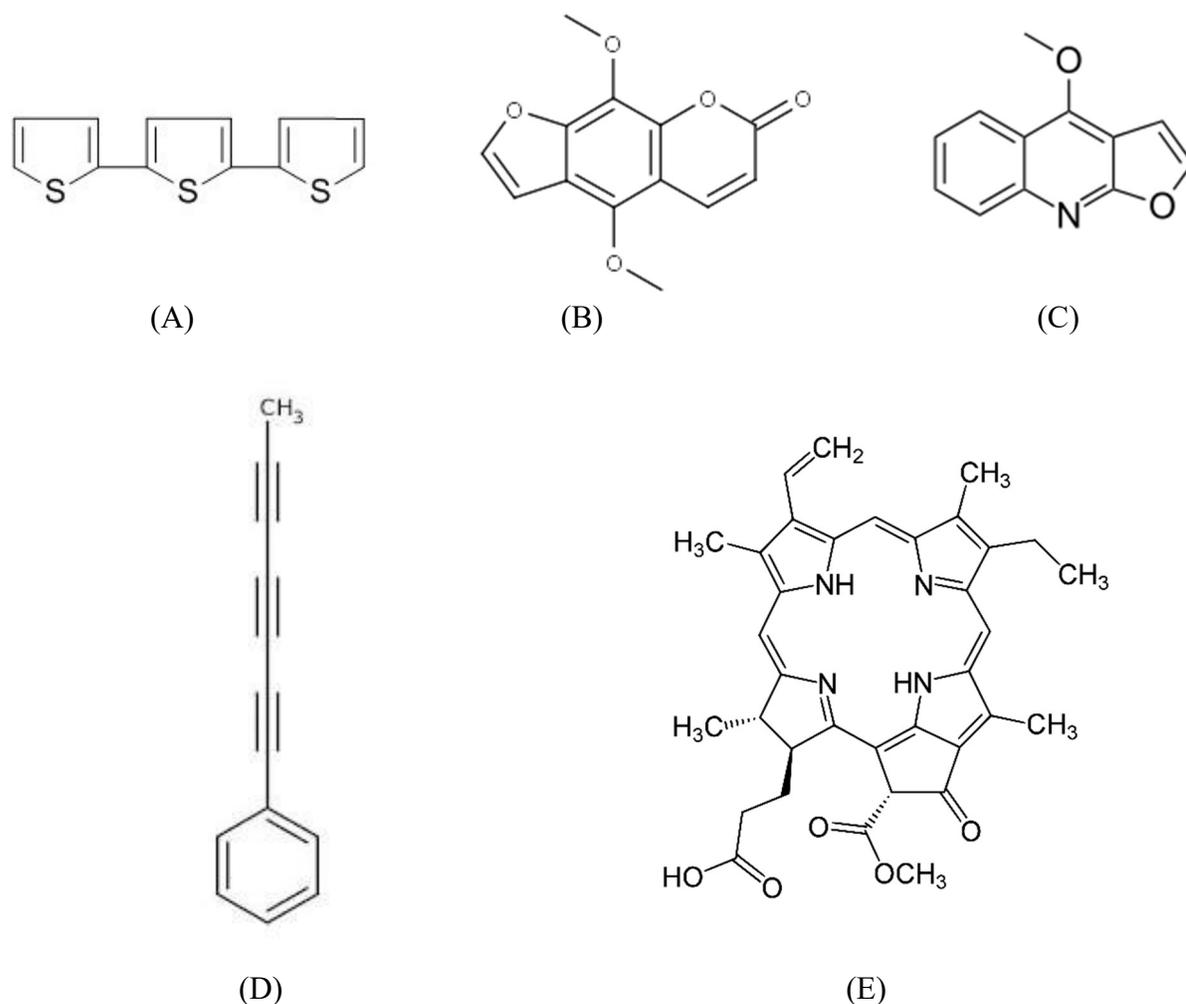
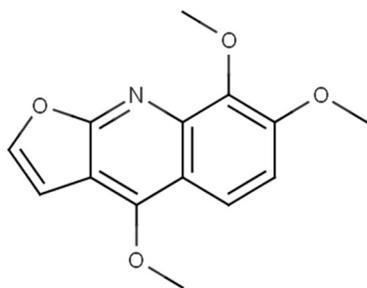
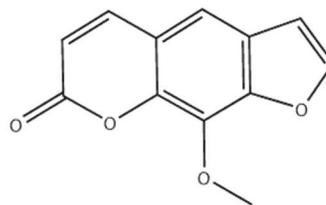


Figure 6 : Photosensibilisants retrouvés chez les végétaux. A :  $\alpha$ -terthienyl (thiophène), B : Isopimpinelline (furocoumarines), C : dictamnine (alcaloïde furoquinoléique), D : phenylheptatriyne (polyacétylène), E : phéophorbide A (porphyrines)

Il est important de savoir que chez certaines espèces, il existe des photosensibilisants qui ne sont pas biogénétiquement liés mais qui possèdent le même mode d'action photosensibilisante. C'est le cas par exemple de la skimmianine (furoquinoline) et la xanthotoxine (furocoumarines) qu'on trouve dans les feuilles de *Skimmia japonica* (Rutacées) [55].



Skimmianine



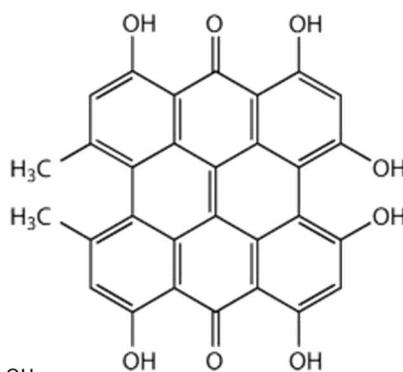
Xanthotoxine

Figure 7 : furanoquinoline et furocoumarine ayant le même mode d'action photosensibilisante.

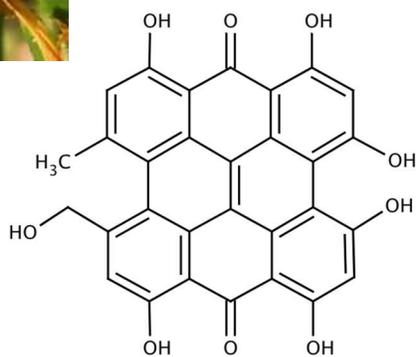
Les plus anciens photosensibilisants connus dans le monde végétal sont les dérivés d'antraquinone, l'hypéricine et la pseudohypéricine, retrouvés dans les feuilles, fleurs et tiges du millepertuis perforé (Figure 8), *Hypericum perforatum* (Clusiacées), ainsi que chez de nombreuses autres espèces du même genre [56].



*Hypericum perforatum*  
(millepertuis perforé)



Hypéricine



pseudohypéricine

Figure 8 : Dérivés d'antraquinone retrouvés chez *Hypericum perforatum*

Cependant, d'autres plantes médicinales, comme *Ammi visnaga*, ont été utilisés depuis des centaines d'années en Inde et au moyen orient pour le traitement du vitiligo ainsi que d'autres maladies dermatologiques. Ces plantes ont pour principe actif des furocoumarines (xanthotoxine) et des furanochromones (khelline).

Les furocoumarines, grâce à leurs propriétés photosensibilisantes, sont jusqu'aujourd'hui utilisées en thérapeutique [41,57-59] :

- Le méthoxy-5 psoralène et le méthoxy-8 psoralène sont utilisés en PUVA-thérapie, pour le traitement photochimiothérapique du psoriasis et d'autres affections dermatologiques. Cette technique consiste à administrer, en général par voie orale, la furocoumarine ; deux ou trois heures après, on procède à une exposition au rayonnement d'une lampe UV émettant dans la zone des UV longs (320-380 nm) ou aux rayons solaires [60-61]
- Dans le traitement du vitiligo ;
- Dans les produits cosmétiques [60-61] .

## I. 4.2.5. Les techniques de la photothérapie

### i. Sources lumineuses utilisées

Le rayonnement émis par une source lumineuse est défini par son intensité ( $\text{mW}/\text{m}^2$ ) et par son spectre. Les lampes utilisées en photothérapie conventionnelle sont des tubes fluorescents à vapeur de mercure à basse pression, dont le spectre dépend de la nature de l'enveloppe interne (le phosphore) [62].

Les lasers peuvent avoir, en fonction de leur longueur d'onde, leur puissance et leur durée d'émission, quatre types d'effets tissulaires : effet thermique (hyperthermie, coagulation et volatilisation), mécanique (la diffusion n'est pas progressive et on observe un confinement de la zone chauffée qui induit la formation d'un plasma dont l'expansion va se faire de façon brutale, sous forme d'une onde de choc), photoablatif (ablation pure de matériel sans lésion thermique sur les berges, comme le ferait un scalpel), ou photochimique. La notion de dose de lumière délivrée lors d'une illumination laser est donc primordiale : un excès aura pour conséquence des effets secondaires importants, un sous-dosage aura pour résultante un sous-traitement [63]. Ainsi, de la connaissance de la dose de lumière délivrée et absorbée au niveau de la cible, dépend l'efficacité du traitement.

### ii. La Puvatérapie

La Puvathérapie est un traitement consistant en l'irradiation du corps par des UVA à large spectre après la prise d'un médicament photosensibilisant de la famille des psoralènes. Le terme PUVA résulte donc de la contraction de Psoralène + UV-A [42]. Le terme Photo-Chimio-thérapie a été

employé par la suite, comme synonyme, pour les patients qui sont traités par prise d'une molécule chimique associée à une exposition lumineuse.

Cette technique est utilisée depuis plus de trente ans dans le traitement de nombreuses dermatoses. Le 8-méthoxypsoralène (8-MOP), MELADININE® 10 mg est le psoralène de référence pour la Puvathérapie. Il est administré par voie orale deux heures avant l'irradiation par les UVA à une posologie de 0,6 mg/kg. Le rythme des séances est généralement de trois séances par semaine, espacées de quarante-huit heures [64].

La Puvathérapie est dite générale lorsque le psoralène est administré par voie orale. Cette technique peut induire certains effets secondaires qui peuvent gêner la poursuite du traitement. Par exemple, les personnes présentant des nausées après la prise orale de psoralène peuvent avoir recours à la Puvathérapie topique, qui consiste à appliquer le psoralène directement sur les zones à traiter. Les photosensibilisants de type psoralène comme la MELADININE FAIBLE®, solution alcoolique à 0,1% et la MELADININE FORTE®, solution alcoolique à 0,75%, sont badigeonnées uniquement sur les lésions une à deux heures avant la séance. La phototoxicité des produits disparaît rapidement en deux à huit heures, mais une photoprotection externe est conseillée pendant vingt-quatre heures [65].

### iii. La Photothérapie UV

La photothérapie UV est un traitement constituant en l'irradiation du corps par des rayons ultraviolets B (UVB) et/ou A (UVA) après l'administration d'un photosensibilisant.

Pendant toute la cure de photothérapie UV il convient de signaler au médecin la prise de tout nouveau médicament, la survenue de manifestations cutanées ou générales, et de ne pas s'exposer au soleil ou aux rayons UV artificiels le jour de la séance [66].

Tout comme la Puvathérapie, les effets indésirables sont :

- Un érythème souvent dû à la prise concomitante d'un médicament photosensibilisant non signalé au médecin,
- Une sécheresse cutanée,
- Un prurit. [67]

Il existe 3 types de photothérapie :

- **Photothérapie UVB à spectre étroit** : grâce à la lampe TL01 fluorescente qui permet d'émettre un spectre étroit centré sur 313 nm. Cette émission spectrale permet d'avoir un effet thérapeutique sans érythème. Cette lampe bénéficie donc du meilleur rapport « indice photothérapeutique » (rapport de la DEM sur la plus petite dose ayant un effet thérapeutique).

- **Photothérapie UVB à spectre large** : les lampes utilisées sont des tubes fluorescents à vapeur de mercure basse pression. En photothérapie UVB spectre large, celui-ci comporte environ 60% d'UVB, 40% d'UVA et une quantité infime d'UVC.
- **Photothérapie UVA1** : la longueur d'onde des rayons ultraviolets est comprise entre 340 et 400 nm. Leur but est d'éliminer les UVA2 responsables d'érythèmes soit les longueurs d'onde de 320 à 340 nm. [64]

### I. 4.2.6. Sélectivité de la photothérapie

La sélectivité de la photothérapie pour les tissus cibles résulte de la localisation souvent préférentielle des PS dans les tissus à traiter et du caractère ciblé de l'irradiation lumineuse au niveau du site d'action. La sélectivité est renforcée par un calibrage précis quelque soit la source de lumière utilisée, le contrôle de l'administration de lumière et de médicament et les équipements capables de contrôler simultanément l'administration de lumière et la fluorescence du photosensibilisant.

La photothérapie agit localement et de façon limitée, et compte tenu de la demi-vie très courte des dérivés actifs, les réactions cessent dès l'arrêt de l'émission lumineuse [50].

### I. 4.2.7. Domaines d'application

La photothérapie et particulièrement la PDT ont été initialement développées pour le traitement des tumeurs mais suite à la découverte de ses différents effets sur le système immunitaire (immunomodulation), des chercheurs ont envisagé son application dans des pathologies de nature inflammatoire. De ce fait, plusieurs études ont été menées sur divers types de pathologies inflammatoires (arthrite, encéphalomyélite, psoriasis) [68-70].

Une autre facette de la PDT repose sur ses capacités à stimuler la régénération tissulaire [71-72]. En plus de ces propriétés immunomodulatrices et cicatrisantes, la thérapie photodynamique est préconisée dans le traitement de certaines maladies dermatologiques (eczéma, dermatite atopique, vitiligo, ...) et ophtalmologiques (traitement des néovaisseaux choroïdiens du myope fort) [73]. Les applications de la photothérapie dynamique en médecine bucco-dentaire sont de plus en plus nombreuses comme le traitement du cancer buccal et des infections bactériennes et virales.

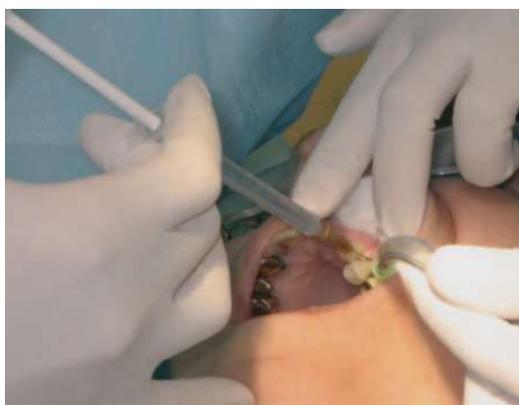
La photothérapie antimicrobienne a été aussi proposée dans le traitement des infections bactériennes, parasitaires, virales et fongiques. Nous avons alors décidé de nous intéresser à l'utilisation de ce procédé qui a fait ses preuves dans plusieurs autres domaines de la médecine [74].

### I. 4.2.8. La thérapie photodynamique antibactérienne (PDTa)

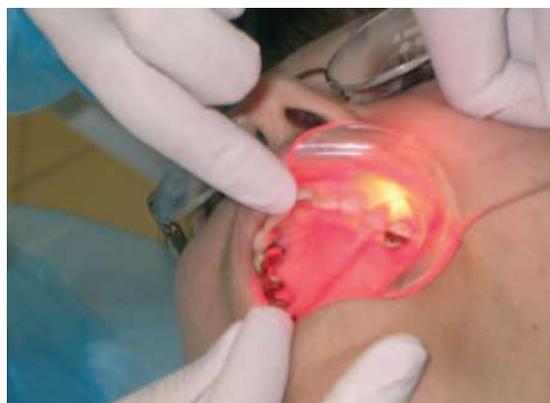
Le mécanisme de photodestruction ou photoinactivation microbiennes par PDT antibactérienne engage la génération d'espèces réactives d'oxygène qui conduiront à des dommages cytotoxiques. Deux mécanismes d'action ont été proposés [75] :

- Le PS peut causer des dommages oxydatifs au niveau de la membrane plasmique de la bactérie, ce qui conduit à la fuite des constituants cellulaires ou à l'inactivation des transporteurs membranaires.
- Le PS peut pénétrer dans les tissus cibles et se lier à l'ADN y conduisant ainsi des dommages et des cassures.

Parmi les plus grands avantages de la PDTa par rapport aux autres thérapies antimicrobiennes est sa double sélectivité due initialement à l'accumulation préférentielle du photosensibilisant dans les cellules à croissance rapide ainsi que l'irradiation localisée au niveau du site de l'infection (Figure 9) [76].



(1)



(2)

Figure 9 : Recours à la thérapie photodynamique (PDTa) pour le traitement des parodontopathies chez l'homme : (1) application de l'agent photosensibilisant directement dans la poche parodontale à l'aide d'une seringue. (2) Irradiation de l'agent photosensibilisant à l'aide d'une fibre optique introduite dans la poche parodontale pour lutter contre les bactéries parodontopathiques et l'inflammation gingivale [50].

Cependant, de nombreux autres avantages peuvent être cités [77]: en effet, la photothérapie dynamique antimicrobienne est une technique sans risque pour les tissus adjacents puisque le PS montre une bonne affinité pour les cellules microbiennes. Et contrairement au traitement antibiotique qui mets plusieurs jours pour agir, le résultat du traitement par PDTa est instantané étant donné que l'élimination des bactéries se fait en quelques secondes ou quelques minutes tout en montrant une efficacité égale, indépendamment d'une résistance bactérienne, aux antibiotiques

[38]. Par ailleurs, la possibilité que les bactéries développent une résistance à la PDTa est quasiment nulle puisqu'il s'agit d'un phénomène physique.

La PDTa montre également une très bonne efficacité contre les biofilms bactériens tandis que le traitement par les thérapies conventionnelles reste encore difficile. Elle peut aussi détruire les facteurs de virulences sécrétés par les microorganismes grâce à la forte réactivité des espèces réactives de l'oxygène. De plus, cette technique peut être utilisée pour traiter des tissus morts (non perfusés) tels que des brûlures.

La PDTa a été aussi proposée dans la dépollution des eaux usées et la désinfection de l'eau : l'opération consiste à placer une quantité donnée d'un photosensibilisateur dans l'eau à traiter, suivi d'une exposition à la lumière d'une longueur d'onde dépendant de la zone d'absorption du PS. L'oxygène singulet généré inhibe les microorganismes contenus dans le milieu, et le photosensibilisant est par la suite filtré sur un support solide [78-81].

## II. Généralités sur le genre *Eryngium*

### II. 1. Position taxonomique et richesse spécifique de la famille des Apiacées

Les Apiacées sont une famille de plantes très évoluées au sein des Angiospermes, ils étaient appelés autrefois Ombellifères de par leur inflorescence en ombelle.

La place de la famille des Apiacées dans la classification systématique botanique APG III (Angiosperm Phylogeny Group) est la suivante (APG III Chase et Reveal, 2009) :

- Embranchement des Spermatophytes (plantes à graine) appelé encore Phanérogames
- Sous embranchement des Angiospermes (plantes à ovaire)
- Clade des Eudicotylédones (Eudicots) ou dicotylédones vraies (embryon à deux cotylédons)
- Clade des Eudicotylédones centrales (Core Eudicots)
- Classe des Asteropsida ou grade des Asteridées (fleurs pentamères gamopétales à carpelles soudés et étamines adnées).
- Sous-classe des Euastéridées II (espèces herbacées à ovaire infère et regroupement des fleurs en inflorescence)
- Ordre des Apiales.

Cette famille comprend près de 3000 espèces réparties en 420 genres qui sont surtout présentes dans les régions tempérées du monde.

C'est une famille très homogène facile à reconnaître grâce à son inflorescence en ombelles composées, néanmoins, il est difficile de différencier les espèces de cette famille les unes des autres.

Les plantes appartenant à la famille des Apiacées sont essentiellement herbacées, annuelles, bisannuelles ou le plus souvent vivaces.

L'inflorescence est la partie la plus importante de la plante car c'est grâce à elle que la famille des Apiacées est facilement reconnue. Avant la classification APG, cette famille portait le nom d'Ombellifères en référence à son inflorescence bien caractéristique. Les fleurs sont en effet groupées en ombelles simples et le plus souvent, en ombelles composées [82]. L'appareil souterrain pérennant est très varié (racine pivotante, rhizome ou tubercule), la tige est ordinairement cannelée et creuse et les feuilles sont alternes, souvent très découpées [82].

Cette famille riche en métabolites secondaires est utilisée tant sur le plan alimentaire que médicinal et présente des intérêts économiques. Elle comporte des coumarines, des flavonoïdes, des composés acétyléniques et des lactones sesquiterpéniques, ainsi qu'une grande richesse en huile essentielle. Cette famille de plantes est bien connue pour avoir une quantité importante d'huile essentielle dans la quasi-totalité de ses organes anatomiques. A nos jours, 760 constituants d'huiles essentielles ont été isolés des Apiacées [83].

## II. 2. Position systématique du genre *Eryngium*

Quand les systématiciens pensent qu'un genre est complexe ou difficile à étudier, ils doivent analyser un groupe de plantes très répandue sur tous les continents avec un nombre important d'espèces. Des espèces qui doivent être morphologiquement variables tout en montrant des caractéristiques d'adaptation, ce qui les rend difficiles à identifier, à délimiter et à interpréter quant aux interrelations. Le genre *Eryngium* présente toutes ces caractéristiques et plus encore [84].

Commun aux deux continents et aux deux hémisphères, le genre *Eryngium* qui se trouve même dans les climats qui semblent interdits aux autres Ombellifères, appartient, sous tous les rapports à la famille des Apiacées, quoiqu'il s'en écarte par celui des caractères de l'inflorescence que l'on croirait le plus essentiel à la famille [85].

Les espèces du genre *Eryngium* dont la racine est vivace présentent souvent la transformation de la base des tiges en racines réelles ou apparentes. Ce phénomène est dû aussi à l'exhaussement du terrain qui empêche la tige de périr toute entière. Les tiges des espèces d'*Eryngium*, toujours herbacées ou annuelles, n'offrent rien de remarquable mais la disposition de leurs rameaux n'est comparable qu'à celle des euphorbes et d'un petit nombre d'autres plantes où un pédoncule floral naît de chaque bifurcation. Les feuilles, en général assez roides dans toutes les espèces sont disposées comme dans les Ombellifères excepté dans quelques espèces du nouveau monde. Ce genre qu'on peut considérer comme le plus considérable des Ombellifères anomales, qui comprennent les genres dont les fleurs paraissent être réunies en tête quoiqu'en effet elles partent d'un point central tout en gardant les autres caractères de la famille [86], tient de bien près celui de l'*Astrantia* parmi les vrais Ombellifères [85]. Composé de plus de 250 espèces, le genre *Eryngium* est le genre le plus vaste de la famille des Apiacées et représente environ quatre cinquièmes de la sous-famille des Saniculoidées (Tableau 2) [87].

Ce genre a été décrit pour la première fois en 1753 par Carl von Linné dans *Species Plantarum* (*Sp. Pl. 1: 232. 1753*)

Tableau 2 : Classification du genre *Eryngium*. (The Angiosperm Phylogeny Group, 2009 ; Carolina et al, 2007).

<b>Règne</b>	<b>Plantae</b>
<b>Division</b>	Magnoliophyta (Angiospermes)
<b>Classe</b>	Magnoliopsida (Dicotylédones)
<b>Clade</b>	Campanulidées ou Euastéridées
<b>Ordre</b>	Apiales
<b>Famille</b>	Apiacées
<b>Sous-famille</b>	Saniculoidées
<b>Genre</b>	<i>Eryngium</i> L.

## II. 3. Diversité botanique et morphologique

L'ombelle des Apiacées est formé par des pédoncules floraux (rayons) divergeant manifestement d'un même point, les fleurs s'épanouissent toutes au même niveau. Chaque rayon est normalement axilé par une bractée, mais seules les bractées les plus externes persistent généralement et forment l'involucre de l'ombelle. Chez les *Eryngium*, ces bractées sont foliacées et épineuses [84].

L'inflorescence en forme de capitule et la présence d'une bractée unique par fleur sont deux caractéristiques qui distinguent facilement ce genre des autres membres de la famille des Apiacées (Figure 10).

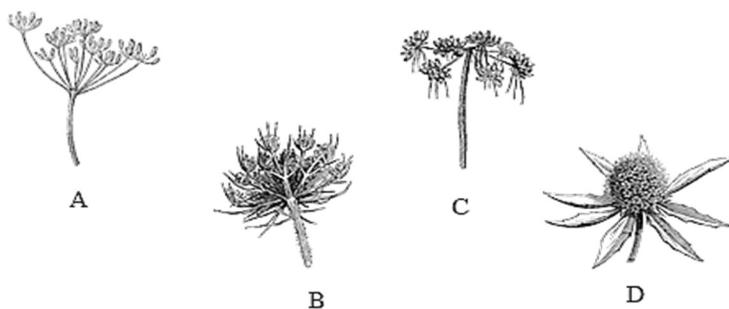


Figure 10: L'ombelle des Apiacées. (A - Ombelle et ombellules dépourvues d'involucre et d'involucelle ; B - Ombelle et ombellules munies d'involucre et d'involucelle ; C - Ombelle réduite et ombellules munies ; D - Ombelle capituliforme aux rayons nuls (*Eryngium*))

Le genre *Eryngium* est, cependant, morphologiquement très variable [84]: Les fleurs sont sessiles en capitule involucre serré, sur un réceptacle globuleux ou cylindrique. Le calice porte à son sommet 5 dents très développées, terminées par une fine épine. Les pétales sont échancrés, ovales ou allongés, avec une longue pointe recourbée en dedans, dressés ou plus ou moins rapprochés entre eux par leur partie supérieure. Les styles sont plus ou moins écartés l'un de l'autre, mais non renversés. Le fruit est ovoïde ou presque globuleux, plus ou moins comprimé parallèlement à la cloison, sans côtes apparentes et couvert de petites écailles dressées, se recouvrant les unes les autres de bas en haut. On ne distingue pas les canaux sécréteurs résinifères dans les parois du fruit, car ils y forment un réseau visible seulement au microscope. Ce sont des plantes sans poils, épineuses, à fleurs blanches ou bleues [88].

Tous ces caractères sont présentés par une multitude de combinaisons, ce qui rend ce genre difficile à identifier et à délimiter, et les relations phylogénétiques difficiles à interpréter [89].

## II. 4. Répartition géographique

Le genre *Eryngium* est présent dans les régions tempérées de tous les continents. Cependant, les espèces de ce genre sont inégalement réparties entre les hémisphères est et ouest.

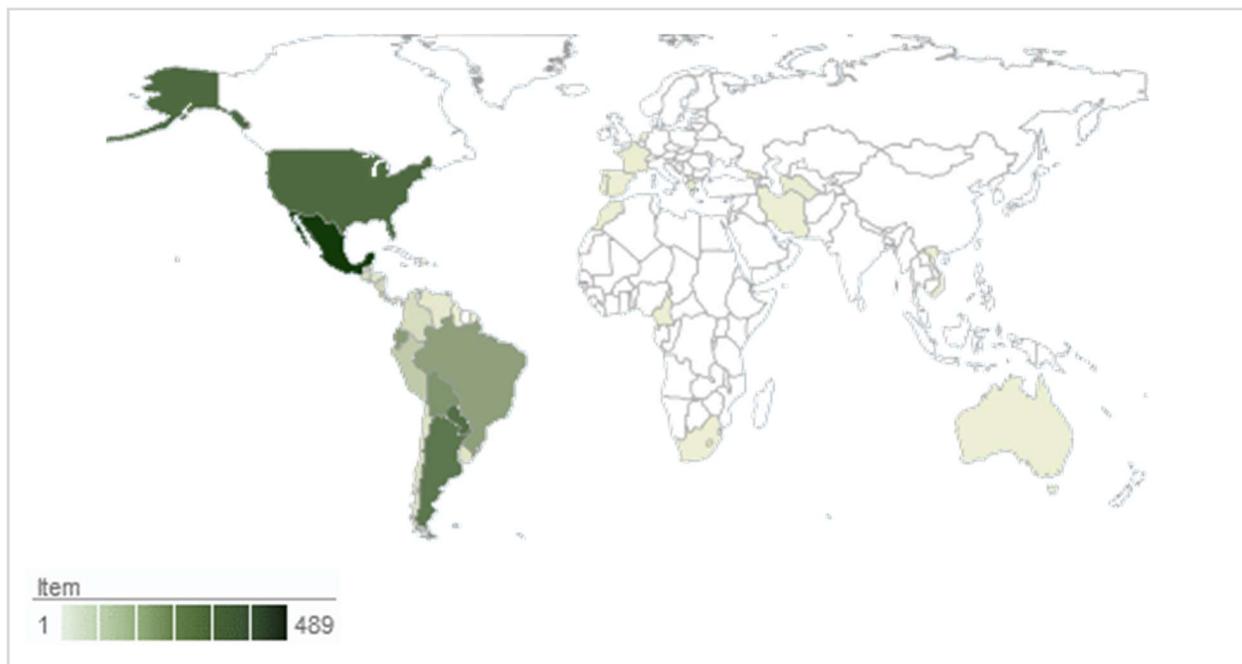


Figure 11 : Répartition géographique des *Eryngium*. (© 2015 Missouri Botanical Garden - 4344 Shaw Boulevard - Saint Louis, Missouri 63110. Source: “Tropicos, botanical information system at the Missouri Botanical Garden- [www.tropicos.org](http://www.tropicos.org)”) (“[tropicos.org/Name/40005855](http://tropicos.org/Name/40005855)” 2015)

Dans chaque hémisphère, deux centres de diversité des *Eryngium* sont reconnus : le centre-ouest du Mexique et le centre-est de l'Amérique du Sud (sud du Brésil, nord-est de l'Argentine et

l'Uruguay) d'une part ; et la méditerranée occidentale et le Sud-Ouest de l'Asie d'autre part [90] [91], et environ deux tiers des espèces de ce genre sont distribués au nord, sud et centre de l'Amérique (Figure 11).

## II. 5. Utilisations traditionnelles

Comme de nombreuses autres plantes de la famille des Apiacées, les *Eryngium* ont été utilisés comme ornement, aliment, condiment ou plante médicinale, et certaines espèces du genre *Eryngium* ont un usage commercial.

Les graines d'*E. foetidum* sont utilisées comme substitut de la coriandre et servent de condiment [92]. *E. bourgatii* de couleur améthyste, *E. alpinum* variété « Blue star » d'un bleu profond, *E. pandanifolium* pouvant atteindre 3 mètres de hauteur, *E. giganteum* et *E. planum* sont couramment utilisés en tant que plantes d'ornement ou pour la confection de bouquets floraux. Ces espèces sont appréciées pour la vivacité de leurs couleurs bleutées et leur caractère rustique ne nécessitant que peu d'entretien [93].

D'autres espèces comme *E. foetidum*, *E. maritimum*, *E. planum*, *E. dichotomum*, *E. campestre* et *E. creticum*, ont été utilisées comme denrées alimentaires ou dans la médecine traditionnelle locale ou mondiale. *E. foetidum* et *E. caucasicum* ont été cultivés en Asie et en Afrique afin d'utiliser les feuilles comme produit comestible [94-95], et les fruits d'*E. foetidum* sont aussi consommés dans l'alimentation nigérienne [96].

Ces espèces, étant originaires d'Amérique tropicale et des Antilles, ont été également utilisées comme médicaments et nourriture, et certains habitants ont même domestiqué la plante dans leurs jardins potagers et dans les vergers. Par conséquent, ces plantes se sont acclimatées et sont actuellement cultivées dans toute l'Asie du Sud, les îles du Pacifique, l'Afrique tropicale et les régions chaudes du sud de l'Europe [84].

En médecine traditionnelle, certaines espèces sont connues et utilisées dans de nombreux pays :

- *E. campestre* est un exemple de plante bien connue de la famille des Apiacées et utilisée en médecine traditionnelle turque comme antitussif, diurétique, apéritif, stimulant et aphrodisiaque par infusion des parties aériennes et des racines [97-98].
- *E. creticum* est utilisée en médecine traditionnelle jordanienne comme un remède pour les piqûres de scorpion dans les zones rurales, et comme agent hypoglycémiant [99].
- *E. foetidum* est utilisée comme anti-inflammatoire en Chine [100].

Plusieurs espèces du genre *Eryngium* sont utilisées comme remède chez différents groupes ethniques amérindiens :

- *E. alismifolium* est utilisée en tant que plante entière contre la diarrhée. Les racines d'*E. aquaticum* sont utilisées comme agent émétique, antidote contre les poisons, les ténias et les oxyures, comme agent diurétiques et contre les maladies vénériennes.

- Les racines d'*E. yuccifolium* sont utilisées pour traiter les problèmes digestifs, la diarrhée, les maux de tête, les courbatures, les maux des dents ainsi que pour les névralgies, les troubles des reins et de la vessie et les morsures de serpent [101].

Certains travaux ont confirmé l'utilisation traditionnelle de certaines de ces plantes. En effet des extraits éthanoliques de *E. billardieri*, *E. campestre*, *E. creticum*, *E. davisii*, *E. foetidum*, *E. isauricum*, *E. kotschyi*, *E. maritimum*, et *E. trisectum* ont montré une activité anti-inflammatoire et anti-nociceptive [102-104].

## II. 6. Intérêt biologique et pharmacologique

Les extraits ou les produits isolés des *Eryngium* ont révélé plusieurs activités biologiques *in-vivo* et *in-vitro*, telles que l'activité cytotoxique contre plusieurs lignées tumorales humaines, ainsi que l'activité anti-inflammatoire, antivenimeuse, antibactérienne, antifongique, anti malarienne, antioxydante, et anti-hyperglycémique. Cependant, il n'y a pas de données cliniques relatives aux utilisations ethno-médicinales de ces plantes, et les mécanismes moléculaires de l'activité des produits purs demeurent insaisissables (en particulier concernant l'activité cytotoxique et antivenimeuse).

Les activités biologiques des *Eryngium* sont résumées dans le Tableau 3 et le Tableau 4.

Tableau 3 : Activités biologiques des *Eryngium in-vitro* (116)

Activités biologiques	Description	Espèce	Agents bioactifs
<b>Cytotoxicité</b>	Cytotoxicité modérée ou faible contre les lignées cellulaires cancéreuses du pancréas, de la prostate, des poumons, leucémiques, et du côlon et la lignée cellulaire normale des fibroblastes de poumon humain	<i>E. campestre</i>	Saponines
	L'extrait éthanolique induit une apoptose dans les lignées de cellules leucémiques humaines	<i>E. planum</i>	Extrait éthanolique
<b>Activité antimutagène</b>	Présente un potentiel antimutagène contre la MNNG des hépatocytes de rats.	<i>E. creticum</i>	Extrait éthanolique
<b>Activité anti-inflammatoire</b>	Les extraits inhibent la iNOS dépendante de la synthèse de l'oxyde nitrique stimulée par la cytokine dans les cellules endothéliales murines, sans affecter la viabilité cellulaire	<i>E. campestre</i>	Différents extraits

	Réduit fortement l'activité myéloperoxydase dans les tissus enflammés d'un modèle aiguë	<i>E. foetidum</i>	Stérols polaires
<b>Effet antipoison (serpent, scorpion)</b>	Des extraits aqueux des feuilles et des racines inhibent l'activité hémolytique du poison des serpents et scorpions	<i>E. creticum</i>	Extrait aqueux
	Des extraits éthanolique de feuilles et de racines améliorent l'hémolyse RBC des globules rouges	<i>E. creticum</i>	Extrait éthanolique
	Inhibe la contraction du muscle lisse trachéal isolé de lapins	<i>E. creticum</i>	Extrait aqueux
<b>Activités antibactérienne, antifongique et antipaludique</b>	Activité antibactérienne sélective contre les espèces de <i>Salmonella</i> et les bactéries du genre <i>Erwinia</i>	<i>E. foetidum</i>	Eryngial*
	Activité observée contre des trypanosomes parasites, des nématodes, des champignons et des bactéries chez l'homme et d'autres mammifères	<i>E. duriaei</i>	Eryngial*
	Activité antifongique avec des valeurs de CMI de 0,16 à 0,32µg / ml contre plusieurs espèces de dermatophytes	<i>E. creticum</i> , <i>E. planum</i>	Extrait volatile
	Activité antifongique	<i>E. creticum</i>	Extrait composés d'un mélange saponines
	Activités antimicrobiennes contre 12 souches bactériennes et une levure	<i>E. maritimum</i>	Fractions chloroformiques
	Activité antiplasmodiale contre <i>Plasmodium falciparum</i> avec CI <sub>50</sub> de 25 µg/ml et <i>P. gallinaceum</i> qui infecte des poulets	<i>E. foetidum</i>	Différents extrait
<b>Activités antioxydante</b>	Activité antioxydante in vitro	<i>E. alpinum</i> , <i>E. bourgatii</i> , <i>E. campestre</i> , <i>E. foetidum</i>	Extraits d'acide rosmarinique et de ses analogues
	Montre de différents niveaux d'activité antioxydante dans six tests in vitro, à la fois en stade floraison et de non-floraison	<i>E. caucasicum</i>	Extrait méthanolique
	Faible activité de piégeage des radicaux libres et faible teneur en phénol totaux	<i>E. maritimum</i>	Extraits

	Inhibe la peroxydation fer-fructose-phosphate des lipides induite dans les systèmes d'émulsion d'acide linoléique et les lécithines de liposome	<i>E. billardieri</i>	Extrait éthanolique
<b>Autres activités</b>	Inhibe la germination de l'abutilon	<i>E. paniculatum</i>	(-)-2,4,4-triméthyl-3-formyl-2,5-cyclohexadienyl angelate
	Présente une activité anthelminthique contre <i>Strongyloides stercoralis</i>	<i>E. foetidum</i>	Eryngial*

\* Eryngial : trans-2-Dodecenal

Tableau 4 : Activités biologiques des *Eryngium in-vivo*

Activité biologique	Modèle Animal	Description	Espèce	Agents bioactifs
<b>Activités anti-inflammatoires</b>	Souris	Inhibe l'œdème des pattes arrière causé par le carraghénane et l'œdème des oreilles induit par le 12-0-tétradécanoylphorbol acétate (TPA).	<i>E. campestre</i> , <i>E. creticum</i> , <i>E. davisii</i> , <i>E. isauricum</i> , <i>E. kotschyi</i> , <i>E. maritimum</i> , et <i>E. trisectum</i>	Extrait éthanolique
	Souris	Activité antinociceptive observée dans le test de contorsion de benzoquinone-induite	<i>E. campestre</i> , <i>E. creticum</i> , <i>E. davisii</i> , <i>E. isauricum</i> , <i>E. kotschyi</i> , <i>E. maritimum</i> , et <i>E. trisectum</i>	Extrait éthanolique
	Souris	Réduit l'œdème auriculaire dans les essais aiguës et chroniques induits par le 12-0-tétradécanoylphorbol acétate (TPA)	<i>E. foetidum</i>	Stérols polaires
	Rats	Empêche les réponses inflammatoires aux injections sous cutanées de sels sodiques	<i>E. planum</i>	Mélange de saponines

		d'acide nucléique ou d'ovalbumine dans les pattes arrière		
	Rats	Administrée par voie orale, elle inhibe l'œdème des pattes arrière causé par le carraghénane	<i>E. foetidum</i>	Décoction
	Rats	Induit les contorsions abdominales provoquées par l'acide acétique comme stimulus à la douleur	<i>E. foetidum</i>	Décoction
<b>Effet antipoison</b>	Cochon d'inde	Prolonge la vie de 20 min à 8 h après injection du venin d'un scorpion jordanien : <i>Leiurus quinquestriatus</i>	<i>E. creticum</i>	Extrait aqueux
<b>Effets anti-hyperglycémiques</b>	Rats	Réduit le taux de glucose sanguin suite à son administration par voie orale chez les modèles normoglycémiques et streptozotocines induits	<i>E. creticum</i>	Décoction
	Rats	Montre une activité antihyperglycémiant prononcée malgré l'absence de toute efficacité in vitro	<i>E. creticum</i>	Extrait aqueux
	Rats	N'a montré aucun effet concernant le niveau de glucose dans des modèles à glycémie normale et diabétique par streptozotocine induite lorsqu'il est administré par unique dose orale	<i>E. foetidum</i>	Extrait
<b>Autres activités</b>	Rats	Activité anti convulsive à une concentration de 110 g / 250 ml induite par la picrotoxine	<i>E. foetidum</i>	Extrait
	Rats	Amélioration de la perméation de piroxicam à travers la peau de rat	<i>E. caeruleum</i> , <i>E. bungei</i>	Huile essentielle

## II. 7. Etudes phytochimiques antérieures et principaux métabolites secondaires isolés dans le genre

### II. 7.1. Principales familles de composés

A partir de plus de 250 espèces décrites du genre *Eryngium*, il y a uniquement 23 espèces qui ont fait plus ou moins l'objet d'études phytochimiques. Environ 127 composés ont été isolés et identifiés [96].

Une vingtaine de publications concernent la composition chimique des extraits aux solvants de plantes du genre *Eryngium* ; neuf d'entre elles traitent aussi de leurs activités biologiques. Il s'agit principalement de saponines triterpéniques, de monoterpènes, sesquiterpènes, triterpènes, flavonoïdes, coumarines, stéroïdes et polyacétylènes. La plupart des extraits biologiquement actifs étudiés renferme des saponines triterpéniques, mais le lien de cause à effet n'a pas été établi explicitement sauf pour les propriétés antifongiques. Outre cette classe de composés, on retrouve plus rarement, dans les extraits des plantes du genre *Eryngium*, des composés acétyléniques et des composés phénoliques

Plusieurs travaux ont indiqué la présence et ont décrit la composition en huiles essentielles de différentes espèces de ce genre, une composition principalement riche en sesquiterpènes et en monoterpènes [93].

## II. 7.2. Famille des polyacétylènes

### II. 7.2.1. Origine et biosynthèse

Les polyacétylènes forment un groupe distinct de produits naturels ayant une structure plus ou moins réactive. Environ 1500 substances possédant une ou plusieurs triples liaisons sont actuellement connues chez les végétaux supérieurs, et plus de 1400 polyacétylènes différents ainsi que des composés qui leur sont apparentés ont été isolés.

Ces composés sont largement distribués chez les familles des Apiacées, Araliacées, et Asteracées, et ils ont été aussi irrégulièrement retrouvés chez 21 autres familles de plantes [105-109]. Ces composés ont été également décrits chez certains champignons Basidiomycètes et des algues. Leur distribution et leur variété structurale en font de bons marqueurs chimiotaxonomiques (par exemple pour la distinction des tribus chez les Asteracées). Chez certaines espèces, ils ne sont pas normalement présents, mais peuvent être élaborés à la suite d'une attaque fongique [110].

Les polyacétylènes aliphatiques à 17 carbones de type falcarinol tels que le falcarinol et le falcarindiol, sont largement répartis chez les Apiacées et les Araliacées [105-106], et par conséquent, la quasi-totalité des polyacétylènes retrouvés dans les parties consommables des Apiacées comestibles, tels que la carotte, le céleri et le persil sont du type falcarinol. Cependant, ils sont moins fréquents dans les parties comestibles des autres familles de plantes, même si elles ont été repérées dans les tomates et les aubergines (Solanacées) [111-113].

Les structures de la plupart des polyacétylènes indiquent leur biosynthèse à partir d'acides gras insaturés, et des expériences par marquage des précurseurs ont confirmé cette hypothèse et ont montré qu'ils sont construits à partir d'unités d'acétate et de malonate [105-118]. Les polyacétylènes du type falcarinol sont formés à partir de l'acide oléique par déshydrogénation conduisant à des acétylènes à C18 : l'acide crépényinique et l'acide déhydrocrépényinique. Ces

derniers sont ensuite transformés en acétylènes à C17 par oxydation. D'autres réactions d'oxydation et de déshydrogénation conduisent au falcarinol et aux acétylènes C17 de type falcarinol (Figure 12) [105-106].

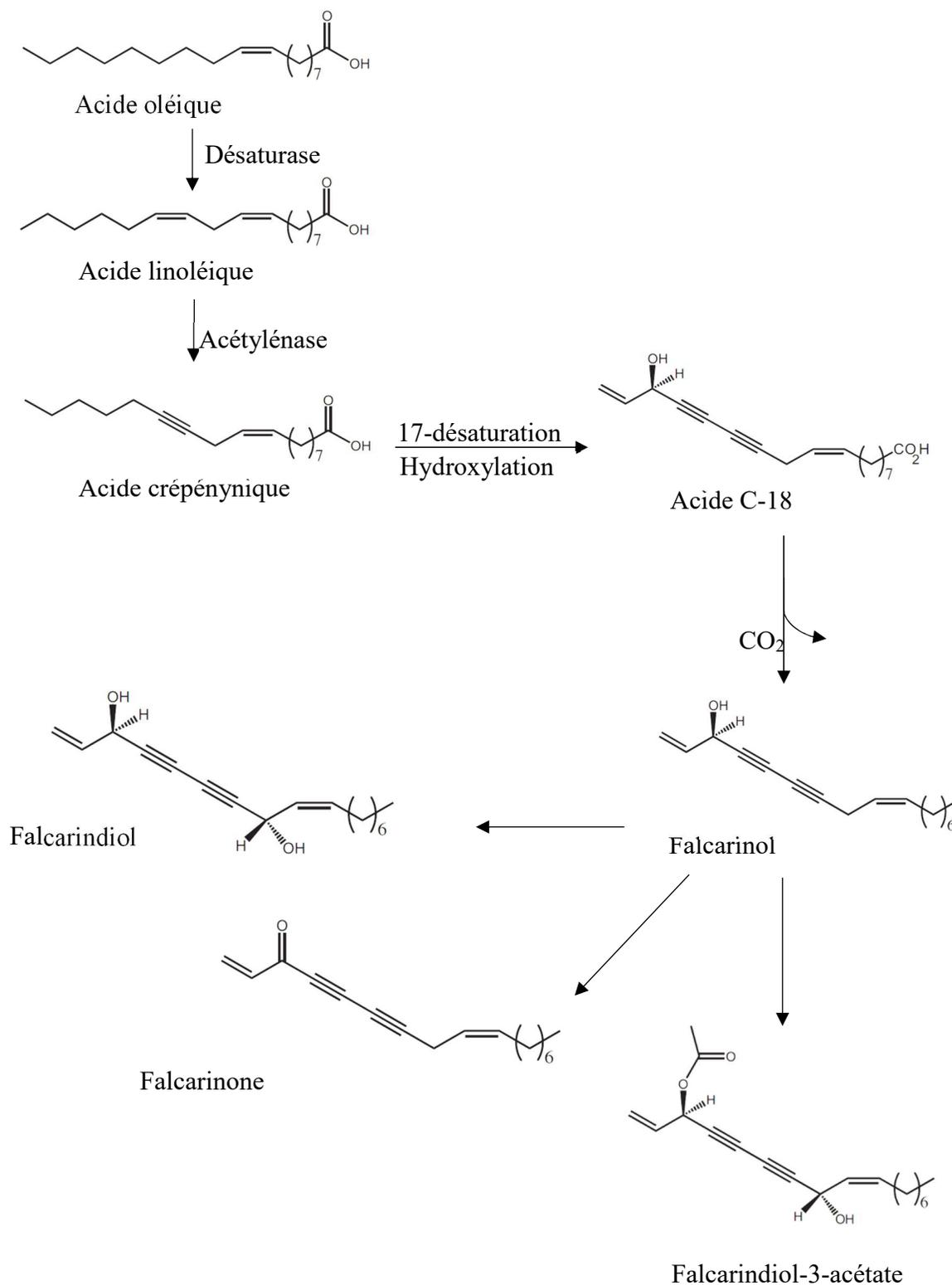


Figure 12 : Biosynthèse du falcarinol et des polyacétylènes de type falcarinol [119]

L'acide triynique en C18 conduit aussi à la formation de composés acétyléniques de longueur variable (Figure 13) [110].

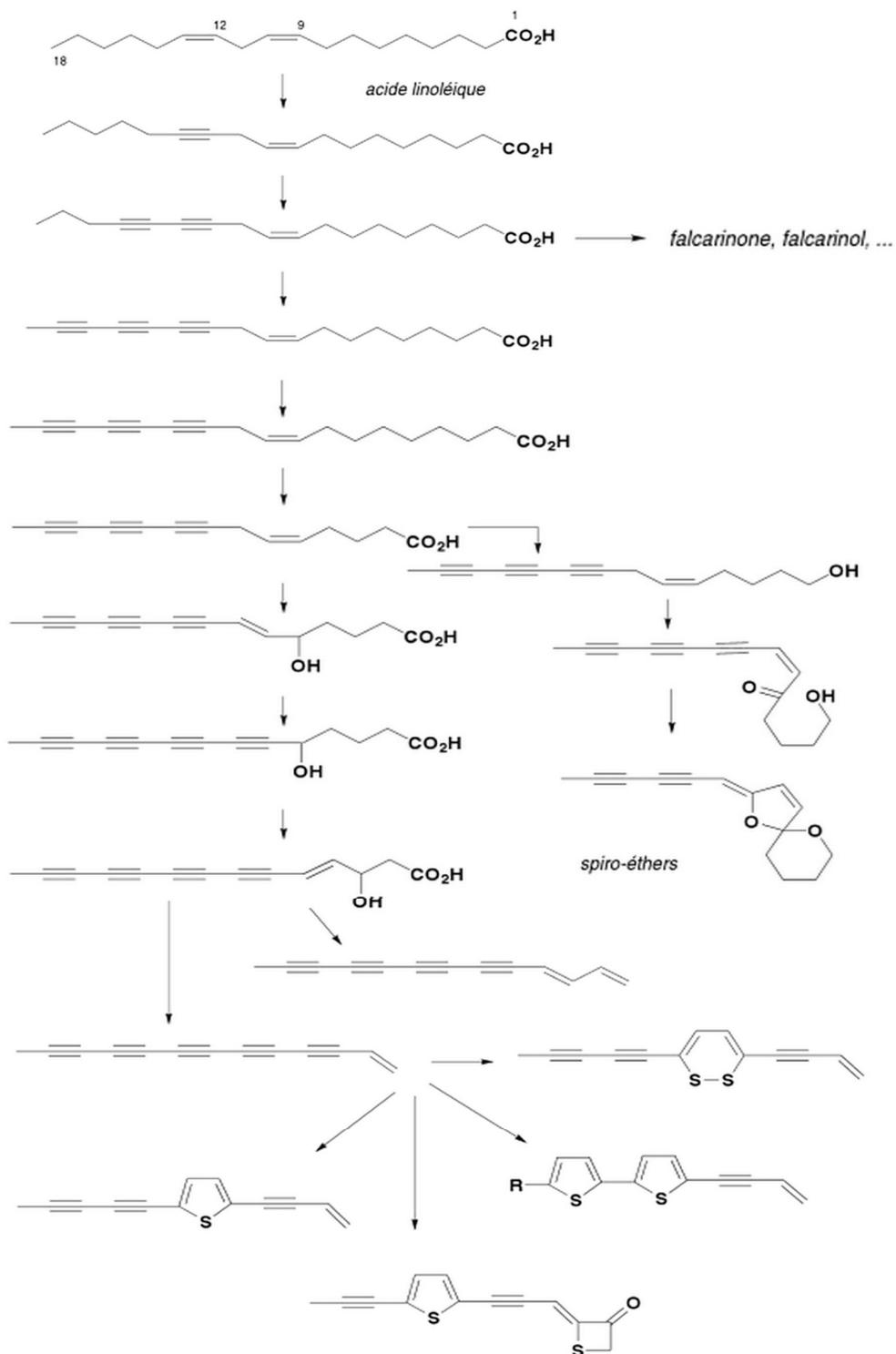


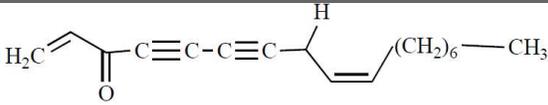
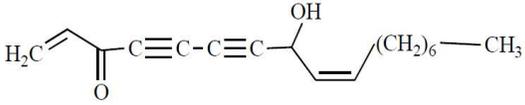
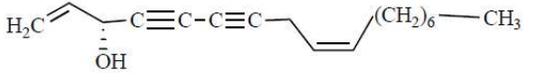
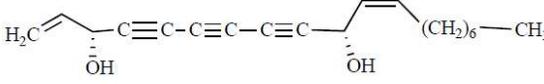
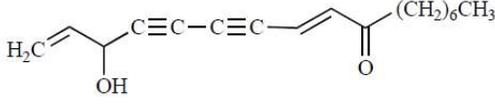
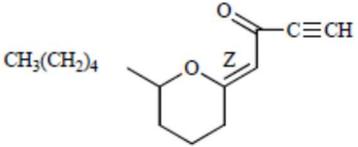
Figure 13: Origine des des polyacétylènes : exemples et cas particulier des composés sulfurés. [110]

## II. 7.2.2. Structure

Les polyacétylènes sont souvent linéaires, mais ils peuvent aussi être partiellement cyclisés. Ils peuvent comporter une ou plusieurs liaisons doubles ainsi que des hétéroatomes (oxygène, soufre, chlore) fréquemment inclus dans un système hétérocyclique : furanes, dihydrofuranones, thiophènes, thiétanones, dithiacyclohexadiènes.

Le Tableau 5 représente la structure de quelques polyacétylènes retrouvés chez les *Eryngium*.

Tableau 5 : Structure de quelques polyacétylènes retrouvés chez les *Eryngium* [96]

Nom	Structure	Source
Falcarinone		<i>E. yuccifolium</i> <i>E. bourgatii</i>
Falcarinolone		<i>E. bourgatii</i>
Falcarinol		<i>E. yuccifolium</i> <i>E. bourgatii</i>
Yuccifolol		<i>E. yuccifolium</i>
(Z)-15-hydroxy-9,16-heptadecadiène-11,13-diyn-8-one		<i>E. agavifolium</i>
(Z)-6-pentyl-2-[2-oxobutylidene-(3-ylidene)]tétrahydropyrane		<i>E. bourgatii</i>

## II. 7.2.3. Activité biologique des polyacétylènes

### i. Activité cytotoxique

De nombreux polyacétylènes tels que le falcarinol, le panaxydol et le panaxytriol, se sont avérés fortement cytotoxiques contre plusieurs lignées cellulaires cancéreuses [120-122], particulièrement vis-à-vis des cellules cancéreuses de l'adénocarcinome gastrique humain avec une dose effective  $DE_{50}$  de 0,108, 0,059 et 0,605  $\mu\text{M}$  respectivement [122]. Cependant, la  $DE_{50}$  pour les cellules saines de fibroblastes humains (MRC-5) était environ 20 fois plus élevée que celle pour les cellules cancéreuses [122], ce qui indique que ces composés pourraient être utiles dans le traitement du cancer.

Cependant, seules quelques études ont été menées afin d'évaluer cette activité *in-vivo*. Une évaluation préliminaire *in-vivo* de l'activité cytotoxique du falcarinol et des polyacétylènes de même type a été effectuée, cette étude a été menée en utilisant un modèle de xénogreffe de mélanome LOX de souris, et a indiqué que le falcarinol avait une certaine activité antitumorale *in-vivo* [123], bien que l'effet thérapeutique n'ait pas été significatif. Récemment, le falcarinol a démontré un effet inhibiteur significatif contre le développement de lésions précancéreuses dans le côlon de rat à des concentrations physiologiquement pertinentes [124], et paraît donc avoir un éventuel effet anticancéreux *in-vivo*.

Etant donné que le falcarinol et les polyacétylènes C17 aliphatiques de type falcarinol sont fréquents chez les Araliacées et les Apiacées, on pourrait s'attendre à ce qu'il y ait plus d'espèces au sein de ces familles présentant une activité cytotoxique.

D'autre part, l'activité cytotoxique sélective des polyacétylènes du type falcarinol vis-à-vis des cellules cancéreuses, indique qu'ils peuvent être utiles dans le traitement et/ou la prévention de divers types de cancer, ce qui contribue à la découverte de vertus thérapeutiques chez les plantes comestibles de la famille des Apiacées [125].

### ii. Activité antibactérienne

Bien que l'activité cytotoxique des polyacétylènes et principalement du falcarinol ait été bien étudiée, peu de travaux ont été effectués pour l'évaluation de l'activité antibactérienne de ces composés.

Ces études montrent que le falcarinol et des polyacétylènes à C17 du type falcarinol ont une activité inhibitrice contre certaines bactéries et mycoplasmes. Ces effets bénéfiques se produisent à des concentrations non toxiques et représentent donc des propriétés pharmacologiques utiles [125].

### iii. Activité antifongique

Le falcarinol et le falcarindiol ont été identifiés comme étant des composés antifongiques chez de nombreuses espèces de la famille des Apiacées, ils inhibent la germination des spores de différents champignons à des concentrations allant de 20 à 200 µg/ml [106,126-131].

Les polyacétylènes du type falcarinol ont tendance à être présents de manière constitutive, ce qui indique qu'ils agissent principalement en tant que composés de pré-infection chez les espèces qui les produisent, même si une certaine augmentation a pu être observée en réponse à des infections [126-129]. Il a été aussi démontré que les polyacétylènes du type falcarinol jouent également le rôle de phytoalexines chez certaines plantes comestibles de la famille des Solanacées, tels que des tomates [111-112] et les aubergines [113].

### iv. Activité anti-inflammatoire et anti agrégante plaquettaire

Le falcarinol et le falcarindiol ont montré des activités anti-inflammatoires et antiagrégantes plaquettaires [132-134].

Pour la falcarinol, il a été suggéré que cette activité est liée à sa capacité à inhiber les lipoxygénases et à moduler le catabolisme des prostaglandines, et ceci par inhibition de l'enzyme qui catabolise la prostaglandine, la 15-hydroxy-prostaglandine deshydrogénase [135].

## II. 7.2.4. Toxicité

Les polyacétylènes oenanthotoxine et cicutoxine (Figure 14) isolés à partir de la ciguë aquatique (*Cicuta virosa* L.), de la carotte à Moreau (*Cicuta maculata* L) et de l'œnanthe safranée (*Oenanthe crocata* L.) de la famille des Apiacées sont extrêmement toxiques (26, 29), ils provoquent des convulsions violentes et la mort [136-137].

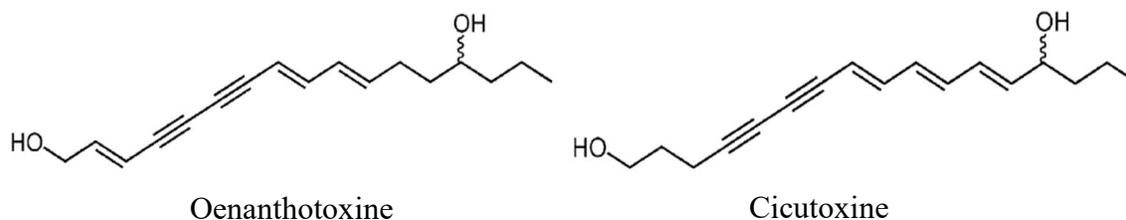


Figure 14 : Structure de polyacétylènes extrêmement toxiques isolés à partir d'Apiacées non comestibles [125]

Ces deux polyacétylènes sont étroitement liés aux polyacétylènes 2,3-dihydrooenanthéol et 2,3-dihydrooenanthéol acétate retrouvés chez l'aneth et/ou l'ajowan, cependant, une étude comparative du mécanisme d'action convulsive a montré que cet effet nécessite une distance bien spécifique entre les deux groupes OH de la molécule, ce qui indique que ces deux derniers polyacétylènes ne disposent pas d'effets toxiques similaires aux deux polyacétylènes précédents [125].

La neurotoxicité du falcarinol a été aussi démontrée lors de son injection à des souris et ceci à des concentrations relativement hautes (dose létale  $DL_{50} = 100 \text{ mg / kg}$ ), et le type de symptômes neurotoxiques produits est similaire à ceux des oenanthotoxine et cicutoxine, bien qu'une dose beaucoup plus élevée soit requise, et qu'aucun empoisonnement de mammifère n'ait été reporté suite à son ingestion volontaire à partir de sources naturelles.

Néanmoins, aucun effet prononcé n'a été démontré pour d'autres polyacétylènes du type falcarinol comme le falcarindiol [136].

## II. 7.2.5. L'hormèse ou effet bénéfique à faible dose : hormesis

L'hormèse est définie par une relation dose-réponse en forme de U [138] c'est à dire une inversion d'une réponse à faible dose, par stimulation de certains phénomènes biologiques, par rapport aux effets des doses plus élevées qui altèrent les mêmes mécanismes [139-140], il convient de noter que la nature du phénomène lui confère un caractère de réversibilité [141]. Par exemple un effet stimulant à faible dose est combiné avec un effet inhibiteur à forte dose [138].

Ce phénomène a été démontré dans des cellules cancéreuses de l'épithélium intestinal humain « Caco-2 », quand ces dernières ont été exposés au falcarinol ainsi que d'autres polyacétylènes à des concentrations allant de  $1 \text{ ng/ml}$  à  $20 \text{ } \mu\text{g/ml}$ , tous les polyacétylènes testés ont montré un effet biphasique, et pour le falcarinol cet effet d'hormèse a été observé à une concentration de  $100 \text{ ng/ml}$ . Durant cette expérience, la rupture des brins d'ADN et l'expression de la protéine active indicatrice de l'apoptose caspase-3, a été réduite à de faibles concentrations de polyacétylènes et a augmenté à des concentrations élevées [142]. Ce type de réactions a été également observé avec les cellules épithéliales mammaires bovines [143] quand celles-ci sont soumises à des concentrations progressives de falcarinol.

Aucun effet similaire des polyacétylènes n'a été démontré vis-à-vis de cellules normales, cependant une inhibition de leur croissance a été observée au-delà de  $1 \text{ } \mu\text{g/ml}$  [144].

La toxicité à des concentrations élevées a été considérée comme un aspect positif car la plupart des nouveaux composés promoteurs pour la santé seraient susceptibles de montrer des effets biologiques biphasiques (hormesis) [145]. Et ceci pourrait être un moyen efficace pour distinguer les composés bioactifs de ceux qui n'ont pas d'effet à de faibles niveaux, ce qui augmente les chances de nouvelles découvertes importantes dans ce groupe particulier de composés. Les

glucosinolates et les isothiocyanates sont un exemple d'un groupe de composés actuellement considérés comme agents anticancéreux et qui ont été à l'origine définis comme toxiques [146].

## II. 7.2.6. Mécanismes d'action : relation structure-activité

Bien qu'il existe plusieurs hypothèses qui expliquent le mécanisme d'action des polyacétylènes, la théorie la plus acceptée attribue leur réactivité à leur caractère hydrophobe et à leur capacité à stabiliser le carbocation formé à la position C-3, et ceci grâce aux triples liaisons conjuguées qui favorisent la substitution nucléophile à cette position (exemple du falcarinol, Figure 15). Il a été suggéré que ce mécanisme d'action pourrait expliquer la bioactivité du falcarinol en général, et les propriétés anticancéreuses des polyacétylènes [119].

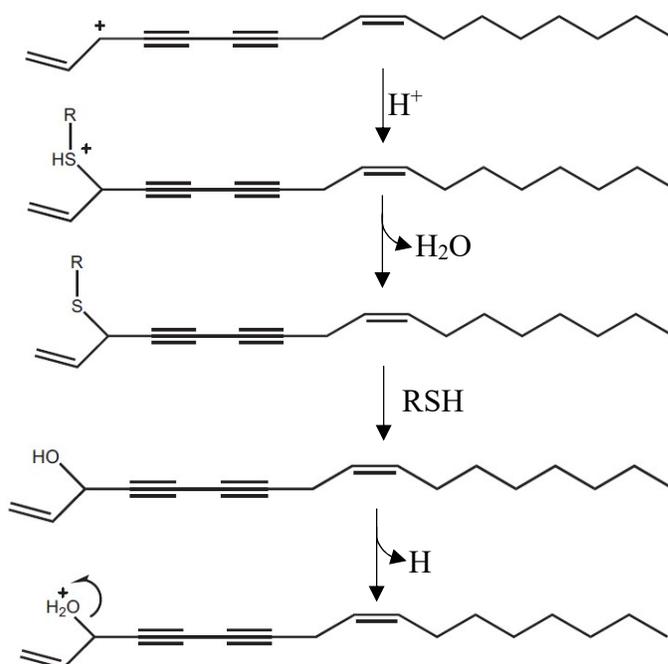


Figure 15 : L'éventuelle réaction des polyacétylènes de type falcarinol avec les biomolécules, (S: Substrat cellulaire)

Sur le plan cellulaire, une étude *in-vitro* a démontré que l'effet suppressif du falcarinol sur la prolifération des différentes cellules tumorales était probablement dû à sa capacité à arrêter la progression du cycle cellulaire des cellules tumorales dans ses différentes phases [147].

## II. 7.2.7. Instabilité des polyacétylènes

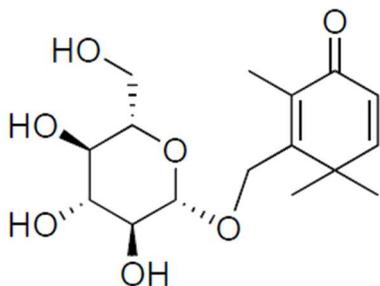
Les polyacétylènes sont en général considérés comme des composés thermosensibles, et ceci est probablement dû à leur structure acétylénique [143] [148]. Le falcarinol s'est avéré très instable sous sa forme pure, il se décompose rapidement lorsqu'il est stocké dans des solvants comme le DMSO, le n-hexane et l'éthanol. Son stockage dans du dichlorométhane à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans une atmosphère d'Argon et protégé de la lumière retarde son processus de dégradation mais ne l'élimine pas entièrement. En outre, à la température ambiante, le falcarinol se décompose rapidement dans le DMSO avec une demi-vie apparente de moins de 24 h [119].

## II. 7.3. Famille des terpènes

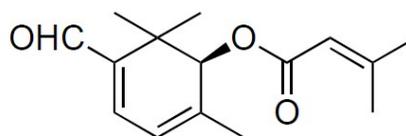
Des composés terpéniques non-volatils et volatils ont été isolés du genre *Eryngium*, il s'agit de monoterpènes, de sesquiterpènes et de triterpénoïdes.

### II. 7.3.1. Monoterpènes

Trois hétérosides de monoterpènes de type cyclohexanone et sept esters d'aldéhydes monoterpéniques ont été isolés, comme le 3-( $\beta$ -D-glucopyranosyloxyméthyl)-2,4,4-triméthyl-2,5-cyclohexadièn-1-one isolé de l'*E. campestre* [149], et le sénécioate d'isoféruyle à partir des feuilles d'*E. variifolium* [150].



3-( $\beta$ -D-glucopyranosyloxyméthyl)-2,4,4-triméthyl-2,5-cyclohexadien-1-one

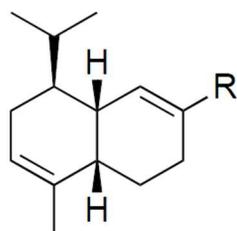


Sénécioate d'isoféruyle

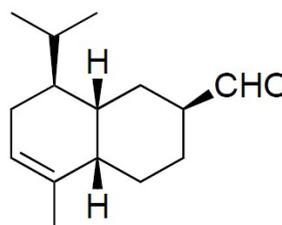
### II. 7.3.2. Sesquiterpènes

Des sesquiterpènes ont été isolés et identifiés à partir de l'extrait hexane/éther des parties aériennes d'*E. creticum* et l'extrait étheré des graines d'*E. giganteum*, ces sesquiterpènes sont des dérivés de perhydronaphthaline substituée par un groupe n-propyle, ce sont l'eryng-9-èn-15-al [103], le 15-hydroxy- $\alpha$ -muurolène, le 15-oxy- $\alpha$ -muurolène et le 15-nor- $\alpha$ -muurolène [151]. D'autres

sesquiterpènes qu'on trouve naturellement dans de nombreuses huiles essentielles ont été aussi isolés, le (+)-lédol, le (+)-spathuléol, le germacrène D et le trans- $\beta$ -farnésène [151].



