

UCL

Université
Catholique
de Louvain



BELGIUM
Faculté de Médecine
Ecole de Pharmacie

Unité d'Analyse Chimique et Physico-chimique des Médicaments
Laboratoire de Pharmacognosie



Université d'Abomey-Calavi
Faculté des Sciences et Techniques
Ecole Doctorale Chimie et Applications
Faculté des Sciences de la Santé
Laboratoire de Pharmacognosie

N° d'ordre 001-05/EDCA/FAST/UAC

**Identification, purification, isolement et
quantifications de principes actifs de *Mitracarpus
scaber* Zucc. et évaluation de leurs activités
antimicrobiennes sur *Dermatophilus congolensis*.**

**Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Chimie Organique et Substances Naturelles**

par

Fernand Ahokanou GBAGUIDI

Soutenue publiquement le 10 décembre 2005, devant la commission d'examen

Président : 1- Prof. Joëlle Quetin-LECLERCQ (PT), Université
Catholique de Louvain (Belgique) Co-Directeur de thèse

Membres : 2- Prof. Mansourou MOUDACHIROU (PT), Université
d'Abomey-Calavi (BENIN), Directeur de thèse.

3- Prof. Georges C. ACCROMBESSI (M-C), Université
d'Abomey-Calavi (BENIN), Co-Directeur de thèse

4- Prof. Bernard TILQUIN (PT), Université
Catholique de Louvain (Belgique)

5- Prof. Roger VERBEECK (PT) Université Catholique de
Louvain (Belgique).

DEDICACE

Je dédie ce travail :

A ma très chère maman, mon cher père et à mon oncle Laurent

METONGNON.

A mes chers enfants Furland et Urmedine et leur mère.

A mes frères Félix et Ghislain, à ma sœur Alice et à tous mes amis.

A Marie-dominique Moisse pour tous ses soutiens.

Remerciements

Avant d'exposer les résultats des recherches qui ont fait l'objet de ce travail, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à sa réalisation.

J'exprime ma profonde reconnaissance au Professeur J. Quetin-Leclercq, mon co-promoteur en Belgique, pour m'avoir donné le goût de la pharmacognosie et pour m'avoir permis de me consacrer à la recherche dans ce domaine en m'accueillant dans son laboratoire. Je tiens à lui témoigner toute ma gratitude pour son encadrement, ses conseils judicieux et sa disponibilité malgré les nombreuses tâches qui lui incombent.

Je tiens à remercier les Professeurs M. Moudachirou et G. Accrombessi, mes co-promoteurs au Bénin, qui ont suivi avec attention ce travail. C'est un grand honneur pour moi, de trouver ici l'occasion, de leur exprimer toute ma reconnaissance pour leurs rigueur et conseils scientifiques, leur appui pédagogique et leur soutien moral.

Je remercie très sincèrement le Professeur B. Tilquin pour ses conseils et son soutien moral.

J'adresse un remerciement tout particulier au professeur P. Van Brandt qui, grâce à son implication dans la coopération universitaire au développement, a été d'un grand appui pour moi dans ce travail.

Merci à vous, membre de mon jury, d'avoir accepté de discuter et de juger ce travail.

Cette thèse en pharmacognosie, science pluridisciplinaire par excellence, n'aurait pu voir le jour sans que de nombreuses collaborations soit établies. C'est avec un plaisir particulier que je remercie :

- ◆ Le Professeur V. Adjakidjé pour m'avoir aidé dans l'identification de
- ◆ G. Muccioli, J. .M. Tilquin et J. Poupar pour avoir réalisé les spectre RMN à 1-D et pour leur aide dans l'interprétation de ces spectres.
- ◆ Le Prof. R. Verbeeck pour son apport en bio-statistique.

Je souhaite également remercier :

- l'Université Catholique de Louvain (UCL) pour m'avoir accordé une bourse pour mon DEA en Belgique et des bourses de stage au Laboratoire de Pharmacognosie de l'UCL pour mes travaux de recherches en thèse ;
- le Laboratoire de Pharmacognosie de l'Unité d'Analyse Chimique et Physico-Chimique des Médicaments (CHAM) de l'UCL pour l'accueil qui m'a toujours été réservé au cours de mes stages en Belgique.
- l'Université d'Abomey Calavi (UAC), la Faculté des Sciences de la Santé (FSS), la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) et particulièrement le Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles du Bénin.
- la Coopération Universitaire Institutionnelle Université Francophone de Belgique (CIUF), le Commissariat Général aux Relations Internationales (CGRI) et l'Association à But non Lucratif (ASBL) du Centre Pharmaceutique de Louvain-La-Neuve pour avoir financé mes stages ;
- tous les membres de l'unité CHAM de l'Université Catholique de Louvain : Sébastien, Hélène, Mohamed, Sara, Caro pour leur collaboration, Marie-Christine pour son aide technique, Géraldine, Françoise, Marie-Yvonne, Ramazan, Jean-Paul, Véronique, Alix, Catherine, Hélène, Guy, Volodia et Marie-France pour tous les services rendus.
- toute l'équipe du Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles de l'Université d'Abomey Calavi : J. Gbénu, E. Yayi, L. Ahoussi, N. Ali, S. Kpoviéssi et M. Zinsou pour leur collaboration.
- tous ceux qui, de près ou de loin ont contribué d'une manière ou d'une autre à la bonne réalisation de cette oeuvre par leurs conseils, leur encouragement et leur affection.

AVANT – PROPOS

Une partie du travail exposé ci – dessous a fait l’objet : **trois publications**

1- Gbaguidi F, Accrombessi G, Moudachirou M, Quetin-Leclercq J.

HPLC quantification of two isomeric triterpenic acids isolated from *Mitracarpus scaber* and antimicrobial activity on *Dermatophilus congolensis*. J Pharm Biomed Anal. (2005) 39; 990-995.

2- Fernand Gbaguidi, Giulio Muccioli, Georges Accrombessi, Mansour Moudachirou, and Joëlle Quetin-Leclercq*

Densitometric HPTLC Quantification of 2-Azaanthraquinone Isolated from *Mitracarpus saper* and Antimicrobial Activity against *Dermatophilus congolensis*
Journal of Planar Chromatography, vol. 18. september/october 2005.

- **F. Gbaguidi^{ab}**, G. Accrombessi^b, J. Gbenou^b, M. Moudachirou^{b*}, J. Quetin- Leclercq^a
Identification, purification, et quantification de deux triterpènes bio-actifs par CCMHP dans *Mitracarpus scaber*. Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie (article accepté sous presse)

) **du prix de la coopération au développement en 2002 en Belgique**

I. BUT ET PLAN DU TRAVAIL	8
II. INTRODUCTION	10
II.1. LA DERMATOPHILOSE BOVINE ET LE <i>DERMATOPHILUS CONGOLENSIS</i>	10
II.1.1. LA DERMATOPHILOSE BOVINE	10
II.1.2. <i>DERMATOPHILUS CONGOLENSIS</i>	13
II.1.2.1. Systématique du <i>Dermatophilus congolensis</i>	13
II.1.2.2. Caractères bactériologiques	14
II.1.2.3. Facteurs de pathogénicité	16
II.1.2.4. Habitat et pouvoir pathogène	16
II.1.2.5. Diagnostic bactériologique	18
II.1.2.6. Sensibilité <i>in vitro</i> aux antibiotiques	19
II.1.3. TRAITEMENT ET PREVENTION DE LA DERMATOPHILOSE BOVINE	20
II.1.3.1. Traitements	20
II.1.3.2. Prévention et prophylaxie médicale	23
II.1.4. PROPOSITION DE PRISE EN CHARGE TOPIQUE	24
II.2. MITRACARPUS SCABER	26
II.2.1. GENRE ET FAMILLE	26
II.2.2. DESCRIPTION BOTANIQUE ET REPARTITION (AU BENIN)	27
II.2.3. USAGES DE <i>MITRACARPUS SCABER</i> EN MEDECINE TRADITIONNELLE AFRICAINE	28
II.2.4. COMPOSITION CHIMIQUE ET ACTIVITES BIOLOGIQUES (TRAVAUX ANTERIEURS)	29
II.3. LES TERPENES ET STEROLS	31
II.3.1. GENERALITES	31
II.3.2. BIOGENESE	32
II.3.2.1. Biosynthèse des unités isoprènes	32
II.3.2.2. La voie du mévalonate	32
II.3.2.3. La voie mévalonate-indépendante	34
II.4.3. BIOSYNTHESE DES TRITERPENES ET STEROLS A PARTIR DES UNITES ISOPRENES	36
II.4.3.1. Introduction	36
II.4.3.2. Activités biologiques de quelques acides triterpéniques	40

Table des matières

III. ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE.	45
III.1. INTRODUCTION	45
III.2. EVALUATION IN VITRO DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE ET IDENTIFICATION PRELIMINAIRE (PAR CCM) DE COMPOSES DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE <i>M. SCABER</i>	46
III.2.1. INTRODUCTION	46
III.2.2. MATERIELS ET METHODES	46
III.2.2.1. Matériel végétal	46
III.2.2.2. Préparation d'extraits bruts	46
III.2.2.3. Criblage phytochimique	48
III.2.2. 4. Analyse CCM	49
III.2.2.5. Fractionnements	53
III.2.2.5.1. Fractionnement liquide-liquide	53
III.2.2.5.2. Fractionnement sur colonne de silice à pression atmosphérique	53
III.2.2.6 Tests biologiques	54
III.2.2.6.1. Test antimicrobien <i>in vitro</i>	54
III.2.2.6.2. Test de cytotoxicité	57
III.2.3. RESULTATS ET DISCUSSIONS	59
III.2.3.1. Rendements des extractions et évaluation des activités antimicrobiennes des extraits éthanoliques bruts	59
III.2.3.2. Analyses Phytochimiques	60
III.2.3.3. Fractionnement liquide – liquide de l'extrait éthanolique	61
III.2.3.4. Chromatographie sur colonne de silice à Pression Atmosphérique (CLPA)	61
III.2.3.4.1. Analyse CCM de la fraction F ₃ et la fraction hydro- alcoolique	62
III.2.3.4.2. Analyse CCM des fractions F ₁ et F ₂	64
III.2.3.4.3. Tentative d'identification par test de brome des acides oléanolique et ursolique dans la fraction F ₁	65
III.2.3.5. Activités antimicrobiennes des fractions et des standards de molécules pures potentiellement présentes	68
III.2.3.6. Evaluation de la cytotoxicité de la F ₁ et de l'extrait brut éthanolique	71
III.2.4. CONCLUSION	72
III.3. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE COMPOSES DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE <i>M. SCABER</i> ET EVALUATION DE LEUR ACTIVITE SUR LE <i>D. CONGOLENSIS</i>	73
III.3.1. INTRODUCTION	73
Identification, purification, isolement, quantifications de principes actifs de <i>Mitracarpus scaber</i> et évaluation de leurs activités antimicrobiennes sur <i>Dermatophilus congolensis</i> .	2

Table des matières

III.3.2. MATERIELS ET METHODES.	73
III.3.2.1. Extraction des acides terpéniques, des stéroïdes et des alcaloïdes totaux	73
III.3.2.2. La MPLC (Medium Pressure Liquid Chromatography)	75
III.3.2.4. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC/MS	77
III.3.2.5. CLHP/MS	81
III.3.2.6. Détermination de structure	83
III.3.2.3.1. Spectre de Masse (SM)	83
III.3.2.6.2. Spectrométrie infra rouge (IR)	83
III.4.2.6.3. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	84
III.3.2.7. Tests antimicrobien sur le <i>D. congolensis</i> .	85
III.3.3. RESULTATS ET DISCUSSIONS	86
III.3.3.1. Fractionnement de la phase hexanique	87
III.3.3.2. Analyse GC/MS des fractions F _{1,1} F _{1,2} et F _{1,3}	88
III.3.3.3. Purification des composés A + B des fractions F _{2,0} et F _{3,0}	93
III.3.3.4. Détermination de structure des composés A, B et C	94
III.3.3.4.1. Structure du composé C	94
III.3.3.4.2. Détermination de structure des composés A et B	100
III.3.4. CONCLUSION	106
III.4. CONCLUSION	107
IV. DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DE METHODES DE QUANTIFICATION	110
IV.1. GENERALITES	110
IV.1.1. OBJECTIF DE LA VALIDATION	110
IV.1.2. PHASE DE VALIDATION	110
IV.1.3. DEFINITION DES CRITERES DE VALIDATION	111
IV.2. STRATEGIE UTILISEE	114
IV.2.1. PREALABLES	114
IV.2.2. PHASE DE PREVALIDATION	115
IV.2.2.1. La sélectivité	115
IV.2.2.2. Etablissement de la fonction réponse	115
IV.2.2.3. La limite de détection	116
IV.2.2.4. Taux de récupération	116
IV.2.3. PHASE DE VALIDATION	117

Table des matières

IV.2.3.1. Fonction de réponse	117
IV.2.3.2. Fidélité de la technique	117
IV.2.3.2.1. Répétabilité	117
IV.2.3.3. Limite de quantification	118
V.3. DEVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UNE METHODE DE QUANTIFICATION DES ACIDES OLEANOLIQUE ET URSOLIQUE PAR CCMHP-DENSITOMETRIQUE.	119
IV.3.1. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE	119
Mode opératoire	119
IV.3.1.2. Détermination de la longueur d'onde de lecture	121
IV.3.1.3. Mode de lecture	124
IV.3.1.4. Préparation des solutions témoins	124
IV.3.2. PHASE DE PREVALIDATION	124
V.3.2.2. Etablissement de la fonction réponse	124
IV.3.2.2. La limite de détection	127
IV.3.3. PHASE DE VALIDATION	128
IV.3.3.1. Fidélité de la technique	128
IV.3.3.2. La limite de quantification	128
IV.3.4. APPLICATION A UN EXTRAIT DE MITRACARPUS SCABER	129
IV.3.4.1. Extraction des acides à partir de la plante	129
IV.3.4.2. Taux de récupération	129
IV.3.4.3. Pureté des pics analysés	129
IV.3.5. CONCLUSION	130
IV.4. DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DE METHODE DE QUANTIFICATION DES ACIDES OLEANOLIQUE ET URSOLIQUE PAR CLHP	131
IV.4.1. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE	131
IV.4.1.2. Détermination de la longueur d'onde de lecture	133
IV.4.1.3. Mode de lecture	133
IV.4.1.4. Préparation des solutions témoins	133
IV.4.1.5. Stabilité des molécules dans la phase mobile	133
IV.4.2. PHASE DE PREVALIDATION	135
V.4.2.1. Etablissement de la fonction réponse	135
IV.4.2.2. La limite de détection	136
IV.4.3. PHASE DE VALIDATION	136
IV.4.3.1. Fidélité de la technique	136
Identification, purification, isolement, quantifications de principes actifs de <i>Mitracarpus scaber</i> et évaluation de leurs activités antimicrobiennes sur <i>Dermatophilus congolensis</i> .	4

Table des matières

IV.4.3.2. La limite de quantification	137
IV.4.4. APPLICATION A UN EXTRAIT DE MITRACARPUS SCABER	137
IV.4.4.1. Extractions des acides à partir de la plante	137
IV.4.4.2. Taux de récupération	139
IV.3.4.3. Pureté des pics analysés	139
IV.4.5. CONCLUSION	141
IV.5. VALIDATION DE METHODE DE CCMHP-DENSITOMETRIQUE ET QUANTIFICATION DE LA 2-AZAANTHRAQUINONE	142
IV.5.1. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE	142
Mode opératoire	142
IV.5.1.2. Détermination de la longueur d'onde de lecture	144
IV.5.1.3. Mode de lecture	144
IV.5.1.5. Préparation des solutions témoins	144
IV.5.2. PHASE DE PREVALIDATION	145
IV.5.2.1. Etablissement de la fonction réponse	145
IV.5.2.2. La limite de détection	146
IV.5.3. PHASE DE VALIDATION	146
IV.5.3.1. Fidélité de la technique	146
IV.5.3.2. Limite de quantification	146
IV.5.4. APPLICATION A UN EXTRAIT DE MITRACARPUS SCABER	147
IV.5.4.1. Extractions de la 2-azaanthraquinone à partir de la plante	147
IV.5.4.2. Taux de récupération	147
IV.5.4.3. Pureté des pics analysés	148
IV.5.5. CONCLUSION	149
V. ETUDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>M. SCABER</i>	151
V.1. INTRODUCTION	151
V.2. MATERIELS ET METHODES	151
V.2.1. MATERIELS ET METHODES D'EXTRACTION	151
V. 2.2. GC/MS	152
V.2.3. TESTS ANTIMICROBIENS ANALYSE	152
V.3. RESULTATS ET DISCUSSIONS	153
V.4. CONCLUSION	156

Table des matières

VI. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	158
VI. BIBLIOGRAPHIE	163

RESUME

La dermatophilose bovine est une dermatose exsudative caractérisée par une lésion croûteuse sur le corps des bovins. C'est une zoonose mineure qui sévit sous forme enzootique et causée par un actinomycète gram positif typique (*Dermatophilus congolensis*). Les antibiotiques utilisés jusqu'à présent par voie parentérale sont peu efficaces à cause du caractère récidivant de la maladie.

Dans le but de trouver une approche phytothérapeutique, différentes plantes utilisées en médecine traditionnelle pour traiter des dermatoses ont été testées sur des animaux malades parmi lesquelles le *Mitracarpus scaber* Zucc. ex Schult + Scult.f. (RUBIACEAE) qui s'est montré particulièrement efficace.

Notre travail avait pour but de vérifier l'activité antimicrobienne d'extraits de *M. scaber* sur *D. congolensis* et de tenter d'identifier et d'isoler les molécules responsables de cette activité. Nous avons montré que l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *M. scaber* présentait une activité antimicrobienne *in vitro* (CMI = 1000 µg/ml) sur le *D. congolensis*. De ce extrait, nous avons identifié, après différents fractionnements (liquide-liquide, CPA et MPLC), par différentes méthodes (CCM, GC/MS, LC/MS) 12 molécules (la 2-azaanthraquinone, l'acide oléanolique, l'acide ursolique, l' α -amyrine, le β -amyrine, le lupéol, le campestanol, le stigmastérol, le β -sitostérol, le squalène, le phytol et la rutine) dont seules la 2-azaanthraquinone et la rutine étaient connus pour être présents dans des échantillons de *M. scaber* provenant d'autres pays.

Parmi les composés identifiés, la 2-azaanthraquinone, l'acide oléanolique, l'acide ursolique, l' α -amyrine, le β -amyrine et le lupéol se sont révélés actifs sur le *D. congolensis* la 2-azaanthraquinone, l'acide oléanolique et l'acide ursolique étant les plus actifs. Nous avons ensuite isolé, purifié et déterminé la structure de ces trois derniers.

Dans une deuxième partie de notre travail, nous avons développé et validé des méthodes de dosage par chromatographie sur couche mince à haute performance-densitométrie et/ou chromatographie liquide à haute performance pour quantifier les trois composés isolés dans l'extrait éthanolique. Grâce à ces dosages nous avons pu montrer que l'acide oléanolique et l'acide ursolique sont présents respectivement à 0.0043% et 0.0125% dans la plante et l'azaanthraquinone à 0.00848%.-

Nous avons également analysé la composition de l'huile essentielle (0,1 µl/g de poudre de plante) et nous y avons mis en évidence la présence d'acides gras et d'aldéhydes linéaires ainsi que de différents dérivés terpéniques comme le limonène, le bornéol, le α -caryophyllène, le β -caryophyllène, l'oxyde de caryophyllène, le phytol ou l'isophytol. Les essais sur le *D. congolensis* ont montré que l'huile essentielle, l'eau florale et les standards de l'acide oléique et de certains terpènes (le bornéol, le α -caryophyllène, le β -caryophyllène, l'oxyde de caryophyllène, le phytol, le tau-cadénol et la 2,3-diméthylnaphtalène-1,4-dione) ne présentent aucune activité antimicrobienne.

I. BUT DU TRAVAIL

I. BUT ET PLAN DU TRAVAIL

L'objectif premier de ce travail est d'isoler et d'identifier les composés du *Mitracarpus scaber* actifs sur le *Dermatophilus congolensis*, agent responsable de la dermatophilose bovine. Notre but est non seulement de contribuer à l'évaluation *in vitro* des propriétés antimicrobiennes de cette plante et de valider son usage en médecine traditionnelle mais également de tenter d'identifier de nouvelles molécules qui pourraient enrichir notre arsenal thérapeutique ou constituer de nouveaux réactifs pharmacologiques. Cette étude complète les travaux de Ali N. (thèse de Doctorat, 2002) qui a montré que *M. scaber* pourrait être utilisé dans la prise en charge topique de la dermatophilose bovine et vise à identifier et quantifier les composés antimicrobiens de cette plante en vue de jeter une base pour un usage possible contre les dermatoses humaines.

Nous avons étudié d'abord les propriétés antimicrobiennes *in vitro* de l'extrait éthanolique et des fractions. Nous avons également isolé et identifié les composés des fractions en nous focalisant sur les fractions les plus actives et évalué leurs effets antimicrobiens sur le *Dermatophilus congolensis*. Ensuite nous avons étudié l'activité cytotoxique sur les cellules en culture *in vitro* de l'extrait brut et de certaines fractions en vue d'évaluer leur sélectivité.

Nous nous sommes aussi attachés à développer et à valider des méthodes de dosage de ces composés actifs afin d'évaluer leur part d'activité dans l'extrait.

Les différentes étapes sont:

- 1. Etude phytochimique (fractionnement et identification des principes actifs)**
 - 1.1. Evaluation de l'activité des extraits bruts éthanoliques et des fractions**
 - 1.2. Isolement, purification et détermination des structures de principes actifs isolés**
 - 1.3. Evaluation de l'activité des composés identifiés**
- 2. Développement des méthodes de dosage et quantification de ces principes actifs isolés**
- 3. Etude de l'huile essentielle.**

II. INTRODUCTION

II. INTRODUCTION

II.1. La dermatophilose bovine et le *Dermatophilus congolensis*

II.1.1. La dermatophilose bovine

La dermatophilose bovine est une maladie infectieuse enzootique des pays tropicaux et subtropicaux. En Afrique tropicale et particulièrement en République du Bénin, elle compte parmi les principales maladies bactériennes des bovins. Elle reste une affection, peu meurtrière qui mérite néanmoins une attention particulière surtout dans les grandes régions d'élevage, en raison des pertes économiques qu'elle engendre au niveau des différents secteurs de la production animale, notamment dans les cas sévères. Elle entrave entre autre le développement de la culture attelée.

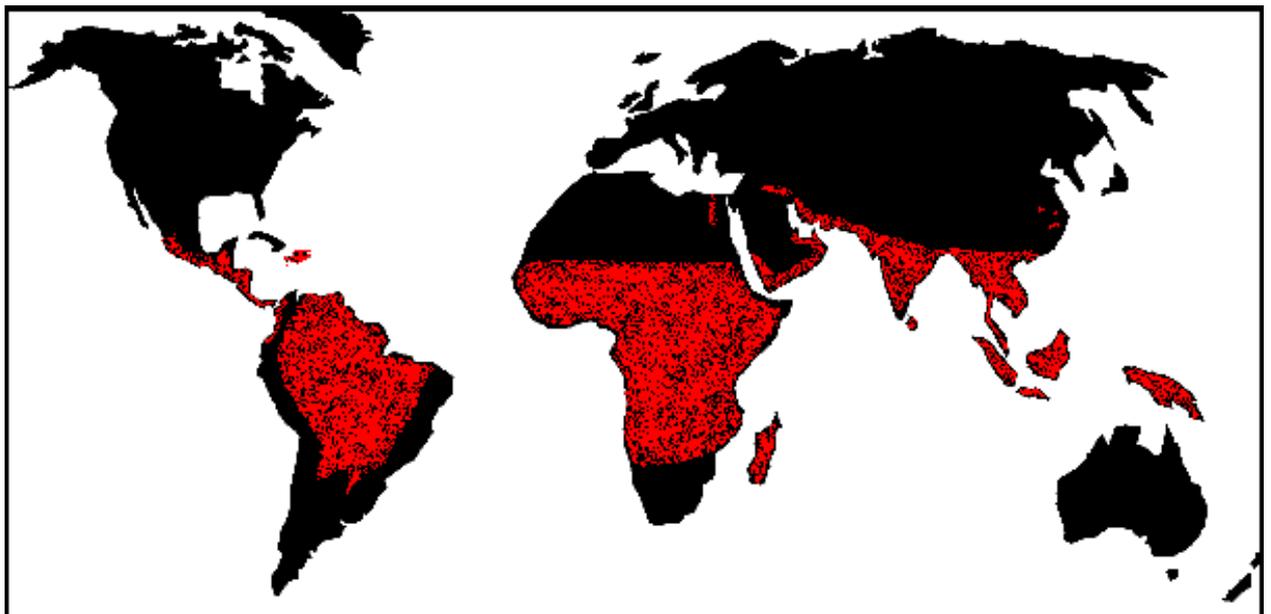


Figure.1 : régions du globe où sévit la dermatophilose bovine (Samui KL, Hugh-Jones ME 1986)



Zone du globe où sévit la maladie

En République du Bénin, la dermatophilose semble peu préoccuper le monde rural parce que moins contagieuse et moins virulente que d'autres affections telles que la peste ou la péri-pneumonie contagieuse bovine ; mais elle a des effets néfastes sur le développement du

cheptel national. Elle influe sur le niveau nutritionnel des veaux en raison de la diminution de la production de lait et entraîne une perte en protéines animales pour l'alimentation humaine. L'organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation (FAO) préoccupée par le problème de la faim dans le monde, a dû financer des projets gouvernementaux pour aider à l'éradication de cette affection. La maladie conduit en effet à un abattage précoce des animaux en cours de production et empêche l'amélioration de la performance des races locales par l'introduction de races exotiques, très sensibles à la maladie (Assogba H., 1976 ; Oppong E., 1976).

Les animaux utilisés au Bénin pour la culture attelée sont essentiellement les Zébus et métis Zébu x Borgou qui sont assez sensibles à la dermatophilose. La période des cultures coïncide avec celle de recrudescence de la maladie. Le traitement des animaux de trait génère des dépenses élevées pour les fermiers qui sont découragés par le caractère récidivant de la maladie. Assogba (1976) rapporte que Sangare fut le premier à révéler en 1942 l'existence de la dermatophilose en République du Bénin. Mourouzaa M. (1957) a observé une forme extensive de la maladie autrefois appelée streptothricose cutanée chez le bovin Borgou et le métis Borgou x Lagunaire. Il a noté aussi que les races Lagunaire et Somba avaient une certaine résistance à la maladie. Dès lors, cette maladie est bien connue des éleveurs comme le témoignent les diverses dénominations dans les différentes langues du pays:

Kroussa kroussa en Dendi

Gnagnare ou *Gougna* en Peuhl

Kirchi en Haoussa

Akli en Fon

Ekourou en Yorouba

En général toutes ces désignations sont attribuées à toutes les maladies de la peau des animaux, mais les éleveurs savent différencier la dermatophilose des autres dermatoses bovines.



Figure.2 : lésions généralisées sur un bovin (Cirad, 2001)

La dermatophilose bovine a été depuis toujours diagnostiquée par l'observation des lésions cutanées. Parfois l'agent causal est mis en évidence sur des frottis préparés à partir des croûtes après coloration au Giemsa ou au bleu de méthylène. Aujourd'hui des méthodes d'identification de l'agent responsable de cette affection par des techniques culturales dans le but de déterminer l'implication de *Dermatophilus congolensis* dans les dermatoses bovines en République du Bénin sont connues (thèse de Doctorat, Ali N. 2002). Elle sévit dans tout le pays avec une prévalence annuelle moyenne de près de 6 %. La fréquence de la maladie croît du Sud au Nord où l'incidence de cette affection est la plus élevée. Le plus gros handicap pour le traitement de la dermatophilose est le manque de vaccins. Elle sévit rarement sous forme aiguë, mais une fois déclarée, elle demeure chronique et récidive chez l'animal à chaque saison de pluies. La maladie réapparaît même si les animaux ont été traités et guéris avec des antibiotiques supposés efficaces par voie parentérale (Ogwu D. et Osori D. 1981; Lloyd D. *et al.*, 1990). Ces observations ont été confirmées par les travaux de Ali N. sur le cheptel du Bénin (Thèse de Doctorat, Ali 2002).

II.1.2. *Dermatophilus congolensis*

II.1.2.1. Systématique du *Dermatophilus congolensis*

Le genre *Dermatophilus* (*Dermatophylus* ; sic) comprend deux espèces, *Dermatophilus congolensis* (*Dermatophylus congolense*" (sic), "Atinomyces dermatonomus", "Tetragenus congolensis", "Actinomyces congolensis", "Nocardia dermatonomus", "Streptothrix bovis", "*Dermatophilus dermatonomus*", "*Dermatophilus pedis*") et *Dermatophilus chelonae*. Traditionnellement, le genre *Dermatophilus* constituait, avec le genre *Geodermatophilus*, la famille des *Dermatophilaceae* dont les représentants se caractérisent par un mycélium parfois rudimentaire et par un sporange multiloculaire. En fait, l'étude de la séquence des ARNr 16S montre que les genres *Dermatophilus* et *Geodermatophilus* appartiennent à 2 sous-ordres différents de l'ordre des Actinomycetales (classe des Actinobacteria, sous-classes des Acidimicrobidae). Le genre *Dermatophilus* est classé dans le sous-ordre des Micrococccineae et dans la famille des *Dermatophilaceae* dont il constitue l'unique genre.

L'espèce *Dermatophilus congolensis* est une bactérie connue depuis longtemps alors que *Dermatophilus chelonae*, une espèce qui peut prêter à confusion, n'a été décrite qu'en 1995 (réf). Cette nomenclature a été proposée pour 3 souches de *Dermatophilus* sp. isolées de tortues. L'étude du polymorphisme électrophorétique de 16 enzymes, effectuée sur 38 souches de *Dermatophilus congolensis* et sur les 3 souches de *Dermatophilus* sp. isolées de chéloniens montre que ces dernières présentent un électrophorétype particulier et suggère qu'elles appartiennent à une nouvelle espèce. Le polymorphisme de restriction de l'ADN, obtenu avec 3 enzymes différentes (Apa I, Bam HI et Pvu II), montre également que les souches isolées des tortues sont génétiquement distinctes des souches de *Dermatophilus congolensis*. L'étude des caractères phénotypiques (morphologie, caractères culturels, caractères biochimiques, électrophorétype des protéines, virulence, absence de déterminant antigénique reconnu par l'anticorps monoclonal 2F4 utilisé pour détecter *Dermatophilus congolensis*) permet de caractériser ces souches. Aussi, elles ont été placées dans une nouvelle espèce, *Dermatophilus chelonae*. On peut cependant remarquer qu'il n'existe aucune donnée concernant les homologies ADN - ADN et la valeur du G + C p. cent.

II.1.2.2. Caractères bactériologiques

L'examen d'une culture jeune, effectuée en milieu liquide, montre des mycéliums constitués de longs filaments effilés de 0,5 à 1,5 μm de diamètre. Ultérieurement, à la suite de divisions transversales et longitudinales les filaments atteignent une taille de 5 μm de diamètre et présentent des ramifications latérales. Au sein de ces filaments, la formation de septums donne naissance à des rangées parallèles et accolées d'éléments cuboïdes inclus dans une gangue gélatineuse. Ces éléments sont des spores qui vont devenir mobiles (zoospores) grâce à l'acquisition de 1 à plus de 6 flagelles formant alors une touffe. Plus tard, les spores perdent leur mobilité et germent. Les cultures effectuées sur milieux gélosés incubés en présence de CO_2 peuvent conduire à la formation d'hyphes aériens. Les espèces du genre *Dermatophilus* sont des bactéries à Gram positif, non acido-résistantes, aéro-anaérobies facultatives, catalase positive, chimio-organotrophes, non fermentatives mais pouvant oxyder quelques sucres.



Figure.3 : culture de *Dermatophilus congolensis* sur gélose au sang (Thèse de N. Ali, 2002)

Dermatophilus congolensis donne une réponse positive aux tests d'hydrolyse de l'urée, de l'amidon, de la gélatine, de la caséine, d'oxydation du glucose, du fructose, du galactose (oxydation transitoire apparaissant dans les 48 heures) et du maltose (oxydation souvent tardive). Pour Vaissaire et Dufrene (1995) le germe oxyde le saccharose et le tréhalose alors que pour Gordon (1989) et pour Ellis *et al.* (1993), ces sucres ne sont pas oxydés. Une réponse négative est notée pour les tests de réduction des nitrates, de production d'indole, de production d'hydrogène sulfuré, d'oxydation du dulcitol, du lactose, du mannitol, de la salicine, du sorbitol et du xylose. Le test de cAMP est généralement positif vis-à-vis d'une souche de *Rhodococcus equi* ou de *Streptococcus agalactiae*. En utilisant une souche bêta-hémolytique de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, le test de cAMP se traduit par une inhibition de l'hémolyse de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* et par une exaltation de l'hémolyse de *Dermatophilus congolensis*. En galerie API ZYM, une réaction positive est obtenue pour l'estérase lipase (C₈), la leucine arylamidase, la phosphatase acide et, pour plus de 94 p. cent des souches, pour la valine arylamidase. En revanche, la réponse est négative aux tests alpha-galactosidase, bêta-galactosidase, bêta-glucuronidase, bêta-glucosidase, alpha-mannosidase et alpha-fucosidase.

Sur gélose au sang incubée à 37 °C, les colonies apparaissent en 48-72 heures (parfois en 24 heures mais elles sont minuscules) et grossissent lentement. Elles sont rugueuses, à bords irréguliers, très adhérentes à la gélose, de couleur blanche ou grise puis prennent une coloration jaune ou orange. L'adhérence à la gélose est telle que le repiquage nécessite souvent un découpage de la gélose autour de la colonie. Sur gélose au sang de mouton, *Dermatophilus congolensis* produit souvent une hémolyse (alpha ou bêta) qui n'est pas observée sur gélose au sang de cheval (sauf, parfois, sous la colonie). Le caractère hémolytique est plus net lorsque les cultures sont effectuées à 27 °C mais peut disparaître au cours des repiquages.

En bouillon, il se forme un sédiment et lorsque le bouillon est enrichi en sérum de lapin, la croissance se traduit par un voile présent en surface ou flottant dans le milieu. L'incubation dans une atmosphère contenant 10 p. cent de dioxyde de carbone accélère la croissance, permet l'obtention d'hyphes aériens mais retarde la formation des septums et des spores.

Aucune culture n'est obtenue sur gélose de Sabouraud glucosée ou sur gélose de MacConkey.

II.1.2.3. Facteurs de pathogénicité

Dermatophilus congolensis ne semble pas capable d'infecter la peau saine. La colonisation de la peau nécessiterait de petits traumatismes, des plaies infligées par des piqûres d'arthropodes, par une végétation vulnérante ou un ramollissement de la peau dû à une humidité excessive. La pluie intervient également en disséminant les zoospores sur la peau saine où elles sont responsables de nouveaux foyers d'infection.

La formation de croûtes serait due à une invasion de l'épiderme par les hyphes et à une multiplication bactérienne dans les couches profondes de l'épiderme suivies d'une infiltration rapide par des neutrophiles. *Dermatophilus congolensis* excrète une enzyme capable de dégrader la kératine ainsi que d'autres protéases, notamment des sérines protéases, qui participeraient à la formation des lésions.

L'infestation par les tiques joue un rôle important dans l'évolution de la dermatophilose car l'infection expérimentale de la peau saine par *Dermatophilus congolensis* conduit uniquement à une lésion localisée qui guérit spontanément. De plus, dans les régions où l'infestation par les tiques est bien contrôlée, l'incidence de la dermatophilose est faible. Les tiques sont responsables de lésions cutanées mais elles provoquent surtout une immunodépression des animaux par le biais de substances contenues dans leur salive.

II.1.2.4. Habitat et pouvoir pathogène

Les souches de l'espèce *Dermatophilus congolensis* sont considérées comme des parasites de l'épiderme des mammifères. Le rôle du sol et du milieu extérieur en tant que réservoir a fait l'objet de controverses. Les essais d'isolement à partir du milieu extérieur se sont souvent soldés par des échecs mais, Wekhe (1989) rapporte l'isolement du germe à partir d'échantillons de sol et d'eau et Martinez et Prior (1991) ont montré que *Dermatophilus congolensis* survit 444 jours dans l'eau et 85 jours dans le sol. Le milieu extérieur pourrait donc constituer une source de contamination et notamment le sol, les pièces d'eau boueuse et même les bains utilisés pour le déparasitage des animaux. Les arthropodes piqueurs ont été incriminés dans la transmission de l'infection et/ou dans l'extension des lésions.

Dermatophilus congolensis est à l'origine d'une dermite exsudative, parfois sévère, accompagnée de la formation de croûtes appelée dermatophilose. Les lésions cutanées comprennent un épaissement du *stratum spinosum* surmonté de croûtes formées d'un exsudat séreux, de neutrophiles morts et de kératinocytes. Le derme sous-jacent contient un

infiltrat de lymphocytes et, dans les cas les plus sévères, il y a disparition des glandes sébacées et sudoripares. La dermatophilose est une maladie bien connue dans les pays tropicaux humides mais elle peut également sévir dans d'autres régions du monde (Amérique Centrale, Amérique du Nord, Amérique du Sud, Australie, Nouvelle Zélande, Europe...). L'infection touche de nombreuses espèces notamment les bovins (dermatophilose bovine), les petits ruminants (Samui KL, Hugh-Jones ME 1986), les chevaux, les mules, les ânes ; elle a été également observée chez le chameau, le zébu, le zèbre, la girafe, l'antilope, le daim, le chien, le chat, le lapin, le porc, l'orang-outang (*Pongo pygmaeus pygmaeus*), l'ours polaire (élevé en captivité), le phoque, le béluga du Saint-Laurent (*Delphinapterus leucas*), des marsupiaux, une espèce de crocodile (*Crocodylus porosus*), des reptiles (*Agama agama*, *Amphibolurus barbatus*, *Calotes mystaceus*) et l'homme. La dermatophilose des ruminants est une des maladies ayant des répercussions économiques graves (perte en viande, en lait, en laine, en cuir, mortalité) notamment en Afrique, aux Caraïbes et, pour l'élevage ovin, dans tout l'hémisphère sud.

- Chez les bovins (Samui KL, Hugh-Jones ME 1986) , la dermatophilose, appelée aussi streptothricose, a d'abord été identifiée en Afrique puis, au cours des 3 dernières décennies, dans le reste du monde. Les formes cliniques les plus sévères sont généralement associées à l'infestation par des tiques (*Amblyomma variegatum* mais aussi, *Boophilus microplus*, *Hyalomma asticum*...). Les lésions peuvent être observées sur n'importe quelle partie du corps (oreilles, museau, mamelle, scrotum, région péri-anale, base de la queue, encolure, dos, flancs, région axillaire, extrémités des membres...). Elles débutent par une agglutination des poils due à la présence d'un exsudat (aspect en poils de pinceaux) puis elles évoluent vers la formation de papules recouvertes de croûtes épaisses, d'un diamètre de 2 à 5 cm, plus ou moins confluentes et formant des placards évoquant une carte de géographie. L'infection peut se généraliser, notamment chez les bovins importés dans des zones d'enzooties. Dans les formes graves, les animaux maigrissent, s'affaiblissent progressivement et l'infection peut conduire à la mort.

- Chez les ovins (Samui KL, Hugh-Jones ME 1986), deux formes cliniques prédominent :

* Une forme se traduisant par des lésions siégeant sur les parties laineuses ("lumpy wool disease") et caractérisée par des croûtes diminuant la valeur marchande de la toison. La santé des animaux est peu altérée sauf si les lésions couvrent une vaste surface. Chez les agneaux, l'infection peut conduire à la mort.

* Une forme caractérisée par de petites croûtes apparaissant sur les membres ("strawberry footrot"), augmentant de surface puis devenant verruqueuses.

- Chez les équidés, la maladie affecte les animaux placés dans de mauvaises conditions d'hygiène et dans un environnement humide (Samui KL, Hugh-Jones ME 1986). En France par exemple, les cas sont plus nombreux en saison pluvieuse. Les lésions siègent habituellement sur les parties hautes du corps, sur les paturons, sur les oreilles et sur les nasaux. Elles présentent une tendance à l'extension et elles consistent en des croûtes sèches entourées de poils agglutinés et hérissés. L'ablation des croûtes révèle que la peau sous-jacente est atteinte d'érythème et d'ulcères. L'état général des animaux n'est généralement pas affecté.
- Chez le chien, l'infection reste également localisée à la peau (tête, dos, flancs) et les signes cliniques sont comparables à ceux observés chez le cheval. Vaissaire et Dufrene (1995) ont également isolé le germe d'un cas d'otite purulente.
- Le chat présente un tableau clinique différent (Samui KL, Hugh-Jones ME 1986). La contamination se ferait à la faveur de plaies puis l'infection provoque la formation d'abcès dans les muscles et dans les nœuds lymphatiques ainsi que la formation d'abcès sous-cutanés qui peuvent se fistuler. Chez cette espèce, on a également décrit la formation de granulomes siégeant sur la langue et sur la paroi vésicale.
- Chez l'homme, la contamination se réalise au contact des animaux infectés ou à la faveur de bains prolongés pris en zones tropicales. La maladie se traduit par des pustules ou des lésions de dermite exsudative, présentes sur la paume des mains ou sur la plante des pieds. Dusch *et al.* (1994) ont décrit un cas de dermatophilose siégeant au niveau du pubis chez un patient n'ayant pas eu de contact avec un animal et ne vivant pas en zone tropicale. Le plus souvent, l'évolution dure moins de 15 jours et la guérison est spontanée. Toutefois, chez un jeune garçon souffrant d'une immunodépression, l'infection a conduit à la formation de nodules d'évolution chronique.

II.1.2.5. Diagnostic bactériologique

Le prélèvement est constitué par des croûtes, décollées à la main et récoltées sur des animaux présentant des lésions typiques et circonscrites. En parallèle, il est très souhaitable de réaliser des frottis avec l'enduit qui tapisse la face interne des croûtes ou avec les sérosités dermiques. Un prélèvement constitué de quelques poils agglutinés ne permet pas de faire la recherche. Chez le chat, on pratiquera une biopsie des tissus présentant des abcès.

Une partie du prélèvement est dilacérée dans un peu d'eau ou de bouillon stérile et sert à préparer des états frais ou des frottis. La coloration des frottis (bleu de méthylène, Gram, Giemsa) permet d'observer des bactéries très polymorphes, présentant parfois des éléments mycéliens fragmentés ainsi que des rangées d'éléments cuboïdes accolés. Compte tenu de l'examen clinique, l'aspect microscopique permet souvent d'assurer le diagnostic.

L'isolement est réalisé sur gélose au sang (la gélose Columbia permet une croissance plus abondante qu'une gélose cœur-cerveau ou trypticase soja) ou sur une gélose enrichie en 25 p. cent de sérum de lapin. Sur ce dernier milieu, l'examen après coloration de Gram permet d'observer la morphologie typique de *Dermatophilus congolensis*.

Pour les prélèvements contaminés (cas le plus fréquent), on fait la culture sur des milieux sélectifs contenant soit de la colistine (1000 UI/mL), soit un mélange d'acide nalidixique (10 µg/mL), de vert malachite (0,25 µg/mL) et de nystatine (200 UI/mL) soit un mélange de colistine (100 UI/mL), d'acide nalidixique (10 µg/mL) et de nystatine (200 UI/mL).

Les milieux sont ensemencés avec un broyat d'abcès, de croûtes ou avec le produit de raclage de la face interne des croûtes.

L'aspect des cultures, les examens bactérioscopiques et les caractères biochimiques assurent l'identification.

La distinction entre *Dermatophilus chelonae* et *Dermatophilus congolensis* qui est une espèce proche, peut s'avérer délicate car cette dernière présente des caractères morphologiques, culturels et biochimiques susceptibles de varier selon les souches. Parmi les critères qui seraient les plus fiables on peut noter que, contrairement à *Dermatophilus congolensis*, *Dermatophilus chelonae* se cultive mieux à 27 °C, dégage une odeur putride, ne réagit pas avec l'anticorps monoclonal 2F4 (réaction d'immunofluorescence), réduit les nitrates en nitrites (réaction faible), ne produit généralement pas d'uréase et résiste à la streptomycine (10 µg) et à la néomycine (30 µg). Le sérodiagnostic peu utilisé, fait appel à l'hémagglutination passive ou à la précipitation en milieu gélifié. Les résultats obtenus sont peu reproductibles car les techniques, notamment la préparation des antigènes, sont mal standardisées. Toutefois, il semble exister une corrélation entre la concentration des sérums et la gravité des lésions.

II.1.2.6. Sensibilité *in vitro* aux antibiotiques

Dermatophilus congolensis est sensible *in vitro* à la pénicilline G, à l'ampicilline, à la streptomycine, à la gentamicine, au chloramphénicol, à l'érythromycine, à la lincomycine, à la

bacitracine, au ceftiofur et aux tétracyclines. La sensibilité est variable selon les souches vis-à-vis de la polymyxine B, l'enrofloxacin, l'oxacilline, la néomycine et l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole. Le germe est résistant aux antibiotiques antifongiques telles que la *griséofulvine* et la *nystatine*. En revanche, certains acaricides (dichlorvos, lindane), ont une action sur *Dermatophilus congolensis*.

II.1.3. Traitement et prévention de la dermatophilose bovine

II.1.3.1. Traitements

La dermatophilose est une maladie difficile à guérir. Pour cette raison, son traitement demeure un problème de grande importance, si bien que plusieurs chercheurs ont essayé de trouver une variété de produits médicamenteux qui pourraient effectivement agir sur l'agent causal aussi bien *in vitro* que *in vivo*. Peleton (1975) a essayé, par voie générale, sans succès le Bérenil, la Lomidine, et d'autres produits comme l'Asuntol, le Novarsenobenzol, alors que Blancou (1976 a) a testé les agents antibiotiques et mycostatiques contre *D. congolensis*. Les deux chercheurs ont remarqué que les résultats des essais de traitement sur les animaux malades n'étaient pas aussi concluants qu'ils le sont pour les tests de sensibilité *in vitro*. Blancou (1976 b) a noté que plusieurs antibiotiques ont des effets bactériostatiques et bactéricides sur les différentes souches de *D. congolensis*. Il a montré également que les antibiotiques agissaient différemment sur le mycélium ou sur les zoospores. Nwufoh (1985) a trouvé que *D. congolensis* était plus sensible aux antibiotiques à large spectre tels que les tétracyclines, la bacitracine, la néomycine et la nitrofurazone, mais demeure résistant au groupe des sulfamides.

Plusieurs composés chimiques ont été utilisés en application locale pour traiter la dermatophilose sans beaucoup de succès. Les solutions arsenicales employées pour les bains acaricides n'ont aucun effet régressif sur la maladie alors que certains animaux développent des signes de toxicité à l'arsenic. Selon Hyslop (1980), le sulfate de zinc aurait une efficacité incertaine ; de même, les doses orales d'iodures, administrées à la limite supérieure et faisant apparaître le premier signe d'iodisme, n'apporteraient aucune amélioration dans le temps. Hart *et al.* (1967 et 1968), Hyslop (1980), ont montré que l'hexachloro-benzène et le sel d'aluminium sont particulièrement actifs tant sur les vecteurs que sur les organismes mais, ils ne parviennent probablement pas à pénétrer profondément les lésions. Blancou (1976 b) a révélé que les composés d'ammonium quaternaire, les dérivés de crésyl et le sulfate de zinc et de cuivre, utilisés en bain pour les bovins réduisaient le nombre de cas cliniques.

L'ammonium quaternaire pourrait réduire le risque de transmission de la bactérie. Thierry et

Memery (1961) ont essayé une pommade composée de dihydromycine pénicilline associée à la papaine pour traiter la maladie par application locale. Saidu et Abdulkader (1986), Heron et Morrow (1989) ont trouvé que les acaricides utilisés en bains ont un effet sur *D. congolensis*. Le traitement local effectué à l'aide de composés galéniques n'a pas été assez performant.

Les éleveurs et certains chercheurs ont essayé des traitements indigènes en utilisant des mélanges de produits naturels sans se soucier des normes scientifiques. Un mélange d'huile de palme, de sulfure, de jus de citron et de pétrole en application locale essayé par NWUFOH (1985) semble actif sur la maladie mais la durée du traitement serait trop longue. Isitor *et al.* (1993) ont testé l'efficacité du Lamstreptocide[®] formule A, (contenant des acides gras, des acides stéariques, oléiques et linoléiques) et la formule B (mélange d'oligo-éléments, comme le fer, le zinc, le cuivre, le manganèse, le cobalt, le calcium, le magnésium, le sodium, le potassium et le phosphore), sur les animaux infectés. Ils ont trouvé qu'après une seconde application de la substance sur les régions du corps précédemment traitées, les croûtes étaient encore positives et *D. congolensis* y a été mis en évidence deux semaines après le traitement. VERDES *et al.* (1989) ont utilisé le Cresogal[®] composé de sulfate de cuivre, de formaldéhyde, d'acide salicylique et d'ichtyol pour traiter les ovins et bovins et ont constaté une cicatrisation et une repousse de la laine et des poils en trois à quatre semaines.

De nombreuses tentatives du traitement de la dermatophilose avec des agents antimicrobiens injectables ont donné des résultats variables. Thierry et Memery (1961), Peleton (1975) ont essayé la pénicilline, la dihydromycine, la terramycine et l'auroéomycine sans succès sur les cas aigus ou chroniques, pendant que Coleman (1967) a noté que plusieurs antibiotiques ne sont pas actifs sur les formes chroniques. Néanmoins, quelques antibiotiques le sont par voie parentérale. BLANCOU (1969) a utilisé 75 mg et 75.000 IU/kg de pénicilline et streptomycine en une seule injection et a obtenu de bons résultats. Peleton (1975) avec les mêmes antibiotiques a rapporté que 92,78% des animaux traités au Tchad étaient guéris. D'après Ilemobade *et al.* (1979), la terramycine longue action (TLA) est le seul antibiotique dont l'efficacité est prouvée par voie injectable. Mais deux ans plus tard Ogwu *et al.* (1981) ont démontré que les animaux traités avec la TLA, même après guérison, ont connu une récurrence de l'infection à *D. congolensis*. Ranaivoson *et al.* (1984) ont injecté 125 ml de suanovyl 20 par 100 kg de poids vif et 20 ml de strepnovyl (composé de 10 mg de spiramycine et de 20 mg de streptomycine) et ont conclu que les deux produits étaient aussi bons que la bipéni-streptomycine. Sarradin *et al.* (1985) ont montré que la TLA assurait 89% de guérison en association avec un bain acaricide hebdomadaire et que par contre, la

spiramycine à la dose de 75 000 UI par Kg de poids n'induisait que 85% de guérison. Nwufoh (1985) a utilisé des antibiotiques à large spectre comme la tétracycline, l'oxytétracycline, la bacitracine, la néomycine et la nitrofurazone avec succès. Mais il a remarqué que les sulfamides n'ont aucun effet sur les lésions. Wilson et Amakiri (1989) ont trouvé que l'oxytétracycline LA (longue action), la terramycine LA, la biocycline et la terramycine sont actives sur *D. congolensis*. Ils ont évalué l'efficacité des produits en fonction des débuts des chutes des croûtes et ont trouvé que l'oxytétracycline LA est efficace et provoque la chute des croûtes dès le 4^{ème} jour après le traitement. Avec la terramycine LA et la biocycline, les croûtes tombent respectivement à partir du 7^{ème} et 9^{ème} jour, et la terramycine entraîne juste une guérison transitoire chez les animaux. Récemment Lloyd *et al.* (1990) soutiennent que l'oxytétracycline LA pourrait être utilisée pour empêcher le déclenchement de la dermatophilose et permettre la réorganisation du système d'élevage, afin de réduire la réapparition de la maladie par l'amélioration de l'alimentation.

Mais tous ces traitements par voie d'injection n'ont pas empêché la récurrence de la maladie : il est alors pertinent de trouver d'autres moyens de traitement pour protéger les animaux durant la saison pluvieuse. En fait, il n'y a aucun produit efficace, qui puisse prévenir la réapparition de la maladie pendant la saison pluvieuse. Lloyd et Noble (1982) ont conclu que l'échec des divers traitements locaux pouvaient provenir de ce que l'épaisseur des croûtes ne permettait pas aux médicaments d'être en contact direct avec la surface infectée. L'efficacité des produits utilisés par voie parentérale est aussi limitée parce qu'ils ne parviennent pas à atteindre l'épiderme non vascularisée. D'autres moyens de traitement de la maladie ont été explorés notamment l'interaction entre les bactéries productrices de substances antibiotiques et *D. congolensis*. Cette approche biologique est un outil thérapeutique possible qui a suscité beaucoup d'intérêt pour la maîtrise de la maladie. Plusieurs auteurs l'ont expérimenté pour traiter aussi bien les dermatoses animales que les staphylococcies observées chez les hommes (Boris 1968). Zaria (1991) a révélé les effets antagonistes entre les staphylocoques isolés chez les porcs et *D. congolensis* isolés chez la souris. La flore cutanée des animaux infectés et leur effet sur le développement de *D. congolensis* ont été décrits par Ojo (1975). Noble et Willie (1980), Nwufoh et Amakiri (1981) ont exploré l'effet antagoniste des microorganismes pour la prévention de la dermatophilose. Plus récemment, Kingali *et al.* (1990) ont trouvé que le développement de *D. congolensis* était inhibé par *Bacillus sp.* isolé de la peau saine du mouton. Plus tard, Zaria (1991) a démontré l'effet inhibiteur des staphylocoques coagulase négative isolés de la peau saine et aussi de la peau lésée du porc sur *D. congolensis*. Lloyd et Noble (1982), Zaria (1991) ont prouvé chez la souris l'effet inhibiteur des staphylocoques

producteurs d'antibiotiques sur *D. congolensis* et ont observé que les lésions pourraient être évitées par l'application simultanée des staphylocoques humains et des staphylocoques coagulase négative isolés du porc. Plusieurs études sur l'effet antagoniste des bactéries ont conduit à la conclusion que *D. congolensis* pourrait être inhibé chez l'animal par la présence simultanée de plusieurs microorganismes provenant de différents hôtes animaux et d'autres microbes producteurs de substances antibiotiques tels que *Bacillus sp.* empêche le développement de *D. congolensis*. Selon Lloyd et Noble (1982), la prospection de la bactériothérapie et du traitement biologique de la dermatophilose par le biais d'interférence bactérienne est très intéressante et semble prometteuse. Théoriquement la méthode est peu coûteuse et peut être renouvelée, mais elle nécessite d'être testée encore pour un moment dans les conditions de terrain.

II.1.3.2. Prévention et prophylaxie médicale

BLANCOU (1976 a) a remarqué que l'isolement des animaux infectés à la fin de la saison sèche ne permettait pas d'éviter la réapparition de la maladie pendant la saison pluvieuse suivante. Il a également montré que l'isolement des animaux malades n'avait aucun effet sur le déclenchement futur de l'infection dans le troupeau. Cela signifie que le contact direct joue un rôle mineur dans le processus de la maladie. La prévention de la maladie pourrait être entreprise selon Curasson et Mornet (1941), Presler (1973), par des baignades régulières des animaux dans une solution acaricide et antiseptique pour détruire les tiques et les bactéries. Même si ce moyen n'a pas une valeur thérapeutique totale, il réduit l'apparition de l'infection. Morrow *et al.* (1993) Martinez *et al.* (1993) ont révélé que le traitement anti-tiques est le moyen le plus efficace pour réduire la prévalence de la dermatophilose.

Blancou (1976) a préconisé des bains acaricides hebdomadaires. Hyslop (1980) proposa d'autres moyens de traitement tels que la protection du bétail contre la pluie, (efficace seulement sur les petits troupeaux), le nettoyage et le renouvellement des baignades contaminés par les parasites infestant. Ceux-ci restent les seuls moyens permettant de réduire l'infection. Il suggère également la destruction des litières et harnais des chevaux contaminés.

La vaccination, associée à des mesures sanitaires, serait un procédé simple pour réduire l'incidence de la maladie. Selon des travaux déjà anciens, la vaccination des bovins (vaccin vivant inoculé par voie intradermique) semblait donner des résultats encourageants. En fait, la vaccination (vaccins chauffés, formolés et précipités à l'alun ou vaccins vivants administrés par voie intradermique ou fractions antigéniques partiellement purifiées) est décevante lors

d'essais effectués sur le terrain. Des différences dans l'antigénicité des souches et dans leur virulence pourraient expliquer ces médiocres résultats.

II.1.4. Proposition de Prise en charge topique

Dans le but de proposer une meilleure alternative phytothérapeutique pour une prise en charge topique de la dermatophilose bovine, des récentes études ont été entreprises et ont montré que les extraits éthanoliques de *Cassia alata*, *Lantana camara* et *Mitracarpus scaber*, sont efficaces *in vivo* sur la dermatophilose bovine (Ali et al. 2003). Ces travaux ont aussi révélés que l'extrait éthanolique de *Mitracarpus scaber* était plus actif *in vivo* et qu'aucune récurrence n'a été observée sur les animaux. (figure.4, 5 et 6)



Figure.4 : dermatophilose bovine sur un bovin du Bénin non traité (Ali et al. 2003)



Figure.5 : bovin au cours du traitement avec des pommades à base d'extraits de *M. scaber* (Ali et al. 2003)



Figure.6 : bovin à près 3 semaines de traitement avec un extrait de *Mitracarpus scaber* (Ali et al.2003)

II.2. *Mitracarpus scaber*

II.2.1. Genre et famille

Le genre *Mitracarpus* appartient à la famille des RUBIACEAE. La famille des RUBIACEAE appartient à la super classe des Tricolpées (Eudicots) et à la classe des Dicotyledonae, des Magnoliopsida et des Tricolpées évoluées. Elle appartient à l'ordre des Gentianales et des Rubiales. C'est une famille riche avec environ 500 genres et près de 700 espèces. On les rencontre essentiellement en zones tropicales et subtropicales ; peu d'espèces dans les régions tempérées et froides. Ce sont des plantes herbacées, arbustes, arbres ou lianes. Les feuilles sont opposées-décussées, simples, stipulées avec des stipules parfois aussi développées que les feuilles pouvant former des pseudo verticilles. L'inflorescence est variée : cymes, racèmes, panicules et plus rarement des fleurs solitaires. Les fleurs sont régulières, hermaphrodites, tétracycliques, 4(-5) mères. Le calice est généralement ouvert, parfois accrescent, mais souvent très réduit ; les sépales sont libres ou soudés. La corolle est formée de (3–)4 ou 5 ou 8–10 pétales plus ou moins soudés, et l'androcée est constitué de 4-5 étamines toutes fertiles, oppositisépales à filets soudés au tube de la corolle ; anthères instrorses à déhiscence longitudinale ou parfois poricide. Le gynécée est formé de 2(-9) carpelles soudés ; ovaire infère uniloculaire ou 2(-9) loculaire ; 1-*n* ovules anatropes dans chaque loge en placentation pariétale (ovaire uniloculaire) ou axile (ovaire 2(-9) loculaire) ; un style à sommet divisé suivant le nombre de carpelles. Le fruit est un schizocarpe formé de 2(-9) méricarpes ou capsules, ou baies, ou drupes. Les graines sont généralement albuminées, parfois exalbuminées. L'embryon généralement droit, parfois courbe (Auger et al. Bordeaux : CNDP, 1985 ; Heywood et al. Nathan, 1996 ; Marouf et al. Dunod, 2000).

Le genre *Mitracarpus scaber* est connu sous quatre synonymes (H.D.Neuwinger. 2000): *Mitracarpus scaber* Zuccar; *Mitracarpus hirtus* (L.) DC.; *Mitracarpus verticillatus* (Schumacher et Thonn.) et *Mitracarpus villosus* (Sw) DC.

En République du Bénin, les noms en langues nationales sont (Adjadohoun et al. 1989) :

- En Fon et Goun: Godokwé;
- En Yoruba: Alèkou;
- En Loukpa: Tantoma;
- En Pédah: Dagbwé.

II.2.2. Description botanique et répartition (au Bénin)

Le *Mitracarpus scaber* est une herbe à tige pubérulente. Les feuilles sont lancéolées, subacutes, de 3 à 6cm de longueur et jusqu'à 1cm de large, glabres ou glabrescentes. Les fleurs sont blanches, en globélules à l'aisselle des feuilles. C'est une espèce courante dans les cultures, sur les terrains vagues, le long des routes et pistes de l'Afrique intertropicale (Figure.7 et 8). On le retrouve aussi dans les prairies estivales du Sahel et dans les lieux ensoleillés du Sénégal (Kerharo.J. 1974.). Au Bénin, *Mitracarpus scaber* a une large répartition. On le retrouve presque dans toutes les cultures en allant des pelouses, des sables sous cocotiers du littoral aux savanes (où on le retrouve très abondamment) du centre et du nord Bénin en passant par les mangroves (Pr V. Adjakidjè. Communication personnelle).

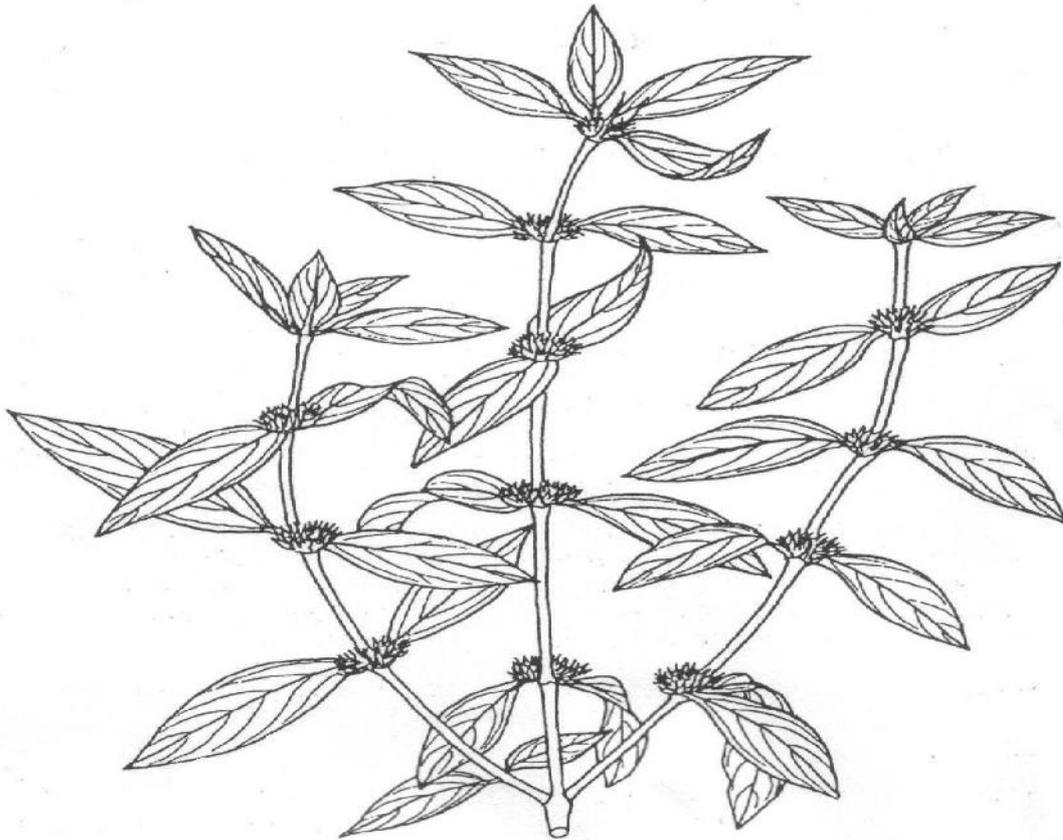


Figure.7 : schéma de la partie aérienne de *Mitracarpus scaber*



Figure.8 : *Mitracarpus scaber*

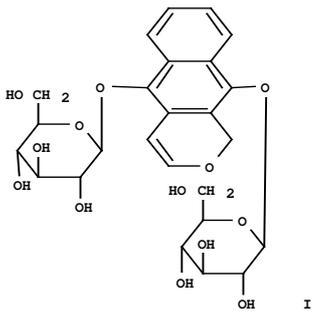
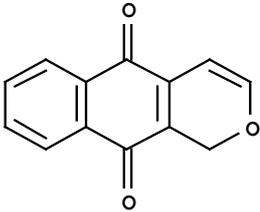
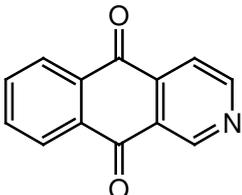
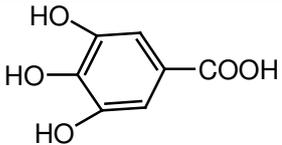
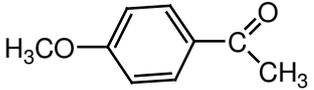
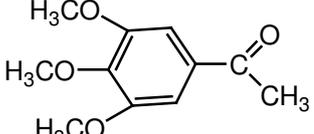
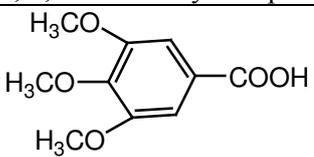
II.2.3. Usages de *Mitracarpus scaber* en médecine traditionnelle africaine

Le macéré aqueux de la plante entière est d'usage topique dans le traitement des dermatoses, soit par une application directe (eczéma), soit sous forme de pommade (H.D.Neuwinger.2000). La feuille est utilisée en friction corporelle pour soigner la fièvre et froissée en friction sur la peau pour traiter des mycoses (Kambu Kabangu. 1990). Le suc de jeunes feuilles est instillé dans les yeux dans les convulsions hyperpyrétiques. Les feuilles ou l'herbe entière font aussi souvent partie de la composition de certaines recettes traditionnelles. Dans les céphalées rebelles, on frotte la tête rasée avec les feuilles de *Pupalia lappacea* et on applique la pulpe de la plante entière de *Mitracarpus scaber* délayée dans du pétrole, en association avec des gousses d'*Aframomum melegueta*. Le décocté aqueux des parties aériennes est aussi administré per os dans les affections hépatiques, les dyspepsies, la constipation et les candidoses bucco-orales et digestives, en association avec les fruits de *Xylopiya aethiopica* (Pr.Adjadohoun et al. 1989). Dans les aménorrhées, on utilise le macéré de pulpe des parties aériennes par voie orale, en association avec des fruits de *Garcinia kola* (Pr Adjadohoun et al; H.E.Neuwinger 2000). Il est aussi utilisé en association avec *Cola cordifolia* pour traiter la lèpre (Dalziel.J.M.1948). Selon cet auteur, la plante est utilisée comme un antidote contre le venin de la vipère par les Haoussa du Nigéria ont reconnu au

décocté de la plante des pouvoirs magiques. La plante de *M. scaber* est utilisée en médecine traditionnelle sénégalaise pour traiter la syphilis (Kambu Kabangu.: Elément de Phytothérapie comparée. 1990, Kerharo J. et al. 1974).