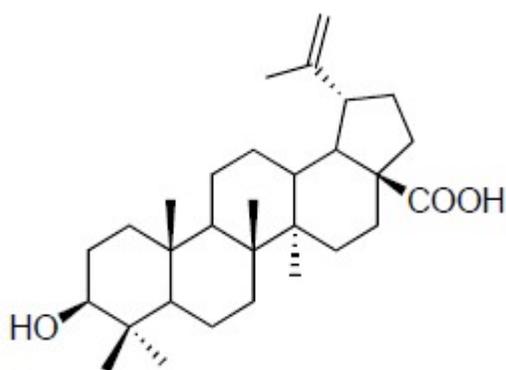
Eryng-9-èn-15-al

R= CH<sub>2</sub>OH: 15-hydroxy- $\alpha$ -muurolèneR=CHO: 15-oxy- $\alpha$ -muurolène

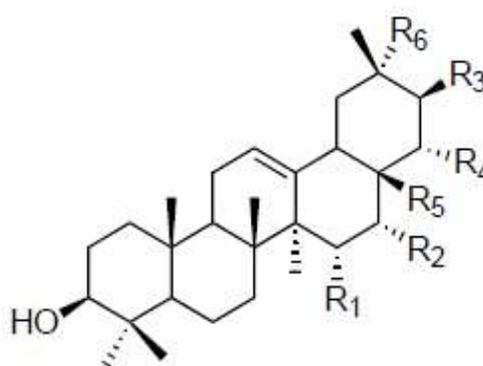
### II. 7.3.3. Triterpénoïdes

Et finalement, un total de 8 triterpénoïdes ont été isolés et identifiés à partir des hydrolysats acides et alcalines des saponines des *Eryngium*. Ce sont tous des triterpénoïdes pentacycliques classés en deux séries d'oléan-12-ène et de lupine [96].

Les dérivés d'oléan-12-ène sont caractérisés par la présence de nombreux groupements hydroxyles au niveau des carbones en positions C-3, 15, 16, 21, 22 et 28 ; et rarement en position C-29. Parmi ces triterpénoïdes on trouve l'acide bétulinique [151] chez l'*E. bromeliifolium*, l'acide oléanolique dans les racines d'*E. macrocalyx* [152-153] et le A1-barringenol dans les parties aériennes d'*E. maritimum*, d'*Eryngium planum*, d'*E. caucasicum* et d'*E. octophyllum* [151,154-155].



Acide bétulinique



Acide oléanolique :

R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=H, R<sub>4</sub>=H, R<sub>5</sub>=COOH, R<sub>6</sub>=CH<sub>3</sub>.

A1-barringenol:

R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=H, R<sub>4</sub>=OH, R<sub>5</sub>=CH<sub>2</sub>OH, R<sub>6</sub>=CH<sub>3</sub>

## II. 7.3.4. Huiles essentielles

La première étude de la composition chimique des huiles essentielles des *Eryngium* date de 1932 et a été effectuée par Koolhas, qui a analysé l'huile essentielle des tiges et des feuilles d'*E. foetidum*, et a signalé le dodécénal comme composé majoritaire de l'huile essentielle [156]. Cette composition a stimulé la curiosité des scientifiques, et à ce jour, la composition de l'huile essentielle de cette espèce a été étudiée par différents chercheurs dans différents pays, qui ont démontré que les composés majoritaires de l'huile essentielle de cette espèce étaient principalement des acides gras et des aldéhydes [157-160].

### i. Les composés oxygénés non terpéniques

L'étude des huiles essentielles des espèces du genre *Eryngium* extraites par hydrodistillation a montré que ces espèces ont relativement un rendement faible en huile essentielle [161].

Plus de 40 huiles essentielles d'*Eryngium* ont été décrites dans la littérature. Parmi ces huiles essentielles, 18 échantillons sont caractérisés par la présence majoritaire d'un composé oxygéné non terpénique. Cette classe de composés représente plus de 50 % de la composition totale des huiles essentielles de 8 échantillons. Il s'agit généralement d'isomères du triméthylbenzaldéhyde ou d'aldéhydes linéaires comme le (*E*)-2-dodécanal.

Ce type de composés a été décrit dans la plupart des huiles essentielles des parties aériennes d'*E. amethystinum*, *E. corniculatum*, *E. creticum*, *E. expandum*, *E. foetidum* et les racines d'*E. palmatum* et *E. yuccifolium* [93] [162].

D'autres composés oxygénés non terpéniques telque les polyacétylènes ont été également décrits (Tableau 6), on trouve notamment le faltarinol au niveau des feuilles et des tiges d'*E. yuccifolium* et les racines d'*E. foetidum* L. du Vietnam et ceux d'*E. planum* L [93].

Tableau 6 : Composés majoritaires oxygénés non terpéniques (%) identifiés dans les huiles essentielles des espèces du genre *Eryngium* [162]

Composé	Espèce	Parties étudiées	Teneur (%)
<b>acide-n-héxadecanoïque</b>	<i>E. caeruleum</i> M.B.	Parties aériennes	11,1
	<i>E. foetidum</i> L. (Cuba)	Feuilles	12
<b>4(5)-acétyl-1H-imidazole</b>	<i>E. caucasicum</i> Trautv.	Feuilles (échantillons côtiers)	63,6
<b>(E)-anéthole</b>	<i>E. paniculatum</i> Cav.	Inflorescence	52,6
<b>(E)-2-dodécénal</b>	<i>E. foetidum</i> L. (S.Tomé e Principe)	Parties aériennes	15,9–37,5
	<i>E. foetidum</i> L. (Venezuela)	Parties aériennes	27,5
	<i>E. foetidum</i> L. (Vietnam)	Parties aériennes	7,8–67,1
		Racines	7,1–11,6
<b>3-dodécénal</b>	<i>E. foetidum</i> L. (Venezuela)	Parties aériennes	5,2
<b>duraldéhyde</b>	<i>E. foetidum</i> L. (Vietnam)	Racines	37,6–53,1
<b>falcarinol</b>	<i>E. foetidum</i> L. (Vietnam)	Racines	3,4–8,1
		Racines	64,4
	<i>E. yuccifolium</i> Michaux.	Feuilles	9,6
		Tiges	3,2
<b>héxadecahydro-cyclobuta[1-4]dicyclooctène</b>	<i>E. caeruleum</i> M.B.	Parties aériennes	47
<b>heptanal</b>	<i>E. creticum</i> Lam.	Parties aériennes fleuries	13,9
<b>hexanal</b>	<i>E. creticum</i> Lam.	Parties aériennes fleuries	52,9
<b>lauraldéhyde</b>	<i>E. foetidum</i> L. (Vietnam)	Parties aériennes	7–11,5
<b>octanal</b>	<i>E. pandanifolium</i> Cham. et Schlecht	Fruit	11,5
	<i>E. palmatum</i>	Racines	31,7
<b>octane</b>	<i>E. creticum</i> Lam.	Parties aériennes fleuries	8,9
<b>2,3,6-triméthylbenzaldéhyde</b>	<i>E. amethystinum</i> L.	Parties aériennes	7,9
		Parties aériennes des pousses	24,7
		Inflorescence	22
		Fruit	16,9
	<i>E. expansum</i> F. Muell.	Parties aériennes	8
	<i>E. foetidum</i> L.	Parties aériennes	5,5–23,7
	<i>E. palmatum</i>	Racines	5,4
<i>E. yuccifolium</i> Michaux.	Racines	13,9	
<b>2,4,5- triméthylbenzaldéhyde</b>	<i>E. corniculatum</i> Lam.	Inflorescence	3,3
		Tiges et feuilles	3,8
	<i>E. foetidum</i> L. (Venezuela)	Parties aériennes	27,7
	<i>E. foetidum</i> L. (Cuba)	Feuilles	20,5
	<i>E. maritimum</i> L. (Sicile)	Parties aériennes	8,3
Racines		6,7	
<b>2,4,6- triméthylbenzaldéhyde</b>	<i>E. corniculatum</i> Lam.	Inflorescence	50,8
		Tiges et feuilles	50
		Racines	29,8
<b>(E)-2-téradécénal</b>	<i>E. foetidum</i> L. (S.Tomé e Principe)	Parties aériennes	18,7–25,3
<b>13-téradécénal</b>	<i>E. foetidum</i> L. (Vietnam)	Parties aériennes	8,9–9
		Racines	7,2–13,1

## ii. Les composés hydrocarbonés terpéniques

40 huiles essentielles appartenant à 23 espèces différentes de ce genre sont dominées par des terpènes hydrocarbonés (Composés majoritaires hydrocarbonés terpéniques (%) identifiés dans les huiles essentielles du genre *Eryngium*. Tableau 7). Ces espèces sont l'*E. alpinum*, *E. amethystinum*, *E. billardieri*, *E. bourgatii*, *E. bungei*, *E. caeruleum*, *E. campestre*, *E. caucasicum*, *E. corniculatum*, *E. duriaei*, *E. expansum*, *E. glaciale*, *E. maritimum*, *E. palmatum*, *E. pandanifolium*, *E. paniculatum*, *E. planum*, *E. rostratum*, *E. rosulatum*, *E. thorifolium*, *E. tricuspdatum*, *E. vesiculaosum*, *E. yuccifolium*. [163] [162].

On trouve assez souvent des sesquiterpènes comme le germacrène D, le bicyclogermacrène ou le  $\beta$ -caryophyllène comme composés majoritaires des huiles essentielles, et dans une moindre mesure le  $\beta$ -curcumène, le (*E*)- $\beta$ -farnésène, le (*E*)-caryophyllène, l' $\alpha$ -muurolène et le valencène. On trouve également des monoterpènes tels que l' $\alpha$ -pinène, le limonène, et le terpinolène ainsi que des diterpènes comme le phyllocladène, composé majoritaire des huiles essentielles des parties aériennes et des racines d'*E. bourgatii* (15 %-37,6 %) [93] [162]

Tableau 7: Composés majoritaires hydrocarbonés terpéniques (%) identifiés dans les huiles essentielles du genre *Eryngium*. [162]

	Composé	Espèce	Parties étudiées	Teneur (%)
Monoterpènes	$\delta$ -3-carène	<i>E. caeruleum</i> M.B.	Parties aériennes	13
	limonène	<i>E. bungei</i> Boiss.	Parties aériennes	7,5
		<i>E. caeruleum</i> M.B.	Parties aériennes	4,2–60,5
		<i>E. caucasicum</i> Trautv.	Feuilles (échantillons de collines)	20,1
		<i>E. planum</i> L.	Pétioles	14,7
			Feuilles en rosette	11,3
		<i>E. thorifolium</i> Boiss.	Parties aériennes fleuries	3,1
	myrcène	<i>E. campestre</i> L.	Inflorescence	3–21,7
			Tiges et feuilles	0,5–23,1
	$\alpha$ -pinène	<i>E. amethystinum</i> L.	Parties aériennes des pousses	11,8
			Inflorescence	25,6
			Fruit	17
		<i>E. corniculatum</i> Lam.	Inflorescence	4
		<i>E. paniculatum</i> Cav.	Inflorescence	19,1
	<i>E. yuccifolium</i> Michaux.	Feuilles	7,6	
	(1R)- $\alpha$ -pinène	<i>E. thorifolium</i> Boiss.	Parties aériennes fleuries	58,6
	$\beta$ -pinène	<i>E. planum</i> L.	Pétioles	9,8
$\gamma$ -terpinène	<i>E. rostratum</i> Cav.	Fruit	4,5	
terpinolène	<i>E. bungei</i> Boiss.	Parties aériennes	14,6	
	<i>E. yuccifolium</i> Michaux.	Feuilles	17,8	

			Racines	25,8
Sesquiterpènes	$\gamma$ -amorphène	<i>E. yuccifolium</i> Michaux.	Tiges	12,2
	bicyclogermacrène	<i>E. alpinum</i> L.	Parties aériennes	11,8
		<i>E. bourgatii</i> Gouan.	Inflorescence	15,1
		<i>E. rosulatum</i> P. W. Michael ined.	Parties aériennes	12,5
		<i>E. vesiculaosum</i> Labill.	Feuilles d'été	22,2
		<i>E. yuccifolium</i> Michaux.	Feuilles	8,8
	bicyclosesquiphellandrène	<i>E. yuccifolium</i> Michaux.	Tiges	3,4
	cis- $\alpha$ -bisabolène	<i>E. caeruleum</i> M.B.	Parties aériennes	2,1
	$\beta$ -curcumène	<i>E. campestre</i> L.	Inflorescence	0,7–22,2
		<i>E. palmatum</i>	Racines	5,9
		<i>E. tricuspdatum</i> L.	Parties aériennes	6,5
	$\delta$ -cadinène	<i>E. billardieri</i> F. Delaroche	Parties aériennes	6,2
	(E)-caryophyllène	<i>E. bourgatii</i> Gouan.	Tiges et feuilles	10,1
		<i>E. glaciale</i> Boiss.	Inflorescence	15,2
	$\beta$ -caryophyllène	<i>E. amethystinum</i> L.	Parties aériennes	19,7
		<i>E. duriaei</i> subsp. <i>juresianum</i> (M. Lainz) M. Lainz	Parties aériennes	6,3
		<i>E. vesiculaosum</i> Labill.	Feuilles d'hiver	20,3
		<i>E. vesiculaosum</i> Labill.	Feuilles d'été	15,6
		<i>E. yuccifolium</i> Michaux.	Feuilles	6,2
	7-epi-sélinène	<i>E. expansum</i> F. Muell.	Parties aériennes	38,3
	$\beta$ -élémente	<i>E. rosulatum</i> P. W. Michael ined.	Parties aériennes	16
	$\delta$ -élémente	<i>E. rosulatum</i> P. W. Michael ined.	Parties aériennes	7
	(E)- $\beta$ -farnésène	<i>E. campestre</i> L.	Inflorescence	0,1–19
<i>E. caucasicum</i> Trautv.		Feuilles (échantillons de collines)	14,1	
germacrèneD	<i>E. alpinum</i> L.	Parties aériennes	10,3	
		Parties aériennes des pousses	31,3	
	<i>E. amethystinum</i> L.	Inflorescence	14,5	
		Fruit	7,6	
	<i>E. campestre</i> L.	Inflorescence	30,3–40,3	
		Tiges et feuilles	31,1–42,4	
	<i>E. maritimum</i> L. (Sicile)	Parties aériennes	10,4	
		Racines	15,9	
	<i>E. maritimum</i> L. (Corse et Sardaigne)	Parties aériennes	13,7–45,9	
	<i>E. vesiculaosum</i> Labill.	Feuilles d'hiver	19,2	
<i>E. yuccifolium</i> Michaux.	Feuilles	18,3		
	Tiges	38,4		
cis- $\beta$ -guaïène	<i>E. expansum</i> F. Muell.	Parties aériennes	10,8	
$\beta$ -gurjunène	<i>E. billardieri</i> F. Delaroche	Parties aériennes	17	

	$\alpha$ -humulène	<i>E. vesiculaosum</i> Labill.	Feuilles d'hiver	8,8
			Feuilles d'été	
	$\alpha$ -muurolène	<i>E. billardieri</i> F. Delaroche	Parties aériennes	42
			<i>E. rostratum</i> Cav.	Fruit
	$\gamma$ -muurolène	<i>E. bourgatii</i> Gouan.	Tiges et feuilles	11,8
			Racines	15,4
	$\alpha$ -néocallitropsène	<i>E. duriaei</i> subsp. <i>juresianum</i> (M. Lainz) M. Lainz	Parties aériennes	26
	$\alpha$ -sélinène	<i>E. pandanifolium</i> Cham. et Schlecht	Feuilles	11,3
	$\beta$ -sélinène	<i>E. pandanifolium</i> Cham. et Schlecht	Feuilles	13,8
			Fruit	9,2
$\beta$ -sesquiphellandrène	<i>E. caucasicum</i> Trautv.	Feuilles (échantillons côtiers)	10	
		Feuilles (échantillons de collines)	44,3	
trans- $\beta$ -bergamotène	<i>E. yuccifolium</i> Michaux.	Racines	18,6	
valencène	<i>E. billardieri</i> F. Delaroche	Parties aériennes	5,7	
		<i>E. glaciale</i> Boiss.	Inflorescence	11,5
<b>Diterpènes</b>	phyllocladène	<i>E. bourgatii</i> Gouan.	Inflorescence	37,6
			Tiges et feuilles	20,4
			Racines	15
	isomère de phyllocladène	<i>E. corniculatum</i> Lam. <i>E. glaciale</i> Boiss.	Racines	13
Inflorescence			43,5	

### iii. Les composés terpéniques oxygénés

Finalement, 17 huiles essentielles de 12 espèces différentes, *E. alpinum*, *E. amethystinum*, *E. bungei*, *E. caucasicum*, *E. corniculatum*, *E. duriaei* subsp. *Juresianum*, *E. foetidum*, *E. maritimum*, *E. pandanifolium*, *E. planum*, *E. rostratum* et *E. tricuspidatum* sont dominés par les alcools ou les oxydes terpéniques, comme comme le caryophyllène oxide, l' $\alpha$ -bisabolol, le spathuléol, le carotol ou l'acétate de bornyle [162-164].

Tableau 8 : Composés majoritaires oxygénés terpéniques (%) identifiés dans les huiles essentielles du genre *Eryngium*. [162].

	Composé	Espèce	Parties étudiées	Teneur (%)
Monoterpénoïdes	bornéol	<i>E. bungei</i> Boiss.	Parties aériennes	44,4
	acétate de bornyle	<i>E. pandanifolium</i> Cham. et Schlecht	Feuilles	20,8
		<i>E. planum</i> L.	Feuilles en rosette	18,1
	camphre	<i>E. bungei</i> Boiss.	Parties aériennes	7,9
	carvacrol	<i>E. bungei</i> Boiss.	Parties aériennes	8,9
	cis-chrysanthényle acétate	<i>E. planum</i> L.	Inflorescence	43,2
	chrysanthényle acétate	<i>E. corniculatum</i> Lam.	Inflorescence	4
	cuminol	<i>E. bungei</i> Boiss.	Parties aériennes	55,3
	1,8-cinéolé	<i>E. bungei</i> Boiss.	Parties aériennes	9,1
	isobornéol	<i>E. bungei</i> Boiss.	Parties aériennes	9,2
	isobornyle formate	<i>E. bungei</i> Boiss.	Parties aériennes	14,7
	terpinen-4-ol	<i>E. planum</i> L.	Feuilles en rosette	10,9
thymol	<i>E. caucasicum</i> Trautv.	Feuilles (échantillons côtiers)	13,9	
Sesquiterpénoïdes	$\alpha$ -bisabolol	<i>E. amethystinum</i> L.	Parties aériennes	7,9
		<i>E. tricuspdatum</i> L.	Parties aériennes	32,6
	$\beta$ -bisabolol	<i>E. rostratum</i> Cav.	Tige	8,6
	4 $\beta$ H-cadin-9-ène-15-al	<i>E. maritimum</i> L. (Corse et Sardaigne)	Parties aériennes	18,4–27,6
	carotol	<i>E. foetidum</i> L. (Venezuela)	Parties aériennes	8,8
		<i>E. foetidum</i> L. (Cuba)	Feuilles	9,9
	caryophyllène oxide	<i>E. alpinum</i> L.	Parties aériennes	21,6
		<i>E. duriaei</i> subsp. <i>juresianum</i> (M. Laínz) M. Laínz	Parties aériennes	7,6
		<i>E. maritimum</i> L. (Turquie)	Parties aériennes	8,2
		<i>E. rostratum</i> Cav.	Tige	8
	14-hydroxy- $\beta$ -caryophyllène	<i>E. duriaei</i> subsp. <i>juresianum</i> (M. Laínz) M. Laínz	Parties aériennes	13,4
	isocaryophyllène-14-al	<i>E. duriaei</i> subsp. <i>juresianum</i> (M. Laínz) M. Laínz	Parties aériennes	16,2
	4 $\beta$ H-muurool-9-ène-15-al	<i>E. maritimum</i> L. (Corse et Sardaigne)	Parties aériennes	4,3–9,3
( <i>E</i> )-nérolidol	<i>E. corniculatum</i> Lam.	Racines	9,4	
spatulénol	<i>E. maritimum</i> L. (Turquie)	Parties aériennes	18,9	
	<i>E. rostratum</i> Cav.	Tige	20	

## II. 7.3.5. Famille des saponosides

Le genre *Eryngium* est connu pour avoir de nombreux saponosides triterpéniques comme principaux composés. À ce jour, 25 saponines ont été isolées à partir de ce genre. La plupart des saponines des *Eryngium* appartiennent au groupe des oléanènes polyhydroxylés. Cette

classe de saponines a été retrouvée dans une large gamme de plantes appartenant à des familles différentes telles que les Sapindacées (*Aesculus* L. et *Harpullia austrocaledonica* Baill) et les Pittosporacées (*Pittosporum tobira* (Thunb.) Ait) [165].

## II. 7.4. Famille des stéroïdes

Onze stéroïdes ont été identifiés chez des espèces du genre *Eryngium*. Ces composés comprennent le  $\beta$ -sitostérol, le stigmastérol, le campestérol, le brassicastérol, le 3- $\alpha$ -cholestérol, le (-)-clérostérol, le  $\Delta^5$ -avénostérol, le  $\Delta^7$ -avénastérol et le  $\Delta^{5,24}$ -stigmastadiénol identifiés à partir des extraits d'hexane des feuilles d'*E. foetidum* [166-169]. Le brassicastérol a été également isolé et identifié à partir de l'extrait éthanolique de la plante entière d'*E. agavifolium* [166] et une étude comparative a indiqué que tous les stéroïdes des feuilles sont également présents au niveau des tiges mais avec des quantités différentes [169].

## II. 7.5. Composés phénoliques

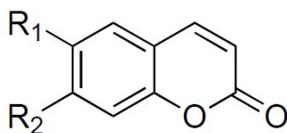
### II. 7.5.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes font aussi partie des principaux composés retrouvés chez les *Eryngium*, et une quinzaine de flavonoïdes comprenant des flavonols, et une flavonone ont été isolés et identifiés.

Les hétérosides des flavonols identifiés comme la quercétine et le kaempferol possèdent soit une chaîne oligosaccharidiques en C-3 ou C-7, soit deux chaînes oligosaccharidiques en C-3 et C-7 [96].

### II. 7.5.2. Coumarines

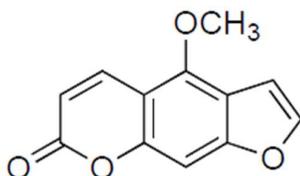
Des coumarines simples ainsi que des furocoumarines linéaires ont été également retrouvées chez les *Eryngium*. Ces coumarines sont la scopolétine isolée à partir des racines d'*E. bourgatii* [170], la 6,7-diméthoxycoumarine, la deltoïne, et la (+)-marmésine à partir d'*E. creticum* [171] [167]; l'umbelliférone, la bergaptine, le décursinol, la grandivittine à partir d'*E. biebersteinianum* [172]; la prantschimGINE, la deltoïne, et la (+)-marmésine des extraits éthanoliques d'*E. ilicifolium* [173]; et le benzoate d'aégélinol, l'agasylline, l'aégélinol et la grandivittine à partir des racines d'*E. campestre* [174].



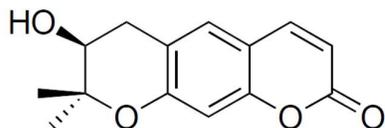
Umbelliférone : R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH

Scopolétine : R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=OH

6,7-diméthoxycoumarine : R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=OCH<sub>3</sub>



Bergaptine



Décursinol

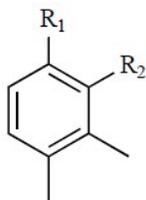
## II. 7.5.3. Autres composés phénoliques

Trois composés phénoliques dont deux nouveaux phenyl cafféates ont été isolés et identifiés chez *E. yuccifolium* [165]. Par ailleurs, l'isolement de substances antioxydantes des extraits des racines d'*E. alpinum* a permis l'identification d'un nouveau dérivé de l'acide rosmarinique, le R-(+)-3'-O-β-D-glucopyranosyl acide rosmarinique, ainsi que deux composés connus le R-(+)-acide rosmarinique, et l'acide chlorogénique [175].

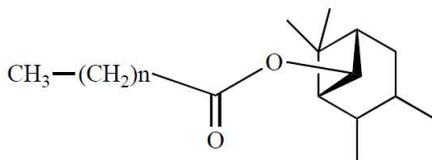
D'autre part, une étude chimiotaxonomique a permis l'identification du R-(+)-acide rosmarinique et du R-(+)-acide rosmarinique 3'-O-β-D-glucopyranosyl chez 13 *Eryngium* différents, à l'exception d'*Eryngium giganteum* E., qui était dépourvu de R-(+)-acide rosmarinique 3'-O-β-D-glucopyranosyle [175].

## II. 7.6. Autres composés des *Eryngium*

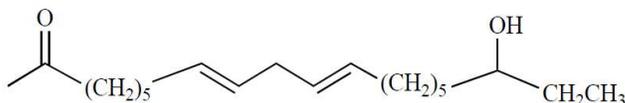
Dix-huit autres classes de composés ont été obtenues à partir des *Eryngium* L., ces composés comportent deux triméthyl-benzaldéhydes isolés à partir des feuilles d'*E. variifolium* [150], trois esters de cis-chrysanthényle identifiés chez *E. planum* [176], ainsi que d'autres composés divers comme les dérivés de l'acide cis-crotonique et les cétones (comme l'eicosa-8,11-diène-18-ol-2-one) et acides aliphatiques à longue chaîne [138].



$R_1=CHO, R_2=CH_3$ : 2,3,4-triméthylbenzaldéhyde  
 $R_1=CH_3, R_2=CHO$ : 2,3,6-triméthylbenzaldéhyde



$n=0$ : acetate de *cis*-chrysanthényle  
 $n=4$  : hexanoate de *cis*-chrysanthényle  
 $n=6$  : octanoate de *cis*-chrysanthényle



Eicosa-8,11-diène-18-ol-2-one

## III. Contexte de l'étude des *Eryngium* tunisiens

### III. 1. Cadre géographique de l'étude

La région méditerranéenne est un grand centre de diversité, et environ 25000 espèces végétales y ont été identifiées [177] [178]. Au fil des siècles, cette diversité botanique remarquable a favorisé les cultures et les traditions qui sont étroitement liées à l'utilisation des plantes, ce qui a engendré un héritage ethnobotanique vaste et varié.

Un grand nombre de recherches a été mené dans une tentative d'exploiter le potentiel médicinal de la flore méditerranéenne et chercher à aborder l'intérêt thérapeutique d'un nombre considérable de plantes encore utilisées jusqu'aujourd'hui, ce qui prouve l'intérêt des connaissances et des traditions liées aux facteurs écologiques et culturels autochtones de cette région [179-182].

La Tunisie a une position géographique avantageée, au carrefour entre l'est et l'ouest du bassin méditerranéen, entre l'Europe et l'Afrique. Le climat méditerranéen typique qui règne dans la partie nord et est du pays se heurte au climat désertique du sud [183]. Il est caractérisé par des étés secs et chauds et des hivers frais et humides, ce qui limite la période végétative, les précipitations sont très irrégulières et la pluviosité varie considérablement du nord au sud. Selon Emberger (1960), il y a cinq principales zones bioclimatiques, allant de la plus aride à la plus humide en fonction des précipitations, mais la pluviosité n'est pas le seul facteur déterminant, les températures, notamment les températures hivernales, ainsi que l'altitude et la situation continentale sont aussi importantes [184].

Les conditions climatiques méditerranéennes de la Tunisie favorisent, aussi bien le développement des plantes sauvages (romarin, thym...) que cultivées (marjolaine, menthe...).

En Tunisie, il existe uniquement huit espèces du genre *Eryngium*. *Eryngium campestre*, *Eryngium dichotomum*, *Eryngium glomeratum*, *Eryngium ilicifolium*, *Eryngium tricuspdatum*, *Eryngium triquetrum*, *Eryngium maritimum*, *Eryngium barrelieri* [89] [185].

### III. 2. *Eryngium triquetrum* Vahl.

#### III. 2.1. Aspect botanique et répartition géographique

Plante d'un vert bleuâtre, devenant à maturité d'un bleu violacé intense. Racine fusiforme. Tige rameuse de 20-40 cm, plusieurs fois trifurquée ; rameaux anguleux, les supérieurs et les pédoncules sont en triquètre. Feuilles radicales en rosette, les primordiales oblongues, simplement dentées ou trilobées, les suivantes profondément divisées, 3-5 fides, les caulinaires semi-amplexicaules, palmatipartites, sont toutes épineuses. Capitules pauciflores, courtement pédonculés ou sessiles. Involucre de 3 bractées triangulaires en alène, vulnérantes. Calice fructifère à dents dressées (Figure 16).

On retrouve cette espèce dans les pâturages rocailleux, les bords des chemins. Elle est répandue dans toute la Tunisie, sauf au sud du territoire [89].

- Aire géographique : Algérie, Maroc, Sicile, Pantelleria.
- Synonymes : pas de synonymes connus pour cette espèce
- Nom commun : panicaut triquètre, panicaut à feuilles de chêne ; Nom vernaculaire : Zreyga, ou « chöuk azrak »



Figure 16 : Photo de l'espèce *Eryngium triquetrum* (Vahl.). Echantillon collecté en mai 2014 à Tunis.  
 En haut à gauche : aspect général de la plante dans son milieu de collecte, à droite : planche de l'herbier illustrant les différentes parties de la plante. En bas : inflorescence.

### III. 2.2. Utilisation traditionnelle

La racine, en décoction, est employée au Maroc contre les douleurs des intestins et le refroidissement. La tige feuillée est utilisée par application locale associée à d'autres plantes (*Thymus broussonetii*, *Herniaria hirsuta*, *Ammodaucus leucotrichus*, *Anastatica hierochuntica*, *Rosmarinus officinalis*, *Petroselinum sativum*, *Opuntia sp ficus-indica*, *Zea mays*) en décoction, et administrée contre la lithiase [186]. Elle est aussi utilisée pour lutter contre les affections digestives, dermatologiques, neurologiques, microbiennes, ORL et la fièvre typhoïde [187] et la racine est donnée aux enfants contre l'amygdalite [188].

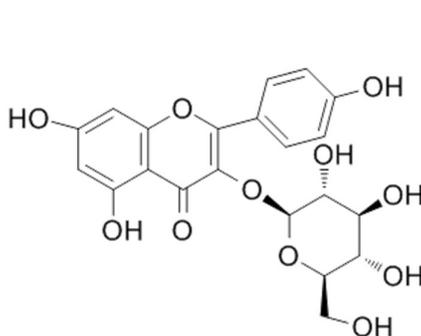
Elle est également utilisée contre les troubles inflammatoires, l'œdème, la sinusite, les infections urinaires ou les inflammations, la cicatrisation des plaies, les piqûres de serpent ou de scorpion, le goitre et l'ascite [189-191]

### III. 2.3. Travaux antérieurs

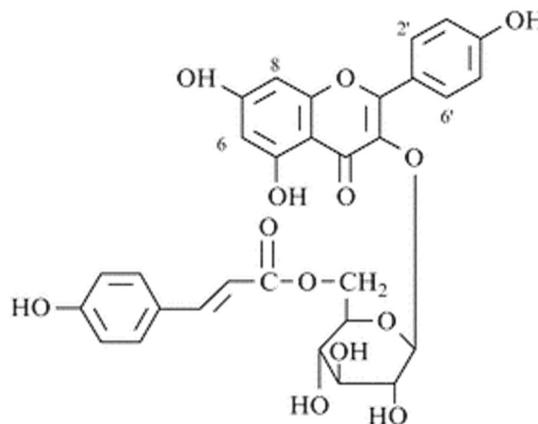
Les racines d'*Eryngium triquetrum*, sur lesquelles s'est principalement effectué notre travail de séparation n'ont jamais fait l'objet d'études phytochimiques.

Un seul rapport concernant des extraits polaires des parties aériennes a été retrouvé [192].

A partir de l'extrait MeOH-H<sub>2</sub>O (70:30, v/v), 5 hétérosides de flavonols ont été identifiés ; le kaempférol 3-*O*-β-D-glucoside, le kaempférol 3-*O*-[6''-*O*-*E*-p-coumaroyl]-β-D-glucopyranoside, le kaempférol 3-*O*-[2'',6''-di-*O*-*E*-p-coumaroyl]-β-D-glucoside, le kaempférol 3-*O*-[α-L-rhamnosyl-(6→1)-*O*-β-D-glucoside, et le quercitol 3-*O*-[α-L-rhamnosyl-(6→1)-*O*-β-D-glucoside.



Astragaline: Kaempférol 3-*O*-β-D-glucoside



Kaempférol 3-*O*-[6''-*O*-*E*-p-coumaroyl]- β -D-glucopyranoside

Cependant, la composition chimique de l'huile essentielle de cette espèce n'a jamais été étudiée.

### III. 3. *Eryngium dichotomum* Desf.

#### III. 3.1. Aspect botanique et répartition géographique

Plante glauque, virant au bleu violacé dans l'inflorescence. Souche épaisse. Tige rameuse de 10-50 cm, à rameaux trifurqués. Feuilles radicales oblongues, longuement pétiolées, entières, dentées-crênelées ; les caulinaires sont sessiles, palmatipartites, à divisions épineuses. Les capitules sont pédonculés. Involucre a 6-7 bractées de 2-3 cm, dentées-épineuses à la base.

Paillettes du réceptacle dimorphes, les externes tridentées, les autres entières. Calice fructifère à dents acuminées (Figure 17). On la trouve dans les pâturages humides argileux [89].

- Aire géographique : Algérie, Maroc, Espagne, Sicile. Italie méridionale, Dalmatie, Crête.
- Synonymes : pas de synonymes connus pour cette espèce [185].
- Nom commun : panicaut dichotome.



Figure 17 : Photo de l'espèce *Eryngium dichotomum* (Desf.). Echantillon collecté en mai 2014 à Tunis. A gauche : Aspect général de la plante, à droite : planche de l'herbier illustrant les différentes parties de la plante.

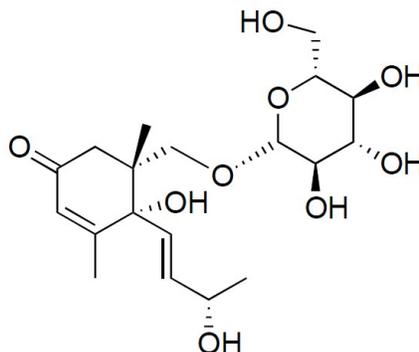
### III. 3.2. Travaux antérieurs

Deux rapports en littérature ont été retrouvés, et qui s'intéressent aux parties aériennes d'*E. dichotomum* tunisienne.

L'étude phytochimique a permis d'isoler et d'identifier 1 hétéroside de monoterpène (5-[( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy) méthyl]-4-hydroxy-4-[(1E,3S)-3-hydroxy-1-butényl]-3,5-diméthyl-2-cyclohexène-1-one), 1 flavonoïde (Naringénine 7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-

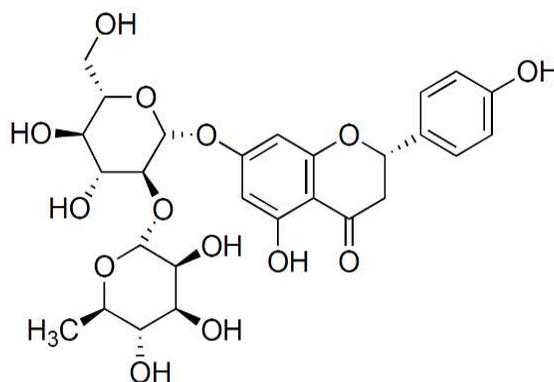
glucopyranoside , et deux stéroïdes (stigmastérol et stigmastérol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside) ; ainsi que 4 sucres, le saccharose, le furanose et ses 2-méthyle analogues [168] [193]. La composition de l'huile essentielle de cette espèce ainsi que son activité biologique n'ont jamais été évaluées.

### Monoterpène



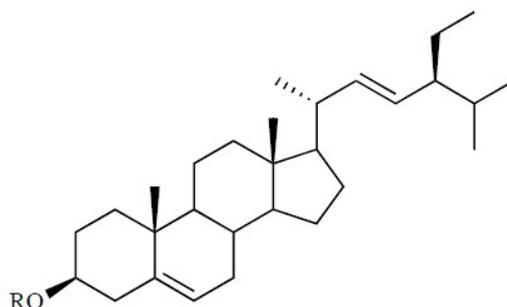
5-[( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)méthyl]-4-hydroxy-4-[(1E,3S)-3-hydroxy-1-butényl]-3,5-diméthyl-2-cyclohexène-1-one

### Flavonoïde



aringénine 7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-glucopyranoside

### Stéroïdes



Stigmastérol: R=H

Stigmastérol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside: R= $\beta$ -D-glucopyranosyl

### III. 4. *Eryngium tricuspidatum* L.

#### III. 4.1. Aspect botanique et répartition géographique

Plante d'abord d'un vert glauque, virant à maturité au bleu violacé. Racine renflée en tubercule noirâtre. Feuilles radicales longuement pétiolées, à pétiole grêle, à limbe arrondi, ovale ou réniforme, à dents mucronulées. Feuilles caulinaires subsessiles palmatipartites, à divisions épineuses. Capitules longuement pédonculées. Involucre de 5-6 bractées acuminées et vulnérantes, dentées. Paillettes du réceptacle sont tous tricuspidés dépassants les fleurs [89].

En Tunisie il existe deux sous-espèces d'*Eryngium tricuspidatum* L., la Ssp. *eu-tricuspidatum* Maire et la Ssp. *bovei* (Boiss.) Ball.

- La Ssp. *eu-tricuspidatum* Maire : elle est caractérisée par des feuilles radicales à limbe arrondi ou ovale. Bractées de l'involucre 2-3 fois plus longues que le capitule, à dents épineuses. Elle est retrouvée dans les bords des chemins, les lieux arides, la brousse. Aire géographique : Algérie, Maroc, Espagne, Italie, Sardaigne, Grèce, Asie mineure.

- La Ssp. *bovei* (Boiss.) Ball. : elle est caractérisée par des feuilles radicales à limbe réniforme. Feuilles caulinaires à divisions courtes et larges, ainsi que les pièces de l'involucre qui sont peu dentées et 1 fois et demie à 2 fois plus longues que le capitule. Elle se trouve dans les pâturages, broussailles et forêts. Aire géographique : endémique algéro-tunisienne [89].

*Eryngium tricuspidatum* L. étudiée dans ce travail appartient à la sous-espèce endémique *bovei* (Boiss.) Ball (Figure 18).

- Synonymes : pas de synonymes connus pour cette espèce [185].
- Nom commun : panicaut tricuspide.



Figure 18 : Photo de l'espèce *Eryngium tricuspdatum* L. ssp. *Bovei* Boiss.

Echantillon collecté en août 2014 à Sedjnane en Tunisie. A gauche : aspect général de la plante dans son milieu de collecte, à droite : planche de l'herbier représentant les différentes parties de la plante dont la racine en tubercule caractéristique d'*E. tricuspdatum* et la feuille réniforme spécifique de la sous-espèce *bovei* (Boiss.) Ball.

### III. 4.2. Utilisation traditionnelle

Au Maroc le décocté des racines est utilisé pour calmer les douleurs d'accouchement ; elle est aussi utilisée pour le gain de poids, ainsi que pour son effet tonique et anti-rhumatismal [194]. Les racines, en décoction, sont efficaces contre les intoxications et les constipations [195].

### III. 4.3. Travaux antérieurs

Pour cette espèce, uniquement l'huile essentielle des parties aériennes a été récemment étudiée. La composition de l'huile essentielle est particulièrement riche en sesquiterpènes oxygénés

(49,6%) et l' $\alpha$ -bisabolol (32,6%) a été identifié comme composé majoritaire de l'huile, suivis par les sesquiterpènes hydrocarbonés et particulièrement l' $\alpha$ -curcumène (6,5%). L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle a été aussi établie contre 13 souches (CMI entre 4,6 à 74 mg/ml), particulièrement contre *Candida albicans* (CMI = 4.6 mg/ml) et les bactéries Gram<sup>+</sup> avec une CMI entre 9 et 18 mg/ml. L'activité antioxydante de cette huile essentielle a également été mise en évidence [164].

### III. 5. *Eryngium campestre* L.

#### III. 5.1. Aspect botanique et répartition géographique

Plante d'un vert blanchâtre, à souche épaisse, à tige dressée, robuste, très rameuse, de 40-60 cm. Feuilles radicales à contour largement triangulaire, pétiolées, les moyennes embrassant la tige par 2 oreillettes, les supérieures ovales, sessiles, toutes pennatifides, coriaces et épineuses. Fleurs blanchâtres en têtes globuleuses ou ovoïdes, pédonculées. L'involucre a 4-6 bractées étroites, linéaires acuminées, étalées à maturité. Paillettes du réceptacle entières, égalant environ 2 fois le calice. Calice fructifère a dents dressées acuminées (Figure 19). On la trouve dans les coteaux incultes, les champs, et aux bords des chemins [89].

- Aire géographique : répandue en Tunisie, et dans la région méditerranéenne. En Europe centrale, Sibérie, et Caucase.
- Synonymes : pas de synonymes connus pour cette espèce [185].
- Nom commun : Chardon roulant, Chouk Labiadh, Bou-neggar (nom local).



Figure 19: Photo de l'espèce *Eryngium campestre* (L.). Echantillon collecté en Juin 2014 à Bizerte

### III. 5.2. Utilisation traditionnelle

En médecine traditionnelle turque, cette espèce est très connue, l'infusion des parties aériennes et des racines est utilisée comme antitussif, diurétique, stimulant de l'appétit et aphrodisiaque. Les racines sont antispasmodiques, diaphorétiques, diurétiques, expectorantes, galactogènes et stimulantes [196] [197]; elles sont aussi très efficaces dans le traitement de la faiblesse causée par la toux chronique réputée dans les stades avancés de l'épuisement pulmonaire [196]. Cette plante est aussi utilisée pour traiter la coqueluche, les maladies du foie et des reins et les affections de la peau [196] [198].

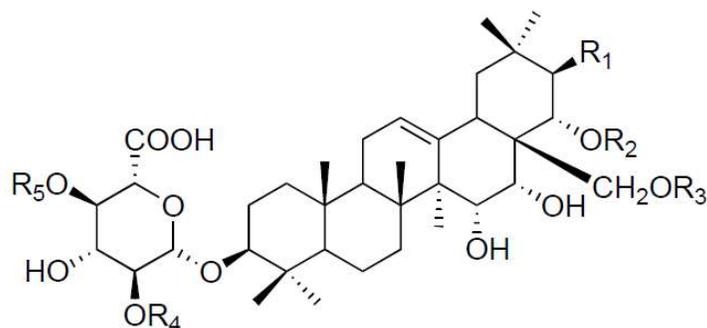
### III. 5.3. Travaux antérieurs

Cette espèce est parmi les espèces les plus étudiées du genre *Eryngium*, à la fois pour les parties aériennes et les racines. Son extrait éthanolique a montré une activité anti-inflammatoire et anti-nociceptive [166] [199].

Des saponines triterpéniques, des monoterpènes, et des polyphénols ont été isolés et identifiés dans des travaux antérieurs [96].

## Saponines triterpéniques

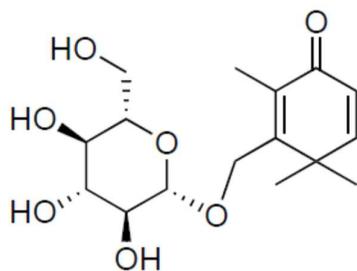
No	Nom du composé
1	3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-22- <i>O</i> - $\beta$ , $\beta$ -diméthylacryloyl-barrigénol A1
2	3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-22- <i>O</i> -angeloyl-arrigénol R1
3	3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-21- <i>O</i> -acetyl-22- <i>O</i> -angeloyl-arrigénol R1
4	3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-21- <i>O</i> -acetyl-22- <i>O</i> - $\beta$ , $\beta$ -diméthylacryloyl-barrigénol R1
5	3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-22- <i>O</i> -angeloyl-28- <i>O</i> -acetyl-arrigénol R1
6	3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\alpha$ 4)]- $\beta$ -Dglucuronopyranosyl-22- <i>O</i> -angeloyl-barrigénol R1
7	3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\alpha$ 4)]- $\beta$ -Dglucuronopyranosyl-22- <i>O</i> - $\beta$ , $\beta$ -diméthylacryloyl-barrigénol A1



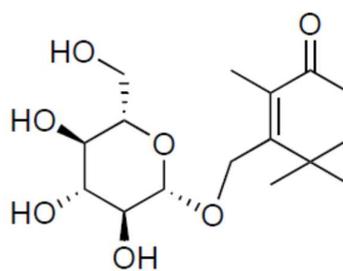
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
1	H	dMA	H	$\alpha$ -L-rhamnopyranosyl	H
2	OH	Ang	H	$\alpha$ -L-rhamnopyranosyl	H
3	OAc	Ang	H	$\alpha$ -L-rhamnopyranosyl	H
4	OAc	dMA	H	$\alpha$ -L-rhamnopyranosyl	H
5	OH	Ang	Ac	$\alpha$ -L-rhamnopyranosyl	H
6	OH	Ang	H	$\beta$ -Dglucuronopyranosyl	$\alpha$ -L-rhamnopyranosyl
7	H	dMA	H	$\beta$ -Dglucuronopyranosyl	$\alpha$ -L-rhamnopyranosyl

## Monoterpènes

No	Nom du composé
1	3-( $\beta$ -D-glucopyranosyloxyméthyl)-2,4,4-triméthyl-2,5-cyclohexadién-1-one
2	3-( $\beta$ -D-glucopyranosyloxyméthyl)-2,4,4-triméthyl-2-cyclohexadién-1-one



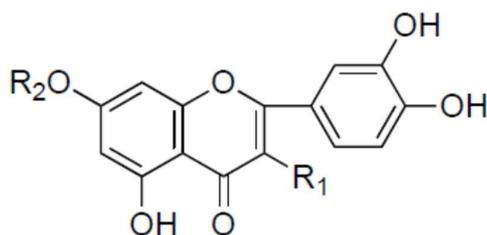
1



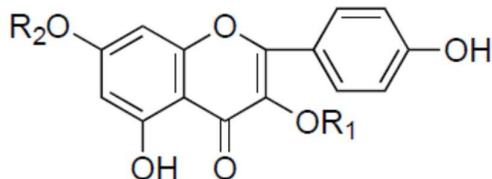
2

## Flavonoïdes

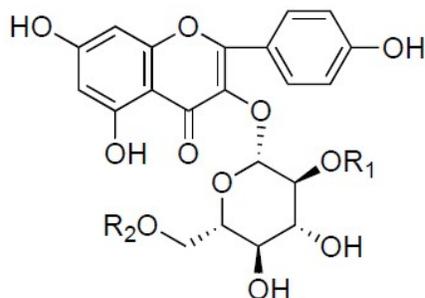
No	Nom du composé
1	Quercétine
2	Isoquercétine
3	Rutine
4	Lutéoline 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside
5	Astragaline
6	Kaempférol 7-O- $\beta$ -L-rhamnopyranoside
7	Kaempférol 3,7-di-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside
8	Kaempférol 3-O- $\beta$ -D-(2'-p-Z-hydroxycinnamoyl)-glucopyranoside



	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>1</b>	OH	H
<b>2</b>	<i>O</i> -β-D-rhamnopyranosyl	H
<b>3</b>	<i>O</i> -α-L-rhamnopyranosyl-(1→6))- β-D-glucopyranosyl	H
<b>4</b>	H	β-D-glucopyranosyl



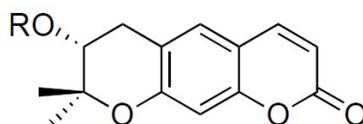
	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>5</b>	β-D-glucopyranosyl	H
<b>6</b>	H	α-L-rhamnopyranosyl
<b>7</b>	α-L-rhamnopyranosyl	α-L-rhamnopyranosyl



	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>8</b>	<i>p</i> -Z-hydroxycinnamoyl	H

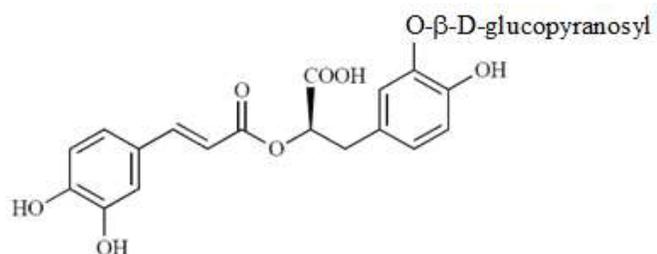
## Coumarines

No	Nom du composé
1	Benzoate d'aégélinol
2	Agasylline
3	Aégélinol



R	
1	
2	
3	H

## Autre composé phénolique

Acide  $\beta$ -D-glucopyranosyl-(+)-3'-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl rosmarinique

La composition de l'huile essentielle de cette espèce a été également établie, l'analyse par CPG/SM a montré que sa composition est riche en terpènes hydrocarbonés et que l' $\alpha$ -pinène et l'hexanal étaient les composés majoritaires.

### III. 6. *Eryngium ilicifolium* Lam.

#### III. 6.1. Aspect botanique et répartition géographique

Plante d'un vert blanchâtre, à tige florifère dès la base et dichotome. Les feuilles sont toutes semblables, oblongues, fortement dentées, épineuses, coriaces et similaires aux bractées de l'involucre. Les capitules sont sub-sessiles, multiflores. Les paillettes du réceptacle tricuspides, courtes, mais dépassant les petites fleurs. Les sépales sont bilobés, longuement mucronés. Et le fruit couvert d'écaillés blanches très obtuses (Figure 20). On la retrouve dans les dépressions humides l'hiver, les lits d'oueds desséchés, et les lieux arides.

- Aire géographique : Algérie, Maroc, Espagne méridionale.
- Synonymes : pas de synonymes connus pour cette espèce [185].
- Nom commun : panicaut à feuilles de houx.



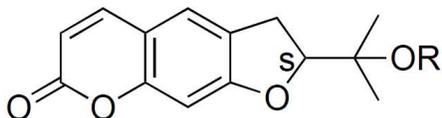
Figure 20 : Photo de l'espèce *Eryngium ilicifolium* (Lamk.). Echantillon collecté en juillet 2014 à Kairouan en Tunisie. A gauche : Aspect général de la plante dans son milieu de collecte, à droite : planche de l'herbier.

#### III. 6.2. Utilisation traditionnelle

Cette plante est utilisée traditionnellement par voie orale contre les désordres digestifs, les gastrites, le refroidissement, les arthrites rhumatoïdes, et pour son effet diurétique et aphrodisiaque, elle est également utilisée en cataplasme pour lutter contre le froid, le rhume et l'arthrite rhumatoïde, et en gargarisme contre la laryngite et la pharyngite [200].

### III. 6.3. Travaux antérieurs

Une seule étude a été retrouvée pour cette espèce, dans laquelle 3 coumarines de la famille des psoralènes (furocoumarines) ont été isolées et identifiées : La deltoïne, la (+)-marmésine et la prantschimigine [173].



Nom du composé	R
(+)-marmésine	H
deltoïne	

### III. 7. *Eryngium maritimum* L.

#### III. 7.1. Aspect botanique et répartition géographique

*Eryngium maritimum* est une plante vivace de 30-60 cm, d'un glauque bleuâtre, très épineuse, à souche émettant des stolons souterrains. La tige est dressée et rameuse. Les feuilles sont coriaces, orbiculaires en rein, palmatilobées, à lobes étalés, anguleux, dentés-épineux et les caulinaires moyennes à gaine non épineuse. Les fleurs sont bleuâtres, en grosses têtes subglobuleuses, pédonculées, en ombelle d'ombellules. Les involucre sont bleuâtres, à 4-6 folioles étalées, larges, ovales ou rhomboïdales, coriaces, incisées-épineuses. Les paillettes extérieures sont à 3 épines divergentes. Le calice est fructifère à dents étalées en étoile. Le fruit est un akène obovale, muni d'écailles acuminées (Figure 21) [201]. On la retrouve dans les sables maritimes [89]:

- Aire géographique : dans le monde elle est répartie en Europe, Asie occidentale et Afrique septentrionale [201].
- Synonymes : pas de synonymes connus pour cette espèce [185] .
- Nom commun : panicaut maritime.



Figure 21 : Photo de l'espèce *Eryngium maritimum* (L.). Echantillon collecté en juillet 2014 à Bizerte en Tunisie. En haut à gauche : Aspect général de la plante dans son milieu de collecte, à droite : planche de l'herbier, en bas : Inflorescence

### III. 7.2. Utilisation traditionnelle

L'infusion de parties aériennes et des racines d'*Eryngium maritimum* sont traditionnellement utilisées comme antitussif, diurétique, cytotonique et stimulant de l'appétit. Les racines sont utilisées sous forme de décoction en qualité de diurétique et fébrifuge, ils provoquent également les menstruations, sont un remède contre l'urétrite et suppriment les obstructions du foie, des reins et de la vésicule biliaire [202] [93].

De par le réseau racinaire qu'elle produit, la plante présente un intérêt environnemental majeur car elle contribue à la tenue des dunes sablonneuses, particulièrement sur le littoral breton, aquitain et corse (dune de la plage de l'Ostriconi par exemple) [93].

### III. 7.3. Travaux antérieurs

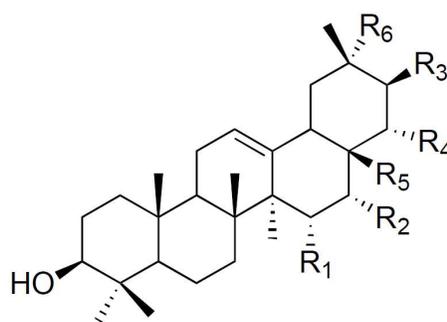
Les travaux concernant *E. maritimum* ont été rapportés par le biais d'une communication par affiche et un article d'étude chimiotaxonomique pour ce qui est de la composition de l'huile essentielle [93] [163]; et à travers trois publications sur les activités anti-inflammatoires, antinociceptive, antimicrobienne et antiradicalaire des extraits des tiges et des racines [199] [203] [204], ces travaux ont montré que les parties aériennes et les racines sont dotées d'un fort pouvoir anti-inflammatoire et anti-nociceptif, cependant les activités antimicrobiennes et anti-radicalaires étaient moins importantes, particulièrement pour les extraits méthanoliques polaires qui étaient moins actifs que les extraits chloroformiques.

Les composés majoritaires de l'huile essentielle d'*E. maritimum* des parties aériennes étudiées sont le germacrène D (43,1 %-42,4 %) et un aldéhyde sesquiterpénique : le 9-murolène-15-aldéhyde (22,4 %-16,4 %) qui est présenté comme un nouveau produit naturel. Les composés majoritaires de l'huile essentielle de racines sont : le  $\gamma$ -guaiène (40,2 %), le 2,3,4-triméthylbenzaldéhyde (24,5 %) et le germacrène D (10,6 %) [163].

Les composés isolés et identifiés de cette espèce sont des triterpénoïdes et des composés phénoliques dont principalement des flavonoïdes [96].

#### Triterpénoïdes

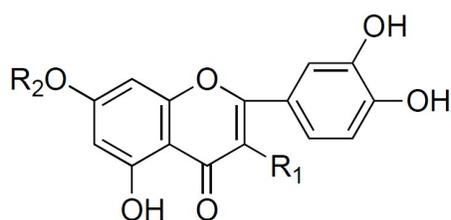
No	Nom du composé
1	R1-barringénol
2	A1-barringénol
3	Barringtogénol C
4	22 $\alpha$ -hydroxyérythrodiol



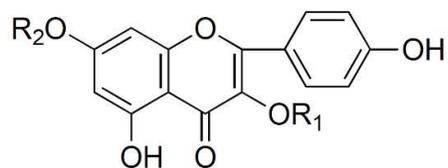
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
1	OH	OH	OH	OH	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>
2	OH	OH	H	OH	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>
3	H	OH	OH	OH	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>
4	H	H	H	OH	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>

## Flavonoïdes

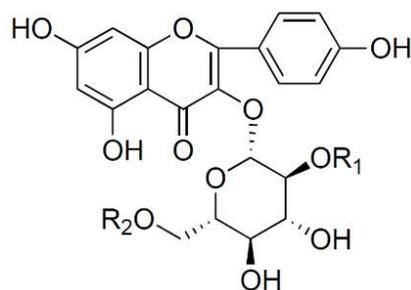
No	Nom du composé
1	Isoquercétine
2	Astragaline
3	Kaempférol 3- $\beta$ -D-glucopyranosyl-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside
4	Kaempférol 3,7-di-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside
5	Kaempférol 3-O- $\beta$ -D-(2 $\beta$ -p-Z-hydroxycinnamoyl)-glucopyranoside



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
1	O- $\beta$ -D-rhamnopyranosyl	H

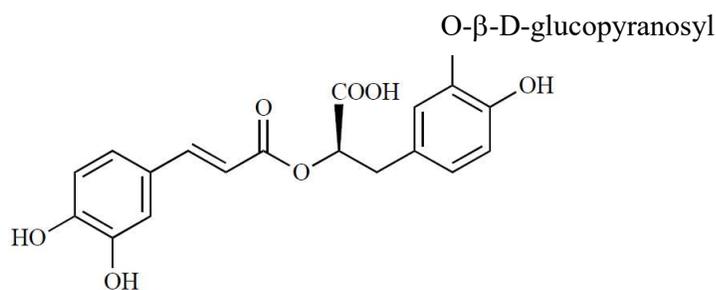


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
2	O- $\beta$ -D-rhamnopyranosyl	H
3	$\beta$ -D-rhamnopyranosyl	$\alpha$ -L-rhamnopyranoside
4	$\alpha$ -L-rhamnopyranoside	$\alpha$ -L-rhamnopyranoside



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
5	p-Z-hydroxycinnamoyl	H

### Composé phénolique



Acide  $\beta$ -D-glucopyranosyl-(+)-3'-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl rosmarinique

## III. 8. *Eryngium barrelieri* Boiss.

### III. 8.1. Aspect botanique et répartition géographique

Plante d'un vert clair, à souche courte terminée par un faisceau de fibres radicales noirâtres. Tige de 10-30 cm dressée, rameuse-dichotome au sommet. Feuilles radicales oblongues-lancéolées, à bord crénelé ou incisé-denté, atténuées en un long pétiole ailé embrassant. Feuilles supérieures sessiles, tripartites, à lobes médian bien plus développé. Fleurs blanches en petits capitules terminaux ou axillaires très serrés. Bractées de l'involucre à folioles linéaires acuminées, épineuses, avec 2 oreillettes à la base. Paillettes entières égalant l'involucre. Calice fructifère à dents étalées (

Figure 22). Fruit ovoïde cylindrique couvert d'écaillés ponctuées. On les retrouve au niveau des Dayas et les dépressions inondées d'hiver [89].

- Aire géographique : Tunisie, Tripolitaine, Algérie, Maroc. Sicile, Italie méridionale, Sardaigne, Corse.

- Synonymes : *E. pusillum* L. [185]
- Nom commun : panicaut nain de Barrelier



Figure 22 : Photo de l'espèce *Eryngium barrelieri* (Boiss.). Echantillon collecté en juin 2014 à El-Hessyane en Tunisie. A gauche : Aspect général de la plante dans son milieu de collecte, A droite : planche de l'herbier.

### III. 8.2. Utilisation traditionnelle

Nous n'avons pas trouvé de données concernant l'utilisation traditionnelle de cette espèce.

### III. 8.3. Travaux antérieurs

A nos connaissances, cette espèce n'as jamais fait l'objet d'études phytochimiques publiées sous ce nom ou le synonyme accepté pour l'espèce (*E. pusillum* L.).

## III. 9. *Eryngium glomeratum* Lamk.

### III. 9.1. Aspect botanique et répartition géographique

Plante d'un vert glauque, à tiges dressées, rigides, de 0,40 à 0,80 m, souvent nombreuses sur la souche. Feuilles caulinaires nombreuses, sessiles, ovales dans leur pourtour, bipennatiséquées à segments linéaires-lancéolés, à dents épineuses. Inflorescence en thyse allongée à nombreux capitules. Involucre à 5 bractées ou moins, linéaires, carénées, entières, égalant 3 à 5 fois les

capitules ovoïdes de 1 cm de large. Paillettes du réceptacle entières (Figure 23). On le retrouve aux infractuosités des rochers et aux lits pierreux des oueds desséchés [89].

- Aire géographique : Syrie, Palestine, Crête, Egypte, Lybie, Tunisie [89].
- Synonymes : Pas de synonymes connus pour cette espèce [185].
- Nom commun : Panicaut aggloméré ; chardon renversé, Shouk el-mag'loub (nom local)



Figure 23 : Photo de l'espèce *Eryngium glomeratum* (Lamk.). Echantillon collecté en août 2014 à Gafsa en Tunisie. A gauche : Aspect général de la plante dans son milieu de collecte, A droite : planche de l'herbier.

### III. 9.2. Utilisation traditionnelle

La décoction des racines d'*E. glomeratum* est utilisée contre les maladies de la peau et les hémorroïdes (usage externe) et contre les calculs rénaux (usage interne) [205].

### III. 9.3. Travaux antérieurs

*Eryngium glomeratum* n'a jamais fait l'objet d'études phytochimiques proprement dites, il existe néanmoins un rapport publié sur l'activité biologique de parties aériennes (extrait à l'hexane et l'acétate d'éthyle), évaluée sur 8 souches microbiennes en utilisant la méthode de

diffusion en disques. Il montre que cette espèce possède une activité antifongique (contre des dermatophytes) modérée (diamètre d'inhibition de 1-10 mm), ce qui confirme son utilisation traditionnelle [206].

# TRAVAUX PERSONNELS

## I. Introduction

La synthèse bibliographique entreprise au début de ce travail de thèse a permis de constater le risque important du phénomène de la résistance microbienne. Par ailleurs, une demande croissante en ingrédients d'origine naturelle a été observée ces dernières années favorisant par conséquent la recherche de nouveaux composés bioactifs. Cette recherche peut prendre plusieurs formes et avoir plusieurs intérêts mais il est courant de voir souligner dans la littérature la nécessité de trouver de nouvelles molécules antimicrobiennes ou de nouvelles pistes thérapeutiques afin de remplacer les antibiotiques et antiseptiques actuels face auxquels les microorganismes ont développé des résistances.

Dans ce contexte, nous nous sommes attachés, à utiliser les différentes méthodologies développées au cours de cette thèse, dans le but de caractériser le pouvoir antimicrobien et phototoxique des *Eryngium* tunisiennes qui avaient été en majorité très peu étudiés jusqu'à présent ; et ceci contre un panel de microorganismes multirésistants. Et d'évaluer, d'autre part, leur pouvoir cytotoxique.

Pour atteindre ces objectifs, l'étude a été réalisée à différents niveaux :

- i. Développer des méthodologies permettant de tester l'activité antimicrobienne et phototoxique qui soient adaptées au criblage de plusieurs échantillons et microorganismes
- ii. Effectuer un criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne à la fois des parties aériennes et des racines des *Eryngium*, étant donné que les connaissances sur les espèces de ce genre se limitaient principalement à l'étude du pouvoir thérapeutique et du contenu phytochimique des parties aériennes, les racines étant très peu étudiées.
- iii. Effectuer une investigation phytochimique et une étude comparative des extraits actifs et corrélérer le pouvoir antimicrobien, phototoxique et cytotoxique de ces extraits à leur contenu phytochimique
- iv. Identifier les molécules majoritaires de la fraction active des racines d'*Eryngium triquetrum* et tester leur pouvoir antimicrobien.

## II. Partie I : Activité biologique et investigation phytochimique des parties aériennes et des racines des *Eryngium* tunisiens

### II. 1. Extraction

Comme décrit dans le chapitre matériel et méthodes, l'extraction a été effectuée par macération, cette méthode d'extraction menée à température ambiante permet d'extraire le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées.

Les parties aériennes et les racines ont été séparées, séchées, réduites en poudre, puis extraites par macération dans des solvants de polarité croissante afin de séparer les composés en fonction de leur polarité. Le système de solvant utilisé est l'éther de pétrole puis le dichlorométhane puis le méthanol, ces solvants vont permettre d'obtenir respectivement pour chaque échantillon un extrait apolaire, un extrait moyennement polaire et un extrait polaire. Chaque extrait obtenu est évaporé à l'évaporateur rotatif pour obtenir des extraits secs (Figure 24).

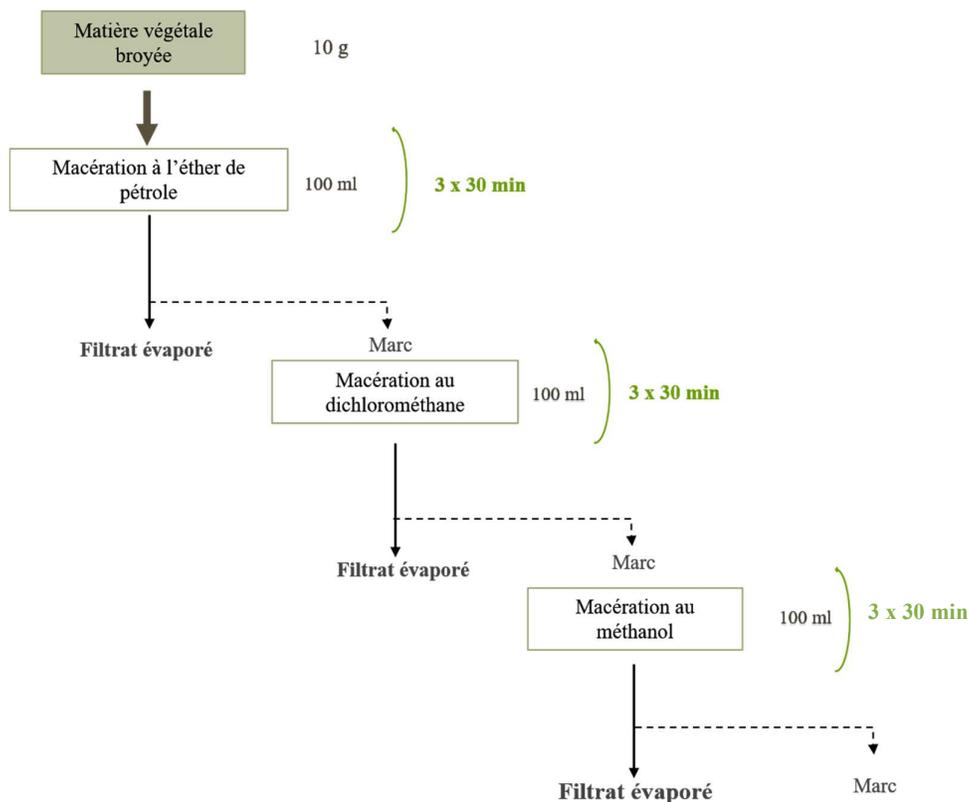


Figure 24 : procédure d'extraction de la drogue sèche des *Eryngium* avec macération

Les extraits récupérés après évaporation à sec et sous pression réduite ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant (Tableau 9).

Tableau 9 : Rendement d'extraction des *Eryngium* par différents solvants (g/100g MS)

Nom de la plante	Solvant	Rendement (%)	
		Racines	Parties aériennes
<i>Eryngium triquetrum</i>	Éther de pétrole	1,5	3
	Dichlorométhane	1,2	2,2
	Méthanol	6	10,2
<i>Eryngium dichotomum</i>	Éther de pétrole	1,1	1
	Dichlorométhane	0,6	0,8
	Méthanol	9,6	6,3
<i>Eryngium tricuspdatum</i>	Éther de pétrole	1,4	1,5
	Dichlorométhane	1,3	1,3
	Méthanol	19,5	15
<i>Eryngium campestre</i>	Éther de pétrole	3,3	2,7
	Dichlorométhane	2	1,7
	Méthanol	20,7	10,7
<i>Eryngium ilicifolium</i>	Éther de pétrole	1,1	3,4
	Dichlorométhane	0,3	2
	Méthanol	7,4	12,3
<i>Eryngium maritimum</i>	Éther de pétrole	4	4,5
	Dichlorométhane	1	2
	Méthanol	24	13
<i>Eryngium barrelieri</i>	Éther de pétrole	2,2	1,1
	Dichlorométhane	1,4	1,3
	Méthanol	12,3	10,8
<i>Eryngium glomeratum</i>	Éther de pétrole	1	1,7
	Dichlorométhane	1	2
	Méthanol	21,5	11,7

Les rendements moyens en extrait à l'éther de pétrole sont compris entre 1 et 4,5 %, cependant les meilleurs rendements ont été obtenus pour le méthanol (6-20,7 %), et ceux du dichlorométhane sont les plus faibles (0,3-2 %). D'autre part, les rendements d'extraction pour les extraits apolaires et moyennement polaires des parties aériennes sont plus élevés pour la plupart des espèces que ceux des racines, contrairement aux extraits méthanologiques.

Les composés qui pourraient contenir les différents extraits préparés selon les données de la littérature sont présentés dans le Tableau 10 :

Tableau 10 : Les principaux composés que pourraient contenir les différents extraits (D'après Ciulei, 1981) [207]

Extraits	Constituants probables
<b>Ether de pétrole</b>	Cires, chlorophylle, lipides, acides gras, stérols, triterpènes, caroténoïdes, huiles essentielles, flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés, coumarines.
<b>Dichlorométhane</b>	Terpénoïdes, polyphénols aglycones (flavonoïdes, coumarines, tanins, anthracenosides), chlorophylle.
<b>Méthanol</b>	Flavonoïdes et coumarines glycosylés, flavonoïdes sulfatés, alcaloïdes, acides aminés, tanins, acides phénoliques, triterpènes et stérols glycosylés

## II. 2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Les différents extraits de plantes ont été testés sur un panel de 36 microorganismes pathogènes multirésistants comprenant 13 bactéries Gram<sup>+</sup>, 22 bactéries Gram<sup>-</sup> et une levure, fournis par le laboratoire de bactériologie clinique (INSERM U 995). Ainsi il a été testé : des bactéries souvent responsables d'infections alimentaires, nosocomiales, cutanées, nasales, respiratoires ou urinaires et de septicémies ; telles qu'*Echerichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Enterococcus faecalis* et une levure, *Candida albicans*, responsable de la candidose ou d'infection cutanée (cf. matériel et méthodes).

Nous avons effectué un criblage initial de l'activité antimicrobienne sur les 36 souches par la méthode de dilution en milieu solide en testant pour les huit espèces (*Eryngium campestre*, *Eryngium dichotomum*, *Eryngium glomeratum*, *Eryngium ilicifolium*, *Eryngium tricuspidatum*, *Eryngium triquetrum*, *Eryngium maritimum*, *Eryngium barrelieri*), deux parties des plantes (racines et parties aériennes), trois solvants d'extraction et cinq concentrations (0,07 ; 0,15 ; 0,3 ; 0,6 ; et 1,25 mg/ml).

Pour les extraits apolaires, des essais préliminaires avec du polypropylène glycol, tween-80, acétone, éthanol et des mélanges acétone-éthanol ont été effectués afin de choisir le meilleur solvant permettant une diffusion optimale de l'extrait dans le milieu gélosé et une répétabilité des résultats. Le mélange acétone-éthanol (1:3) a été sélectionné pour la préparation des solutions initiales, le reste des dilutions a été effectué dans l'éthanol tout en vérifiant l'absence d'activité des témoins acétone-éthanol et de l'éthanol à une concentration de 5 % dans le milieu gélosé.

L'évaluation d'actif antimicrobien est conventionnellement effectuée par la mesure des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits. La CMI correspond à la plus faible concentration en agent actif capable d'inhiber totalement la croissance d'un microorganisme donné.

Les résultats obtenus montrent que toutes les plantes étudiées présentent un potentiel antimicrobien et ceci pour les deux parties des plantes. Les CMI des différents extraits sur les 36 germes ont été déterminées et regroupées dans le Tableau 11.





Si l'on considère l'ensemble de ces résultats, les extraits à l'éther de pétrole et au dichlorométhane (extraits non-polaires) sont beaucoup plus actifs contre les bactéries testées que les extraits méthanoliques (extraits polaires). Ces derniers sont totalement inactifs pour la plupart des plantes testées dans la gamme des concentrations expérimentée. Toutefois, les extraits dichlorométhaniques sont notablement moins actifs que les extraits à l'éther de pétrole.

La bonne activité antibactérienne observée pour les extraits à l'éther de pétrole peut être due à leur richesse en huiles essentielles ; en effet, plusieurs études ont prouvé le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles d'*Eryngium* [208] [164], mais peut être aussi due à la présence d'autres composés apolaires comme les triterpènes, les polyacétylènes ou les coumarines qui ont été également retrouvés dans les extraits apolaires des plantes du genre *Eryngium* [96], soit à un effet synergique entre les différents composés.

D'autre part, les bactéries Gram<sup>+</sup> se sont montrées plus sensibles aux extraits testés que les bactéries Gram<sup>-</sup>, en effet toutes les souches Gram<sup>+</sup> testées étaient sensibles à l'action d'au minimum 2 et au maximum 30 extraits, contrairement aux souches Gram<sup>-</sup> où uniquement 6 souches des 22 bactéries testées se sont avérées sensibles. Ceci peut être dû aux différences des caractéristiques entre les parois des deux types de bactéries, en effet les bactéries Gram négatives possèdent une résistance intrinsèque aux agents antimicrobiens due à la nature de leurs membranes externes. Ces membranes sont composées de lipopolysaccharides formant une barrière imperméable aux composés hydrophobes. Généralement les travaux portant sur la recherche d'activité antibactérienne chez les plantes révèlent une plus forte sensibilité des bactéries à Gram<sup>+</sup> que des bactéries à Gram<sup>-</sup>.

Néanmoins, dans cette étude, les extraits testés sont également efficaces envers les bactéries à Gram<sup>-</sup> : *Acinobacter baumannii* (9010, 9011), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Yersinia pseudotuberculosis* (2777) et *Pseudomonas aeruginosa* (8131, ATCC 27583) multirésistantes.

Parmi les bactéries Gram<sup>+</sup>, *Staphylococcus lugdunensis* était la plus sensible, elle a été inhibée par 31 extraits dont 5 ayant une CMI < 70 µg/ml ; suivie par *Streptococcus agalactiae* inhibée par 24 extraits (4 CMI < 70 µg/ml) ; puis *Staphylococcus epidermidis* qui a été inhibée par 22 extraits dont 4 CMI < 70 µg/ml. Pour les bactéries Gram<sup>-</sup>, *Stenotrophomonas maltophilia* s'est avérée la plus sensible, elle a été inhibée par 27 extraits (13 CMI < 70 µg/ml) suivie par *Yersinia pseudotuberculosis* qui a été sensible à 24 extraits (6 CMI < 70 µg/ml) puis *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583 qui a été inhibée par 13 extraits, à 4 reprises avec des CMI inférieurs à 70 µg/ml.

Par rapport aux 8 espèces étudiées, la plus forte activité antimicrobienne a été obtenue pour *Eryngium tricuspdatum* avec un plus large spectre d'inhibition (20 souches inhibées par les racines et 19 par les parties aériennes) et une plus grande efficacité inhibitrice (13 CMI < 70 µg/ml pour les racines et 7 CMI < 70 µg/ml pour les parties aériennes). Cette espèce est très peu étudiée, une seule publication traite de l'huile essentielle des parties aériennes [164], et dans laquelle l'huile essentielle testée sur 11 bactéries et 2 levures a démontré un effet

antimicrobien intéressant (CMI entre 4,6 et 74 µg/ml) ; les racines de cette plante sont les plus actives mais n'ont jamais été étudiées auparavant.

On trouve en deuxième position, les parties aériennes d'*Eryngium glomeratum* qui étaient actives sur 19 souches, avec 7 CMI < 70 µg/ml. Néanmoins, les racines de cette espèce n'étaient pas fortement actives contre les bactéries testées. Cette espèce n'a jamais fait l'objet d'études phytochimiques, mais les extraits des parties aériennes ont été testés sur des dermatophytes et présentent une activité fongicide modérée.

Par la suite, l'extrait le plus actif était celui des racines d'*Eryngium triquetrum*, qui a inhibé la croissance de 14 souches avec 4 CMI < 70 µg/ml.

Le reste des espèces étudiées présentent une activité intéressante mais relativement modérée ; et sur l'ensemble des résultats, les parties aériennes étaient généralement plus actives que les racines sauf pour *E. triquetrum*, *E. tricuspidatum* et *E. dichotomum*.

## II. 3. Evaluation de l'activité phototoxique des extraits

L'activité phototoxique antimicrobienne représente l'avantage, par rapport aux antibiotiques, de ne pas créer de phénomènes de résistance puisqu'il s'agit d'un processus physique [209].

Dans cette étude nous avons réussi à mettre en place un dispositif simple permettant de mesurer *in-vitro* la capacité photoactive des extraits bruts (cf. matériel et méthodes). Ce dispositif permet d'avoir un criblage rapide des photosensibilisants et de sélectionner des produits naturels pouvant être appliqués dans la thérapie photodynamique antibactérienne (PDTa) qui représente de plus en plus une alternative émergente contre la résistance microbienne [209].

Pour réaliser cette expérience, nous avons choisi de tester les extraits à l'éther de pétrole des parties aériennes et des racines des 8 espèces, étant donné que ces extraits étaient plus actifs que ceux faits au DCM et au MeOH contre les 36 souches multirésistantes.

La lecture des résultats (CMI) des extraits soumis à l'action des irradiations ultraviolettes ainsi que les témoins négatifs des extraits soumis aux mêmes conditions mais sans irradiations a été effectuée en repérant l'absence ou la présence de chaque colonie microbienne dans les boîtes de pétri (Figure 25). Les résultats sont représentés dans le Tableau 12 et le Tableau 13.



Figure 25 : Photo de boîtes de pétri d'un extrait photoactif montrant l'inhibition de certaines souches (cercles bleus dans le témoin négatif) après interaction avec les rayons UV par rapport à un témoin non irradié.

Les témoins de culture et les témoins solvants sans et avec irradiations ne présentent aucune activité inhibitrice sur la croissance microbienne.

Tableau 12 : Activité phototoxique des 8 espèces sur les bactéries à Gram<sup>+</sup>

	B. Gram +												
	<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus. sp</i>	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. warneri</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>S. agalactiae</i>		<i>S. dysgalactiae</i>
	23	24	25	26	27	19	28	29	31	32	33	35	34
<i>E. triquetrum</i>													
R-	0,3	1,25	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,6	0,3	0,3	0,15	0,15	0,15
R+	0,3	1,25	0,3	0,3	<0,07	0,3	0,15	0,3	0,15	0,3	<0,07	<0,07	<0,07
P-					1,25	1,25	1,25		1,25		1,25	1,25	0,6
P+	1,25		0,6	0,6	<0,07	0,6	0,3	0,3	0,6	1,25	<0,07	0,15	<0,07
<i>E. ilicifolium</i>													
R-													
R+					1,25								0,6
P-			0,6	0,6	0,3	0,3	0,6	0,3	0,6	0,6		1,25	1,25
P+	1,25	1,25	0,3	0,3	0,15	0,3	0,15	0,3	0,3	0,3	0,15	0,3	0,15
<i>E. dichotomum</i>													
R-	0,6		0,6	0,6	0,15	0,15	0,15	1,25	0,3	1,25	0,3	0,3	0,15
R+	0,6		0,3	0,3	0,3	0,3	0,15	0,6	0,6	0,6	0,3	0,15	<0,07
P-					1,25		1,25		1,25				1,25
P+			1,25	0,6	1,25	0,6	0,3	1,25	1,25	0,6	1,25		0,3
<i>E. maritimum</i>													
R-							0,15						0,6
R+					0,6	1,25	<0,07	0,6	1,25		0,6	0,6	0,3
P-			1,25	1,25	0,6	0,6	0,15	1,25	0,6				1,25
P+			1,25	1,25	0,6	0,3	0,15	0,6	0,6	1,25	1,25	1,25	1,25
<i>E. campestre</i>													
R-					1,25	1,25	1,25		1,25		1,25	0,6	0,15
R+			1,25	1,25	0,3	1,25	0,6	1,25	1,25		<0,07	0,15	0,15
P-			0,6	1,25	0,3	0,6	0,3	0,6	0,3	1,25	1,25	1,25	1,25
P+	1,25		0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,6	0,6	0,6	0,6
<i>E. barrelieri</i>													
R-						0,6	0,3	1,25				0,3	1,25
R+					1,25	0,6	0,3	1,25			1,25	0,6	1,25
P-	0,3	1,25	0,3	0,3	0,3	0,15	<0,07	<0,07	0,15	0,3	0,15	0,15	
P+	0,3	1,25	0,3	0,3	0,3	0,15	<0,07	<0,07	0,15	0,3	0,15	0,15	
<i>E. tricuspdatum</i>													
R-	0,6		0,6	0,3	0,3	0,15	0,15	0,3	0,15	0,3	0,15	0,15	
R+	0,6		0,3	0,3	0,3	0,15	0,15	<0,07	0,15	0,3	<0,07	<0,07	
P-	0,6		0,15	0,15	0,15	<0,07	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	
P+	0,6		0,15	0,15	<0,07	<0,07	<0,07	<0,07	0,15	0,15	0,15	<0,07	
<i>E. glomeratum</i>													
R-							0,6						
R+					1,25		0,3	1,25					
P-			1,25	0,3	0,3	0,15	0,15	0,3	0,15	0,3	0,3	0,15	
P+	1,25		0,3	0,3	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,3	0,15	0,15	

R- : extraits des racines non irradiés, R+ : extraits des racines irradiés, PA- : extraits des parties aériennes non irradiés, PA+ : extraits des parties aériennes irradiés.

Tableau 13 : Activité phototoxique des 8 espèces sur les bactéries à Gram- et la levure

		B. Gram-																				L	
<i>C. freundii</i>		<i>E. coli</i>			<i>E. aerogenes</i>	<i>E. cloacae</i>			<i>K. pneumoniae</i>		<i>S. marcescens</i>		<i>P. mirabilis</i>	<i>P. stuartii</i>	<i>Salmonella. sp</i>	<i>A. baumannii</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. maltophilia</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>C. albicans</i>	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20	21	22	36	30	
<i>E. triquetrum</i>																							
R-																					0,3	0,3	
R+																					0,3	0,3	
P-																1,25	0,6				1,25	1,25	
P+											1,25					1,25	0,3				<0,07	0,6	
<i>E. ilicifolium</i>																							
P-																1,25	<0,07				0,15	0,3	
P+	1,25	1,25			1,25	1,25			1,25	1,25	1,25	1,25	0,6	1,25	1,25	0,3	<0,07				0,15	0,3	1,25
<i>E. dichotomum</i>																							
R-																	0,3				0,3	1,25	1,25
R+	1,25				1,25	1,25			0,6	1,25	1,25		1,25	1,25		0,3	<0,07				0,3	0,3	0,6
P-																0,3	0,15				0,3	0,15	
P+	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25							1,25			0,3	0,15				0,3	0,3	
<i>E. maritimum</i>																							
R-																							
R+																					1,25		
P-																	0,6				0,3		
P+																	1,25						
<i>E. campestre</i>																							
R-																0,3	0,15				0,15	0,15	
R+																0,6	0,3				0,15	0,3	
P-																1,25	0,6						
P+																0,6	0,3				0,6		
<i>E. barrelieri</i>																							
R-																						1,25	
R+																	1,25				0,15		
P-																1,25					1,25	0,15	0,3
P+																1,25					1,25	0,15	0,3
<i>E. tricuspidatum</i>																							
R-																1,25					0,15	0,15	
R+																1,25			1,25		1,25	<0,07	<0,07
P-																1,25					1,25	0,15	0,15
P+																1,25					0,6	0,15	0,15
<i>E. glomeratum</i>																							
R-																1,25							
R+																1,25							
P-																1,25						0,3	
P+																1,25						0,15	0,6

R- : extraits des racines non irradiés, R+ : extraits des racines irradiés, PA- : extraits des parties aériennes non irradiés, PA+ : extraits des parties aériennes irradiés.

L'irradiation par les rayons UV a permis de réduire d'une manière plus ou moins importante la croissance bactérienne, ce qui indique la présence de composés photosensibilisants (PS) dans les extraits actifs. En effet, *in-vitro*, l'association entre certains photosensibilisants et la lumière peut avoir un effet destructeur sur les microorganismes [210]. Le PS doit pour cela s'accumuler dans la membrane cellulaire du pathogène, voire traverser cette membrane en fonction du type de la membrane bactérienne [211].

Les extraits photoactifs ont agi selon deux types d'actions :

- Elargissement du spectre d'activité : des bactéries qui n'étaient pas sensibles à l'action des extraits sans UV ont été inhibées après l'irradiation de ces derniers, jusqu'à même une inhibition de la majorité des bactéries à Gram<sup>-</sup> particulièrement pour *E. ilicifolium* et *E. dichotomum*.
- Augmentation de l'efficacité inhibitrice : la concentration minimale inhibitrice est devenue alors plus faible sur les mêmes bactéries qui étaient initialement sensibles à l'extrait non irradié.

Dans le premier cas, l'extrait qui présente le plus large spectre d'activité par rapport aux témoins (Figure 26) est celui des parties aériennes d'*E. ilicifolium* : initialement actifs contre 14 souches dont 4 bactéries Gram<sup>-</sup>, il présente après irradiation une activité sur 29 souches dont 15 bactéries à Gram<sup>-</sup>. On trouve par la suite les extraits des parties aériennes et des racines d'*E. dichotomum* suivie par l'extrait des parties aériennes d'*E. triquetrum*.

Aucun changement du spectre d'activité n'a été observé pour les racines d'*E. triquetrum*, les parties aériennes d'*E. barrelieri* et les parties aériennes d'*E. tricuspdatum*.

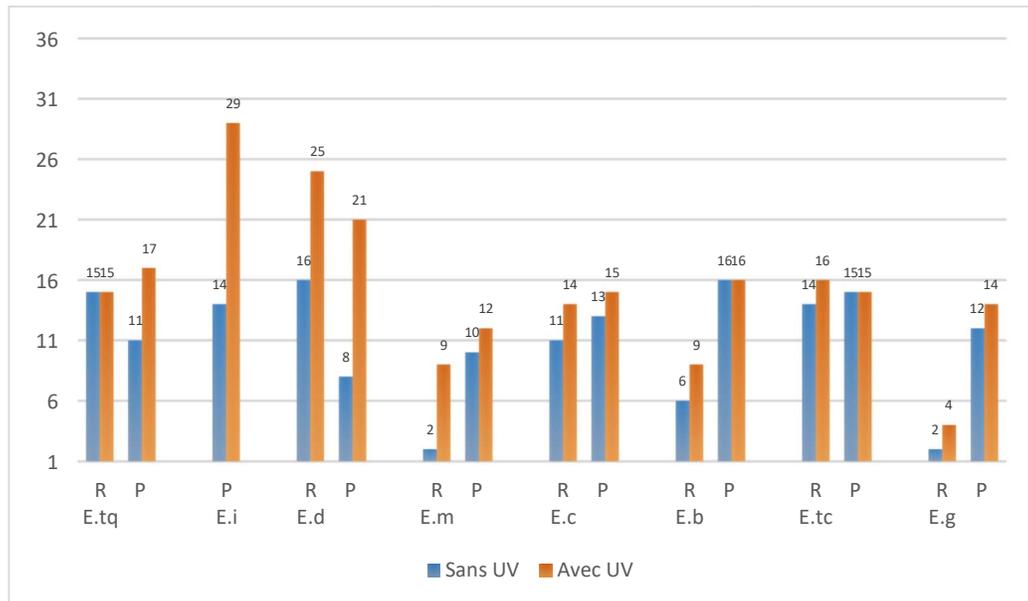


Figure 26 : Spectre d'inhibition photoactive : effet des irradiations UV sur le nombre de souches inhibées. E.tq : *E. triquetrum* ; E.i : *E. ilicifolium* ; E.d : *E. dichotomum* ; E.m : *E. maritimum* ; E.c : *E. campestre* ; E.b : *E. barrelieri* ; E. tc : *E. tricuspdatum* ; E.g : *E. glomeratum* ; R : racines, P : parties aériennes.

L'inhibition des bactéries Gram- par photosensibilisation des extraits et principalement ceux d'*E. ilicifolium* et *E. dichotomum* représente un résultat intéressant, étant donné que les bactéries Gram négatives ont généralement une faible vulnérabilité aux photosensibilisants [74]. En effet, les bactéries à Gram positif comme les Staphylocoques et les Streptocoques, ont une paroi fine avec une enveloppe cellulaire « poreuse » ce qui facilite la liaison avec les photosensibilisants administrés, qu'ils soient neutres, anioniques ou cationiques. À l'inverse, les bactéries à Gram négatif, comme *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, ont une paroi épaisse, peu perméable et une surface membranaire hautement chargée négativement [211] ; seuls certains photosensibilisants cationiques peuvent se lier aux bactéries à Gram négatif et permettre la destruction de la cellule par effet photodynamique [212].

Concernant les espèces fongiques, leur membrane cellulaire offre une perméabilité intermédiaire entre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif [211].

En plus d'un spectre d'action assez large, les photosensibilisants cationiques présentent l'avantage majeur d'avoir une plus grande sélectivité pour les cellules infectées que pour les cellules saines environnantes, ce qui limite le risque de dommages tissulaires collatéraux [213]. Parmi ces PS on trouve essentiellement les porphyrines (comme les protoporphyrines) qui sont responsables de ce type d'activité [211].

Une étude approfondie de ces extraits actifs est alors indispensable, notamment en ce qui concerne leurs compositions chimiques et leurs activités vis-à-vis des bactéries Gram négatifs. Par ailleurs, étant donné que notre étude se limite à des extraits à l'éther de pétrole semble être intéressante dans la mesure où elle permettrait d'attribuer l'effet photosensibilisateur à un groupe déterminé de composés ayant une nature apolaire.

Pour le deuxième type d'action, il s'agit de l'augmentation de l'efficacité inhibitrice. Cette efficacité a été déterminée par le calcul du pourcentage d'inhibition en utilisant la formule suivante [214]:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{CMI(UV -) - CMI (UV+)}{CMI (UV-)} \times 100$$

Les moyennes des pourcentages d'inhibition déterminées pour chaque extrait sont représentées dans la Figure 27 :

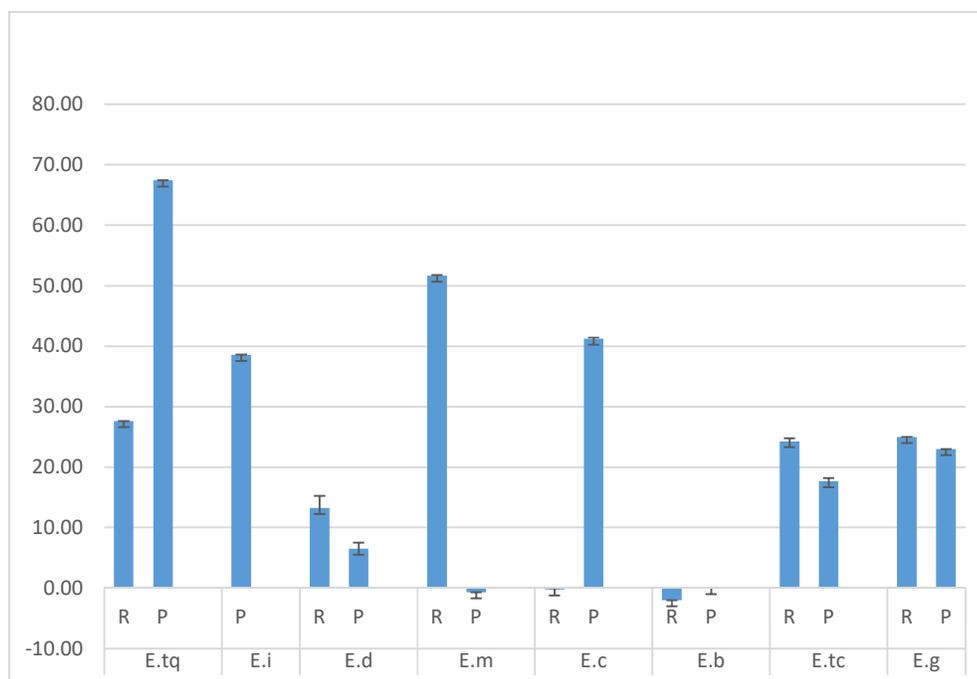


Figure 27 : Pourcentage d'inhibition moyen des extraits irradiés calculé par rapport aux témoins non irradiés. E.tq : *E. triquetrum* ; E.i : *E. ilicifolium* ; E.d : *E. dichotomum* ; E.m : *E. maritimum* ; E.c : *E. campestre* ; E.b : *E. barrelieri* ; E. tc : *E. tricuspdatum* ; E.g : *E. glomeratum* ; R : racines, P : parties aériennes.

D'après ces résultats on remarque que les parties aériennes d'*E. triquetrum* présentent la plus grande efficacité d'inhibition. En effet, le pourcentage d'inhibition a augmenté de 67% par rapports aux témoins sans UV, suivie par les racines d'*E. maritimum* (51,7 %) et les parties aériennes d'*E. campestre* (41,2 %). L'étude des composés présents dans ces extraits s'avère nécessaire et peut ouvrir de nouvelles perspectives pour la compréhension de leurs propriétés.

On remarque aussi qu'il y a des valeurs de pourcentages d'inhibition négatives pour les racines d'*E. barrelieri* et les parties aériennes d'*E. maritimum* dues à la diminution de l'activité par rapport au témoin, ceci pourra s'expliquer par une dégradation des composés actifs suite à leur irradiation.

## II. 4. Evaluation de l'activité cytotoxique des extraits

Pour évaluer l'activité cytotoxique des 8 espèces nous avons testé les extraits à l'EP des parties aériennes sur deux lignées cellulaires :

- J 774, une lignée de macrophages dérivée d'un réticulosarcome de souris : lignée cancéreuse.
- WI-38, lignées diploïdes de fibroblastes pulmonaires humains : lignée normale.

Le Tableau 14 montre les valeurs des  $CI_{50}$  pour les lignées cellulaires tumorales et normales traitées avec les différents extraits ainsi que les indices de sélectivité.

Tableau 14 : Valeurs des  $CI_{50}$  pour les différentes lignées cellulaires après traitement avec les extraits des *Eryngium* : E.m : *E. maritimum*; E.i : *E. ilicifolium* ; E.b : *E. barrelieri*; E.g : *E. glomeratum*; E.tc : *E. tricuspdatum* ; E.tq : *E. triquetrum*; E.d : *E. dichotomum*; E.c : *E. campestre*, et indices de sélectivité.

	<b>CI<sub>50</sub> (WI38- µg/ml)</b>	<b>SD</b>	<b>CI<sub>50</sub> (J774- µg/ml)</b>	<b>SD</b>	<b>Indices de sélectivité</b>
E.m	33,79	4,65	24,46	4,35	1,38
E.i	13,38	0,90	5,30	1,21	2,53
E.b	43,97	7,05	21,65	0,55	2,03
E.g	2,30	0,30	1,11	0,13	2,07
E.tc	1,19	0,12	0,50	0,05	2,39
E.tq	0,86	0,26	0,32	0,05	2,69
E.d	3,92	0,89	1,82	0,43	2,16
E.c	3,92	1,57	1,59	0,22	2,47

Dans cette étude, tous les extraits des parties aériennes des *Eryngium* ont montré une activité cytotoxique inférieure à 30 µg/ml contre la lignée cellulaire tumorale J774, et des indices de sélectivité supérieure à 2, sauf pour *E. maritimum*.

Les données de littérature ont considéré qu'une valeur supérieure ou égale à 2 représente un indice de sélectivité intéressant [215] surtout quand il s'agit d'un extrait brut. Cette valeur signifie qu'un extrait est deux fois plus cytotoxique contre les cellules tumorales en comparaison avec la lignée cellulaire normale [216].

D'autre part, selon l'Institut du Centre National Américain, seuls les extraits avec des  $CI_{50}$  inférieures ou égales à 30 µg/ml contre des lignées cellulaires tumorales expérimentales constituent des agents promoteurs pour le développement de médicaments anticancéreux [215].

En se basant sur ces données, *E. triquetrum* représente l'activité cytotoxique la plus intéressante par rapports aux autres *Eryngium*, avec une  $CI_{50}$  de 0,32 µg/ml et avec l'indice de sélectivité le plus élevé (2,69) vis-à-vis des cellules normales.

Afin de comparer les parties aériennes et les racines, nous avons testé l'extrait à l'EP des racines d'*E. triquetrum* contre les mêmes lignées cellulaires. Les résultats sont représentés dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Valeurs des  $CI_{50}$  pour les différentes lignées cellulaires après traitement avec les extraits des *Eryngium* : E.tq.PA : Parties aériennes d'*E. triquetrum*, E.tq.R : Racines d'*E. triquetrum*, et indices de sélectivité.

	<b>CI<sub>50</sub> (WI38-µg/ml)</b>	<b>SD</b>	<b>CI<sub>50</sub> (J774-µg/ml)</b>	<b>SD</b>	<b>Indice de sélectivité</b>
E.tq.PA	0,86	0,26	0,32	0,05	2,69
E.tq. R	0,26	0,05	0,09	0,01	2,77

Les extraits des racines d'*Eryngium triquetrum* ont montré une plus forte activité cytotoxique avec une  $CI_{50}$  de 0,09  $\mu\text{g/ml}$  contre les cellules tumorales et un indice de sélectivité plus élevé que celui des parties aériennes (2,77) vis-à-vis des cellules normales.

### **III. Partie II : Etude comparative de la variabilité inter et intra spécifique des *Eryngium* tunisiens**

#### **III. 1. Extraction et analyse CPG/SM : choix de méthode**

##### **III. 1.1. Extraction**

Nous avons établi une étude comparative, basée sur la variabilité des composés volatils des extraits actifs (extraits à l'éther de pétrole) des 8 *Eryngium* après extraction par ultrason à courte durée. Le choix de cette méthode est basé sur le fait que les effets mécaniques des ultrasons induisent une perturbation des parois cellulaires ce qui entraîne une plus grande pénétration intraparticulaire du solvant dans les cellules facilitant ainsi la libération rapide de leur contenu et l'accélération de la cinétique d'extraction.

L'efficacité de rupture cellulaire et du transfert de la masse sont les principaux facteurs responsables des bonnes performances de l'extraction par ultrason [217].

Notre but était d'avoir finalement un extrait liquide bien concentré en principes actifs sans avoir recours à une étape de séchage qui peut altérer la composition et /ou changer les proportions relatives de chaque analyte dans l'échantillon à analyser.

Les composés sont donc libérés dans le solvant, il ne s'agit pas d'une huile essentielle mais bien d'un extrait au solvant.

En outre, le profil chromatographique réalisé par CCM des extraits éther de pétrole a montré que ces derniers avaient une composition assez proche de celle des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation (Figure 28). La comparaison entre la composition des extraits éther de pétrole et des huiles essentielles analysés par CPG/MS sera détaillée dans le chapitre IV. 5.1.

Ce procédé d'extraction par ultrason présente un grand intérêt notamment pour l'extraction de composés thermosensibles (même si la composition de l'extrait diffère légèrement de celle de l'huile essentielle).

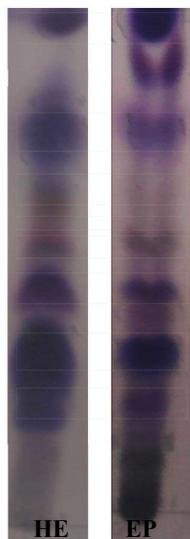


Figure 28 : CCM de l'huile essentielle (HE) et de l'extrait à l'éther de pétrole (EP) des parties aériennes d'*E. glomeratum*. Solvant de migration : Toluène/AcOEt (28,5 : 1,5, V/V), détection : anisaldéhyde sulfurique.

### III. 1.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Pour analyser les extraits obtenus précédemment, plusieurs méthodes analytiques, à haut débit et permettant d'avoir beaucoup d'informations, peuvent être utilisées. Ces méthodes permettent, généralement, de déterminer avec succès la composition chimique des extraits des plantes sans purification préalable des composés. Parmi ces méthodes, nous pouvons citer la chromatographie en phase gazeuse (CPG) qui s'applique essentiellement aux composés volatils ou susceptibles d'être facilement vaporisés par chauffage sans décomposition. La CPG permet de transmettre aux analytes une énergie très importante qui, avec l'ionisation électronique, conduit à une fragmentation très reproductible. Cette reproductibilité a permis de créer des bibliothèques de spectres universelles regroupant les spectres de plus de 100 000 composés (comme celle du National Institute of Standards and Technology (NIST) par exemple), ainsi que l'obtention directe d'informations structurales facilitent leur identification.

Enfin, l'existence des indices de rétention spécifiques à la CPG (relatifs aux temps de rétention des composés ainsi que ceux de la gamme des n-alcanes), facilite également l'identification des composés.

Cependant, l'analyse par CPG/SM nécessite que les analytes soient relativement volatils. En ce qui concerne les composés polaires et peu volatils, il est souvent nécessaire d'effectuer une étape de modification chimique (dérivatisation) afin de les rendre volatils. Pour cette étude, s'agissant d'un extrait apolaire et riche en composés volatils, et en se basant sur les données de la littérature, nous n'avons pas réalisé ce type de traitement, et nous nous sommes juste limités à l'étude des composés volatils contenus dans les extraits. En effet, ce traitement de

l'échantillon est assez contraignant et peut conduire à des réactions de dégradation et la production d'artéfacts (comme l'énolisation d'une cétone suivie de silylation de l'énol par exemple). En même temps, ce traitement peut nuire à l'aspect quantitatif et l'équilibre de la réaction peut être modifié dans certains échantillons, particulièrement pour les extraits apolaires qui sont notamment riches en composés volatils et susceptibles d'être dégradés. D'autre part, le couplage CPG/SM est souvent basé sur l'utilisation de sources à impact électronique qui permettent rarement d'obtenir la masse du composé intact mais seulement d'observer les ions issus de sa fragmentation ; ainsi, l'absence de l'ion moléculaire rend délicate toute identification de composés inconnus ou non décrits dans les bases de données. C'est ainsi que plusieurs travaux ont effectué ce type d'analyse sur des extraits apolaires (n-hexane, dichlorométhane et éther de pétrole) sans avoir recours à un traitement préalable des extraits bruts [218-220].

### **III. 2. Analyse des extraits éther de pétrole des *Eryngium* par CPG/SM**

La récolte des échantillons a été effectuée de mai à août 2014 dans 5 stations appartenant à 4 étages bioclimatiques différentes (Figure 75). L'analyse des composés volatils découle à la fois de l'analyse des spectres de masse des différents composés, de leur comparaison avec ceux disponibles dans les bibliothèques consultées (NIST MAINLIB et replib) et de la détermination des indices de rétentions de tous les composés identifiés et de leur comparaison avec ceux disponibles dans la littérature pour le même type de colonne [221-239]. La teneur d'un composé est exprimée en pourcentage relatif par rapport à l'ensemble des composés analysés par CPG/SM.

Les taux d'identification des composés volatils varient entre 94,3 % et 99,7 %. Nous avons pu identifier au total 83 composés.

#### **III. 2.1. Etude de la composition chimique des extraits des parties aériennes d'*E. dichotomum***

Le matériel végétal a été récolté de mai à juin 2014 sur 4 stations en Tunisie, appartenant à 4 étages bioclimatiques : subhumide (station A), semi-aride à hiver doux (station B), semi-aride à hiver frais (station C), et aride à hiver frais (station D). Les résultats de l'analyse sont représentés dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Composition (%) des quatre extraits de l'*E. dichotomum* analysés par CPG/SM, en gras : >5%.

N°	Composé	IR	Station	Station	Station	Station	Identification
			A	B	C	D	
1	acétate de (+)- cis-chrysanthényle	1260	4	<b>13,8</b>	3,1	4	SM, IR <sub>lit</sub>
2	copaène	1370	3,0	3	4,7	2	SM, IR <sub>lit</sub>
3	(Z)-caryophyllène	1407	3,6	0	2,4	0	SM, IR <sub>lit</sub>
4	$\alpha$ -humulène	1444	1,6	0	0	0	SM, IR <sub>lit</sub>
5	germacrène D	1470	2,8	<b>8,5</b>	<b>13</b>	2,4	SM, IR <sub>lit</sub>
6	valencène	1482	0	4,4	0	0	SM, IR <sub>lit</sub>
7	elixène	1485	<b>26,3</b>	5	<b>12,8</b>	<b>19,8</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
8	$\delta$ -selinène	1490	1,3	<b>12</b>	<b>5,4</b>	5	SM, IR <sub>lit</sub>
9	lédol	1507	<b>19,9</b>	<b>25,7</b>	<b>27,5</b>	<b>40</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
10	$\delta$ -cadinène	1512	2,3	1,1	2,6	2,1	SM, IR <sub>lit</sub>
11	$\delta$ -guaiène	1553	<b>5,5</b>	<b>5,2</b>	<b>7,4</b>	<b>6,4</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
12	spathulenol	1574	<b>8,6</b>	<b>10,5</b>	<b>13,8</b>	<b>8,6</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
13	époxyde d'(E)-farnésène	1640	<b>13,9</b>	<b>6</b>	2,3	<b>6,1</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
14	phytol	1849	<b>6,8</b>	4,5	1,9	3,4	SM, IR <sub>lit</sub>
15	acide n-hexadécanoïque	1990	0	0	2,8	0	SM, IR <sub>lit</sub>
Total identifié			99,6	99,5	99,5	99,7	
Monoterpènes hydrocarbonés			0	0	0	0	
Monoterpènes oxygénés			4	13,8	3,1	4	
Sesquiterpènes hydrocarbonés			46,4	39,2	48,3	37,5	
Sesquiterpènes oxygénés			42,3	42,1	43,6	54,7	
Diterpènes			6,8	4,5	1,9	3,4	
Autres			0	0	2,8	0	

IR : Indice de rétention, déterminé par comparaison des temps de rétention avec ceux d'une gamme d'alcane linéaires.  
 Identification : SM : spectrométrie de masse (mode de fragmentation et comparaison avec des bibliothèques) ; IR<sub>lit</sub> : comparaisons d'indices de rétention avec ceux donnés dans la littérature.

15 composés ont été identifiés. Des sesquiterpènes, en l'occurrence le germacrène D (2,4-13%), l'elixène (5-26,3 %), le  $\delta$ -selinène (1,3-12 %), le lédol (19,9-40 %), le spathulénol (8,6-13,8 %), l'époxyde d'(E)-farnésène (2,3-13,9 %), mais aussi un monoterpène, l'acétate de cis-chrysanthényle (3,1-13,8 %) et un diterpène, le phytol (1,9-6,8%) sont présents dans les extraits d'*E. dichotomum*.

Du point de vue qualitatif, les extraits des échantillons d'*E. dichotomum* récoltés dans les différentes stations sont relativement homogènes. Ces extraits se distinguent entre eux principalement par des variations quantitatives au niveau des composés majoritaires : l'échantillon provenant de la station (A) est plus concentré en elixène (26,3 %) et en époxyde d'(E)-farnésène (13,9 %). L'échantillon provenant de la station (B) est plus riche en acétate de cis-chrysanthényle (13,8 % contre une teneur en ce monoterpène variant de 3,1 % à 4 % pour les autres stations). Nous remarquons aussi que l'échantillon provenant de la station (D) a une bien plus forte concentration en lédol (40 %).

### **III. 2.2. Etude de la composition chimique des extraits des parties aériennes d'*E. campestre***

Le matériel végétal a été récolté de juin à fin juillet 2014 sur 3 stations en Tunisie, appartenant à 3 étages bioclimatiques différents : subhumide (Station A), semi-aride à hiver frais (station C), et aride à hiver frais (station D).

Les résultats des analyses des extraits des parties aériennes sont repris dans le Tableau 17. Au total, 33 composés ont été identifiés ; ces composés représentent de 96,4 % à 98,4 % des composés chimiques « volatils » globaux.

Tableau 17 : Composition (%) des trois extraits d'*E. campestre* analysés par CPG/SM, en gras : >5%.

N°	Composé	IR	Station A	Station C	Station D	Identification
1	acétate de (+)- cis-chrysanthényle	1260	0,1	0,6	0	SM, IR <sub>lit</sub>
2	copaène	1370	0,2	0,3	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
3	(-)- $\beta$ -elemène	1384	0,2	0,2	0,2	SM, IR <sub>lit</sub>
4	$\alpha$ -cedrène	1405	0,1	0,1	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
5	(Z)-caryophyllène	1407	0,1	0,2	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
6	$\alpha$ -trans-bergamotène	1426	0,5	0,3	0,6	SM, IR <sub>lit</sub>
7	$\alpha$ -guaïène	1434	0	0	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
8	$\alpha$ -humulène	1444	0,1	1,3	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
9	$\beta$ -cedrène	1447	0,7	0,6	1,4	SM, IR <sub>lit</sub>
10	$\beta$ -farnésène	1450	0,6	0,5	0,9	SM, IR <sub>lit</sub>
11	germacrène D	1470	1,2	2,9	0,2	SM, IR <sub>lit</sub>
12	$\beta$ -himachalène	1471	4,5	0	<b>6,6</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
13	valencène	1482	0,1	0,6	0	SM, IR <sub>lit</sub>
14	elixène	1485	4,7	2,4	<b>8,3</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
15	$\delta$ -selinène	1490	3,9	5	3,3	SM, IR <sub>lit</sub>
16	germacrène A	1496	0,3	0,3	0,4	SM, IR <sub>lit</sub>
17	$\beta$ -bisabolène	1502	2,8	3,2	2,8	SM, IR <sub>lit</sub>
18	$\gamma$ -cadinène	1505	<b>10,8</b>	<b>8,3</b>	<b>14,8</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
19	lédol	1507	<b>24,1</b>	<b>27,3</b>	<b>20,3</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
20	$\delta$ -cadinène	1512	0,3	0,5	0,2	SM, IR <sub>lit</sub>
21	$\beta$ -sesquiphellandrène	1519	0,1	0,2	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
22	thujopsène	1554	2,2	3	3,4	SM, IR <sub>lit</sub>
23	spathulène	1574	4,6	<b>7,4</b>	4,4	SM, IR <sub>lit</sub>
24	aromadendrène oxide 1	1591	0,2	0,4	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
25	alloaromadendrène	1593	0,8	0,8	1,2	SM, IR <sub>lit</sub>
26	cubénol	1607	<b>16,1</b>	<b>14,6</b>	<b>8,7</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
27	$\beta$ -oplopénone	1632	0,3	0,4	0	SM, IR <sub>lit</sub>
28	$\beta$ -eudesmol	1649	0,2	0,3	<b>6,8</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
29	$\alpha$ -bisabolol	1684	<b>9,7</b>	<b>11,2</b>	<b>10,6</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
30	santalol	1698	2,8	0,8	0	SM, IR <sub>lit</sub>
31	1-hydroxyméthyl-1,1-4a-triméthyl-6-méthylène octahydro naphthalen-2-ol	1723	0	0,5	0	SM, IR <sub>lit</sub>
32	falcarinol	2053	0,3	0,2	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
33	2,9-heptadecadiène-4,6-diyne-8-ol	2110	3,8	1,9	2,1	SM
Total identifié			96,8	96,4	98,4	
Monoterpènes hydrocarbonés			0	0	0	
Monoterpènes oxygénés			0,1	0,5	0	
Sesquiterpènes hydrocarbonés			34,6	30,7	45,2	
Sesquiterpènes oxygénés			58	62,9	50,8	
Autres			4,1	2,2	2,2	

IR : Indice de rétention, déterminé par comparaison des temps de rétention avec ceux d'une gamme d'alcane linéaires. Identification : SM : spectrométrie de masse (mode de fragmentation et comparaison avec des bibliothèques) ; IR<sub>lit</sub> : comparaisons d'indices de rétention avec ceux donnés dans la littérature.

Les profils chromatographiques des échantillons provenant des 3 stations de récolte ont des compositions chimiques similaires, caractérisées par l'abondance de sesquiterpènes oxygénés (50,8-62,9 %) avec comme composés majoritaires le lédol (20,3-27,3%), le cubénoïl (8,7-16,1%), le  $\gamma$ -cadinène (8,3-14,8 %) et l' $\alpha$ -bisabolol (9,7-11,2%). Bien qu'ils soient qualitativement semblables, les échantillons de ces 3 stations diffèrent quantitativement par leurs teneurs en composés majoritaires et minoritaires. L'*E. campestre* de la station (D) est caractérisé par une concentration plus élevée en  $\gamma$ -cadinène,  $\beta$ -eudesmol, elixène et  $\beta$ -himachalène. L'*E. campestre* de la station (C) est plus riche en lédol et spathulénoïl et celui de la station subhumide (A) contient des teneurs plus élevées en cubénoïl.

### III. 2.3. Etude de la composition chimique des extraits des parties aériennes d'*E. ilicifolium*

Le matériel végétal a été récolté en juillet 2014 sur 2 stations en Tunisie, localisées dans 2 étages bioclimatiques différents : semi-aride à hiver frais (station C), et aride à hiver frais (station D).

Les résultats des analyses des extraits des parties aériennes (Figure 29) sont repris dans le Tableau 18. Au total, 16 composés ont été identifiés.

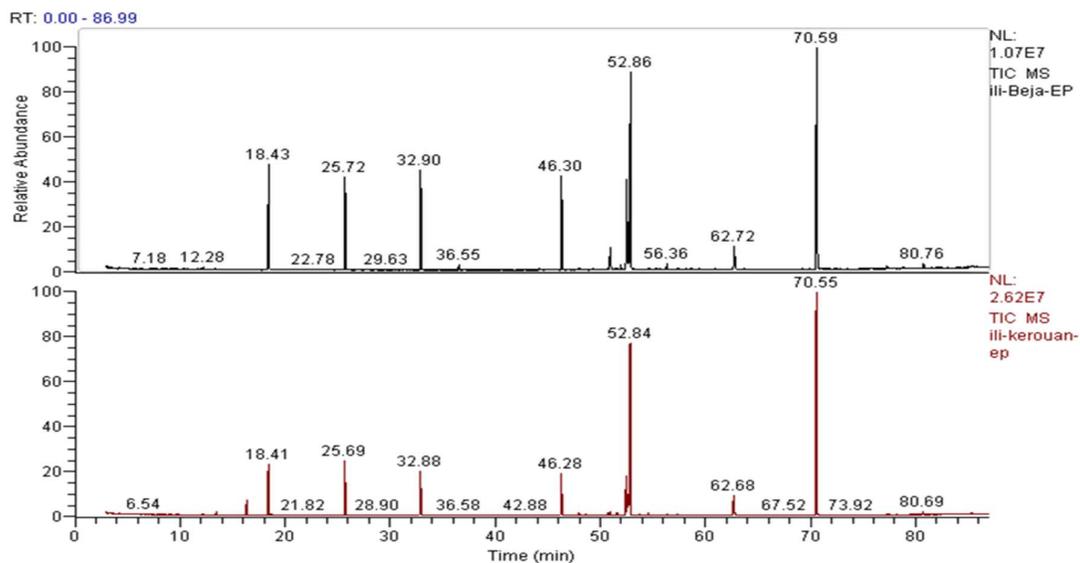


Figure 29 : Chromatogramme de la composition chimique de l'extrait d'*E. ilicifolium*.

Tableau 18 : Composition (%) des trois extraits de l'*E. ilicifolium* analysés par CPG/SM, en gras : >5%.

N°	Composé	IR	Station C	Station D	Identification
1	$\alpha$ -pinène	933	0	0,6	SM, K <sub>lit</sub>
2	$\beta$ -pinène	971	0	2,8	SM, K <sub>lit</sub>
3	acétate de (+)- cis-chrysanthényle	1260	1,4	0	SM, K <sub>lit</sub>
4	copaène	1370	0,2	0	SM, K <sub>lit</sub>
5	daucène	1373	0	0,1	SM, K <sub>lit</sub>
6	$\alpha$ -trans-bergamotène	1426	0	0,8	SM, K <sub>lit</sub>
7	$\beta$ -himachalène	1471	0	0,7	SM, K <sub>lit</sub>
8	elixène	1485	0	0,6	SM, K <sub>lit</sub>
9	$\delta$ -selinène	1490	1	0	SM, K <sub>lit</sub>
10	$\beta$ -bisabolène	1502	3,7	4,4	SM, K <sub>lit</sub>
11	lédol	1507	<b>39</b>	<b>37,8</b>	SM, K <sub>lit</sub>
12	spathuléol	1574	1,4	0,2	SM, K <sub>lit</sub>
13	aromadendrène oxide 2	1662	<b>5,8</b>	4,8	SM, K <sub>lit</sub>
14	cis-Z- $\alpha$ -bisabolène epoxide	1835	<b>45</b>	<b>46</b>	SM, K <sub>lit</sub>
15	acide n-hexadécanoïque	1990	0,8	0	SM, K <sub>lit</sub>
16	falcarinol	2053	1	0,6	SM, K <sub>lit</sub>
Total identifié			99,4	99,3	
Monoterpènes hydrocarbonés			0	3,4	
Monoterpènes oxygénés			1,4	0	
Sesquiterpènes hydrocarbonés			4,9	6,5	
Sesquiterpènes oxygénés			91,3	88,8	
Diterpènes			0	0	
Autres			1,8	0,6	

IR : Indice de rétention, déterminé par comparaison des temps de rétention avec ceux d'une gamme d'alcane linéaires.  
 Identification : SM : spectrométrie de masse (mode de fragmentation et comparaison avec des bibliothèques) ; IR<sub>lit</sub> : comparaisons d'indices de rétention avec ceux donnés dans la littérature

L'étude de la variabilité chimique inter-stations d'*E. ilicifolium* montre une similarité qualitative et quantitative des composés majoritaires. Ces composés sont le cis-Z- $\alpha$ -bisabolène epoxide (45 %, 46 %), le lédol (37,8 %, 39 %), l'aromadendrène oxide 2 (5,8 %, 4,8 %) et le  $\beta$ -bisabolène (3,7 %, 4,4 %). Cependant il existe une différence radicale au niveau de la présence et la teneur en composés minoritaires, ces différences sont principalement d'ordre qualitatif. En effet, sur les 16 composés identifiés, seuls 5 composés sont communs aux extraits des deux stations de récolte.

### III. 2.4. Etude de la composition chimique des extraits des parties aériennes d'*E. glomeratum*

Le matériel végétal a été récolté en août 2014, cette espèce ne pousse que dans le sud tunisien, elle n'a pu être retrouvée que dans une seule station. Cette station appartient à l'étage aride à hiver frais (station E).

Cette espèce n'a jamais fait, à notre connaissance, l'objet d'études phytochimiques.

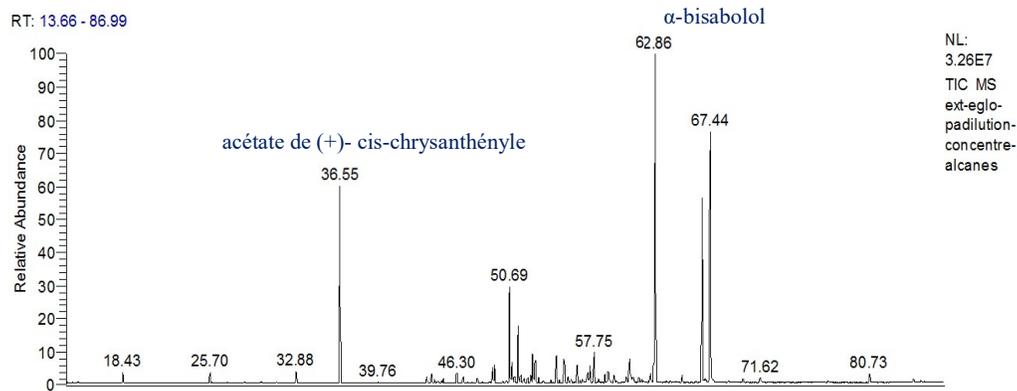


Figure 30 : Chromatogramme de la composition chimique de l'extrait d'*E. glomeratum*

Les résultats des analyses des extraits des parties aériennes (Figure 30) sont repris dans le Tableau 19. Au total, 54 composés ont été identifiés ; ces composés représentent 95,8% des composés chimiques « volatils » globaux de l'extrait à l'éther de pétrole.

Tableau 19: Composition (%) de l'extrait d'*E. glomeratum* analysé par CPG/SM , en gras : >5%.

N°	Composé	IR	Station E	Identification
1	$\alpha$ -pinène	933	0,4	SM, IR <sub>lit</sub>
2	octanal	1001	0,2	SM, IR <sub>lit</sub>
3	( <i>S</i> )-cis-verbénol	1140	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
4	trans-verbénol	1159	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
5	acétate de (+)- cis- chrysanthényle	1260	<b>10,8</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
6	$\alpha$ -cubébène	1347	t	SM, IR <sub>lit</sub>
7	ylangène	1365	0,5	SM, IR <sub>lit</sub>
8	copaène	1370	0,6	SM, IR <sub>lit</sub>
9	daucène	1373	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
10	$\beta$ -bourbonène	1376	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
11	$\tau$ -cadinène	1378	0,2	SM, IR <sub>lit</sub>
12	$\beta$ -cubebène	1382	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
13	(-)- $\beta$ -elemène	1384	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
14	( <i>Z</i> )-caryophyllène	1407	0,5	SM, IR <sub>lit</sub>
15	$\beta$ -copaène	1419	t	SM, IR <sub>lit</sub>
16	$\alpha$ -trans-bergamotène	1426	0,4	SM, IR <sub>lit</sub>
17	$\alpha$ -guaïène	1434	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
18	$\alpha$ -humulène	1444	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
19	$\beta$ -cedrène	1447	0,9	SM, IR <sub>lit</sub>
20	$\beta$ -farnésène	1450	1	SM, IR <sub>lit</sub>
21	germacrène D	1470	<b>5,7</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
22	$\beta$ -selinène	1474	2	SM, IR <sub>lit</sub>
23	$\beta$ -vetivénène	1477	0,6	SM, IR <sub>lit</sub>
24	valencène	1482	3,6	SM, IR <sub>lit</sub>
25	elixène	1485	0,8	SM, IR <sub>lit</sub>
26	$\alpha$ -chamigrène	1489	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>

27	$\delta$ -selinène	1490	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
28	germacrène A	1496	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
29	$\beta$ -bisabolène	1502	1,6	SM, IR <sub>lit</sub>
30	lédol	1507	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
31	$\delta$ -cadinène	1512	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
32	$\beta$ -sesquiphellandrène	1519	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
33	élémol	1546	0,2	SM, IR <sub>lit</sub>
34	$\delta$ -guaïène	1553	2,1	SM, IR <sub>lit</sub>
35	di-epi-cedren oxide	1560	0,4	SM, IR <sub>lit</sub>
36	isoaromadendrène époxyde	1564	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
37	spathuléol	1574	1,2	SM, IR <sub>lit</sub>
38	caryophyllène oxide	1578	0,2	SM, IR <sub>lit</sub>
39	( <i>E</i> )-longipinocarvéol	1589	0,2	SM, IR <sub>lit</sub>
40	aromadendrène oxide 1	1591	0,6	SM, IR <sub>lit</sub>
41	alloaromadendrène	1593	1	SM, IR <sub>lit</sub>
42	carotol	1600	1,8	SM, IR <sub>lit</sub>
43	cubénol	1607	0,4	SM, IR <sub>lit</sub>
44	aristolène epoxide	1615	0,6	SM, IR <sub>lit</sub>
45	isopathuléol	1628	0,6	SM, IR <sub>lit</sub>
46	$\beta$ -eudesmol	1649	1,7	SM, IR <sub>lit</sub>
47	aromadendrène oxide 2	1662	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
48	ledène oxide	1678	0,6	SM, IR <sub>lit</sub>
49	$\alpha$ -bisabolol	1684	<b>21,6</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
50	1-hydroxyméthyl-1,1-4a-triméthyl-6-méthylène octahydro naphthalen-2-ol	1723	0,5	SM, IR <sub>lit</sub>
51	14-oxy- $\alpha$ -muurolène	1752	<b>12,1</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
52	14-hydroxy- $\alpha$ -muurolène	1765	<b>16,1</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
53	acide-n-hexadecanoïque	1990	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
54	falcarinol	2053	0,6	SM, IR <sub>lit</sub>
Total identifié			95,8	
Monoterpènes hydrocarbonés			0,4	
Monoterpènes oxygénés			10,8	
Sesquiterpènes hydrocarbonés			23	
Sesquiterpènes oxygénés			60,5	
Diterpènes			0	
Autres			0,9	

IR : Indice de rétention, déterminé par comparaison des temps de rétention avec ceux d'une gamme d'alcane linéaires.  
 Identification : SM : spectrométrie de masse (mode de fragmentation et comparaison avec des bibliothèques) ; IR<sub>lit</sub> : comparaisons d'indices de rétention avec ceux donnés dans la littérature

L'analyse des résultats montre la richesse d'*E. glomeratum* en composés volatils (54 composés identifiés).

Comme pour les autres *Eryngium*, les sesquiterpènes hydrocarbonés (23%) et oxygénés (60,5%) sont les familles des composés les plus représentées. Les composés majoritaires sont principalement l' $\alpha$ -bisabolol (21,6 %) et le 14-hydroxy- $\alpha$ -muurolène (16,1 %). On remarque aussi la présence d'un monoterpène, l'acétate de cis-chrysanthényle, parmi les composés majoritaires (10,8 %).

### III. 2.5. Etude de la composition chimique des extraits des parties aériennes d'*E. barrelieri*

*Eryngium barrelieri* est une espèce bisannuelle, oligotrophe stricte, et ne pousse que dans les marées (197). Cette espèce n'a jamais fait l'objet d'études phytochimiques antérieures. Nous n'avons pas pu la retrouver que dans une seule station qui appartient à l'étage bioclimatique semi-aride à hiver doux (station B) et la récolte a été effectuée en juin 2014.

Au total, 37 composés ont été identifiés ; ces composés représentent 98,2% des composés chimiques « volatils » globaux de l'extrait. Tous les constituants recensés et leurs abondances relatives sont présentés dans le Tableau 20.

La composition chimique est largement dominée par les 34 sesquiterpènes qui représentent 91,8 % des composés de l'extrait, 33,7 % sont des sesquiterpènes hydrocarbonés et 58,1 % des sesquiterpènes oxygénés. Les composés majoritaires sont le ledene alcool (41,6 %), le  $\beta$ -sélinène (14,9 %), le spathuléol (6,9 %) et l'acétate de cis-chrysanthényle (5,1 %).

Tableau 20 : Composition (%) de l'extrait d'*E. barrelieri* analysé par CPG/SM, en gras : >5%.

N°	Composé	IR	Station B	Identification
1	acétate de (+)- cis-chrysanthényl	1260	<b>5,1</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
2	ylangène	1365	0,2	SM, IR <sub>lit</sub>
3	copaène	1370	0,7	SM, IR <sub>lit</sub>
4	daucène	1373	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
5	$\tau$ -cadinène	1378	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
6	(Z)-caryophyllène	1407	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
7	$\alpha$ -trans-bergamotène	1426	0,5	SM, IR <sub>lit</sub>
8	$\beta$ -cedrène	1447	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
9	$\beta$ -farnésène	1450	0,4	SM, IR <sub>lit</sub>
10	germacrène D	1470	1,2	SM, IR <sub>lit</sub>
11	$\beta$ -selinène	1474	<b>14,9</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
12	$\beta$ -vetivénène	1477	0,2	SM, IR <sub>lit</sub>
13	valencène	1482	1,8	SM, IR <sub>lit</sub>
14	elixène	1485	1,4	SM, IR <sub>lit</sub>
15	$\delta$ -selinène	1490	3	SM, IR <sub>lit</sub>
16	lédol	1507	4,2	SM, IR <sub>lit</sub>
17	$\alpha$ -panasinsène	1507	2,1	SM, IR <sub>lit</sub>
18	$\delta$ -cadinène	1512	1	SM, IR <sub>lit</sub>
19	$\delta$ -guaïène	1553	0,7	SM, IR <sub>lit</sub>
20	di-epi-cedrenoxide	1560	0,6	SM, IR <sub>lit</sub>
21	isoaromadendrene epoxide	1564	0,5	SM, IR <sub>lit</sub>
22	spathulenol	1574	<b>6,9</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
23	(E)-longipinocarvéol	1589	1,1	SM, IR <sub>lit</sub>
24	alloaromadendrène	1593	0,2	SM, IR <sub>lit</sub>
25	calarene epoxide	1608	0,4	SM, IR <sub>lit</sub>
26	aristolene epoxide	1615	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
27	$\beta$ -oplopénone	1632	0,4	SM, IR <sub>lit</sub>
28	$\beta$ -eudesmol	1649	0,8	SM, IR <sub>lit</sub>
29	$\alpha$ -eudesmol	1658	t	SM, IR <sub>lit</sub>
30	$\alpha$ -bisabolol	1684	2,3	SM, IR <sub>lit</sub>
31	14-oxy- $\alpha$ -muurolène	1752	1,4	SM, IR <sub>lit</sub>
32	10-peroxy-murolan-3,9(11)-diène	1764	0,6	SM, IR <sub>lit</sub>
33	Z- $\alpha$ -trans-bergamotol	1770	0,5	SM, IR <sub>lit</sub>
34	cis-Z- $\alpha$ -bisabolène epoxide	1835	0,5	SM, IR <sub>lit</sub>
35	phytol	1849	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
36	acide n-hexadécanoïque	1990	1	SM, IR <sub>lit</sub>
37	ledene alcool	2117	<b>41,6</b>	SM
Total identifié			98,2	
Monoterpènes hydrocarbonés			0	
Monoterpènes oxygénés			5,1	
Sesquiterpènes hydrocarbonés			33,7	
Sesquiterpènes oxygénés			58,1	
Diterpènes			0,3	
Autres			1	

IR : Indice de rétention, déterminé par comparaison des temps de rétention avec ceux d'une gamme d'alcane linéaires. Identification : SM : spectrométrie de masse (mode de fragmentation et comparaison avec des bibliothèques) ; IR<sub>lit</sub> : comparaisons d'indices de rétention avec ceux donnés dans la littérature

### III. 2.6. Etude de la composition chimique des extraits des parties aériennes d'*E. maritimum*

Le matériel végétal a été récolté en juillet 2014, sur 2 stations appartenant aux 2 étages bioclimatiques subhumide (station A) et semi-aride à hiver doux (station B). Les résultats des analyses des extraits des parties aériennes (Figure 31) sont repris dans le Tableau 21. Au total, nous avons identifié 54 composés représentant de 97,4 % à 98 % des composés chimiques « volatils » globaux de l'extrait à l'éther de pétrole.

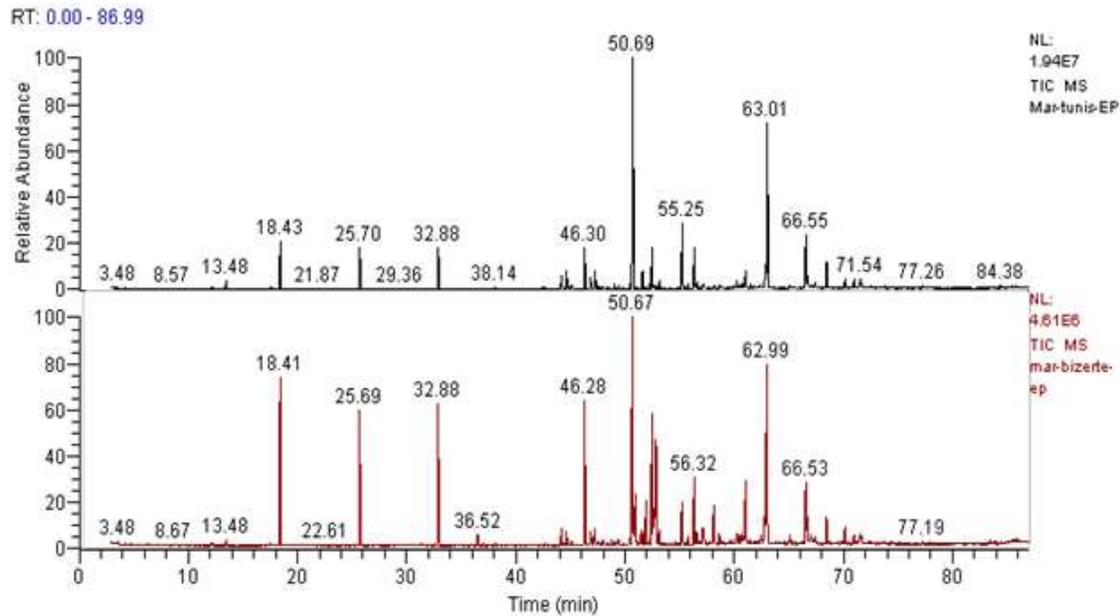


Figure 31 : Chromatogramme des composés volatils de l'extrait d'*E. maritimum*

Cette composition est dominée par les sesquiterpènes, ces composés représentent de 95,8 à 96,1 % de la composition globale. 59,1 % et 60,9 % sont des sesquiterpènes oxygénés et 35,5% et 36,7% sont des sesquiterpènes hydrocarbonés.

Tableau 21 : Composition (%) des trois extraits de l'*E. maritimum* analysés par CPG/SM , en gras : >5%.