II.2.4. Composition chimique et activités biologiques (travaux antérieurs)

Mitracarpus scaber a fait l'objet de certaines études phytochimiques dans le but d'identifier des substances responsables de ses activités biologiques (Tableau.1). Harouna H. et al en 1995, ont isolé de *Mitracarpus scaber* et établi la structure d'une quinone (pentalongine hydroquinone diglycoside 5,10-dihydroxy-2H-naphtho [2,3-b]-pyran-5,10-β-D-bisglucopyranoside) qu'ils ont baptisé "Harounoside". Pialat et al ont isolé de ses parties aériennes la pentalongine (1H-naphtho [2,3-c] pyran-5,10-dione) naphthoquinonique. Ogoundaini et al ont montré en 1999 que les dérivés naphthoquinoniques identifiées dans *Mitracarpus scaber* ont des activités antibactérienne et antifongique. Okunade et al ont isolé en 1999 de *Mitracarpus scaber* une azaanthraquinone (benz[g]isoquinoléine-5,10-dione) et, ont montré que cette molécule a *in vitro* une activité inhibitrice sur certains agents pathogènes liés au SIDA. Il est aussi reconnu à l'extrait de *Mitracarpus scaber* des propriétés hépatoprotectrices selon les travaux de Gemano M.P. et al en 1999. Une étude phytochimique d'un extrait méthanolique de *Mitracarpus scaber* réalisée par Bisignano et al en 2000, a permis d'identifier la présence d'acide gallique, de 4-méthoxyacétophénone, de 3,4,5-triméthoxyacétophénone, d'acide 3,4,5-triméthoxybenzoïque, de kampférol-3-O-rutinoside, de rutine et de psoralène. Ces derniers auteurs ont aussi montré que l'acide gallique et l'acide 3, 4,5-triméthoxybenzoïque isolés de *Mitracarpus scaber* inhibaient la croissance de *Staphylococcus aureus*, et que la 4-méthoxyacétophénone et la 3,4,5-triméthoxyacétophénone inhibaient efficacement la croissance de *C albicans* (Bisignano et al. 2000). Ils ont aussi signalé que les autres composés isolés (kampférol-3-O-rutinoside, rutine et psoralène) ont également des activités antibactériennes et antimycosiques. De récentes études (Okoli et al. 2003) ont montré que la partie aérienne de *Mitracarpus scaber* a des propriétés anti-inflammatoires. Le dosage de l'huile essentielle a révélé la présence de vingt-six composés (Ekpendu et al en 1993) dont onze acides gras différents. L'acide hexadécanoïque est majoritaire puis suivent dans l'ordre l'acide pentadécanoïque, l'acide (Z)-octadéc-9-énoïque, l'acide tétranoïque, l'acide (ZZ) octadéca-9,12-diénoïque, acide (Z)-hexadec-9-énoïque, l'acide octadécanoïque et l'acide dodecanoïque. Ils ont aussi identifié six esters d'acides gras, deux aldéhydes et six monoterpènes oxygénés.

Auteurs	Structure du composé isolé	Activités
Harouna H. et al en 1995	 <p>pentalongine hydroquinone diglycoside, 5, 10-dihydroxy-2H-naphtho [2,3-b]-pyran-5,10-β-D-bisglucopyranoside</p>	Aucune activité testée
Pialat et al. 1999 ; Ogoundaini et al 1999	 <p>1H-naphtho [2,3-c] pyran-5,10-dione Pentalongine naphthoquinonique</p>	Activité antimicrobienne et antifongique
Okunade et al. 1999	 <p>benz[g]isoquinoléine-5,10-dione (2-azantraquinone)</p>	Activité antimicrobienne sur germes liés au SIDA
Bisignano et al. 2000	 <p>Acide gallique</p>	Inhibe la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i>
Bisignano et al. 2000	 <p>4-méthoxyacétophénone</p>	Inhibe la croissance de <i>C albicans</i>
Bisignano et al. 2000	 <p>3, 4,5-triméthoxyacétophénone</p>	Inhibe la croissance de <i>C albicans</i>
Bisignano et al. 2000		Inhibe la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i>

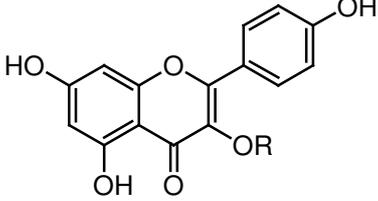
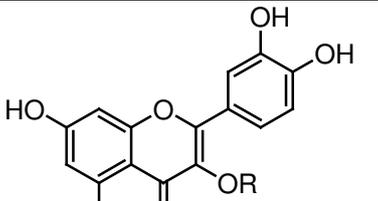
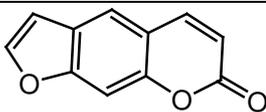
3, 4,5-triméthoxybenzoïque	
Bisignano et al. 2000	 <p>kampférol-3-O-rutinoside (R = Glu 6-Rham)</p>
Bisignano et al. 2000	 <p>Rutine (R = Glu 6-Rham)</p>
Bisignano et al. 2000	 <p>Psoralène</p>

Tableau.1 : résumé des structures des composés isolés de *Mitracarpus scaber* et leur activité antimicrobienne

II.3. Les terpènes et stérols

Au cours de nos études sur les principes actifs du *Mitracarpus scaber*, nous avons identifié et isolé une série de terpènes et stérols qui exprimaient une partie de l'activité antimicrobienne de cette plante sur *D. congolensis*. Des études récentes avaient déjà montré la présence de triterpènes dans le genre *Mitracarpus* : *Mitracarpus villosus* (Ekpendu et al. 2001).

II.3.1. Généralités

Les terpènes sont une famille de composés issus de la polymérisation d'unités isoprènes à 5 atomes de carbone. Malgré leur grande diversité structurale, les terpènes sont synthétisés dans les plantes suivant un nombre restreint de voies de biosynthèse formant ainsi des squelettes au nombre de carbones multiple de 5. Les terpènes sont classés suivant le nombre d'unités isoprènes condensées pour former leur squelette.

Classe	Unités isoprènes	Carbones	Exemples
Hémiterpène	1	5	isoprène, méthylbuténol
Monoterpène	2	10	limonène, menthol, camphre
Sesquiterpène	3	15	artémisine, caryophyllène, gossypol

Diterpène	4	20	taxol, esters de phorbol, ginkgolides
Sesterpène	5	25	ophioboline, lutéone
Triterpène	6	30	squalène, acide oléanolique et ursolique
Tétraterpène	8	40	β -carotène, lycopène
Polyprénol	n	$n \times 5$	caoutchouc naturel

Tableau.2: les différentes classes de terpènes.

Avec plus de 23 000 composés différents, la famille des terpènes est la plus grande famille de composés naturels. Elle offre une immense diversité structurale et chaque année de nombreuses nouvelles molécules sont encore isolées.

Les phytostérols et stéroïdes, bien que directement dérivés des triterpènes, font exception à la règle du nombre de carbone multiple de 5. Leur nombre de carbone est ≤ 27 .

II.3.2. Biogenèse

II.3.2.1. Biosynthèse des unités isoprènes

Pendant de nombreuses années la seule voie de biosynthèse des terpènes connue était la voie de l'acide mévalonique, avec comme point de départ l'acétylCoA. Récemment, Rohmer (1999) a mis en évidence une nouvelle voie de biosynthèse appelée la voie du déoxyxylulose phosphate (Eisenreich, 2001) ou voie non mévalonique (Schuhr, 2001). Ces deux voies de biosynthèse conduisent à la formation du même métabolite, l'isopentényl pyrophosphate (IPP), unité isoprène de base dans la synthèse des terpènes. Ces deux voies sont compartimentées au sein de la cellule. La voie du mévalonate opère essentiellement dans le cytoplasme et les mitochondries alors que la voie du déoxyxylulose phosphate se déroule au niveau des plastides (chloroplastes ou chromoplastes dans la cellule végétale). Cette compartimentation n'est toutefois pas absolue car des échanges de métabolites entre compartiments existent (Rohmer, 1999).

II.3.2.2. La voie du mévalonate

Cette voie de biosynthèse est la voie classique de synthèse des terpènes (y compris les stéroïdes) au sein de tous les organismes vivants, des bactéries aux mammifères.

Les Figures 9a et 9b reprennent les diverses étapes de la biosynthèse de l'isopentényl pyrophosphate à partir de l'acétyl-CoA en passant par l'acide mévalonique. Les principaux enzymes de cette voie sont situés dans le cytoplasme. Ils sont impliqués dans la synthèse de métabolites cytosoliques et particulièrement les triterpènes et les stéroïdes ainsi que quelques sesquiterpènes.

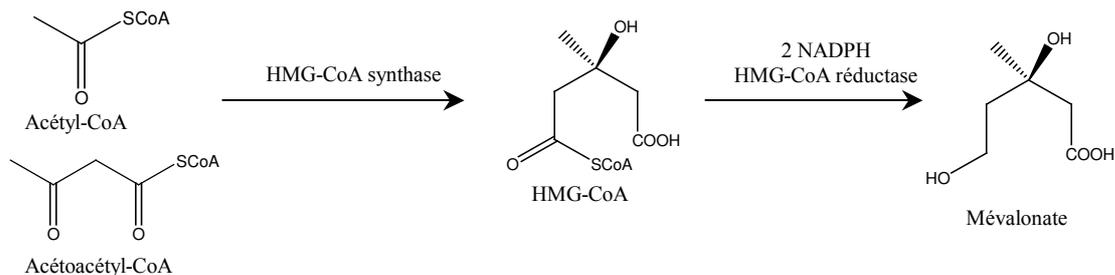


Figure. 9a : synthèse du mévalonate à partir d'acétylcoenzymeA.

Il est intéressant de noter le rôle de l'isoprène synthase (Figure.9b). Cet enzyme est responsable de la synthèse d'un hémiterpène, l'isoprène. L'isoprène est une molécule volatile libérée par les plantes dans l'atmosphère. On estime à 10¹² g la quantité totale d'isoprène libérée par an par les plantes (Wolfertz, 2003). Cette molécule joue un rôle très important dans l'interaction des plantes avec leur environnement. En effet, ce composé est libéré essentiellement durant la journée, lors de la photosynthèse. C'est un puissant capteur de radicaux libres et il permet aux plantes de résister à de fortes doses d'ozone (Loreto, 2001). De plus, il joue un rôle important dans la « thermotolérance » des feuilles en stabilisant la membrane des chloroplastes lors de températures élevées (Kesselmeier, 1999 ; Singaas, 1997). Le méthylbuténol de découverte plus récente joue un rôle identique à celui de l'isoprène (Fisher, 2000).

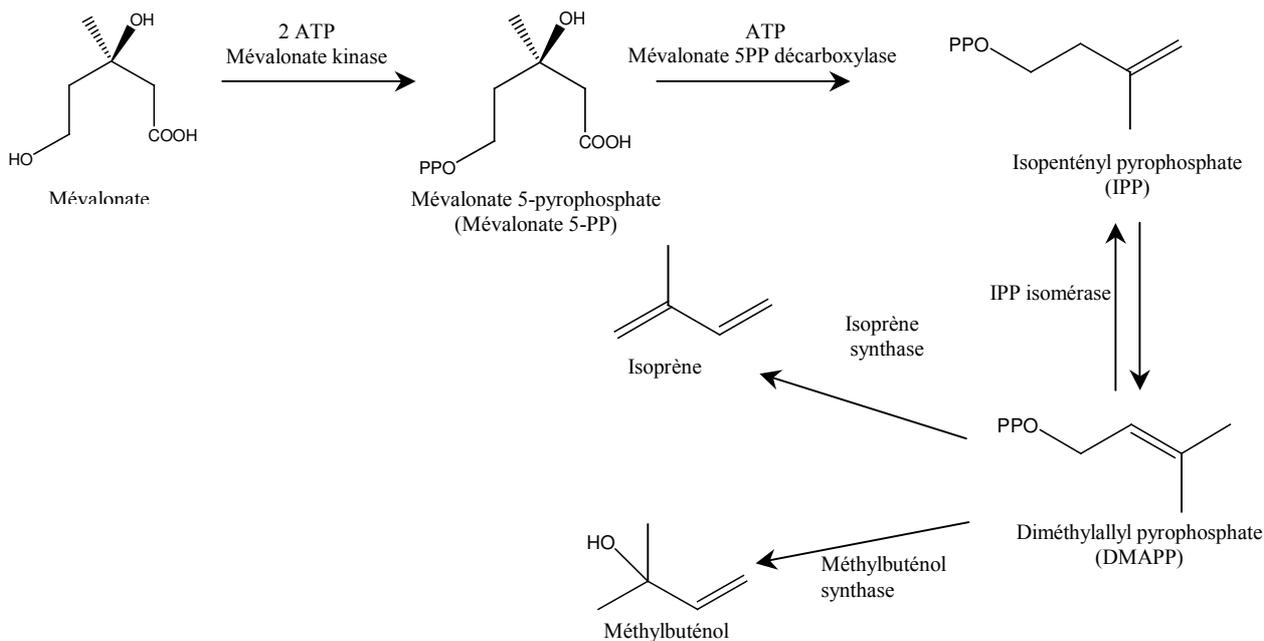


Figure. 9b : synthèse des unités isoprènes à partir du mévalonate.

II.3.2.3. La voie mévalonate-indépendante

Cette voie découverte très récemment possède une multitude de noms : voie mévalonate-indépendante, voie du glycéraldéhyde 3-phosphate/pyruvate, voie du déoxyxylulose (DXP) ou voie du méthylérythritol phosphate (MEP) (Dewick, 2002). L'ensemble des gènes, enzymes et réactions intervenant dans cette voie de biosynthèse ne sont pas encore tous connus. La voie du déoxyxylulose phosphate a été mise en évidence chez les bactéries, les algues, les plantes supérieures et les protozoaires. Il semblerait toutefois que cette voie soit moins souvent impliquée dans la synthèse des terpénoïdes que la voie du mévalonate (Dewick, 2002). La voie mévalonate-indépendante est compartimentée au niveau des plastides des cellules et donne lieu à la synthèse de métabolites tels que les monoterpènes, les diterpènes, les tétraterpènes (caroténoïdes), quelques sesquiterpènes et les chaînes prénylées de la chlorophylle (composant majeur des chloroplastes) (Dewick, 2002). Les plus grosses interrogations sur les différents mécanismes impliqués dans cette voie de biosynthèse se situent au niveau des dernières étapes, lors de la transformation du MECDP en unité isoprène (IPP et DMAPP) (Figure 10). Il semblerait qu'un réarrangement intramoléculaire ait lieu, suivi par une réduction et une déshydratation (Lichtenhaler, 2000). Le rôle de l'IPP isomérase reste énigmatique car il semblerait que l'IPP et le DMAPP puissent être formés indépendamment à partir d'un même intermédiaire (Dewick, 2002). Grâce aux techniques d'incorporation d'intermédiaires marqués au ^{13}C ou au deutérium, il est possible de suivre la voie et les étapes de transformation subies par les métabolites de la plante. La description complète de cette nouvelle voie de biosynthèse ne saurait donc tarder.

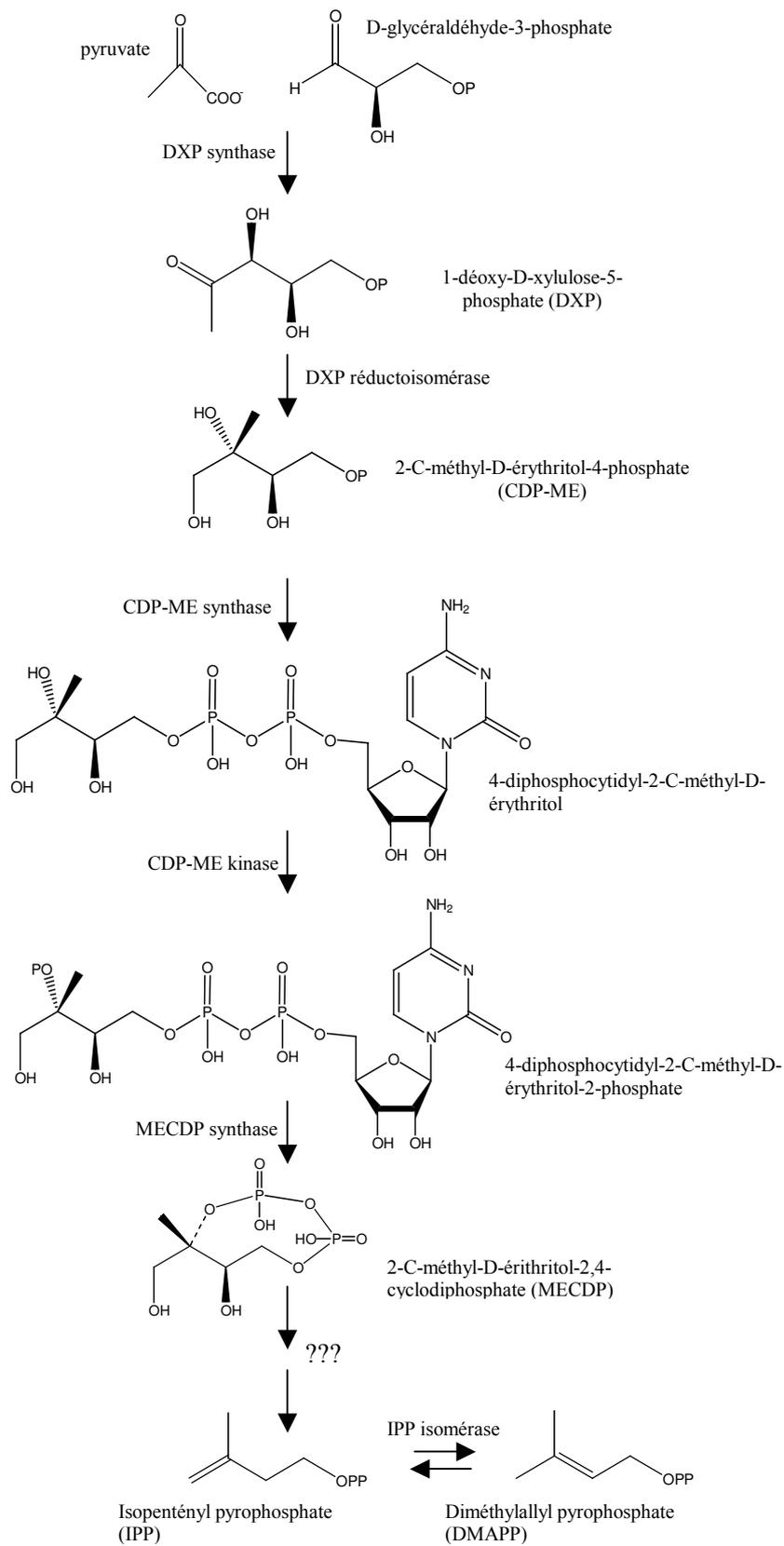


Figure. 10 : voie mévalonate indépendante (Dewick , 2002)

II.4.3. Biosynthèse des triterpènes et stérols à partir des unités isoprènes

II.4.3.1. Introduction

Les triterpènes sont des composés en C₃₀ issus généralement de la cyclisation biosynthétique du 3S-2,3-époxy-2,3-squalène ou plus rarement, du squalène lui même (figure.11). Ils sont presque toujours hydroxylés en 3 (du fait de l'ouverture de l'époxyde).

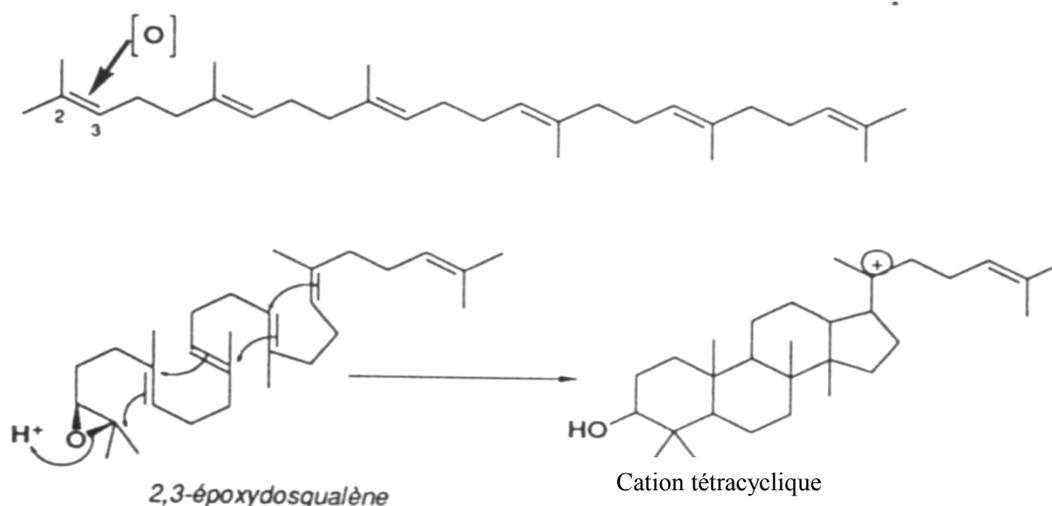


Figure. 11a : formation du 2,3-époxydosqualène et du cation tétracyclique (Bruneton J., 1999)

Les triterpènes malgré la variation des squelettes (4000 composés construits sur plus de 40 squelettes différents), présentent une très forte unité structurale (Chalwood B.V. et al. 1991). Les différences majeures sont d'ordres configurationnels et liés à la conformation adoptée par l'époxydosqualène (ou le squalène) avant la cyclisation (figure. 11a). Le cation issu de cette cyclisation peut ensuite subir une série de déplacements 1,2 de proton et de méthyles rationalisant l'existence des différents squelettes tétra – et pentacycliques qui caractérise le groupe (Figure.11b). La conformation du squalène avant la cyclisation explique la variation des squelettes de base et aussi la configuration α et β de substituants de certains carbones asymétriques (α = substituants dirigés vers le bas du plan médian :cf figure.11b. Et β celui vers le haut soit en avant dans le plan). Les modifications secondaires des triterpènes sont assez limitées : hydroxylations supplémentaires, insaturations, fonctionnalisation des méthyles angulaires, lactonisations et oxydation de groupe méthyle sont les plus usuelles. Le damarane se transforme par ces différentes réactions en une série de triterpènes pentacycliques (Figure. 11c). Une exception est constituée par plusieurs familles des RUTALES qui peuvent remanier profondément le squelette tétracyclique initial : oxydation, ouverture- recyclisation, élimination de la chaîne

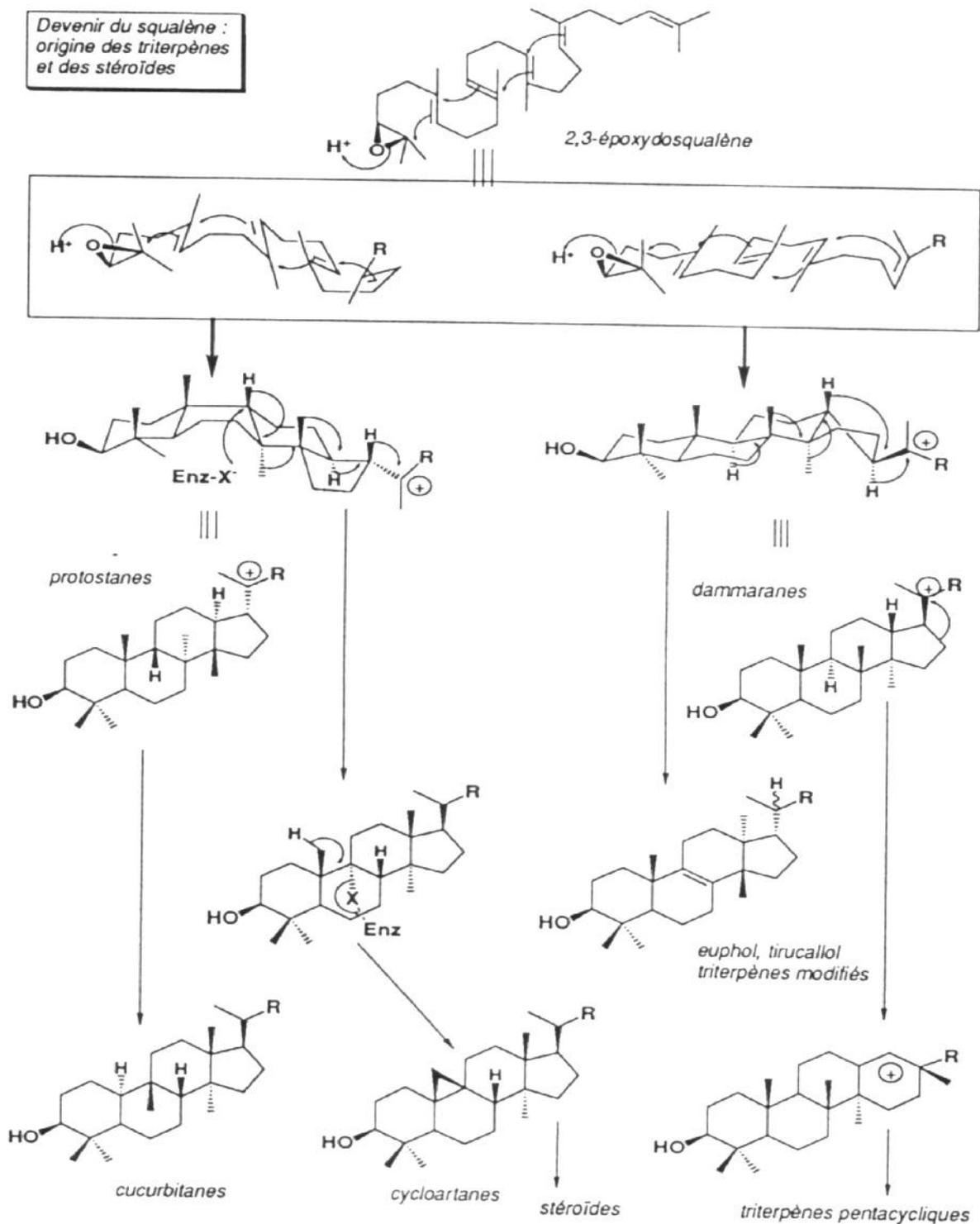


Figure.11b : Cyclisation de l'époxydosqualène et formation des pentacycles et stéroïdes (Bruneton J., 1999)

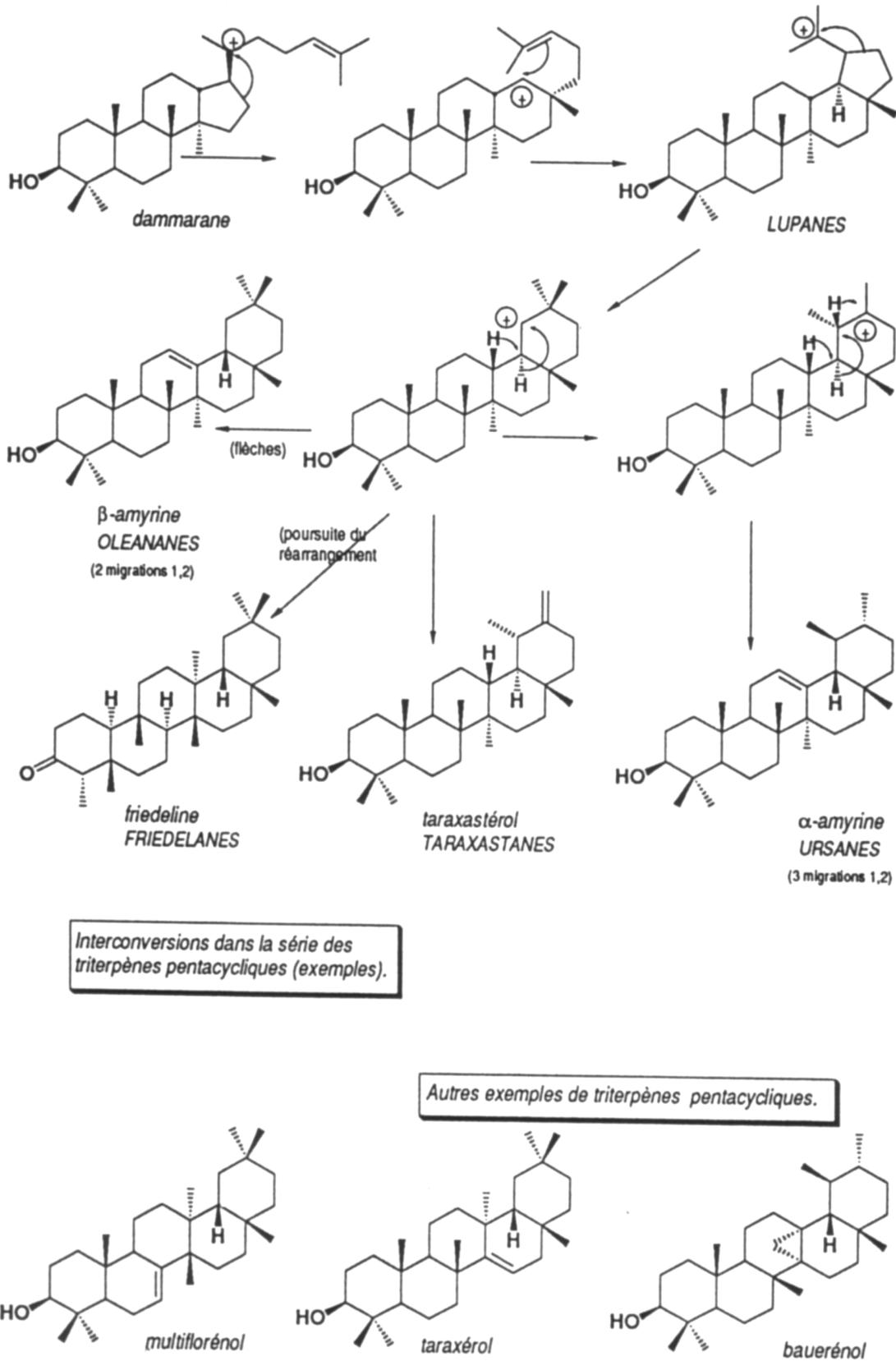


Figure.11c : Formation de structures type pentacyclique (Bruneton J., 1999)

La nomenclature des triterpènes est basée sur la position des groupement greffés sur les squelettes connus en indiquant la configuration absolue α ou β des substituants sur le squelette. Le système de numérotation des carbones des triterpènes suit celui des stérols (figure 12a) avec une addition des méthyles sur les carbones 4 et 14 selon l'exemple montré dans le lanostane (Chalwood B.V. et al. 1991).

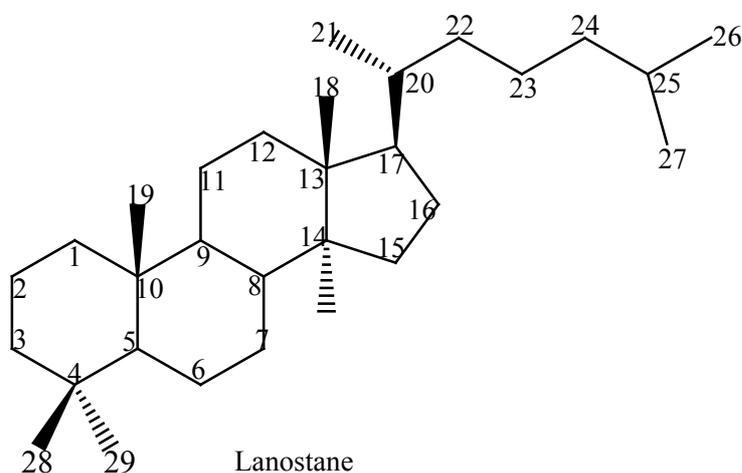


Figure.12a : numérotations des carbones du Lanostane

Au cours des migrations de groupes méthyles qui caractérisent la biosynthèse de plusieurs squelettes triterpéniques, les méthyles gardent généralement leur numéro. Les triterpènes pentacycliques suivent la numérotations des oléanes pour les pentacycliques aux cycles hexaniques et des hopanes pour ceux avec un cycle pentanique (Figure.14b), elle même dérivée de celle de lanostane.