N°	Composé	IR	Station A	Station B	Identification
1	$\alpha$ -pinène	933	0,3	0,8	SM, IR <sub>lit</sub>
2	limonène	1024	0	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
3	trans-verbénol	1159	0	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
4	acétate de (+)- cis-chrysanthényle	1260	0,8	0	SM, IR <sub>lit</sub>
5	cis-verbényl acétate	1286	0	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
6	$\alpha$ -cubebène	1347	t	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
7	copaène	1370	1,2	1,3	SM, IR <sub>lit</sub>
8	daucène	1373	0,2	0,2	SM, IR <sub>lit</sub>
9	$\beta$ -bourbonène	1376	1	2	SM, IR <sub>lit</sub>
10	$\tau$ -cadinène	1378	0,1	0,2	SM, IR <sub>lit</sub>
11	$\beta$ -cubebène	1382	0,2	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
12	(-)- $\beta$ -elemène	1384	0,3	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
13	(Z)-caryophyllène	1407	1	1,4	SM, IR <sub>lit</sub>
14	$\beta$ -copaène	1419	0,1	0,2	SM, IR <sub>lit</sub>
15	$\alpha$ -trans-bergamotène	1426	0,3	0,2	SM, IR <sub>lit</sub>
16	$\alpha$ -guaïène	1434	0,1	0,2	SM, IR <sub>lit</sub>
17	$\alpha$ -humulène	1444	0,4	0,4	SM, IR <sub>lit</sub>
18	$\beta$ -cedrène	1447	0,3	0	SM, IR <sub>lit</sub>
19	$\beta$ -farnésène	1450	0,3	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
20	$\nu$ -muurolène	1466	0,4	0,5	SM, IR <sub>lit</sub>
21	germacrène D	1470	<b>15,8</b>	<b>25,8</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
22	$\beta$ -selinène	1474	3,7	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
23	valencène	1482	0,7	0	SM, IR <sub>lit</sub>
24	elixène	1485	1	2	SM, IR <sub>lit</sub>
25	$\alpha$ -chamigrène	1489	0	0,2	SM, IR <sub>lit</sub>
26	$\delta$ -selinène	1490	3	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
27	germacrène A	1496	0,4	0,6	SM, IR <sub>lit</sub>
28	$\beta$ -bisabolène	1502	1,9	0	SM, IR <sub>lit</sub>
29	$\gamma$ -cadinène	1505	2,6	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
30	lédol	1507	<b>7</b>	0	SM, IR <sub>lit</sub>
31	$\delta$ -cadinène	1512	0,8	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
32	$\delta$ -guaïène	1553	3,4	<b>7,7</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
33	di-epi-cedrène oxide	1560	1	0,7	SM, IR <sub>lit</sub>
34	spathulénol	1574	4,7	4,7	SM, IR <sub>lit</sub>
35	caryophyllène oxide	1578	1	0,7	SM, IR <sub>lit</sub>
36	(E)-longipinocarvéol	1589	1	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
37	aromadendrène oxide 1	1591	0,8	0,4	SM, IR <sub>lit</sub>
38	cubénol	1607	0	0,4	SM, IR <sub>lit</sub>
39	calarène epoxide	1608	3,1	0	SM, IR <sub>lit</sub>
40	aristolène époxide	1615	0,9	0,4	SM, IR <sub>lit</sub>
41	cedrandiol, 8S, 13-	1638	0,2	3,2	SM, IR <sub>lit</sub>
42	longicamphenylone	1642	<b>5,5</b>	2,6	SM, IR <sub>lit</sub>
43	aromadendrène oxide 2	1662	0,4	0,5	SM, IR <sub>lit</sub>
45	$\gamma$ -costol	1684	2,8	3	SM, IR <sub>lit</sub>

46	8- hydroxy-cycloisolongifolène	1687	<b>14,1</b>	<b>18,8</b>	SM
47	1-hydroxymethyl-1,1-4a-trimethyl-6-méthylène octahydro naphthalen-2-ol	1723	0,6	0,4	SM, IR <sub>lit</sub>
48	palustrol	1749	4,7	<b>6,5</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
49	14-oxy- $\alpha$ -muurolène	1752	2,2	1,8	SM
50	10-peroxy-murolan-3,9(11)-diène	1764	0,7	1	SM
51	farnesyl methyl ester	1783	2,4	3,6	SM, IR <sub>lit</sub>
53	phytol	1849	0,7	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
54	acide n-hexadécanoïque	1990	0,1	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
Total identifié			98	97,4	
Monoterpènes hydrocarbonés			0,3	0,9	
Monoterpènes oxygénés			0,8	0,2	
Sesquiterpènes hydrocarbonés			35,2	36,7	
Sesquiterpènes oxygénés			60,9	59,1	
Diterpènes			0,7	0,1	
Autres			0,1	0,3	

IR : Indice de rétention, déterminé par comparaison des temps de rétention avec ceux d'une gamme d'alcane linéaires. Identification : SM : spectrométrie de masse (mode de fragmentation et comparaison avec des bibliothèques) ; IR<sub>lit</sub> : comparaisons d'indices de rétention avec ceux donnés dans la littérature

Les composés majoritaires sont le germacrène D (15,8 %-25,8 %), le 8-hydroxy-cycloisolongifolène (14,1 %-18,8 %), le palustrol (4,7 %-6,5 %), le spathuléol (4,7 %) et le  $\delta$ -guaiène (3,4 %-7,7 %).

Les compositions des échantillons des 2 stations de récoltes sont assez proches qualitativement, cependant *E. maritimum* de la station B est caractérisée par une plus grande concentration en composés majoritaires, particulièrement en germacrène D (25,8 %).

### III. 2.7. Etude de la composition chimique des extraits des parties aériennes d'*E. tricuspdatum*

Le matériel végétal a été récolté en août 2014, cette espèce a été retrouvée sur une station appartenant à l'étage subhumide (station A).

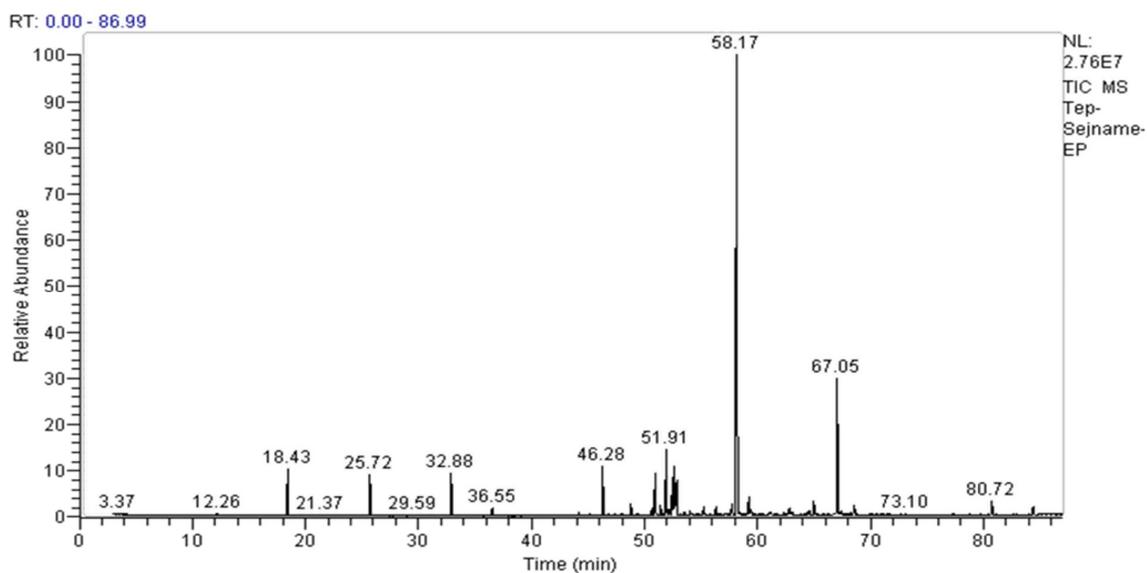


Figure 32 : Chromatogramme de la composition chimique de l'extrait d'*E. tricuspdatum*

La composition de l'extrait d'*E. tricuspdatum* (Figure 32) est particulièrement riche en sesquiterpènes oxygénés (74,8 %) avec comme composés majoritaires le cubénol (48,6%), la longipinocarvone (14,4 %), le  $\delta$ -sélénène (6,9 %) et le  $\beta$ -bisabolène (5,7 %) (Tableau 22).

Tableau 22 : Composition (%) des trois extraits de l'*E. tricuspidatum* analysés par CPG/SM, en gras : >5%.

N°	Composé	IR	Station A	Identification
1	acétate de (+)- cis-chrysanthényle	1260	0,8	SM, IR <sub>lit</sub>
2	copaène	1370	0,2	SM, IR <sub>lit</sub>
3	(-)-β-elemène	1384	0,2	SM, IR <sub>lit</sub>
4	(Z)-caryophyllène	1407	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
5	α-trans-bergamotène	1426	0,2	SM, IR <sub>lit</sub>
6	β-cedrene	1447	0,2	SM, IR <sub>lit</sub>
7	β-farnesène	1450	0,2	SM, IR <sub>lit</sub>
8	germacrène D	1470	1	SM, IR <sub>lit</sub>
9	valencène	1482	1,2	SM, IR <sub>lit</sub>
10	δ-selinène	1490	<b>6,9</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
11	β-bisabolène	1502	<b>5,7</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
12	γ-cadinène	1505	0,9	SM, IR <sub>lit</sub>
13	lédol	1507	3,8	SM, IR <sub>lit</sub>
14	δ-cadinène	1512	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
15	β-sesquiphellandrene	1519	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
16	spathulénol	1574	1	SM, IR <sub>lit</sub>
17	caryophyllène oxide	1578	0,4	SM, IR <sub>lit</sub>
18	aromadendrene oxide 1	1591	0,2	SM, IR <sub>lit</sub>
19	carotol	1600	1,2	SM, IR <sub>lit</sub>
20	cubenol	1607	<b>48,6</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
22	isopathulenol	1628	0,7	SM, IR <sub>lit</sub>
23	α-eudesmol	1658	0,4	SM, IR <sub>lit</sub>
24	viridiflorol	1676	0,4	SM, IR <sub>lit</sub>
25	α-bisabolol	1684	1	SM, IR <sub>lit</sub>
26	1-hydroxymethyl-1,1-4a-trimethyl-6-méthylène octahydro naphthalen-2-ol	1723	1,6	SM, IR <sub>lit</sub>
27	longipinocarvone	1758	<b>14,4</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
28	acide n-hexadécanoïque	1990	0,1	SM, IR <sub>lit</sub>
29	falcarinol	2053	1,6	SM, IR <sub>lit</sub>
30	ledene alcool	2117	1	SM, IR <sub>lit</sub>
Total identifié			94,3	
Monoterpènes hydrocarbonés			0	
Monoterpènes oxygénés			0,8	
Sesquiterpènes hydrocarbonés			7	
Sesquiterpènes oxygénés			74,8	
Diterpènes			0	
Autres			1,8	

IR : Indice de rétention, déterminé par comparaison des temps de rétention avec ceux d'une gamme d'alcane linéaires. Identification : SM : spectrométrie de masse (mode de fragmentation et comparaison avec des bibliothèques) ; IR<sub>lit</sub> : comparaisons d'indices de rétention avec ceux donnés dans la littérature

### III. 2.8. Etude de la composition chimique des extraits des parties aériennes d'*E. triquetrum*

Le matériel végétal a été récolté de mai à fin juin 2014 sur 3 stations, appartenant à 3 étages bioclimatiques différents : subhumide (station A), semi-aride à hiver doux (station B), semi-aride à hiver frais (station C).

15 composés ont été identifiés (Tableau 23) et à la différence des autres *Eryngium*, cette espèce est particulièrement riche en composés non terpéniques notamment le falcarinol (16,7%-28,5%) qui appartient à la famille des polyacétylènes. Toutefois, la composition est principalement dominée par les sesquiterpènes hydrocarbonés (36,2%-50,7 %).

Tableau 23 : Composition (%) des trois extraits de l'*E. triquetrum* analysés par CPG/SM , en gras : >5%.

N°	Composé	IR	Station A	Station B	Station C	Identification
1	acétate de (+)- cis-chrysanthényle	1260	0	<b>12,5</b>	0	SM, K <sub>lit</sub>
2	copaène	1370	<b>7,7</b>	2,2	<b>6,6</b>	SM, K <sub>lit</sub>
3	β-farnésène	1450	2,9	0	0	SM, K <sub>lit</sub>
4	germacrène D	1470	<b>9,1</b>	<b>7,2</b>	<b>13,7</b>	SM, K <sub>lit</sub>
5	β-himachalène	1471	1,7	4,3	0	SM, K <sub>lit</sub>
6	β-selinène	1474	4,2	<b>8,1</b>	4	SM, K <sub>lit</sub>
7	elixène	1485	<b>9,9</b>	3,8	<b>14,4</b>	SM, K <sub>lit</sub>
8	δ-selinène	1490	4,1	<b>6,6</b>	0	SM, K <sub>lit</sub>
9	lédol	1507	<b>9,3</b>	<b>19,3</b>	<b>15,3</b>	SM, K <sub>lit</sub>
10	δ-cadinène	1512	2,4	1,5	3,5	SM, K <sub>lit</sub>
11	δ-guaiène	1553	<b>6,3</b>	2,4	<b>8,4</b>	SM, K <sub>lit</sub>
12	spathulénol	1574	<b>7</b>	<b>7,1</b>	<b>15,6</b>	SM, K <sub>lit</sub>
13	cubénol	1607	2,4	3,5	0	SM, K <sub>lit</sub>
14	acide n-hexadécanoïque	1990	4,1	2,4	0	SM, K <sub>lit</sub>
15	falcarinol	2053	<b>28,5</b>	<b>16,7</b>	<b>18</b>	SM, K <sub>lit</sub>
Total identifié			99,7	97,7	99,6	
Monoterpènes hydrocarbonés			0	0	0	
Monoterpènes oxygénés			0	12,5	0	
Sesquiterpènes hydrocarbonés			48,3	36,2	50,7	
Sesquiterpènes oxygénés			18,7	29,9	30,9	
Diterpènes			0	0	0	
Autres			32,6	19,1	18	

IR : Indice de rétention, déterminé par comparaison des temps de rétention avec ceux d'une gamme d'alcane linéaires.  
 Identification : SM : spectrométrie de masse (mode de fragmentation et comparaison avec des bibliothèques) ; IR<sub>lit</sub> : comparaisons d'indices de rétention avec ceux donnés dans la littérature

Les composés majoritaires sont le falcarinol (16,7 % à 28,5 %), le lédol (9,3 % à 19,3 %), le spathulénol (7 % à 15,6 %), l'elixène (3,8 % à 14,4 %) et le germacrène D (7,2 % à 13,7 %).

Il existe, cependant, une disparité de la composition chimique selon la provenance. Les différences qualitatives notables sont celle d'*E. triquetrum* de la station (B) qui diffère par la présence de l'acétate de cis-chrysanthényle (12,5 %), totalement absent dans les deux autres stations de récolte, et celle d'*E. triquetrum* de la station (C) qui diffère par l'absence de  $\beta$ -himachalène,  $\delta$ -selinène, cubénoïl et acide hexadécanoïque par rapport aux deux autres stations. Les trois stations comportent également des différences quantitatives, principalement dans la teneur en composés majoritaires.

### III. 3. Bilan de l'étude de la composition chimique des extraits des huit espèces et évaluation de la variabilité chimique dans le genre *Eryngium*

A la suite de cette étude réalisée sur les extraits de 8 espèces du genre *Eryngium*, nous avons identifié 83 composés qui représentent 94,3 % à 99,7 % des composés « volatils » totaux des extraits apolaires. Ces 8 *Eryngium* présentent des compositions chimiques relativement proches et sont principalement constituées de sesquiterpènes oxygénés. Le lédol, l'acétate de cis-chrysanthényle, le spathulénoïl, le copaène et le  $\delta$ -selinène sont présents dans toutes les espèces étudiées.

L'objectif de cette étude est d'établir une cartographie, c'est à dire un regroupement des extraits en fonction de leurs compositions afin de définir les échantillons les plus proches chimiquement en prenant en considération un milieu de récolte commun qui est l'ensemble du territoire tunisien.

Une fois les groupes et leur composition fixés, cette étude nous a permis de discerner les principaux facteurs discriminants entre eux.

Pour cela nous nous sommes basés sur les données de 17 échantillons : *E. campestre* (3 échantillons), *E. triquetrum* (3 échantillons), *E. maritimum* (2 échantillons), *E. ilicifolium* (2 échantillons), *E. dichotomum* (4 échantillons), *E. glomeratum* (1 échantillon), *E. barrelieri* (1 échantillon) et *E. tricuspidatum* (1 échantillon).

Ainsi, les variables utilisées pour cette étude (quantités relatives des différents composés chimiques) sont représentées par le pourcentage de chaque composé dans chaque extrait.

Nous avons procédé à une analyse statistique par Classification Hiérarchique Ascendante (CHA) et par Analyse en Composante Principale (ACP).

La CHA a permis d'établir une typologie en 5 classes de 73,7 % de la somme des carrées interclasses ce qui a permis de définir 5 groupes d'échantillons (Figure 33) :

- Groupe 1 : incluant les 2 échantillons d'*E. barrelieri* et d'*E. glomeratum*
- Groupe 2 : contenant l'échantillon d'*E. tricuspidatum*.
- Groupe 3 : constitué par les 2 échantillons d'*E. maritimum*.
- Groupe 4 : constitué par les 3 échantillons d'*E. campestre*.

- Groupe 5 : ce dernier groupe est constitué par les autres échantillons d'*E. triquetrum*, *E. dichotomum* et *E. ilicifolium*.

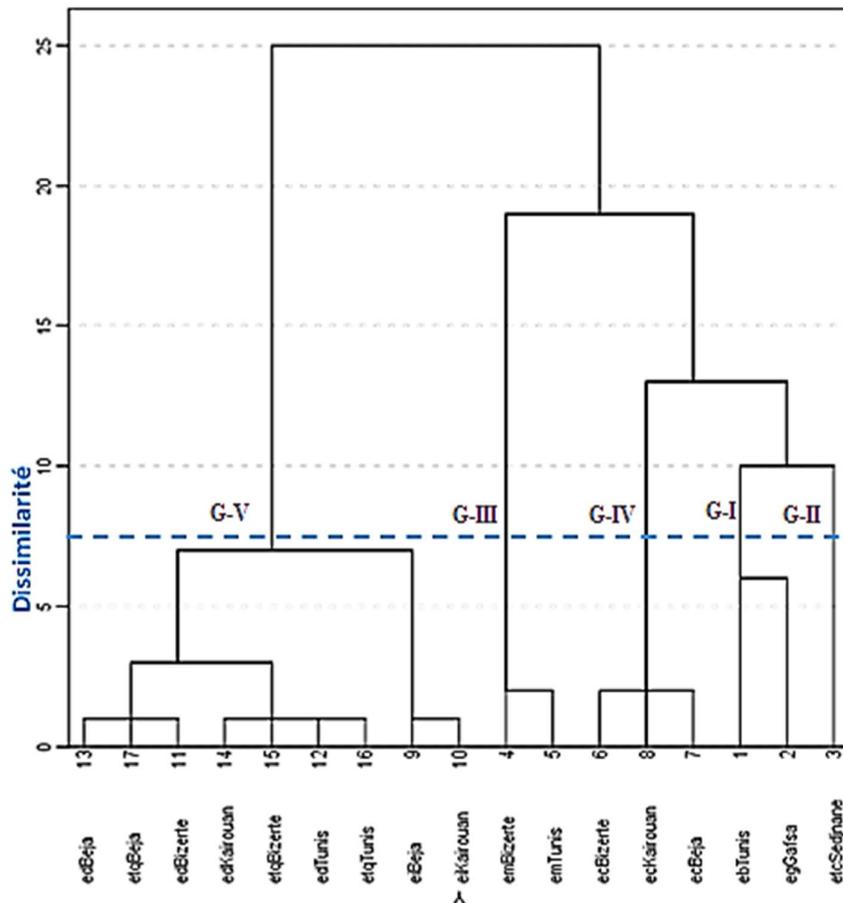


Figure 33 : Dendrogramme des extraits des *Eryngium* de Tunisie en fonction de leurs composés chimiques volatils ; ec (*E. campestre*), em (*E. maritimum*), etc (*E. tricuspidatum*), eb (*E. barrelieri*), ed (*E. dichotomum*), etq (*E. triquetrum*), ei (*E. ilicifolium*), eg (*E. glomeratum*).

Figure 34 La Figure 34 confirme les résultats de la CHA et met en évidence les principales différences d'ordre quantitatif entre les 5 groupes. Les composés discriminants sont : l'acétate de (+)-cis-chrysanthényle, le germacrène D, le  $\beta$ -selinène, le  $\gamma$ -cadinène, le lédol, le cubénol, le E-farnésène epoxide, l' $\alpha$ -bisabolol, le 8-hydroxy-cycloisolongifolène, le 14-oxy- $\alpha$ -muurolène et le longipinocarvone.

Les composés :  $\beta$ -cubébène,  $\alpha$ -cubébène,  $\beta$ -copaène,  $\alpha$ -guaïène,  $\gamma$ -muurolène, 8-hydroxy-cycloisolongifolène,  $\gamma$ -costol, palustrol,  $\beta$ -bourbonène, farnésyl methyl ester, di-epi-cedrénoxyde, aristolène epoxide, caryophyllène oxyde,  $\tau$ -cadinène et aromadendrène oxyde sont fortement et positivement corrélés à l'axe des abscisses de la première composante principale et s'orientent donc dans l'axe F1, ainsi, le pourcentage en ces composés chimiques

évolue selon les coordonnées de cet axe. Les extraits qui ont donc une forte valeur d'abscisse sur l'axe F1 contiennent un pourcentage élevé des composés cités précédemment.

Les composés  $\beta$ -cédrène, alloaromadendrène et  $\alpha$ -bisabolol sont fortement et positivement corrélés à l'axe des ordonnées de la deuxième composante principale (F2), ils seront donc privilégiés pour l'interprétation de l'axe F2. Alors que les composés  $\delta$ -guaiène et  $\delta$ -cadinène sont négativement corrélés avec cet axe. Par conséquent, les échantillons qui ont une forte valeur positive sur l'axe 2 ont un pourcentage important en  $\beta$ -cedrène, alloaromadendrène et  $\alpha$ -bisabolol et un pourcentage faible en  $\delta$ -guaiène, et  $\delta$ -cadinène.

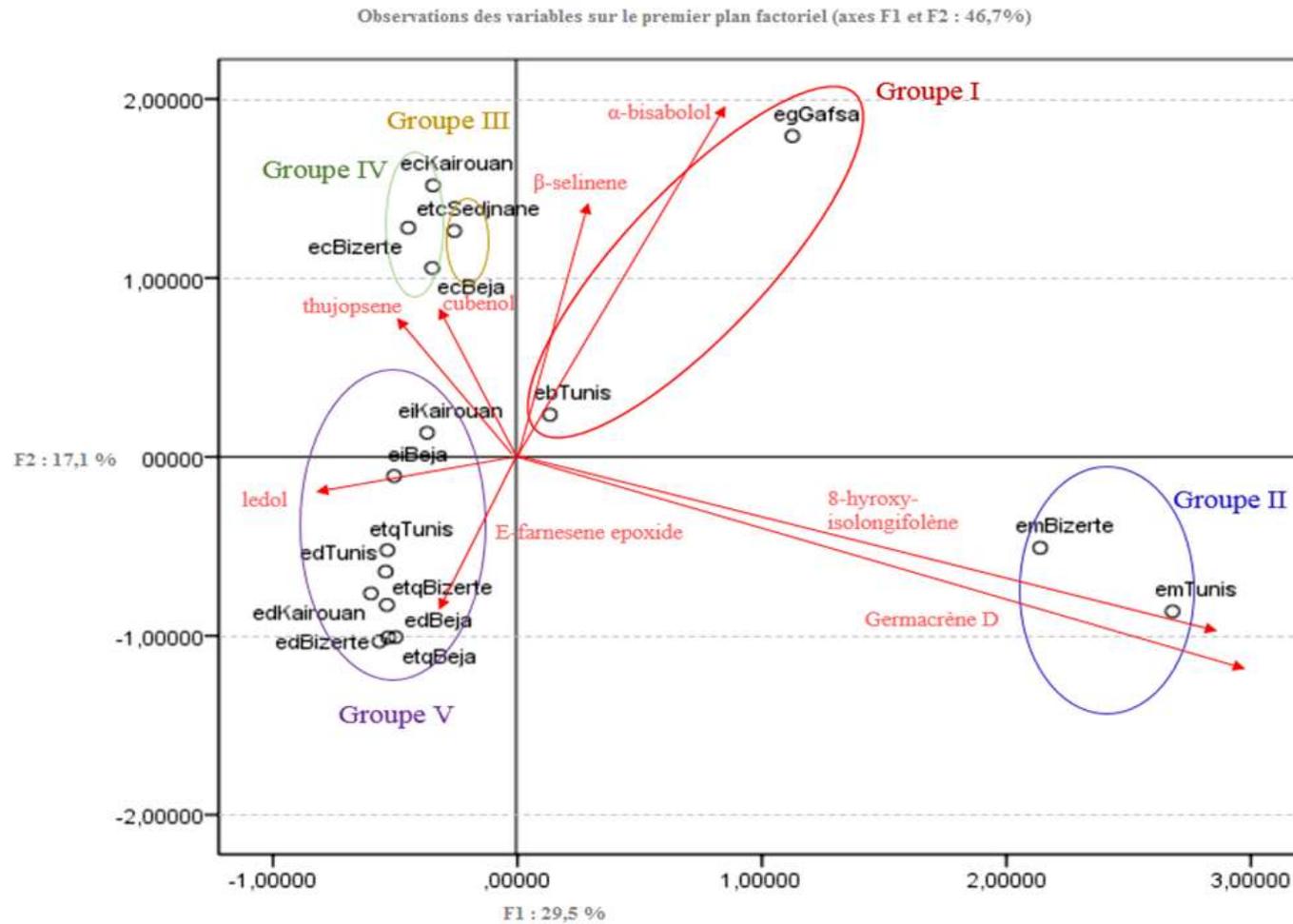


Figure 34 : ACP des compositions chimiques des extraits des *Eryngium* tunisiennes : ec (*E. campestre*), em (*E. maritimum*), etc (*E. tricuspidatum*), eb (*E. barrelieri*), ed (*E. dichotomum*), etq (*E. triquetrum*), ei (*E. ilicifolium*), eg (*E. glomeratum*).

- Le Groupe 1 inclue les 2 échantillons d'*E. barrelieri* et *E. glomeratum*, il est caractérisé par une composition chimique principalement distinguée par des teneurs élevées en acétate de (+)-cis-chrysanthényle (5,11-10,8 %),  $\beta$ -selinène (2,1-14,9 %), l' $\alpha$ -bisabolol (2,3-21,6 %), le 14-oxy- $\alpha$ -muurolène ( 1,41-12,1%) et enfin le ledene alcool (0-41,6%).
- Le Groupe 2 comporte l'extrait d'*E. tricuspidatum* qui est caractérisé par des teneurs en cubénol comme composé majoritaire (48,6 %). Et le longipinocarvone qui représente 14,4 % de sa composition totale.
- Le Groupe 3 est constitué par les 2 échantillons d'*E. maritimum*. Ils sont caractérisés par une plus forte concentration en (E)-farnésène epoxide (15,9-25,8 %), et une présence unique du 8-hydroxy-cycloisolongifolène (14,1-18,8 %) qui caractérise ce groupe et est considéré ainsi parmi les facteurs discriminants entre ce groupe et les autres.
- Le Groupe 4 est constitué par les 3 échantillons d'*E. campestre*. Ce groupe est caractérisé par une présence majoritaire de lédol (20,3-27,3 %), une présence importante en  $\gamma$ -cadinène (8,3-14,8 %). Il contient également 9,7 à 11,2% de germacrène A, et 8,7 % à 16,1 % de cubénol, ces composés sont ainsi considérés parmi les facteurs discriminants de ce groupe et caractérisent uniquement cette classe.
- Le Groupe 5 est constitué par les autres échantillons, c'est-à-dire ceux d'*E. dichotomum*, *E. ilicifolium* et *E. triquetrum*. Ce groupe est caractérisé par une présence majoritaire de lédol (9,3-39 %) et d'acétate de (+)-cis-chrysanthényle (1,4-12,5 %), sans oublier qu'il est le seul à contenir le germacrène D avec une teneur maximale de 13,9 %.

En conclusion il existe 5 groupes d'espèces, différenciées par leurs compositions chimiques, ces groupes appartiennent à une zone géographique définie par l'ensemble du territoire tunisien. *E. dichotomum*, *E. triquetrum* et *E. ilicifolium* sont les plus proches chimiquement, et les compositions chimiques des extraits du groupe 1 (*E. barrelieri*, *E. glomeratum*) et 2 (*E. tricuspidatum*) sont les plus éloignées de la composition chimique des autres espèces.

Il conviendrait, ultérieurement, de mener une étude génétique pour compléter cette analyse chimique et mettre en évidence les différents aspects de cette variabilité.

### **III. 4. Discussion : corrélation entre l'activité biologique et l'investigation phytochimique des extraits des 8 *Eryngium***

Notre étude de l'activité antimicrobienne des différents extraits des 8 *Eryngium*, et particulièrement des parties aériennes de ces espèces, sur les 36 microorganismes multirésistants, a permis de mettre en évidence un intéressant pouvoir antimicrobien des extraits éther de pétrole.

Nous avons, par la suite, analysé la composition chimique des extraits à l'éther de pétrole par CPG/SM. Généralement, les composés volatils, des hydrocarbures à chaîne longue ou ramifiée, des alcools, des acides et des esters peuvent être caractérisés par CPG/SM [240].

Les propriétés pharmacologiques des composés identifiés permettent d'expliquer en partie les activités biologiques observées des extraits éther de pétrole. En effet, la CPG/SM a révélé la forte abondance en composés terpéniques dans l'ensemble des extraits. De nombreuses études rapportent les propriétés antimicrobiennes que possèdent ces composés, et principalement les monoterpènes et les sesquiterpènes, dans l'activité antimicrobienne de nombreux extraits et huiles essentielles [241] [242]. Dans ce travail, parmi les composés terpéniques identifiés, on distingue chez toutes les espèces étudiées une plus forte abondance des composés terpéniques oxygénés (42,4-92,7 %) par rapport aux composés terpéniques hydrocarbonés (4,9-43,7 %).

Les composés terpéniques oxygénés sont des dérivés de terpènes hydrocarbonés possédant des groupes fonctionnels oxygénés, ils sont biosynthétisés par capture de carbocations à partir de molécules d'eau (formation d'un alcool) ou par des réactions d'oxydation catalysées par des oxydases classiques (hydroxylation allylique, oxydation de l'alcool en cétone insaturée, réduction d'une double liaison conjuguée, ...) [110]. Ils peuvent être subdivisés en alcools, esters, aldéhydes, cétones, éthers et phénols. Le géraniol, le menthol, le linalool, le citronellol, le carvone, le thymol, le carvacrol, le géranyl acétate, le géraniol et le 1,8-cinéole sont des exemples de terpènes oxygénés connus et retrouvés dans de nombreuses huiles essentielles et extraits ; ces composés sont dotés d'activités biologiques diverses [243].

Plusieurs auteurs attribuent principalement le fort pouvoir antimicrobien des terpènes aux composés terpéniques oxygénés [244] et particulièrement aux terpènes phénoliques ; en effet, plusieurs études ont montré que les composés terpéniques hydrocarbonés possèdent relativement une plus faible capacité antimicrobienne [245].

L'activité antimicrobienne des terpènes oxygénés est due initialement au caractère hydrophile des groupements fonctionnels (tel que les groupements hydroxyles) qui assurent leur solubilisation dans les milieux physiologiques aqueux ce qui leur permet d'accéder aux cellules microbiennes. D'autre part, le caractère lipophile du squelette hydrocarboné de ces molécules facilite leur insertion entre les phospholipides membranaires et par conséquent leur pénétration dans les parois des cellules microbiennes [245-248].

Les composés terpéniques oxygénés communs entre tous les extraits analysés sont le spathuléol, le lédol et l'acétate de cis-chrysanthényle qui sont présents avec des teneurs variables selon l'espèce. Les terpènes hydrocarbonés communs sont le copaène et le  $\delta$ -sélénène.

Le pouvoir antimicrobien du spathuléol, du lédol (fraction enrichie) et du copaène ont été décrits dans la littérature ; l'activité antimicrobienne du spathuléol a été démontrée contre *Cryptococcus neoformans* et *Enterococcus faecalis* avec une CMI égale à 0,2 mg/ml [249], d'autres études ont montré que ce composé était également actif contre *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* avec des CMI de 1,35 et 1,5 mg/ml respectivement [250] et contre *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis* et *Xanthomonas campestris* avec une CMI de 0,015 mg/ml pour les 3 souches [251]. Une étude réalisée sur une fraction enrichie en lédol (12 %)

a montré une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* avec une CMI de 0,05 mg/ml, *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes* avec une CMI de 0,1 mg/ml, *Enterococcus faecalis* et *Enterobacter aerogenes* avec une CMI de 0,4 mg/ml et *Campylobacter jejuni* avec une CMI de 0,03 mg/ml [36]. L'activité antibactérienne du copaène a été également mise en évidence dans des travaux antérieurs, 100 µg/disque de ce composé ont montré un effet inhibiteur (diamètre d'inhibition de 6 mm) contre *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa* et *Streptococcus pyogenes* et une plus forte activité contre *Staphylococcus aureus* (22 mm d'inhibition) [252].

Parmi les extraits des parties aériennes des 8 *Eryngium* étudiées, celui d'*E. tricuspdatum* a montré la plus forte activité antimicrobienne. Les analyses statistiques descriptives ACP et CHA que nous avons effectué ont montré que cette espèce est la plus éloignée chimiquement des autres *Eryngium*. Le cubénol (48,6 %) et le longipinocarvone (14,4 %) sont les composés discriminatifs entre cette espèce et les autres *Eryngium*. L'activité antimicrobienne du cubénol a été étudiée dans des travaux antérieurs ; Solís et al. (2004) ont montré que ce composé (100 µg/disque) était actif contre *Bacillus subtilis* (9 mm), *Escherichia coli* (6 mm), *Pseudomonas aureginosa* (11 mm), *Staphylococcus aureus* (9 mm) et *Streptococcus pyogenes* (6 mm) [252].

On distingue également la présence de  $\delta$ -selinène (6,9 %) et  $\beta$ -bisabolène (5,7 %) parmi les composés majoritaires d'*E. tricuspdatum*. Une étude récente effectuée sur 14 huiles essentielles a montré que l'activité antimicrobienne de celles-ci a été fortement corrélée à la présence du  $\beta$ -bisabolène ; cette activité inhibitrice a été obtenue contre 10 bactéries dont 4 bactéries Gram positives, *Listeria innocua*, *staphylocoque sp.* à coagulase-négative, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* et 6 bactéries Gram négatives, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* et *Klebsiella oxytoca* [253].

Nous avons également repéré un pouvoir photoactif intéressant des extraits éther de pétrole et particulièrement de ceux d'*E. ilicifolium*, *E. dichotomum* et *E. triquetrum* qui ont montré le plus fort pouvoir photoactif contre les 36 microorganismes pathogènes. Les analyses statistiques descriptives ACP et CHA que nous avons effectué indiquent que les compositions chimiques des 3 espèces sont considérablement proches (Figure 33 et

Figure 34) ce qui leur a permis d'être classées statistiquement dans un seul groupe d'espèces (groupe 5).

L'action conjuguée de ces extraits photoactifs et de la lumière ultraviolette a induit une photoréaction qui a conduit à l'inhibition des colonies bactériennes. Cette photoréactivité est due à la présence de molécules photoactivables. D'une manière générale, plusieurs composés peuvent être à l'origine de cette activité notamment certains composés terpéniques. Des études antérieures ont montré que certains sesquiterpènes oxygénés comme le 2,7-dihydroxycadalène sont dotés d'activité phototoxique contre *Xanthomonas campestris*, une protéobactérie phytopathogène Gram négative [254]. Cette activité a été attribuée à la présence de groupes hydroxyméthyle ainsi que des fonctions cétone [54]. Spikes (1989) a également démontré la capacité des composés ayant des groupes cétoniques à induire une activité phototoxique, cette photoactivité a été également confirmée par Gata-Gonçalves et al. qui ont testé la capacité

phototoxique des composés terpéniques purs ayant une fonction cétone comme le pulégone [54]; dans cette étude l'activité phototoxique d'autres composés terpéniques oxygénés purifiés comme le citronellol et le carvacrol a été également mise en évidence [54]. Par conséquent, l'activité phototoxique antimicrobienne des extraits d'*E. dichotomum*, *E. ilicifolium* et *E. triquetrum* peut être expliquée par la présence de composés terpéniques oxygénés photoréactifs. Les analyses ACP et CHA montrent que des fortes teneurs en lédol et en acétate de (+)-cis-chrysanthényle comptent parmi les facteurs discriminatifs entre ces espèces et les autres *Eryngium*. Bien que l'activité phototoxique de ces deux composés n'ait jamais été décrite dans la littérature, il serait intéressant d'étudier leur comportement vis-à-vis des irradiations ultraviolettes en rapport avec l'activité antimicrobienne.

Cependant, l'activité phototoxique peut être attribuée à d'autres composés photoréactifs qui n'ont peut-être pas été identifiés par CPG/SM et qui peuvent être présents dans les extraits éther de pétrole comme les coumarines, les quinones, les chromènes, les porphyrines, les polyacétylènes et les isoflavonoïdes [54], qui peuvent agir indépendamment ou en synergie.

L'examen des données de la littérature montrent que les plantes du genre *Eryngium* contiennent principalement des saponosides triterpéniques, des flavonoïdes, des monoterpènes glycosylés, des composés phénoliques, des polyacétylènes, de l'huile essentielle, des aldéhydes terpéniques, des oligosaccharides et, plus rarement, des coumarines [96] [255].

La prantschimigine, la déltoïne, et la marmésine, des coumarines de la famille des psoralènes (furocoumarines) ont été auparavant identifiées à partir d'un extrait éthanolique d'*E. ilicifolium* [173]; cependant des furocoumarines n'ont jamais été identifiées chez *E. dichotomum* ou *E. triquetrum*. Les propriétés photodynamisantes des furocoumarines ont été mises en évidence depuis longtemps en photothérapie, et ces composés sont utilisés jusqu'aujourd'hui en puvarthérapie pour traiter certaines affections dermatologiques comme le psoriasis, le vitiligo et les lymphomes cutanés [47-49] et en thérapie photodynamique antibactérienne notamment dans le traitement des parodontopathies [50] et la désinfection des eaux usées [78-81].

D'autre part, de nombreux polyacétylènes ont été identifiés dans le genre *Eryngium*. Dans la plupart des cas, ces composés et les dérivés soufrés qui leur sont biogénétiquement reliés possèdent une activité phototoxique UVA-dépendante particulièrement contre les nématodes, les larves d'insectes et certains champignons, bactéries et virus [110]. L'analyse CPG/SM montre que l'extrait des parties aériennes d'*E. triquetrum* est particulièrement riche en faltarinol (16,7 %), un polyacétylène commun dans la famille des Apiacées, ce qui pourrait expliquer l'activité phototoxique de cet extrait; cependant l'activité phototoxique du faltarinol n'a jamais été étudiée auparavant et il sera intéressant d'envisager une étude de la photoactivité potentielle de ce composé.

L'explication de la relation structure-activité des composés photoréactifs est assez complexe, ces composés ont la propriété d'absorber la lumière (photon,  $h\nu$ ) pour se transformer d'un état stable à un état électronique excité d'énergie supérieure qui est responsable de leur réactivité [256]. Plusieurs critères chimiques, photophysiques et biologiques déterminent l'activité d'un composé phototoxique notamment le spectre d'absorption de la molécule, la nature de sa

photodégradation, son hydrophobicité, sa capacité à produire de l'oxygène singulet et son type de réaction photochimique [54, 256, 257].

Finalement, une forte activité cytotoxique a été observée pour les extraits des parties aériennes et des racines des 8 *Eryngium* contre la lignée cancéreuse de macrophages du réticulosarcome de souris J774. L'activité cytotoxique la plus intéressante a été obtenue pour *E. triquetrum*. La forte teneur en falcarinol dans l'extrait des parties aériennes de cette espèce peut être à l'origine de cette activité. En effet, des études précédentes ont montré que ce composé est hautement et sélectivement cytotoxique contre de nombreuses lignées de cellules cancéreuses [121] avec une plus forte activité contre une lignée d'adénocarcinome gastrique humain (les cellules cancéreuses MK-1) et une  $DE_{50}$  de 0,108  $\mu$ M [122].

### **III. 5. Analyse de l'huile essentielle d'*E. barrelieri* et *E. glomeratum* et étude comparative avec les extraits à l'éther de pétrole**

#### **III. 5.1. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles d'*E. barrelieri* et *E. glomeratum* par CPG/SM**

A notre connaissance, aucune étude phytochimique n'a été effectuée sur les espèces *Eryngium glomeratum* et *Eryngium barrelieri* et il n'existe aucune donnée disponible sur leurs huiles essentielles.

Dans cette partie du chapitre, nous présentons les résultats de notre étude sur les huiles essentielles de ces deux plantes préparées à partir de végétaux récoltés en Tunisie durant leur période de floraison (entre juin et août 2014), et nous nous attarderons sur la comparaison avec les extraits à l'éther de pétrole décrits précédemment.

Le matériel végétal a été hydrodistillé durant 4 heures dans un appareillage de type Clevenger. Le rendement d'extraction était de 0,73 % et 0,11 % respectivement pour les parties aériennes et racines d'*E. glomeratum* et de 0,08 % et 0,02 % respectivement pour les parties aériennes et racines d'*E. barrelieri* par rapport à la masse de végétal sec.

Les huiles essentielles obtenues ont été analysés par CPG/SM. Les résultats détaillés sont présentés dans le Tableau 24.

Comme pour les extraits à l'éther de pétrole, l'identification des composés a été réalisée par la comparaison des spectres de masse des produits des huiles essentielles avec les spectres de masse des bibliothèques commerciales informatisées (NIST MAINLIB et replib), de la détermination des indices de rétentions de tous les composés identifiés et de leur comparaison avec ceux disponibles dans la littérature pour le même type de colonne [221-239].

Tableau 24 : Composition (%) des huiles essentielles d'*E. barrelieri* et *E. glomeratum* analysés par CPG/SM, en gras : >5%.

Composé	IR	E,g, PA	E,g, R	E,b, PA	E,b, R	Identification
$\alpha$ -pinène	933	4,2	0,3	3,2	-	SM, IR <sub>lit</sub>
camphène	945	t	-	-	-	SM, IR <sub>lit</sub>
sabinène	968	t	-	-	-	SM, IR <sub>lit</sub>
$\beta$ -pinène	969	0,8	-	t	-	SM, IR <sub>lit</sub>
( <i>E,E</i> )-cosmène	984	t	-	-	-	SM, IR <sub>lit</sub>
2,4-( <i>E,E</i> )-heptadienal	1007	-	-	t	-	SM, IR <sub>lit</sub>
p-cymène	1018	0,1	-	0,1	-	SM, IR <sub>lit</sub>
limonène	1022	0,1	-	0,1	-	SM, IR <sub>lit</sub>
$\gamma$ -terpinène	1052	t	-	t	-	SM, IR <sub>lit</sub>
$\beta$ -pyronène	1055	-	-	t	-	SM, IR <sub>lit</sub>
terpinolène	1079	t	-	t	-	SM, IR <sub>lit</sub>
2-nonanone	1086	t	-	-	-	SM, IR <sub>lit</sub>
linalool	1095	t	-	-	-	SM, IR <sub>lit</sub>
$\alpha$ -campholenal	1119	0,1	-	0,1	-	SM, IR <sub>lit</sub>
trans-pinocarvéol	1131	t	-	-	-	SM, IR <sub>lit</sub>
d-verbénol	1135	-	-	0,1	-	SM, IR <sub>lit</sub>
( <i>S</i> )-cis-verbénol	1138	0,2	0,1	0,1	-	SM, IR <sub>lit</sub>
trans-verbénol	1143	t	-	t	-	SM, IR <sub>lit</sub>
eucarvone	1149	t	t	0,2	-	SM, IR <sub>lit</sub>
I-2-nonenal	1155	t	-	-	-	SM, IR <sub>lit</sub>
pinocarvone	1157	0,1	-	-	-	SM, IR <sub>lit</sub>
terpinène-4-ol	1172	t	-	t	-	SM, IR <sub>lit</sub>
p-cymen-8-ol	1181	t	-	t	-	SM, IR <sub>lit</sub>
$\alpha$ -terpinéol	1187	t	-	-	-	SM, IR <sub>lit</sub>
décanal	1203	t	-	t	-	SM, IR <sub>lit</sub>
trans-carvéol	1215	t	-	t	-	SM, IR <sub>lit</sub>
$\gamma$ -pyronène	1223	-	-	t	-	SM, IR <sub>lit</sub>
nérol	1224	t	-	-	-	SM, IR <sub>lit</sub>
acétate de (+)- cis-chrysanthényle	1262	<b>27,3</b>	-	-	-	SM, IR <sub>lit</sub>
trans-2-decenal	1265	t	-	0,2	1,7	SM, IR <sub>lit</sub>
thymoquinone	1266	-	0,1	-	-	SM, IR <sub>lit</sub>
2,4-( <i>E,Z</i> )-décadienal	1301	-	-	t	2,3	SM, IR <sub>lit</sub>
2,4,5-triméthylbenzaldéhyde	1309	-	0,8	t	-	SM, IR <sub>lit</sub>
2,4-( <i>E,E</i> )-décadienal	1315	t	t	0,1	2,6	SM, IR <sub>lit</sub>
$\delta$ -élémente	1322	t	t	0,1	-	SM, IR <sub>lit</sub>
$\alpha$ -cubébène	1339	t	t	t	-	SM, IR <sub>lit</sub>
2,4,6-triméthylbenzaldéhyde	1346	t	t	t	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
undec-2-enal	1349	-	-	-	0,7	SM, IR <sub>lit</sub>
ylangène	1351	0,4	0,1	t	-	SM, IR <sub>lit</sub>
copaène	1364	0,9	0,2	1,4	2,2	SM, IR <sub>lit</sub>
daucène	1364	0,2	1,2	1	0,9	SM, IR <sub>lit</sub>
$\beta$ -bourbonène	1376	0,1	-	-	-	SM, IR <sub>lit</sub>
$\tau$ -cadinène	1377	0,1	0,8	0,4	-	SM, IR <sub>lit</sub>
$\beta$ -cubébène	1381	-	-	t	-	SM, IR <sub>lit</sub>
(-)- $\beta$ -élémente	1383	0,4	0,5	0,1	-	SM, IR <sub>lit</sub>
Longifolène	1386	-	-	t	-	SM, IR <sub>lit</sub>
( <i>Z</i> )-caryophyllène	1407	0,3	0,2	0,3	-	SM, IR <sub>lit</sub>
$\beta$ -copaène	1419	0,1	0,1	t	-	SM, IR <sub>lit</sub>

$\gamma$ -elemène	1421	0,1	-	t	-	SM, IR <sub>lit</sub>
$\alpha$ -trans-bergamotène	1426	0,2	0,6	1	0,9	SM, IR <sub>lit</sub>
$\alpha$ -guaiène	1432	t	0,1	-	-	SM, IR <sub>lit</sub>
epi-bicyclo-sesquiphellandrène	1441	-	1,1	-	-	SM, IR <sub>lit</sub>
$\alpha$ -humulène	1443	0,1	-	0,2	-	SM, IR <sub>lit</sub>
$\beta$ -cedrène	1447	0,6	-	-	-	SM, IR <sub>lit</sub>
$\alpha$ -patchoulène	1449	-	-	0,4	0,8	SM, IR <sub>lit</sub>
$\beta$ -farnésène	1449	0,3	1,8	0,6	-	SM, IR <sub>lit</sub>
cis-cadina-1(6),4-diène	1460	0,1	0,2	-	-	SM, IR <sub>lit</sub>
acoradiène	1463	-	-	0,5	<b>10,5</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
germacrène D	1470	4,6	<b>5,1</b>	0,4	-	SM, IR <sub>lit</sub>
$\beta$ -selinène	1474	0,2	-	<b>20,1</b>	1,8	SM, IR <sub>lit</sub>
$\beta$ -vetivénène	1478	-	-	1,1	-	SM, IR <sub>lit</sub>
valencène	1481	0,4	-	0,7	-	SM, IR <sub>lit</sub>
elixène	1484	0,8	-	<b>7,1</b>	-	SM, IR <sub>lit</sub>
$\alpha$ -chamigrène	1488	0,1	-	1	-	SM, IR <sub>lit</sub>
$\delta$ -selinène	1492	-	<b>15,6</b>	0,1	-	SM, IR <sub>lit</sub>
germacrène A	1494	0,3	-	-	-	SM, IR <sub>lit</sub>
(-)- $\alpha$ -panasinsène	1507	-	-	2	-	SM, IR <sub>lit</sub>
$\delta$ -cadinène	1511	0,3	0,3	3	4,3	SM, IR <sub>lit</sub>
$\beta$ -sesquiphellandrène	1518	0,1	0,4	0,3	0,3	SM, IR <sub>lit</sub>
calamenène	1522	-	-	0,2	0,5	SM, IR <sub>lit</sub>
isolongifolène époxide	1543	-	3,4	-	-	SM
elemol	1544	0,2	-	0,2	-	SM, IR <sub>lit</sub>
$\delta$ -guaiène	1551	-	1,7	-	-	SM
di-epi-cedrenoxide	1559	1,2	<b>15,9</b>	<b>18,7</b>	<b>26,5</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
- (-) spathulénol	1573	0,8	-	<b>5,7</b>	-	SM, IR <sub>lit</sub>
caryophyllène oxide	1575	-	0,8	-	0,5	SM, IR <sub>lit</sub>
globulol	1581	-	-	0,7	-	SM, IR <sub>lit</sub>
aromadendrène oxide	1585	1,1	0,7	0,3	-	SM
allo-aromadendrène	1590	0,4	-	0,2	-	SM, IR <sub>lit</sub>
cedrénol	1596	-	-	0,6	1	SM, IR <sub>lit</sub>
carotol	1599	0,7	-	1,5	0,7	SM, IR <sub>lit</sub>
cubénol	1605	-	-	t	-	SM, IR <sub>lit</sub>
calarène époxide	1605	0,4	0,5	-	-	SM
aristolène epoxide	1615	0,8	t	0,3	-	SM
$\gamma$ -eudesmol	1619	0,7	3,4	2,3	4	SM, IR <sub>lit</sub>
iso-spathulénol	1627	1,1	-	-	-	SM, IR <sub>lit</sub>
$\beta$ -oplopénone	1629	0,8	<b>20</b>	<b>10,6</b>	<b>20,3</b>	SM, IR <sub>lit</sub>
$\tau$ -cadinol	1641	-	-	0,2	-	SM, IR <sub>lit</sub>
$\beta$ -eudesmol	1649	2,9	-	1,8	-	SM, IR <sub>lit</sub>
$\alpha$ -eudesmol	1656	-	-	0,2	-	SM, IR <sub>lit</sub>
aromadendrène oxide 2	1661	0,8	-	-	-	SM
$\alpha$ -bisabolol	1685	<b>12</b>	-	-	-	SM, IR <sub>lit</sub>
neoclovène oxide	1686	-	0,5	-	-	SM, IR <sub>lit</sub>
9-hydroxy-isolongifolène	1720	-	4,1	-	-	SM, IR <sub>lit</sub>
14-oxy- $\alpha$ -muurolène	1752	<b>6,1</b>	-	-	-	SM
14-hydroxy- $\alpha$ -muurolène	1768	<b>19,6</b>	-	-	-	SM, IR <sub>lit</sub>
( <i>E,E</i> )-farnésyl acétone	1935	-	-	0,1	-	SM, IR <sub>lit</sub>
acide hexadecanoïque	1993	0,1	0,4	0,5	2,6	SM, IR <sub>lit</sub>
( <i>Z</i> )-falcarinol	2052	0,3	-	t	1,4	SM, IR <sub>lit</sub>
$\delta$ -cadinol	2065	-	-	t	3	SM, IR <sub>lit</sub>

ledene alcool	2117	-	3,4	1,5	2,1	SM
acide octadecanoïque	2137	-	1,2	-	0,5	SM, IR <sub>lit</sub>
Total identifié (%)		94,7	85,9	92,7	92,4	
monoterpenes hydrocarbonés (%)		5,4	0,3	3,6	0	
monoterpenes oxygénés (%)		28,1	0,2	0,7	0	
sesquiterpenes hydrocarbonés (%)		11,2	30,1	42,5	22,2	
sesquiterpenes oxygénés (%)		49,2	52,7	44,8	58,1	
autres composés (%)		0,7	2,5	1,1	12,1	

E.g. : *E. glomeratum* E.b. : *E. barrelieri*, PA : parties aériennes, R : racines, t : trace <0.1 %. IR : Indice de rétention, déterminé par comparaison des temps de rétention avec ceux d'une gamme d'alcane linéaires. Identification : SM : spectrométrie de masse (mode de fragmentation et comparaison avec des bibliothèques) ; IR<sub>lit</sub> : comparaisons d'indices de rétention avec ceux donnés dans la littérature

Les rendements en huiles essentielles des parties aériennes et des racines des deux *Eryngium* sont très faibles (0,02-0,73 %). Notre résultat est conforme aux analyses publiées par d'autres auteurs, indiquant que les *Eryngium* contiennent généralement de faibles quantités d'huiles essentielles [258].

Les 4 huiles essentielles analysées sont dominées par une grande teneur en sesquiterpènes. Sur un total de 85,9 à 94,7 % des composés identifiés, 60,4 à 87,3 % correspondent à des sesquiterpènes, dont 51,3 à 81,4 % du total des sesquiterpènes sont des sesquiterpènes oxygénés. D'une manière générale, les huiles essentielles des plantes du genre *Eryngium* sont plus riches en sesquiterpènes qu'en d'autres types de composés [259].

L'huile essentielle des parties aériennes d'*E. glomeratum* est caractérisée par la présence majoritaire d'un ester monoterpénique, l'acétate de (+)-cis-chrysanthényle (27,3 %) et de deux sesquiterpènes alcool le 14-hydroxy- $\alpha$ -muurolène (19,6 %), et l' $\alpha$ -bisabolol (12 %). D'autres composés à des teneurs supérieures à 1% ont été également détectés, on distingue essentiellement le germacrène D (4,6%), l' $\alpha$ -pinène (4,2 %) et le  $\beta$ -eudesmol (2,9 %).

Les monoterpènes sont quasiment absents dans l'huile essentielle des racines d'*E. glomeratum* (0,5 % de la composition totale). Les composés majoritaires de cette huile essentielle sont tous des sesquiterpènes, principalement oxygénés notamment le  $\beta$ -oplopénone (20 %) et le di-epi-cedrenoxide (15,9 %), et hydrocarbonés dont principalement le  $\delta$ -selinène (15,6 %). Ces composés sont suivis par la présence marquante du germacrène D (5,1 %), du 9-hydroxyisolongifolene (4,1 %), de l'isolongifolène époxyde (3,4 %) et du  $\gamma$ -eudesmol (3,4 %).

L'huile essentielle des parties aériennes d'*E. barrelieri* est caractérisée par la présence majoritaire du  $\beta$ -selinène (20,1 %), un sesquiterpène hydrocarboné, et de deux sesquiterpènes oxygénés, le di-epi-cedrenoxide (18,7 %) et le  $\beta$ -oplopénone (10,6 %). D'autres composés ont été notamment identifiés dont principalement l'elixène (7,1 %), le spathulénol (5,7 %), l' $\alpha$ -pinène (3,2 %) et le  $\delta$ -cadinène (3 %). Contrairement à la composition des parties aériennes d'*E. glomeratum*, la teneur en monoterpènes oxygénés de cette espèce est très insignifiante (0,7 %).

L'huile essentielle des racines d'*E. barrelieri* diffère des autres huiles essentielles par des teneurs plus élevées en composés non-terpéniques (12,1 %). Ces composés sont principalement représentés par l'acide hexadécanoïque, les deux isomères du 2,4-décadiénal et le faltarinol. Les composés majoritaires de cette huile essentielle sont le di-epi-cedrenoxide (26,5 %),  $\beta$ -oplopénone (20,3 %) et l'acoriadiène (10,5 %). D'autres composés ayant une

teneur supérieure à 1 % sont représentés principalement par le  $\delta$ -cadinène (4,3 %), le  $\gamma$ -eudesmol (4 %) et le  $\delta$ -cadinol (3 %).

En référant aux données de la littérature, on trouve que les constituants des huiles essentielles des plantes du genre *Eryngium* se répartissent en trois principaux groupes : le premier groupe est caractérisé par la présence majoritaire en composés non terpéniques oxygénés notamment le triméthylbenzaldéhyde et le (*E*)-2-dodécanal [157, 160, 260-262], le deuxième est essentiellement constitué de composés terpéniques hydrocarbonés comme le germacrène D, l' $\alpha$ -pinène et le phyllocladène [161, 163, 263]. Le 3<sup>ème</sup> groupe est plus rare, il représente les huiles essentielles caractérisées par la prédominance de composés terpéniques oxygénés (alcools ou oxides) comme l'huile essentielle d'*E. bungei* riche en cuminol (55,3 %) et en carvacrol (8,9 %) [264], l'huile essentielle d'*E. pandanifolium* riche en acétate de bornyle (20,8 %) et celles d'*E. rostratum* et *E. tricuspidatum* dominées par l' $\alpha$ -bisabolol (65,3 %) [261]. Les huiles essentielles analysées dans notre étude appartiennent à ce 3<sup>ème</sup> groupe.

Il existe également certaines similitudes entre les composés majoritaires des huiles essentielles d'*E. glomeratum* et *E. barrelieri* analysés dans notre étude, et celles des autres espèces du même genre décrites dans la littérature. Ainsi, l'acétate de cis-chrysanthényle, composé majoritaire de l'huile essentielle des parties aériennes d'*E. glomeratum*, a été aussi identifié comme composé majoritaire dans l'huile essentielle de l'inflorescence d'*E. planum* L. [265], l' $\alpha$ -bisabolol (12% dans l'huile essentielle d'*E. glomeratum*) a été également identifié comme composé majoritaire de l'huile essentielle des parties aériennes d'*E. tricuspidatum* L. [164]. Le  $\beta$ -sélinène, identifié comme composé majoritaire de l'huile essentielle des parties aériennes d'*E. barrelieri* (20,1 %), a été aussi identifié comme l'un des composés majoritaires d'*E. pandanifolium* L. [261]. Les autres composés majoritaires que nous avons identifiés dans les huiles essentielles d'*E. glomeratum* et *E. barrelieri*, n'étaient pas auparavant identifiés comme composés majoritaires des autres huiles essentielles des espèces du genre *Eryngium*. Cependant, le sabinène, le limonène, le caryophyllène oxide, le spathulénol, le germacrène D et le triméthylbenzaldéhyde, que nous avons également identifiés, ont été décrits auparavant comme composés majoritaires chez d'autres espèces du même genre [158, 163, 259,261], ces composés sont significativement présents chez *E. glomeratum* et *E. barrelieri* mais ne sont pas considérés comme composés majoritaires dans notre cas.

Les huiles essentielles d'*E. glomeratum* et *E. barrelieri* montrent une différence notable entre les deux parties analysées (parties aériennes et racines) de chaque espèce :

- Les rendements d'extraction des huiles essentielles des organes souterrains sont beaucoup plus faibles que ceux des parties aériennes.
- Les compositions chimiques des huiles essentielles des parties aériennes sont caractérisées par une plus forte proportion en monoterpènes par rapport aux racines.
- Les racines sont plus riches en sesquiterpènes oxygénés et en composés non-terpéniques que les parties aériennes des deux espèces.

La comparaison des compositions chimiques des huiles essentielles des parties aériennes d'*E. glomeratum* et *E. barrelieri* avec ceux des extraits éther de pétrole décrits dans la section

III.2.4 et III.2.5 montrent certaines variations qualitatives et quantitatives des composés analysés.

Des variations principalement quantitatives ont été observées au niveau des composés majoritaires des deux types d'extraits de chaque espèce : l'huile essentielle d'*E. glomeratum* est plus riche en acétate de cis-chrysanthényle (27,3 %) et en l'alcool sesquiterpénique 14-hydroxy- $\alpha$ -muurolène (19,6 %) que l'extrait éther de pétrole de cette espèce (10,8 et 16,2 % respectivement pour les deux composés) ; cependant, l'extrait éther de pétrole est plus riche en  $\alpha$ -bisabolol (21,6 %) que l'huile essentielle (12 %).

L'huile essentielle d'*E. barrelieri* est plus riche en  $\beta$ -selinène (20,1 %) que l'extrait éther de pétrole (14,9 %) et en élixène (10,6 % contre 1,4 % dans l'extrait EP). La teneur en spathulénol est à peu près équivalente dans les deux extraits. Le di-epi-cédrénoxide, l'un des composés majoritaires de l'huile essentielle d'*E. barrelieri* (18,7 %) est présent en très faible quantité dans l'extrait éther de pétrole (0,6 %).

Dans l'ensemble, les huiles essentielles des deux espèces sont plus riches en monoterpènes hydrocarbonés (3,6-5,4 %) que les extraits à l'éther de pétrole (0-0,4 %). En revanche, les extraits éther de pétrole sont plus riches en sesquiterpènes oxygénés (58,1-60,5 %) que les huiles essentielles (44,8-49,2 %).

### III. 5.2. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*E. barrelieri* et *E. glomeratum*

Nous avons étudié l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*E. barrelieri* et *E. glomeratum* contre les mêmes souches de microorganismes pathogènes testées pour les extraits éther de pétrole par la méthode de dilution en gélose. A cause des rendements faibles en huiles essentielles des racines des deux espèces, seules les huiles essentielles des parties aériennes ont été étudiées pour cette activité.

Les souches utilisées comprennent 13 bactéries Gram<sup>+</sup> : *Corynebacterium sp.* T25-17, *Enterococcus faecalis* C159-6, *E. sp.* 8153, *Mycobacterium smegmatis* 5003, *Staphylococcus aureus* (8146, 8147), *S. epidermidis* (5001, 10282), *S. lugdunensis* T26A3, *S. warneri* T12A12, *Streptococcus agalactiae* (T25-7, T53-C2), *S. dysgalactiae* T46C14), 22 bactéries Gram<sup>-</sup> : *Acinetobacter baumannii* (9010, 9011), *Citrobacter freundii* (11041, 11042), *Enterobacter aerogenes* 9004, *E. cloacae* (11050, 11051, 11053), *Escherichia coli* (8138, 8157, ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* 11016, 11017), *Proteus mirabilis* 11060, *Providencia stuartii* 11038, *Pseudomonas aeruginosa* (8131, ATCC 27583), *Salmonella sp.* 11033, *Serratia marcescens* (11056, 11057), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Yersinia pseudotuberculosis* (2777) et une levure : *Candida albicans* 10286. Nous avons testé 10 concentrations allant de 1250 à 2  $\mu$ g/ml. Les résultats sont représentés dans le Tableau 25.

Tableau 25 : Activité antimicrobienne des huiles essentielles des parties aériennes d'*Eryngium glomeratum* Lamk. et *Eryngium barrelieri* Boiss.

Nom des souches	CMI des huiles essentielles ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		Témoin solvant	Antibiotiques			
	E.g. AP	E.b. AP		G	V	A	Amph
<b>Bactéries Gram<sup>-</sup></b>							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 8131	9	19	-	S	R	R	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27583	<2	9	-	R	R	R	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<2	9	-	S	R	R	-
<b>Bactéries Gram<sup>+</sup></b>							
<i>Corynebacterium sp</i> T25-17	78	-	-	S	S	S	-
<i>Enterococcus faecalis</i> C159-6	312	-	-	R	R	R	-
<i>Mycobacterium smegmatis</i> 5003	312	-	-	S	S	S	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 8147	312	-	-	S	S	S	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 5001	78	625	-	S	S	S	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 10282	156	39	-	S	S	S	-
<i>Staphylococcus lugdunensis</i> T26A3	78	156	-	S	S	S	-
<i>Staphylococcus warneri</i> T12A12	156	625	-	S	R	S	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> T25-7	19	156	-	R	R	R	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> T53 C2	<2	156	-	R	R	R	-
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> T46C14	39	625	-	R	R	R	-
<b>Levure</b>							
<i>Candida albicans</i> 10286	156	625	-	-	-	-	S

CMI : concentration minimale inhibitrice ( $\mu\text{g/ml}$ ), E.g. : *Eryngium glomeratum* ; E.b. : *Eryngium barrelieri* ; AP : parties aériennes, G : Gentamicine, V : Vancomycine, A : Amoxicilline, Amph : Amphotericine B. CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) des antibiotiques : Gentamicine, S :  $\leq 4$ , R :  $> 8$  ; Vancomycine, S :  $\leq 4$ , R :  $> 16$  ; Amoxicilline, S :  $\leq 4$ , R :  $> 16$  ; Amphotericine B, S :  $\leq 1$ , R :  $> 4$ .

Les deux huiles essentielles étaient globalement plus actives contre les bactéries Gram<sup>+</sup> que les bactéries Gram<sup>-</sup>. Néanmoins, elles présentent une forte activité spécifique contre les deux souches de *Pseudomonas aeruginosa* testées et une activité intéressante contre *Stenotrophomonas maltophilia*.

Cette activité est très intéressante étant donné que *P. aeruginosa* est une bactérie virulente naturellement résistante aux antibiotiques ; de plus, cette bactérie est rarement inhibée par les extraits des plantes ou les huiles essentielles [266].

L'huile essentielle d'*E. glomeratum* a montré une plus forte activité antimicrobienne (15 bactéries inhibées dont 3 CMI  $< 2 \mu\text{g/ml}$ ) que celle d'*E. barrelieri* (11 bactéries inhibées).

Comme pour les extraits éther de pétrole, les huiles essentielles d'*E. barrelieri* et *E. glomeratum* sont dominées par les composés terpéniques oxygénés ce qui pourra expliquer la forte activité antimicrobienne de ces deux huiles essentielles.

La comparaison de l'activité antimicrobienne des extraits éther de pétrole d'*E. barrelieri* et *E. glomeratum* à celle des huiles essentielles montre une plus forte activité de l'huile essentielle d'*E. glomeratum* contre *S. agalactiae* T25-7, *C. albicans*, *Corynebacterium sp* T25-17 et *E. faecalis* C159-6. Cependant, l'extrait EP d'*E. glomeratum* révèle une activité plus importante contre *S. aureus* 8147 et *M. smegmatis* 5003.

L'huile essentielle d'*E. barrelieri* était plus active contre *S. epidermidis* 5001, *S. maltophilia* et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583 que l'extrait EP. Tandis-que ce dernier a exhibé une plus forte inhibition des souches de *Streptococcus dysgalactiae* T46C14.

Finalement, les extraits éther de pétrole des deux espèces ont montré un plus large spectre d'activité antimicrobienne : 19 bactéries ont été inhibées par l'extrait d'*E. glomeratum* contre 15 bactéries inhibées par l'huile essentielle et 13 bactéries ont été inhibées par l'extrait d'*E. barrelieri* contre 11 bactéries inhibées par son huile essentielle.

L'ensemble des résultats révèle une plus forte activité antimicrobienne des extraits éther de pétrole par rapport à celle des huiles essentielles d'*E. glomeratum* et *E. barrelieri*. Ceci peut être expliqué par la plus forte abondance en sesquiterpènes oxygénés dans les extraits EP (58,1-60,5 %) par rapport aux huiles essentielles (44,8-49,2 %) ; en effet, de nombreuses études ont montré que les sesquiterpènes oxygénés sont responsables à de nombreuses activités biologiques et pharmacologiques intéressantes, notamment un fort pouvoir antimicrobien [267].

## **IV. Partie III : Etude phytochimique des racines d'*Eryngium triquetrum***

### **IV. 1. Introduction : Choix de la plante et résumé du criblage de l'activité biologique**

L'espèce *Eryngium triquetrum* Vahl. a retenu notre attention en premier lieu pour ses utilisations traditionnelles dans le traitement des affections digestives, dermatologiques et microbiennes, contre les infections ORL, la typhoïde, les amygdalites, les infections urinaires, les inflammations, et pour la cicatrisation des plaies, et les ascites [188]; et en second lieu, en raison du peu de travaux phytochimiques répertoriés sur elle.

Lors du criblage d'activités pharmacologiques, détaillé dans la partie II.2, nous avons constaté que l'extrait à l'éther de pétrole de cette plante possède un fort pouvoir antimicrobien et cytotoxique avec un indice de sélectivité plus élevé par rapport aux autres *Eryngium*.

Les racines de cette espèce ont montré un pouvoir antimicrobien (inhibition de 14 souches dont 4 CMI < 70 µg/ml) et cytotoxique (CI<sub>50</sub> = 0,09 µg/ml) supérieur à celui des parties aériennes.

N'ayant jamais fait *à priori* l'objet d'études phytochimiques, les racines d'*Eryngium triquetrum* ont été sélectionnées pour être soumises à une investigation phytochimique approfondie.

La caractérisation des molécules actives de cette espèce fait intervenir différentes étapes, dont les trois principales sont le fractionnement et l'identification des composés d'intérêt (guidés par des analyses phytochimiques et des tests biologiques), suivis par l'étude de l'activité biologique des composés purifiés. Durant ce travail, nous nous attarderons également sur les difficultés de séparation nous ayant conduit à adapter notre stratégie méthodologique.

#### IV. 2. Extraction à partir des racines d'*Eryngium triquetrum*

6 kg de racines ont été séchés à l'étuve ventilée pendant 12 h à 37°C puis nous avons procédé à une extraction à l'éther de pétrole avec épuisement de la drogue végétale broyée par lixiviation et ceci afin d'extraire une grande partie des principes actifs.

Après évaporation à sec et sous pression réduite nous avons obtenu 23 g d'extrait brut, la Figure 35 représente le profil chromatographique sur couche mince de cet extrait.

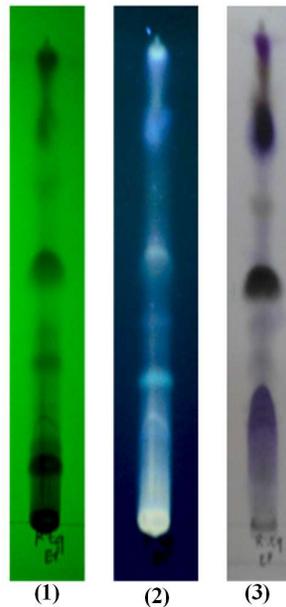


Figure 35 : CCM de l'extrait à l'éther de pétrole des racines d'*E. triquetrum*, dépôt 10 µl. Solvant de migration : Toluène/AcOEt (28,5 : 1,5, V/V), détection : (1) UV 254, (2) UV 365, (3) anisaldéhyde sulfurique.

#### IV. 3. Fractionnement bioguidé de l'extrait éther de pétrole

##### IV. 3.1. Bioautographie de l'extrait brut

Afin de bioguider l'isolement de composés antimicrobiens, nous avons utilisé la méthode de bioautographie d'immersion de l'extrait à l'éther de pétrole sur des souches sensibles à

l'extrait brut : *Staphylococcus lugdunensis*, *S. epidermidis* et *Streptococcus agalactiae*. Nous avons obtenu les mêmes zones d'inhibition pour les 3 bactéries testées (Figure 36).

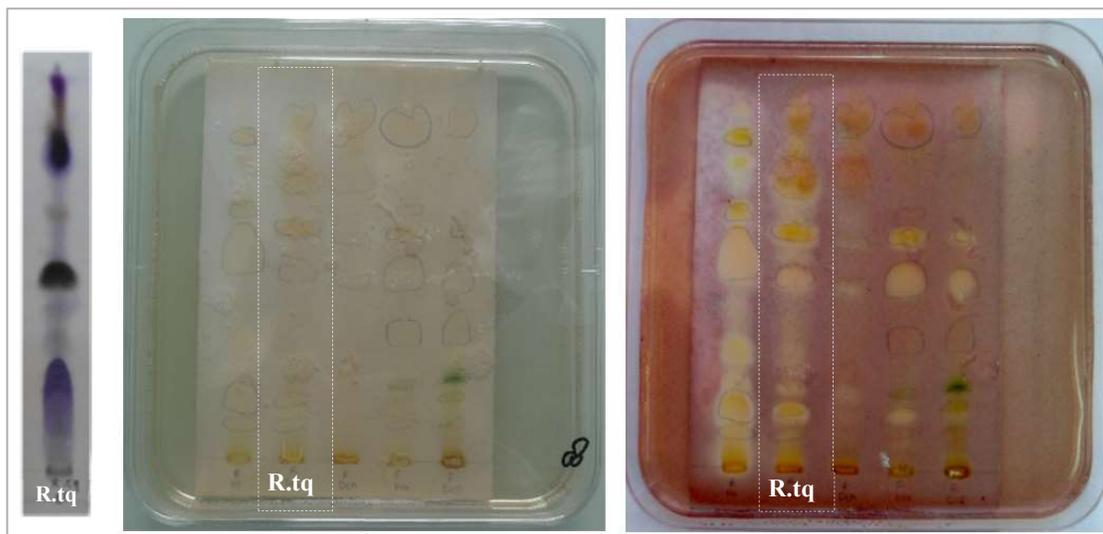


Figure 36 : CCM et bioautographie de l'extrait brut (B) des racines d'*E. triquetrum* , (R.tq) dépôt 10  $\mu$ l. Solvant de migration : Toluène/AcOEt (28,5 : 1,5, V/V), avant et après incubation des bactéries à 37°C.

La majorité des tâches observées sur la CCM de l'extrait brut présentent des zones d'inhibition sur les bactéries testées. Cependant, en variant les solvants de migration de la CCM, une seule tâche des produits les plus polaires et/ou les plus apolaires de l'extrait brut correspond parfois à plusieurs tâches superposées. Afin de repérer les produits les plus actifs, nous avons donc procédé à des bioautographies des produits issus du fractionnement en variant les solvants d'élution.

#### IV. 3.2. Purification du composé C1.4 à partir de l'extrait brut

La première étape de séparation a été effectuée par Chromatographie sur Colonne ouverte. Cette étape permet une séparation grossière des molécules selon leur polarité. Le résultat des essais préliminaires par chromatographie sur couche mince nous a conduit à utiliser comme système d'élution : (cyclohexane/ acétate d'éthyle) en gradient de polarité.

Une masse de 20 g de l'extrait à l'éther de pétrole a été déposée sur une colonne de gel de silice (cf. matériel et méthodes) préparée dans du cyclohexane. L'élution a été réalisée par un gradient de polarité en commençant par du cyclohexane pur et en terminant par l'acétate d'éthyle. Nous avons procédé à un rinçage de la colonne par la suite par du méthanol. Le fractionnement a été réalisé tous les 50 ml et le suivi de ces fractions a été effectué par CCM. Les plaques ont été visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec l'anisaldéhyde sulfurique et chauffées à 100°C.

La Figure 37 représente le schéma de fractionnement de l'extrait éther de pétrole et les masses respectives des fractions obtenues. La séparation a conduit à 15 fractions (C1.1 à C1.15). Parmi ces fractions nous avons eu 1,3 g du composé C1.4 pur, élué à 3% acétate d'éthyle.

Les fractions C1.14 et C1.15, ayant des profils chromatographiques proches, ont été par la suite regroupées en une seule fraction : C1.14.

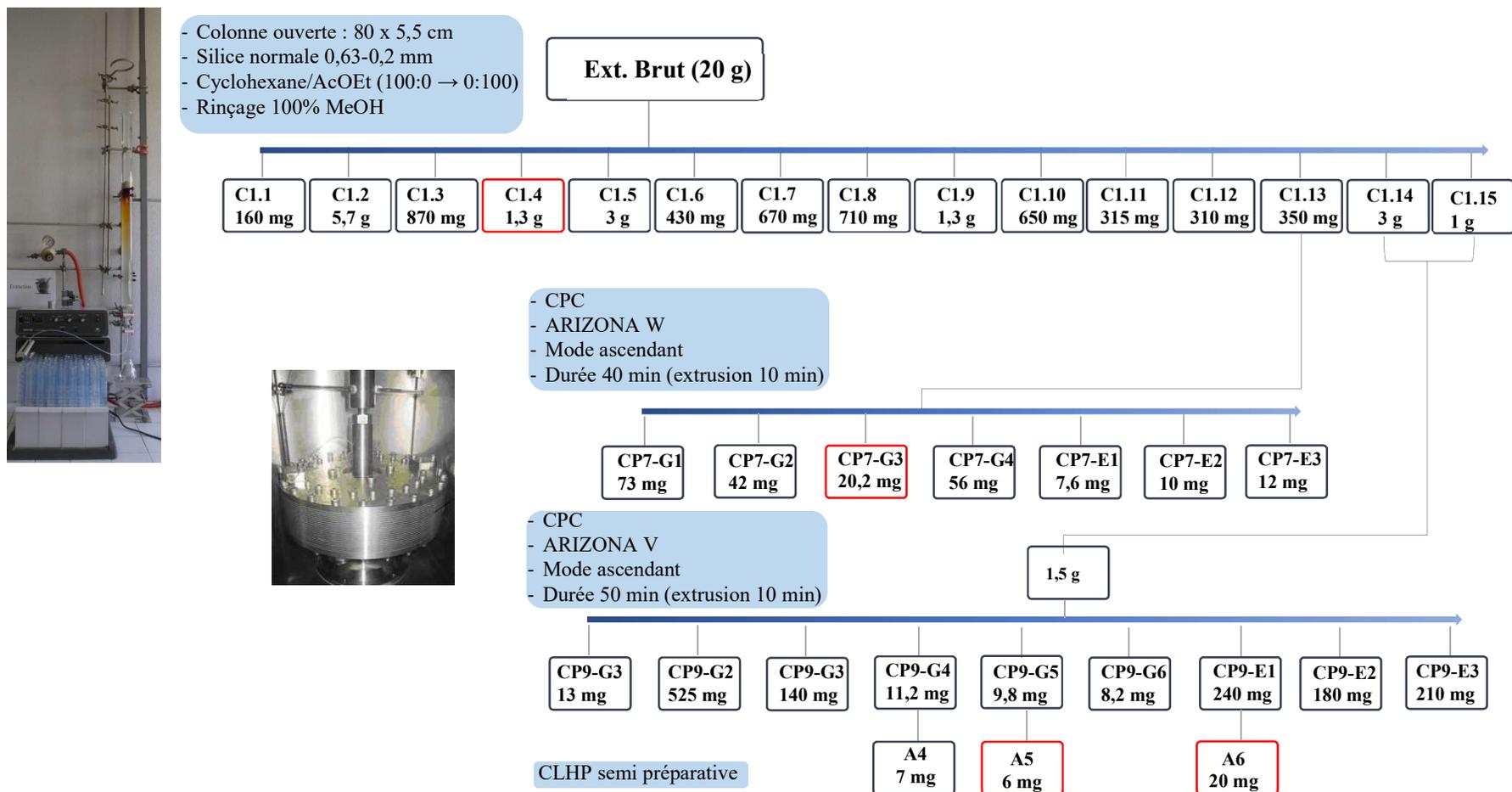


Figure 37 : Schéma de fractionnement et bilan massique de l'extrait éther de pétrole (20 g).

### IV. 3.3. Purification du composé CP7-G3

L'isolement des autres molécules actives de l'extrait à l'éther de pétrole d'*Eryngium triquetrum* fut particulièrement difficile en raison de la présence de nombreux composés gras indissociables en chromatographie. Ces composés sont présents dans la même zone de polarité que les principes actifs, ce qui a rendu l'isolement de molécules pures extrêmement délicat.

Par conséquent, le travail préliminaire à l'étude des composés de cette plante a consisté à tester de nombreuses méthodes chromatographiques en association avec divers systèmes de solvants, et ceci afin de mettre au point un système de fractionnement permettant la séparation des corps gras peu spécifiques des autres composés de l'extrait.

En premier lieu, le suivi de l'activité antimicrobienne des fractions a été effectué par bioautographie d'immersion afin d'identifier les tâches d'inhibition correspondant aux molécules actives, cette bioautographie a été réalisée avec les souches de *Staphylococcus lugdunensis*, *S. epidermidis* et *Streptococcus agalactiae* (Figure 38) qui ont montré une sensibilité vis-à-vis de l'extrait brut (cf. II.2).

Dans les fractions C1.10, C1.11, C1.12, C1.13 et C1.14 nous avons observé plusieurs tâches d'inhibition ce qui prouve la présence de nombreux composés antimicrobiens, les tâches d'inhibition étaient les mêmes pour les 3 souches testées.

Néanmoins, toutes ces fractions sont dominées par un acide gras présent sous forme de trainée en CCM (Figure 35), avec un Rf de 0,32 dans un système d'élution éther de pétrole/ acétate d'éthyle (20:2).

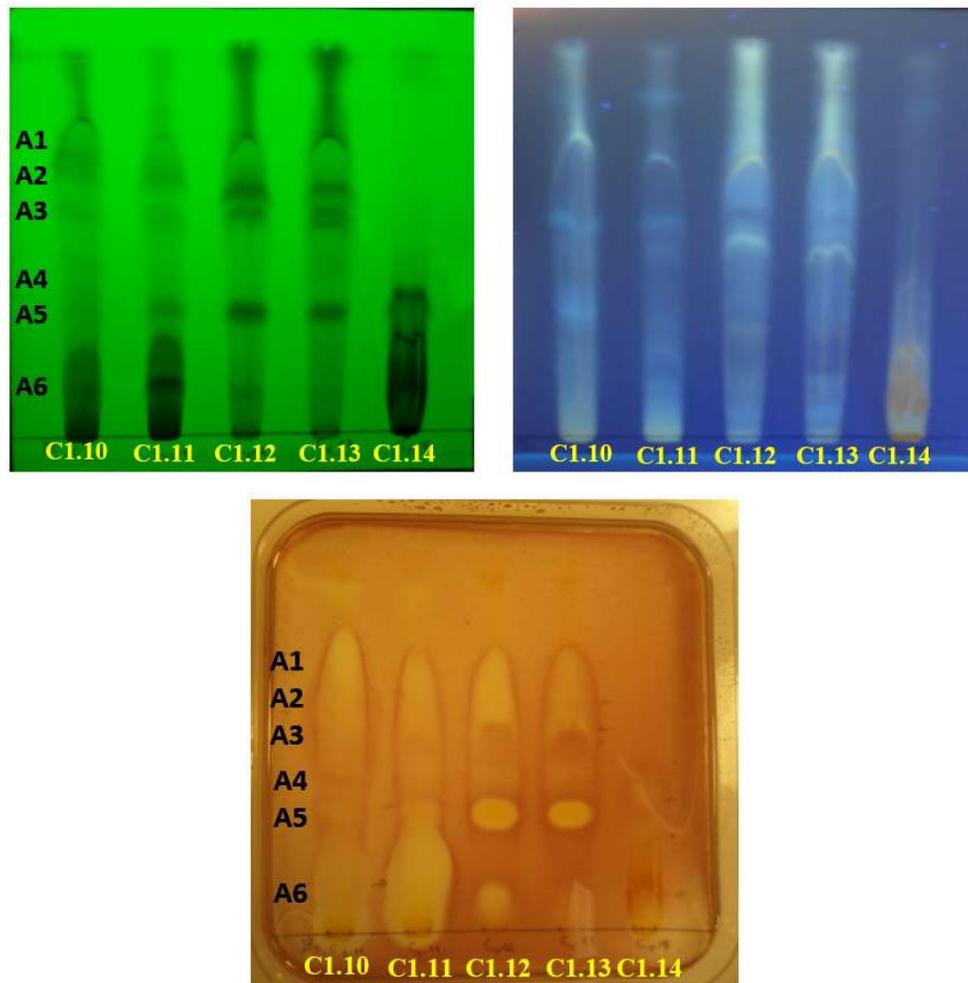


Figure 38:CCM (254 et 365 nm) et bioautographie d'immersion des fractions C1.10, C1.11, C1.12, C1.13 et C1.14 , (éluant EP/ AcOEt, 20 :5) ; A1,A2, A4, A5, A6 : composés actifs ; A3 : l'acide gras CP7G3.

Tableau 26 : Rf des composés d'intérêt

Rf des composés actifs	EP/AcOEt (20:5)	T/AcOEt (28,5:1,5)
A1	0,49	0,44
A2	0,44	0,38
A4	0,34	0,30
A5	0,25	0,23
A6	0,10	0,09
<b>Rf de l'acide gras</b>		
A3 : CP7G3	0,40	0,36

Etant donné que la polarité de l'acide gras (**CP7G3**) est assez proche des composés actifs (A1, A2, A4, A5 et A6), nous n'avons pas réussi à les séparer et ceci par différentes méthodes dont principalement des chromatographies sur colonnes et par partage liquide/liquide (hexane MeOH (1:1) ; et Hexane/MeOH/ H<sub>2</sub>O 2:1:1).

L'isolement de cet acide gras des autres composés actifs a été alors réalisé par Chromatographie de Partage Centrifuge, à partir de la fraction C1.13 ; le but était d'avoir des sous- fractions, contenant les principes actifs, séparées de l'acide gras.

Pour développer une méthodologie de séparation CPC, la première étape serait de sélectionner un système de solvants biphasique, qui doit fournir des valeurs de coefficients de partage (Kd) appropriées à la séparation des molécules d'intérêt (cf. matériel et méthodes). Pour ce faire, nous avons testé différents systèmes (Tableau 26) dont la majorité appartient à la gamme des systèmes Arizona. Le but était de choisir le système de solvant permettant d'avoir le coefficient de partage (Kd) différent de celui des autres composés et le plus proche de 1 pour le composé CP7-G3 afin qu'il soit élué au bout d'un volume de colonne. Nous avons alors testé une large gamme de polarité des systèmes Arizona (systèmes de J à X).

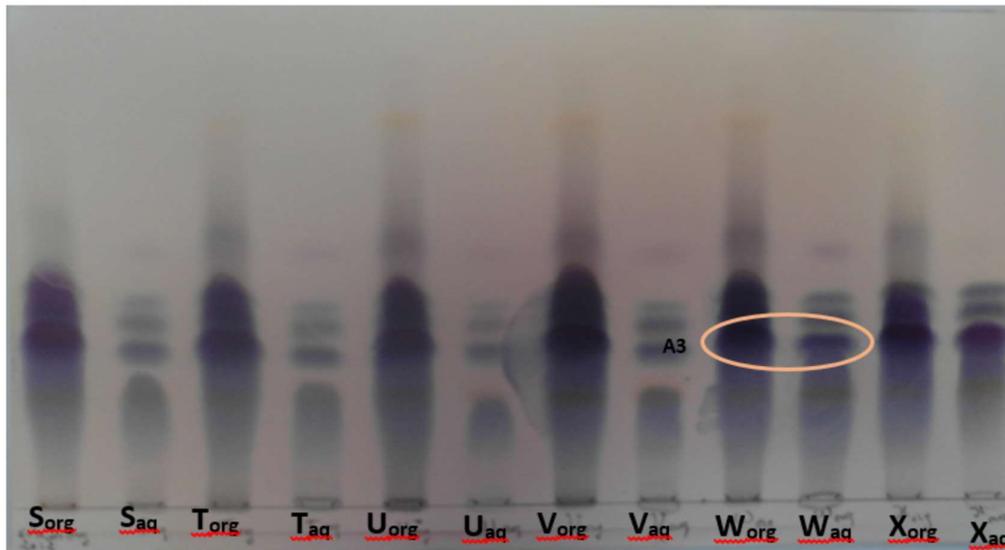
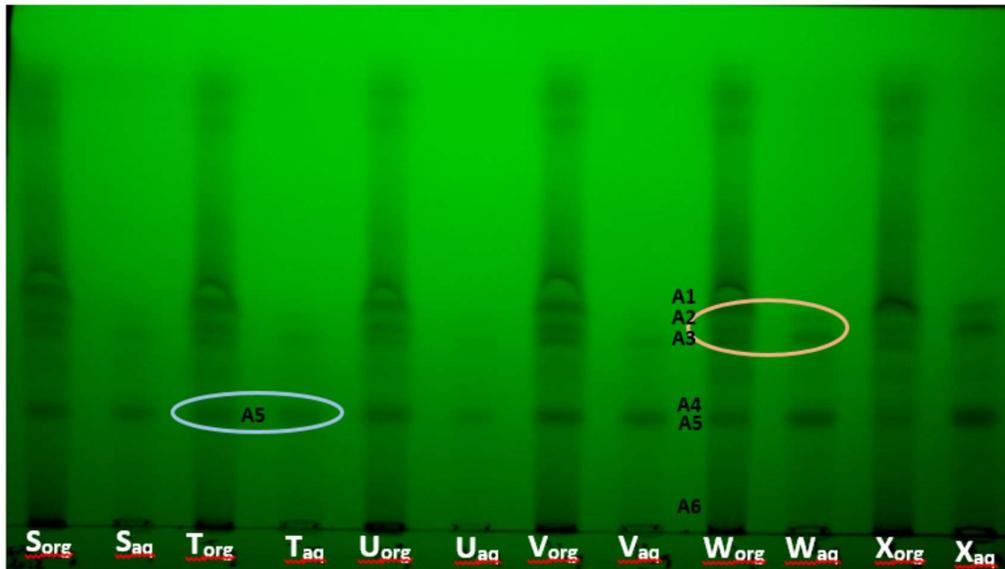


Figure 39 : CCM récapitulatives des systèmes de solvant testés (éluant EP/AcOEt 20:2) ; S, T, U, V, W, X : systèmes Arizona testés, aq : phase aqueuse, org : phase organique (en haut : UV 254 nm, en bas : révélés à l'anisaldéhyde sulfurique)

Par CCM (Figure 39), les systèmes V, W et X, qui ont visiblement montré le coefficient de partage le plus adapté, ont été sélectionnés (Tableau 27) ; nous avons donc procédé au calcul des  $K_d$  respectifs par CLHP (UV à 254 et 205 nm).

Tableau 27: Coefficient de partage des systèmes V, W et X

Systèmes de solvants	Coefficient de partage
V (hep/AcOEt/MeOH/H <sub>2</sub> O, 5:1:5:1)	0,88
W (hep/AcOEt/MeOH/H <sub>2</sub> O, 6:1:6:1)	0,99
X (hep/AcOEt/MeOH/H <sub>2</sub> O, 9:1:9:1)	0,86

Le système W ( $K_d \approx 1$ ) a donc été choisi. La phase aqueuse a été choisie comme phase stationnaire et a été par conséquent introduite en premier lieu dans la colonne. La phase organique a été employée comme phase mobile et a été introduite en second lieu en mode ascendant dans la colonne tout en respectant les conditions opératoires choisies (vitesse de rotation de 1600 rpm, débit 8 ml/min). Nous avons utilisé le mode d'élu-tion-extrusion pour la séparation afin de collecter l'ensemble des molécules de l'échantillon. En effet, en poussant la phase stationnaire aqueuse dans la colonne, les molécules ayant une forte affinité pour cette phase vont être éluées tout en conservant la séparation déjà débutée pendant l'élu-tion.

L'élu-tion a été réalisée pendant 40 min, puis l'ex-trusion a ensuite été effectuée pendant 10 min toujours en mode ascendant.

Finalement, nous avons obtenu 7 fractions (Figure 37) dont une fraction contient le produit CP7-G3 pur sous forme d'huile visqueuse de couleur jaunâtre (20,2 mg). Cependant, le rendement final des autres fractions contenant les principes actifs (CP7E1 et CP7 E2), et dont on a réussi à éliminer l'acide gras, était très faible (7,6 et 10 mg respectivement), nous n'avons donc pas pu séparer les composés actifs à partir de ces fractions. Nous, avons par conséquent, entamé la séparation de ces composés à partir des autres fractions issues de la première colonne C1.

#### IV. 3.4. Purification du composé A6 :

Afin d'isoler les composés actifs présents dans les fractions C1.10, C1.11, C1.12, et C1.14, vérifiés par bioautographie, nous avons donc choisi de continuer la séparation sur la fraction C1.14 qui ne contient pas l'acide gras CP7-G3 mais dont les composés actifs (A4 et A5) sont présent en une plus faible concentration, ainsi que le composé actif A6 (Figure 40).

Pour ce faire, nous avons procédé à l'analyse cette fraction par CLHP. La méthode utilisée pour analyser la fraction C1.14 est la suivante : A : H<sub>2</sub>O, B : ACN : 58→70 % 30 min, 70 % 30-35 min, 70→100 % 35-40 min, 100 % 40-45 min. Les produits sont détectés par UV à 205 et 254 nm. La longueur d'onde de 205 correspond au maximum d'absorption des composés A4, A5 et A6. La fraction C1.14 a été analysée en 45 min et les mêmes conditions ont été utilisées pour analyser les différentes fractions collectées à la sortie de la CPC.

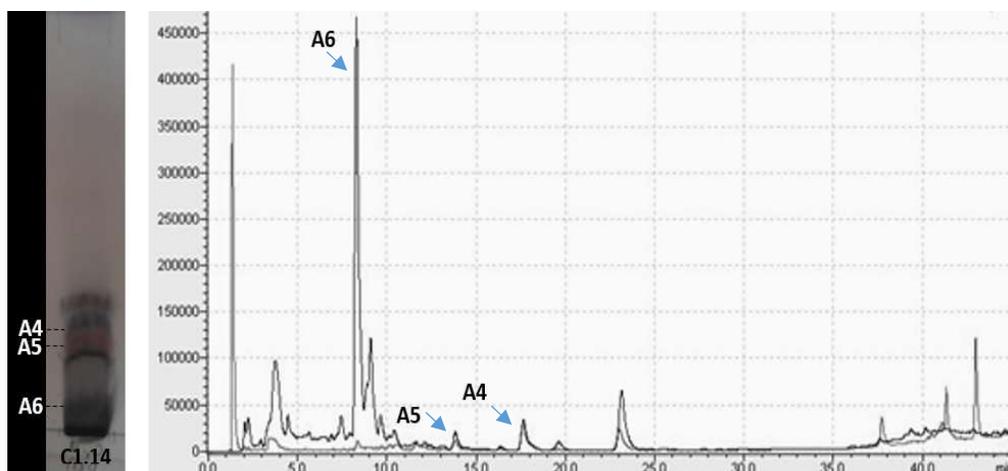


Figure 40 : Profil CCM (éluant toluène/acétate d'éthyle 1,5 : 28,5) et chromatogramme obtenu à 254 et 205 nm de la fraction C1.14 , injection d'une solution à 1 mg/mL (20  $\mu$ L) ; T = 25°C : A6, tr = 8 min ; A5, tr = 13,8 min ; A4, tr = 17,5 min.

En testant les systèmes ARIZONA de J à X pour séparer le composé CP7-G3 (section II.3.3), les systèmes T, U et V, ont visiblement montré en CCM le coefficient de partage le plus adapté pour les composés A4 et A5 (Figure 41). Pour choisir le système de solvant approprié, nous avons donc utilisé ces systèmes de solvants pour séparer ces mêmes composés qu'on retrouve aussi dans la fraction C1.14.

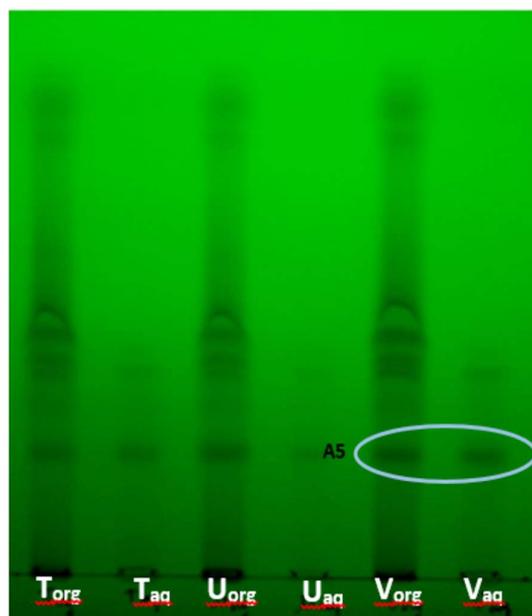


Figure 41: CCM récapitulatives des systèmes de solvant testés pour séparer les composés A4 et A5 (éluant EP/AcOEt 20:2) ; T, U, V : systèmes Arizona testés, aq : phase aqueuse, org : phase organique.

Pour choisir entre ces différents systèmes celui qui nous permet de séparer ces deux composés en CPC, il est toujours préférable que les valeurs de  $K_d$  soient comprises entre 0,5 et 1 afin que les molécules soient séparées en un volume de colonne sans consommation excessive de solvants. Les  $K_d$  des composés d'un échantillon doivent être différents pour pouvoir les séparer.

Nous avons par conséquent procédé au calcul des  $K_d$  respectifs, ainsi que celui d'un système de solvant adapté entre le U et le V (hep/AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O, 19:4:19:4), avec CLHP (Figure 42), afin de savoir si la séparation par CPC est réalisable. Le Tableau 28 montre les valeurs de  $K_d$  obtenues avec ces différents systèmes.

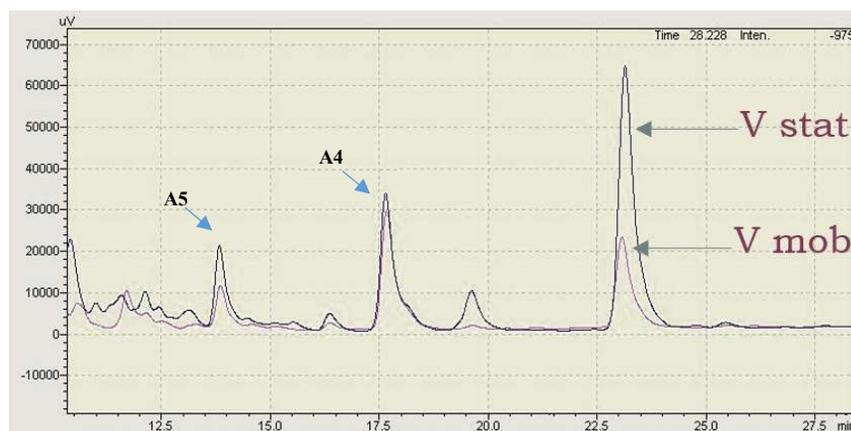


Figure 42 : profil CLHP (longueurs d'onde 205 nm) de la phase organique (V mob) et la phase aqueuse (V stat) du système V de la fraction C1.14

Tableau 28 : Coefficient de partage des composés A5 et A4 dans les systèmes T, U, V et le système adapté

Systèmes de solvants		Coefficient de partage	
		A5	A4
T	hep/AcOEt/MeOH/H <sub>2</sub> O, 3:1:3:1	0,31	0,13
U	hep/AcOEt/MeOH/H <sub>2</sub> O, 4:1:4:1	0,5	0,3
Système adapté	hep/AcOEt/MeOH/H <sub>2</sub> O, 19:4:19:4	0,68	0,42
V	hep/AcOEt/MeOH/H <sub>2</sub> O, 5:1:5:1	0,56	0,87

Le système Arizona V composé de hep/AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O (5:1:5:1) a donné des valeurs de  $K_d$  différentes pour les deux composés et dans la zone recherchée ( $0,5 < K_d < 2$ ), il a donc été choisi comme le plus approprié au fractionnement des molécules A4 et A5.

Nous avons donc procédé à la séparation de 1,5 g de la fraction C1.14 par CPC en mode ascendant avec ce système de solvant comme détaillé dans la section « matériel et méthodes ». Le fractionnement par CPC a duré 50 minutes, le composé A4 a été élué à partir de 23 minutes jusqu'à 28 minutes et le composé A5 ayant un coefficient de partage plus bas a été retardé, il a été alors élué à partir de 33 minutes jusqu'à 43 minutes (Figure 43).

Le composé A6, beaucoup plus polaire, a été récupéré en extrusion.

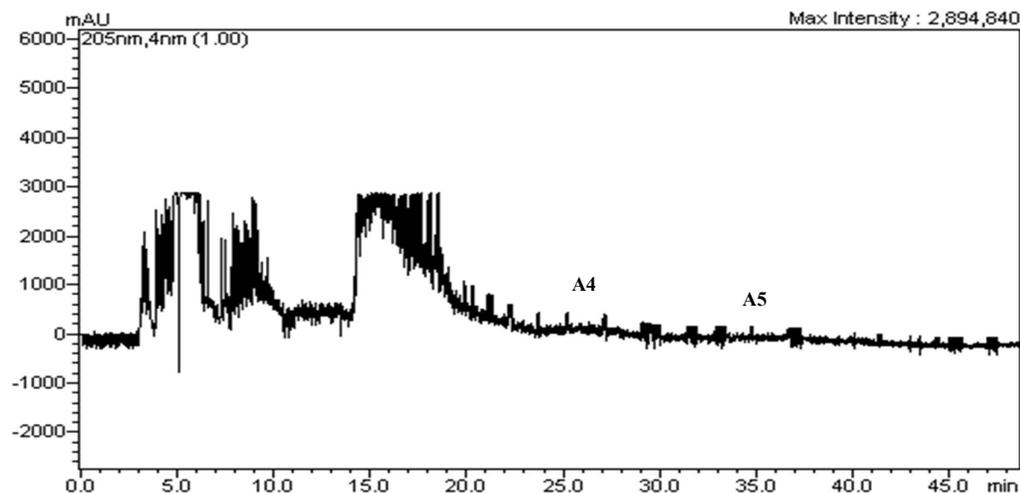
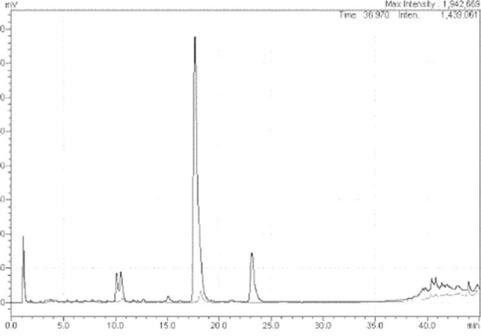
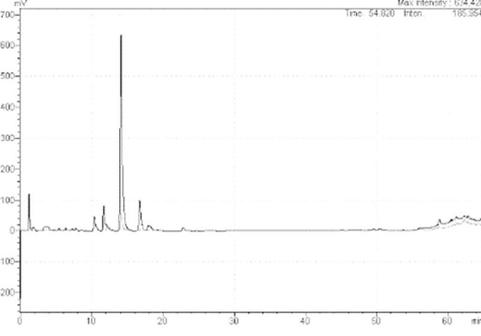
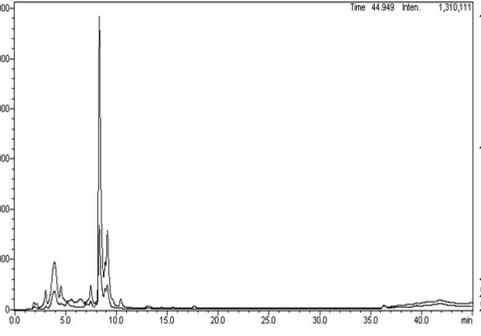


Figure 43: Chromatogramme du fractionnement de la fraction C1.14 des racines d'*E. triquetrum* obtenu par CPC (205 nm) avec le système de solvant Arizona V constitué du mélange Hept/AE/MeOH/H<sub>2</sub>O (5/1/5/1, v/v).

Suite à cette CPC nous avons obtenu 9 sous-fractions (Figure 37). Les composés d'intérêt récupérés ont été analysés en CLHP dans les mêmes conditions que C1.14, les chromatogrammes sont représentés dans le Tableau 29.

Tableau 29 : caractérisation des sous-fractions contenant les principes actifs de C1.14 après son passage en CPC

Nom	CCM (anisaldéhyde sulfurique)	Chromatogramme (CLHP)	Masse
CP9-G4			11,2 mg
CP9-G5			9,8 mg
CP9-E1			240 mg

Nous avons par la suite procédé à la repurification de ces 3 sous-fractions par CLHP semi-préparative. Le composé A5 pur est rapidement dégradé quelques heures après son isolement, nous n'avons donc pas pu l'identifier.

Afin de purifier le composé A6, nous avons procédé à une CLHP préparative, la méthode utilisée pour la séparation de la sous-fraction CP9-E1 est la suivante : pompe A : H<sub>2</sub>O, pompe B : ACN : 30 → 65 % 30 min ; 65 → 100 % 30-33 min ; 100 % 33-43 min ; avec un débit de 15 ml/min ; le volume injecté est 500 µl à partir d'une solution de 60 mg/ml. La séparation a conduit à la purification du composé A6 (6,3 mg, tr = 29 min, 62 % ACN).

L'analyse CLHP du composé séparé A4 a montré qu'il s'agissait d'un mélange de deux composés qui co-éluent. Nous n'avons pas réussi à séparer ces deux composés par CLHP semi-préparative.

#### IV. 3.5. Purification du composé C2.4 :

L'activité antimicrobienne des fractions C1.1, C1.2 et C1.3 issues de la première colonne de silice C1 a été testée par bioautographie d'immersion avec la souche de *Staphylococcus epidermidis* (5001) sensible à l'extrait brut. Plusieurs taches d'inhibition ont été observées, particulièrement pour la fraction C1.2 (Figure 44).

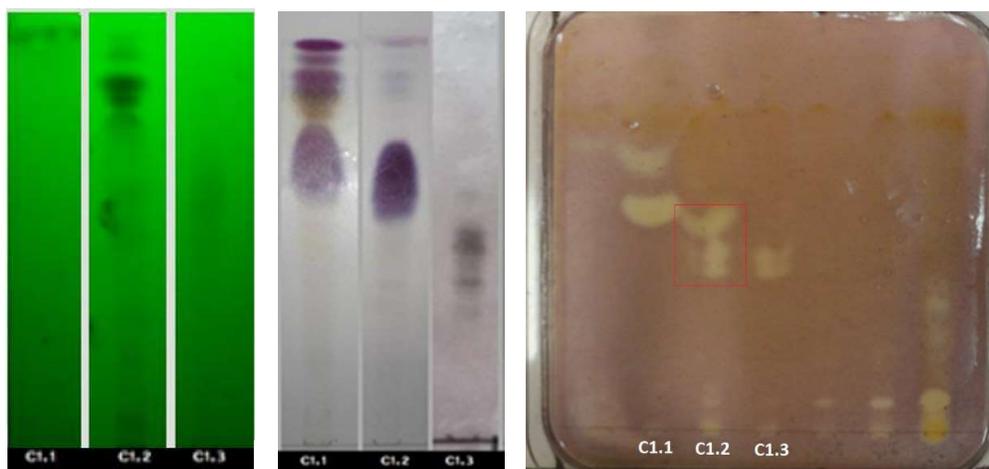


Figure 44 : CCM (à 254 nm et révélées à l'anisaldéhyde sulfurique) et bioautographie d'immersion des fractions C1.1, C1.2, et C1.3 (éluant EP/ AcOEt, 20:5).

Les fractions C1.1, C1.2 et C1.3 contiennent aussi des composés gras qui ont rendu la séparation des composés actifs assez contraignante.

Afin de purifier les composés actifs de la fraction C1.2, nous avons initialement réalisé une colonne de silice (Figure 45) de granulométrie fine (15-4 µm) en utilisant comme solvant d'éluant de l'hexane avec l'acétate d'éthyle par gradient de polarité, en commençant par de l'hexane et en finissant par l'acétate d'éthyle (5%), 10 ml ont été récupérés pour chaque sous-fraction. Nous avons obtenu 10 fractions qui ont permis de concentrer les principes actifs très apolaires sans les séparer. Cette première colonne a permis de purifier 240 mg du composé gras C2.4.

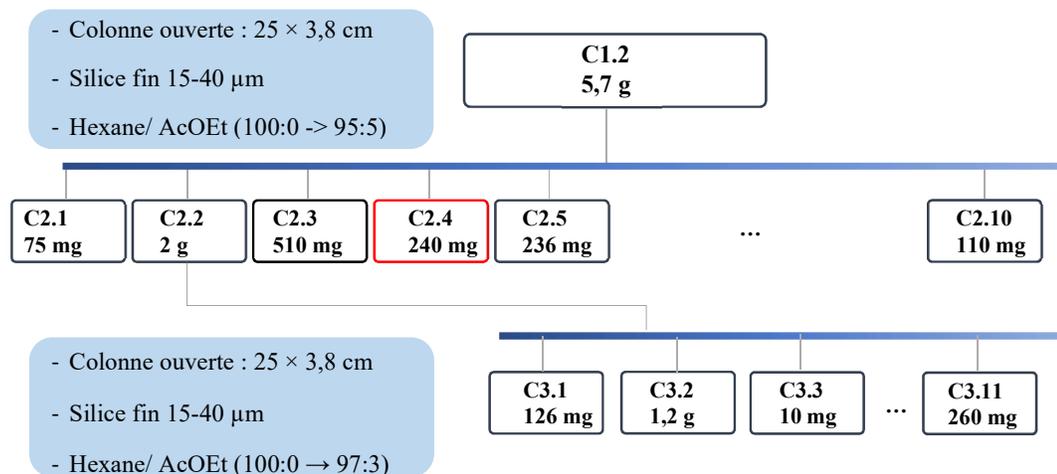


Figure 45 : Schéma de fractionnement de 5,7 g de la fraction C1.2 et de purification du composé C2.4 (240 mg).

Nous n'avons pas réussi à séparer les composés actifs de la fraction C1.2 à partir de la première colonne de silice ; nous avons alors repris la séparation par une deuxième colonne de silice de même dimension que la précédente avec un gradient de 0 à 3% d'acétate d'éthyle dans l'hexane ; 5 ml ont été récupérés pour chaque sous-fraction. Nous avons obtenu finalement 11 fractions sans pouvoir séparer les composés actifs du composé gras peu spécifique.

Nous avons effectué par la suite plusieurs essais de séparation par colonnes de silice en mode isocratique (hexane) et de séphadex (LH-20), mais nous n'avons pas réussi à séparer les composés actifs à cause de leurs polarités assez proches et la présence des composés gras.

Nous avons envisagé, par conséquent, la séparation des composés actifs également présents dans la fraction C1.3 (870 mg) par CPC. Pour ce faire, plusieurs systèmes de solvants ont été testés. Cependant, étant donné le caractère très apolaire des composés actifs, le choix du système de solvant approprié pour la CPC a été réalisé en se basant sur la chromatographie sur couche mince. Les systèmes de solvants testés sont répertoriés dans le Tableau 30.

Tableau 30 : systèmes de solvant testés pour la séparation des composés actifs de la fraction C1.3 :

Système de solvants	Composition
Arizona X	hep/AcOEt/MeOH/H <sub>2</sub> O ; 9:1:9:1
Arizona Y	hep/AcOEt/MeOH/H <sub>2</sub> O ; 19:1:19:1
Arizona Z	hep/MeOH ; 1:1
Système 1	PetEt <sub>2</sub> O/EtOH/ET <sub>2</sub> O/H <sub>2</sub> O ; 5:4:0,5:1
Système 2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O ; 22:17:8
Système 3	Hex/EtOH/MeOH/H <sub>2</sub> O ; 1:5:1:5
Système 4	Hex/AcOEt/MeNO <sub>2</sub> /MeOH ; 9:1,5:4,5:1,5

Le système de solvant qui a offert le meilleur partage entre les deux phases était le système Arizona Z, qui est le système le plus apolaire de la gamma Arizona. Ce système est composé d'heptane et méthanol (1:1). (Figure 46). Nous avons par conséquent envisagé la séparation des composés actifs par CPC par le système Arizona Z.

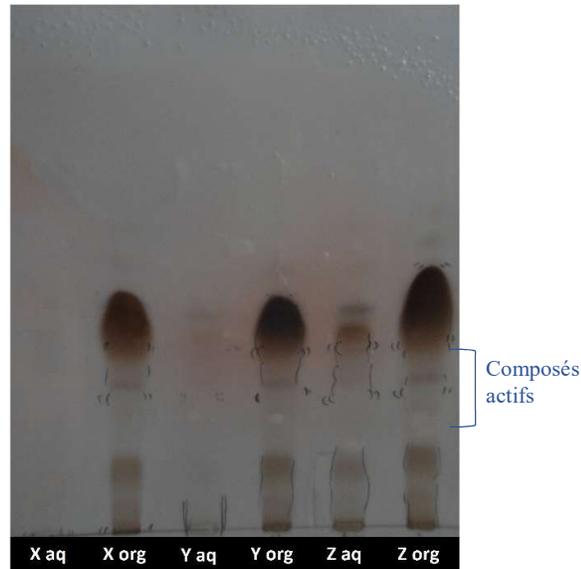


Figure 46 : CCM récapitulatives des systèmes de solvant testés pour la séparation de C1.3 : (éluant EP/AcOEt 20:2) ; X, Y, Z : systèmes Arizona testés, aq : phase aqueuse, org : phase organique (révélés à l'anisaldéhyde sulfurique)

Pour cette séparation, nous avons également choisi le mode d'élu-tion-extrusion en système ascendant. La phase aqueuse a été choisie comme phase stationnaire, et la phase organique a été employée comme phase mobile, la vitesse de rotation était de 1600 rpm, débit de 10 ml/min). L'élu-tion a été réalisée pendant 35 min, puis l'extrusion a ensuite été effectuée pendant 6 min toujours en mode ascendant. Finalement, nous avons obtenu 6 groupes de fractions (Figure 47).

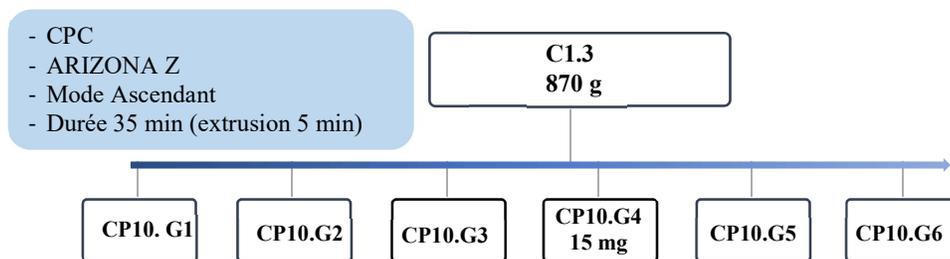


Figure 47 : Schéma de fractionnement par CPC de la fraction C1.3 (870 mg) par le système Arizona Z.

Le fractionnement par CPC a permis d'avoir deux principales fractions : CP10.G2 (Figure 48) concentrée en composé gras C2.4 qu'on a purifié précédemment avec la colonne de silice C2 et la fraction CP10.G4 qui contient les composés actifs (Figure 49),

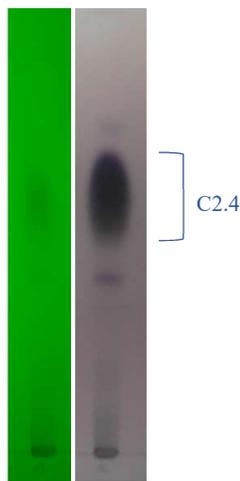


Figure 48 : CCM récapitulatives (UV : 254 nm et anisaldéhyde sulfurique respectivement) de la fraction CP10.G2. Eluant EP/AcOEt (20:2).

Cependant nous avons obtenu un rendement très faible de cette fraction (15 mg), ce qui a empêché l'achèvement de la séparation des composés recherchés.

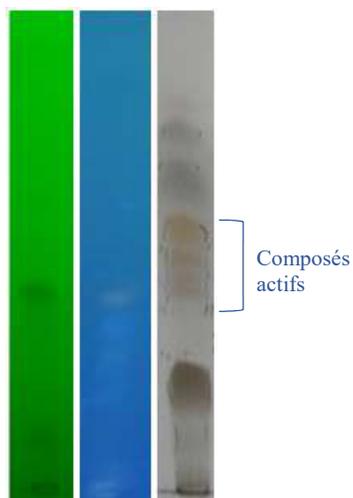


Figure 49 : CCM récapitulatives de la fraction CP10.G4. (254 nm, 365 nm et anisaldéhyde sulfurique respectivement). Eluant EP/AcOEt (20:2).

## IV. 4. Identification des composés isolés

### IV. 4.1. Détermination structurale de C1.4

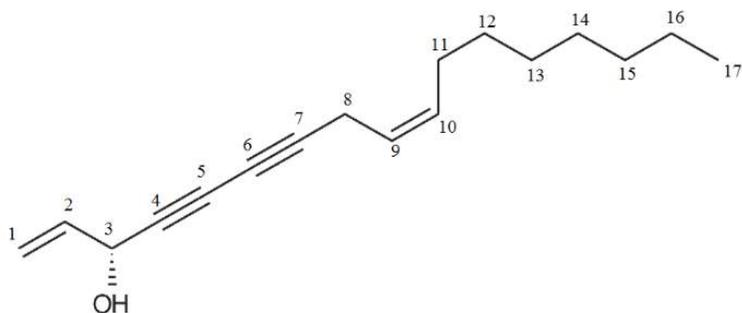


Figure 50 : Composé C1.4

Le composé C1.4 a été isolé sous forme d'une huile jaune. En CCM, il possède un rapport frontal de 0,45 lorsque la plaque CCM est éluée avec un mélange toluène/AcOEt (28,5:1,5) comme solvant de migration. Le composé est révélé sous UV à 254 nm et apparaît sous forme d'une tache noire après révélation à l'anisaldéhyde sulfurique.

#### IV. 4.1.1. Spectrométrie de masse

Le spectre de masse haute résolution obtenu en mode ESI négatif a généré un ion  $[M-H]^-$  de  $m/z$  243,17544. Ce qui est compatible avec une composition élémentaire  $C_{17}H_{23}O$  qui comporte 6 insaturations.

Le composé C1.4 possède donc une formule brute  $C_{17}H_{24}O$ , soit une masse de 244,17544 (erreur inférieure à 5 ppm) avec un degré d'insaturation de 6.

#### IV. 4.1.2. Spectroscopie RMN

Le spectre RMN du  $^{13}C$  (Figure 51) enregistré en *J-modulé* dans le  $CDCl_3$  confirme la présence de 17 carbones.

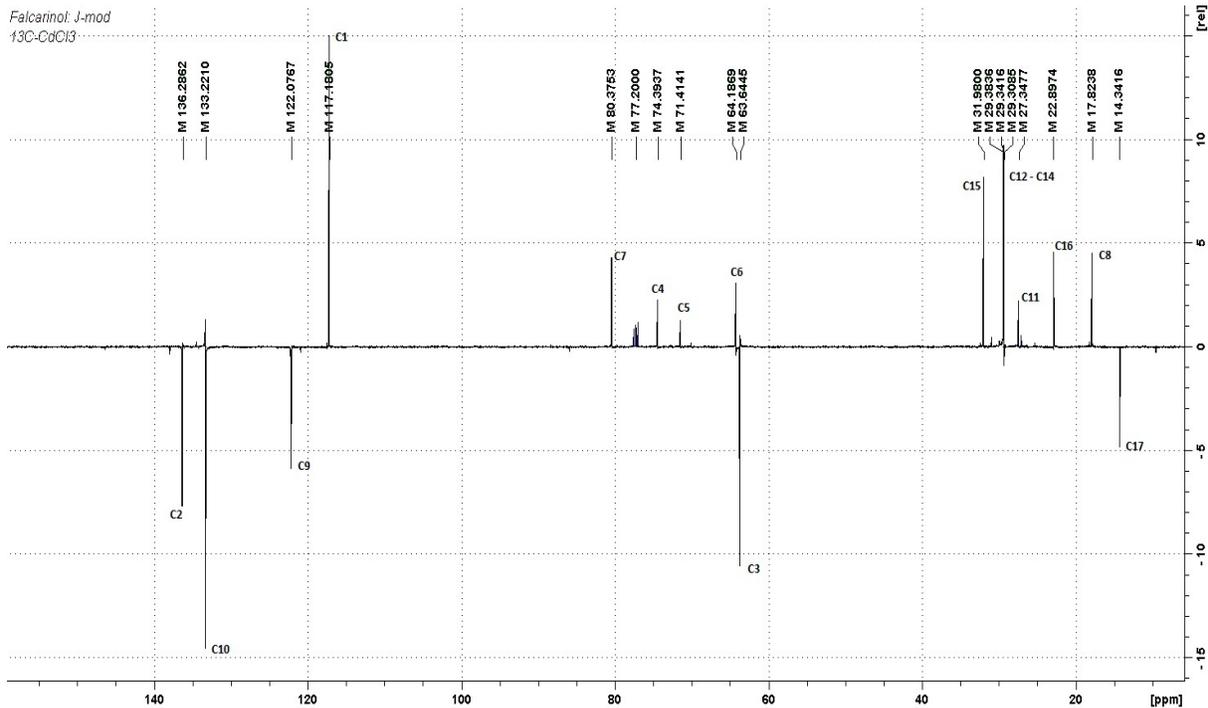


Figure 51: Spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  en *J*-modulé du composé C1.4 (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  et les informations supplémentaires fournies par l'expérience de corrélation directe  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , HSQC, permettent de distinguer 4 carbones quaternaires dont les déplacements sont caractéristiques des triples liaisons conjuguées ( $\delta$  64,2 ;  $\delta$  71,4 ;  $\delta$  74,4 ; 80,3), et 8 méthylènes dont un méthylidène à  $\delta$  117,1. Toutefois 5 signaux peuvent provenir de carbones primaires ou tertiaires dont 3 signaux correspondent à des CH fortement déblindés oléfiniques ( $\delta$  122,1 ;  $\delta$  133,2 ;  $\delta$  136,3) et un carbone qui correspond à un groupement méthyle terminal ( $\delta$  14,3). L'ensemble de ces informations permet ainsi d'attribuer les 6 insaturations aux quatre carbones diynes et aux carbones oléfiniques, on peut donc conclure qu'il s'agit d'un polyacétylène aliphatique à 17 atomes de carbone.



Le spectres proton (Figure 52) et COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figure 53) du composé C1.4, indiquent la présence de :

- Un signal intégrant pour 8H à 1,26 ppm correspondant au groupe des méthylènes de la chaîne aliphatique (H-13 à 16).
- Un triplet à  $\delta_{\text{H}} = 0,87$  ppm d'intensité 3H ( $J = 6,9$  Hz), révélant la présence d'un groupement méthyle terminal (H-17) lié à un groupe  $-\text{CH}_2$ .
- Un système ABX à  $\delta_{\text{H}} = 5,22$  ppm (1H, ddd,  $J=10,1$  Hz, 1,4 Hz, 0,9 Hz H-1a), à  $\delta_{\text{H}} = 5,45$  ppm (1H, ddd,  $J=17,0$  Hz, 1,2 Hz, 0,9 Hz, H-1b) et à  $\delta_{\text{H}} = 5,92$  ppm (1H, ddd,  $J=17$  Hz, 10 Hz, 5,3 Hz, H-2) (Figure 54).

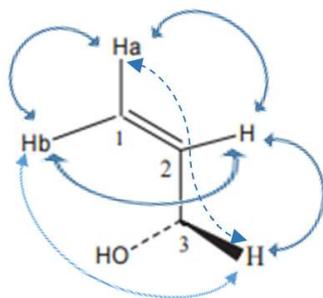


Figure 54 : couplages du système ABX de H-1, H-2 et H-3

- Deux protons du groupement oléfinique (H-9 et H-10) d'intensités 1H correspondent chacun à un doublet détriplé détriplé à  $\delta_{\text{H}} = 5,36$  ppm (dt,  $J = 1,5$  Hz, 6,9 Hz, 10,5 Hz) correspondant à H-9, et  $\delta_{\text{H}}=5,5$  ppm (dt,  $J = 1,6$  Hz, 7,3 Hz, 10,5 Hz) correspondant à H-10 sont couplés aux protons des deux  $\text{CH}_2$  allyliques (H-11 :  $\delta_{\text{H}} = 2$  ppm et H-8 :  $\delta_{\text{H}} = 3,02$  ppm) (Figure 55).

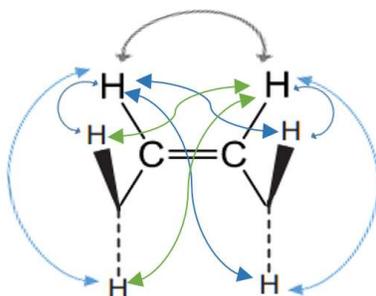


Figure 55: couplage des protons du groupement oléfinique

- Un doublet d'intensité 1H à  $\delta_{\text{H}} = 4,9$  ppm ( $J = 5,3$  Hz) correspondant à H-3.
- Un singulet d'intensité 1H à  $\delta_{\text{H}} = 1,41$  ppm correspondant le plus probablement au proton mobile de l'hydroxyle.
- Un quadruplet d'intensité 2H ( $J = 7,2$  Hz) à  $\delta_{\text{H}} = 2,01$  ppm (H-11).
- Un doublet dédoublé à 3,02 ppm ( $J = 6,8$  Hz ; 0,6 Hz) ppm d'intensité 2H (H-8).

La grande valeur de la constante de couplage entre H-1b et H-2 (17 Hz) indique qu'ils sont dans une configuration trans, de même la petite valeur de la constante de couplage entre H-9 et H-10 ( $J = 10,5$  Hz) montre qu'ils sont dans une configuration cis. La position de l'hydroxyle en C-3 est clairement démontrée par les constantes de couplage des H-2 et H-3  $J_{2,3} = J_{3,2} = 5,3$  Hz (Figure 56). L'ensemble des résultats est regroupé dans le Tableau 31.

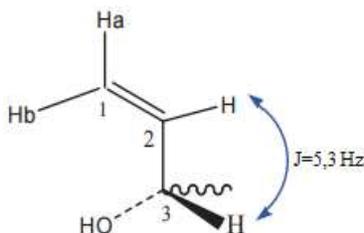


Figure 56 : position de l'hydroxyle en C-3

L'évaluation du spectre hétéronucléaire HSQC (Figure 57) nous a permis de démontrer que :

- Les protons éthyléniques situés à  $\delta_H = 5,45$  ppm et  $\delta_H = 5,20$  ppm sont portés par le carbone localisé à  $\delta_C = 117,2$  ppm.
- Le proton éthylénique à  $\delta_H = 5,9$  est attaché au carbone résonnant à  $\delta_C = 136,3$  ppm,
- Le proton à  $\delta_H = 4,9$  ppm est lié au carbone situé à  $\delta_C = 63,6$  ppm,
- Le proton à  $\delta_H = 3,02$  ppm est attaché au carbone localisé à  $\delta_C = 17,8$  ppm,
- Le proton à  $\delta_H = 5,36$  ppm est porté par le carbone résonnant à  $\delta_C = 122,1$  ppm,
- Le proton à  $\delta_H = 5,50$  ppm est attaché au carbone situé à  $\delta_C = 133,2$  ppm.
- Le proton à  $\delta_H = 2,01$  ppm est porté par le carbone résonnant à  $\delta_C = 27,3$  ppm.
- Le proton à  $\delta_H = 0,87$  ppm est lié au carbone situé à  $\delta_C = 14,3$  ppm.

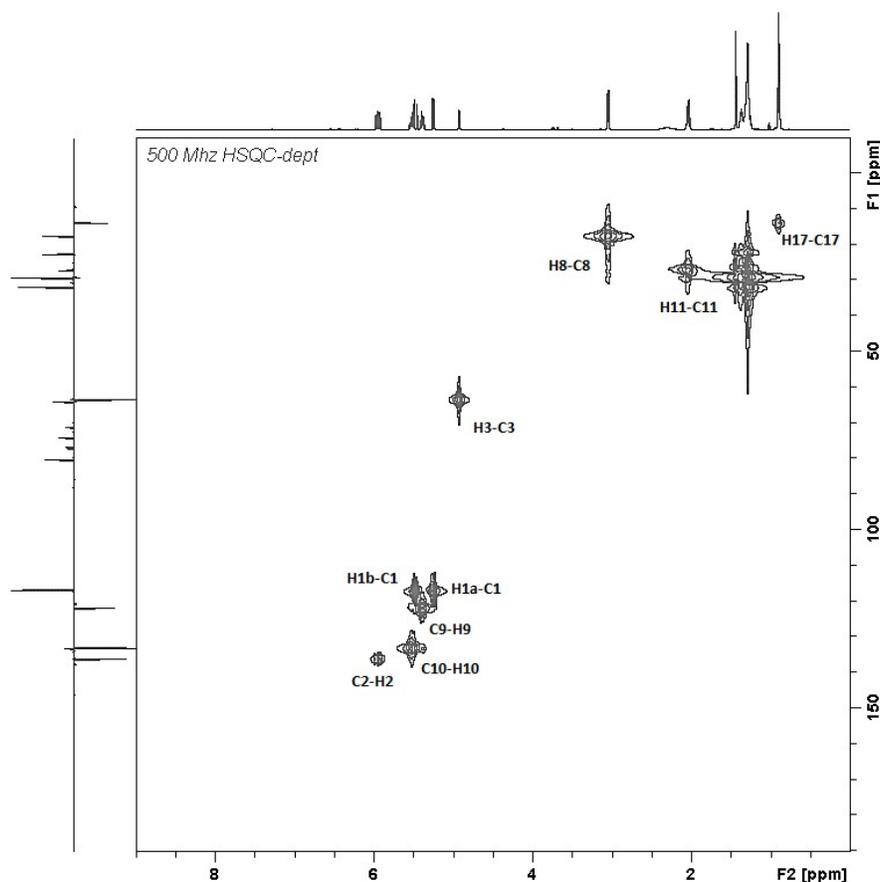


Figure 57 : Spectre HSQC du produit C1.4 ( $\text{CDCl}_3$ )

La corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC nous a permis de reconstituer le squelette de la molécule en prenant comme point de départ les protons du carbone  $\delta_{\text{C}} 117,1$  ppm de la double liaison terminale :

- Le carbone quaternaire résonnant à  $\delta_{\text{C}} = 74,4$  (C-4) est lié au carbone situé à  $\delta_{\text{C}} = 63,6$  (C-3), ce qui est suggéré par la corrélation entre les protons à  $\delta_{\text{H}} = 5,22$  (H-1a) ;  $\delta_{\text{H}} = 5,45$  (H-1b) ;  $\delta_{\text{H}} = 5,92$  (H-2) et  $\delta_{\text{H}} = 4,90$  (H-3) et le carbone quaternaire (Figure 58).
- Le proton à  $\delta_{\text{H}} = 4,9$  est corrélé aux 4 carbones quaternaires, ce qui justifie son emplacement juste avant le carbone à  $\delta_{\text{C}} = 74,4$  (C-4).
- Le proton à  $\delta_{\text{H}} = 3,02$  du carbone C-8 est corrélé aux 4 carbones quaternaires, ainsi qu'aux carbones de la double liaison  $\delta_{\text{C}} = 122,1$  et  $\delta_{\text{C}} = 133,2$  ; il se situe donc entre le carbone C-9 de la double liaison C-9=C-10 et le carbone quaternaire C-7 de la triple liaison C-6  $\equiv$  C-7 ce qui justifie le signal du proton fortement déblindé du  $\text{CH}_2$  ( $\delta_{\text{H}} = 3,02$ ).
- Le proton à  $\delta_{\text{H}} = 5,36$  (H-9) est fortement corrélé avec le carbone quaternaire  $\delta_{\text{C}} = 80,4$  (C-7) ce qui justifie son emplacement du côté de la triple liaison (Figure 58). Et celui à  $\delta_{\text{H}} = 5,5$  (H-10) est corrélé aux carbones de la chaîne aliphatique  $\delta_{\text{C}} = 27,3$  (C-11) et  $\delta_{\text{C}} = 29,4$  (C-12) ce qui justifie son emplacement du côté de la chaîne aliphatique.
- Les liaisons des carbones de la chaîne aliphatique sont reconstituées en prenant comme point de départ les protons du carbone  $\delta_{\text{C}} = 14,3$  (C-17) du groupe méthyle terminal.

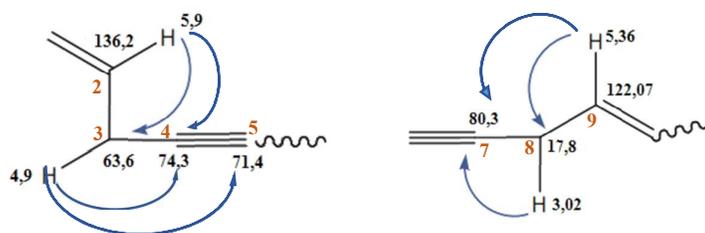


Figure 58: Principales corrélations HMBC du C1.4

Les données spectrales que nous avons obtenues sont en accord avec les données publiées pour cette molécule [268] et nous ont permis d'identifier C1.4 comme étant le 3R,9(Z)-heptadéca-1,9-diène-4,6-diyn-3-ol (Figure 50). Cette molécule est communément appelée le falcarinol.

Tableau 31 : RMN  $^1\text{H}$  du C1.4

Déplacement chimique ( $\delta$ ppm)	Intégration	Multiplicité (J en Hz)	Attributions
5,45	1	ddd (17; 1,2; 0,9)	H-1b
5,22	1	ddd (10,1; 1,4; 0,9)	H-1a
5,92	1	ddd (17; 10; 5,3)	H-2
4,90	1	d (5,3)	H-3
3,02	2	dd (6,8; 0,6)	H-8
5,36	1	dt (10,5; 6,9; 1,5)	H-9
5,50	1	dt (10,5; 7,3; 1,6)	H-10
2,01	2	q (7,2)	H-11
1,34	2	m	H-12
1,26	8	m	H-13 à H-16
0,87	3	t (6,9)	H-17
1,41	1	s	OH

Tableau 32 : RMN  $^{13}\text{C}$  du C1.4

Déplacement chimique ( $\delta$ ppm)	DEPT	Attributions	Corrélation avec H HSQC
117,18	CH2	C-1	H-1a, H-1b
136,28	CH	C-2	H-2
63,64	CH	C-3	H-3
74,4	C	C-4	-
71,4	C	C-5	-
64,18	C	C-6	-
80,4	C	C-7	-
17,82	CH2	C-8	H-8
122,1	CH	C-9	H-9
133,22	CH	C-10	H-10
27,34	CH2	C-11	H-11
29,38	CH2	C-12	H-12
29,34	CH2	C-13	H-13
29,3	CH2	C-14	H-14
31,98	CH2	C-15	H-15
22,89	CH2	C-16	H-16
14,3	CH3	C-17	H-17

#### IV. 4.2. Détermination structurale du composé A6

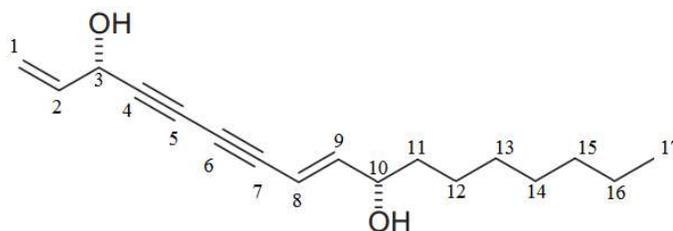


Figure 59 : Structure du composé A6

Le composé A6 a été isolé sous forme d'une huile jaunâtre. En CCM, il possède un rapport frontal de 0,1 lorsque la plaque CCM est éluee avec un mélange toluène/ AcOEt (28,5:1,5) comme solvant de migration. Le composé est révélé sous UV à 254 nm, et après révélation à l'anisaldéhyde sulfurique il apparaît sous forme d'une tache rouge-brune à la lumière du jour.

#### IV. 4.2.1. Spectrométrie de masse

Le spectre de masse haute résolution obtenu en mode ESI positif a généré un ion  $[M+H]^+$  de  $m/z$  261,18491. Ce qui est compatible avec une composition élémentaire  $C_{17}H_{25}O_2$  qui comporte 6 insaturations.

Le composé A6 possède donc une formule brute  $C_{17}H_{24}O_2$ , soit une masse de 260,18491 avec un degré d'insaturation de 6.

#### IV. 4.2.2. Spectroscopie RMN

Le spectre RMN du  $^{13}C$  enregistré en *J-modulé* dans le  $CDCl_3$  confirme la présence de 17 carbones.