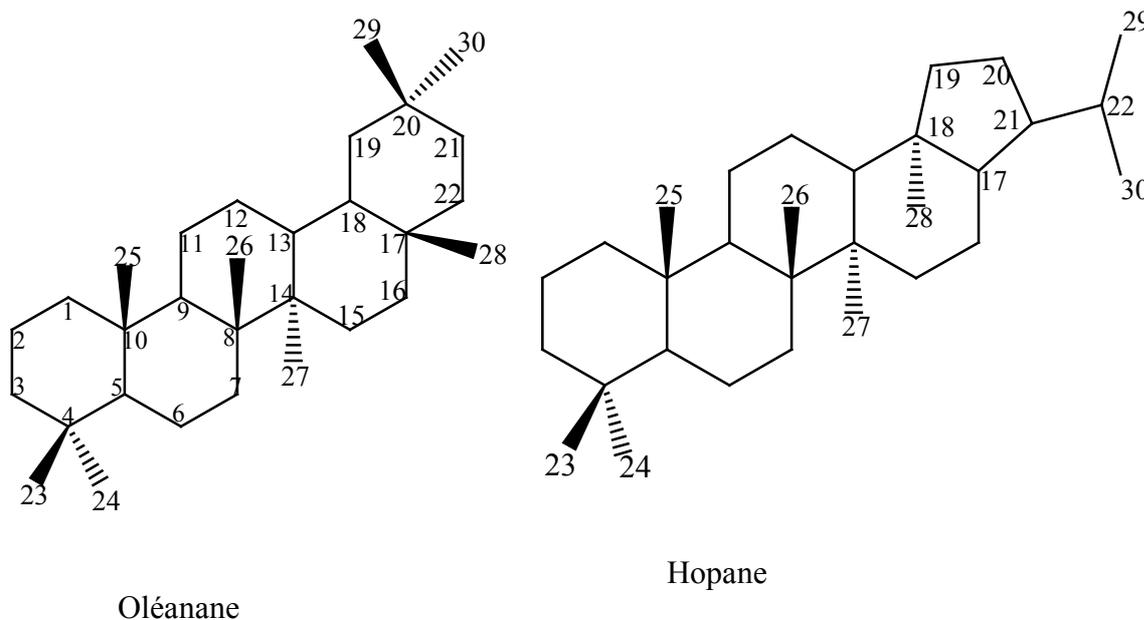
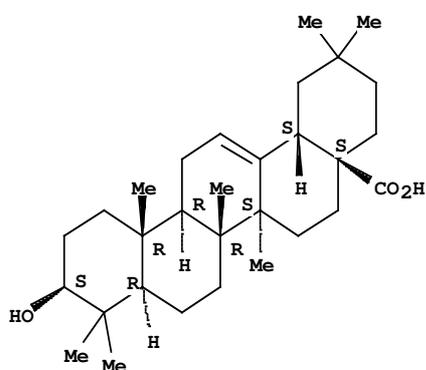


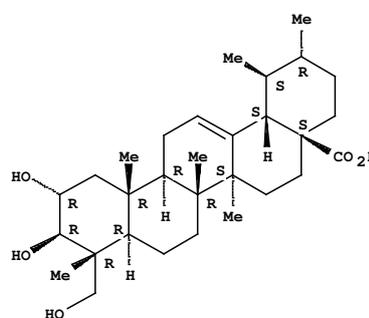
Figure.12b : numérotation des carbones des squelettes oléanane et Hopane

II.4.3.2. Activités biologiques de quelques acides triterpéniques

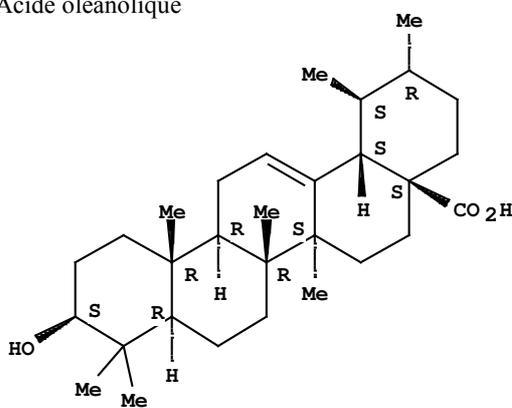
Les triterpènes se présentent fréquemment sous forme d'hétérosides (saponosides) dans les aliments et les plantes. Les acides triterpéniques ont des squelettes triterpéniques généralement pentacycliques (Figure.13) portant une fonction carboxylique suite à une oxydation secondaire (Bruneton J., 1999). Les plus étudiés sont ceux de la série des ursanes et des oléananes et sont doués d'un large spectre d'activités biologiques (Jie Liu. J. 1995) : les acides oléanolique et ursolique sont à la fois hépatoprotecteurs, anti-inflammatoires, antihyperlipidemiants, anti tumeurs, cicatrisants, antimicrobiens et antiparasitaires. Certaines de ces propriétés sont partagées par d'autres acides triterpéniques (Tableau.3).



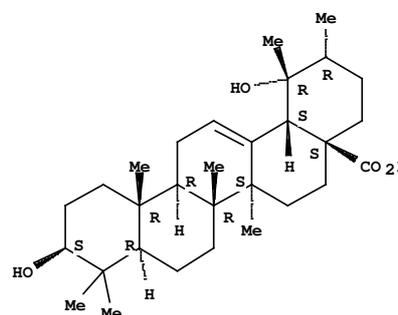
I-Acide oléanolique



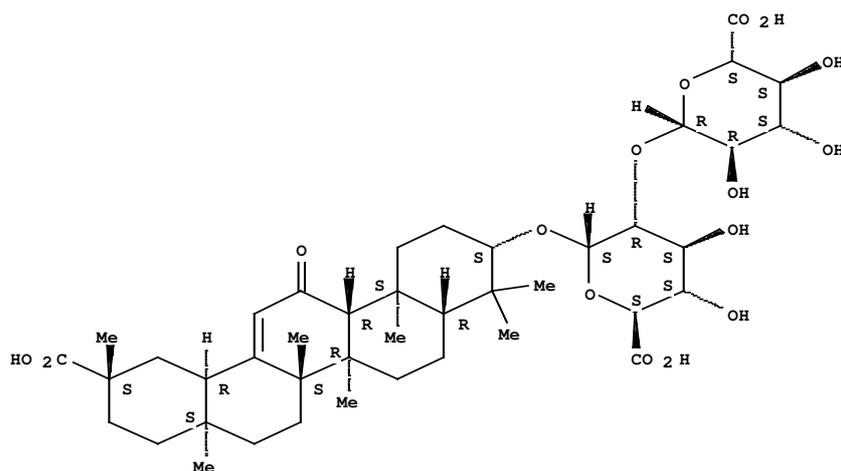
III- Acide Pomolique



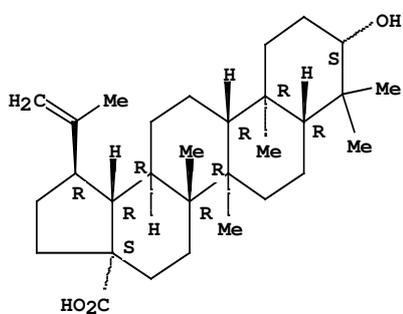
II- Acide ursolique



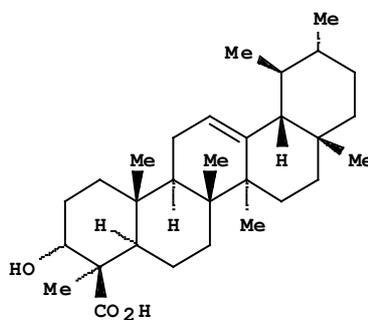
V- Acide asiatique



IV- Acide Glycyrrhizique



VI-Acide betulinique



VII- Acide boswellique

I

Figure.12 : structure de quelques acides triterpéniques

Introduction

Activités	Types d'acides triterpéniques	Modes d'actions	Références
Antidiabétique	Acide oléanolique (I)	- Hypoglycémiant	Matsuda H, et al. 1998; Yoshikawa M, et al. 1996; Yoshikawa M, et al. 1996; Vasilenko, et al. 1982
Anti-HIV	Acide oléanolique (I), acide pomolique (III), acide glycyrrhizique (IV)	Inhibition de la duplication virale	Kashiwada Y, et al. 1998, Batina, et al. 2003
Anti-hépatotoxique	Acide oléanolique (I) et ursolique (II), acide glycyrrhizique (IV)	<ul style="list-style-type: none"> - Protection contre l'hépatotoxicité tétrachlorure de carbone - Protection contre la peroxydation des lipides et la toxicité des adriamycines - Contre les substances chimiques qui induisent la nécrose hépatique, inhibition de la méthallothionine , prévention contre la fibrose, stimulation de la régénérescence des cellules hépatiques 	<p>Liu Y, et al. 1998 ; Liu J, et al. 1995, Jie Liu. J. 1995</p> <p>Jie Liu. J. 1994</p> <p>Ma, et al. 1986; Lin, et al . 1988 ; Gan, et al. 1988 ; Ohigashi, et al.1988 ; Ohigashi, et al. 1986 ; Batina, et al. 2003 ; Lin, et al. 1987, Ma, et al.1986, Zhang, et al.1996, Zhang, et al. 1984</p>
Anti - ulcère	Acide oléanolique (I), glycyrrhizique (IV) et ursolique (II)	Induction de la cicatrisation et en plus un effet anti ulcer pour le IV	Farina C, et al. 1998, Batina, et al. 2003
Inhibition enzymatique	<ul style="list-style-type: none"> - I, II - asiatique (V) 	<ul style="list-style-type: none"> - Suppression de l'activité de l'oxyde nitrique oxydase (iNOS) et la cyclooxygénase (COX-2) - Inhibition de la sécrétion de l'histamine (inflammation) - Inhibition de l'ADN ligase I - Augmente l'action de léffet inhibiteur de la cholestase sur l'ATPase des canaux membranaires 	<p>Suh N, et al. 1998 ; Ho JY, et al. 2001</p> <p>Tan GT, et al. 1996</p> <p>Tsuruga, et al. 1991</p>

Introduction

Anti tumoral	-Acide oléanolique (I) - Acide ursolique (II) - acide glycyrrhizique (IV) - acide betulinique (VI)	- Inhibition de la croissance des tumeurs - Cytotoxique pour les cellules de la leucémie (anti-leucémique) - Induction <i>in vitro</i> de l'apoptose dans les cellules B - Inhibe la prolifération des cellules cancéreuses	Hsu Hy, et al. 1997, Batina, et al. 2003 Hsue-YH, et al. 1997 Lee, et al. 1994 Pedersen, et al. 2002 Zuc, et al. 2202
Anti - chocs anaphylactiques	Acide oléanolique (I)	Antagoniste dans les chocs anaphylactiques	Zhang LR, et al. 1995
Anti – inflammatoire	- I, II et dérivés hydroxylés, acide glycyrrhizique (IV) et analogues, acide boswellique (VII) et dérivés	- anti – œdémateux - activité anti - angiogénique - Anti-inflammation générale (inhibition d'enzymes qui interviennent dans les réactions inflammatoires précitées)	K Ziterl-Eglseer, et al.1997 Hyung-HS, et al. 1996 Huang, et al. 1994. Kosuge, et al.1985 ; Takagi, et al. 1980 ; Batina, et al. 2003 ; Krohn, et al. 2001
Anti fongique	I, II, acide glycyrrhizique (IV) et analogue	- Inhibition de croissance des champignons	Favel, et al. 1994, Batina, et al. 2003
Antimicrobienne	I, II	- Inhibition de croissance - Inhibition de la mutagenèse bactérienne	Colins, et al. 1987 Young, et al. 1994
Antihyperlipidémiant	I, II	-Prévention contre athérosclérose expérimentale - Réduction de taux de cholestérol sanguin - Diminution du taux de protéines LDL - Fait croître le taux de protéines HDL	- Parvente'eva, et al.1979 - Vasilenko, et al. 1982 - Vasilenko, et al. 1981 - Ma, et al. 1986
Antiparasitaire	I, II	- Antitrypanosomal (<i>T.cruzi</i>) - antileishmania	Abbe, et al. 2002 - Tan, et al. 2002
Activité spasmolytique	(VIII) acide eucalyptanoïque	- Blocage de l'influx de calcium	- Begum, et al. 2002

NB :

- CDDO : 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oïque
- angéloyloxyoléanolique: dérivé de l'acide oléanolique

Tableau.3 : Résumé des activités de quelques acides triterpéniques pentacycliques

Identification, purification, isolement, quantifications de principes actifs de *Mitracarpus scaber* et évaluation de leurs activités antimicrobiennes sur *Dermatophilus congolensis*.

III. ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE

III. ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE.

III.1. Introduction

Selon les travaux antérieurs, c'est l'extrait éthanolique de *M. scaber* qui a présenté les meilleures activités *in vivo* sur la dermatophiles bovine (Ali et al. 2002) par rapport aux autres plantes testées. Récemment, les mêmes auteurs ont montré que l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *M. scaber* était actif sur le *D. congolensis* (Ali et al. 2003). Le principal but de cette partie étant d'identifier et de purifier les composés actifs de cet extrait, il était avant tout nécessaire de faire un screening phytochimique et une évaluation de l'activité antimicrobienne sur le *D. congolensis* de différentes fractions de cet extrait obtenues avec des solvants de polarités croissantes. Ceci permettra d'avoir une idée générale sur la polarité des composés actifs de l'extrait brut. Nous utiliserons ensuite ces informations pour déterminer les systèmes de solvants pour les différents fractionnements bio-guidés de l'extrait éthanolique. Le fractionnement bio-guidé est une suite de fractionnements à partir de l'extrait brut au cours desquels la ou les fraction(s) les plus active(s) est ou sont ensuite fractionnée(s) jusqu'à l'obtention de composés purs. Le fractionnement a été guidé dans ce travail par l'analyse des activités antimicrobiennes sur *D. congolensis* des fractions. Ce procédé a l'avantage d'orienter l'étude phytochimique vers des composés ayant l'activité biologique voulue.

III.2. Evaluation in vitro de l'activité antimicrobienne et identification préliminaire (par CCM) de composés de l'extrait éthanolique de *M. scaber*

III.2.1. Introduction

La première étape d'une étude phytochimique est de connaître les grandes classes de composés du métabolisme secondaire que contient la plante à étudier. Il s'agira ici de faire le screening phytochimique de la plante et des fractionnements sur colonne à pression atmosphérique (CPA) et liquide-liquide de l'extrait éthanolique avec des solvants de différentes polarités. Une comparaison des activités antimicrobiennes des différentes fractions CPA et des fractions liquide-liquide ne permettra pas certes de déterminer la nature et la polarité de tous les composés actifs mais donnera des informations pour les fractionnements futurs en vue de l'isolement et l'identification de composés actifs. Pour ce travail, nous avons d'abord déterminé une méthode d'extraction optimale.

III.2.2. Matériels et méthodes

III.2.2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est la partie aérienne de *Mitracarpus scaber* récoltée au sud du Bénin. La plante collectée dans les environs de Cotonou et Abomey-Calavi, a été identifiée et authentifiée par l'Herbier National du Bénin, où un spécimen a été déposé (N° AA.6252/HLB). Elle a été ensuite séchée dans une chambre à l'abri de la lumière pendant 5 jours (durant lesquels elle a été retournée chaque jour) à une température ambiante. Le séchage a continué à une température de 50°C pendant 48H. Enfin, elle a été minutieusement réduite en poudre par un pulvérisateur (European Pharmacopeia, 2002) puis stockée dans un conservateur à température ambiante.

III.2.2.2. Préparation d'extraits bruts

- **Macération** : 40g de poudre de plante sont mis en macération pendant 48 heures dans le solvant.
- **Percolation** : Cette extraction a pour but d'extraire la majeure partie des principes solubilisables contenus dans une drogue végétale ou animale par un épuisement progressif

de cette drogue au moyen de solvants appropriés. Cette opération consiste à faire passer le solvant lentement et régulièrement à travers la drogue convenablement pulvérisée et disposée en couche suffisamment épaisse (A. Denoël, 1971). 40g de poudre sont mis en macération de plante pendant 48 heures dans l'éthanol puis soumis à une percolation à débit de 1ml/min jusqu'à épuisement (figure.15).

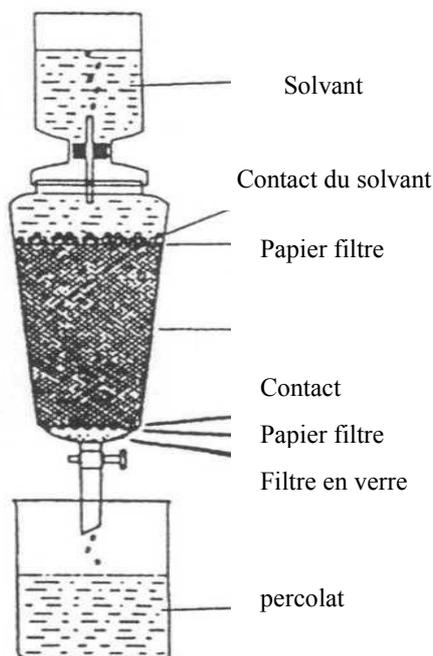


Figure .15 : schéma d'un percolateur.

- **Extraction Soxhlet** : C'est une méthode d'extraction par percolation utilisant un appareil de Soxhlet (Figure.16). Le solvant sous l'effet de la chaleur distille et est condensé au niveau du réfrigérant. Les gouttelettes formées retombent dans une ampoule où se trouve une cartouche en cellulose contenant la drogue. Le solvant extrait les composés solubles puis retourne dans le ballon via un système de siphon. Le solvant chauffé distille à nouveau et le cycle recommence. Ce système donne une macération répétée avec renouvellement de solvant, mais permet aussi d'obtenir les portions de composés solubles de la plante dans un petit volume de solvant. Le

principal risque est la perte des composés thermolabiles. 40g de poudre ont été extraits par 500ml d'éthanol jusqu'à observation de solvant incolore dans le siphon.

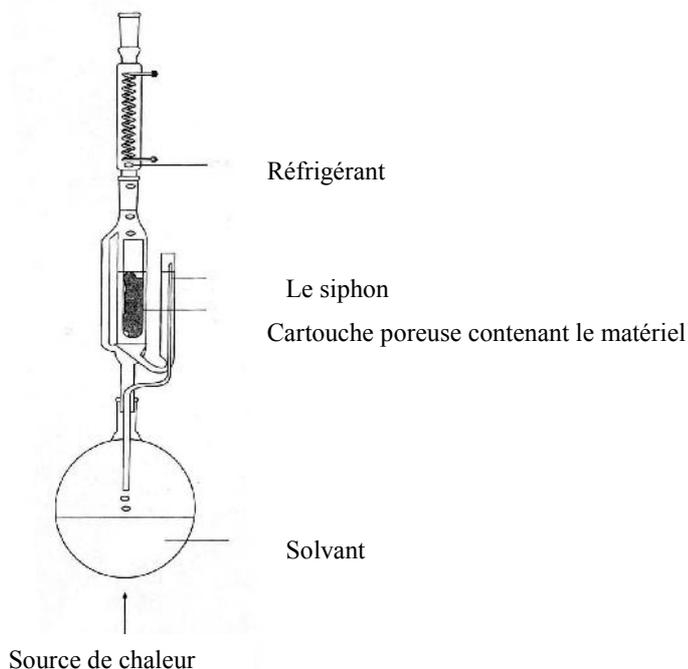


Figure.16 : schéma d'un soxhlet

III.2.2.3. Criblage phytochimique

La première étape dans l'analyse de la composition chimique d'une plante consiste à déterminer ses principales classes de métabolites secondaires. Cette information est essentielle pour la sélection de la méthode d'extraction et des différentes méthodes chromatographiques à appliquer. De plus, la comparaison des résultats du criblage aux données chimiotaxonomiques sur les plantes de ce genre peut nous donner des précisions sur le type de principes actifs rencontrés.

Le criblage phytochimique est une analyse chimique qualitative basée sur des réactions de colorations ou de précipitations plus ou moins spécifiques à chaque classe de principes actifs (Tableau.3). Le détail de ces tests ainsi que la composition des réactifs est repris dans l'ouvrage de P.J Houghton : "*Laboratory handbook for the fractionnation of natural extracts*" (Houghton, 1998).

Classes de principe actif	Réactif spécifique et Réaction
<i>Alcaloïdes</i>	-Dragendorff (iodobismuthate de potassium) → précipité orange -Mayer (iodomercurate de potassium) → précipité jaunâtre
Tanins	-FeCl ₃ → coloration bleu-foncée
Flavonoïdes	-Shinoda (réaction à la cyanidine) → coloration orange-rouge
Anthocyanes	-Coloration rouge en milieu acide et bleue violacée en milieu alcalin
Leucoanthocyanes	-Alcool chlorhydrique (EtOH 50°/HCl _{cc} 2:1) → coloration rouge cerise
Dérivés quinoniques	-Bornträger (réaction entre cycles quinoniques en milieu NH ₄ OH) → coloration rouge violacée
Saponosides	-Détermination de l'indice mousse (positif si IM>100)
Stéroïdes et Terpènes	-Liebermann-Burchard (Anhydride acétique-H ₂ SO _{4cc} 50:1) → coloration violette -Kedde (acide dinitrobenzoïque 1% dans l'EtOH + NaOH 1N 1:1) → coloration rouge pourpre (cardénolides)
Dérivés cyanogénétiques	-Guignard (Papier imprégné d'acide picrique) → coloration marron
Mucilages	-Etude de la viscosité des infusés et décoctés
Huiles essentielles	-Entraînement à la vapeur -Odorat

Tableau 3. Le criblage phytochimique.

III.2.2. 4. Analyse CCM

Avant de poursuivre les purifications de l'extrait éthanolique, il était essentiel de développer une méthode d'analyse simple et rapide pour étudier la composition des différents extraits et fractions de la plante. La technique la plus fréquemment utilisée pour l'analyse des extraits de plante est la chromatographie sur couche mince (CCM). Cette technique offre l'avantage de sa rapidité, de son faible coût et de permet une visualisation directe de la séparation des composés (Figure. 17).

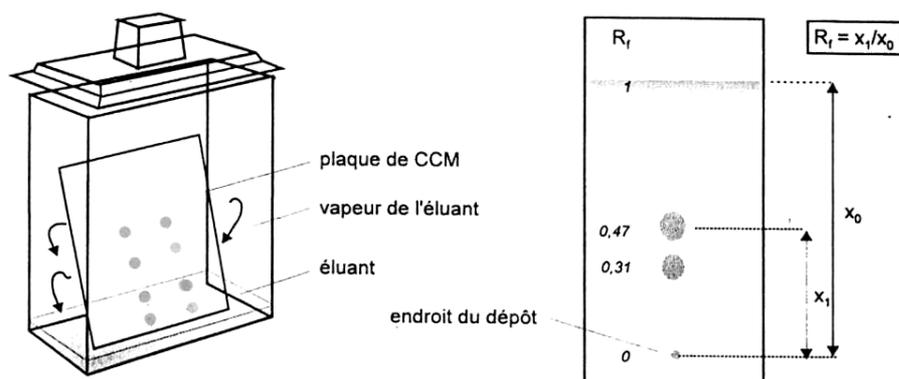


Figure.17 : schéma d'une cuve de CCM

Les fractions et extraits seront analysés par CCM afin d'étudier leur composition et de mettre en évidence les principales classes de principes actifs à l'aide de réactifs plus ou moins spécifiques.

Les analyses par CCM remplaceront les détecteurs à la sortie des colonnes et les fractions seront rassemblées en fonction de leur profil chromatographique.

Finalement, l'analyse par CCM des produits isolés nous donnera une indication sur leur pureté.

L'extrait éthanolique est un extrait susceptible de contenir différents types de molécules : terpènes, stéroïdes, saponosides, flavonoïdes, hétérosides, composés phénoliques etc. Pour certains d'entre eux, il existe relativement peu de révélateurs spécifiques en CCM. Nous avons donc décidé d'utiliser des révélateurs relativement universels tels que l'anisaldéhyde sulfurique, la vanilline sulfurique pour les composés terpéniques et autres molécules proches. Pour identifier les composés polaires, nous avons utilisé le Réactif de NE/PEG (Natural product/ polyethylene glycol reagent) et le $FeCl_3$ (Wagner H et Bladt. S., 1995). Ce révélateur est assez spécifique des dérivés phénoliques et acides phénoliques. Pour identifier les composés comportant un azote (les alcaloïdes), nous avons utilisé le réactif de Dragendroff (Wagner H et Bladt S., 1995). Pour les autres composés, nous avons utilisé l'acide sulfurique à 10%, suivi d'un chauffage.

Les plaques utilisées sont des plaques de silice normale et la détection des bandes des différents composés s'est faite d'abord par visualisation directe des bandes colorées, ensuite sous UV (254 et 366 nm) et finalement à l'aide des révélateurs précités.

Pour chaque échantillon analysé, 10 μ l d'une solution à 5 mg/ml sont déposés sur la plaque. La méthode la plus fréquente était celle impliquant l'utilisation de plaques de silice normale avec comme éluant un mélange de Toluène-Acétate d'éthyle-Méthanol (80:18:2) et comme révélateur,

l'anisaldéhyde sulfurique. Cet éluant est couramment utilisé pour la séparation des terpènes et stéroïdes.

D'autres méthodes ont été développées pour l'analyse de produits plus polaires ou pour l'analyse d'une classe spécifique de principes actifs. La liste des différentes méthodes de CCM utilisées au cours de ce travail est reprise ci-dessous.

- Plaques :
 - TLC Silica gel 60 F_{254S} Merck[®].
 - HPTLC Silica gel 60 F_{254S} Merck[®].
 - RP-8 F_{254S} Merck[®].
 - RP-18 F_{254S} Merck[®].
 - Cellulose F Merck[®].
 - Alumine 60 F_{254S} Merck[®] neutre (type E).
 - Préparative Silicagel sans indicateur de fluorescence (2 mm) Merck[®].
- Phases mobiles :
 - Composés apolaires : Toluène-Acétate d'éthyle -Méthanol (80-18-2) (système 1)
 - *Composés polaires : Acétone – butanone – acide formique (10 - 7 – 1) (Système 2)
 - *Acétate d'éthyle – acide formique – eau (6-1-1) (système 3)
 - *Acétate d'éthyle- Acide acétique glacial- acide formique- eau (100-11-11-26) (Système 4)
 - Alcaloïdes : *Chloroforme- Méthanol -Ammoniac 10 % (80-40-1.5) (système 5)
 - *Toluène-Acétate d'éthyle - Diéthylamine (70-20-10) (système 6)
 - * Hexane-Acétate d'éthyle- Méthanol (10-5-2) ou (10-5-1) (système 7, 8)
 - * Hexane-Acétate d'éthyle (10-5) (système 9)
 - * Benzène- Acétate d'éthyle- Acide formique (36-12-5) (système 10)
- Révélateurs :
 - Anisaldéhyde sulfurique :
 - ♦ Préparation : EtOH *p*-anisaldéhyde-Acide Acétique (90-5-1) + 5% H₂SO₄ ajouté extemporanément. Après pulvérisation, chauffage 5 min à 105°C.
 - ♦ Détection : Spots colorés (mauve-rose-bleu) ou sous UV.

- ♦ Classes de molécules mise en évidence : terpènes, stéroïdes, saponosides ...

- Acide sulfurique 10 % :
- ♦ Préparation : 10 ml H₂SO₄ dans 80 ml d'eau et 20 ml d'éthanol. Après pulvérisation, chauffage 5 min à 105°C.
- ♦ Détection : Spots colorés (noir-brun).
- ♦ Classes de molécules mise en évidence: la plupart des composés organiques

- Vanilline sulfurique :
- ♦ Préparation : Vanilline (1% dans EtOH) + H₂SO₄ (10 % dans EtOH) en mélange 1:1. Après pulvérisation, chauffage 5 min à 105°C.
- ♦ Détection : Spots colorés (mauve-rose-bleu) ou sous UV
- ♦ Classes de molécules mise en évidence : terpènes, stéroïdes, saponosides, tanin condensés ...

- Réactif de Dragendorff
- ♦ Préparation : Solution a : 0.85 g de nitrate de bismuth dans 10 ml d'ac. acétique et 40 ml d'eau. Solution b : 8 g d'iodure de potassium dans 30 ml d'eau. Solution stock : Solution a-Solution b (1:1). Solution de pulvérisation : 1 ml de solution stock + 2 ml d'ac. acétique + 10 ml d'eau.
- ♦ Détection : Spots jaunâtres
- ♦ Classes de molécules mise en évidence : alcaloïdes

- Réactif de NP/PEG (Natural product/ polyethylene glycol reagent)
- ♦ Préparation : mélange de 5% de polyéthylène glycol 600 dans de l'éthanol et de réactif de Neu (dissoudre 1g de diphénylborate de 2-aminoéthyle) dans 100ml de méthanol à 50 :50
- ♦ Détection : spot Jaune à orange ou bleu, UV 365nm
- ♦ Classes de molécules en évidence : flavonoïdes et acides phénols

- Réactif au FeCl_3
- ◆ Préparation : 10% d'une solution aqueuse de FeCl_3
- ◆ Détection : spot Jaune à orange ou violet à vert dans le visible, UV 365nm
- ◆ Classes de molécules mises en évidence : flavonoïdes et acides phénols et tanins

III.2.2.5. Fractionnements

III.2.2.5.1. Fractionnement liquide-liquide

C'est une méthode de séparation des composés d'un mélange basée sur leur coefficient de partage entre liquides non miscibles. C'est un principe largement utilisé actuellement surtout par les appareils de HSCCC (High Speed Counter-Current Chromatography). Pour notre travail, nous avons fait une séparation par décantation entre eau - méthanol (50 -50) et le dichlorométhane dans une ampoule à décanter (figure .18). L'extrait éthanolique est dissout dans un mélange eau-méthanol puis extrait 3 fois avec 50ml d'un solvant apolaire.

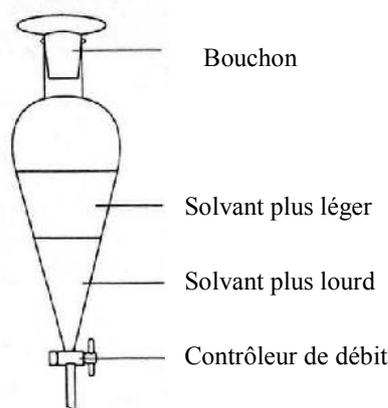


Figure.18 : schéma d'une ampoule.

III.2.2.5.2. Fractionnement sur colonne de silice à pression atmosphérique

La chromatographie sur colonne de silice en phase normale est une méthode de séparation des composés d'un mélange en fonction de leurs affinités pour la silice en utilisant un gradient de solvants de polarité croissante. Cette méthode est moins efficace que la MPLC ou l'HPLC car elle ne permet pas l'utilisation de phase stationnaire de fine granulométrie. C'est cependant une étape très importante dans les fractionnements bio-guidés car elle permet de réaliser des

fractionnements grossiers et de repérer dans quelles fractions on retrouve les composés les plus actifs.

*** Préparation de la colonne et fractionnement de l'échantillon**

- La phase stationnaire est de la silice 0,062mm-0,2mm conditionnée par du méthanol (soit 100g de silice dans 300ml de MeOH pendant 24h) coulée dans une colonne de verre de 2,2cm de diamètre sur 20cm de hauteur.

- Nous avons déposé 1,5 g d'extrait sec éthanolique solubilisé dans 5ml de méthanol sur la colonne.

- Nous avons passé sur la colonne 150ml de chaque phase mobile dans l'ordre suivant:

1-) éther de pétrole ; 2-) éther de pétrole- toluène (50-50) ; 3-) dichlorométhane ;
4-) dichlorométhane - acétate d'éthyle (50 -50) ; 5-) acétate d'éthyle ; 6-) dichlorométhane-
acétone (50 -50) ; 7-) acétone ; 8-) acétone- méthanol (50 -50) ; 9-) méthanol.

III.2.2.6 Tests biologiques

III.2.2.6.1. Test antimicrobien *in vitro*

- Matériel biologique

Tous nos tests antimicrobiens sont réalisés dans le laboratoire de l'Unité de Microbiologie de l'UCL. Les souches de *Dermatophilus congolensis* (1° souche: 43037; 2° souche: 44180 = ATCC 14637 souche type) utilisées sont achetées chez DSMZ (Deutsche Sammlung Van Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) et identifiées (test de fermentation et séquençage par PCR) par le laboratoire de microbiologie de l'UCL.

*** Préparation des dilutions de fractions**

Les dilutions des extraits sont réalisées dans un mélange (50%-50%) diméthylsulfoxyde (DMSO) -eau de manière à ce que la concentration en DMSO ne dépasse pas 3% du milieu de culture. De plus un témoin DMSO seul à la même concentration est réalisé à chaque expérience.

Les concentrations des extraits testés sont résumées dans le tableau.4 :

Concentrations des extraits dans le DMSO-EAU (50%-50%)	Concentrations d'extraits par boîtes de 20ml de gélose (en µg/ml de milieu)
20000µg/ml	1000µg/ml
10000µg/ml	500µg/ml
5000µg/ml	250µg/ml
2500µg/ml	125µg/ml
1250µg/ml	62,5µg/ml
625µg/ml	31µg/ml
310µg/ml	16µg/ml
155µg/ml	8µg/ml
77.5µg/ml	4µg/ml
39µg/ml	2µg/ml

Tableau.4 : dilution d'extraits et concentration dans les boîtesensemencées.

* Préparation des dilutions du témoin d'antibiotique

Nous avons utilisé la tétracycline comme témoin antibiotique (Sigma art T3383 lot 89H0915) Des dilutions à 1280, 640, 320, 160, 80, 40, 20 à 10µg/ml ont été réalisées dans du sérum physiologique.

1ml de chacune des dilutions a été homogénéisé avec 19ml de milieu Mueller-Hinton agar (Mueller-Hinton agar 2 Biomérieux art 51075). Les concentrations finales en antibiotique sont : 64 ; 32 ; 16 ; 8 ; 4 ; 2 ; 1 ; 0.5 µg/ml de milieu

* Préparation des boîtes

Les cultures proprement dites s'effectuent dans du Muller-Hinton agar (Mueller-Hinton agar 2 Biomérieux art 51075) préparé à 38g/ml, autoclavé et maintenu à une température de 45°C. Dans chaque boîte convenablement notée, 1ml de chaque dilution d'extraits, de témoin ou de molécules pures (voir préparation de dilutions) est déposé ; puis on complète avec 19ml de milieu liquide (à 45°C) qu'on homogénéise. Après durcissement de la gélose, les boîtes sont séchées pendant une nuit à 37°C.

- Ensemencement et détermination de CMI

* Mise en culture des souches de *Dermatophilus congolensis*

Les germes des souches prélevés du stock ont été repris par +/-1ml de milieu BH (Brain heart ou bouillon nutritif enrichi au trypton Soja Broth - Oxoid). Des boîtes de gélose au sang (Columbia au sang de Mouton 5%, Becton Dickinson) sont ensemencées avec ces homogénats obtenus par étalement en stries puis mises à 37°C. On réalise ensuite des cultures sur gélose inclinée d'où seront prélevées des colonies pour l'ensemencement quotidien des bouillons Nutrient broth.

* Détermination des CMI

Les CMI sont déterminées par la méthode de dilution dans l'Agar (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1990).

A partir des bouillons ensemencés la veille, des dilutions des souches sont réalisées dans du sérum physiologique, afin d'obtenir +/-10⁷ germes/ml.

Les boîtes contenant 20ml de milieu de culture et les différentes concentrations d'extraits, d'antibiotique, de molécules pures ou de solvant sont ensemencées par passage dans un multipoint inoculateur A400Denley (1µl/spot soit 10⁴germes), puis placées 4 jours à 37°C.

La lecture est effectuée au terme de la quatrième journée d'incubation par observation visuelle des souches.

L'activité antimicrobienne est exprimée en CMI : Concentration Minimale Inhibitrice, c'est à dire la concentration minimale testée inhibant complètement la croissance des microorganismes. Elle a été déterminée visuellement par observation de la croissance ou de l'absence des souches de *Dermatophilus congolensis* quand elles sont inoculées sur des géloses contenant différentes concentrations d'extraits de *Mitracarpus scaber* dilués dans un mélange (50%-50%) diméthylsulfoxyde (DMSO) - eau.

III.2.2.6.2. Test de cytotoxicité

* DESCRIPTION DU TEST

Les solutions stocks sont préparées dans le DMSO à une concentration de 10 mg/ml et conservées à 4°C.

Nous avons testé l'activité cytotoxique des extraits bruts sur des cellules cancéreuses du col de l'utérus (HeLa) et des cellules J-774 : macrophages de souris et cellules de la peau de la souris. Le test utilisé est un test MTT basé sur la réduction du sel de tétrazolium (MTT) en diformazan par les déshydrogénases des cellules vivantes. La quantité de diformazan (de couleur mauve) ainsi formée est directement proportionnelle à l'activité métabolique des cellules et donne donc une information sur la survie et la multiplication des cellules. Le test est réalisé dans des plaques de microtitration à 96-puits. 5000 cellules HeLa ou J-774 sontensemencées dans chaque puit dans 100 µl de milieu de culture (DMEM, Gibco BRL) contenant 10% de sérum de veau fœtal inactivé. Les cellules sont ensuite laissées au repos durant 24h dans un incubateur à 37°C sous atmosphère enrichie en CO₂ (5 %). Après 24h d'incubation, 100µl des différentes dilutions d'extraits dans du milieu de culture sont ajoutés aux puits. Au minimum, 7 puits sont utilisés par concentration. Le contrôle négatif correspond au DMEM additionné de quantités de DMSO équivalentes à celles présentes dans les différentes dilutions des solutions stocks. On considère que dans les puits traités par le contrôle négatif, il y a 100 % de viabilité cellulaire. Afin de déterminer la concentration qui diminue de 50 % la viabilité cellulaire par rapport au contrôle négatif (IC50) nous avons préparé 5 concentrations différentes d'extrait. Une fois les dilutions d'extraits rajoutées dans les puits, on laisse incuber la plaque durant 72h. Ensuite, le milieu est éliminé et remplacé par 100 µl de milieu frais contenant du MTT (Sigma) (0.3 mg/ml dans PBS). Après 45 min, le milieu est à nouveau éliminé et le diformazan formé est dissout dans 100 µl de DMSO. Afin de déterminer le pourcentage de viabilité cellulaire, on lit l'absorbance des puits à l'aide d'un lecteur de micro-plaques à des longueurs d'onde de 570 et 620 nm. En comparant l'absorbance des puits traités à l'absorbance des contrôles négatifs (considérée comme 100 % de viabilité cellulaire) on obtient le pourcentage de viabilité cellulaire.

$$\% \text{ de viabilité cellulaire} = \frac{\text{Absorbance des traités}}{\text{Absorbance des contrôles négatifs}} \times 100$$

*** Analyse statistique**

Un test *t* de student est également réalisé afin de déterminer si la différence entre traités et contrôles négatifs est significative ($p < 0.05$ = différence significative ; $p < 0.001$ = différence fortement significative). Ces essais sont répétés au minimum trois fois afin de déterminer l'IC₅₀.

Le principe de ce test reste le même pour tous les produits testés lors de ce travail.

III.2.3. Résultats et discussions

III.2.3.1. Rendements des extractions et évaluation des activités antimicrobiennes des extraits éthanoliques bruts

Les rendements d'extraction obtenus sur 40 g de plante avec les différentes méthodes sont résumés dans le tableau 5a. Ce rendement a été calculé à partir des résultats de trois extractions indépendantes. La percolation a donné un meilleur rendement d'extrait brut, ceci s'explique par le fait que le solvant reste moins en contact avec la poudre de plante ce qui évite les effets de saturation. Cette méthode pouvait bien être conseillée pour l'extraction éthanolique.

	Macération	Percolation	Extraction au Soxhlet
Rendements (%)	15,9	16,8	11,8

Tableau.5a: variation des rendements selon les méthodes d'extraction

Nous avons déterminé la CMI (Tableau .5b) des différents extraits éthanoliques obtenus après 4 jours sur le *D. congolensis*. Les résultats indiquent que les CMI sont identiques quelque soit le mode de préparation de ces extraits (1000µg/ml) et nettement plus élevées que le témoin de tétracycline (1µg/ml). Cependant, il s'agit d'une activité significative. Dans le but d'identifier les composés actifs, nous avons donc d'abord réalisé un screening phytochimique puis des fractionnements de l'extrait éthanolique obtenu par percolation.

Extraits et témoins utilisés	CMI après 4 jours
Témoin blanc avec 500µl de DMSO	Tout pousse normalement
Témoin tétracycline	1 µg/ml
Macération	1000 µg/ml
Percolation	1000 µg/ml
Soxhlet	1000 µg/ml

Tableau .5b : résultats des tests antimicrobiens des extraits éthanoliques.

III.2.3.2. Analyses Phytochimiques

Le screening phytochimique est un ensemble de tests permettant de déterminer les principales classes de métabolites secondaires présents dans le *Mitracarpus scaber*. Ces tests se basent sur une série de réactions d'identification caractéristiques pour chaque classe de composés et permet d'orienter le choix des méthodes de fractionnement.

Principes actifs	Résultats
Alcaloïdes	-/+
Tanins	+
Flavonoïdes	++
Dérivés quinoniques	+
Terpènes et stéroïdes	++
Huile essentielle	+

Tableau.6 : résultat du criblage phytochimique. + : positif ; ++ : nettement positif. ; - : négatif

Les résultats du criblage (tableau 6) montrent que la plante est riche en dérivés terpéniques, ce qui n'était pas décrit dans la littérature. Mais récemment Ekpendu a montré la présence de triterpènes dans *Mitracarpus villosus* (Ekpendu et al. 2001).

Nous avons mis en évidence la présence d'huile essentielle, ce qui confirme d'autres résultats de Ekpendu (Ekpendu et al. 1993).

Les essais se sont révélés positifs pour les tanins et les flavonoïdes, en accord avec les résultats obtenus par Bisignano qui avait isolé plusieurs O-glycosides de flavones dans les feuilles de *M. scaber* (Bisignano et al. 2000). Concernant les alcaloïdes, le test initial du criblage consistait en une simple macération de la poudre de plante dans de l'acide chlorhydrique 5% puis précipitation par le réactif de Mayer était négatif. Comme la littérature signalait la présence de l'azaanthraquinone dans *M. scaber* (Okunade et al. 1999), nous avons donc décidé de modifier le protocole pour concentrer au maximum les alcaloïdes. Pour cela nous avons laissé macérer la plante dans du dichlorométhane. Cette solution de dichlorométhane a été extraite par de l'acide chlorhydrique 5% afin de protoner les alcaloïdes. La solution acide où ils se retrouvent sera alcalinisée puis extraite à nouveau au dichlorométhane. Ce qui conduit à un extrait un extrait alcaloïdique purifié. Les alcaloïdes ont été mis en évidence par CCM (phase mobile : chloroforme-méthanol-ammoniac 10 % (80:40:1.5), plaque : TLC Silica gel 60 F_{254S} Merck®).

Leur présence a été détectée par l'apparition de bandes jaune-orange après révélation à l'aide du réactif de Dragendorff.

Même si le criblage phytochimique nous permet d'avoir une bonne indication sur les classes de composés présents dans la plante, il est toutefois important de souligner que la sensibilité et la limite de détection de ces essais n'est pas connue. Ainsi, le test initial sur les alcaloïdes était négatif mais en utilisant un autre mode opératoire plus sensible nous avons pu détecter leur présence. Ces résultats sont donc à considérer uniquement comme une première indication. Des essais plus poussés seraient nécessaires pour identifier toutes les classes de métabolites secondaires présents dans la plante.

III.2.3.3. Fractionnement liquide – liquide de l'extrait éthanolique

Nous avons dissout 1,5g d'extrait éthanolique sec dans 60ml de solution hydro-alcoolique (eau – méthanol 50-50) puis extrait trois fois avec chaque fois 50ml de dichlorométhane. Les résultats sont résumés dans le tableau 7a :

	Extrait dichlorométhanique	Extrait hydro- alcoolique
Quantité d'extrait sec (en mg)	605	879

Tableau 7a. résultat quantitatif de l'extrait liquide – liquide

III.2.3.4. Chromatographie sur colonne de silice à Pression Atmosphérique (CPA)

Nous avons déposé 1,5g d'extrait sec éthanolique repris dans 5ml de méthanol sur la colonne. Les phases mobiles sont dans l'ordre 1-) ether de pétrole, 2-) ether de pétrole- toluène (50-50) 3-) dichlorométhane, 4-) dichlorométhane - acétate d'éthyle (50 -50), 5-) acétate d'éthyle, 6-) dichlorométhane – acétone (50 -50), 7-)acétone, 8-) acétone – méthanol (50 -50), 9-) méthanol. Nous avons constaté qu'après passage des différents solvants, il reste sur la tête de la colonne un dépôt d'extrait que nous avons récupéré et extrait avec une solution hydro- alcoolique. Les quantités des différentes fractions sont résumées dans le tableau suivant où chaque fraction est désignée par le numéro du solvant comme défini ci-dessus :

Numéro de fraction	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Résidu récupéré sur la colonne
quantités	204.5mg	53.6mg	9mg	3mg	4.2mg	2mg	210.1mg	137mg	156.7mg	615mg

Tableau.7b: résultats quantitatifs des différentes fractions

Suite à l'homologie des spots observée par analyse CCM des fractions et leurs faibles quantités, nous avons décidé de regrouper les neuf fractions de la colonne en trois fractions nommées F₁, F₂ et F₃ pour la suite de nos tests comme suit :

- F₁ = fractions 1, 2, 3 et 4
- F₂ = fractions 5 et 6
- F₃ = fractions 7, 8 et 9

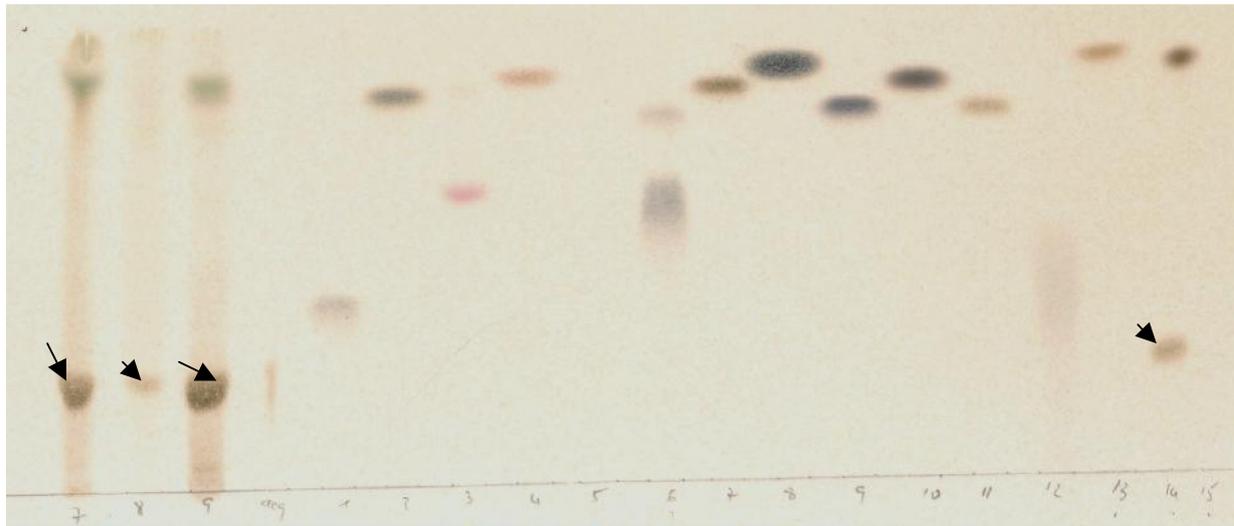
Ensuite, nous avons analysé les trois fractions en tenant compte des observations précédentes pour choisir les phases mobiles.

III.2.3.4.1. Analyse CCM de la fraction F₃ et la fraction hydro- alcoolique

Ces fractions contenant plusieurs composés révélés (Figure 19a et 19b) par le réactif de Réactif de NP/PEG (Natural product/ polyethylene glycol reagent), nous avons fait des chromatographies avec différents témoins phénoliques disponibles au laboratoire. On a utilisé trois systèmes différents (Th. Brasseur, 1988) :

- Système 2
- Système 3
- Système 4

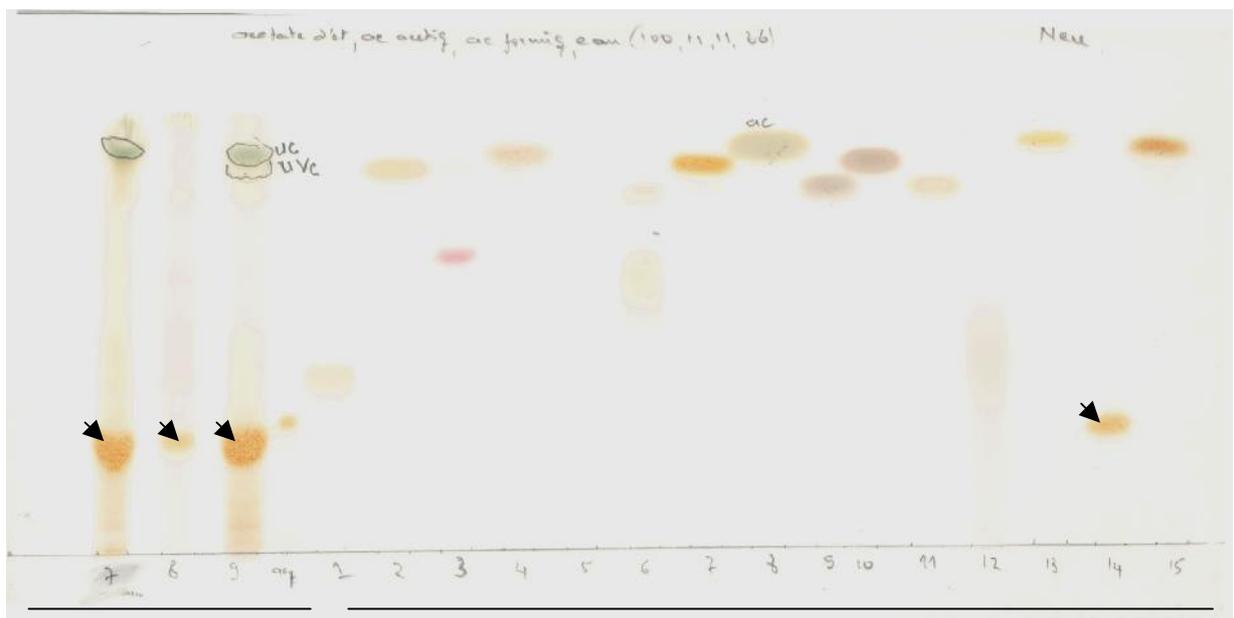
Les résultats des analyses CCM dans les différents solvants ont révélé que le spot majoritaire a le même R_f que la rutine (Figure.19a et b). Pour la fraction hydroalcoolique l'identité de spot a été confirmée par dépôt couplé avec la rutine. Les chromatographies réalisées dans les autres phases confirment que le spot majoritaire a bien le même R_f de la rutine, déjà identifiée dans la plante (Bisignano et al. 2000).



Les trois fractions de la F₃ et extrait hydro-alcoolique de l'extrait liq-liq

TÉMOINS DE QUELQUES DÉRIVÉS PHÉNOLIQUES

Figure.19a : CCM des fractions de F₃ de la colonne avec le système 4 révélée par FeCl₃



Les trois, fractions de la F₃ et extrait hydro alcoolique de l'extrait liq-liq

Témoins de quelques dérivés phénoliques

Figure.19b : CCM F₃ de la colonne avec système 4 révélée au réactif de NEU

-aq = fraction aqueuse obtenue par extraction liquide-liquide (50%eau, 50%méthanol) de l'extrait brut sec éthanolique

Identification, purification, isolement, quantifications de principes actifs de *Mitracarpus scaber* et évaluation de leurs activités antimicrobiennes sur *Dermatophilus congolensis*.

-Détection : le réactif de Neu (NP/PEG) puis lecture à L'UV-365nm pour la figure 20

-Témoins :

1 : acide chlorogénique, $R_f = 0.44$; 2 : acide caféique $R_f = 0.93$; 3 : pelargonidine $R_f = 0.75$; 4 apigénine $R_f = 0.96$; 5 coumarine $R_f = 0.98$; 6 acide tannique $R_f = 0.88$; 7 lutéoline 90% $R_f = 0.94$; 8 catéchol $R_f = 0.96$; 9 acide gallique $R_f = 0.87$; 10 pyrogallol $R_f = 0.93$; 11 hydrate de catéchine $R_f = 0.88$; 12 acide ellagique, non identifié par le révélateur ; 13 kampférol $R_f = 0.97$; 14 **rutine $R_f = 0.35$** ; 15 quercétine $R_f = 0.95$. Tous les témoins utilisés sont de qualité de chez Sigma

Nous avons observé également la présence de la rutine dans la fraction polaire obtenue après extraction liq-liq.

III.2.3.4.2. Analyse CCM des fractions F₁ et F₂

Par les travaux antérieurs sur *Mitracarpus scarber* et les résultats de notre screening phytochimique, nous avons tenté d'identifier par des analyses CCM certains composés dans les fractions F₁ et F₂. Vu le nombre important de spots révélés par l'anisaldéhyde, nous avons réalisé des CCM avec des témoins de composés déjà isolés de la plante, des terpènes, des stérols et autres structures proches disponibles. On remarque (Figure.20) dans la fraction F₁ mais pas dans la fraction F₂, la présence d'un spot (Composé C) au même R_f que la benz [g] isoquinoléine-9,10-dione déjà isolée de la plante.

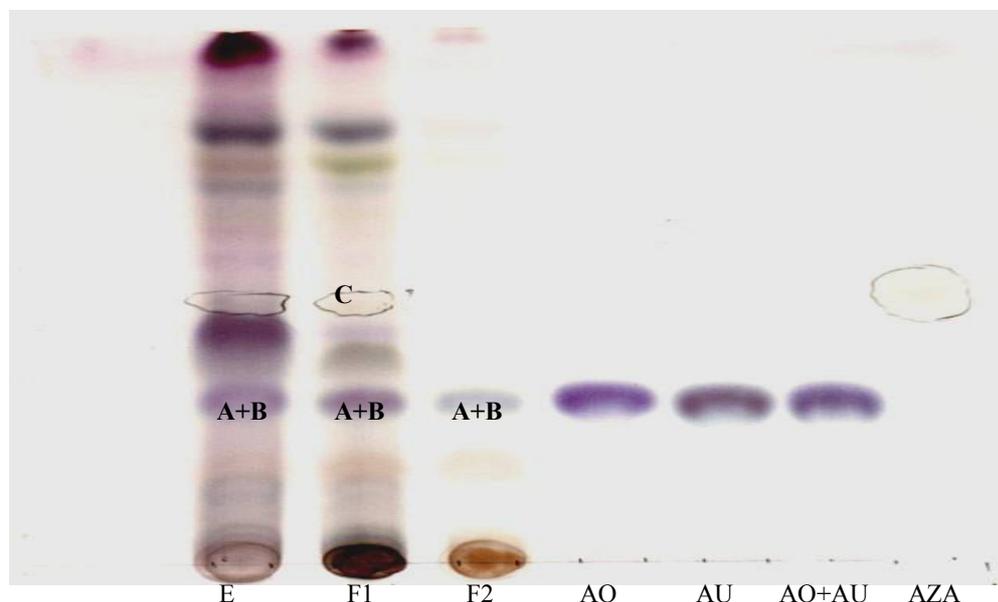


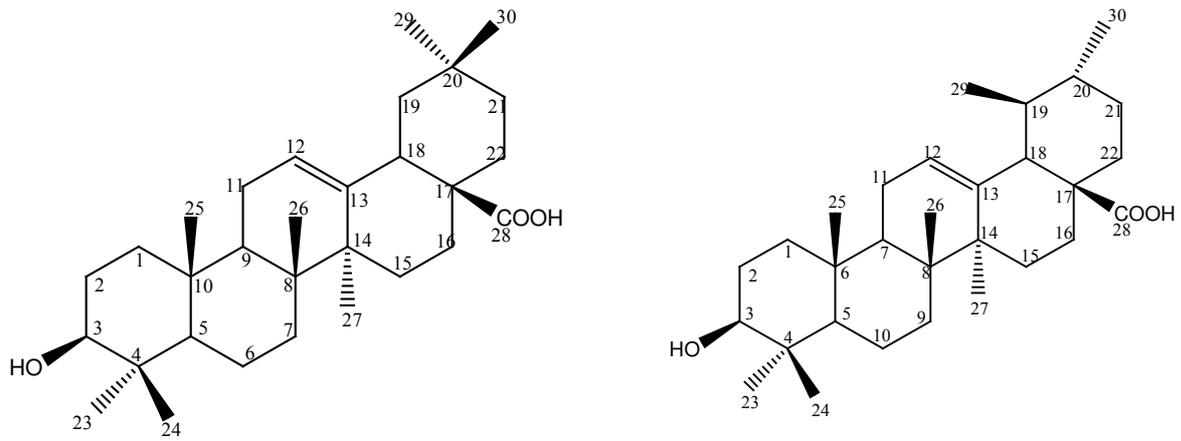
Figure.20 : CCM des F₁ et F₂ et de témoins

- E : extrait brut éthanolique (10 μ l d'une solution à 20mg/ml)
- F₁ et F₂ (10 μ l d'une solution à 20mg/ml) fractions de la CPA
- OA : acide oléanolique (10 μ l d'une solution à 5mg/ml)
- AU : acide ursolique (10 μ l d'une solution à 5mg/ml)
- AO + AU : mélange de l'acide oléanolique et de l'acide ursolique (10 μ l d'une solution à 5mg/ml du mélange 50%-50%)
- AZA : Benz[*g*]isoquinoléine-9,10- dione (10 μ l d'une solution à 10mg/ml).
- système de solvant : système 10
- Révélateur : anisaldéhyde 5% sulfurique et observation après chauffage.

L'analyse de la chromatographie de la figure.20 a montré aussi des spots (composés A+B) dans les fractions et extrait au même Rf que ceux des acides oléanolique et ursolique. Mais du fait que ces deux composés migrent au même Rf, il n'est pas possible de déterminer lequel est présent d'autant plus que d'autres composés proches pourraient migrer au même Rf.

III.2.3.4.3. Tentative d'identification par test de brome des acides oléanolique et ursolique dans la fraction F₁

Comme on l'a constaté plus haut, on ne peut savoir si les composés A+B sont l'acide oléanolique (3 β -hydroxyoléan-12-èn-28-oïque) seul, l'acide ursolique (3 β -hydroxyours-12-èn-oïque) seul, le mélange des deux acides ou éventuellement des molécules proches qui sont présentes dans la fraction F₁. Les acides oléanolique et ursolique sont deux isomères de position qui diffèrent uniquement par la position des groupements méthyles sur les carbones 19 et 20 (figure.21.)



Acide ursolique

Acide oléanolique

Figure.21 : Structure des acides oléanolique et ursolique

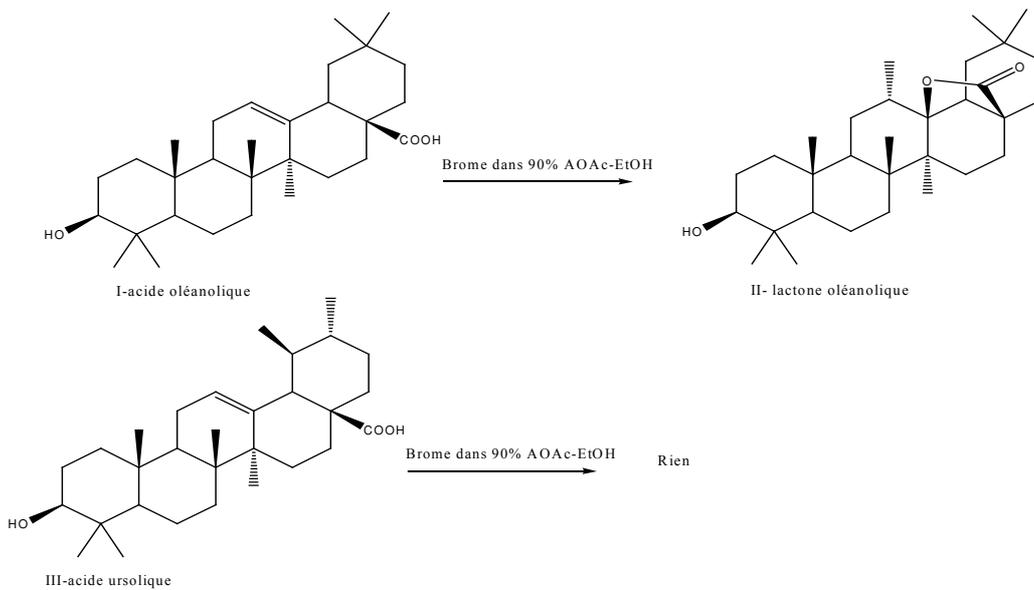


Figure. 22: Test de Brome (Keith.G et al; 1983).
 Identification, purification, isolement, quantifications de principes actifs de *Mitracarpus scaber* et évaluation de leurs activités antimicrobiennes sur *Dermatophilus congolensis*.

Cette analogie de structure entre les deux acides rend difficile leur séparation par CCM. Nous avons alors tenté de les séparer en traitant le mélange dissous dans 90% HOAc-EtOH par le brome (Keith.G et al ; 1983). L'acide oléanolique est transformé en lactone (structure II de la figure.22) ; ce qui le rend plus lipophile que l'acide ursolique qui ne réagit pratiquement pas à cause de la gêne stérique du méthyle en 19. Le mélange bromé ainsi obtenu est séparé par chromatographique sur couche mince. En appliquant ce test avec un témoin du mélange des deux acides, avec chaque acide seul et avec la fraction F₁, nous avons constaté la présence des deux spots (lactone et acide non transformé) dans la fraction F₁ (Figure.23 a et b)



Figure.23a : CCM comparative des témoins d'acide oléanolique, ursolique et de mélange des deux traités au brome ou non

Description :

- AUT : acide ursolique traité par le brome
- AUNT : acide ursolique non traité par le brome
- AOT : acide oléanolique traité par le brome
- AONT : acide oléanolique traité par le brome
- AOT+AUT : mélange acides oléanolique et ursolique traités par le brome

Description :

- AUT : acide ursolique traité par le brome
- AOT : acide oléanolique traité par le brome
- F1-T : Fraction F1 traitée par le brome
- Système de solvant d'éluion : Toluène – acétate d'éthyle – méthanol : 80-18-2
- Révélateur : anisaldehyde 5% sulfurique



Figure.23b : CCM de la F1 et des témoins d'acides oléanolique et ursolique traités par le brome

On voit sur la figure.23a que la lactone de l'acide oléanolique formée se sépare bien de l'acide ursolique qui reste pratiquement intact. Cette méthode appliquée à la fraction F₁ montre sur la figure.23b que le spot A+B se sépare en deux. Au R_f d'acide ursolique, on observe un spot dans la F₁ donc on peut penser à la présence de l'acide ursolique (ou d'un composé qui migre au même R_f). Au R_f de la lactone oléanolique nous n'observons pas de spot distinct dans la F₁, mais une traînée qui ne peut être identifiée. On peut en déduire que soit la F₁ ne contient pas l'acide oléanolique, soit qu'il y est présent en quantité très faible. D'autres méthodes (LC/MS, GC/MS, UV, IR et RMN) seront utilisées plus tard pour confirmer la présence ou non des deux acides.

III.2.3.5. Activités antimicrobiennes des fractions et des standards de molécules pures potentiellement présentes

Les résultats des tests antimicrobiens (CMI) de l'extrait éthanolique et des fractions F₁, F₂ et F₃ sont repris dans le tableau 8. L'extrait éthanolique est actif avec une CMI de 1000 µg/ml. Par contre la fraction F₃ et la fraction récupérée sur la colonne et l'extrait liquide – liquide hydro-alcoolique n'inhibent pas la croissance de *Dermatophilus congolensis* à la dose maximale utilisée (1500 µg/ml). Par contre la fraction F₁ semble être la plus active avec une CMI de 125 µg/ml suivi de l'extrait liquide – liquide dichlorométhanique avec une CMI de 250 µg/ml, puis la fraction F₂

avec une CMI de 1000 μ g/ml. Ces résultats montrent que les composés qui inhibent le mieux la croissance de *Dermatophilus Congolensis* sont des molécules lipophiles.

Fractions et témoins utilisés	CMI après 4 jours
Témoin blanc avec 500 μ l de DMSO	Tout pousse normalement
Témoin tétracycline	1 μ g/ml
Extrait éthanolique	1000 μ g/ml
F ₁	125 μ g/ml
F ₂	1000 μ g/ml
F ₃	Tout pousse pour les concentrations utilisées
Résidu récupéré sur la colonne	Tout pousse pour les concentrations utilisées
Extrait liquide - liquide dichlorométhanique	250 μ g/ml
Extrait liq – liq de solution hydro alcoolique	Tout pousse pour les concentrations utilisées

Tableau .8 : résultats des tests antimicrobiens des fractions F₁, F₂, F₃ et le résidu récupéré sur la colonne.

Afin d'essayer d'établir une corrélation entre l'activité d'inhibition de la croissance de la fraction F₁ sur *D. congolensis* et celle des molécules identifiées par CCM dans cette fraction, nous avons réalisé des tests antibactériens avec l'alcaloïde naphtoquinonique (la 2-benz[g]isoquinoléine-9,10-dione), l'acide oléanolique (et son sel), l'acide ursolique (et son sel) et la rutine (rutoside). Les résultats (Tableau.9) montrent clairement que l'alcaloïde naphtoquinonique (2-azaanthraquinone) présente la plus forte activité antimicrobienne (CMI : 7.5 μ g/ml), ce qui est en accord avec l'activité antimicrobienne décrite par Okunade (Okunade et al. 1999) pour d'autres germes. Les sels des deux acides triterpéniques ont les mêmes CMI alors que l'acide oléanolique a une meilleure activité que l'acide ursolique. Cette différence d'activité entre sel d'acide et acide peut s'expliquer par leurs solubilités dans le milieu de culture. Ces résultats sur les deux acides triterpéniques sont en accord avec les travaux antérieurs (Woldemichael, et al. 2003; Shim et al. 2002; Braghiroli, et al., 1996; Richard et al., 1994) qui montrent que les deux acides triterpéniques ont des propriétés antimicrobiennes. L'activité de la fraction F₁ semble donc due en partie à celle de l'alcaloïde naphtoquinonique et de l'acide ursolique et éventuellement de l'acide oléanolique s'il est présent. La rutine identifiée dans la

fraction F₃ ne présente pas d'activité inhibitrice sur la croissance de *D. Congolensis* à la concentration maximale testée (1000µg/ml : concentration à laquelle l'extrait brut est actif) de même que l'acide gallique, la 4-méthoxyacétophénone, la 3,4,5-triméthoxyacétophénone, l'acide 3,4,5-triméthoxybenzoïque et le psoralène identifiés précédemment dans la partie aérienne de *M. scaber* et présentant des activités antimicrobiennes sur le *Staphylococcus aureus* et le *C. albicans* (Bisignano et al. 2000). Ces dernières molécules n'ont cependant pas été identifiées dans l'extrait éthanolique que nous avons analysé.

Molécules testé	CMI après 4jours
Témoin blanc avec 500µl de DMSO	Tout pousse normalement
Témoin tétracycline	1µg/ml
.Acide ursolique	150µg/ml
Sel d'acide ursolique	15µg/ml
Acide oléanolique	70µg/ml
Sel d'acide oléanolique	15µg/ml
Benz[g]isoquinoléique-9,10-dione	7,5µg/ml
Rutine	Pas d'activité inhibitrice
acide gallique	Pas d'activité inhibitrice
4-méthoxyacétophénone	Pas d'activité inhibitrice
3, 4,5-triméthoxyacétophénone	Pas d'activité inhibitrice
acide 3, 4,5-triméthoxybenzoïque	Pas d'activité inhibitrice
Psoralène	Pas d'activité inhibitrice

Tableau.9 : CMI de quelques molécules pures identifiées dans l'extrait éthanolique de *M. Scaber* sur *D. Congolensis*

III.2.3.6. Evaluation de la cytotoxicité de la F₁ et de l'extrait brut éthanolique

L'usage *in vivo* de pommades trop concentrées (1 part d'extrait pour 1 part de beurre de karité) en extrait éthanolique de *M. scaber*, creusaient les plaies au niveau des lésions (N. Ali Thèse de Doctorat). Nous avons donc fait un test de cytotoxicité pour évaluer la toxicité de l'extrait brut et celle de la fraction qui semble la plus active sur l'inhibition de la croissance de *D. congolensis*. L'activité a été mesurée par test MTT sur des cellules humaines de carcinome du col de l'utérus (HeLa) et des macrophages de souris (J774). Les résultats montrent que l'extrait brut éthanolique aussi bien que la fraction F₁ sont cytotoxiques, mais on constate que l'extrait brut est beaucoup plus cytotoxique que la fraction F₁ (Tableau.10). Les mêmes résultats sont observés pour les cellules J774. Cette cytotoxicité de l'extrait brut pourrait expliquer l'abrasion des plaies par usage de pommade trop concentrée (Thèse de N. Ali 2002). Ces résultats indiquent aussi que les molécules les plus cytotoxiques seraient différentes des molécules les plus actives sur *D. congolensis*.