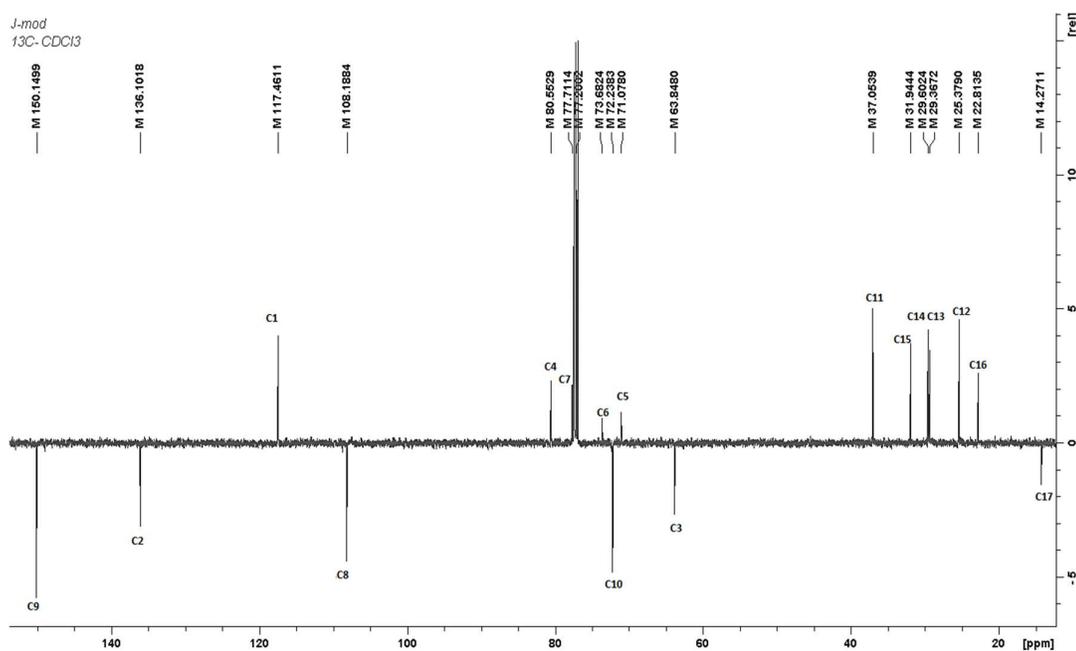


Figure 60 : Spectre de RMN du  $^{13}C$  en *J-modulé* du composé A6 (500 MHz,  $CDCl_3$ )

L'analyse du spectre RMN du  $^{13}C$  de ce composé (Figure 60) indique qu'il y a une certaine ressemblance de structure avec le composé précédent. On observe :

- Les deux carbones oléfiniques de la double liaison terminale, dont les déplacements sont similaires à ceux de la molécule précédente  $\delta_C = 117,5$  et  $\delta_C = 136,10$ , ainsi que le carbone allylique à  $\delta_C = 63,8$  également présent dans la molécule précédente.
- La présence de quatre carbones quaternaires ayant également des déplacements typiques des triples liaisons conjuguées ( $\delta_C = 71,1$ ,  $\delta_C = 73,7$ ,  $\delta_C = 77,2$ ,  $\delta_C = 80,5$ )
- Le groupement méthyle terminal à  $\delta_C = 14,3$

- 4 méthylènes dont les déplacements sont similaires aux méthylènes terminaux de la chaîne aliphatique de la molécule précédente ( $\delta_C = 22,8$ ,  $\delta_C = 29,4$ ,  $\delta_C = 29,6$ ,  $\delta_C = 31,9$ ).
- Les signaux correspondant à des CH fortement déblindés oléfiniques  $\delta_C = 108,2$  et  $\delta_C = 150,1$ . Cependant ces signaux ont des déplacements différents de ceux des carbones de la double liaison de la molécule précédente.
- L'ensemble de ces informations permet aussi de conclure qu'il s'agit d'un polyacétylène aliphatique à 17 atomes de carbone

En conclusion, ces constatations ainsi que les informations supplémentaires fournies par l'expérience de corrélation directe  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , HSQC, permettent de distinguer 4 carbones quaternaires, 7  $\text{CH}_2$ , 1  $\text{CH}_3$  et 5 CH. Le signal à  $\delta_C = 72,2$  correspond donc à un CH dont le signal déblindé pourrait être expliqué par sa liaison avec un groupement hydroxyle (non visible sur le spectre), la présence de ce second groupement hydroxyle est confirmée par le spectre de masse.

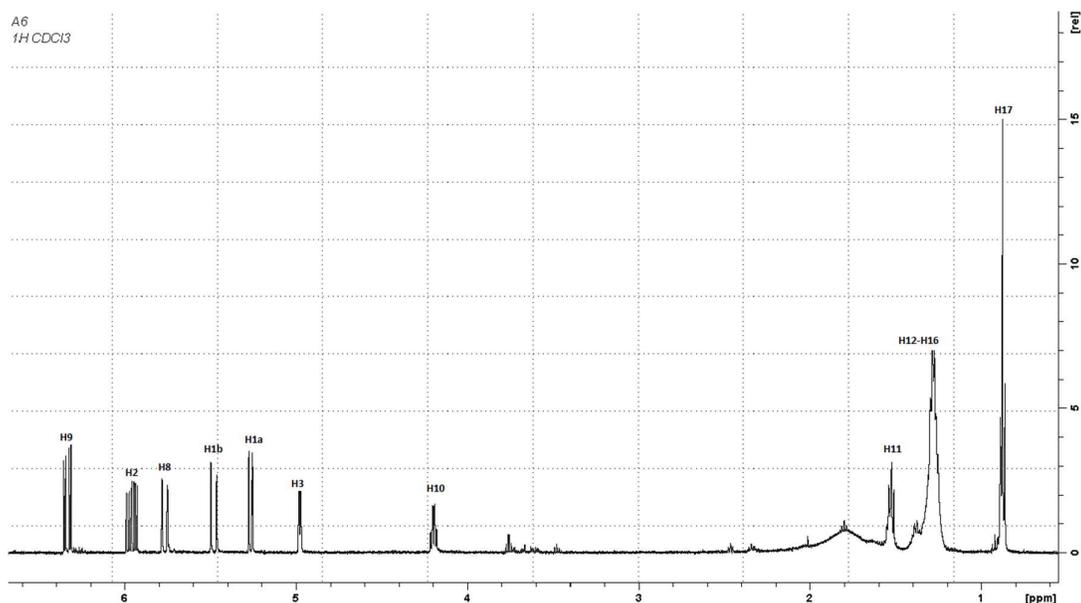


Figure 61 : Spectre du  $^1\text{H}$  du composé A6 (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Les spectres du proton (Figure 61) et COSY 1H-1H indiquent la présence de :

- Un système ABX de la double liaison terminale similaire à celui de la molécule précédente, à  $\delta_H = 5,26$  ppm (1H, ddd,  $J = 10,2$  Hz, 1,2 Hz, 0,9 Hz H-1a), à  $\delta_H = 5,48$  ppm (1H, ddd,  $J = 17,0$  Hz, 1,3 Hz, 0,9 Hz, H-1b) et à  $\delta_H = 5,96$  ppm (1H, ddd,  $J = 17,0$  Hz, 10,2 Hz, 5,3 Hz, H-2).
- Trois protons à  $\delta_H = 6,35$  ppm (1H, dd,  $J = 16,0$  Hz ; 5,6 Hz ; H-9),  $\delta_H = 5,76$  ppm (1H, dd,  $J = 16,0$  Hz ; 1,5 Hz ; H-8) et  $\delta_H = 4,19$  ppm (1H, q,  $J = 6,0$  Hz ; H-10) formant un second système ABX qui n'était pas présent dans la molécule précédente (Figure 62).

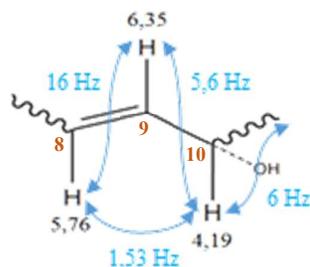
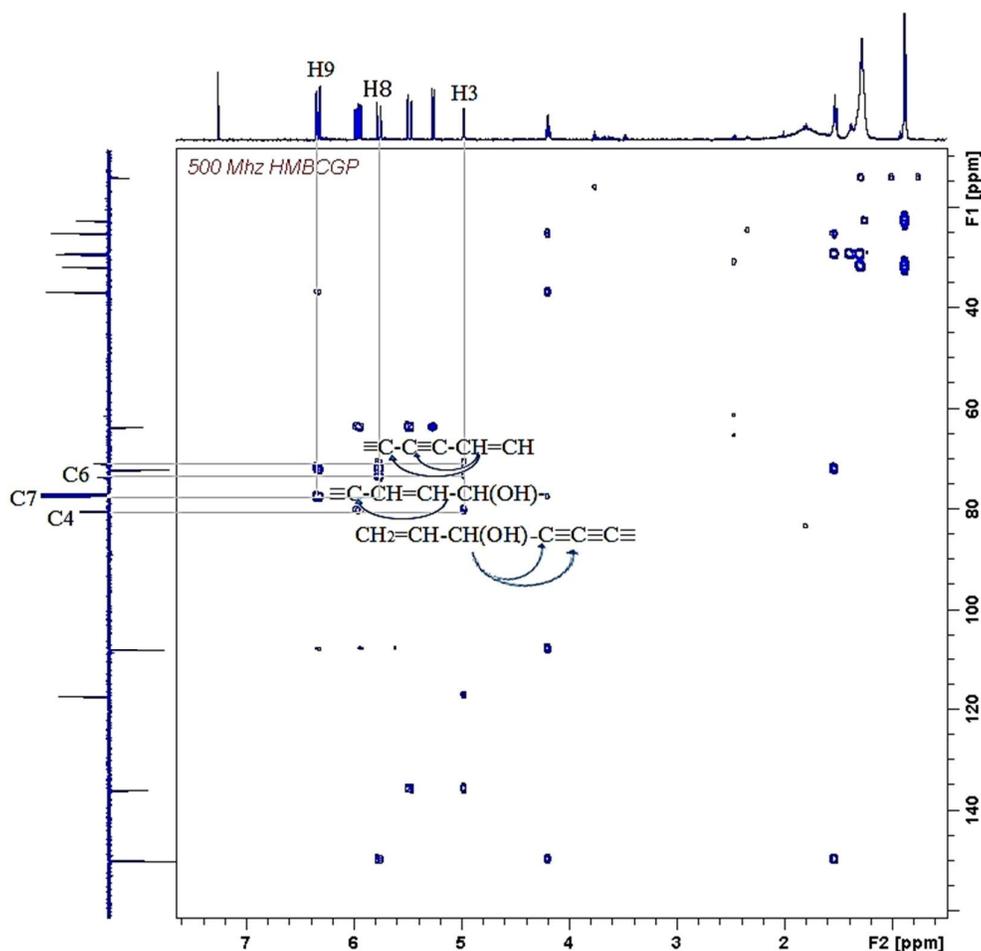


Figure 62 : Corrélations proton-proton (H-8, 9 et 10) du spectre COSY

- Les valeurs élevées des constantes de couplage entre H-1b et H-2 (17 Hz) et entre H-8 et H-9 ( $J = 16$  Hz) indiquent que ces protons sont dans une configuration trans. La position des deux hydroxyles en C-3 et en C-10 est clairement démontrée respectivement par leurs constantes de couplage  $J_{2,3} = J_{3,2} = 5,3$  Hz et  $J_{9,10} = J_{10,9} = 5,6$  Hz.
- En ce qui concerne le reste de la molécule, il s'agit de la chaîne aliphatique à 7 carbones.

Les expériences de corrélation directe  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC et de corrélation indirecte  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (Figure 63) permettent d'identifier les caractéristiques de ce squelette :

- Deux doubles liaisons déduites de la présence des signaux de trois carbones tertiaires éthyléniques (108,8 ; 136,1 ; et 150,1 ) portant les protons à 5,76 ; 5,96 et 6,35 respectivement et du carbone secondaire oléfinique (117,46 ) portant les protons à 5,26 et 5,48 .
- Deux carbones tertiaires à 63,84 et à 72,23 portant les protons à 4,97 (1H ; ddd ; 5,3 ; 1,3 et 1,2 Hz) et 4,19 (1H ; q ; 6 Hz) respectivement, indiquant la présence des deux groupements hydroxyles.
- 6 méthylènes de la chaîne aliphatique terminale : 37,0 (C-11) ; 25,4 (C-12) ; 29,4 (C-13) ; 29,6 (C-14) ; 31,9 (C-15) ; 22,8 (C-16) , dont l'enchaînement a été déterminé par HMBC en prenant comme point de départ le méthyle terminale (3H, t, 6,9) à 14,27.
- A partir des corrélations observées sur le spectre  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY et celles qu'on a déjà vu précédemment, on déduit deux enchaînements : **(a)**  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}(\text{OH})$  ; **(b)**  $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-(\text{CH})_5-\text{CH}_3$ . Ces deux fragments sont reliés ensemble par les 4 carbones quaternaires dont l'ordre a été déterminé par HMBC.

Figure 63 : Spectre HMBC du produit A6 ( $\text{CDCl}_3$ )

Le spectre relatif à l'expérience HMBC montre des corrélations entre le proton ( $\delta_{\text{H}} = 4,97$ ) du CH du carbone 3 ( $\delta_{\text{C}} = 63,84$ ) et tous les carbones quaternaires reportés, de même le proton du carbone éthylénique ( $\delta_{\text{C}} = 108,2$ ) montre une corrélation avec tous les carbones quaternaires. D'autre part, le proton du carbone 2 ( $\delta_{\text{C}} = 6,0$ ) corréle avec le carbone quaternaire à  $\delta_{\text{C}} 80,5$  et celui du carbone 10 à  $\delta_{\text{C}} = 72,23$  corréle avec le carbone quaternaire  $\delta_{\text{C}} = 77,2$  ; ceci explique l'enchaînement de la molécule  $\text{CH}_2\text{-CH-CH(OH)-C}\equiv\text{C-C}\equiv\text{C-CH=CH-CH(OH)-}$ , ainsi que l'ordre des 4 carbones quaternaires.

Les données spectrales (Tableau 33 et Tableau 34) que nous avons obtenu sont en accord avec les données publiées pour cette molécule [269] et nous ont permis d'identifier A6 comme étant le (3S, 10S)-1,8-heptadecadiène-4,6-diyne-3,10-diol (Figure 59). Cette molécule est communément appelée le (3S, 10S)-panaxydiol.

Tableau 33 : RMN  $^1\text{H}$  du C1.4

Déplacement chimique ( $\delta$ ppm)	Intégration	Multiplicité (J en Hz)	Attributions
5,48	1	ddd (17,0 ; 1,3 ; 0,9)	H-1b
5,26	1	ddd (10,2 ; 1,3 ; 0,9)	H-1a
5,96	1	ddd (17 ; 10,2 ; 5,3)	H-2
4,97	1	ddd (5,3 ; 1,3 ; 1,3)	H-3
5,76	1	dd (16,0 ; 1,5)	H-8
6,35	1	dd (16,0 ; 5,6)	H-9
4,19	1	q (6,0)	H-10
1,53	2	m	H-11
1,3	10	m	H-12 à H-16
0,87	3	t (6,9)	H-17

Tableau 34 : RMN  $^{13}\text{C}$  du C1.4

Déplacement chimique ( $\delta$ ppm)	DEPT	Attributions	Corrélation avec H HSQC
117,46	CH2	C-1	H-1a, H-1b
136,10	CH	C-2	H-2
63,84	CH	C-3	H-3
80,55	C	C-4	-
71,07	C	C-5	-
73,68	C	C-6	-
77,2	C	C-7	-
108,18	CH	C-8	H-8
150,14	CH	C-9	H-9
72,23	CH	C-10	H-10
37,05	CH2	C-11	H-11
25,38	CH2	C-12	H-12
29,36	CH2	C-13	H-13
29,6	CH2	C-14	H-14
31,94	CH2	C-15	H-15
22,81	CH2	C-16	H-16
14,27	CH3	C-17	H-17

#### IV. 4.3. Identification du composé C2.4

Le composé C2.4 (Figure 64) a été isolé sous forme d'une huile légèrement jaunâtre. En CCM, C2.4 possède un rapport frontal de 0,54 lorsque la plaque CCM est éluée avec un mélange

éther de pétrole/AcOEt (20:2) comme solvant de migration. Le composé est révélé sous UV à 254 nm (tâche très claire) et apparaît sous forme d'une tache violette qui vire au vert après révélation à l'anisaldéhyde sulfurique (Figure 65).

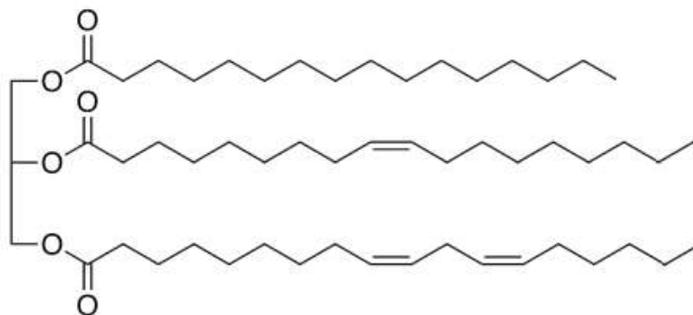


Figure 64 : structure du composé C2.4



Figure 65 : CCM du composé C2.4 (élution EP/AcOEt 20 :2) révélé à l'anisaldéhyde sulfurique.

Contrairement aux composés décrits précédemment, l'identification du composé C2.4 a été principalement fondée sur la présence de signaux caractéristiques des triacylgcérols en RMN du  $^1\text{H}$ .

Barison et *al* (2010) décrivent que leur méthode d'identification par RMN- $^1\text{H}$  présente de nombreux avantages par rapport à l'identification classique des triglycérides par chromatographie en phase gazeuse, et ceci pour plusieurs raisons :

- Cette méthode ne nécessite pas des prétraitements des échantillons, comme la dérivation, qui sont parfois lents et peuvent introduire des erreurs expérimentales.
- Cette méthode est plus efficace et reproductible que la CPG.
- Cette méthode est également plus précise, simple et plus rapide [269].

La Figure 66 représente les signaux caractéristiques de l'unité glycérol ainsi que ceux relatifs aux différents acides gras pouvant composer le groupement -R caractéristique du triglycéride, comparé avec ceux du composé C2.4.

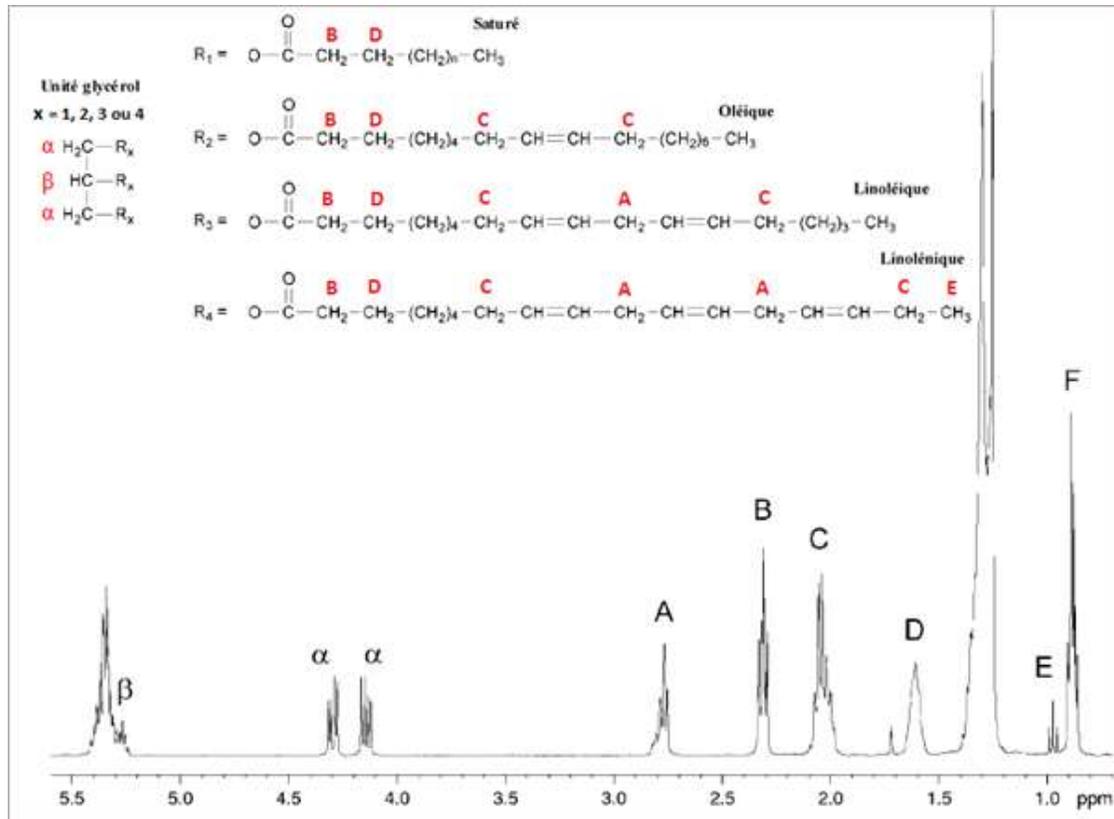


Figure 66 : représentation du spectre RMN- $^1\text{H}$  montrant les signaux caractéristiques du triglycéride : unité glycérol et différents types d'acides gras.

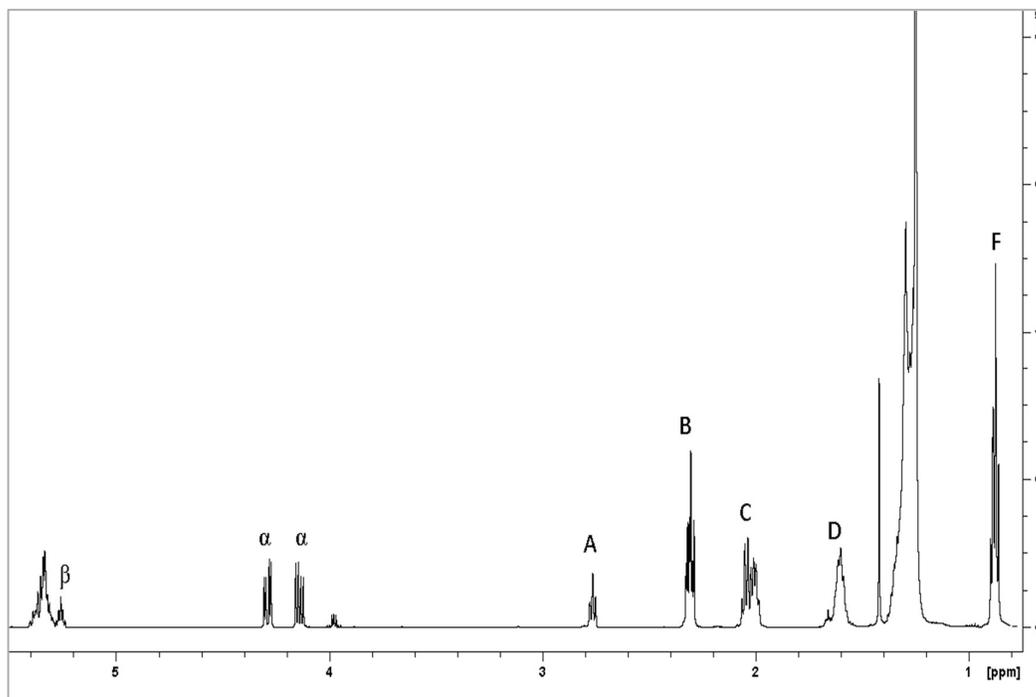


Figure 67 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H du composé C2.4. (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

En comparant le spectre de la molécule C2.4 (Figure 67) avec les signaux caractéristiques des triglycérides [269], on remarque la présence de :

- Deux signaux  $\alpha$  situés à  $\delta_H = 4,12$  et  $4,27$ , correspondant aux 2 méthylènes de l'unité glycérol.
- Le signal  $\beta$  situé à  $\delta_H = 5,24$ , correspondant au CH intermédiaire de l'unité glycérol.
- Le signal A situé à  $\delta_H = 2,74$ , correspondant au méthylène (H-11) localisé entre les deux CH oléfiniques des deux doubles liaisons au niveaux des protons H-9 et H-10 et ceux des protons H-12 et H-13 de l'acide linoléique.
- Les signaux B et D situés à  $\delta_H = 2,28$  et  $1,58$  respectivement, correspondants au méthylènes (H-2 et H-3) situés du côté du carbone carboxylique C-1.
- Le signal C situé à  $\delta_H = 2,0$ , correspondant aux deux méthylènes (H-11 et H-14) situés de part et d'autre des deux doubles liaisons dans le cas de l'acide linoléique ou des deux méthylènes (H-8 et H-11) situés de part et d'autre de la double liaison unique dans le cas de l'acide oléique.

Cependant, on remarque l'absence du signal E caractéristique du CH<sub>3</sub> terminal de l'acide linoléique, d'où on conclut l'absence de cet acide gras au niveau de notre triglycéride.

Selon Barison et *al* (2010), la détermination des acides gras constituant les 3 chaînes du triacylglycérol repose sur les pourcentages relatifs calculés à partir de l'intégration de chaque signal caractéristique des acides gras : linoléiques (absents dans notre cas), linoléiques, oléiques et saturés. En effet, les acides gras constituant un triglycéride peuvent correspondre

soit à 3 acides gras de même type, soit à deux acides gras de même type avec un acide gras différent, soit à 3 acides gras différents.

Etant donné que les intégrations des protons en RMN-<sup>1</sup>H est proportionnelle au nombre d'hydrogènes dans l'échantillon, la composition des acides gras du triglycéride est déterminée par la relation entre les intégrations des différents signaux caractéristiques de chaque chaîne d'acide gras avec l'un des signaux caractéristiques de l'unité glycérol. Pour ceci on peut choisir l'un des signaux raisonnant à 4,12 ou 4,27 des hydrogènes  $\alpha$  du glycérol (d'intégration 2 H). En absence d'acide linoléique dans l'échantillon, on commence par le signal A qui est présent uniquement dans l'acide linoléique. Si on suppose que le triglycéride contient uniquement l'acide linoléique (3 chaînes d'acide linoléique), le ratio est tel qu'on a deux protons  $\alpha$  du glycérol pour 6 protons des 3 CH<sub>2</sub> des acides linoléiques présents dans le triglycéride. C'est-à-dire qu'un ratio de 33,3 % des signaux  $\alpha$  (4,27 ppm) par rapport aux signaux A donnent un triglycéride composé de 100 % d'acide linoléique.

Cependant, le ratio calculé dans notre molécule est égal à 11,11 % (Le signal A est d'intégration 2), ce qui signifie que notre molécule est constituée uniquement de 1/3 d'acide linoléique c'est-à-dire une seule chaîne d'ester de cet acide gras.

Pour calculer le pourcentage d'acide oléique dans la molécule, on applique la même méthode de calcul que précédemment sauf que pour cet acide gras il faut considérer que le signal caractéristique C est présent aussi dans l'acide linoléique (Figure 66). Il faut alors calculer en premier lieu le ratio des signaux C en supposant que le triglycéride est composé uniquement d'acide oléique. Pour ce faire nous connaissons que 2 H du signal  $\alpha$  (4,27 ppm) doivent correspondre à 12 H des 3 CH<sub>2</sub> (des signaux C) présents dans les 3 chaînes d'acide oléique (composée chacune de 2 signaux C). Le ratio calculé correspond alors à 16,7 %. C'est-à-dire que 16,7 % des signaux  $\alpha$  (4,27 ppm) par rapport aux signaux C donnent un triglycéride composé de 100 % d'acide oléique. Cependant, pour notre triglycéride, le signal C donne une intégration de 8, et en soustrayant les 4 protons des signaux C de l'acide linoléique, le ratio calculé donne une valeur de 5,55 %, c'est-à-dire que notre molécule est composée uniquement de 1/3 d'acide oléique. Le même calcul a été réalisé pour les signaux B et D confirmant que la molécule est finalement constituée de 1/3 d'acide gras saturé. Finalement, on conclut que la molécule du triglycérides C2.4 est constituée de 3 chaînes d'esters d'acides gras : acide linoléique, acide oléique et acide gras saturé.

Le spectre J-modulé de C2.4 est composé de 10 carbones correspondant à CH ou CH<sub>3</sub> et 45 carbones correspondant à CH<sub>2</sub> ou C. L'acide gras saturé est constitué alors de 16 carbones dont 12 CH<sub>2</sub>, il correspond de ce fait à l'acide palmitique. Par conséquent, cette méthode d'identification basée sur les travaux de Barison et *al* (2010) nous a permis d'identifier les trois acides gras composant la structure glycéridique comme étant l'acide linoléique, l'acide oléique, et l'acide palmitique.

Afin d'élucider la position de chaque acide gras sur le squelette glycérol, nous nous sommes fiés aux données de la littérature. Le seul triglycéride contenant l'acide linoléique, l'acide oléique, et l'acide palmitique décrit dans la littérature chez les végétaux supérieurs était le 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-linoleoyl-rac-glycerol (POL), qui est un triglycéride commun dans les

huiles végétales, ayant en position interne l'acide oléique. Les déplacements chimiques des protons du composé C2.4 sont en adéquation avec ceux obtenus pour le POL décrits dans la littérature [270] ce qui nous permet de confirmer l'identification de ce composé comme étant le 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-linoléoyl-rac-glycerol (Figure 69).

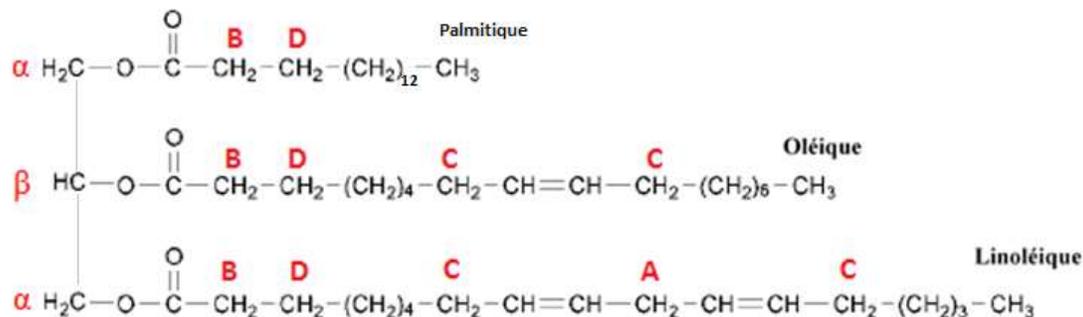


Figure 68 : Structure du composé C2.4

#### IV. 4.4. Détermination structurale du composé CP7-G3

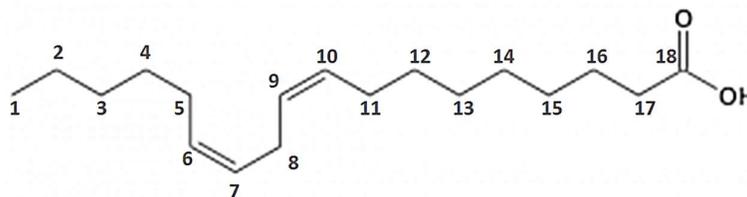


Figure 69 : composé CP7-G3

Le composé CP7-G3 (Figure 69) a été isolé sous forme d'une huile légèrement jaunâtre. En CCM, CP7-G3 possède un rapport frontal de 0,4 lorsque la plaque CCM est éluée avec un mélange EP/ AcOEt (20:5) comme solvant de migration. Le composé est révélé sous UV à 254 nm, et après révélation à l'anisaldéhyde sulfurique il apparaît sous forme d'une tache violette à la lumière du jour.

Le spectre RMN du <sup>1</sup>H de ce composé est un spectre typique d'un acide gras insaturé. En effet, les acides gras et particulièrement les acides gras insaturés donnent des signaux spécifiques en RMN du <sup>1</sup>H (cf. identification du composé C2.4). La Figure 70 représente le spectre RMN-<sup>1</sup>H du CP7-G3 comparé avec le spectre du triglycéride C2.4 décrit dans la section précédente.

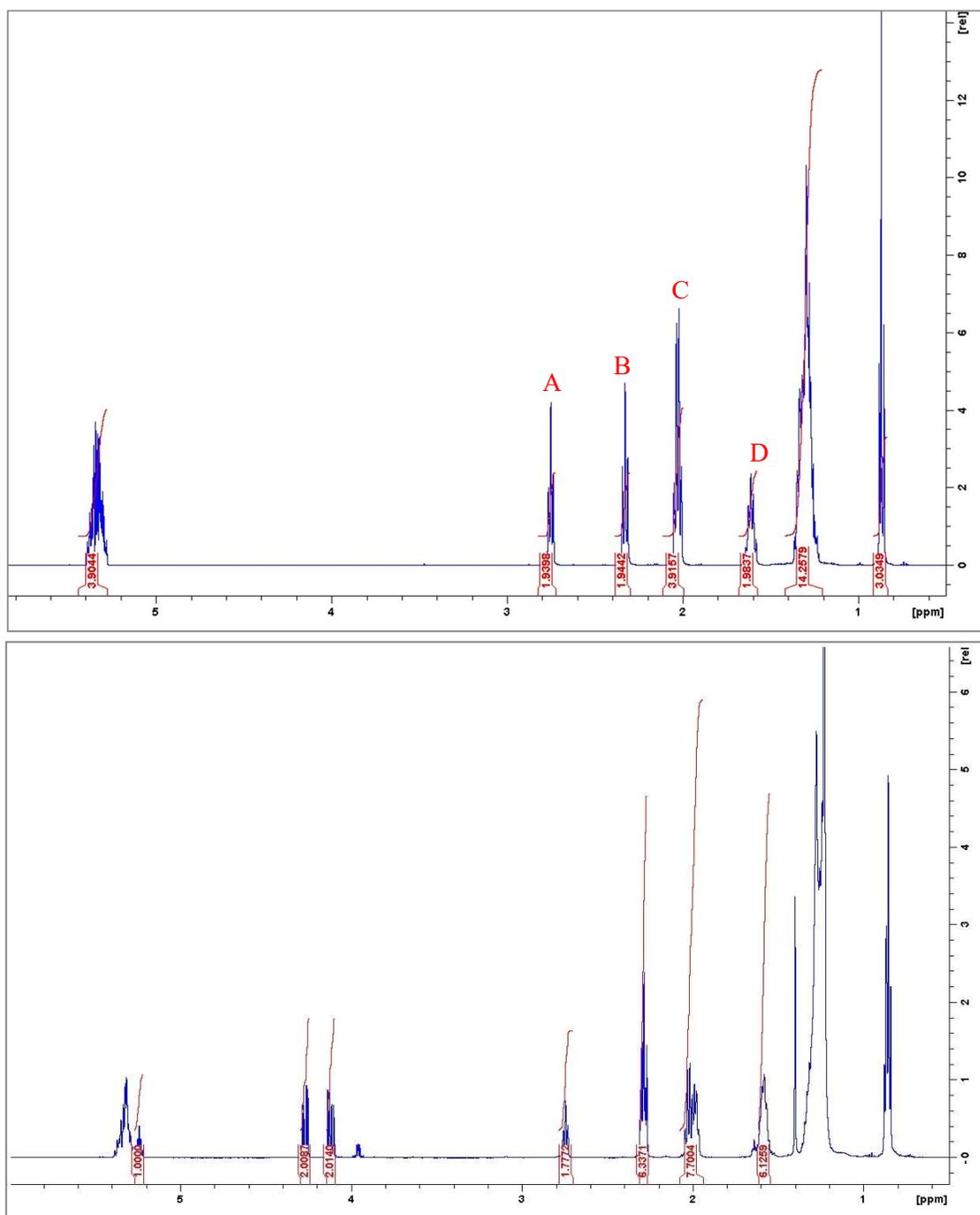


Figure 70 : spectre RMN- $^1\text{H}$  du composé CP7-G3 (en haut) et spectre RMN- $^1\text{H}$  du composé C2.4 (en bas). (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Par rapport au spectre RMN- $^1\text{H}$  du composé C2.4, on remarque l'absence des signaux caractéristiques de l'unité glycérol, c'est-à-dire les deux signaux  $\alpha$  ( $\delta_{\text{H}} = 4,12$  et  $4,27$  ppm) correspondant aux 2 méthylènes de l'unité glycérol ; et le signal  $\beta$  ( $\delta_{\text{H}} = 5,24$  ppm) correspondant au CH intermédiaire.

La comparaison des signaux caractéristiques (A, B, C et D) avec les données de la littérature permet, en premier lieu, d'identifier cet acide gras comme étant l'acide linoléique  $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$  (Figure 71) [269] [271].

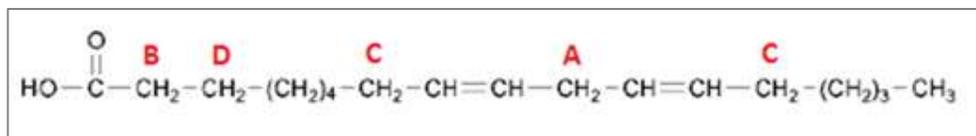


Figure 71 : Structure de l'acide linoléique montrant les fragments (A, B, C et D) ayant des signaux spécifiques en RMN- $^1\text{H}$

Le spectre RMN du  $^{13}\text{C}$  enregistré en *J-modulé* dans le  $\text{CDCl}_3$  confirme la présence de 18 carbones.

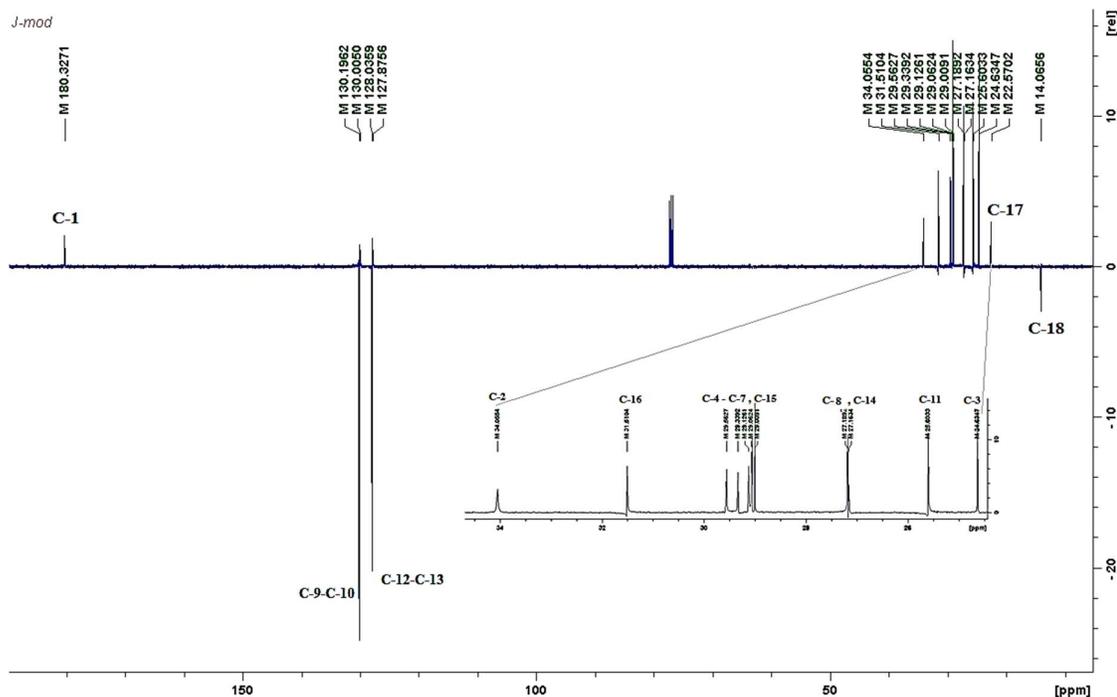


Figure 72 : Spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  en *J-modulé* du composé CP7-G3 (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure 72) et les informations supplémentaires fournies par l'expérience de corrélation directe  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , HSQC, permettent de distinguer 5 signaux qui peuvent provenir de carbones primaires ou tertiaires dont 4 signaux correspondent à des CH fortement déblindés oléfiniques ( $\delta$  127,8 ;  $\delta$  128,0 ;  $\delta$  130,0 et  $\delta$  130,2) et un carbone qui correspond à un groupement méthyle terminal ( $\delta$  14,1). On distingue aussi un seul carbone quaternaire fortement déblindé ( $\delta$  180,3) qu'on attribue au C-1 carboxylique. On distingue 13 carbones qui se situent entre  $\delta$  22,5 et  $\delta$  34,0 qui correspondent aux  $\text{CH}_2$  du reste de la chaîne d'acide gras.

L'évaluation du spectre hétéronucléaire HSQC nous a permis de démontrer que :

- Les protons du signal caractéristique B situés à  $\delta_{\text{H}} = 2,3$  sont portés par le carbone situé à  $\delta_{\text{C}} = 34,1$  (C-2),
- Les protons du signal caractéristique D situés à  $\delta_{\text{H}} = 1,6$  sont attachés au carbone résonnant à  $\delta_{\text{C}} = 24,6$  (C-3),
- Les protons du signal caractéristique C situés à  $\delta_{\text{H}} = 2,0$  sont attachés aux carbones résonnant à  $\delta_{\text{C}} = 27,16$  et  $\delta_{\text{C}} = 27,18$  (C-8 et C-14),
- Les protons du signal caractéristique A situés à  $\delta_{\text{H}} = 2,7$  sont portés par le carbone situé à  $\delta_{\text{C}} = 25,6$  (C-11),
- Les protons éthyléniques situés à  $\delta_{\text{H}} = 5,3$  (un multiplet intégrant pour 4 H) sont portés par les carbones localisé à  $\delta_{\text{C}} = 127,8$  ;  $\delta_{\text{C}} = 128,0$  ;  $\delta_{\text{C}} = 130,0$  et  $\delta_{\text{C}} = 130,2$  (C-13, C-12, C10 et C-9 respectivement).
- Les protons du  $\text{CH}_3$  terminal situés à  $\delta_{\text{H}} = 0,87$  sont attachés au carbone résonnant à  $\delta_{\text{C}} = 14,0$ .

Les données spectrales obtenues (Tableau 35 et Tableau 36) sont conformes aux données publiées pour cette molécule [271] et nous ont permis d'identifier CP7-G3 comme étant le 9(Z),12(Z)-acide linoléique (Figure 69).

Tableau 35 : RMN  $^1\text{H}$  du CP7-G3

Déplacement chimique ( $\delta$ ppm)	Intégration	Multiplicité (J en Hz)	Attributions
2,33	2	t (7,5)	H-2
1,61	2	m	H-3
1,22-1,37	14	m	H-4-H-7 et H-15-H-17
2,03	4	q (7)	H-8 et H-14
2,75	2	dd (6,8 ; 0,6)	H-11
5,33	4	m	H-9-H-10 et H-12-H-13
0,87	3	t (6,9)	H-18

Tableau 36 : RMN  $^{13}\text{C}$  du C1.4

Déplacement chimique ( $\delta$ ppm)	DEPT	Attributions	Corrélation avec H HSQC
180,32	C	C-1	-
130,19	CH	C-9	H-9
130,0	CH	C-10	H-10
128,0	CH	C-12	H-12
127,87	CH	C-13	H-13
34,05	CH <sub>2</sub>	C-2	H-2
31,51	CH <sub>2</sub>	C-16	H-16
29,56-29,0	CH <sub>2</sub>	C-4-C-7, C-15	H-4-H-7 et H-15
27,18	CH <sub>2</sub>	C-8	H-8
27, 16	CH <sub>2</sub>	C-14	H-14
25,6	CH <sub>2</sub>	C-11	H-11
24,6	CH <sub>2</sub>	C-3	H-3
22,57	CH <sub>2</sub>	C-17	H-17
14, 06	CH <sub>3</sub>	C-18	H-18

#### IV. 5. Evaluation de l'activité antibactérienne des composés actifs isolés

##### IV. 5.1. Criblage de l'activité antibactérienne

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne des produits isolés qui ont montré une activité inhibitrice lors du criblage en bioautographie d'immersion (composés C1.4 et A6), nous avons choisi d'étudier leur effet sur des souches hautement résistantes aux antibiotiques. Nous avons donc réalisé en premier lieu un criblage de l'activité sur 35 bactéries incluant 32 souches multirésistantes (types de résistances définis) dont 23 bactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE).

Les BLSE sont des enzymes à large spectre, conférant une résistance bactérienne à la quasi-totalité des  $\beta$ -lactamines (pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes et monobactames) [272]. Les bactéries productrices de BLSE posent un véritable problème de santé publique [273], en effet plus de 200 BLSE sont actuellement décrites et leur diffusion à travers le monde est associé à des taux de morbidité et de mortalité élevés [20].

22 bactéries des 23 souches productrices de BLSE utilisées pour ce test ont le gène, codant pour l'enzyme de résistance, déterminé (cf. matériel et méthodes partie IV.1.1.2).

Ce premier criblage a été réalisé par la méthode de dilution en gélose. Cette méthode nécessite des quantités importantes de produits, pour cette raison nous n'avons réalisé ce test que sur le composé C1.4 (1,3 g) et la fraction CP9E1 enrichie en composé A6 (46 %). Nous avons aussi testé l'activité de l'extrait brut afin de comparer le pouvoir antibactérien des composés purifiés avec leur extrait d'origine. Les caractéristiques des souches sélectionnées sont répertoriées dans le Tableau 37.

Tableau 37 : Caractéristiques des souches sélectionnées

N°	Nom		Type	Resistance
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10276	BLSE	PER-1
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10280	BLSE	VIM-2
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10278	BLSE	GES-2
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8136		Production d'une penicillinase et défaut porine D2
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8134		Résistance aux Fluoroquinolone et aminosides
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27583		NA
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8131		Sauvage
8	<i>Escherichia coli</i>	11006	BLSE	CTX M15
9	<i>Escherichia coli</i>	11014	BLSE	VIM 2
10	<i>Escherichia coli</i>	11008	BLSE	SHV 2A
11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11024	BLSE	CTX M15
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11032	BLSE	NDM 1
13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11028	BLSE	TEM 3
14	<i>Klebsiella Oxytoca</i>	11049	BLSE	CTX M15
15	<i>Salmonella sp</i>	11037	BLSE	CMY 2
16	<i>Enterobacter cloacae</i>	10281	BLSE	KPC-2
17	<i>Enterobacter cloacae</i>	11053	BLSE	NDM 1
18	<i>Enterobacter cloacae</i>	11055	BLSE	OXA 43
19	<i>Enterobacter aerogenes</i>	9004	BLSE	BLSE
20	<i>Serratia marcescens</i>	11057		Cephalosporinase HN 2
21	<i>Serratia marcescens</i>	10267	BLSE	KPC-2
22	<i>Serratia marcescens</i>	10271	BLSE	SME-1
23	<i>Proteus mirabilis</i>	11062	BLSE	TEM 21
24	<i>Proteus mirabilis</i>	11064	BLSE	ACC 1
25	<i>Citrobacter freundii</i>	11045	BLSE	CTX M15
26	<i>Citrobacter freundii</i>	11043	BLSE	TEM 3
27	<i>Acinetobacter baumannii</i>	10275	BLSE	VIM 4
28	<i>Acinetobacter baumannii</i>	9010	BLSE	VEB 1
29	<i>Staphylococcus aureus</i>	8241		Résistance à la méticilline, kanamycine et tobramycine (phénotype KT), et fluoroquinolones
30	<i>Staphylococcus aureus</i>	8148		Resistance à la méticilline et fluoroquinolones
31	<i>Staphylococcus aureus</i>	8143		Résistance à la méticilline, kanamycine et tobramycine (phénotype KT)
32	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	8237		Sauvage
33	<i>Enterococcus faecalis</i>	8152		Resistante aux aminosides bas niveau
34	<i>Enterococcus faecalis</i>	8153		Resistance MLSb (Resistance à erythromycine et clindamycine et sensibilité pristinamycine
35	<i>Enterococcus faecium</i>	9001		Multi résistante

Pour l'extrait brut et la fraction enrichie CP9E1 nous avons testé des concentrations allant de 1250 à 2 µg/ml, et pour le composé pur C1.4 les concentrations testées s'échelonnent de 312 à 0,3 µg/ml.

Les résultats (Tableau 38) prouvent que les produits testés possèdent une forte activité antibactérienne contre les bactéries Gram<sup>+</sup> multirésistantes, mais nous avons aussi constaté une forte inhibition de certaines bactéries Gram<sup>-</sup> et particulièrement une activité ciblée contre les souches de *Pseudomonas aeruginosa* multirésistantes et productrices de BLSE. On constate aussi une forte inhibition de la bactérie *Acinetobacter baumannii* (BLSE, VIM-4), une bactérie responsable d'infections nosocomiales survenant le plus souvent par épidémies et qui pose un problème émergent de multi-résistance aux antibiotiques. Son gène de résistance VIM-4, β-lactamase de classe B, est responsable de l'hydrolyse des carbapénèmes.

Sur l'ensemble des résultats, le composé C1.4 présente une activité beaucoup plus importante que celle de l'extrait brut avec des CMI allant de 19,5 à au-delà de 0,3 µg/ml.

L'activité de la fraction CP9E1 est quant-à elle comparable avec celle de l'extrait brut même si elle possède une plus forte inhibition des souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 38 : Activité antibactérienne des produits testés, CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )

	Gram-		Gram+	
<i>E. faecium</i>	9001	1250	1250	4,8
	8153	1250	-	19,5
<i>E. faecalis</i>	8152	150	625	2,4
	8237	312	1250	4,8
<i>S. saprophyticus</i>	8143	1250	625	4,8
	8148	312	625	4,8
<i>S. aureus</i>	8241	1250	-	9,7
	9010	-	-	-
<i>A. baumannii</i>	10275	>2,4	>2,4	<0,3
	11043	-	-	-
<i>C. freundii</i>	11045	-	-	-
	11064	-	-	-
<i>P. mirabilis</i>	11062	-	-	-
	10271	-	-	-
<i>S. marcescens</i>	10267	-	-	-
	11057	-	-	-
<i>E. aerogenes</i>	9004	-	-	-
	11055	-	-	-
<i>E. cloacae</i>	11053	-	-	-
	10281	-	-	-
<i>Salmonella. sp</i>	11037	-	-	-
	11049	-	-	-
<i>K. oxytoca</i>	11028	-	-	-
	11032	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	11024	-	-	-
	11008	-	-	-
<i>E. coli</i>	11014	-	-	-
	11006	-	-	-
	8131	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27583	-	-	-
	8134	>2,4	>2,4	<0,3
<i>P. aeruginosa</i>	8136	150	>2,4	2,4
	10278	-	1250	>0,3
<i>P. aeruginosa</i>	10280	-	-	-
	10276	-	-	19,5
Extrait Ep				
CP9E1				
CI.4				

Afin de déterminer la CMI et la CMB des produits purs sur les bactéries les plus sensibles à l'action de l'extrait brut et des produits testés précédemment, nous avons utilisé la méthode de dilution en milieu liquide sur les deux bactéries Gram+ : *Staphylococcus aureus* 8148, *Enterococcus faecalis* 8152 ; et les 3 souches de bactéries Gram- : *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa* 8136, 8134 et 10278) en réalisant 39 concentrations à partir de 1250 µg/ml.

Par la suite, nous avons déterminé la concentration minimale bactéricide à partir des concentrations correspondant à la CMI, CMI × 2 et CMI × 4.

D'après les travaux de Carbonnelle et *al.* [274], les substances antimicrobiennes sont considérées comme des agents bactéricides lorsque le rapport CMB/CMI est inférieur ou égal à 4. On considérera l'agent comme bactériostatique quand le rapport CMB/CMI est supérieur à 4.

Les résultats sont représentés dans le Tableau 39.

Tableau 39 : CMI et CMB des composés C1.4 et A6 (µg/ml)

	C1.4		A6		Antibiotiques*		
	CMI	CMB	CMI	CMB	LVX	G	FOX
<i>S. aureus</i> 8148	4,8 ± 0,00	9,6	150± 0,00	300	R	S	I
<i>E. faecalis</i> 8152	2,4 ± 1,39	4,8	150± 43,3	>600	R	I	R
<i>P. aeruginosa</i> 8136	0,6 ± 0,35	1,2	19± 5,1	75	R	R	R
<i>P. aeruginosa</i> 8134	0,00029 ± 0,00018	0,00029	4,8± 2,7	9,6	R	R	R
<i>P. aeruginosa</i> 10278	0,0023 ± 0,0013	>0,0092	0,0046± 0,0026	>0,018	R	R	R

\*Antibiogramme (EUCAST standardising antimicrobial susceptibility), LVX : lévofloxacine, G : gentamicine, FOX : céfoxitine, R : résistant, S : sensible, I : sensibilité intermédiaire.

Les résultats obtenus montrent que le falcarinol (C1.4) a une activité bactéricide contre toutes les bactéries testées sauf *P. aeruginosa* 10278. Le panaxydiol (A6) est également bactéricide contre la quasi-totalité des bactéries testées, il a toutefois une activité bactériostatique contre *E. faecalis* 8152 et *P. aeruginosa* 10278.

Le falcarinol était globalement plus actif contre les bactéries testées que le panaxydiol, et sur l'ensemble des bactéries inhibées, les *Pseudomonas aeruginosa* étaient les plus sensibles à l'action de ces 2 polyacétylènes, notamment *P. aeruginosa* 8134 résistante aux fluoroquinolones et aminosides et *P. aeruginosa* 10278 productrice de β-lactamases à spectre étendu (Figure 73). Le falcarinol représente particulièrement une activité inhibitrice contre *P. aeruginosa* 8134 avec des CMI et CMB égales à 0,29 ng/ml et une activité totalement bactéricide.

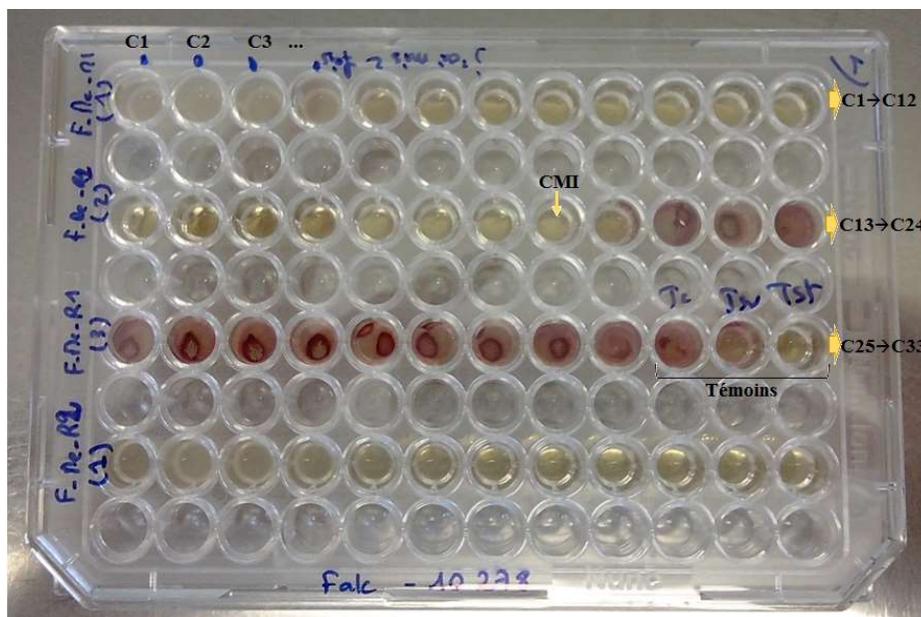


Figure 73 : Photo de l'activité antimicrobienne du falcarinol contre *P. aeruginosa* 10278 dans la microplaque montrant l'emplacement des dilutions des concentrations de C1 (1250 mg/ml) à C33 ( $2,9 \times 10^{-10}$  mg/ml), les témoins Tc (témoin de culture), T<sub>sv</sub> (témoin de solvant) et T<sub>st</sub> (témoin de stérilité) et la CMI (C20)

Une telle activité contre *Pseudomonas aeruginosa* est rarement observée chez les produits naturels [275]. D'une part parce qu'il s'agit d'une bactérie Gram négative, ces bactéries possèdent une membrane externe naturellement imperméable aux antibiotiques, et d'autre part cette bactérie possède une résistance naturelle et une multiplicité de mécanismes de résistances acquises. L'activité ici observée témoigne donc d'une certaine originalité et spécificité.

#### IV. 6. Discussion sur les composés isolés et sur l'activité antimicrobienne

Durant ce présent travail, nous avons rencontré plusieurs difficultés dans la séparation et la purification des composés actifs de l'extrait apolaire des racines d'*E. triquetrum* à cause de la présence des corps gras. Toutefois, tous les composés que nous avons purifiés sont décrits et isolés pour la première fois chez cette espèce.

Les composés acétyléniques sont largement répandus dans la famille des Apiacées. Comme nous l'avons mentionné dans la partie « généralités », les polyacétylènes et particulièrement les composés en C-17, comme le falcarinol, possèdent des activités biologiques très intéressantes à savoir des effets anti-inflammatoires, cytotoxiques, anti-tumoraux, antiagrégant plaquettaire et antimicrobiens [276].

Dans le genre *Eryngium*, le falcarinol a été retrouvé chez *E. bourgatii*, *E. glaciale*, *E. rostratum* et *E. yuccifolium*. Le panaxydiol a été retrouvé uniquement chez *E. agavifolium* [96].

L'activité antibactérienne du falcarinol a été peu étudiée dans les travaux antérieurs en comparaison aux nombreuses études effectuées sur les autres activités biologiques de ce composé. Kobaisy et al. (1997) ont montré une forte activité inhibitrice du falcarinol contre *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* avec une CMI de 3,1 µg/ml, contre *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* avec une CMI de 6,25 µg/ml et une forte inhibition de la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium avium* (10µg/disque) [277]. Schinkovitz et al. (2008) ont montré que le falcarinol possède également une activité inhibitrice contre *Mycobacterium fortuitum* et *Mycobacterium aurum* avec une CMI de 16,4 µM [278]. Cependant, l'activité antibactérienne du panaxydiol n'a jamais été publiée, à notre connaissance.

La structure moléculaire des polyacétylènes à C-17 et leur hydrophobie sont responsables des réactivités de ces composés. La relation structure-activité du falcarinol a été ainsi expliquée par sa capacité à former des carbocations très stables avec une perte de molécule d'eau agissant ainsi comme un agent très réactif alkylant diverses biomolécules [279] Figure 74.

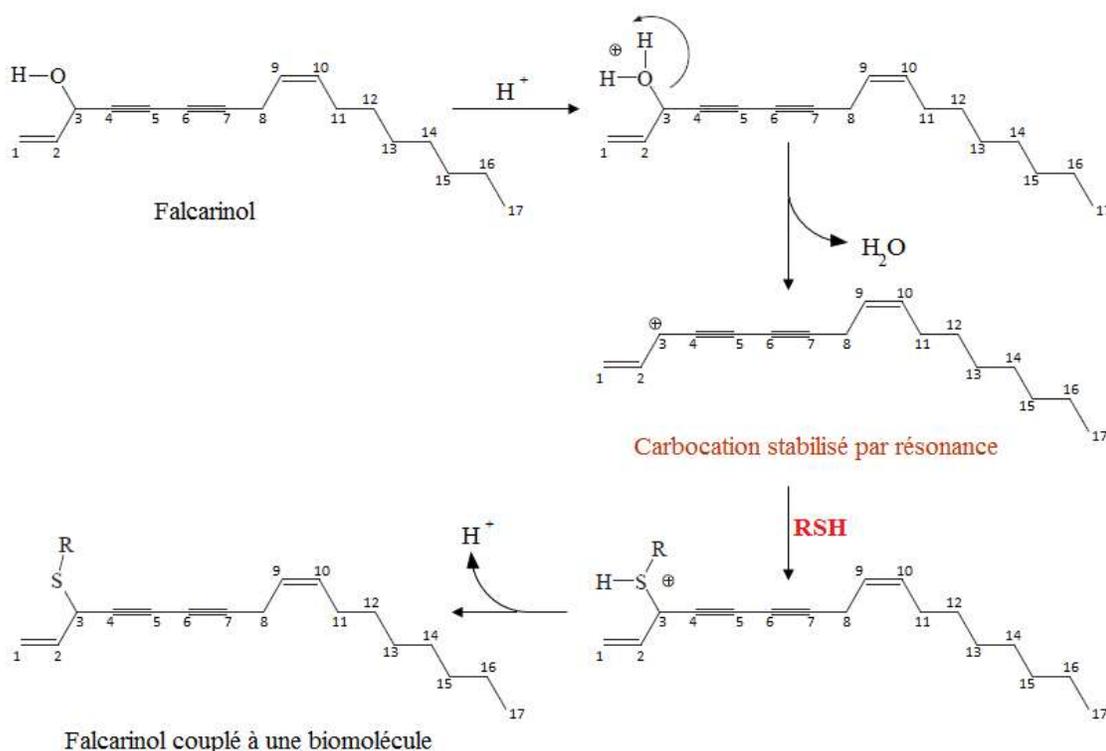


Figure 74: mécanisme d'action proposé pour le falcarinol. RSH : résidu thiol d'une biomolécule (par exemple : une protéine) [279].

L'activité antibactérienne mise en évidence dans ce travail est très intéressante : une très forte inhibition a été observée contre des bactéries extrêmement résistantes aux antibiotiques et productrices de BLSE avec une spécificité d'action particulièrement observée contre les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (BLSE).

Nous avons observé une forte inhibition des souches d'*Acinetobacter baumannii* VIM-4. Les souches d'*A. baumannii* font l'objet d'une attention particulière depuis une dizaine d'années à cause de leur émergence souvent associée à une multirésistance aux antibiotiques conduisant à de réelles impasses thérapeutiques [280]. Les enzymes VIM-4 appartiennent à la classe des Métallo- $\beta$ -lactamases qui confèrent à ces bactéries une résistance aux carbapénèmes. Ces enzymes hydrolysent très fortement toutes les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'aztréonam [281].

*P. aeruginosa* (10278) productrice de BLSE de type GES-2 a également été fortement inhibée par les deux polyacétylènes testés avec des CMI de 2,3 et 4,6 ng/ml respectivement pour le falcarinol et le panaxydiol.

Cette activité est très intéressante du fait que les *P. aeruginosa* GES-2 sont des formes évolutives de BLSE. En effet, la multirésistance chez *P. aeruginosa* inclue généralement la résistance aux fluoroquinolones, aux céphalosporines de spectre large, aux carbapénèmes et aux aminosides. Les résistances aux  $\beta$ -lactamines sont toutefois plus évolutives, ces enzymes contribuent à une résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération. Les enzymes GES-2 sont encore plus évolutives, elles dérivent des BLSE avec une activité additionnelle de carbapénémase [282]. Ces enzymes hydrolysent toutes les  $\beta$ -lactamines [281].

Enfin, la meilleure activité inhibitrice et bactéricide a été observée pour le falcarinol contre la souche de *P. aeruginosa* résistante aux fluoroquinolones et aminosides avec une CMI et CMB égales à 0,29 ng/ml.

Les activités décrites ci-avant étaient plus fortes que celles observées pour l'extrait brut. Ces activités sont prometteuses et ouvrent de nouvelles perspectives quant à l'utilisation pharmacologique de ces deux polyacétylènes.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le présent travail avait pour objectif d'étudier la bioactivité, essentiellement antimicrobienne, et la biodiversité chimique de plantes médicinales de la flore tunisienne utilisées en médecine traditionnelle. Ces plantes appartenant à la famille des Apiacées, correspondent à toutes les espèces du genre *Eryngium* qui poussent en Tunisie et qui sont en majorité très peu étudiées.

La première partie de ce travail a consisté en la réalisation d'extraits de différentes polarités à partir des parties aériennes et des racines des huit espèces. L'activité antimicrobienne (CMI) des 48 extraits a été par la suite évaluée *in vitro* envers 36 microorganismes pathogènes reconnus pour leur impact clinique. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence la présence d'agents antimicrobiens de nature apolaire chez toutes les espèces et de justifier en partie l'utilisation de ces plantes en médecine traditionnelle pour le traitement de certaines maladies infectieuses.

Par ailleurs, le développement d'une méthodologie simple de criblage qui associe les outils de la photothérapie antimicrobienne à la méthode de dilution en milieu solide, permettant ainsi d'étudier simultanément l'activité d'un grand nombre d'extraits, nous a permis d'évaluer l'activité phototoxique antimicrobienne des extraits apolaires des 8 *Eryngium*. Suite à cette étude, nous avons obtenu des résultats prometteurs pour *E. dichotomum*, *E. ilicifolium* et *E. triquetrum* indiquant la richesse de ces plantes en composés photoréactifs potentiellement intéressants pour leurs propriétés antibactériennes.

L'activité cytotoxique des extraits apolaires contre la lignée de cellules cancéreuses J774 a été également évaluée, l'activité la plus intéressante a été observée pour les racines d'*E. triquetrum* avec une  $CI_{50}$  plus faible que les autres extraits (0,09  $\mu\text{g/ml}$ ) et un indice de sélectivité plus élevé.

Une analyse de la variabilité chimique des extraits apolaires des parties aériennes de ces espèces a été effectuée par CPG/SM. Cette analyse phytochimique, associée aux méthodes statistiques descriptives, a permis de classer les espèces tunisiennes du genre *Eryngium* en 5 groupes distincts et de déterminer les composés caractérisants chaque groupe. Cette étude phytochimique devrait être complétée par une étude génétique afin de mettre en évidence les différents aspects de cette variabilité.

L'analyse phytochimique a, également, mise en évidence la richesse de ces plantes en molécules très diverses et qui présentaient de nombreuses propriétés pharmacologiques. De nombreux composés antimicrobiens notamment des sesquiterpènes oxygénés comme le spathulénol, le lédol, l' $\alpha$ -bisabolol et le cubénol, mais aussi des sesquiterpènes hydrocarbonés comme le  $\beta$ -bisabolène et le copaène, et cytotoxiques comme le falcarinol, ont été identifiés.

Une étude phytochimique approfondie a été réalisée sur les racines d'*E. triquetrum* afin d'extraire, isoler par des essais bio-guidés et identifier les composés actifs. Le fractionnement optimisé par chromatographies sur colonnes, CPC et CLHP a permis d'isoler et identifier 4 composés dont deux polyacétylènes dotés d'activité antimicrobienne.

L'étude de l'activité antimicrobienne des polyacétylènes identifiés sur des bactéries multirésistantes et productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu a permis de mettre en évidence un fort pouvoir antimicrobien et une spécificité d'action notamment contre les souches de

*Pseudomonas aeruginosa* BLSE et multirésistantes, avec des CMI allant jusqu'à 0,29 ng/ml et une activité majoritairement bactéricide.

Ces résultats encourageant nous incitent à continuer l'investigation phytochimique des racines d'*E. triquetrum* qui n'ont jamais été étudiées jusqu'à présent, et à déterminer la relation structure-activité des composés isolés particulièrement contre les formes évolutives de résistances aux antibiotiques.

# MATERIEL ET METHODES

## I. Matériel végétal et extractions

### I. 1. Matériel végétal : identification, récolte et séchage :

Nous avons réalisé cette étude sur les parties aériennes et les racines de toutes les espèces du genre *Eryngium* qui poussent en Tunisie (8 espèces). L'identification botanique a été faite en collaboration avec Mme Fathia Skhiri, professeur en botanique à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir.

20 échantillons ont été collectés de chaque espèce dans chaque milieu de récolte, et tous les spécimens ont été récoltés d'une manière homogène en gardant une distance inter-plantes fixe sur chaque terrain, afin de couvrir l'ensemble des populations végétales retrouvées et garder le caractère aléatoire de l'échantillonnage. Le Tableau 40 présente l'origine et la date de récolte des différents échantillons.