Fractions testées	10µg/ ml	std deviation	25 µg/ml	std deviation	50 µg/ml	std deviation
Extrait éthanolique de <i>Mitracarpus scaber</i>	85,96	7,8	35,27**	3,44	17,22**	1,24
Fract 1 de l'extrait éthanolique de <i>Mitracarpus scaber</i>	89,26	9,81	79,51*	6,61	58,53**	3,55

Tableau.10 : résultats des tests de cytotoxicité de la fraction F₁ et de l'extrait brut éthanolique effectués sur des cellules HeLa.

Les chiffres indiquent le pourcentage d'activité mitochondriale après traitement par rapport au témoin considéré comme 100%.

*p < 0, 05

**p < 0,001

III.2.4. Conclusion

Le but de cette partie était d'évaluer l'activité d'extraits de *Mitracarpus scaber* sur la croissance de *Dermatophilus congolensis* et de tenter d'identifier quelques molécules actives. Grâce à ce travail, nous avons pu confirmer, *in vitro* que l'extrait éthanolique de *M. scaber* a une activité antimicrobienne sur le *Dermatophilus congolensis* et que les molécules les plus actives semblent être lipophiles. Par ailleurs, on a observé que l'extrait brut est plus cytotoxique que la fraction la plus active (F₁); ceci prouve que *M. scaber* contient des composés qui inhiberaient plus sélectivement la croissance de *D. congolensis* que celle des cellules de mammifères.

Nous avons identifié par analyse CCM de l'extrait éthanolique de *M. scaber* la présence d'un spot migrant au même Rf que l'acide ursolique avant après traitement au brome et d'un autre non modifié par traitement au brome. Nous avons aussi montré l'activité d'inhibition de la croissance de *D. congolensis* des acides ursolique et oléanolique plus actif sous forme de sels. De plus, nous avons constaté que la fraction la plus active semblait contenir un alcaloïde naphthoquinonique (benz[*g*]isoquinoléine-9,10-dione) déjà isolé de *M. scaber* et qui présente une bonne activité inhibitrice sur *D. congolensis*. Ces résultats nous permettent de conclure que ces composés pourraient être, au moins partiellement, responsables de l'activité antimicrobienne du *M. scaber*. Cependant, d'autres molécules actives peuvent être également présentes mais n'ont pas été identifiées par l'analyse en chromatographie sur couche mince.

Nous allons donc, dans la suite de ce travail vérifier la présence de ces molécules actives dans l'extrait de *M. scaber* en tentant de les purifier et de les analyser par d'autres méthodes plus spécifiques (RMN, LC/MS, GC/MS). Nous voudrions aussi les quantifier pour déterminer dans quelle mesure elles sont responsables de l'activité des extraits.

Nos résultats confirment que ceux observés *in vivo* par N. Ali (N. Ali, Thèse de Doctorat. 2002) sur des animaux infectés par le *D. congolensis* sont dus, au moins partiellement à un effet antimicrobien de l'extrait de plante sur ce germe.

III.3. Isolement et identification de composés de l'extrait éthanolique de *M. scaber* et évaluation de leur activité sur le *D. congolensis*

III.3.1. Introduction

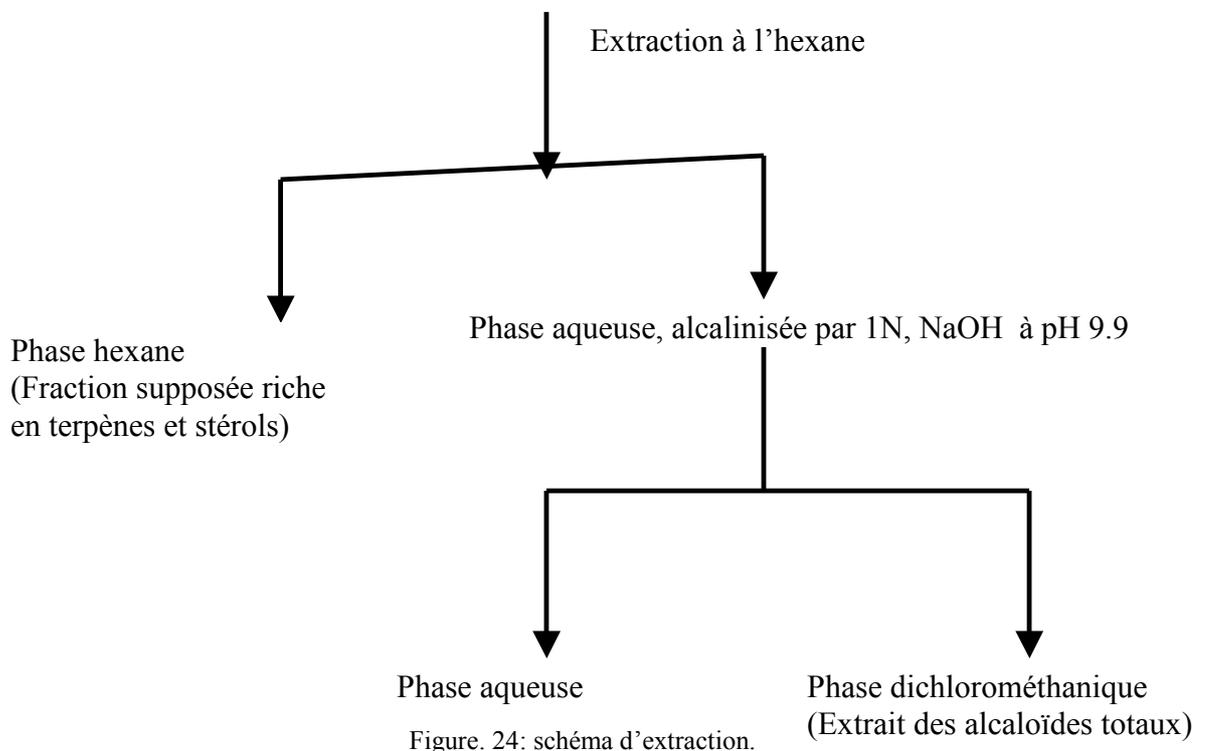
A la lecture des CMI des différentes fractions (tableau.8) obtenues par fractionnement sur colonne à pression atmosphérique et des composés antimicrobiens précédemment isolés de la plante, on peut conclure que les composés les plus actifs sur le *D. congolensis* semblent être des composés lipophiles. Les molécules actives identifiées préliminairement par CCM appartiennent essentiellement à deux classes de composés du métabolisme secondaire : les alcaloïdes et les terpènes. Nous avons dès lors décidé de faire une extraction sélective à partir de l'extrait éthanolique : celui-ci est d'abord extrait par l'hexane en milieu acide (pour obtenir les acides triterpéniques et stérols), puis par le dichlorométhane en milieu alcalin, pour obtenir une fraction riche en alcaloïdes. Nous avons ensuite procédé à un fractionnement par chromatographie CCM préparative, VLC ou CLV (vacuum liquid chromatography ou chromatographie liquide sous vide) et MPLC (medium pressure liquid chromatography) pour purifier ces composés actifs détectés précédemment.

III.3.2. Matériels et méthodes.

III.3.2.1. Extraction des acides terpéniques, des stéroïdes et des alcaloïdes totaux

5g d'extrait éthanolique ont été dissous dans 100 ml de 1N H₂SO₄ (pH : 2.5) et extraits trois fois avec 100 ml de n-hexane. La solution aqueuse a été alcalinisée (1N, NaOH) à pH 9.9 et extraite avec trois fois avec 100 ml de CH₂Cl₂. La phase dichlorométhanique constitue l'extrait total alcaloïdique (2,9%) alors que la phase hexanique (47,9%) contient notamment les terpènes et stérols (Fig.24).

Extrait éthanolique dissout dans 1N H₂SO₄ (pH : 2.5)



* Purification de l'azaanthraquinone (composé C)

Le composé C (AAQ) a été purifié de l'extrait alcaloïdique par une chromatographie sur couche mince préparative (prep-TLC ou CCM préparative), sur gel de silice avec un mélange toluène – acétate d'éthyle -méthanol (80-18-2) comme phase mobile. Une dernière purification a été réalisée par chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice (0.062-0.2mm, 10cm x 5cm), en éluant successivement avec de l'éther (100ml) puis avec du dichlorométhane (150ml). L'AAQ (composé C) s'est retrouvé dans la fraction dichlorométhanique (2,3%). Nous avons répété l'expérience deux fois pour avoir assez de composé pour les tests de détermination de structure.

* Purification des triterpènes et stéroïdes

Les triterpènes et stéroïdes ont été purifiés de la fraction hexanique par chromatographie liquide à pression moyenne (CLPM ou MPLC), et identifiés par chromatographie liquide à haute performance ou par chromatographie gazeuse couplées à la masse (LC/MS ou GC/MS).

III.3.2.2. La MPLC (Medium Pressure Liquid Chromatography)

Les colonnes de MPLC (Hostetmann, 1998 ; Houghton, 1998) sont des tubes en verre remplis de phase stationnaire composée généralement de silice. Ces colonnes peuvent être préparées au laboratoire à l'aide de silice normale ou greffée. Le principe de séparation est le même qu'en HPLC. La différence avec la HPLC se situe au niveau de la taille des grains de silice. En MPLC, les grains sont plus gros et moins réguliers, leur taille varie de 15 à 25 μm . La pression et l'efficacité de séparation sont donc moindres qu'en HPLC où la taille des grains varie entre 2 et 8 μm .

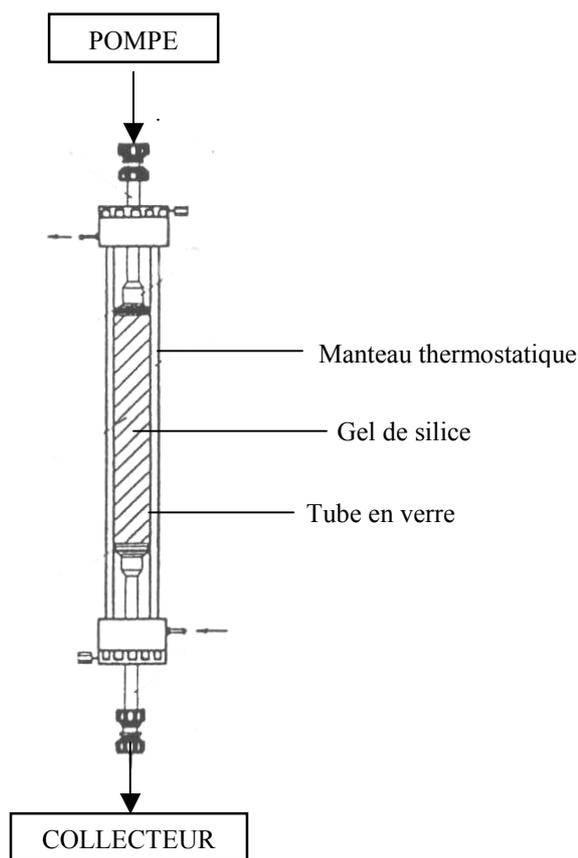


Figure.25: schéma représentant une colonne de MPLC.

A partir de la fraction pré-purifiée, il nous a généralement fallu deux étapes de purifications supplémentaires pour isoler les composés majoritaires avec une pureté suffisante (figure. 26).

Chaque étape de purification nécessite la mise au point d'une phase mobile qui assurera une séparation optimale des composés de la fraction.

Une fois les conditions mises au point, la fraction est dissoute dans un minimum de phase mobile (max. 5 ml) et injectée au sommet de la colonne MPLC. La phase mobile est alors injectée à un débit de 1 ml/min et la sortie de la colonne reliée à un collecteur de fraction (4 min/tube). Les fractions sont collectées dans des tubes et leur composition est analysée par CCM sur gel de silice (éluant : Tol-EtOAc-MeOH (80 :18 :2), Hex- EtOAc -MeOH (10 :5 :2 ; 10 :5 :1) et Hex- EtOAc (10 :5) révélateur : anisaldéhyde sulfurique). Les fractions sont ensuite rassemblées en fonction de leur profil chromatographique. A la fin de la séparation, la colonne est rincée par du méthanol afin de récupérer le maximum de composés non-élués par la phase mobile.

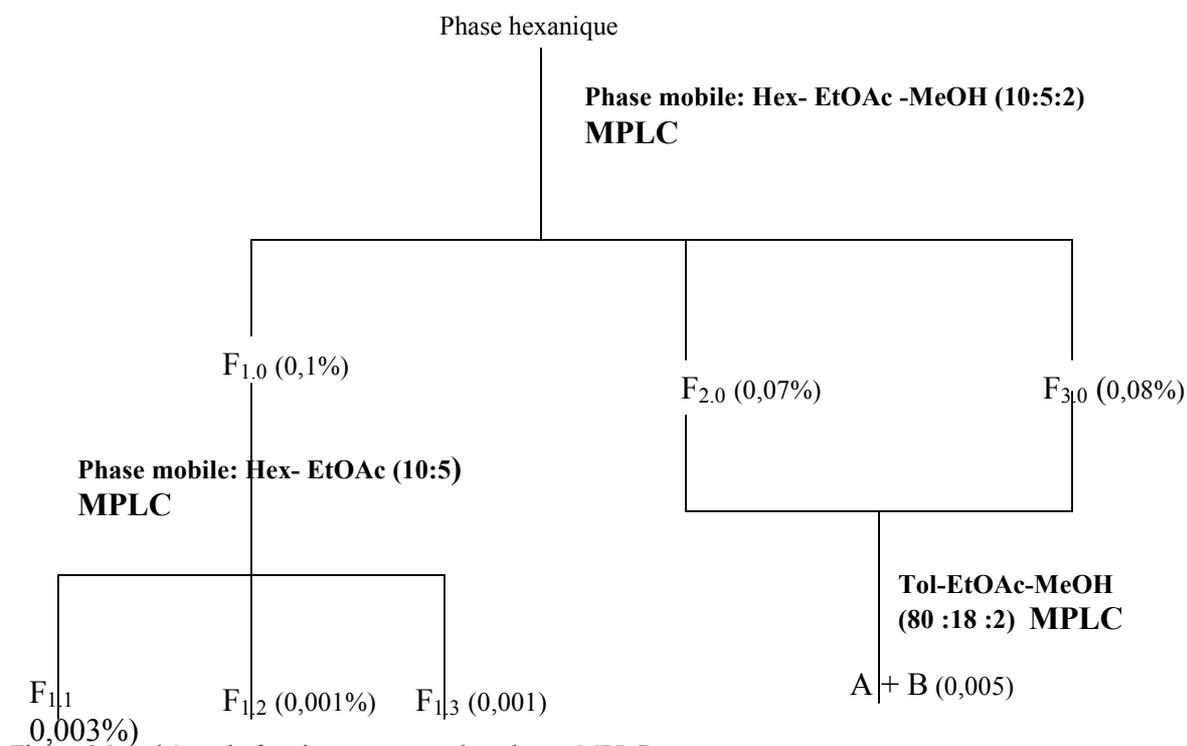


Figure.26 : schéma de fractionnement sur la colonne MPLC

- Mise au point de la séparation

Lors de nos purifications, nous avons travaillé principalement avec de la silice normale. L'étape la plus importante de cette purification consistait donc à sélectionner la meilleure phase mobile pour notre séparation. Pour ce faire, nous avons utilisé des plaques de CCM de

silice normale sur lesquelles les fractions à purifier sont déposées. Plusieurs systèmes de solvants de polarités variables ont été utilisés afin de trouver une phase mobile qui assure en CCM une bonne séparation des composés tout en veillant à ce qu'ils migrent avec un $R_f < 0,3$. Si les composés migrent trop haut en CCM, ils risquent de ne pas être retenus sur la colonne et de ne pas être séparés.

Après plusieurs essais sur différentes fractions, nous avons déterminé que c'était le mélange toluène-acétate d'éthyle - méthanol et hexane - acétate d'éthyle - méthanol qui donnaient les meilleurs résultats. En fonction de la polarité des composés contenus dans la fraction analysée, les proportions de chaque solvant sont modifiées afin de répondre aux critères de séparation en CCM.

- MATÉRIEL

- Colonne : Colonne en verre : Omnifit (OM 6427 15 x 750 mm)
- Phase stationnaire : Lichroprep Si 60 Merck® (taille des grains : 15-25 μM)
- Débit de phase mobile : 1 ml/min
- Collection des fractions : 4-8 min/tube

Phase Mobile : Toluène – Acétate d'éthyle – Méthanol (80-18-2)

Hexane – Acétate d'éthyle – Méthanol (10-5-2)

Hexane – Acétate d'éthyle (10-5)

Révéléateur : Anisaldéhyde sulfurique.

III.3.2.4. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

GC/MS

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectroscopie de masse permet de séparer les composés d'un mélange selon leur polarité et leur capacité de se volatiliser puis d'identifier leur structure par analyse de leur spectre de masse.

* Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique très répandue, dont les principaux avantages sont son extrême sensibilité, sa polyvalence, la rapidité de mise au point des analyses nouvelles et les possibilités d'automatisation, qui augmente encore son intérêt. La séparation sur colonne se fait sur des composés qui doivent être à l'état gazeux, l'analyse des liquides ou des solides impose de pouvoir les transformer à l'état de vapeur par

chauffage. C'est sans doute la principale contrainte à laquelle il faut penser avant de choisir cette technique, puisqu'elle limite son emploi à l'étude des composés thermostables et suffisamment volatils. Un appareil de CPG comprend schématiquement trois modules spécifiques : un injecteur, une colonne et un détecteur. Dans le cas de couplage de la CPG à la MS, la colonne est directement reliée à la chambre d'ionisation de la MS et le tout est réuni dans un bâti unique. La phase mobile qui entraîne l'échantillon dans la colonne est un gaz, appelé gaz vecteur (dans le cadre de notre travail, nous avons utilisé l'hélium). Les débits, contrôlés avec précision, permettent une bonne répétitivité des temps de rétention. L'analyse débute à l'instant où on introduit une petite quantité de l'échantillon, sous forme liquide ou gazeuse, dans l'injecteur, qui a la double fonction de porter cet échantillon à l'état gazeux et de l'amener dans le flux gazeux en tête de la colonne. Cette dernière se présente comme un tube de faible section enroulé sur lui-même, de 1 à plus de 100m de longueur suivant les cas et contenant la phase stationnaire (les phases stationnaires commerciales sont assimilées généralement à des liquides, rarement à des solides). La colonne est placée dans une enceinte à température régulée. Dans le cas du GC/MS la phase gazeuse en aval de la colonne passe dans la chambre d'ionisation du MS (voir figure. 28).

* **La spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse (SM) désigne une méthode d'analyse qui repose sur la détermination des espèces atomiques ou moléculaires individuelles de l'échantillon analysé mais aussi de fragments de ces molécules, ce qui permet de recueillir des informations sur leurs structures. Les perfectionnements successifs ainsi que l'apparition de nouvelles techniques d'ionisation, a fait de cette méthode celle qui a le plus vaste champ d'application en analyse par sa polyvalence et par son extrême sensibilité (Rouessac F, Rouessac A., Ourisson G, 1998).

* **Principe**

Après élution par le gaz vecteur, les molécules sous forme gazeuse sont ionisées afin de soumettre les espèces chargées qui en résultent à l'action d'un champ électrique et/ou magnétique selon le type d'appareil. L'étude des trajectoires suivies, dans une enceinte où règne un vide poussé (10^{-4} Pa), permet de déterminer le rapport masse/charge des ions donc éventuellement leur nature (de Hoffmann E., 1994).

Le spectromètre de masse réalise une série d'opérations successives que l'on peut classer de la

manière suivante :

1. Ionisation : l'espèce étudiée est vaporisée et ionisée dans la source de l'appareil par un des nombreux procédés existants (ex : MALDI, FAB, electrospray, ...) (pour l'ionisation de notre échantillon, nous avons utilisé la méthode de l'impact électronique).
2. Accélération : aussitôt formés, les ions sont extraits de la source, focalisés et accélérés par des lentilles électroniques, pour accroître leur énergie cinétique.
3. Séparation : les ions sont "filtrés" suivant leur rapport masse/charge par l'analyseur, certains appareils combinant plusieurs types d'analyseurs en série (ex : analyseur quadripolaire, ion trap, ...).
4. Détection : après séparation les ions terminent leur course en venant frapper un détecteur qui quantifie les charges électriques (ex : multiplicateurs d'électrons à dynodes séparées, multiplicateurs d'électrons à dynode continue,...).
5. Présentation du spectre de masse issu du signal du détecteur de l'appareil.

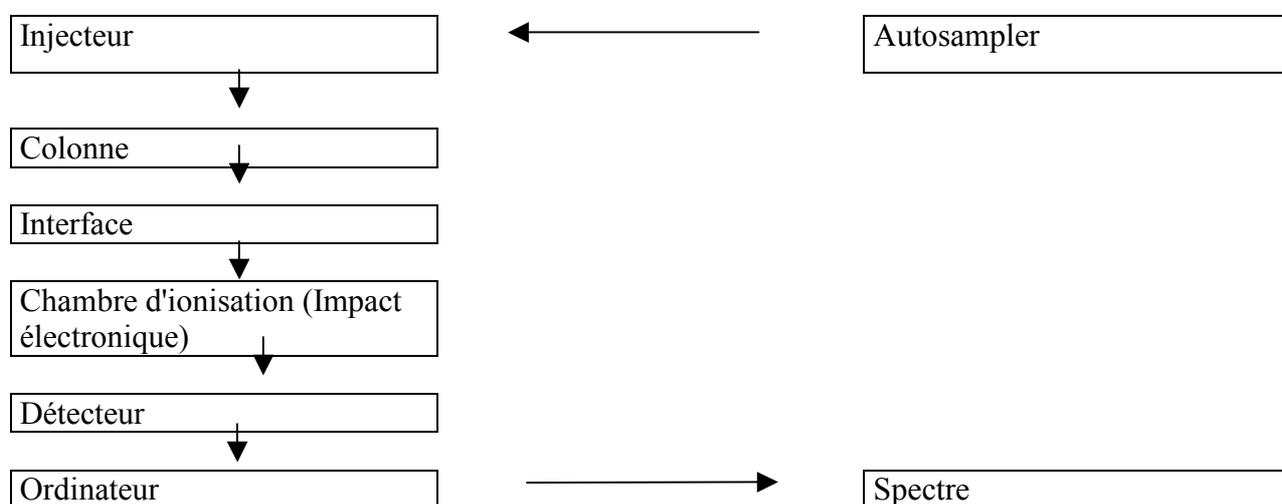


Figure. 27: étapes de l'obtention d'un spectre par un GC-MS

* L'ionisation par impact électronique

L'ionisation par impact électronique reste le procédé le plus largement utilisé pour les molécules relativement volatiles. C'est le seul procédé qui conduit à des spectres reproductibles, et qui permet des comparaisons à l'aide de spectrothèques (Analyse chimique -

Méthodes et techniques instrumentales modernes,...).

L'ionisation est provoquée dans la source, par impact d'électrons obtenus par effet thermoïonique sur les molécules de l'échantillon. La source d'électron provient donc d'un filament chauffé qui émet des électrons accélérés vers une anode (de Hoffmann, 1994).

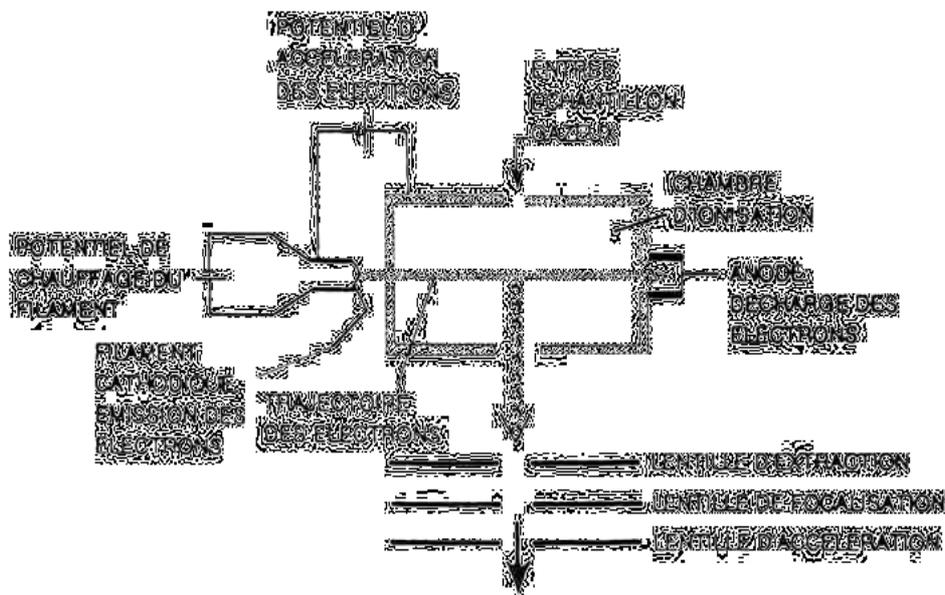
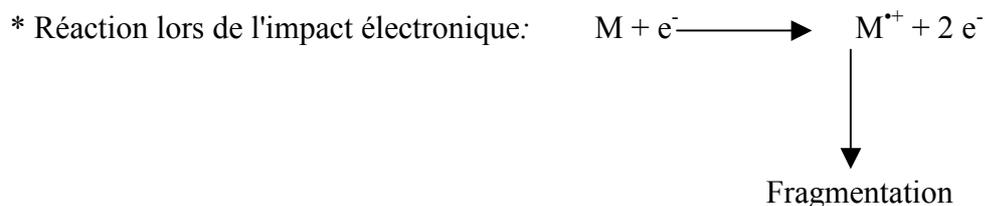


Figure. 28: schéma d'une source par impact électronique

Ces électrons sont accélérés par une différence de potentiel de 70 V. Ceci leur fournit une énergie cinétique suffisante pour que la collision entre un électron et une molécule de l'échantillon entraîne l'ionisation de cette dernière. L'énergie moyenne d'ion d'une molécule est de 70 eV. A 70 eV le rendement de l'ionisation est de 1 ion formé pour 10000 molécules.



* Appareillage

Le chromatographe utilisé était le TRACE GC 2000 series (ThermoQuest, Italy), équipé d'un autosampler AS2000 (ThermoQuest). Le système GC est couplé au Trace MS mass spectrometer (ThermoQuest) à ionisation électronique.

La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne capillaire (DB-XLB; de 15 m × 0.25 mm avec 0.25 µm de diamètre interne) de chez J&W Scientific (Agilent Technologies, USA). L'hélium était utilisé comme gaz vecteur à un débit de 1.2ml/min. Les

échantillons étaient injectés en mode split (rapport split : 1/9). La température d'injection était réglée à 250°C et celle du four programmée entre 50°C et 320°C (10°C/min) et cette dernière température était maintenue pendant 3min. La température de couplage du GC était de 310°C. L'énergie des électrons était de 70eV et la source des électrons à 250°C. Les échantillons ont été analysés en mode full-scan (250-650 amu).

* Identification des constituants

L'identification des constituants est basée sur la comparaison des temps de rétention et des données spectrales des standards, la comparaison des indices linéaires de rétention relative (ILR) de la série des *n*-hydrocarbures et des données commerciales disponibles dans l'ordinateur (NIST 95 and ADAMS). Les témoins purs d' α -amyrine (Extrasynthèse), de β -amyrine (Extrasynthèse), de β -sitostérol (95%, Sigma), de lupéole (Extrasynthèse), de campestanol (Herbstandard), du stigmastérol (Sigma) de squalène (extrasynthèse) ont été utilisées. Pour les témoins non disponibles nous nous sommes basés sur les standards dans la librairie du logiciel de l'appareil avec une conformité du spectre de masse supérieure à 86%.

III.3.2.5. CLHP/MS

C'est une chromatographie liquide couplée à un spectre de masse. Le système de masse est à peu près le même que dans le cas du GC/MS sauf ce qui concerne l'interface et la technique d'ionisation. L'avantage de ce système est de compléter la purification en séparant des composés qui contamineraient éventuellement le produit supposé purifié (par CL) et d'obtenir en même temps le spectre de masse ; ce qui permet d'obtenir des informations sur le composé le composé à identifier et le (les) éventuel (s) contaminant (s) (ou autres composés non identifiés par la méthode de purification). La possibilité d'utiliser une quantité très faible pour l'analyse (100ppm) est un atout en pharmacognosie où les substances naturelles sont souvent isolées en faibles quantités après un travail très laborieux.

Le système LC/MS est composé d'une pompe MERCK-HITACHI L6200, d'un injecteur manuel Rheodyne 7725i, d'un détecteur LCQ avantage S/NLAD00293. La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne SPHERISORB[®] ODC, 25 cm x 4.6 mm, 5 μ de taille des particules. Les spectres de masse ont été réalisés par un LCQ mass spectrometer, équipé d'une source APCI. Les données ont été acquises et analysées par le logiciel Xcalibur. La même source a été utilisée en injection directe pour obtenir les spectres de masse.

Nous avons choisi de travailler avec l'APCI car il est fréquemment décrit dans la littérature sur les triterpènes (G.A. Van der Doelen et al. 1998). La spectrométrie de masse, même si elle entraîne la destruction de l'échantillon analysé, n'exige que des quantités infimes de molécules (10^{-12} g).

La spectrométrie de masse fournit de nombreuses informations sur la molécule analysée :

- Poids moléculaire et formule brute. Grâce à la spectrométrie de masse à haute résolution, nous pouvons obtenir la masse exacte de la molécule et ainsi déterminer sa formule brute qui permet également de déterminer le nombre d'insaturations (I) de la molécule :

$$I = \text{nbr de Carbone} - \frac{\text{nbr d'Hydrogène}}{2} - \frac{\text{nbr d'Halogène}}{2} + \frac{\text{nbr d'Azote}}{2} + 1$$

- Identification de la molécule grâce à la comparaison des spectres de masse contenus dans une spectrothèque. Mais pour une comparaison complète avec la littérature, nous avons aussi une fragmentation en APCI.
- Informations sur la structure de la molécule grâce à l'analyse des fragments. Le développement de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS et MSⁿ) a permis d'améliorer l'analyse de la fragmentation.

*** Conditions opératoires :**

Phase mobile : 85 % Acétonitrile (HPLC grade) / 15 % eau milli-Q

Colonne HPLC : Merck LiChroCart RP 250-4 cat.1.50983

Phase Stationnaire : LiChroSpher 100 RP-18 5 □m

Flux de la phase mobile : 0.6 ml/min

Temps d'analyse : 20 min

Longueur d'onde UV : 215 nm

Volume injecté : 20µl

Range UV: 0.2 FS

RSPT UV: 0.5 s

Source MS: APCI

Tune MS: UA_OA_APCI_200ul

Source APCI : Vaporizer T: 455°C

Sheath Gas: 45

Aux gas: 20

Discharge Current: 5 □V

Ion transfer Capillary T: 200°C

Capillary voltage: 35 V

Tube lens offset: 15 V

Ionization: APCI positif

III.3.2.6. Détermination de structure

III.3.2.3.1. Spectre de Masse (SM)

Les appareils et matériels sont les mêmes que dans le chapitre III.3.2.5. La source d'ion utilisée est ICPA (Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique) ou APCI (Atmospheric Pressure chemical ionization) en mode positif. Nous avons choisi cette source à cause du caractère acide des triterpènes isolés (Mass spectrometry, A. de Hoffmann et V. Stroobant, 2001).

III.3.2.6.2. Spectrométrie infra rouge (IR)

L'IR est une technique simple qui permet d'obtenir des informations sur la structure de la molécule et essentiellement sur ses différents groupements et fonctions (double liaison, noyau aromatique, hydroxyle, cétone, acide carboxylique ...). L'« empreinte digitale » de la molécule caractérisée par l'ensemble des pics de transmittance en dessous de 1600 cm^{-1} est caractéristique du squelette de la molécule (Silverstein, 1991 ; Rouessac, 1998).

Cette analyse exige des quantités d'échantillon de l'ordre du mg mais elle offre la possibilité de récupérer l'échantillon après analyse. Pour cela, nous avons travaillé sur disque de NaCl, l'échantillon est dissous dans un solvant organique volatil et déposé sur le disque. La solution est évaporée avant analyse. A la fin de l'analyse, le disque est rincé par le même solvant et l'échantillon récupéré.

- Matériel

- Perkin Elmer FTIR 286
 - Expériences réalisées en collaboration avec le Professeur Jacques Poupaert et Giulio Muccioli de l'unité CMFA, UCL.
- Sur disque de NaCl

III.4.2.6.3. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La RMN est la technique spectrale qui nous fournit le plus d'informations sur la structure de la molécule surtout grâce au développement de la RMN à deux dimensions. Cette technique exige des quantités plus grandes de matériel (± 5 mg) que l'on dissout dans du chloroforme, DMSO ou éthanol deutérés additionné de TMS (tetra-méthylsilane) comme standard interne ($\delta = 0$ ppm). L'échantillon peut-être récupéré après analyse.

Chaque spectre nous donne des informations spécifiques sur le squelette, sur les fonctions et leurs positions, sur la stéréochimie, sur le nombre d'hydrogènes ou de carbones La comparaison de ces informations avec d'autres données spectrales de molécules proches nous permet de déterminer la structure de la molécule. (Silverstein, 1991 ; Rouessac, 1998)

* RMN à 1-D :

- **Spectre du proton (^1H).**

- L'intégration des pics permet de déterminer le nombre total de protons et le nombre de protons correspondant à un pic donné.
- La multiplicité des raies fournit des informations sur le nombre de protons portés par les carbones voisins (singulet, doublet, triplet ...).
- Le déplacement chimique des pics (δ en ppm) permet l'identification des groupements et fonctions de la molécule grâce à la comparaison de leur déplacement chimique à ceux des tables de référence ou de la littérature.
- La constante de couplage entre les pics (J en Hz) permet de déterminer la position des protons les uns par rapport aux autres.

- **Spectre du carbone découplé (^{13}C).**

- Le nombre de pics détermine le nombre de carbones (sauf si la molécule présente une symétrie).
- Le déplacement chimique des pics (δ en ppm) permet l'identification des groupements et fonctions de la molécule en les comparant à ceux des tables de référence ou de la littérature.

- **Matériel**

- Bruker 300 à 300 MHz (^1H) et 75 MHz (^{13}C)

- Expériences réalisées en collaboration avec le Professeur Jacques Poupaert et Giulio Muccioli de l'unité CMFA, UCL.

III.3.2.7. Tests antimicrobien sur le *D. congolensis*.

Les CMI ont été déterminées comme décrit précédemment. Pour les fractions obtenues en faibles quantités, nous avons utilisé la méthode de détermination de zones d'inhibition autour des disques imbibés de produits ou fractions pour évaluer l'activité antimicrobienne des fractions et composés purifiés.

- Détermination de la zone d'inhibition

Le test de sensibilité a été réalisé par la méthode de diffusion sur gélose brain-heart agar (Ali et al. 2003). La gélose inoculée par inondation a été laissée 30 min à la température du laboratoire. Des disques de 6mm de diamètre, découpés dans du papier Wattman n°1, stérilisés et imprégnés des différentes concentrations d'extrait alcoolique, hexanique, alcaloïdique, des fractions de l'extrait alcaloïdique, des antibiotiques, et de l'alcool à 96°C (utilisé pour dissoudre les extraits), à raison de 10µl et 20µl par disque, ont été déposés stérilement après séchage sur la gélose. Les boîtes ont été incubées 48h.

Les témoins d'oxacilline, de tétracycline, les extraits et fractions ont été préparés à 1280µg/ml ou 1280ppm, puis dilués successivement pour avoir respectivement 640ppm, 320ppm, 160ppm, 80ppm, 40ppm, et 20ppm.

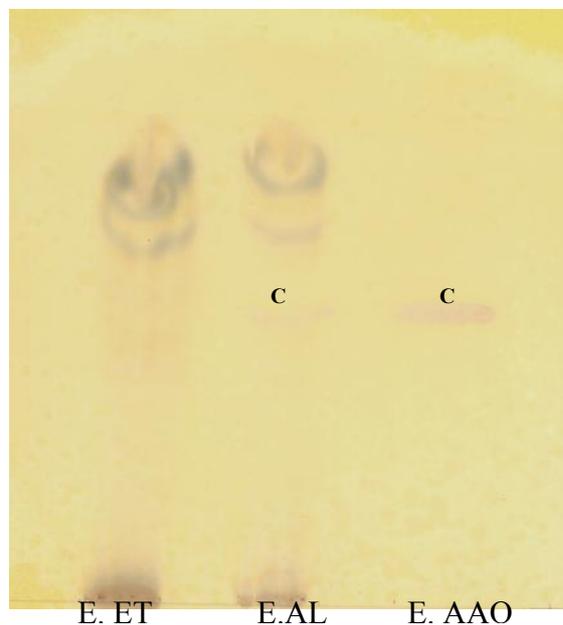
III.3.3. Résultats et discussions

On peut constater que la fraction alcaloïdique a une CMI supérieure à la fraction hexanique (Tableau.11).

témoin antibiotique, molécules et sel des acides triterpéniques	CMI après 4 jours
Témoin blanc avec 500µl de DMSO	Tout pousse normalement
Témoin tétracycline	1µg/ml
Extrait alcaloïdes total	750µg/ml
Extrait hexanique	700µg/ml
Extrait éthanolique	1000µg/ml

Tableau.11 : CMI des différentes fractions de l'extrait total des alcaloïdes

De l'extrait alcaloïdique, nous avons isolé par CCM préparative et CLV le composé C (figure.28), une poudre jaune. Ce composé migre au même Rf que la 2-azaanthraquinone.



- **Système de solvant** : toluène, acétate d'éthyle, méthanol (80, 18, 2).
- **Révéléateur** : Dragendorff
- **E. Et** : Extrait éthanolique
- **E. Al** : Extrait alcaloïdique
- **C** : composé C isolé

Figure. 28 : CCM du composé C isolé

III.3.3.1. Fractionnement de la phase hexanique

La phase hexanique a été fractionnée sur une colonne MPLC pour donner différentes fractions (figure.26), ensuite regroupées par analyse CCM (Figure.29). L'analyse CCM des fractions en utilisant des standards de certains terpènes et stéroïdes disponibles, a montré des spots migrant aux mêmes Rf que les témoins de l' α -amyrine, du β -amyrine, du lupéol, du campestanol, du stigmastérol, du β -sitostérol et du squalène. Ces résultats indiquent la présence dans les extraits de terpènes et stéroïdes autres que les acides oléanolique et ursolique ou des composés migrant aux mêmes Rf.

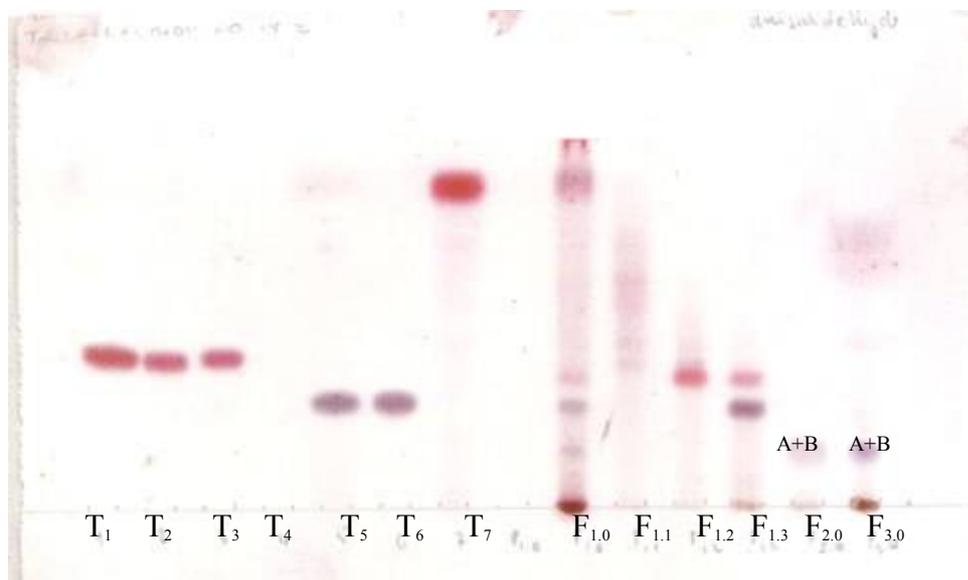


Figure. 29 : Analyse CCM des fractions hexaniques

CCM :

- **Témoins** : t₁ = α -amyrine ; t₂ = β -amyrine; t₃ = Lupéol ; t₄ = Campestanol ; t₅ = Stigmastérol ; t₆ = β -sitostérol ; t₇ = squalène.
- **Système de solvant** : toluène, acétate d'éthyle, méthanol (80, 18, 2).

Révélateur : anisaldéhyde sulfurique à 5% lecture au visible après chauffage.

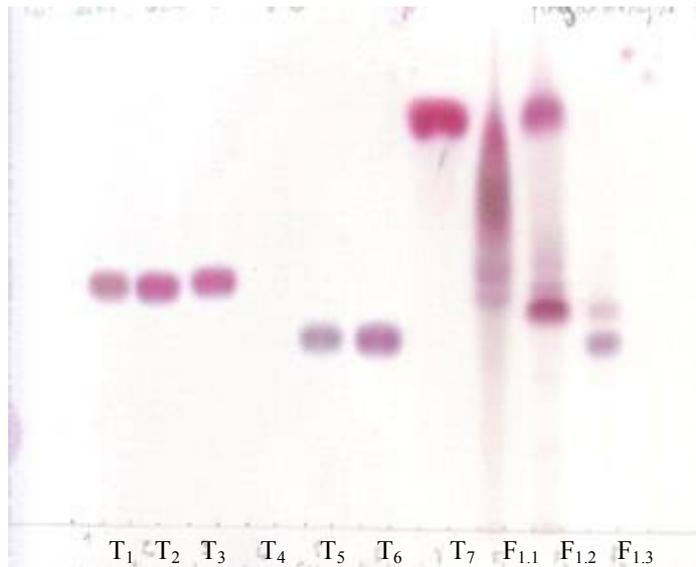
Les tests antimicrobiens (Tableau.12) ont montré que seules les fractions F_{2.0} et F_{3.0} et la phase hexanique inhibent la croissance de *D. congolensis*. Cependant, la faible activité des fractions F_{1.2} et F_{1.3} provenant du fractionnement de F_{1.0} prouve qu'il existe bien des composés actifs dans la fraction F_{1.0} mais qu'ils sont probablement en faible quantité.

Fractions et témoins (640ppm)	Diamètre de zone d'inhibition (cm)	
	10µl (6.4µg)	20µl (12.8µg)
Tétracycline	6.5	7
Oxacilline	6.5	7
Phase hexanique	1	1
F _{1.0}	Pas d'activité	Pas d'activité
F _{2.0}	1	1.5
F _{3.0}	1	1.5
F _{1.1}	Pas d'activité	Pas d'activité
F _{1.2}	0.4	0.5
F _{1.3}	0.3	0.5

Tableau. 12 : activité antimicrobienne des fractions de la phase hexanique

III.3.3.2. Analyse GC/MS des fractions F_{1.1} F_{1.2} et F_{1.3}

L'analyse CCM de ces fractions en utilisant des standards de certains terpènes et stérols disponible, a montré la présence de spots migrant aux mêmes R_f que l' α -amyrine, du β -amyrine, du Lupéol, du stigmastérol, du β -sitostérol et du squalène (figure 30). De plus les fractions F_{1.2} et F_{1.3} se sont montrées légèrement actives sur le *D. congolensis* contrairement à la fraction de départ F_{1.0}



Témoins : t₁ = α -amyrine ; t₂ = β -amyrine; t₃ = Lupéol ; t₄ = Campestanol ; t₅ = Stigmastérol ; t₆ = β -sitostérol ; t₇ = Squalène.

- **Système de solvant :** toluène/ acétate d'éthyle/méthanol (80/18/2).

- **Révéléteur :** anisaldéhyde sulfurique à 5% observation à la lumière du jour après chauffage

Figure.30 : Analyse CCM des fractions F_{1.1}, F_{1.2}, F_{1.0}

Nous avons alors décidé de faire une analyse GS/MS pour identifier les composés présents dans ces fractions. L'analyse a été faite en utilisant différents témoins (cfr matériel et méthodes). Les résultats (Figure. 31a, b, c, d ; Tableau.13) confirment ceux de l'analyse CCM et montrent que la fraction F_{1.0} contient principalement du phytol, du campestanol, du stigmastérol et du β -sitostérol qu'on retrouve dans les fractions F_{1.2} et F_{1.3}. On note la présence du squalène dans la F_{1.1}, l' α -amyrine, le lupéol, et le β -amyrine dans la F_{1.2} qui n'avaient pas pu être identifiés dans la F_{1.0} car présents en trop faible quantité.

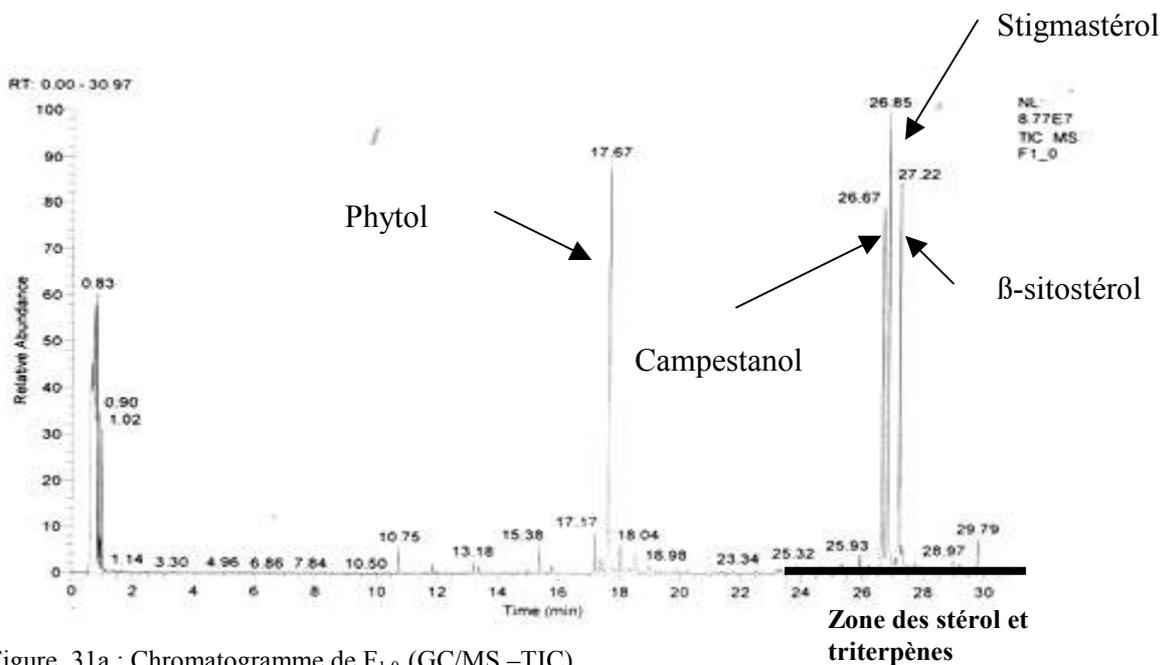


Figure. 31a : Chromatogramme de F_{1.0} (GC/MS –TIC)

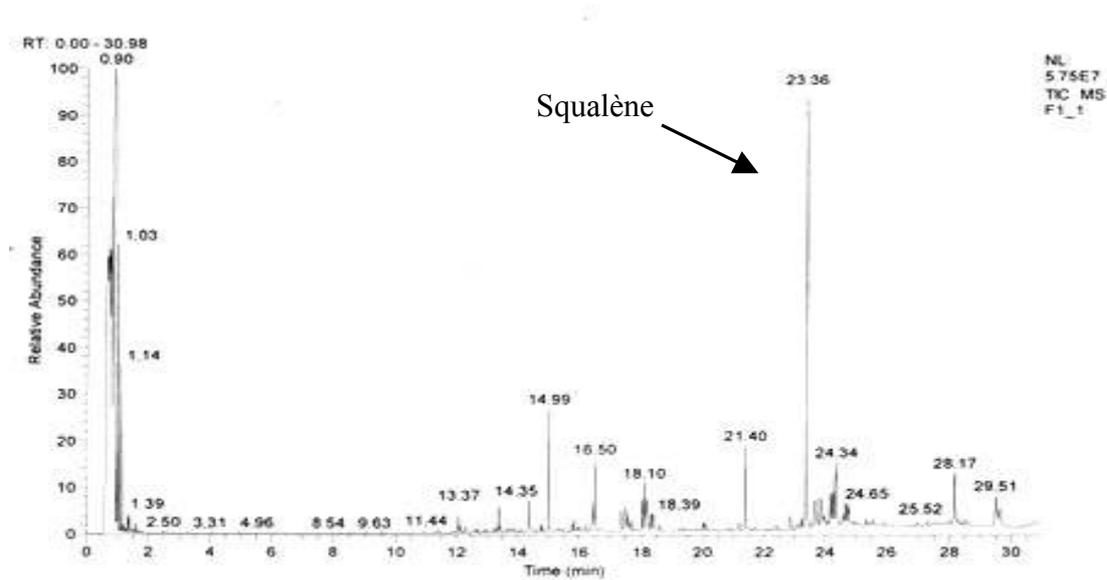


Figure.31b : Chromatogramme de F_{1.1} (GC/MS -TIC)

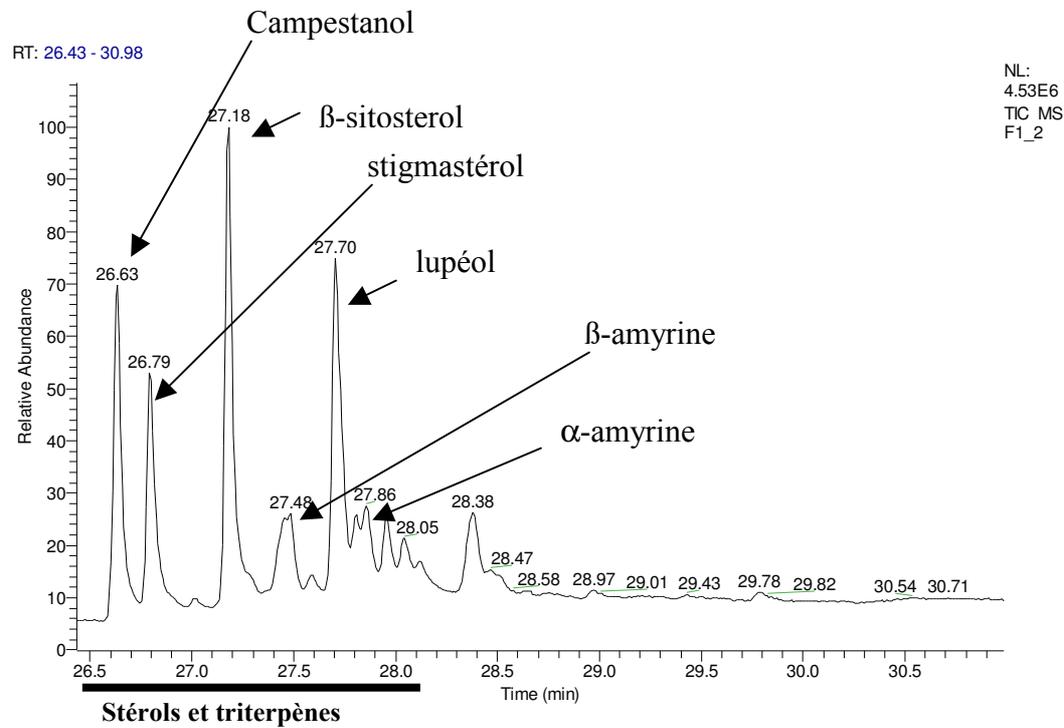


Figure.31c : Chromatogramme GC/MS de la fraction F_{1.2} (TIC agrandissement partie Tr > 26,5 min)

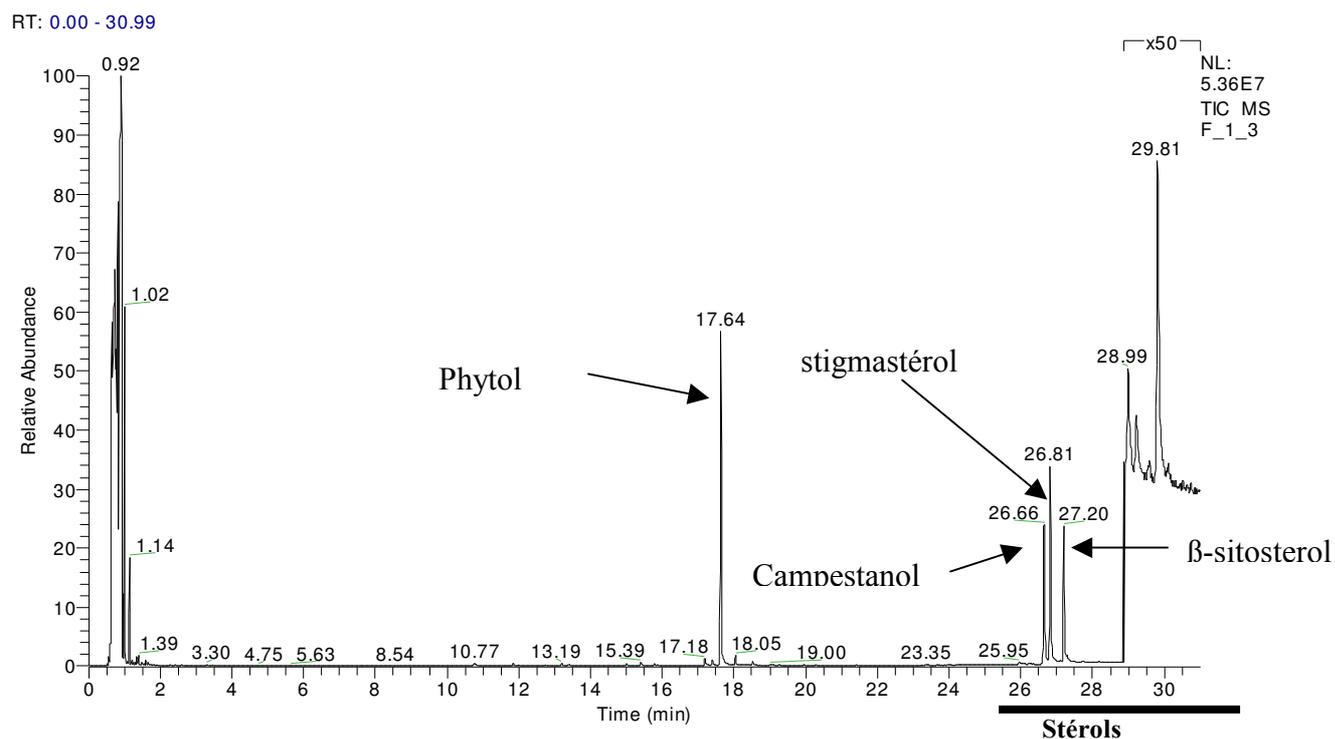


Figure.31d : Chromatogramme GC/MS de la fraction F_{1.3} (TIC)

Composé (standard)	t _R (min)	Structures et Masse moléculaires	Fractions
phytol	17,67	<chem>CC(C)CCCC(C)CCCC(C)CCCC(C)C=CCO</chem> M = 296	F _{1.0} , F _{1.3}
squalène	23,36	<chem>CC(C)=CC(=C)CC(=C)CC(=C)CC(=C)CC(=C)CC(=C)CC</chem> M = 356	F _{1.1}
campestanol	26,60	<chem>CC(C)CC(C)C1CCC2C(C1)C=CC3C2CCC(O)C3</chem> M = 400	F _{1.0} , F _{1.3} et F _{1.2}

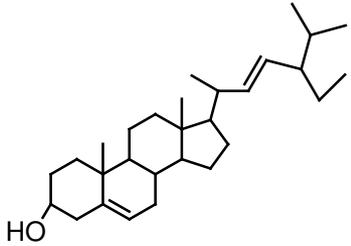
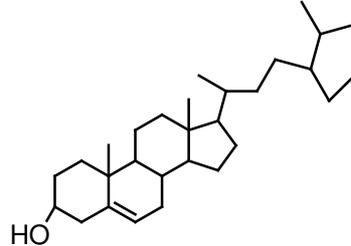
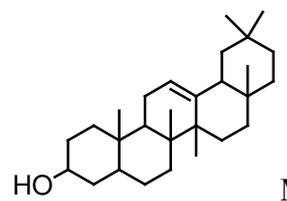
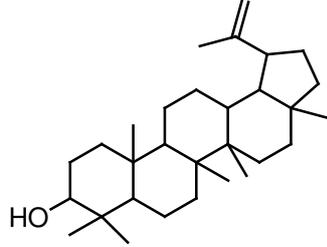
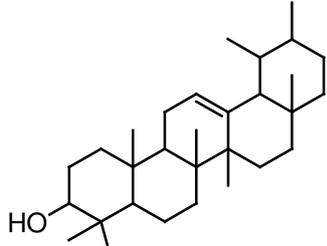
stigmastérol	26,8		F _{1.0} , F _{1.2} , F _{1.3}
		M = 412	
β-sitostérol	27,2		F _{1.0} , F _{1.2} , F _{1.3}
		M=414	
β- amyrine	27,5		F _{1.2}
		M = 426	
lupéol	27,8		F _{1.2}
		M = 426	
α-amyrin	27,9		F _{1.2}
		M = 426	

Tableau.14 : Structure et temps de rétention des différents composés identifiés dans les fractions F_{1.0}, F_{1.1}, F_{1.2} et F_{1.3} par GS/MS

On remarque que la fraction F_{1.1} contient surtout du squalène et que la fraction F_{1.2} est la plus riche en stérol

Les Tests antimicrobiens des standards de l'α-amyrine, du β-amyrine, du lupéol, du campestanol, du stigmastérol, du β-sitostérol et du squalène sur le *D. congolensis* ont montré que seuls le lupéol l'α-amyrine et le β-amyrine avaient une activité inhibitrice sur le *D. congolensis* (Tableau.15).

Standards et témoins (640ppm)	Diamètre de zone d'inhibition (cm)	
	10µl (6.4µg)	20µl (12.8µg)
Tétracycline	6.5	7
Oxacilline	6.5	7
α-amyrine	0.4	0.6
β-amyrine	0.4	0.5
Lupéol	0.3	0.4
campestanol	Pas d'activité	Pas d'activité
phytol	Pas d'activité	Pas d'activité
stigmastérol	Pas d'activité	Pas d'activité
β-sitostérol	Pas d'activité	Pas d'activité
squalène	Pas d'activité	Pas d'activité

Tableau.15 : activité antimicrobienne des standards des terpènes et stérol identifiés dans la phase hexanique

Ces résultats confirment des études récentes qui ont montré que ces composés présentaient une activité antimicrobienne, bien prononcée pour le lupéol (Freire, Marcia de Fatima Inacio et al. 2002 ; Singh B. et al. 2003 ; Woldemichael et al. 2003, Borges-Argaez et al. 2000) et modérée pour l'α-amyrine et le β-amyrine (Mahran G. et al. 1993; Ramesh, N. et al. 2001 ; Singh B. et al. 2003 ; Woldemichael et al. 2003, Borges-Argaez et al. 2000).

On peut alors penser que la faible activité de la fraction F_{1,2} est bien due à ces composés qui sont présents dans la plante en faible quantité. Mais nous n'avons pas isolé ces composés à cause de la faible quantité des fractions d'une part et du fait qu'ils sont largement connus et étudiés d'autre part.

III.3.3.3. Purification des composés A + B des fractions F_{2,0} et F_{3,0}

Les composés A+B ont été purifiés par une MPLC des fractions F_{2,0} et F_{3,0} en éluant par la phase mobile (système1). Le mélange des composés A+B est une poudre blanche que nous avons utilisé pour la confirmation des structures de ces composés par RMN 1D en comparant les spectres témoins avec ceux des mélanges des standards de AO et AU et A + B isolé .

III.3.3.4. Détermination de structure des composés A, B et C

La détermination de structure des composés A+B et C isolés a été réalisée en combinant les données obtenues à l'aide de différentes techniques telles que la spectrométrie de masse (SM), l'infra rouge (IR), la spectrophotométrie UV, et la résonance magnétique nucléaire (RMN). Le traitement de l'ensemble de ces informations et la comparaison des résultats avec ceux trouvés dans la littérature nous a permis de confirmer la structure moléculaire des composés isolés. Les composés actifs isolés étant déjà connus, nous avons fait les spectres RMN des témoins pour comparaison et confirmation.

III.3.3.4.1. Structure du composé C

Le composé C est une poudre jaune soluble dans les solvants organiques. Le spectre UV/vis dans le dichlorométhane du composé C est identique à celui du standard du 2-azaanthraquinone (Sigma) et montre un maximum d'absorption entre 280 et 350nm (Figure.32).

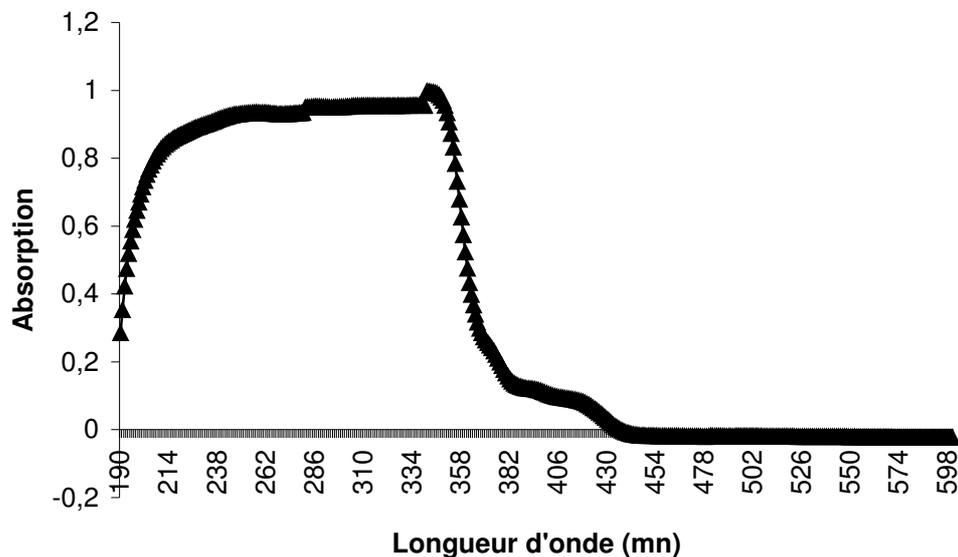


Figure.32 : spectre UV/vis du composé C

Le composé C absorbe entre 3096 et 3023 cm^{-1} correspondant aux bandes d'élongation C-H des composés hétéroaromatiques (Silverstein, 1991, p124) et entre 1336 et 1298 cm^{-1} avec une forte intensité caractéristiques des élongations C-N des amines aromatiques tertiaires (Figure. 33). Aussi on note sur le même spectre des absorptions de forte intensité à 1679 cm^{-1} caractéristique des élongations C=O et entre 1579 – 1478 cm^{-1} caractéristique des squelettes aromatiques.

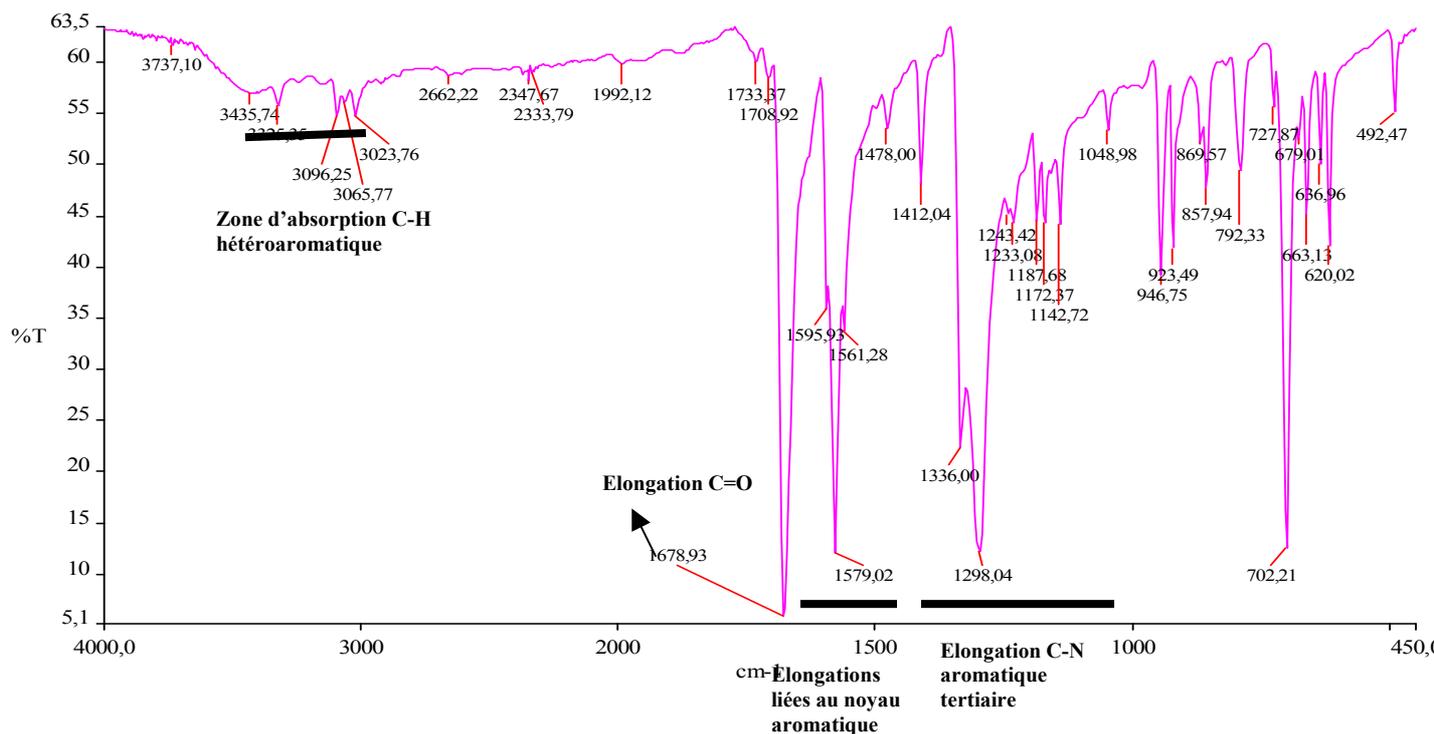


Figure.33 : spectre IR du composé C

L'injection directe du composé C dans la source puis analyse en mode APCI donne le spectre de la figure.34. On observe bien les pics $m/z = 211.2$ $[MH + H]^+$, 210.2 $[MH]^+$ et 182.2 (correspondant à la molécule après élimination de $[NH_4]^+$ caractéristique de la 2-azaanthraquinone. Le spectre du composé C est identique à celui du standard de la 2-azaanthraquinone.