Cette récolte a été effectuée pendant le stade de floraison qui s'étale entre mai et août pour l'ensemble des *Eryngium*. 5 stations appartenant à 4 étages bioclimatiques ont été définies : station A (subhumide), station B (semi-aride à hiver doux), station C (semi-aride à hiver frais), et stations D et E (aride à hiver frais). (Figure 75)

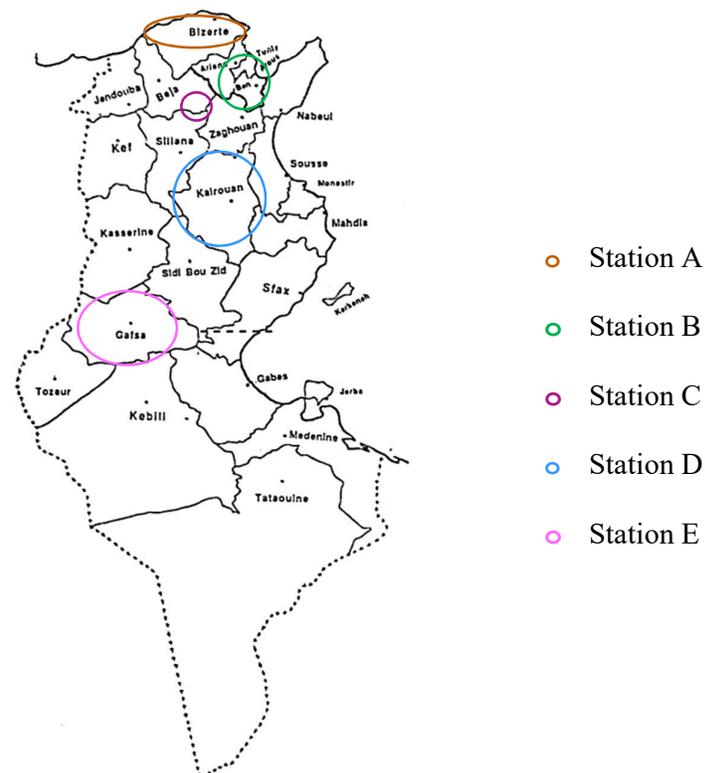


Figure 75 : carte des stations de prélèvements des *Eryngium*

Tableau 40 : Origine et date de récolte des *Eryngium*

	Date de récolte	N° d'herbier	Station	Coordonnées
<i>Eryngium triquetrum</i>	Mai-Juin	ERTq-113	A	Bizerte 37° 15' 30" N ; 9° 53' 0" E
			B	Tunis 36° 50' 23" N ; 10° 7' 31" E
			C	près de Béja 36° 35' 29" N ; 9° 33' 31" E
<i>Eryngium dichotomum</i>	Mai-Juin	ERDI-112	A	Bizerte 37° 14' 51" N ; 9° 53' 11" E
			B	Tunis : Rades 36° 45' 5" N ; 10° 16' 55" E
			C	près de Béja 36° 32' 28" N ; 9° 24' 4" E
			D	Kairouan 35° 41' 35" N ; 10° 1' 54" E
<i>Eryngium tricuspdatum</i>	Août	ERTd-bo-111	A	Bizerte : Sedjnane 36° 59' 51" N ; 9° 14' 12" E
<i>Eryngium campestre</i>	Juin-Juillet	ERCA-112	A	Bizerte : Utica 37° 5' 37" N ; 10° 0' 1" E
			C	près de Béja 34° 14' 51" N ; 9° 7' 31" E
			D	Kairouan : près d'El Oueslatia 35° 44' 6" N ; 9° 57' 19" E
<i>Eryngium ilicifolium</i>	Juillet	ERIL-112	C	près de Béja 36° 34' 8" N ; 9° 26' 5" E
			D	Kairouan 35° 43' 3" N ; 9° 59' 1" E
<i>Eryngium maritimum</i>	Juillet	ERMA-111	A	Bizerte : Rimel 37° 43' 54" N ; 9° 53' 37" E
			B	Tunis : Slimen 36° 43' 53" N ; 10° 28' 11" E
<i>Eryngium glomeratum</i>	Août	ERGL-114	E	Gafsa : Mont Orbata 34° 22' 18" N ; 9° 11' 33" E
<i>Eryngium barrelieri</i>	Juin	ERBA-111	B	Tunis : El Hessyane 36° 58' 22" N ; 10° 5' 58" E

Après la récolte, le matériel végétal a été étendu à l'ombre en fine couche pour qu'il sèche à l'air libre ; le séchage a duré 3 semaines.

Les racines d'*Eryngium triquetrum* utilisées pour la séparation ont été récoltées en mai 2013 et séchées à l'étuve ventilée à 37°C durant 48 heures.

## I. 1.1. Protocole d'extraction général

Les racines et les parties aériennes ont été traitées séparément. Après broyage, la poudre obtenue a subi des extractions successives à température ambiante avec des solvants de polarité croissante. Les solvants utilisés étaient l'éther de pétrole puis le dichlorométhane puis le méthanol, cette approche d'extraction permet de fractionner grossièrement les divers produits naturels de la matrice végétale.

La drogue végétale a été laissée macérer pendant 30 min sous agitation avec un rapport drogue/solvant de 1/10 (1g de poudre avec 10 ml de solvant).

Après filtration, le marc est à nouveau extrait deux fois dans les mêmes conditions (figure 24), les filtrats sont réunis et évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif à la température maximale de 40°C. Les extraits secs ainsi obtenus ont été conservés à 4°C à l'abri de la lumière pour être utilisés dans les différentes analyses.

## I. 1.2. Procédure d'extraction des racines d'*Eryngium triquetrum*

Comme expliqué dans la partie résultats et discussion (cf. page 110), nous avons sélectionné *Eryngium triquetrum* Vahl. Pour les travaux phytochimiques de séparation afin d'isoler et d'identifier ses composés actifs.



Figure 76 : photo des racines d'*Eryngium triquetrum* Vahl. utilisées pour cette étude

Les études biologiques subséquentes sur cette plante nous ont permis de trouver l'organe le plus actif, les racines (Figure 76). Afin de pouvoir mener les études phytochimiques et biologiques sur l'extrait à l'éther de pétrole qui a montré la plus forte activité biologique, nous avons réalisé une procédure d'extraction en grande quantité par lixiviation. Cette méthode consiste en une extraction du maximum de principes actifs par passage lent et

régulier d'un solvant au travers la poudre de drogue sans chauffage. La poudre végétale est ainsi placée durant 72 h dans une colonne de percolation avec suffisamment de solvant pour qu'elle soit imbibée. Le lixiviat est récupéré goutte-à-goutte et du solvant neuf est ajouté afin d'épuiser la poudre.

Nous avons utilisé 19 litres d'éther de pétrole afin de réaliser l'extraction à partir de 6 kg de plante, un extrait de 23 g a été ainsi obtenu.

### **I. 1.3. Procédure d'extraction par ultrason à courte durée**

Pour réaliser la caractérisation phytochimique des 17 échantillons d'*Eryngium*, nous avons utilisé la méthode d'extraction par ultrasons. Cette méthode permet de raccourcir le temps d'extraction et augmenter considérablement le rendement. La sonication applique des forces de cisaillement intenses dans le milieu et libère ainsi un haut rendement d'extrait dans un temps très court. Nous avons utilisé cette méthode afin d'assurer une répétabilité des conditions d'extraction des 17 échantillons d'*Eryngium* dans le but de comparer fiablement les composés volatils dont les profils chimiques ont été établis par la suite par CPG/SM.

10 g de plantes broyées ont été placées avec 15 ml d'éther de pétrole pour analyses (éther de pétrole AnalaR NORMAPUR, VWR Chemicals) aux ultrasons pendant 10 minutes, l'extrait est par la suite filtré avec un filtre pour seringue de 0,45 µm de diamètre de pores (VWR Syringe Filters). L'extrait liquide ainsi obtenu a été directement analysé par CPG/SM.

## **I. 2. Techniques chromatographiques**

Dans le cadre de notre travail, nous avons utilisé les techniques suivantes

### **I. 2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) analytique**

La chromatographie sur couche mince permet aux constituants d'un mélange de se séparer par migration différentielle, chacun d'eux est d'autant plus entraîné par l'éluant qu'il est plus soluble dans celui-ci et moins adsorbé sur la phase stationnaire. Cette technique permet d'avoir une idée globale des métabolites présents dans un extrait ou une fraction. Utilisée à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications, elle permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé lorsque les conditions opératoires sont bien déterminées. Les analyses sur couche mince sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium Silicagel 60 avec indicateur coloré F254 de 0,2 mm d'épaisseur (Macherey-Nagel®, Allemagne).

Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. Cette phase mobile est constituée d'un mélange binaire, tertiaire ou quaternaire

de solvants selon le type de séparation souhaitée. Dans notre cas, les systèmes de solvants qu'on a couramment utilisés sont les suivants (les proportions sont données en volume) :

- Ether de pétrole / acétate d'éthyle (10 : 1) ; (5 : 1) et (1 : 1)
- Dichlorométhane / acétate d'éthyle (10 : 1)
- Toluène / acétate d'éthyle (28,5 / 1,5) ; (5 : 1), (2 : 1)
- Dichlorométhane / méthanol (10 : 1)
- Acétate d'éthyle / acide acétique / acide formique / eau (100 : 11 : 11 : 27)

L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 356 nm), avant et, dans certains cas, après révélation par les réactifs appropriés

Le révélateur le plus utilisé pour ce présent travail est le réactif polyvalent à l'anisaldéhyde sulfurique : une solution de p-anisaldéhyde à 0,5 % est préparée dans un mélange CH<sub>3</sub>OH/AcOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (85:10:5).

On détermine alors le rapport frontal :

$$R_f = \frac{\text{Distance entre l'origine (le dépôt) et la tâche du produit A}}{\text{Distance entre l'origine (le dépôt) et le front du solvant B}}$$

## I. 2.2. Chromatographie sur Colonnes ouvertes (CC)

Des colonnes ouvertes en verre ont été utilisées et conditionnées en phase normale par du gel de silice. Les substances ont été alors éluées en sens inverse de leur polarité propre. Les composés peu polaires avaient une plus grande affinité pour la phase mobile et ont été donc élués rapidement, et inversement les solutés polaires avaient une plus grande affinité pour la phase stationnaire et ont été élués lentement.

La taille et le diamètre de la colonne sont déterminés en fonction de la masse et du degré de pureté de l'échantillon à fractionner. Le gel de silice (Macherey-Nagel) utilisé est de granulométrie 0,063-0,2 mm pour la séparation de l'extrait brut, et de granulométrie 15-40 µm pour la séparation des sous-fractions. La quantité de silice introduite dans la colonne correspond approximativement à une charge de 30 à 50 fois la masse de l'échantillon à séparer, ce rapport pouvant être diminué ou augmenté selon qu'une séparation grossière ou bien qu'une meilleure résolution sont souhaitées. Différentes tailles de colonnes ont été utilisées, choisies en fonction de la quantité d'échantillon chargée. Le dépôt des échantillons à la surface de la silice est réalisé sous forme de liquide et le tout est recouvert d'une couche de sable de Fontainebleau. Des ampoules contenant la phase mobile ont été

fixées au-dessus de la colonne. Un système de pompe permettant d'exercer une légère pression, est parfois fixé au niveau de ces ampoules lorsque cela est nécessaire.

Les colonnes sont éluées par différents systèmes de phases mobiles, en mode gradient, afin d'optimiser la séparation des échantillons. Les fractions sont alors récoltées dans des tubes à essai grâce à un collecteur Büchi 684. Après évaporation d'une partie du solvant au miVac Genevac® pour concentrer les fractions, des CCM permettent de regrouper les tubes de composition chimique identique.

### **I. 2.3. Chromatographie d'exclusion stérique sur Sephadex LH-20**

La séparation des échantillons peut être réalisée par la technique de chromatographie d'exclusion stérique dont le mécanisme principal consiste à séparer les molécules par leur taille moléculaire, en faisant passer l'échantillon au travers d'un tamis moléculaire constitué de fine billes polymères, ici du gel de dextran hydroxypropylé Sephadex LH-20 (Sigma Aldrich), qui ont été réticulées pour créer un réseau de polysaccharide. Les composés les plus volumineux sont élués les premiers tandis que les molécules de tailles inférieures sont éluées tardivement, car piégées au sein du tamis moléculaire. Deux autres principes de séparation interviennent également dans une moindre mesure comme le phénomène d'adsorption et le phénomène de partage, notamment en fonction des solvants utilisés (il est ainsi possible de séparer deux isomères de position). La quantité de Sephadex LH-20 utilisée correspond à environ 50 fois le poids d'échantillon chargé. Le gel de Sephadex LH-20 est conditionné au contact du solvant d'éluion pendant au moins 3 heures. La quantité de phase mobile utilisée nécessaire au conditionnement du gel correspond à environ 3 fois la masse du gel utilisé. Les colonnes sont éluées par différents systèmes de phases mobiles.

### **I. 2.4. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)**

#### **I. 2.4.1. Chromatographie liquide haute performance analytique**

##### **i. Principe**

La technique de séparation la plus appréciée en analyse phytochimique est la chromatographie liquide à haute performance (CLHP), elle fait intervenir une phase stationnaire solide constituée de particules fines et une phase mobile liquide. Les principes de base permettant de séparer des produits d'un mélange sont les mêmes que ceux décrits dans le cas de la CCM. L'immense avantage de la CLHP par rapport à la chromatographie sur couche mince réside dans l'amélioration sensible des paramètres de seuil de détection et de résolution de séparation, ainsi que dans les possibilités d'automatisation du procédé.

Cette technique peut être utilisée selon plusieurs modes de séparation en fonction des caractéristiques physico-chimiques des analytes à séparer dont le mode dit phase normale (NP, Normal Phase) dans lequel la phase stationnaire est polaire et la phase mobile est apolaire, et le mode dit phase inverse (RP, Reversed Phase) dans lequel les polarités sont inversées, sont les deux principaux modes utilisés dans les travaux antérieurs.

Un système de CLHP classique comprend les éléments suivants :

- Un système de pompage (simple ou multiple) pour déplacer la phase mobile à haute pression (200-300 bars),
- Un injecteur (manuel ou automatique) pour introduire, dans le système à haute pression, l'échantillon solubilisé dans un solvant adéquat et exempt de particules en suspension (risque de colonne bouchée),
- Une colonne contenant la phase stationnaire. Celle-ci est de granulométrie très fine, c'est d'ailleurs ce qui permet le gain de résolution,
- Un détecteur à ultraviolets,
- Une interface permettant de visualiser les signaux enregistrés par le détecteur (intégrateur ou logiciel informatique).

## ii. Instrument et méthodologie

Le laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille possède un système de CLHP de marque Shimadzu équipée de deux pompes LC-10AS, d'un détecteur UV SPD-10A à deux longueurs d'onde et d'un module de contrôle SCL-10Avp. Le tout est piloté via le logiciel LC solutions. Un dégazeur Alltech est placé entre les flacons de solvant et les pompes, afin d'éviter les perturbations dans la détection provoquées par la présence de bulles d'air dans la phase mobile.

Nous avons travaillé avec une colonne de type C18 (phase inverse), c'est-à-dire rendue hydrophobe par greffage de résidus octadécyls sur les groupes silanols. Que ce soit pour des analyses isocratiques (composition du mélange identique pendant toute l'analyse) ou en gradient, nous avons toujours travaillé avec des mélanges acétonitrile / eau.

Les analyses ont été réalisées sur colonne VisionHT, RP-18, basique (5 µm, 250 mm x 4,6 mm) de la marque Grace (Epernon, France). Les solvants A et B sont respectivement l'eau et l'acétonitrile.

Le débit est de 1 ml/min et la température est de 40°C. Le gradient est détaillé dans le Tableau 41. Le volume d'injection est de 20 µl à partir de solutions de 1 mg / ml.

Tableau 41 : Gradient des solvants majoritairement utilisés pour l'analyse en CLHP des fractions et produits purs d'*Eryngium triquetrum* Vahl.

Intervalle (min)	Acétonitrile (%)
0 - 30	58 → 70
30 - 35	70

35 – 40	70 → 100
40 – 45	100

### I. 2.4.2. Chromatographie liquide haute performance préparative et semi-préparative

La purification des fractions par CLHP est réalisée au sein de notre laboratoire grâce à un système CLHP Shimadzu équipé d'un détecteur UV Shimadzu®SPD-M20A muni d'une barrette de diodes, les colonnes semi-préparative (5  $\mu$ m, 250 mm x 10 mm) et préparative (5  $\mu$ m, 250 mm x 21,2 mm) sont des colonnes Vision HT, RP-18, basiques. Une boucle d'injection de 500  $\mu$ l a été utilisée et un débit de 15 ml/min.

### I. 2.5. Chromatographie de partage centrifuge (CPC)

#### I. 2.5.1. Principe de la technique

La CPC est une technique de chromatographie liquide-liquide préparative qui utilise un système de solvant biphasique sans phase stationnaire solide. De ce fait, la séparation des molécules est basée sur leur différence de partage entre les deux phases liquides non miscibles en fonction de leur polarité et leur affinité. D'une manière simplifiée, une colonne CPC est constituée d'un empilement de disques en acier inoxydable dans lesquels sont gravées des cellules de partage reliées entre-elles par des capillaires (Figure 77) [283].



Figure 77 : Photographie d'un appareil CPC (Armen® instruments) et détail d'un des disques constitutifs de la colonne

Quand la colonne est mise en rotation, le champ de force centrifuge maintient la phase stationnaire liquide au sein de la colonne. La phase dite mobile, quant à elle, est pompée au travers de la phase stationnaire liquide.

Des systèmes de solvants biphasiques variés peuvent être appliqués lorsque l'on travaille sur des échantillons naturels. En effet, des systèmes couvrant toute la gamme de polarité et

constitués de deux à cinq solvants sont aujourd'hui largement utilisés pour le fractionnement d'extraits végétaux.

En raison du manque de données répertoriées dans la littérature scientifique concernant le choix d'un mélange de solvants adapté aux types de composés apolaires recherchés (principalement les polyacétylènes), nous avons orienté notre démarche vers un système universel, adapté à la plupart des substances naturelles. Ce mélange quaternaire, dénommé ARIZONA, a été pour la première fois décrit par Rodolphe Margraff et est considéré comme une combinaison de deux systèmes binaires principaux : AcOEt-eau (1:1) et heptane-MeOH (1:1) (155). Allant de A (AcOEt-eau) à Z (heptane-MeOH), toutes les polarités entre ces deux systèmes sont couvertes par des proportions différentes de chacun des quatre solvants.

La sélection d'un système de solvants biphasique doit fournir des valeurs de coefficients de partage ( $K_d$ ) appropriées à la séparation des molécules cibles, tout en fournissant un pourcentage de rétention de phase stationnaire et un temps d'analyse acceptables. Le  $K_d$ , qui définit le partage d'une molécule entre deux phases liquides, a été calculé selon la procédure décrite par Ito:

$$K_d = \frac{C_{\text{sup}}}{C_{\text{inf}}}$$

Où  $C_{\text{sup}}$  correspond à la concentration de l'analyte dans la phase supérieure et  $C_{\text{inf}}$  correspond à la concentration de l'analyte dans la phase inférieure.

D'après cette relation, un composé possédant un  $K_d$  proche de 1 sera élué de la colonne au bout d'un volume de colonne. En revanche, des composés possédant des  $K_d < 1$  (forte affinité avec la phase inférieure) ou des  $K_d > 1$  (forte affinité pour la phase supérieure) seront respectivement élués avant et après un volume de colonne. En CPC, il est donc préférable que les valeurs de  $K_d$  soient comprises entre 0,5 et 1 afin que les molécules soient séparées en un volume de colonne sans consommation excessive de solvants. Cependant, un  $K_d$  inférieur à 2 peut être accepté car permettant toujours une séparation en un temps raisonnable. Les  $K_d$  des composés d'un échantillon doivent bien évidemment être différents pour pouvoir les séparer. Il y a donc nécessité de calculer les coefficients de partage des composés d'intérêts dans le système de solvants choisi afin de savoir si la séparation par CPC est réalisable.

Les systèmes de solvants génèrent donc deux phases, une légère et une dense, qui selon l'application recherchée, peuvent être utilisées comme phase stationnaire ou mobile. En effet, l'utilisation d'appareil CPC permet d'inverser facilement le sens de pompage de la phase mobile via une vanne 4 voies située avant la colonne. Lorsque la phase stationnaire est la plus dense, la phase mobile est alors pompée en mode ascendant à contre sens du champ de force centrifuge. Au contraire, lorsque la phase stationnaire est la plus légère la

phase mobile est introduite dans le sens du champ de force centrifuge, on parle alors de mode descendant [283].

Cette particularité de la CPC permet de travailler avec différents modes de développements dont, parmi les plus connus, le mode d'élution-extrusion que nous avons utilisé pour notre travail. Ce mode consiste, après une période d'élution classique, à pousser avec de la phase stationnaire fraîche, la phase mobile puis la phase stationnaire initiales hors de la colonne, et ce sans intervertir le sens d'introduction de la phase mobile. Cette méthode permet d'éliminer les deux phases liquides initialement présentes dans la colonne et de collecter l'ensemble des molécules de l'échantillon, tout en diminuant le volume de solvant normalement nécessaire à l'élution des molécules ayant une forte affinité pour la phase stationnaire [283].

Grâce à l'utilisation d'une phase stationnaire liquide, la CPC présente plusieurs avantages qui sont appréciables lorsque l'on travaille sur des produits naturels :

- Pas d'adsorption irréversible
- Peu ou pas de dégradation des molécules
- Aucune perte d'échantillon
- Technique versatile (plusieurs modes de développement)
- Forte capacité de charge

Néanmoins, elle a pour principal défaut d'avoir une plus faible efficacité (nombre de plateaux théoriques) que la CLHP préparative, et nécessite une bonne étanchéité du système pour éviter les fuites de solvants et d'échantillon lorsque la colonne est en rotation.

### **I. 2.5.2. Instrument et méthodologie**

Afin de déterminer le coefficient de partage d'un composé dans un système donné, le système de solvant est préparé et 1 ml de chaque phase est placé sur 5 mg du composé ou d'un mélange de composés. Après agitation, 0,5 ml de chaque phase est prélevé, séché, redissout dans un mélange acétonitrile / eau 50 : 50 (v/v) et injecté en CLHP. Le coefficient de partage est obtenu en faisant le rapport des aires entre la phase inférieure et la phase supérieure à 205 nm du composé considéré.

Les solvants sélectionnés pour les deux phases sont injectés par des pompes Shimadzu®LC-20AP. Les cellules de l'appareil à CPC Armen instruments® sont d'abord chargées de phase stationnaire, puis la phase mobile est ajoutée. Après équilibration, l'échantillon à séparer dissout dans les deux phases est injecté. A la sortie de CPC se trouve un détecteur UV Shimadzu®SPD-M20A muni d'une barrette de diodes. Enfin, un collecteur de fractions Gilson®FC204 permet de récupérer l'échantillon fractionné dans plusieurs tubes. Le mode de pompage de la phase mobile utilisé pour ce présent travail est un mode ascendant, ce qui signifie que la phase mobile est la phase supérieure. La quantité d'extrait injectée peut varier entre 200 mg et 2 g. Le débit de phase mobile au cours de l'élution est de 8 ml/min. L'élution dure en moyenne 60 minutes et est suivie d'une extrusion de 15 à 30 minutes à 30 ml/min. La collecte des fractions se fait à 1 tube/min,

soit 8 ml/tube. Après évaporation d'une partie du solvant au miVac Genevac® pour concentrer les fractions, des CCM permettent de regrouper les tubes de composition identique qui sont ensuite analysées par CLHP.

## I. 2.6. Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG/SM)

### I. 2.6.1. Principe

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition [93], elle fournit le pourcentage relatif de chaque signal par rapport à l'ensemble des signaux du mélange analysé, et permet, également, une analyse qualitative sur la base des temps de rétention. Ceux-ci, bien que spécifiques d'un composé, ont tendance à varier d'une analyse à l'autre, notamment du fait du vieillissement des colonnes.

Pour une colonne donnée, chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts, IK) ou en programmation de température (indices de rétention, IR), ces derniers demeurent constants dans la mesure où la programmation de température reste identique. Ils sont comparés à ceux d'échantillons authentiques contenus dans une bibliothèque de référence propre au laboratoire, dans des bibliothèques commerciales, ou encore reportés dans la littérature. L'indice de rétention est calculé selon la formule suivante :

$$I_i = 100 \cdot \left( \frac{t_r(i) - t_r(n)}{t_r(n+1) - t_r(n)} \right) + 100 \cdot n$$

Où

**$I_i$  : l'indice de rétention d'un composé  $i$**

**$t_r$  : temps de rétention**

**$n$  : l'alcane qui précède le composé  $i$**

**$n+1$  : l'alcane qui se situe après le composé  $i$**

L'utilisation d'un spectromètre de masse comme détecteur en chromatographie en phase gazeuse est, aujourd'hui, une technique de référence [93]. En effet, le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe.

## I. 2.6.2. Mode opératoire

La CPG/SM utilisée pour ce travail est établie en mode « Impact Electronique » (CPG/SM-IE), l'ionisation des substances sortant de la colonne capillaire se fait par bombardement à l'aide d'un faisceau d'électrons d'énergie de 70 eV provenant d'un filament chauffé. Les fragments ioniques positifs ainsi obtenus, dont éventuellement l'ion moléculaire, forment le spectre de masse du composé.

L'appareil est un chromatographe de type ThermoFinnigan Trace DSQ équipé d'un passeur d'échantillon couplé à un spectromètre de masse équipé d'un analyseur à piégeage de charge (trappe à ions). L'ensemble est piloté par un ordinateur muni d'un système d'acquisition et d'exploitation des données utilisant le logiciel XCalibur. La séparation chromatographique en phase gazeuse a été effectuée à l'aide d'une colonne de type Uptibond 5 Premium UB5 (5% phényl-95% diméthylpolysiloxane) de 30 m de long, 0,25 mm de diamètre intérieur et 0,25  $\mu\text{m}$  d'épaisseur de film. Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1 ml / min, le mode d'ionisation est provoqué par des collisions avec les électrons à 70 eV ; et l'intensité du filament est de 250  $\mu\text{A}$ .

Le gradient de température de la colonne a été programmé de 40°C (pendant 5 minutes) puis augmente jusqu'à 200°C à raison de 2°C / min. La température de l'injecteur est de 250°C, et le mode d'injection est le « split ». La température de la ligne de transfert est de 230°C et celle de la chambre d'ionisation est de 250°C, avec une fenêtre de balayage de masse de  $m/z$  40 à 650. Le volume injecté est de 1  $\mu\text{L}$ . Les composés sont alors identifiés par leur temps de rétention sur le chromatogramme et par leurs ions spécifiques caractérisés par leur rapport masse/charge ( $m/z$ ) sur le spectre de masse

## II. Techniques de détermination structurale des composés isolés

### II. 1. Spectrométrie de Masse Haute Résolution (HRMS)

Les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées grâce à un spectromètre de masse haute résolution Thermo Scientific Orbitrap Exactive<sup>TM</sup> (Brême, Allemagne), en utilisant l'électrospray (HESI-II) appartenant à la plateforme du Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses (CUMA), Université de Lille Nord de France.

### II. 2. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La méthode de choix pour l'identification des composés naturels isolés est la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN), elle permet l'accès à des informations concernant le squelette et la fonctionnalisation des molécules [93]. Cette technique repose sur la propriété qu'ont des noyaux tels que  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{19}\text{F}$  et  $^{31}\text{P}$  de posséder un moment magnétique nucléaire permanent.

Placés dans un champ magnétique extérieur, ils prennent par rapport à celui-ci certaines orientations bien définies auxquelles correspondent des niveaux d'énergie distincts. Pour une valeur donnée de champ, des transitions entre niveaux immédiatement contigus sont dues à l'absorption de radiations électromagnétiques de longueurs d'onde caractéristiques dans la région des radiofréquences.

En phytochimie, les deux atomes les plus étudiés sont l'hydrogène (proton)  $^1\text{H}$  et le carbone  $^{13}\text{C}$ . Nous allons rappeler ici les caractéristiques essentielles des techniques utilisées.

## II. 2.1. RMN du $^1\text{H}$

La réalisation d'un spectre de RMN du  $^1\text{H}$  est une étape fondamentale dans la détermination structurale d'une molécule. De plus, elle ne nécessite que quelques minutes, depuis l'avènement de la RMN à transformée de Fourier.

En RMN du  $^1\text{H}$ , trois informations sont importantes :

### - Le déplacement chimique ( $\delta$ ) :

C'est une fréquence exprimable en Hertz (Hz), qui est en pratique toujours présentée sous la forme d'une échelle de ppm (rapport de la fréquence de résonance sur celle du champ magnétique  $B_0$ ), qui a l'avantage d'être la même quelle que soit la puissance de l'appareil. Elle donne une indication sur la nature des groupements chimiques présents.

### - L'intégration :

L'aire sous la courbe de chaque pic est proportionnelle au nombre d'atomes d'hydrogène équivalents concernés. Cependant, la prise en compte de l'intégration nécessite souvent la connaissance de la masse totale de la molécule (cf. spectrométrie de masse).

### - Le couplage :

Chaque proton est couplé avec ses voisins immédiats non équivalents dans la molécule. Ceci se traduit par un changement de forme des signaux observés. Le signal d'un proton indique le nombre de protons avec lesquels il est couplé ( $n+1$  raies pour  $n$  voisins) et peut même donner des renseignements d'ordre structural, via l'écartement de ces raies, mesuré en Hz et appelé constante de couplage ( $J$ ).

## II. 2.2. RMN du $^{13}\text{C}$

L'isotope  $^{13}\text{C}$  ne représente qu'1% des atomes de carbone existant. La sensibilité de cette expérience n'est donc pas excellente, ce qui oblige à multiplier le nombre des expériences (scans) sur plusieurs heures afin d'obtenir un spectre de bonne qualité. Ceci est particulièrement handicapant pour les substances naturelles qui sont souvent isolées en faible quantité par rapport aux produits de la chimie de synthèse. En revanche, la résolution obtenue est très supérieure à celle des spectres du  $^1\text{H}$  (pour un même appareil : les

déplacements chimiques s'échelonnent généralement sur plus de 200 ppm, contre 10 ou 15 pour le proton).

Il existe des couplages en RMN du  $^{13}\text{C}$ , mais on utilise aujourd'hui majoritairement des expériences dites « 1H-découplées », qui permettent un gain appréciable de sensibilité.

Plusieurs expériences permettent, au moyen de séquences d'impulsions particulières de conserver une partie des informations qu'aurait apporté le couplage  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , tout en bénéficiant du gain de sensibilité procuré par le découplage. Il s'agit d'expériences de spin-écho *J*-modulé (APT : *Attached Proton Test* encore appelé *Jmod*) pouvant impliquer un transfert de polarisation (DEPT : *Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer*).

Nous avons toujours utilisé le *Jmod* pour ce travail. Il permet la différenciation dans le spectre des pics correspondant à des carbones portant un nombre pair d'hydrogènes (secondaires ou quaternaires) de ceux correspondant à des carbones portant un nombre impair d'hydrogènes (primaires ou tertiaires).

## II. 2.3. RMN bidimensionnelle

La RMN bidimensionnelle [93] conduit à des spectres de corrélation proton-proton (COSY et NOESY) et proton-carbone (HSQC et HMBC) et permet de mettre en évidence des interactions (directes et indirectes) entre les noyaux. Elle fournit des renseignements très précis sur la structure moléculaire.

La séquence HSQC permet de savoir à quel carbone est lié chaque proton (couplage  $^1\text{J}_{\text{CH}}$ ). La séquence COSY permet la visualisation du voisinage immédiat des atomes d'hydrogène, par interactions scalaires (à travers les liaisons chimiques). La séquence HMBC montre la corrélation entre un atome de carbone et un proton situés à plusieurs liaisons de distance (typiquement 3), cette technique complète très bien le COSY pour l'établissement de l'enchaînement des atomes d'une molécule permettant la construction du squelette de la molécule.

La séquence NOESY peut fournir de nombreuses informations sur l'orientation spatiale des protons et donc sur la stéréochimie de la structure.

### II. 2.3.1. Mode opératoire

Les molécules issues d'*Eryngium triquetrum* ont été solubilisés dans 500  $\mu\text{l}$  de chloroforme deutéré (Euriso-top®, St-Aubin, France). Les analyses de résonance magnétique nucléaire ont été effectuées sur des spectromètres Bruker Avance 300 et 500 au Laboratoire d'Application de RMN de l'Université de Lille Nord de France, et traités avec le logiciel Topspin 3.1 (Bruker).

## III. Outils statistiques

Afin d'étudier la variabilité chimique des composés volatils des différentes espèces du genre *Eryngium*, et compte tenu du nombre important de données obtenues, nous nous sommes orientés vers une analyse des variables par des méthodes statistiques descriptives multidimensionnelles telles que l'Analyse en Composante Principale (ACP) et la Classification Ascendante Hiérarchique (CAH). Ces deux outils permettent d'avoir une vision synthétique, des similitudes ou des différences au sein d'un ensemble d'échantillons. Sans trop entrer dans les théories régissant les statistiques, nous allons montrer ici le parti que le chimiste peut en tirer. Le logiciel utilisé pour effectuer les tests statistiques multivariés est l'SPSS software (version 20 ; IBM).

### III. 1. Analyse en Composante Principale (ACP)

L'ACP est une méthode qui permet d'analyser un ensemble de données quantitatives dans un espace multidimensionnel. Son principe est basé sur un changement de variable qui réduit la dimensionnalité de l'espace et qui fournit en conséquence une représentation simplifiée de celui-ci. Une ACP est généralement utilisée lorsque les données étudiées sont issues de l'observation de  $n$  individus situés dans un espace  $E$  de  $p$  dimensions ( $p > 3$ ) ; l'ensemble des données forme alors un nuage de  $n$  points dans  $E_p$ . L'objectif de l'ACP est de trouver la meilleure représentation graphique du nuage de  $n$  points à l'intérieur d'un sous espace  $H$  de  $E$ , et de dimension  $q$ . La meilleure représentation est soit celle qui minimise les déformations du nuage de points, soit celle qui conserve au maximum la dispersion initiale de celui-ci à l'intérieur de l'espace  $E$ . Ainsi le sous espace  $H$  optimal est celui dont les  $q$  dimensions maximisent la somme des carrés des distances des points projetés et leur centre de gravité. En résumé, l'objectif de l'ACP est de fournir une image simplifiée d'un espace de données complexes, en conservant un maximum d'information [283].

Concrètement, le nuage de points de l'espace multivarié est finalement converti en un nuage de points dans un espace à 2 dimensions. Les points et les différentes variables de cet espace sont projetés selon les 2 axes perpendiculaires, les plus représentatifs de l'ensemble du nuage. Dans cette étude, les variables sont les constituants du mélange des différents extraits tandis que les points sont les échantillons des différentes espèces [93].

### III. 2. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)

La CAH est une méthode d'agglomération de différents points dans un espace varié. On établit tout d'abord la dissimilarité entre chaque point via des calculs de distance, ensuite, le système choisi agglomère les points entre eux de façon itérative et abouti à la formation de plusieurs groupes. Les agglomérations successives sont représentées sous forme d'arborescence sur le dendrogramme issu de la CAH. Ceci permet ainsi de regrouper les échantillons selon plusieurs groupes, en fonction de l'importance de la dissimilarité entre chaque rameau de l'arbre. [93]

L'utilisateur doit faire preuve de prudence dans les conclusions tirées des représentations issues de son échantillonnage géographique. Dans une ACP, il est important que les deux

axes choisis aient un pourcentage de représentation suffisamment élevé pour que l'ACP soit jugée pertinente. Si le pourcentage est trop faible, les conclusions qui découlent de la représentation sont erronées. De même, la CAH, bien que permettant d'établir différents groupes, ne fournit strictement aucune information concernant les affinités de ces groupes avec les diverses variables utilisées. Dans notre cas, nous avons systématiquement établi les groupes les plus représentatifs en CAH et confirmé ces groupes en ACP. Une fois les groupes et leur composition fixés, les affinités de chaque groupe avec les composés discriminants ont été déterminées par l'ACP. Selon la classification ainsi faite, chaque échantillon a été confronté aux données de la matrice afin d'éviter les aberrations toujours possibles en ACP.

## **IV. Tests pharmacologiques**

### **IV. 1. Procédure d'évaluation de l'activité antimicrobienne**

Pour évaluer l'activité antimicrobienne d'une substance naturelle ou d'un extrait végétal les méthodes communément employées sont réalisées par dilution ou par diffusion [283]. Pour ce travail nous avons utilisé les méthodes de dilution, qui représentent plusieurs avantages dont la détermination de la concentration minimale inhibitrice. Ces techniques de dilution, autant sur milieu solide ou liquide, sont des méthodes de référence. Elles consistent à mettre un inoculum microbien au contact de concentrations croissantes de l'échantillon. Le degré d'inhibition de la croissance microbienne détermine le pouvoir antimicrobien des substances testées.

Tous les tests microbiologiques ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire de bactériologie clinique de la Faculté de Pharmacie de Lille 2 (INSERM U995).

#### **IV. 1.1. Méthode de dilution en milieu solide**

Cette méthode consiste en l'ensemencement de géloses contenant des concentrations décroissantes en extraits ou molécules à tester. On recherche la plus faible concentration pour laquelle il y a inhibition macroscopique de la pousse microbienne, elle présente l'avantage de pouvoir tester une large gamme de bactéries à la fois grâce à l'inoculateur à têtes multiples (Mast Laboratories®, Bootles, England).

##### **IV. 1.1.1. Criblage de l'activité antimicrobienne des extraits des 8 *Eryngium***

Le criblage de l'activité antimicrobienne a été réalisé sur les extraits à l'éther de pétrole, au dichlorométhane et au méthanol, des parties aériennes et des racines séparément, des 8 *Eryngium*.

Ce criblage d'activité a été effectué sur 36 souches pathogènes de l'homme capables de se développer dans un milieu aérobie gélosé de Mueller Hinton (MHA).

Ces bactéries sont :

- 13 bactéries Gram positives : *Corynebacterium sp.* T25-17, *Enterococcus faecalis* C159-6, *E. sp.* 8153, *Mycobacterium smegmatis* 5003, *Staphylococcus aureus* (8146, 8147), *S. epidermidis* (5001, 10282), *S. lugdunensis* T26A3, *S. warneri* T12A12, *Streptococcus agalactiae* (T25-7, T53-C2), *S. dysgalactiae* T46C14 ;
- 22 bactéries Gram negatives : *Acinetobacter baumannii* (9010, 9011), *Citrobacter freundii* (11041, 11042), *Enterobacter aerogenes* 9004, *E. cloacae* (11050, 11051, 11053), *Escherichia coli* (8138, 8157, ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* 11016, 11017), *Proteus mirabilis* 11060, *Providencia stuartii* 11038, *Pseudomonas aeruginosa* (8131, ATCC 27583), *Salmonella sp.* 11033, *Serratia marcescens* (11056, 11057), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Yersinia pseudotuberculosis* 2777.
- Une levure : *Candida albicans* 10286.

Une solution initiale de chaque extrait brut a été préparée à 50 mg/ml. Puis nous avons effectué des dilutions de 1/2, en série, dans le solvant pour avoir 5 concentrations allant de 25 à 1,5 mg/ml. Une nouvelle dilution de 1/20 dans le milieu de culture, à partir des dilutions précédentes, a permis d'obtenir des concentrations finales de 1,25 mg/ml ; 0,6 mg/ml ; 0,3 mg/ml ; 0,15 mg/ml et 0,07 mg/ml.

Chaque tube homogénéisé au vortex est immédiatement coulé dans la boîte de Pétri correspondante puis on laisse refroidir le milieu coulé avant inoculation de bactéries.

Les micro-organismes ont été cultivés pendant 24 heures à 37 °C dans des tubes contenant un milieu MHA en pente à partir de suspension de souches contenues dans un milieu liquide BH (brain-heart). On procède donc à leur dilution dans 10 ml de solution RC (Ringer Cystéine) en s'assurant de bien mélanger afin d'avoir une répartition homogène des micro-organismes, puis une goutte de chaque suspension est récupérée dans 10 ml de solution RC afin d'obtenir une concentration finale de 10<sup>5</sup> UFC/ml.

Pour finaliser la préparation des boîtes de Pétri, 1 ml de suspension de chacun des tubes RC préparés précédemment est prélevé pour remplir les puits de la plaque de l'ensemencement multiple (Appareil de Steers). La surface de la gélose estensemencée avec un inoculum des souches à étudier, l'inoculateur à têtes multiples de l'appareil de Steers permet d'ensemencer au maximum 36 souches différentes par boîte.

Deux boîtes témoin "avant" et "après" l'ensemencement ont été réalisées pour vérifier la stabilité des concentrations des inocula, une boîte de témoin solvant a été aussi préparée pour vérifier l'absence d'effet inhibiteur du solvant. La culture des micro-organismes se fait par incubation des boîtes de Pétri, pendant 24 heures, à 37 °C.

La lecture des résultats se fait en observant la présence ou l'absence de colonie à la surface de la gélose.

#### IV. 1.1.2. Criblage de l'activité antimicrobienne contre des bactéries hautement résistantes et productrices de BLSE

Afin de chercher des produits ayant un fort pouvoir antimicrobien, nous avons réalisé un second criblage de l'activité contre des bactéries hautement résistantes aux antibiotiques, dont 23 souches productrices de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE). Ce criblage a été réalisé sur l'extrait brut à l'éther de pétrole des racines d'*Eryngium triquetrum*, la fraction CP9E1 issue de cet extrait et le composé C1.4, selon la méthode de dilution en milieu gélosé décrite précédemment.

Les 35 souches sélectionnées sont composées de 28 bactéries Gram<sup>-</sup> et 7 bactéries Gram<sup>+</sup> appartenant à 15 espèces différentes : *Pseudomonas aeruginosa* (10276, 10280, 10278, 8136, 8134, ATCC 27583, 8131), *Escherichia coli* (11006, 11014, 11008), *Klebsiella pneumoniae* (11024, 11032, 11028), *Klebsiella oxytoca* (11049), *Salmonella. Sp* (11037), *Enterobacter cloacae* (10281, 11053, 11055), *Enterobacter aerogenes* (9004), *Serratia marcescens* (11057, 10267, 10271), *Proteus mirabilis* (11062, 11064), *Citrobacter freundii* (11045, 11043), *Acinetobacter baumannii* (10275, 9010), *Staphylococcus aureus* (8241, 8148, 8143), *Staphylococcus saprophyticus* (8237), *Enterococcus faecalis* (8152, 8153), *Enterococcus faecium* (9001).

Les caractéristiques des souches sélectionnées sont détaillées dans le Tableau 37.

Les bactéries BLSE sélectionnées dans ce présent travail ont en majorité des gènes de résistance définis, ces gènes sont dérivés de mutations ponctuelles dans la séquence génétique codant pour le site actif des  $\beta$ -lactamases :

- **PER-1** : Les BLSE de type PER-1 hydrolysent toutes les  $\beta$ -lactamines à l'exception des carbapénèmes. Initialement découverte en 1993 chez *P. aeruginosa* en Turquie, l'enzyme PER-1 est fréquente chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter* spp. mais a aussi été détectée chez *S. enterica*, *Providencia* spp., *P. mirabilis* et *A. faecalis* [284]. En Turquie, une étude récente a montré que 32 % des souches résistantes à la ceftazidime de *P. aeruginosa* et 55 % de celles de *A. baumannii* étaient productrices de PER-1.  
PER-1 est surtout présente en Turquie et en Corée du Sud, mais quelques cas ont été décrits en Italie, France, Belgique et Tunisie.
- **VIM-2 et VIM-4** : Les BLSE de type VIM appartiennent aux bêta-lactamases de classe B, appelées aussi métallo-bêta-lactamases (carbapénémases) [284]. VIM-2 ont été décrites dans des isolats cliniques de *P. aeruginosa* dans de nombreux pays dispersés sur l'ensemble du globe, et représente actuellement la carbapénémase la plus fréquente chez *P. aeruginosa*.  
Les enzymes de type VIM et IMP sont désormais endémiques dans certains pays tels que la Grèce, l'Italie, l'Espagne, Taiwan et le Japon [281].
- **GES-2** : Les souches productrices de GES ont été plus isolées en Afrique du Sud, Grèce et en France, GES-2 a été initialement décrite chez *P. aeruginosa*, les BLSE

- de type GES sont de plus en plus rapportées chez les bacilles à Gram négatif, notamment *P. aeruginosa*, *E. coli* et *K. pneumoniae*. GES-1 a été initialement décrite chez une souche de *K. pneumoniae* isolée en 1998 en France puis en Argentine, au Brésil, au Portugal et aux Pays-Bas [284]. A ce jour, 9 variants différents ont été décrits dont GES-2 en Afrique du Sud. Contrairement à la plupart des BLSE, GES-1 n'hydrolyse pas l'aztréonam et surtout GES-2 hydrolyse les carbapénèmes en étant moins sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.
- **CTX-M15** : Récemment il y a eu une explosion mondiale des gènes CTX-M dans la population, néanmoins, la cause de cette propagation n'est pas connue [285]. Ces BLSE ont émergé chez les entérobactéries et la situation épidémiologique a complètement changé au niveau mondial. En effet, la plupart des souches productrices de BLSE sont maintenant des souches d'*E. coli* exprimant des BLSE de type CTX-M responsables d'infections communautaires, notamment urinaires. Les mécanismes de diffusion de CTX-M semblent complexes, mettant en jeu plutôt la diffusion de plasmides (épidémies de plasmides) et/ou d'autres éléments génétiques mobiles que la diffusion unique d'un clone bactérien. Au niveau de leur spectre d'activité, elles hydrolysent préférentiellement le céfotaxime (céphalosporines de troisième génération), d'où leur nom de céfotaximases [284], [285].
  - **SHV 2A** : Les BLSE de type SHV ont été détectées parmi de nombreuses entérobactéries (notamment *K. pneumoniae*) mais aussi chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter spp.* Les souches productrices d'enzymes du type SHV montrent une susceptibilité partiellement diminuée vis-à-vis du céfépime (antibiotique de la classe des céphalosporines). Le type SHV constitue celui qui comporte le plus grand nombre (supérieur à 70) d'enzymes BLSE [285]. Ainsi, la première  $\beta$ -lactamase capable d'hydrolyser les céphalosporines à spectre élargi, SHV-2 (mutant ponctuel de SHV-1) a été décrite en 1985 dans une souche de *K. pneumoniae* en Allemagne.
  - **CMY-2** : la CMY appartient aux  $\beta$ -lactamases de la classe C, codées par des gènes chromosomiques ou plasmidiques. Ces  $\beta$ -lactamases sont capables d'hydrolyser les céphalosporines y compris les céphamycines (céfoxitine) ainsi que les pénicillines, mais pas le céfépime. Elles sont résistantes aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases. Le gène CMY-2 a un support plasmidique qui lui permet d'être transféré à différentes espèces d'entérobactéries (*E. coli*, *Klebsiella sp.*, *Salmonella sp.*, etc) [286].
  - **NDM-1** : Appartient aux métallo- $\beta$ -lactamases, elle a déjà été identifiée sur tous les continents en 2010 à l'exception de l'Amérique du Sud et Centrale. Plusieurs épidémies ou cas sporadiques ont été décrits en milieu hospitalier ou en milieu communautaire. Ce type d'enzyme a été principalement isolé chez *K. pneumoniae*, et dans une moindre mesure, chez les autres entérobactéries [281]. Le niveau de résistance aux carbapénèmes est là aussi variable. Cependant les plasmides porteurs du gène comportent très souvent plusieurs autres gènes de résistance ce qui conduit au final à une multirésistance voire à une toto-résistance des souches [281].
  - **OXA-43** : Appartient aux carbapénémases de classe D (oxacillinases), Ces enzymes possèdent une grande activité catalytique pour la cloxacilline, l'oxacilline et la méticilline. Ces enzymes ont été fréquemment observés chez *P. aeruginosa*

mais aussi chez les entérobactéries, particulièrement en France et en Turquie. Les BLSE de type OXA sont codés par de gènes portés par des éléments mobiles comme les transposons et intégrons [285].

- **KPC-2** : c'est une carbapénémase de classe A comme le VIM-1, La grande majorité des souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de carbapénémases VIM-1 ou KPC-2/-3 ont été détectées par des prélèvements de dépistage chez des patients qui avaient préalablement été hospitalisés en Grèce (Grèce continentale, Crète, Rhodes, Chypre) ou en Italie (Sicile) [281].
- **SME-1** : c'est une carbapénémase de classe A capable de conférer la résistance aux carbapénèmes, elle a été décrite chez *S. marcescens* [287]. Les SME sont restreintes à *S. marcescens* et ne se disséminent que peu.
- **TEM-3 et TEM-21** : La majorité des BLSE de ce type dérivent par quatre à sept mutations ponctuelles de l'enzyme originale (TEM-1 ou TEM-2). Actuellement, il y a plus de 140 enzymes TEM. Ces mutations rendent l'enzyme capable d'hydrolyser les Céphalosporines de troisième génération mais aussi plus vulnérable à l'action des inhibiteurs (acide clavulanique) [285].
- **VEB-1** : les enzymes du type VEB (VEB-1 a 38 % d'identité avec PER-1) [284] hydrolysent de préférence la ceftazidime et l'aztréonam et ont été retrouvées chez les entérobactéries dans le Sud-Est asiatique, chez *A. baumannii* en France [285] et chez *P. aeruginosa* en Thaïlande.

Nous avons réalisé 10 concentrations en série pour chacun des produits.

Pour l'extrait brut et la fraction CP9E1 les concentrations testées sont : 1250 ; 600 ; 300 ; 150 ; 70 ; 39 ; 19 ; 9 ; 4,8 et 2 µg/ml. Quant au composé pur C1.4, nous avons réalisé une gamme de concentrations plus basse : 300 ; 150 ; 70 ; 39 ; 19 ; 9 ; 4,8 ; 2 ; 1,2 et 0,6 µg/ml. Les conditions opératoires sont les mêmes que celles décrites précédemment.

## IV. 1.2. Bioautographie

Les techniques bioautographiques sont très sensibles et permettent le criblage rapide d'un grand nombre d'extraits végétaux. Elles apportent en outre des informations préliminaires sur la nature des composés actifs (Rf, comportement sous lumière UV, etc.). Les tests sur plaques permettent donc une détection qualitative d'inhibiteurs et peuvent être utilisés comme outil de fractionnement bioguidé en testant les produits issus de fractionnement et les produits purs.

### IV. 1.2.1. Préparation des plaques CCM

10µl à partir d'une solution de 100 mg/ml de produits à tester ont été déposés sur des plaques de chromatographie sur couche mince et ont été élués avec un système de solvants approprié. On a déposé dans les mêmes conditions 10 µl de chaque produit sans les faire migrer, ils serviront comme témoins positifs.

Après avoir été soigneusement séchées, les plaques ont été conservées dans un endroit stérile avant le test bioautographique.

#### IV. 1.2.2. Préparation du milieu et ensemencement des bactéries

Pour choisir la bactérie à inclure dans notre milieu gélosé nous nous sommes fiés au test CMI afin de sélectionner la ou les bactéries ayant le plus de sensibilité avec nos extraits. Les micro-organismes sont cultivés dans des tubes contenant un milieu MHA en pente. 24 h plus tard, 10 ml de liquide RC (Ringer Cystéine) sont ajoutés aux cultures fraîches. Ensuite 5 ml de cette solution ont été dilués dans 25 ml de milieu de culture BH. Les plaques CCM (10 × 10 cm) développées et stérilisées ont été déposées dans des boîtes de culture carrées ; ensuite, 30 ml de la suspension gélose-bactérie sont ajoutés à chaque boîte. L'incubation a duré 24 heures à 37°C.

Pour observer les résultats, les plaques sont ensuite révélées à l'aide d'une solution aqueuse de para-iodonitrotétrazolium (INT) (AppliChem, Darmstadt, Allemagne) à 2 mg/ml qui, une fois vaporisée sur la surface de la gélose et incubée de nouveau pendant quatre heures, est transformée par une déshydrogénase bactérienne en un composé d'une couleur rouge foncée, ce qui a permis de visualiser des zones d'inhibition incolores sur fond rouge (Figure 78).



Figure 78 : photos de la préparation de bioautographie d'immersion représentant la mise en place de la CCM dans les boîtes de pétri carrée, l'ajout du milieu de culture contenant les souches à tester et la révélation de la plaque par le réactif INT.

#### IV. 1.3. Détermination de CMI et CMB en microplaque

Afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) des produits isolés C1.4 et A6, nous avons utilisé la méthode de dilution en milieu liquide en microplaque (Figure 79).

Comme pour la méthode de dilution en milieu solide, cette méthode consiste à mettre un inoculum bactérien au contact de concentrations décroissantes de matrice à tester, selon une dilution en série de raison  $\frac{1}{2}$ . L'inoculum bactérien est distribué de façon égale dans les puits de microplaque contenant la matrice à tester. Après incubation, la CMI est indiquée par le puit qui contient la plus faible concentration de matrice où aucune croissance n'est visible. La CMB est définie comme étant la concentration minimale d'extrait (ou de composé) ne laissant pas de bactéries survivantes de l'inoculum après incubation à 37 °C pendant 24 heures.

Au cours de ce test, 33 concentrations des produits C1.4 et A6 ont été préparées de 25 mg/ml à  $58 \times 10^{-10}$  mg/ml. 10  $\mu$ l de chaque dilution sont ensuite ajoutés à 180  $\mu$ l de milieu Mueller-Hinton et 10  $\mu$ l de suspension bactérienne à  $10^5$  UFC.ml<sup>-1</sup>. Les concentrations finales en produits s'échelonnent de 1,25 mg/ml à  $2,9 \times 10^{-10}$  mg/ml.

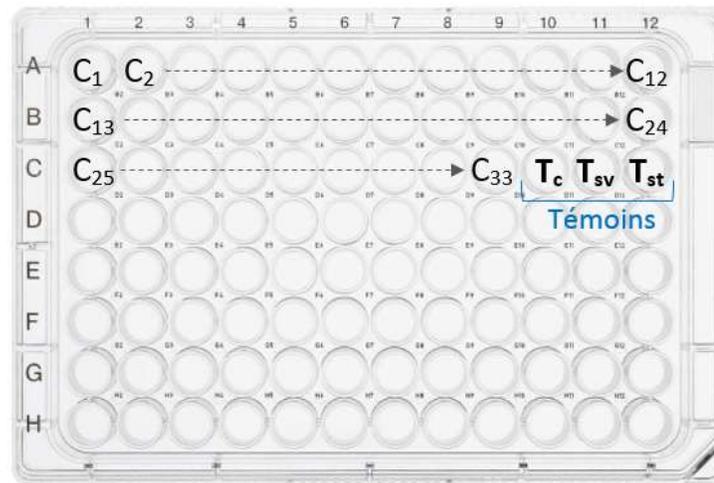


Figure 79 : Schéma représentant la préparation de microplaques (96 puits) permettant de déterminer la CMI des produits purifiés : l'emplacement des dilutions des concentrations de C1 (25 mg/ml) à C33 ( $58 \times 10^{-10}$  mg/ml) et les témoins T<sub>c</sub> (témoin de culture contenant le milieu et la suspension bactérienne), T<sub>sv</sub> (témoin de solvant contenu dans le milieu de culture) et T<sub>st</sub> (témoin de stérilité contenant uniquement le milieu de culture MH)

Les CMI obtenus au cours du criblage sur les 35 bactéries par la méthode de dilution en milieu solide ont révélé une forte activité de l'extrait brut, de la fraction CP9E1 enrichie en composé A6 (46 %) et du composé C1.4 particulièrement contre *Pseudomonas aeruginosa*. Nous avons donc choisi de continuer ce test sur 3 souches de *Pseudomonas aeruginosa* hautement résistantes qui ont été repérées sensibles à nos produits (*P. aeruginosa* 8136, 8134 et 10278), nous avons aussi choisi deux souches multirésistantes à Gram+ (*Staphylococcus aureus* 8148 et *Enterococcus faecalis* 8152), également sensibles à nos produits, afin de déterminer aussi la concentration minimale bactéricide. Tous les tests ont été réalisés en triplicat.

Après incubation des plaques pendant 24 heures à 37°C, la lecture des résultats s'effectue en repérant la présence ou l'absence de trouble dans chaque puits ce qui indique la présence

ou l'absence de croissance bactérienne. La CMI se situe au niveau du dernier puit où une absence de croissance est observée. 10 µl de réactif INT est ajouté à chaque puit afin de vérifier toute croissance bactérienne et confirmer la CMI observée précédemment.

Pour déterminer la CMB, on prélève 100 µl des puits contenant la CMI, deux fois la CMI et quatre fois la CMI (avant la pulvérisation par l'INT) qu'on ensemence dans des boîtes de pétri contenant du milieu de culture solide (MHA). Après 24 heures d'incubation, la CMB est déterminée par la plus faible concentration où aucune croissance bactérienne n'est observée à la surface de la gélose.

## **IV. 2. Criblage et évaluation de l'activité phototoxique**

### **IV. 2.1. Préparation des extraits et culture bactérienne**

Les extraits à l'éther de pétrole ont été préparés selon la procédure d'extraction générale (section I.2). La préparation des différentes concentrations des extraits, les souches microbiennes et l'ensemencement des micro-organismes ont été effectués selon la méthode de dilution en milieu solide décrite précédemment (section V.1.1.1.). Les tests phototoxiques ont été effectués en 2 répétitions, et des boîtes de pétri d'extraits préparés avec la même méthode et placés dans les mêmes conditions mais dans l'obscurité ont servi comme témoins négatifs. Deux témoins de culture et deux témoins de solvants avec et sans irradiations ont été testés afin de vérifier l'absence d'effet des rayons ultraviolets sur la croissance microbienne ainsi que l'absence d'interaction des rayons ultraviolets avec les solvants utilisés pour la dilution des extraits dans le milieu de culture.

### **IV. 2.2. Appareillage de l'activité phototoxique**

Pour réaliser ce test, la mise en place de la technique a été basée principalement sur les travaux de Hudson et Towerst (1991) [54] mais aussi en associant ceux de Costa *et al.* (2002) et Coutinho *et al.* (2009) [288], et en apportant quelques modifications. A nos connaissances c'est la première fois que l'activité phototoxique antimicrobienne est associée à la méthode de dilution en milieu solide (par l'appareil de Steers) sur boîtes de pétri qui permet un large criblage de cette activité sur un panel de 36 souches. La technique que nous avons réalisée se caractérise par la facilité de mise en œuvre et la large gamme de bactéries et d'extraits utilisés en une seule expérience.

#### **IV. 2.2.1. Source lumineuse**

La source des irradiations, en suivant les recommandations de Hudson et Towerst (1991), était une lampe de type BLB (Black Light Blue, 160W, EYE HID LAMP, Amérique du nord) ; les rayons ultraviolets émis par ce type de lampes (300-400 nm) se situent dans la

gamme des UVA avec une légère irradiation dans la gamme des UVB et un maximum d'intensité à 350 nm (Figure 80).

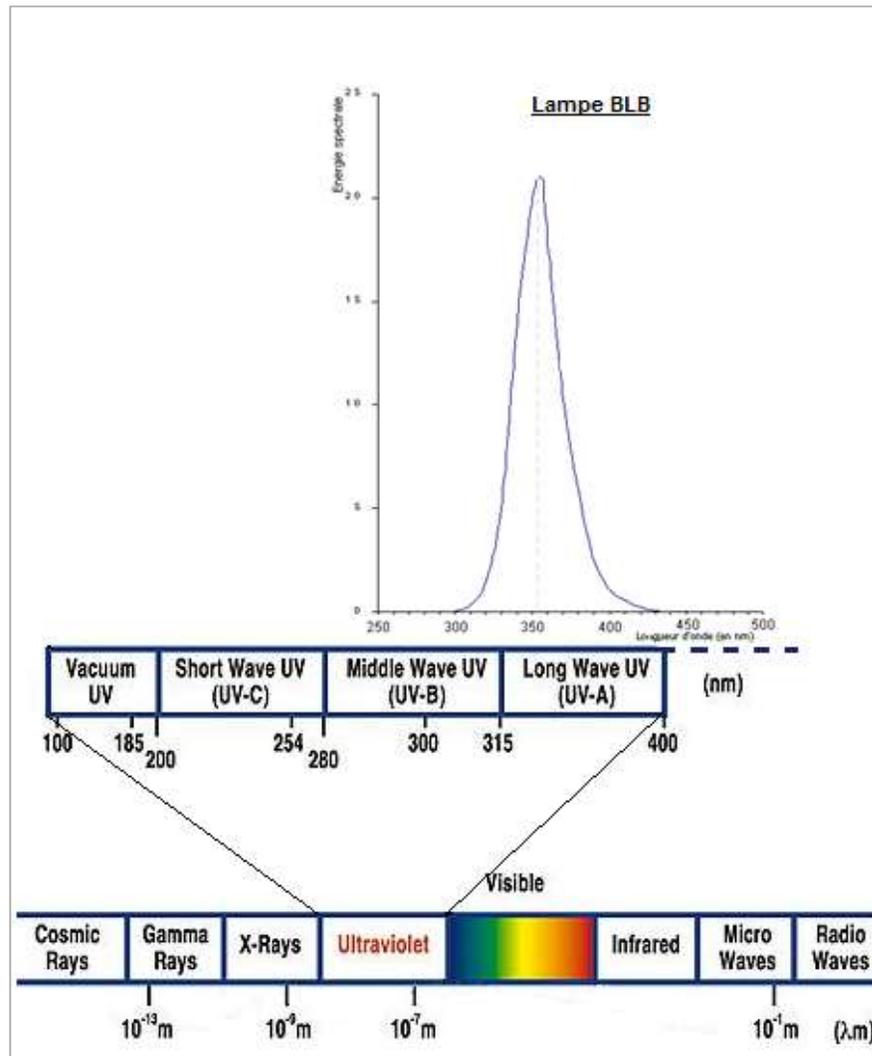


Figure 80 : Spectre des irradiations UV émises par la lampe BLB (nm)

L'exposition aux ultraviolets a été réalisée tout au long de l'incubation des bactéries (24 h) à un intervalle répétitif d'1h 15 d'irradiation suivi par 15 min de repos afin d'éviter un surchauffage de la lampe et de son milieu environnant et garder par conséquent une température constante d'incubation de 35°C. Le choix de cet intervalle d'irradiation a été fixé après plusieurs essais préalables en contrôlant la température d'incubation à différents endroits de l'étuve tout au long du temps d'incubation.

#### **IV. 2.2.2. Incubateur**

L'incubation des micro-organismes a été effectuée dans une étuve ventilée (double porte, THERMO JOUAN, USA) pour assurer une distribution homogène de la température qui a été fixée à 35°C durant l'incubation microbienne (24 h), 3 thermomètres ont été placés à différents endroits de l'étuve pour vérifier sa répartition.

La lampe UV a été placée à un rayon de 48 cm des boîtes de pétri et le contrôle des durées d'irradiations a été effectué grâce à un programmateur électrique de type Flash Pratic.

#### **IV. 2.3. Lecture des résultats**

Comme pour la méthode de dilution en milieu solide, la lecture des résultats a été effectuée en repérant la présence ou l'absence de colonies à la surface de gélose (Figure 25). Nous avons observé une croissance de toutes les souches contenues dans les boîtes témoins ce qui indique que les irradiations UV n'ont pas d'action inhibitrice sur les micro-organismes en absence d'extraits photosensibilisants, et que les solvants utilisés n'inhibent pas la croissance microbienne avec et sans UV.

#### **IV. 3. Evaluation de l'activité cytotoxique**

Les tests cellulaires ont été réalisés à l'UCL en collaboration avec Pr Joelle Leclercq.

Pour la sélection des extraits d'intérêt thérapeutique, 2 lignées cellulaires ont été utilisées :

La première correspond à des cellules non cancéreuses de fibroblastes pulmonaires humains (WI38) et la deuxième correspond à des cellules de la lignée cancéreuse de macrophages dérivée d'un réticulosarcome de souris (J774) (BALB/c murine).

#### **IV. 3.1. Culture des cellules**

Les lignées WI38 et J774 ont été cultivées respectivement dans les milieux DMEM et RPMI1640 (Gibco) supplémentés avec 10% du sérum de bovin fœtal inactivé par la chaleur (Gibco), L-glutamine (4 mM et 2 mM respectivement pour les deux lignées cellulaires), 100 IU.ml<sup>-1</sup> de pénicilline et 100 µg ml<sup>-1</sup> de streptomycine.

#### **IV. 3.2. Mesure de la prolifération cellulaire**

La mesure de la prolifération repose sur un test classique de mesure de la viabilité cellulaire appelé test MTT (Mosmann, 1983).

#### IV. 3.2.1. Test MTT : Principe

Cette méthode permet de quantifier l'activité enzymatique de la succinyl déhydrogénase mitochondriale, enzyme présente et active uniquement dans les cellules vivantes, capables de cliver un sel de tétrazolium de couleur jaune soluble dans l'eau, le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (ou MTT) en un dérivé formazan de couleur bleue, insoluble dans l'eau. L'activité enzymatique est mesurée grâce au changement de couleur du réactif, par spectroscopie UV-visible (DO 570 nm) sur un lecteur de plaques. La quantité de formazan produit est donc proportionnelle au nombre de cellules vivantes [289] [290].

#### IV. 3.2.2. Mode opératoire

Les extraits sont d'abord dilués dans du DMSO pour avoir des concentrations de 10 mg/ml.

Les cellules sontensemencées dans des plaques à 96 puits (5000 cellules par puit) avec 100 µl de milieu (DMEM ou RPMI1640) et 10% de FBS pendant 24 heures. Ensuite, 200 µl de milieu fraîchement préparé contenant 50 µg/ml d'extrait sont ajoutés à chaque puits. Pour les cellules témoins, seul du milieu est ajouté. La mesure de la prolifération a été réalisée en deux fois pour chaque échantillon.

Pour déterminer les CI<sub>50</sub>, 5000 cellules sontensemencées dans 180 µl de milieu (DMEM ou RPMI1640) avec 10% de FBS dans les plaques à 96 puits pendant 24 heures. Les dilutions sont ensuite préparées dans une seconde plaque comme suit (Figure 81).

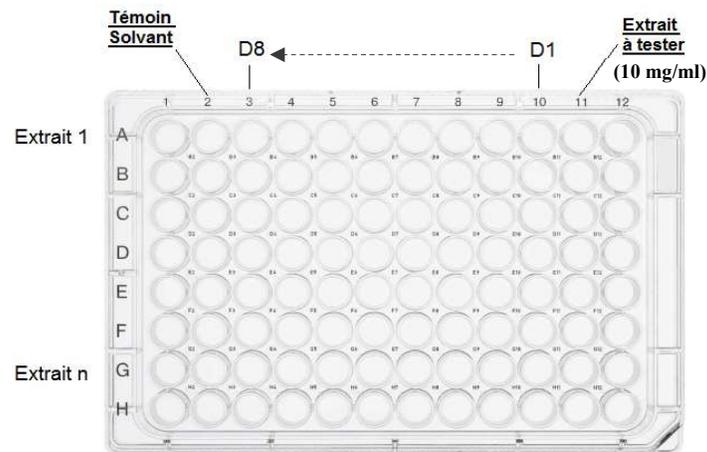


Figure 81 : Schéma de plaque utilisée pour préparer les dilutions pour l'activité cytotoxique.

Chaque rangée de A à H correspond à chacun des extraits. Dans chaque puit de la colonne 11 nous avons placé les extraits à tester puis 10 µl de chaque extrait ont été dilués dans 190 µl du milieu pour avoir une concentration initiale de 500 µg/ml (puit 10), puis nous avons réalisé une série de 8 dilutions de raison 1/3 en prélevant 50 µl de chaque puit qu'on a dilué

dans 100 µl de milieu déjà contenus dans le puit suivant (de 9 à 3). Dans la colonne 2 nous avons préparé le témoin milieu (190 µl de milieu + 10 µl de solvant).

Par la suite, les plaques contenant les cultures cellulaires ont servi pour réaliser l'activité cytotoxique. Un volume de 20 µl de chaque dilution est prélevé de la plaque précédente et dilué dans 180 µl de milieu dans le puit correspondant de la plaque de culture cellulaire. Les dilutions sont ajoutées en duplicata de manière à avoir deux rangées pour chaque extrait. Les concentrations finales testées pour chaque extrait sont : 50 µg/ml ; 16,66 µg/ml ; 5,55 µg/ml ; 1,85 µg/ml ; 0,62 µg/ml ; 0,2 µg/ml ; 0,068 µg/ml ; 0,023 µg/ml.

Pour les 2 tests (screening et détermination des  $CI_{50}$ ), les plaques sont incubées pendant 72 heures. Ensuite, le milieu est remplacé par 100 µl de milieu DMEM ou RPMI1640 sans sérum, contenant 10 µl de solution de MTT (3 mg/ml dans du PBS). Après 45 min, le milieu est enlevé puis 100 µl de DMSO sont ajoutés à chaque puits pour solubiliser les cristaux formés. Les plaques sont ensuite agitées et les densités optiques sont enregistrées à deux longueurs d'ondes (570 nm et 620 nm), contre un blanc (100 µl of pure DMSO) dans un lecteur de microplaques. Dans l'ensemble des expériences, la camptothécine (Sigma) a été utilisée comme contrôle positif (25 à 0,00025 µg/ml). La concentration de solvant la plus élevée à laquelle sont exposées les cellules est de 1%, ce qui a été démontré non toxique pour les cellules. Tous ces tests ont été effectués en 3 répétitions.

La densité optique relative est exprimée par la formule suivante :

$$\text{Viabilité \%} = [A_T/A_{NT}] \times 100$$

Dont **A** : absorbance, **NT** : cellules témoin et **T** : cellules traitées par les extraits

## REFERENCES

1. Organisation Mondiale de la Santé: Résistance aux antimicrobiens. In: Organisation mondiale de santé. (Accessed Mai 2005) Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/fr/>
2. INSERM: COMBACTE : Un nouveau pas dans la lutte contre les résistances aux antibiotiques. (Accessed 2013) Available at: <http://www.inserm.fr/espace-journalistes/combacte-un-nouveau-pas-dans-la-lutte-contre-les-resistances-aux-antibiotiques>
3. Bonnet, J.: Utilisation raisonnée des antibiotiques en élevage porcin. Démarche d'accompagnement dans sept élevages., Lyon (2014)
4. INSERM: Résistance aux antibiotiques. (Accessed May 2013) Available at: <http://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-et-microbiologie/dossiers-d-information/resistance-aux-antibiotiques>
5. Gillespie, S. H.: Antibiotic resistance in the absence of selective pressure. International Journal of Antimicrobial Agents 17(3), 171-176 (2001)
6. Ben Redjeb, S.; Ben Hassen, A.; Hammami, A.; Kechrid, A.; Ben Redjeb, S.; Ben Hassen, A.; Hammami, A.; Kechrid, A.: Epidémiologie des résistances bactériennes en Tunisie: Résistance aux antibiotiques. La Presse Médicale, 1-5 (2000)
7. Organisation Mondiale de la Santé: Premier rapport de l'OMS sur la résistance aux antibiotiques: une menace grave d'ampleur mondiale. (Accessed 2014) Available at: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/fr/>
8. Mayer, K.; Opal, S.; Medeiros, A.: Mechanisms of antibiotic resistance. In : Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. In: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th edition, Churchill Livingstone. 2:236-253. Churchill Livingstone (2000)
9. Sarr, M. M.: Prévalence des souches d'*Escherichia coli* porteuses de gènes de virulence associés aux *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) et/ou résistantes aux antibiotiques dans les effluents de la station d'épuration de Cambérène et des abattoirs de Dakar., DAKAR (2012)
10. Labid, A.: Etude fréquentielle des bactéries responsables des infections septicémiques chez les enfants dans la région d'Annaba., Annaba, Algérie (2015)

11. Diallo, A. A.: *Escherichia coli* pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animale : Prévalence et caractérisation avant et après traitement épuratoire., France (2013)
12. Chopra, I.; O'Neill, A. J.; Miller, K.: The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resistance Updates* 6(3), 137-145 (2003)
13. Davies, J. E.: Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. In : *Antibiotic Resistance. Origins, evolution, selection and spread.* Chadwick DJ & Goode J (Eds.), Chichester (1997) 15-27
14. AFSSA: Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine. Rapport du groupe de travail "Antibiorésistance". In: Maisons-Alfort: AFSSA. (Accessed Janvier 2006) Available at: <https://www.anses.fr/fr/system/files/SANT-Ra-ABR.pdf>
15. Guerin-Faubleee, V.: *Les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques.*, Lille (2010)
16. Scott, G.: Antibiotic resistance. *Medicine Journal* 37(10), 551-556 (2009)
17. Faure, S.: Transfert d'un gène de résistance aux beta-lactamines blaCTX-M-9 entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : influence d'un traitement antibiotique., France (2009)
18. Abraham, E. P.; Chain, E.: An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146(3713), 837 (1940)
19. Walsh, C.: Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406(6797), 775-781 (2000)
20. Masterton, R.; Drusano, G.; Paterson, D. L.; Park, G.: Appropriate antimicrobial treatment in nosocomial infections-the clinical challenges. *Journal of Hospital Infection* 55(11), 1-12 (2003)
21. Rodriguez-Villalobos, H.; Struelens, M. J.: Résistance bactérienne par  $\beta$ -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur Résistance bactérienne par  $\beta$ -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimate. *Réanimation* 15(3), 205-213 (2006)
22. Aubron, C.; Rapp, C.; Parienti, J. J.; Pateya, O.: Actualité de l'antibiothérapie inhalée dans les infections respiratoires à *Pseudomonas aeruginosa*. *Médecine et Maladies Infectieuses* 32(9), 460-467 (2002)

23. Guery, B.; Kipnis, E.; Béraud, G.; Faure, K.; Lille, C. H. R. U.: Pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa* : aspects thérapeutiques. (2009)
24. Jeannot, K.; Plésiat, P.: Implications thérapeutiques de la résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa*. La Lettre de l'infectiologue 20(6), 227-237 (2005)
25. de Bentzmann, S.; Plésiat, P.: *Pseudomonas aeruginosa*: Une virulence complexe. RFL 2011(435), 73-81 (2011)
26. Mérens, A.; Janvier, F.; Vu-Thien, H.; Cavallo, J. D.; Jeannot, K.: Phénotypes de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*. Revue Francophone des Laboratoires 2012(445), 59-74 (2012)
27. Pollack, M.: *Pseudomonas aeruginosa*. In : Principles and practice of infectious diseases. 4th Ed. Mandell G L, Bennett J E, Dolin R, editors, New York, N.Y: Churchill Livingstone (1995) 1980-2003
28. Jehl, F.; Chomar, M.; Weber, M., Gerard, A.: De l'antibiogramme à la prescription. Edition Biomérieux, Paris, France (2000)
29. Mérens, A.; Delacour, H.; Plésiat, P.; Cavallo, J. D.; Jeannot, K.: *Pseudomonas aeruginosa* et résistance aux antibiotiques. Revue Francophone des Laboratoires 2011(435), 49-62 (2011)
30. Giamarellou, H.: Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections. Journal Antimicrob Chemother 49(2), 229-233 (2002)
31. Nordmann, P.; Cuzon, G.; Naas, T.: The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. The Lancet infectious diseases 9(4), 228-236 (2009)
32. Weldhagen G.F.; Poirel, L.; Nordmann, P.: Ambler class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel development and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother 47(8), 2385-2392 (2003)
33. Jones, J. D. G., Dangl, J. L.: The plant immune system. Nature 444, 323-329 (2006)
34. Cowan, M. M.: Plant products as antimicrobial agents. Clinical microbiology reviews 12(4), 564-582 (1999)
35. Gibbons, S.: Phytochemicals for bacterial resistance - strengths, weaknesses and opportunities. Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research 74(6), 594-602 (2008)
36. Guinoiseau, E.: Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action., Français (2010)

37. Okusa Ndjolo, P.: Etude phytochimique et activité antimicrobienne directe et indirecte de *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae)., Bruxelles (2012)
38. Reinhard, A.: La thérapie photodynamique pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et la prévention des cancers colorectaux associés: évaluation sur modèles murins., Vandoeuvre-lès-Nancy, France (2014)
39. Fitzpatrick, T. B.; Pathak, M. A.: Part IV: Basic Considerations of the Psoralens: Historical aspects of methoxsalen and other furocoumarins. *Journal of Investigative Dermatology* 32(2), 229-231 (1959)
40. Robin, M.: Les plantes photosensibilisantes., Limoges, France (2011)
41. Bordin, F.: Photochemical and photobiological properties of furocoumarins and homologues drogues. *International Journal of Photoenergy* 1, 1-6 (1999)
42. Hannani, D.: Etude des mécanismes d'action de la photochimiothérapie extra-corporelle chez l'Homme., Grenoble I, France (2010)
43. Parrish, J. A.: Phototherapy and photochemotherapy of skin diseases. *Journal of Investigative Dermatology* 77(1), 167-171 (1981)
44. Young, A.J.; Frank, H.A.: Energy transfer reactions involving carotenoids: Quenching of chlorophyll fluorescence. *J. Photochem. Photobiol.* 36(1), 3-15 (1996)
45. Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H.: Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 274(2), 532-538 (1989)
46. Epstein, J. H.: Phototoxicity and Photoallergy. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 18(4), 274-284 (1999)
47. Mang, R.; Stege, H.; Krutmann, J.: Mechanisms of phototoxic and photoallergic reactions. In : *Contact Dermatitis 5e édition, partie 1.* Springer-Verlag (2011) 155-163
48. Société Française de Dermatologie: *Photodermatologie - Photobiologie cutanée, photoprotection et photothérapie 2ème édition 2nd edn.* ARNETTE, Rueil-Malmaison (2008)
49. Zhang, AY.: Drug-Induced Photosensitivity. (Accessed 2010) Available at: <http://emedicine.medscape.com/>
50. Séguier, S.; Coulomb, B.; TEDESCO, A: Apport de la thérapie photodynamique dans le traitement des parodontopathies chez l'homme. *Odontologie*, 1-5 (2008)

51. Dougherty, T. J.; Kaufman, J. E.; Goldfarb, A.; Weishaupt, K. R.; Boyle, D.; Mittleman, A.: Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Research* 38(8), 2628-35 (1978)
52. Pegaz, B.; Debeve, E.; Ballini, J. P.; Wagnieres, G.; Spaniol, S.; Albrecht, V.; Scheglmann, D. V.; Nifantiev, N. E.; Van Den Bergh, H.; Konan-Kouakou, Y. N.: Photothrombic activity of m-THPC-loaded liposomal formulations: pre-clinical assessment on chick chorioallantoic membrane model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 28(1), 134-40 (2006)
53. Morosini, V.: Pour une amélioration de la thérapie photodynamique appliquée à la cancérologie : Potentialités des dendrimères poly(amidoamine) et des Quantum Dots CdTe adressés par l'acide folique., Centre de Recherche en Automatique de Nancy, France (2010)
54. Hudson, J. B.; Towers, G. H. N.: Therapeutic potential of plant photosensitizers. *Pharmacology & therapeutics* 49(3), 181-222 (1991)
55. Towers, G. H. N.; Graham, E. A.; Spenser, I. D.; Abramowski, Z.: Phototoxic Furanoquinolines of the Rutaceae. *Journal of Medicinal Plant Research* 41(2), 136-142 (1981)
56. Giese, A.C.: Hypericium. *Photochemical and Photobiological Reviews* 5, 229-255 (1980)
57. Serrano, J.; Merchan, M.; Serrano, L.: Photoreactivity of furocoumarins and DNA in PUVA Therapy: Formation of Psoralen-Thymine Adducts. *The Journal of Physical Chemistry B* 112(44), 14002-14010 (2008)
58. Yurkow J., Laskin J.: Mechanism of action of Psoralens: Isobologram Analysis reveals that Ultraviolet light potentiation of psoralen action is not additive but synergistic. *Cancer Chemother Pharmacol.* 27, 315-319 (1991)
59. Valkova, S.: UVB phototherapeutic modalities comparison of two treatment for chronic Psoriasis. *Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica, et Adriatica* 16(1), 26-30 (2007)
60. Lowe, N. J.; Cripps, D. V.; Warrin, A. P.: Photochemotherapy for mycosis fungoides: a clinical and histological study.. *Archives of dermatology* 115(1), 50-53 (1979)
61. Morison, W. L.; Parrish, J. A.; Fitzpatrick T. B.: Oral psoralen photochemotherapy of atopic eczema. *British Journal of Dermatology* 98(1), 25-30 (1987)
62. Roelandts, R.: The history of phototherapy: something new under the sun?. *Journal of the American Academy of Dermatology* 46(6), 926-930 (2002)

63. Hecka, A.: Caractérisation par Spectrométrie de Masse d'extraits de Millepertuis potentiellement utilisables en Photodiagnostic et Photothérapie des cancers: Etude de leurs propriétés photochimiques en solution et en milieu cellulaire., France (2009)
64. Maiolo, E.: Bénéfices et dangers du rayonnement solaire et de sa composante ultraviolette : de l'utilisation médicale aux nouvelles habitudes de loisirs., France (2013)
65. Adamski, H.; Amblard, P.; Verret, J. L.: Photodermatologie troisième partie: photothérapie. Arnette, France (2008)
66. Beani, J. C.; Jeanmougin, M.: La photothérapie UVB à spectre étroit dans le psoriasis vulgaire : utilisation pratique et préconisation de la Société Française de Photodermatologie. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*. 137(1), 21-31 (2010)
67. Puzenat, E.; Aubin, F.: Photothérapie de l'enfant : indications, explications aux parents et suivi. *Annales de dermatologie et de vénéréologie* 134(5), 92-93 (2007)
68. Xu, Y.; Young, M.J.; Battaglino, R.A.; Morse, L.R.; Fontana, C.R.; Pagonis, T.C.; Kent, R.; Soukos, N.S.: Endodontic Antimicrobial Photodynamic Therapy: Safety Assessment in Mammalian Cell Cultures. *Journal of endodontics* 35(11), 1567-1572 (2009)
69. Fontana, C. R.; Lerman, M. A.; Patel, N.; Grecco, C.; de Souza Costa, C. A.; Amiji, M. M.; Bagnato, V.S.; Soukos, N. S.: Safety assessment of oral photodynamic therapy in rats. *Lasers in Medical Science* 28(2), 479-486 (2013)
70. Aghahosseini, F.; Arbabi-Kalati, F.; Fashtami, L. A.; Fateh, M.; Djavid, G. E.: Treatment of oral lichen planus with photodynamic therapy mediated methylene blue: a case report. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)* 11(2), 126-129 (2006)
71. Garrier, J.; Bezdetnaya, L.; Barlier, C.; Grafe, S.; Guillemin. F.; D'Hallewin, M. A.: Foslip®-based photodynamic therapy as a means to improve wound healing. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 8(4), 321-327 (2011)
72. Jayasree, R.S.; Gupta A. K.; Rathinam, K.; Mohanan, P. V.; Mohanty, M.: The influence of photodynamic therapy on the wound healing process in rats. *Journal of Biomaterials Applications* 15(3), 176-86 (2001)
73. Soler, V.; Pagot-Mathis, V.; Quintyn, J. C. : Photothérapie dynamique sous huile de silicone pour traiter des néovaisseaux choroïdiens du myope fort. *Journal Français d'Ophtalmologie* 34(8), 561.e1-561.e4 (2011)
74. Kaabar, O.: La thérapie photodynamique en médecine bucco-dentaire., France (2012)

75. Sharma, S. K.; Mroz, P.; Dai, T.; Huang, Y. Y.; Denis, T. G. S.; Hamblin, M. R. : Photodynamic Therapy for Cancer and for Infections: What Is the Difference? *Israel journal of chemistry* 52(8-9), 691-705 (2012)
76. Dai, T.; Huang, Y. Y.; Hamblin, M. R.: Photodynamic therapy for localized infections - state of the art. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 6(3), 170-188 (2009)
77. Wainwright, M.: 'Safe' photoantimicrobials for skin and soft-tissue infections. *International journal of antimicrobial agents* 36(1), 14-8 (208)
78. Valduga, G.; Bertoloni, G.; Reddi, E.; Jori, G.: Effect of extracellularly generated singlet oxygen on Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 21(1), 81-86 (1993)
79. Schäfer, M.; Schmitz, C.; Facius, R.; Horneck, G.; Milow, B.; Funken, K. H.; Ortner, J.: Systematic study of parameters influencing the action of rose Bengal with visible light on bacterial cells: Comparison between the biological effect and singlet oxygen production. *Photochemistry and Photobiology* 71(5), 514-523 (2000)
80. Jori, G.; Brown, S. B. : Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochemical & Photobiological Sciences* 3(5), 403-405 (2004)
81. Lukšiene, Ž.: New approach to inactivation of harmful and pathogenic microorganisms by photosensitization, *Photosensitization: An Overview. Food Technology and Biotechnology* 43(5), 411-418 (2005)
82. Paloma, F.: *Les plantes de la famille des Apiacées dans les troubles digestifs.*, France (2012)
83. Moreau, F.: *Botanique : Procaryotes (cyanophytes et bactéries). Eucaryotes (algues, champignons et végétaux supérieurs). La plante dans ses rapports avec le milieu.* Ed. Paris, Gallimard, France (1960)
84. Calvino, C. I.; Martínez, S. G.; Downie, S. R.: The evolutionary history of *Eryngium* (Apiaceae, Saniculoideae): Rapid radiations, long distance dispersals, and hybridizations. *Molecular phylogenetics and evolution* 46(3), 1129-50 (2008)
85. Dubois-Maisonneuve, J.; Jacquelin-Dubuisson, R.J.: *Annales des sciences et des arts.* D. Colas, Paris (1809)
86. Duméril, C.: *Éléments des sciences naturelles: La Minéralogie et la botanique.* Deterville libraire, Paris (1825)
87. Pimenov, M. G.; Leonov, M. V.: *Genera of the Umbelliferae.* Royal Botanic Gardens, Kew, United Kingdom (1993)

88. Coste, H.: Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des contrées limitrophes II. Librairie scientifique et technique Albert Blanchart, Paris (1980)
89. Pottier-Alapetite, G.: Flore de la Tunisie : angiospermes, dicotylédones, vol. 2 : Apétales-Dialypétales. Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche scientifique/Ministère de l'Agriculture, Tunis (1979)
90. Turmel, J. M.: Répartition géographique des *Eryngium*. I. Ancien Monde. Bulletin du Museum national d'histoire naturelle; 1ère Série 20(4), 395-401 (1948)
91. Turmel, J. M.: Répartition géographique des *Eryngium*. II. Nouveau Monde. Bulletin du Museum national d'histoire naturelle; 2ère Série 21(1), 120-131 (1949)
92. Rama, C. P. P., Sudhakar, R. C., Raza, S. H., Dutt, C. B. S.: Folklore medicinal plants of North Andaman Islands, India. *Fitoterapia* 79(6), 458-464 (2008)
93. Darriet, F.: Caractérisation de nouvelles molécules et variabilité chimique de trois plantes du continuum Corse-Sardaigne: *Chamaemelum mixtum*, *Anthemis maritima* et *Eryngium maritimum*., France (2011)
94. Ekpong, B.; Sukprakarn, S.: Harvest stages and umbel order contribution on eryngo (*Eryngium foetidum* L.) seed yield and quality. *Kasetsart Journal (Natural Science)* 40, 273-279 (2006)
95. Khoshbakht, K.; Hammer, K.; Pistrick, K.: *Eryngium caucasicum* Trautv. cultivated as a vegetable in the Elburz Mountains (Northern Iran). *Genetic Resources and Crop Evolution* 54(2), 445-448 (2006)
96. Wang, P.; Su, Z.; Yuan, W.; Deng, G.; Li, S.: Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Eryngium* L.(Apiaceae). *Pharmaceutical Crops* 3, 99-120 (2012)
97. Kartal, M.; Mitaine-Offer, A. C.; Abu-Asaker, M.; Miyamoto, T.; Calis, I.; Wagner, H.; Lacaille-Dubois, M. A.: Two new triterpene saponins from *Eryngium campestre*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 53(10), 1318-1320 (2005)
98. Baytop, T.: Therapy with Medicinal Plants in Turkey-Past and Present. 2nd Edn. Nobel Tip Basimevi, Istanbul, Turkey (1999)
99. Jaghabir, M.: Hypoglycemic effects of *Eryngium creticum*. *Archives of Pharmacal Research* 14(4), 295-297 (1991)
100. Bencao, E. C. O. Z.: Zhonghua Bencao 5. Shanghai Science and Technology Press, Shanghai, China (1999)

101. Moerman, D. E.: Native American Medicinal Plants: An Ethnobotanical Dictionary. Timber Press, Portland (2009)
102. Alkofahi, A.; Sallal, A. J.; Disi, A. M.: Effect of *Eryngium creticum* on the hemolytic activities of snake and scorpion venoms. *Phytotherapy Research* 11(7), 540-542 (1997)
103. Ayoub, N. A.; Kubeczka, K. H.; Nawwar, M. A. M.: An unique n-propyl sesquiterpene from *Eryngium creticum* L. (Apiaceae). *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences* 58(9), 674-676 (2003)
104. Ebrahimzadeh, M. A.; Nabavi, S. F.; Nabavi, S. M.: Antioxidant activity of leaves and inflorescence of *Eryngium caucasicum* Trautv. at flowering stage. *Pharmacognosy Research* 1(6), 435-439 (2009)
105. Bohlmann, F.; Burkhardt, T.; Zdero, C.: Naturally Occurring Acetylenes. Academic Press, London (1973)
106. Hansen, L.; Boll, P. M.: Polyacetylenes in araliaceae: Their chemistry, biosynthesis and biological significance. *Phytochemistry* 25, 285-293 (1986)
107. Christensen, L. P.; Lam, J.: Acetylenes and related compounds in Cynareae. *Phytochemistry* 29, 2753-2785 (1990)
108. Christensen, L. P.; Lam, J.: Acetylenes and related compounds in Heliantheae. *Phytochemistry* 30, 11-49 (1991a)
109. Christensen, P. L.: Acetylenes and related compounds in Anthemideae. *Phytochemistry* 31, 7-49 (1992)
110. Bruneton, J.: Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.). Lavoisier s.a.s, Cachan, France (2009)
111. De Wit, P. J. G. M., Kodde, E.: Induction of polyacetylenic phytoalexins in *Lycopersicon esculentum* after inoculation with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). *Physiological Plant Pathology* 18(2), 143-148 (1981)
112. Elgersma, D. M.; Weijman, A. C. M.; Roeymans, H. J.; Eijk, G. W.: Occurrence of Falcarinol and Falcarindiol in Tomato Plants after Infection with *Verticillium albo-atrum* and Characterization of Four Phytoalexins by Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Phytopathology* 109(3), 237-240 (1984)
113. Setsuko, I.; Yoshimoto, O.: Elicitation of Diacetylenic Compounds in Suspension Cultured Cells of Eggplant. *Plant Physiology* 86(1), 176-181 (1988)

114. Bu'Lock, J. D.; Smalley H. M.: The biosynthesis of polyacetylenes. Part V. The role of malonate derivatives, and the common origin of fatty acids, polyacetylenes, and "acetate-derived" phenols. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 4662-4664 (1962)
115. Bu'Lock, J.D.; Smith G. N.: The origin of naturally-occurring acetylenes. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 332-336 (1967)
116. Jones, E.R.H.; Thaller, V.; Turner, J.L.: Natural acetylenes. Part XLVII. Biosynthetic experiments with the fungus *Lepista diemii*(singer). Biogenesis of the C8 acetylenic cyano-acid diatretyne 2. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*(5), 424-428 (1975)
117. Barley, G. C.; Jones, E. R. H.; Thaller, V.: Experiments on biosynthesis and metabolism of acetylenes and thiophenes. In : *Chemistry and Biology of Naturally-Occurring Acetylenes and Related Compounds (NOARC)*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1988) 85-91
118. Cahoon, E. B.; Schnurr, J. A.; Huffman, E. A., Minto, R. E.: Fungal responsive fatty acid acetylenases occur widely in evolutionarily distant plant families. *The Plant Journal* 34(5), 671-683 (2002)
119. Rawson, A.; Brunton, N. P.; Rai, D. K.; McLoughlin, P.; Tiwari, B. K.; Tuohy, M. G.: Stability of faltarinol type polyacetylenes during processing of Apiaceae vegetables. *Trends in Food Science & Technology* 30(2), 133-141 (2013)
120. Ahn, B. Z.; Kim, S. I.: Beziehung zwischen Struktur und cytotoxischer Aktivität von Panaxydol-Analogen gegen L1210 Zellen. *Archiv der Pharmazie* 321(2), 61-63 (1988)
121. Matsunaga, H.; Katano, M.; Yamamoto, H.; Mori, M.; Takata, K.: Studies on the panaxytriol of *Panax ginseng* CA Meyer. Isolation, determination and antitumor activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 37(5), 1279-1281 (1989)
122. Matsunaga, H.; Katano, M.; Yamamoto, H.; Fujito, H.; Mori, M.; Takata, K.: Cytotoxic activity of polyacetylene compounds in *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 38(12), 3480-3482 (1990)
123. Bernart, M. W.; Cardellina, J. H.; Balaschak, M. S.; Alexander, M. R.; Shoemaker, R. H.; Boyd, M. R.: Cytotoxic faltarinol oxylipins from *Dendropanax arboreus*. *Journal of natural products* 59(8), 748-753 (1996)
124. Kobæk-Larsen, M.; Christensen, L. P.; Vach, W.; Ritskes-Hoitinga, J.; Brandt, K. : Inhibitory effects of feeding with carrots or (-)-faltarinol on development of azoxymethane-induced preneoplastic lesions in the rat colon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(5), 1823-1827 (2005)

125. Christensen, L. P.; Brandt, K. : Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: Occurrence, bioactivity and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41(3), 683-693 (2006)
126. Harding, V. K.; Heale, J. B.: Isolation and identification of the antifungal compounds accumulating in the induced resistance response of carrot root slices to *Botrytis cinerea*. *Physiological Plant Pathology* 17(3), 277-289 (1980)
127. Harding, V. K.; Heale, J. B.: The accumulation of inhibitory compounds in the induced resistance response of carrot root slices to *Botrytis cinerea*. *Physiological Plant Pathology* 18(1), 7-15 (1981)
128. Garrod, B.; Lewis, B. G.; Coxon, D. T.: Cis-heptadeca-1, 9-diene-4, 6-diyne-3, 8-diol, an antifungal polyacetylene from carrot root tissue. *Physiological Plant Pathology* 13(2), 241-246 (1978)
129. Olsson, K.; Svensson, R.: The influence of polyacetylenes on the susceptibility of carrots to storage diseases. *Journal of Phytopathology* 144(9-10), 441-447 (1996)
130. Christensen, L.P.: L. P. Biological activities of naturally occurring acetylenes and related compounds from higher plants. *Recent Research Developments in Phytochemistry* 2, 227-257 (1998)
131. Kemp, M. S.: An antifungal polyacetylene from *Aegopodium podagraria*. *Phytochemistry* 17(5), 1002 (1978)
132. Appendino, G.; Tagliapietra, S.; Nano, G. M.; Picci, V.: An anti-platelet acetylene from the leaves of *Ferula communis*. *Fitoterapia* 64, 179 (1993)
133. Teng, C. M.; Kuo, S.C.; Ko, F. N.: Antiplatelet actions of panaxynol and ginsenosides isolated from ginseng. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 990(3), 315-320 (1989)
134. Alanko, J.; Kurahashi, Y.; Yoshimoto, T.; Yamamoto, S.; Baba, K.: Panaxynol, a polyacetylene compound isolated from oriental medicines, inhibits mammalian lipoxygenases. *Biochemical pharmacology* 48(10), 1979-1981 (1994)
135. Wright, M.E.; Mayne, S.T.; Swanson, C.A.: Dietary carotenoids, vegetables, and lung cancer risk in women: the Missouri Women's Health study (United States). *Cancer Causes & Control* 14(1), 85-96 (2003)
136. Anet, E. F. L. J.; Lythgoe, B.; Silk, M. H.; Trippett, S.: Oenanthotoxin and cicutoxin. Isolation and structures. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 309-322 (1953)

137. Uwai, K.; Ohashi, K.; Takaya, Y.; Ohta, T.; Tadano, T.; Kisara, K.; Shibusawa, K.; Sakakibara, R.; Oshima, Y.: Exploring the structural basis of neurotoxicity in C17-polyacetylenes isolated from water hemlock. *Journal of Medicinal Chemistry* 43(23), 4508-4515 (2000)
138. Calabrese, E. J.; Baldwin, L. A.: The hormetic dose–response model is more common than the threshold model in toxicology. *Toxicological Sciences* 71(2), 246-250 (2003a)
139. Neafsey, P. J.; Boxenbaum, H.; Ciraulo, D. A.; Fournier, D. J.: A Gompertz Age-Specific Mortality Rate Model of Aging, Hormesis, and Toxicity: Fixed-Dose Studies. *Drug Metabolism Reviews* 19(3-4), 369-401 (1988)
140. Rao, S. B.: Chlordecone-CCl<sub>4</sub> interactive hepatotoxicity-suppression of hormesis and recovery. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 9(2), 60-63 (1994)
141. Boxenbaum, H.: Longevity hormesis : réversible life prolongation from nonessential agents. *Comments Toxicology* 5(2), 141-149 (1995)
142. Young J.F., Duthie S.J., Milne L., Christensen L.P., Duthie G.G., Bestwick C.S.: Biphasic effect of falcarinol on caco-2 cell proliferation, DNA damage, and apoptosis. *J Agric Food Chem* 55(3), 618-23 (2007)
143. Hansen, S.L.; Purup, S.; Christensen, L.P.: Bioactivity of falcarinol and the influence of processing and storage on its content in carrots (*Daucus carota* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83, 1010-1017 (2003)
144. Purup, S.; Larsen, E.; Christensen L. P.: Differential effects of falcarinol and related aliphatic C(17)-polyacetylenes on intestinal cell proliferation. *Journal of agricultural and Food Chemistry* 57(18), 8290-8296 (2009)
145. Calabrese, E.J.; Baldwin, L.A.: Hormesis as a biological hypothesis. *Environmental Health Perspectives* 106(Suppl 1), 357-362 (1998)
146. Lund, E. K.: Non-nutritive bioactive constituents of plants: dietary sources and health benefits of glucosinolates. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 73(2), 135-143 (2003)
147. Kuo, Y. C.; Lin, Y. L.; Huang, C. P.; Shu, J. W.; Tsai, W. J.: A tumor cell growth inhibitor from *Saposhnikovae divaricata*. *Cancer investigation* 20(7-8), 955-964 (2002)
148. Kidmose, U.; Hansen, S. L.; Christensen, L. P.; Edelenbos, M.; Larsen, E.; Nørbæk, R.: Effects of genotype, root size, storage, and processing on bioactive compounds in organically grown carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of Food Science* 69(9), S388–S394 (2004)

149. Clemens, A. J. E.; Otto, S.: A cyclohexenone and a cyclohexadienone glycoside from *Eryngium campestre*. *Phytochemistry* 25(3), 741-743 (1986)
150. Muckensturm, B.; Boulanger, A.; Farahi, M.; Reduron, J.P.: Secondary metabolites from *Eryngium* species. *Natural Product Research* 24(5), 391-397 (2010)
151. Hiller, K.; Von, T. N.; Lehmann, G.; Grundemann, E.: Betulinic acid-a saponin in *Eryngium bromeliifolium* Delar. 21. The contents of a saniculoidea. *Pharmazie* 29(2), 148-149 (1974)
152. Ikramov, M. T.; Kharlamov, I. A.; Khazanovich, R. L.; Khalmatov, K. K.: Saponins of *Eryngium macrocalyx*. *Him. Prir. Soedin.* 12(3), 354-354 (1976)
153. Serova, N. A.: Saponin from *Eryngium incognitum*. *Meditinskaya Promyshlennost SSSR* 15(11), 26-27 (1961)
154. Hiller, K.; Von Mach, B.; Franke, P.: On the saponins of *Eryngium maritimum* L. Part 25. Toward information on components of some Saniculoideae. *Pharmazie* 31(1), 53 (1976)
155. Ikramov, M. T.; Khazanovich, R. L.; Khalmatov, K. K.: Saponins from two species of *Eryngium*. *Chemistry of Natural Compounds* 7(6), 826 (1971)
156. Chowdhury, J. U., Nandi, N. C., & Yusuf, M.: Chemical Constituents of Essential Oil of the Leaves of *Eryngium foetidum* from Bangladesh, Bangladesh. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research* 42(3), 347-352 (2007)
157. Leclercq, P. A.; Duñg, N. X.; Lô, V. N.; Toanh, N. V.: Composition of the essential oil of *Eryngium foetidum* L. from Vietnam. *Journal of Essential Oil Research* 4(4), 423-424 (1992)
158. Wong, K. C.; Feng, M. C.; Sam, T. W.; Tan, G. L.: Composition of the leaf and roots oils of *Eryngium foetidum* L. *Journal of Essential Oil Research* 6(4), 369-374 (1994)
159. Pino, J.A.; Rosado, A.; Fuentes, V.: Chemical composition of the leaf oil of *Eryngium foetidum* L. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research* 9, 467-468 (1997)
160. Martins, A. P.; Salgueiro, L. R.; da Cunha, A. P.; Vila, R.; Cañigueral, S.; Tomi, F.; Casanova, J.: Essential oil composition of *Eryngium foetidum* from S. Tomé e Príncipe. *Journal of Essential Oil Research* 15(2), 93-95 (2003)
161. Palá-Paúl, J.; Pérez-Alonso, M. J.; Velasco-Negueruela, A.; Vadaré, J.; Villa, A. M.; Sanz, J.; Brophy, J. J.: Analysis of the essential oil composition from the different parts of *Eryngium glaciale* Boiss. from Spain. *Journal of Chromatography A* 1094(1), 179-182 (2005)
162. Erdem, S. A.; Nabavi, S. F.; Orhan, I. E.; Daglia, M.; Izadi, M.; & Nabavi, S. M.: Blessings in disguise: a review of phytochemical composition and antimicrobial activity of plants belonging to the genus *Eryngium*. *DARU* 23(1), 1 (2015)

163. Darriet, F.; Andreani, S.; De Cian, M. C.; Costa, J.; Muselli, A.: Chemical variability and antioxidant activity of *Eryngium maritimum* L. essential oils from Corsica and Sardinia. *Flavour and Fragrance Journal* 29(1), 3-13 (2014)
164. Merghache, D.; Boucherit-Otmani, Z.; Merghache, S.; Chikhi, I.; Selles, C.; Boucherit, K.: Chemical composition, antibacterial, antifungal and antioxidant activities of Algerian *Eryngium tricuspidatum* L. essential oil. *Natural Product Research* 11(28), 795-807 (2014)
165. Zhang, Z., Li, S., Ownby, S., Wang, P., Yuan, W., Zhang, W. and Beasley, R.S.: Phenolic compounds and rare polyhydroxylated triterpenoid saponins from *Eryngium yuccifolium*. *Phytochemistry* 69(10), 2070-2080 (2008)
166. García, M. D.; Sáenz, M. T.; Gómez, M. A.; Fernández, M. A.: Topical antiinflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation models. *Phytotherapy Research* 13(1), 78-80 (1999)
167. Suleiman, A.K.: Phytochemistry of *Eryngium creticum*. *Alexandria Journal of Pharmaceutical Sciences* 8(1), 73-75 (1994)
168. Nacef, S.; Ben Jannet, H.; Hamza, M. A.; Mighri Z.: Contribution to the phytochemical investigation of the plant *Eryngium dichotomum* Desf. (Apiaceae) from Tunisia. *Journal de la Societe Chimique de Tunisie* 10(2), 141-148 (2008)
169. Wolfe, E.A.; Sherwood, G.A.; Mitchell, K.A.; Browne, M.P.: Anti-inflammatory and analgesic properties from the stems of *Eryngium foetidum* (Shadow Benny). In : 220th ACS National Meeting., Washington, DC, United States. (2000)
170. Joergen, L.; Lars, P. C.; Tove, T.: Acetylenes from roots of *Eryngium bourgatii*. *Phytochemistry* 31(8), 2881-2882 (1992)
171. El-Gamal, M. H. A.; El-Bay, F. K.; El-Tawill, B. A. H.; Gadalla, K. Z.: Constituents of local plants. XXI. the coumarins of *Ficus salicifolia* L. fruits, *Eryngium creticum* Lam. and *Pityranthus tortuosus* Deaf. *Egyptian Journal of Chemistry* 18(4), 767-772 (1978)
172. Abyshev, A. Z.; Denisenko, P. P.; Abyshev, D. Z.; Kerimov, Y. B: Chemical study of some species of the Caucasus flora of the umbellate family. *Farmatsiia (Moscow)* 26(4), 42-44 (1977)
173. Pinar, M.; Galan, M. P.: Coumarins from *Eryngium ilicifolium*. *Journal of Natural Products* 48(5), 853-854 (1985)
174. Erdelmeier, C. A.; Sticher, O.: Coumarin derivatives from *Eryngium campestre*. *Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research* 51(5), 407-409 (1985)

- 
175. Le Claire, E.; Schwaiger, S.; Banaigs, B.; Stuppner, H.; Gafner, F.: Distribution of a new rosmarinic acid derivative in *Eryngium alpinum* L. and other Apiaceae. *Journal of agricultural and food chemistry* 53(11), 4367-4372 (2005)
176. Bohlmann, F.; Zdero, C.: Terpene derivatives from higher plants. XII. New terpene aldehyde esters from *Eryngium* species. *European Journal of Inorganic Chemistry* 104(6), 1957-1961 (1971)
177. Greuter, W.: Origin and peculiarities of Mediterranean island floras. *Ecologia Mediterranea* 21(1/2), 1-10 (1995)
178. Heywood, V.H.: The Mediterranean region a major centre of plant diversity. In : *Wild food and non-food plants: Information networking.*, Chania, Grèce, pp.5-3 (1999)
179. Ballero, M.; Poli, F.; Sacchetti, G.; Loi, M.C.: Ethnobotanical research in the territory of Fluminimaggiore (south-western Sardinia). *Fitoterapia* 72, 788-801 (2001)
180. Pieroni, A.; Quave, C. L.; Villanelli, M. L.; Mangino, P.; Sabbatini, G.; Santini, L.; Boccetti, T.; Profili, M.; Ciccioli, T.; Rampa, L. G.; Antonini, G.; Girolamini, C.; Cecchi, M.; Tomasi, M.: Ethnopharmacognostic survey on the natural ingredients used in folk cosmetics, cosmeceuticals and remedies for healing skin diseases in the inland Marches, Central-Eastern Italy. *Journal of Ethnopharmacology* 91, 331-3344 (2004)
181. Guarrera, P.M.; Forti, G.; Marignoli, S.: Ethnobotanical and ethnomedicinal uses of plants in the district of Acquapendente (Latium, Central Italy). *Journal of Ethnopharmacology* 96, 429-444 (2005)
182. Passalacqua, N.G.; Guarrera, P.M.; De Fine, G.: Contribution to the knowledge of the folk plant medicine in Calabria region (Southern Italy). *Fitoterapia* 78, 52-68 (2007)
183. Leporatti, M. L.; Ghedira, K.: Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and Tunisia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 5, 31 (2009)
184. Emberger, L.: *Les végétaux vasculaires*. In : *Traité de botanique (systématique)*. Masson & Cie, Paris, France (1960)
185. Le Floc'h, E.; Boulos, L.; Vela, E.: *Catalogue synonymique commenté de la flore de Tunisie*. Banque Nationale de Gènes de la Tunisie, Tunis, Tunisia (2010)
186. Ghourri, M.; Zidane, L.; Douira, A.: *Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement de la lithiase rénale dans la province de Tan-Tan (Maroc saharien)*. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 7(4), 24 (2013)

187. Daoudi, A.; Bammou, M.; Zarkani, S.; Slimani, I.; Ibjibijen, J.; Nassiri, L.: Ethnobotanical study of medicinal flora in rural municipality of Aguelmous - Khenifra province – (Morocco). *Phytothérapie*, 1-9 (2015)
188. Bellakhdari, J.: La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Ibis Press, Saint-Etienne, France (1997)
189. Lev, E.: Reconstructed materia medica of the Medieval and Ottoman al-Sham. *Journal of Ethnopharmacology* 80(2), 167-179 (2002)
190. Sezik E.; Yesilada E.; Tabata M.; Honda G.; Takaishi Y.; Fujita T.; Tanaka T.; Takeda Y.: Traditional medicine in Turkey VIII. Folk medicine in East Anatolia; Erzurum, Erzincan, Agri, Kars, Igdir provinces. *Economic Botany* 51, 195-211 (1997)
191. Yesilada, E.; Sezik, E.: A survey on the traditional medicine in Turkey: semi-quantitative evaluation of the results. VII. Studium Press, LLC, Houston, Texas (2003)
192. Khalfallah, A.; Berrehal, D.; Kabouche, A.; Karioti, A.; Bilia, A. R.; Kabouche, Z.: Flavonoids, Antioxidant and Antibacterial Activities of *Eryngium triquetrum*. *Chemistry of Natural Compounds* 50(1), 130-132 (2014)
193. Nacef, S.; Msaddek, M.; Ben Jannet, H.; Attia, S.; Chriaa, J.; Bakhrouf, A.; Mighri, Z.: Isolation and structural elucidation of a steroid and a heteroside from the plant *Eryngium dichotomum*. GC/MS identification of some plants and study of their antibacterial activities. *Journal de la Societe Algerienne de Chimie* 13(2), 163-175 (2003)
194. Bellakhdar, J.: Médecine traditionnelle et toxicologie ouest - saharienne, contribution à l'étude de la pharmacopée marocaine. Edition technique Nord-africaine, Rabat, Maroc (1978)
195. Bammi, J.; Douira, A.: Les plantes medicinales dans la foret de l'Achach (plateau central, Maroc). *Acta Botanica Malacitana* 27, 131-145 (2002)
196. Grieve, M.: botanical.com: A Modern Herbal. (Accessed 1995) Available at: <http://botanical.com/>
197. Chiej, R.: Encyclopaedia of Medicinal Plants. Macdonald, London (1984)
198. Bown, D.: Encyclopaedia of Herbs and their Uses. Dorling Kindersley Publishing, UK (1995)
199. Lisciani, R.; Fattorusso, E.; Surano, V.; Cozzolino, S.; Giannat-tasio, M.; Sorrentino, L.: Anti-inflammatory activity of *Eryngium maritimum* L. rhizome extracts in intact rats. *Journal of Ethnopharmacology* 12(3), 263-270 (1984)

- 
200. El Rhaffari, L.; Zaid, A.: Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. In : Des sources du savoir aux médicaments du futur : actes du 4e congrès européen d'ethnopharmacologie. Fleurentin J. (ed.), Pelt J.M. (ed.), Mazars G. (ed.), Lejosne J.C. (trad.), Cabalion Pierre (collab.), Prais, France (2002) 293-318
201. Coste, H.: Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des contrées limitrophes II. Librairie scientifique et technique Albert Blanchart, Paris, France (1980)
202. Andrew, C.: Encyclopedia of Medicinal Plants. 2nd edition. Dorling Kindersley, Londres (2001)
203. Kupeli, E.; Kartal, M.; Aslan, S.; Yesilada, E.: Comparative evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activity of Turkish *Eryngium* species. Journal of Ethnopharmacology 107(1), 32-37 (2006)
204. Laetitia, M. D.; Le Floch, G.; Magné, C.: Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of Halophytic species. Journal of Ethnopharmacology 116(2), 258-262 (2008)
205. Baydoun, S.; Chalak, L.; Dalleh, H.; Arnold, N.: Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in traditional medicine by the communities of Mount Hermon, Lebanon. Journal of Ethnopharmacology 173, 139-156 (2015)
206. Khafagi, I. K.; Dewedar, A.: The efficiency of random versus ethno-directed research in the evaluation of Sinai medicinal plants for bioactive compounds. Journal of Ethnopharmacology 71(3), 365-376 (2000)
207. Ciulei, I.: Methodology for analysis of vegetable drugs. United Nations Industrial Development Organisation, Romania (1981)
208. Kholkhal, W.; Ilias, F.; Bekhechi, C.; Bekkara, F. A.: *Eryngium maritimum*: A Rich Medicinal Plant of Polyphenols and Flavonoids Compounds with Antioxidant, Antiba. Current Research Journal of Biological Sciences 4(4), 437-443 (2012)
209. Augros, C.; Bezzina, M. E.; Bertrand, M. F.; Rocca, J. P.: La thérapie photodynamique antibactérienne. Réalités cliniques 23(2), 139-148 (2012)
210. Moan, J.; Peng, Q.: An Outline of the Hundred-Year History of PDT. Anticancer Research 23(5A), 3591-3600 (2003)
211. Lavogiez, C.; Mortier, L.; Mordon, S.: La photothérapie dynamique antimicrobienne en dermatologie. Partie I : les infections bactériennes et fongiques. Annales de Dermatologie et de Vénérologie 142(12), 782-788 (2015)

212. Minnock, A.; Vernon, D. I.; Schofield, J.; Griffiths, J.; Parish, J. H.; Brown, S. B.: Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 32(3), 159-164 (1996)
213. Demidova, T. N.; Hamblin, M. R.: Photodynamic therapy targeted to pathogens. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 17(3), 245-254 (2004)
214. Farzaneh, M.; Kiani, H.; Sharifi, R.; Reisi, M.; Hadian, J.: Chemical composition and antifungal effects of three species of *Satureja* (*S. hortensis*, *S. spicigera*, and *S. khuzistanica*) essential oils on the main pathogens of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology* 109, 145-151 (2015)
215. Suffness, M.; Pezzuto, J. M.: Assays related to cancer drug discovery. In : *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. Academic Press, London (1990) 71-133
216. Oliveira, P. F. D.; Alves, J. M.; Damasceno, J. L.; Oliveira, R. A. M.; Dias Júnior, H.; Crotti, A. E. M.; Tavares, D. C.: Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 25(2), 183-188 (2015)
217. Romdhane, M.: Extraction solide-liquide sous ultrasons: mise en oeuvre d'un capteur de puissance locale ultrasonore. (1993)
218. Vijayakumara, A.; Duraipandiyana, V.; Jeyaraj, B.; Agastian, P.; Karunai Raj, M.; Ignacimuthu, S.: Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of *Illicium griffithii* Hook. f. & Thoms extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2(3), 190-199 (2012)
219. Amala, K.; Saraswathy, A.; Amerjothy, S.: GC-MS Analysis of N-Hexane Extract of *Epilobium divaricatum* (L.) Cass. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2(1), 33-35 (2013)
220. Oirere, E. K.; Anusooriya, P.; Raj, C. A.; Gopalakrishnan, V. K.: Phytochemical analysis of n-hexane leaf extract of *Alpinia purpurata* (Vieill.) K. Schum using UV-VIS, FTIR and GC-MS. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science* 7(8), 387-389 (2015)
221. Adams, R. P.: *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/mass Spectroscopy*. Allured Business Media, Illinois, USA (2012)
222. Tietel, Z.; Lewinsohn, E.; Fallik, E.; Porat, R.: Importance of storage temperatures in maintaining flavor and quality of mandarin. *Postharvest Biology and Technology* 64(1), 175-182 (2012)

223. Isidorov, V.; Zenkevich, I.; Dubis, E.; Slowikowski, A.; Wojciuk, E.: Group identification of essential oils components using partition coefficients in a hexane–acetonitrile system. *Journal of Chromatography A* 814, 253-260 (1998)
224. Kumar, P.; Mishra, S.; Malik A.; Satya, S.: Housefly (*Musca domestica* L.) control potential of *Cymbopogon citratus* Stapf. (Poales: Poaceae) essential oil and monoterpenes (citral and 1,8-cineole). *Parasitology Research* 112, 69-76 (2013)
225. Chu, S. S.; Liu, Q. R.; Liu, Z. L.: Insecticidal activity and chemical composition of the essential oil of *Artemisia vestita* from China against *Sitophilus zeamais*. *Biochemical Systematics and Ecology* 38, 489-492 (2010)
226. Palá-Paúl, J.; Brophy, J. J.; Pérez-Alonso, M. J.; Usano, J.; Soria, S. C.: Essential oil composition of the different parts of *Eryngium corniculatum* Lam. (Apiaceae) from Spain. *Journal of Chromatography A* 1175, 289-293 (2007)
227. Deba, F.; Xuan, T. D.; Yasuda, M.; Tawata, S.: Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food Control* 19, 346-3352 (2008)
228. Boyom, F. F.; Ngouan, V.; Zollo, P. H.; Menut, C.; Bessiere J. M., Rosenthal, P. J.: Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. *Phytochemistry* 64(7), 1269-1275 (2003)
229. Yu, J. Q.; Liao, Z. X.; Cai, X. Q.; Lei, J. C.; Zou, G. L.: Composition, antimicrobial activity and cytotoxicity of essential oils from *Aristolochia mollissima*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23(2), 162-167 (2007)
230. Santos, T. G.; Fukuda, K.; Kato, M. J.; Sartorato, A.; Duarte, M. C. T.; Ruiz, A. T. G.; de Carvalho, J. E.; Augusto, F.; Marques, F. A.; Maia, B. H. L. N. S.: Characterization of the essential oils of two species of Piperaceae by one- and two-dimensional chromatographic techniques with quadrupole mass spectrometric detection. *Microchemical Journal* 115, 113-120 (2014)
231. Skaltsa, HD.; Demetzos, C.; Lazari, D.; Sokovic, M.: Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. *Phytochemistry* 64(3), 743-752 (2003)
232. Al-Reza, S. M.; Rahman, A.; Sattar, M. A.; Rahman, M. O.; Fida, H. M.: Essential oil composition and antioxidant activities of *Curcuma aromatica* Salisb. *Food and Chemical Toxicology* 48(6), 1757-1760 (2010)
233. Herzi, N.; Bouajila, J.; Camy, S.; Romdhane, M.; Condoret, J. S.: Comparison of different methods for extraction from *Tetraclinis articulata*: Yield, chemical composition and antioxidant activity. *Food Chemistry* 141, 3537-3545 (2013)

234. do Nascimento, M. E.; Zoghbi, M. D. G. B.; Pinto, J. E. B. P.; Bertolucci, S. K. V.: Chemical variability of the volatiles of *Copaifera langsdorffii* growing wild in the Southeastern part of Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology* 43, 1-6 (2012)
235. Li, J.; Li, F.; Xu, Y.; Yang, W.; Qu, L.; Xiang, Q.; Liu, C.; Li, D.: Chemical Composition and Synergistic Antioxidant Activities of Essential Oils from *Atractylodes macrocephala* and *Astragalus membranaceus*. *Natural Product Communications* 8, 1321-1324 (2013)
236. Salimpour, F.; Mazooji, A.; Darzikolaei, S. A.: Chemotaxonomy of six *Salvia* species using essential oil composition markers. *Journal of Medicinal Plants Research* 5, 1795-1805 (2011)
237. Bero, J.; Beaufay, C.; Hannaert, V.; Hérent, M. F.; Michels, P. A.; Quetin-Leclercq, J.: Antitrypanosomal compounds from the essential oil and extracts of *Keetia leucantha* leaves with inhibitor activity on *Trypanosoma brucei* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Phytomedicine* 20, 270-274 (2013)
238. Li, H. Q.; Bai, C. Q.; Chu, S. S.; Zhou, L.; Du, S. S.; Liu, Z. L.; Liu, Q. Z.: Chemical composition and toxicities of the essential oil derived from *Kadsura heteroclita* stems against *Sitophilus zeamais* and *Meloidogyne incognita*. *Journal of Medicinal Plants Research* 5, 4943-4948 (2011)
239. Shao, Q.; Deng, Y.; Liu, H.; Zhang, A.; Huang, Y.; Xu, G.; Li, M. : Essential oils extraction from *Anoectochilus roxburghii* using supercritical carbon dioxide and their antioxidant activity. *Industrial Crops and Products* 60, 104-112 (2014)
240. Deshpande, S. N.; Kadam, D.G.: Evaluation of antibacterial activity of extracts of *piper betle* [linn.] Leaves against *streptococcus mutans*. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4(11), 1040-1050 (2015)
241. Morris, J. A.; Khettry, A.; Seitz, E. W.: Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 56(5), 595-603 (1979)
242. Cakir, A.; Kordali, S.; Zengin, H.; Izumi, S.; Hirata, T.: Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. *Flavour and Fragrance Journal* 19(1), 62-68 (2004)
243. Jayasena, D. D.; Jo, C.: Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science & Technology* 34(2), 96-108 (2013)
244. Van Zyl, R. L.; Seatlholo, S. T.; Van Vuuren, S. F.; Viljoen, A. M.: The biological activity of 20 nature identical essential oil constituents. *Journal of Essential Oil Research* 18, 129-133 (2006)

- 
245. Kalembe, D.; Kunicka, A.: Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 10, 813-829 (2003)
246. Carson, C. F.; Mee, B. J.; Riley, T. V.: Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. *Antimicrob Agents Chemother* 46(6), 1914-1920 (2002)
247. Knobloch, K.; Pauli, A.; Iberl, B.; Weigand, H.; Weis, N.: Antibacterial and antifungal properties of essential oils components. *Journal of Essential Oil Research* 1(3), 119-128 (1989)
248. Ben Arfa, A.; Combes, S.; Preziosi-Belloy, L; Gontard, N; Chalier, P.: Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology* 43(2), 149-54 (2006)
249. Fernandes, F. H.; Guterres, Z. D. R.; Violante, I. M.; Lopes, T. F.; Garcez, W. S.; Garcez, F. R.: Evaluation of mutagenic and antimicrobial properties of brown propolis essential oil from the Brazilian Cerrado biome. *Toxicology Reports* 2, 1482-1488 (2015)
250. Bougatsos, C.; Ngassapa, O.; Runyoro, DK.; Chinou, IB.: Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oils of two *Helichrysum* species from Tanzania. *Zeitschrift für Naturforschung C* 59(5-6), 369-72 (2004)
251. Rahman, A.; Shanta, Z. S.; Rashid, M. A.; Parvin, T.; Afrin, S.; Khatun, M. K.; Sattar, M. A.: In vitro antibacterial properties of essential oil and organic extracts of *Premna integrifolia* Linn. *Arabian Journal of Chemistry* (2011)
252. Solís, C.; Becerra, J.; Flores, C.; Robledo, J.; Silva, M.: Antibacterial and antifungal terpenes from *pilgerodendron uviferum* (D. Don) Florin. *Journal of the Chilean Chemical Society* 49(2), 157-161 (2004)
253. Evrendilek, G. A.: Empirical prediction and validation of antibacterial inhibitory effects of various plant essential oils on common pathogenic bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 202, 35-41 (2015)
254. Davies, K. J.: Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *Journal of Biological Chemistry* 262(20), 9895-9901 (1987)
255. Erdem, S. A.; Nabavi, S. F.; Orhan, I. E.; Daglia, M.; Izadi, M.; Nabavi, S. M.: Blessings in disguise: a review of phytochemical composition and antimicrobial activity of plants belonging to the genus *Eryngium*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 23(1), 1 (2015)

- 
256. Chennoufi, R.: Etudes des relations structure-activités de molécules photoactivables pour imager et déclencher des processus biologiques sous excitation 2-photon., France (2015)
257. Gata-Gonçalves, L.; Nogueira, J. M. F.; Matos, O.; de Sousa, R. B.: Photoactive extracts from *Thevetia peruviana* with antifungal properties against *Cladosporium cucumerinum*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 70(1), 51-54 (2003)
258. Palá-Paúl, J.; Copeland, L. M.; Brophy, J. J.; Goldsack, R. J.: Essential oil composition of *Eryngium rosulatum* PW Michael ined.: A new undescribed species from eastern Australia. *Biochemical Systematics and Ecology* 34(11), 796-801 (2006)
259. Palá-Paúl, J.; Perez-Alonso, M. J.; Velasco-Negueruela, A.; Vadaré, J.; Villa, A. M.; Sanz, J.; Brophy, J. J.: Essential oil composition of the different parts of *Eryngium bourgatii* Gouan from Spain. *Journal of Chromatography A* 1074(1), 235-239 (2005)
260. Cardozo, E.; Rubio, M.; Rojas, L. B.; Usubillaga, A.: Composition of the essential oil from the leaves of *Eryngium foetidum* L. from the Venezuelan Andes. *Journal of Essential Oil Research* 16(1), 33-34 (2004)
261. Brophy, J. J.; Goldsack, R. J.; Copeland, L. M.; Palá-Paúl, J.: Essential oil of *Eryngium* L. species from New South Wales (Australia). *Journal of Essential Oil Research* 15(6), 392-397 (2003)
262. Ayoub, N.; Al-Azizi, M.; König, W.; Kubeczka, K. H.: Essential oils and a novel polyacetylene from *Eryngium yuccifolium* Michaux. (Apiaceae). *Flavour and fragrance journal* 21(6), 864-868 (2006)
263. Çelik, A.; Aydınlik, N.; Arslan, I.: Phytochemical constituents and inhibitory activity towards methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of *Eryngium* species (Apiaceae). *Chemistry & Biodiversity* 8(3), 454-459 (2011)
264. Morteza-Semnani, K.: Essential oil composition of *Eryngium bungei* Boiss. *Journal of Essential Oil Research* 17(5), 485-486 (2005)
265. Thiem, B.; Kikowska, M.; Kurowska, A.; Kalemba, D.: Essential oil composition of the different parts and In Vitro shoot culture of *Eryngium planum* L. *Molecules* 16(8), 7115-7124 (2011)
266. Owlia, P.; Saderi, H.; Rasooli, I.; Sefidkon, F.: Antimicrobial characteristics of some herbal Oils on *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to their chemical compositions. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 107-114 (2010)

267. Petronilho, S.; Maraschin, M.; Coimbra, M. A.; Rocha, S. M.: In vitro and in vivo studies of natural products: A challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Industrial Crops and Products* 1(12), 40 (2012)
268. Yang, Y.Q.; Li, S.N.; Zhong, J.C.; Zhou, Y.; Zeng, H.Z.; Duan, H.J.; Bian, Q.H.; Wang, M.: Total synthesis of each enantiomer of falcarinol and panaxjapyne A via asymmetric catalytic alkynylation of an aldehyde. *Tetrahedron: Asymmetry* 26(7), 361-366 (2015)
269. Barison, A.; Pereira da Silva, C. W.; Campos, F. R.; Simonelli, F.; Lenz, C. A.; Ferreira, A. G. : A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Magnetic resonance in chemistry* 48(8), 642-650 (2010)
270. Lee, S.; Son, H.; Lee, J.; Min, K.; Choi, G. J.; Kim, J.-C.; Lee, Y.-W.: Functional Analyses of Two Acetyl Coenzyme A Synthetases in the Ascomycete *Gibberella zeae*. *Eukaryot. Cell* 10(8), 1043-1052 (2011)
271. Cai, H.; Liu, X.; Chen, Z.; Liao, S.; Zou, Y.: Isolation, purification and identification of nine chemical compounds from *Flammulina velutipes* fruiting bodies. *Food chemistry* 141(3), 2873-2879 (2013)
272. Grall, N.; Andremont, A.; Armand-Lefèvre, L.: Résistance aux carbapénèmes: vers une nouvelle impasse? *Journal des Anti-infectieux* 13(2), 87-102 (2011)
273. Paterson, D. L.; Bonomo, R. A.: Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews* 18(4), 657-686 (2005)
274. Carbomelle, B; Denis, F.; Man-nonier, A.; Pinon, G.; Vague, R.: *Bactériologie medicale: Techniques usuelles*. SIVIRP (ed), Paris (1987)
275. Raut, J. S.; Karuppayil, S. M.: A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products* 62, 250-264 (2014)
276. Roberto, N.: Polyacetylenes from terrestrial plants and fungi: Recent phytochemical and biological advances. *Fitoterapia* 106, 92-109 (2015)
277. Kobaisy, M.; Abramowski, Z.; Lermer, L.; Saxena, G.; Hancock, R. E. W.; Towers, G. H. N.; Doxsee, D.; Stokes, R. W.: Antimycobacterial polyynes of Devil's Club (*Oplopanax horridus*), a North American native medicinal plant. *Journal of Natural Products* 60(11), 1210-1213 (1997)
278. Schinkovitz, A.; Stavri, M.; Gibbons, S.; Bucar, F.: Antimycobacterial polyacetylenes from *Levisticum officinale*. *Phytotherapy Research* 22(5), 681-684 (2008)
279. Crozier, A.; Clifford, M. N.; Ashihara, H. (Eds.): *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. John Wiley & Sons., UK (2006)

280. Giamarellou, H.; Antoniadou, A.; Kanellakopoulou, K.: *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? *International journal of antimicrobial agents* 32(2), 106-119 (2008)
281. Boutet-dubois, A.; Pantel, A.; Sotto, A.; Lavigne J. P.: Les entérobactéries productrices de carbapénémases. *Alin&ns*, 5 (2012)
282. Haut Conseil de la santé publique: Dépistage du portage digestif des bactéries commensales multirésistantes aux antibiotiques importées en France à l'occasion du rapatriement de patients en provenance de l'étranger et maîtrise de leur diffusion., France (2010)
283. Michel, T.: Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*)., France (2011)
284. Cattoir, V.: Les nouvelles Beta-Lactamases a Spectre Etendu (BLSE). (Accessed 2008) Available at: <http://www.mapar.org/>
285. Rodriguez-Villalobos, H.; Struelens, M. J.: Résistance bactérienne par  $\beta$ -lactamases à spectre étendu: implications pour le réanimateur. *Réanimation* 15(3), 205-213 (2006)
286. Institut de Veille Saniatire: Epidémie de Salmonellose à *Salmonella* Newport multirésistante due à la consommation de viande de cheval: mai-juin 2003 - Point au 18 juin 2003. (Accessed June 19, 2003) Available at: [http://www.invs.sante.fr/display/?doc=presse/2003/le\\_point\\_sur/salmonellose\\_190603](http://www.invs.sante.fr/display/?doc=presse/2003/le_point_sur/salmonellose_190603)
287. Gales, A. C.; Biedenbach, D. J.; Winokur, P.; Hacek, D. M.; Pfaller, M. A.; Jones, R. N.: Carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates producing Bush group 2f  $\beta$ -lactamase (SME-1) in the United States: results from the MYSTIC Programme. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 39(2), 125-127 (2001)
288. Coutinho, H. D.; Costa, J. G.; Lima, E. O.; Siqueira-Júnior, J. P.: In vitro phototoxic activity of *Eugenia jambolana* L. and *Hyptis martiusii* Benth. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 96(1), 63-65 (2009)
289. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65(1-2), 55-63 (1983)
290. Heo, D. S.; Park, J. G.; Hata, K.; Day, R.; Herberman, R. B.; Whiteside, T. L.: Evaluation of tetrazolium-based semiautomatic colorimetric assay for measurement of human antitumor cytotoxicity. *Cancer Research* 50(12), 3681-3690 (1990)

## ANNEXES

## ANNEXE 1. Bactéries testées : origine et types de résistance

N°	Nom de la souche	Origine	Type de résistance
ATCC 25922	<i>E.coli</i>	Collection du laboratoire	NA
8131	<i>Pseudomonas</i>	coproculture	Sauvage (aucune résistance acquise)
8134	<i>Pseudomonas</i>	urine	Résistance aux Fluoroquinolone et aminosides
8136	<i>Pseudomonas</i>	pus	Production d'une penicillinase et défaut porine D2
8138	<i>E.coli</i>	hémoculture	Production d'une penicillinase
8157	<i>E.coli</i>	hémoculture	Production d'une penicillinase et résistance aux fluoroquinolones
8146	<i>Staphylococcus</i>	pus	Résistance à la méticilline, kanamycine
8147	<i>Staphylococcus</i>	pus	Sauvage (aucune résistance acquise)
8237	<i>Staphylococcus</i>	urine	Sauvage (aucune résistance acquise)
8241	<i>Staphylococcus</i>	pus	Résistance à la méticilline, kanamycine et tobramycine (phénotype KT), et fluoroquinolones
8152	<i>Enterococcus</i>	coproculture	Resistante naturelle aux aminosides bas niveau
8153	<i>Enterococcus</i>	coproculture	Resistance MLSb (Résistance à erythromycine et clindamycine et sensibilité pristinamycine)
09001	<i>Enterococcus faecium</i>	Néphrologie	multi R
09010	<i>A baumannii</i>	CHU Val.	VEB-1
09011	<i>A baumannii</i>	CHU Val.	multi R
ATCC 27583	<i>Pseudomonas</i>	collection	NA
10267	<i>S marcescens</i>	Collection du laboratoire	KPC-2
10271	<i>S marcescens</i>	Collection du laboratoire	SME-1
10275	<i>A baumannii</i>	Collection du laboratoire	VIM-4
10276	<i>P aeruginosa</i>	Collection du laboratoire	PER-1
10278	<i>P aeruginosa</i>	Collection du laboratoire	GES-2
10280	<i>P aeruginosa</i>	Collection du laboratoire	VIM-2
10281	<i>Enterobacter cloacae</i>	Collection du laboratoire	KPC-2
10286	<i>Candida albicans</i>	Collection du laboratoire	
05003	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	CIP 73.26	
11006	<i>E.coli</i>	Collection du laboratoire	CTX M15
11008	<i>E.coli</i>	Collection du laboratoire	SHV 2A
11014	<i>E.coli</i>	Collection du laboratoire	VIM.2
11016	<i>K pneumoniae</i>	Collection du laboratoire	Sauvage
11017	<i>K pneumoniae</i>	Collection du laboratoire	Penicillinase
11024	<i>K pneumoniae</i>	Collection du laboratoire	CTX M15
11028	<i>K pneumoniae</i>	Collection du laboratoire	TEM 3
11032	<i>K pneumoniae</i>	Collection du laboratoire	NDM 1
11033	<i>Salmonella sp</i>	Collection du laboratoire	Sauvage
11037	<i>Salmonella sp</i>	Collection du laboratoire	CMY 2
11038	<i>P stuartii</i>	Collection du laboratoire	Sauvage
11043	<i>C freundii</i>	Collection du laboratoire	TEM 3
11045	<i>C freundii</i>	Collection du laboratoire	CTX M15
11049	<i>K oxytoca</i>	Collection du laboratoire	CTX M15
11050	<i>E cloacae</i>	Collection du laboratoire	Sauvage
11051	<i>E cloacae</i>	Collection du laboratoire	Cephalosporinase HN2
11052	<i>E cloacae</i>	Collection du laboratoire	Cephalosporinase
11053	<i>E cloacae</i>	Collection du laboratoire	NDM 1
11055	<i>E cloacae</i>	Collection du laboratoire	OXA 43
11056	<i>S marcescens</i>	Collection du laboratoire	Sauvage
11060	<i>P mirabilis</i>	Collection du laboratoire	Sauvage
11062	<i>P mirabilis</i>	Collection du laboratoire	TEM 21
11064	<i>P mirabilis</i>	Collection du laboratoire	ACC 1

## ANNEXE 2. RÉSUMÉ GRAPHIQUE DE LA THÈSE