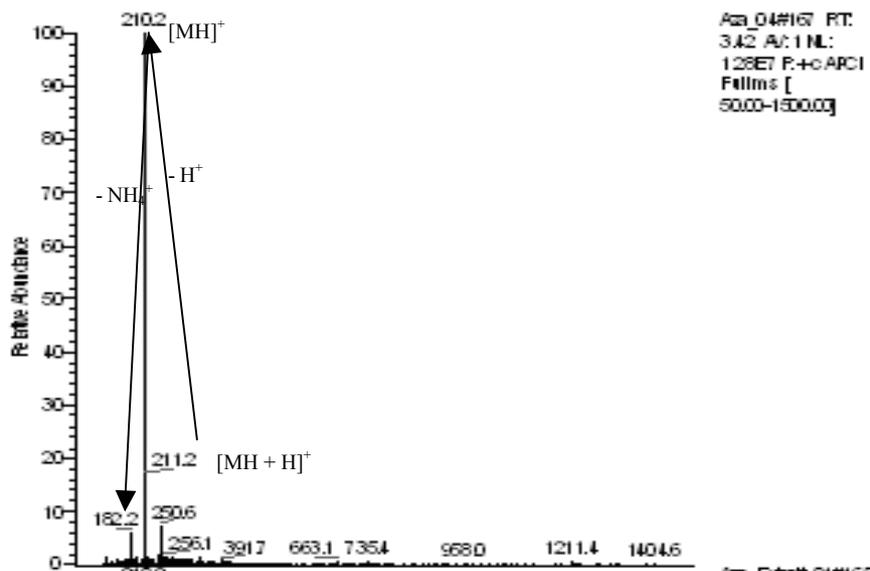


Figure.34 : Spectre de masse en mode APCI du Composé C.

La lecture des spectres ^{13}C -RMN (Figure.35) et ^1H -RMN (Figure.36) du composé C dans le CDCl_3 et la comparaison des valeurs des déplacements chimiques du carbone avec celles de Okunadé (tableau.16) prouve bien que le composé C est la 2-azaanthraquinone (Figure.37)

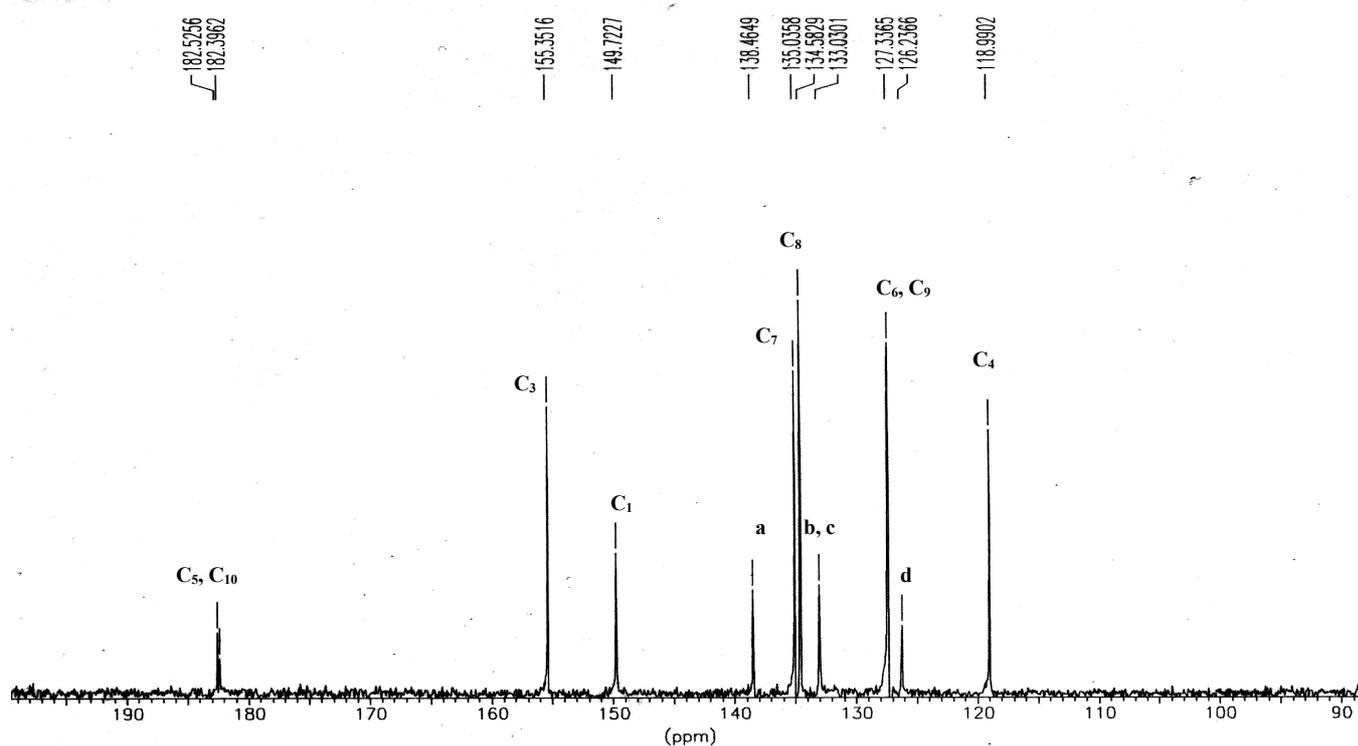


Figure.35 : Spectre ^{13}C -RMN du composé C dans le CDCl_3

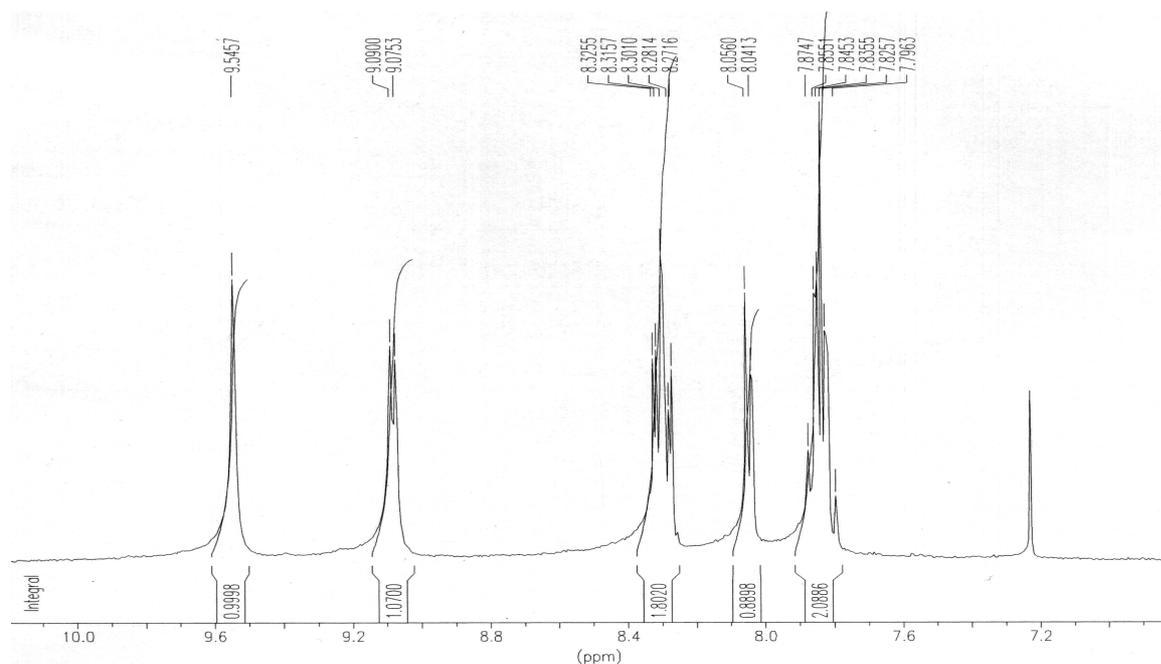


Figure.36 : spectre ^1H -RMN du composé C dans le CDCl_3

N° de carbone	Spectre (Okunade et al.)		Spectre (Extrait <i>Mitracarpus scaber</i>)	
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) multiplicités
1	147.9		149.72	9.5 s
2	-	-	-	-
3	153.1		155.35	9.0 d
4	120.1		119	8.32 d
a	139.6		138.46	-
5	181.6		182.52 (0.33)	-
b	132.9		133.03	-
6	127.5		127.33	8.04 d
7	135.2		135.03	7.80 t
8	134.9		134.58	7.90 t
9	127.4		127.33	8.05 d
c	132.9		133.03	-
10	181.4		182.39 (0.34)	-
d	127.2		126.23	-

Tableau. 16 : données spectroscopiques ^{13}C et ^1H RMN du composé C dans le CDCl_3 Comparées à celle des travaux de Okunade et al.

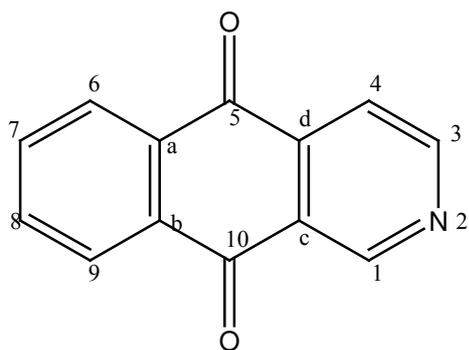


Figure.37 : structure de la 2-azaanthraquinone (Composé C)

III.3.3.4.2 Détermination de structure des composés A et B

Le mélange des composés A+B est une poudre blanche insoluble dans le méthanol, peu soluble dans l'éthanol et soluble dans les solvants organiques. Le spectre IR (figure. 38) des composés présente des pics d'absorption évasés à forte intensité à 3400 et 2900 cm⁻¹ caractéristiques du -OH de la fonction carboxylique sur un cycle non aromatique (Charles J. Pouchert).

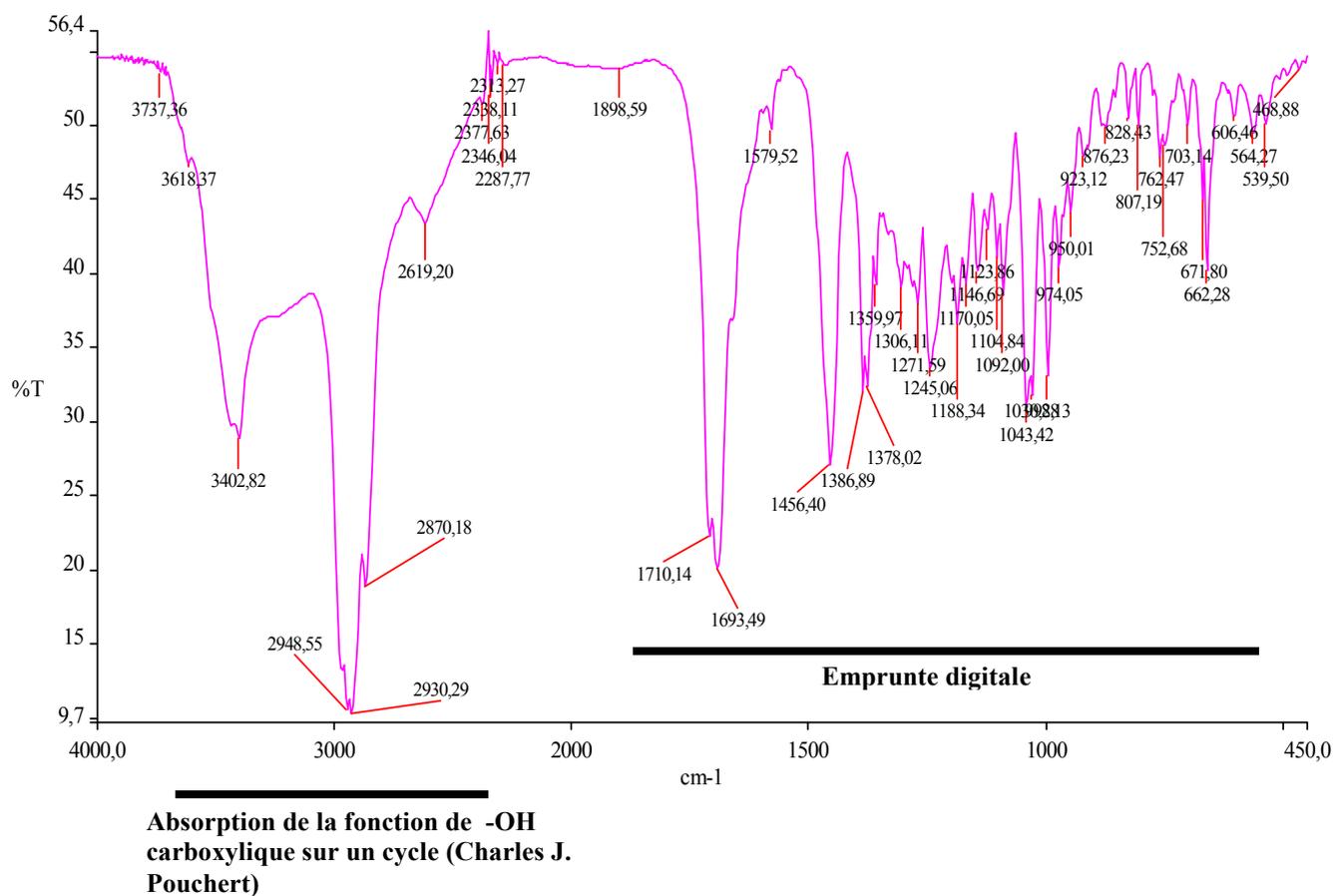


Figure.38 : spectre IR des composés A+B

Une injection directe du mélange A + B dans la source en mode APCI donne le spectre de la figure.39. On observe bien les pics $m/z = 457 [M + H]^+$, 439 et 393 qui sont caractéristiques des triterpènes acides et particulièrement des acides oléanolique et ursolique (Van der Doelene et al. 1998).

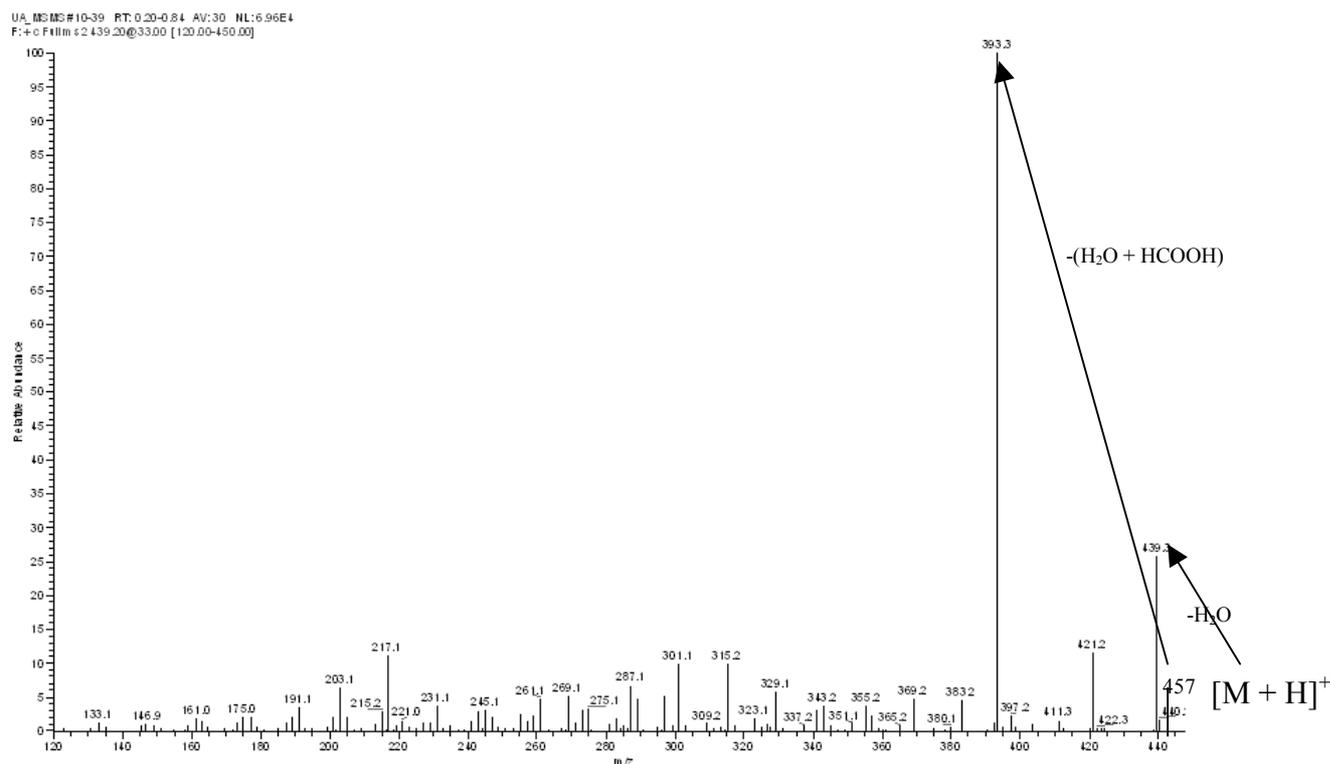


Figure 39 : Spectre de masse en mode APCI du mélange A + B.

Les spectres RMN des composés A + B et des standards des acides oléanolique (composé A, Figure.43) et ursolique (composé B, Figure. 43) sont identiques (Figure. 40a) et montrent les déplacements chimiques $\delta = 178, 144$ et 78 ppm caractéristiques respectivement de C_{28} , C_{13} , C_3 des deux acides et 125 ppm et 122 ppm caractéristiques respectivement du C_{12} de l'acide oléanolique et C_{12} de l'acide ursolique (B.V. Charlood. 1991). On note également les différents déplacements chimiques des carbones C_{19} et C_{20} des deux acides soit $\delta = 55$ et 33 ppm pour l'acide oléanolique et 39 et 42 ppm pour l'acide ursolique (B.V. Charlood. 1991). On observe également une série de pics dans la région aliphatique correspondants aux autres carbones du squelette des deux acides (B.V. Charlood. 1991). Ces résultats ont été confirmés avec quelques shifts par une analyse théorique avec le Chemdraw version 2004 (figure 40b).

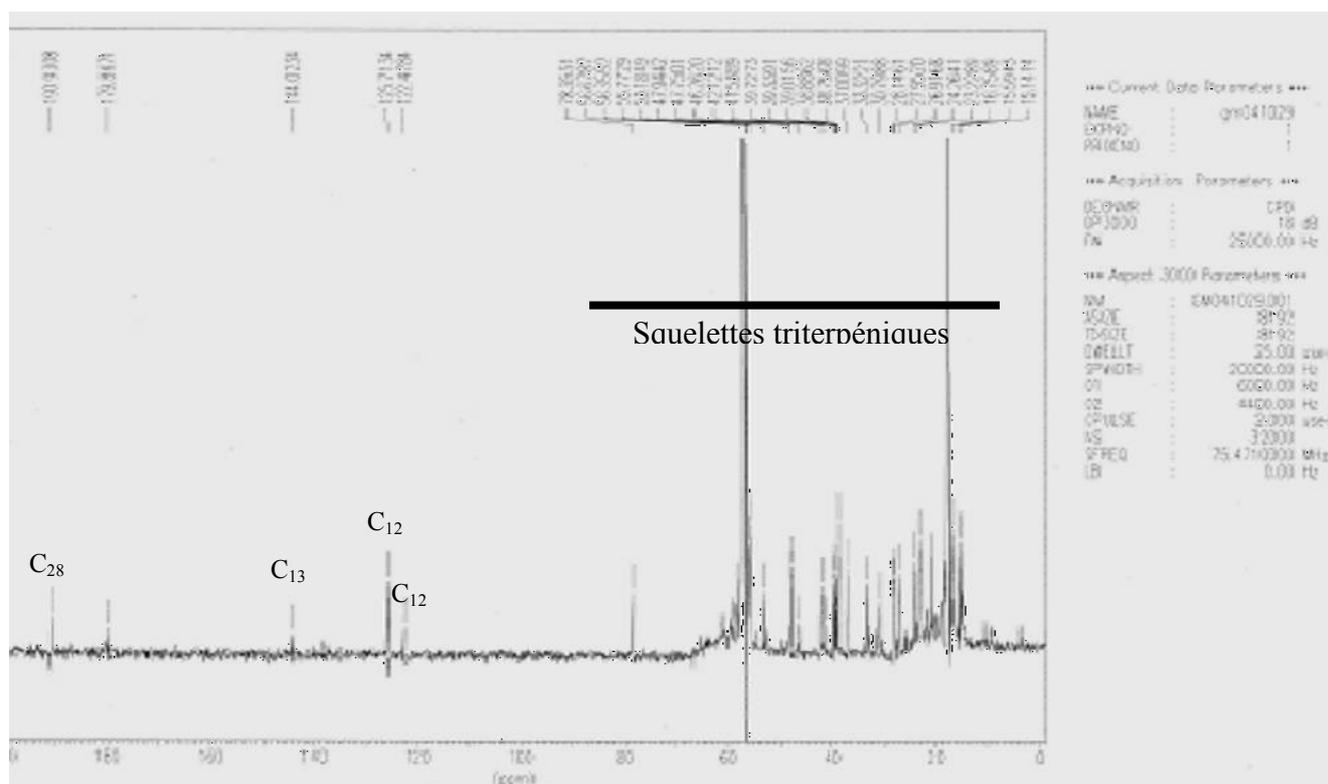


Figure.40a: Spectre ¹³C-RMN des composés A + B dans l'éthanol et le DMSO deutéré

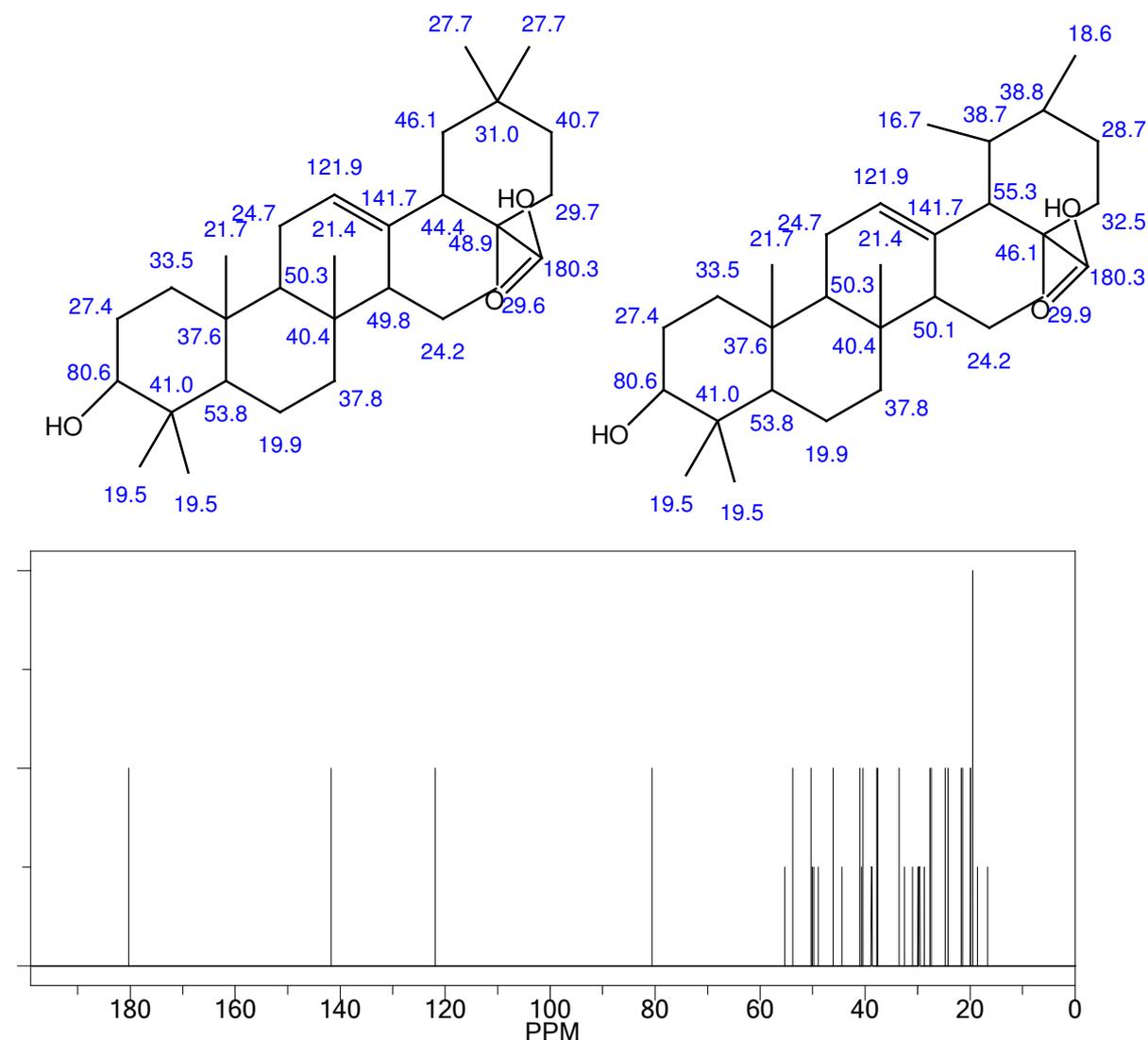


Figure.40b: estimation ¹³C-RMN par le Chemdraw version 2004 du mélange des acides oléanolique et ursolique

Une analyse LC/UV/MS et MS² en mode APCI positive du mélange A + B (Figures.41 et 42) montre deux pics en UV qui donnent en masse des spectres caractéristiques des acides oléanolique et ursolique (G.A. Van der Doelen et al. 1998). L'analyse comparative des spectres LC/UV/MS des témoins des acides oléanolique et ursolique montre bien qu'il y a dans cette fraction les deux triterpènes. Ces spectres ainsi que le MS² confirment et montrent bien la présence des pics *m/z* : 457, 439, 411 et 393 caractéristiques des deux triterpènes (G.A. Van der Doelen et al. 1998).

C:\Xcalibur\data\Fernand\Data\UA+OA_21
MS + MSMS/ UV 215 nm

05/13/2005 11:07:46 AM

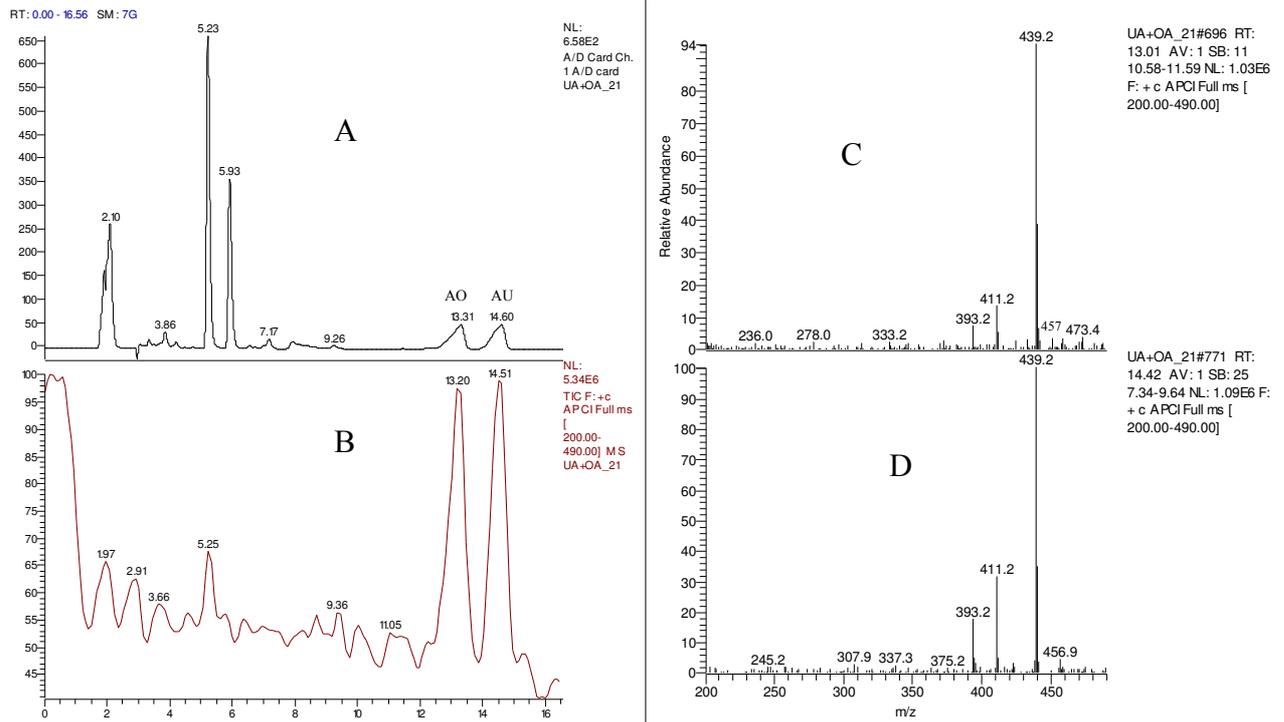


Figure.41 : Chromatogramme LC/UV (A) et LC/MS (TIC :B) du mélange A + B et spectres de masse des pics Tr 13,31 et 14,51 (C et D)

C:\Xcalibur\data\Fernand\Data\UA+OA_21
MS + MSMS/ UV 215 nm

05/13/2005 11:07:46 AM

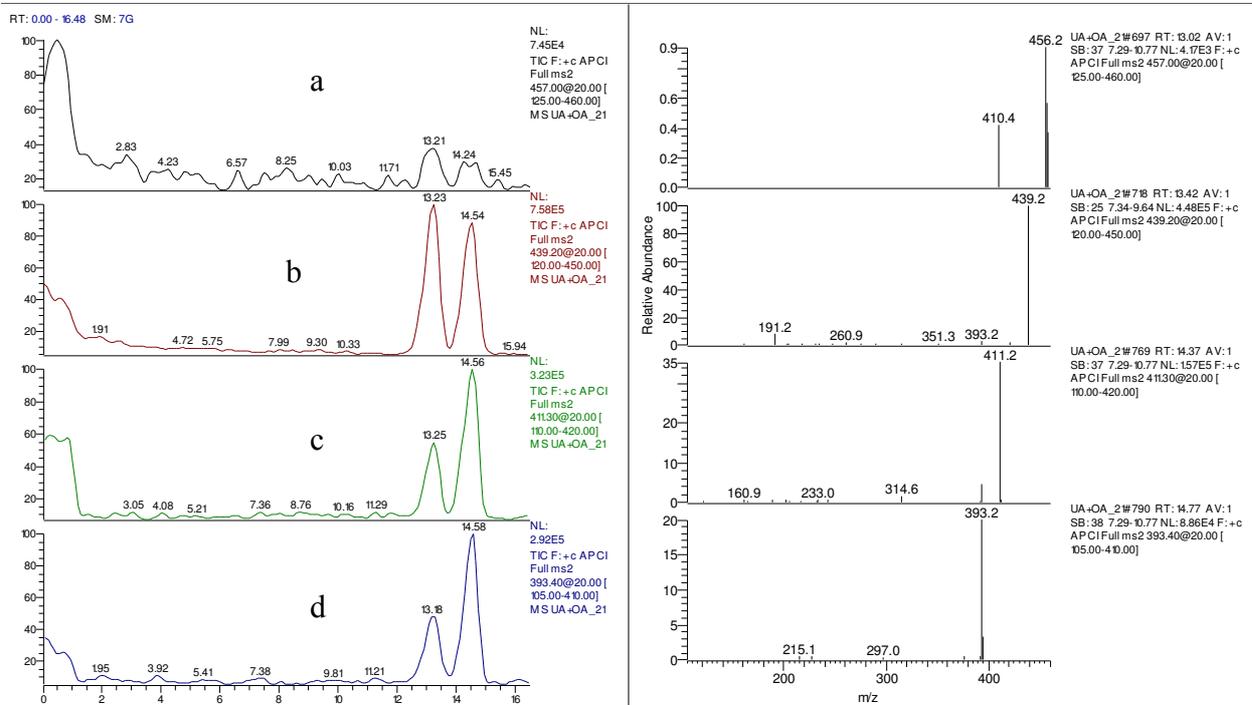


Figure.42 : Chromatogramme MS² des ions m/z: 457 (a), 439 (b), 411(c) et 393 (d) du mélange A + B

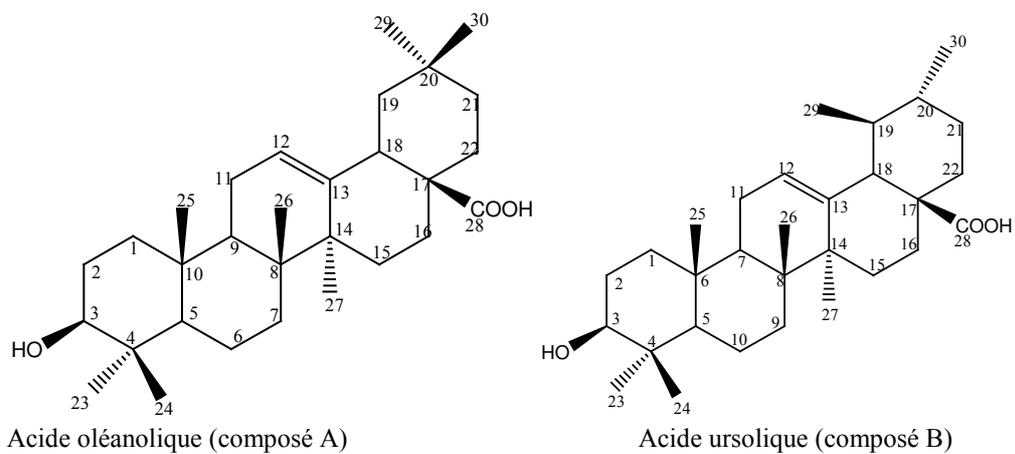


Figure. 43 : structure de l'acide oléanolique (composé A) et l'acide ursolique (composé B)

III.3.4. Conclusion

Grâce à la comparaison des différents spectres obtenus avec ceux de référence, nous avons vérifié la structure de trois molécules isolées. Ce sont bien les trois molécules initialement supposées : la 2-azanthraquinone (AAQ), l'acide oléanolique (AO) et l'acide ursolique (AU) mais seule la 2-azanthraquinone a été précédemment isolée d'une espèce nigériane de *M. Scaber*. Les acides oléanolique et ursolique sont isolés ici pour la première fois du *M scaber*. Par ailleurs, nous avons également identifié dans la plante : l' α -amyrine, la β -amyrine, le lupéol, le campestanol, le stigmastérol, le β -sitostérol le squalène et du phytol dans l'extrait éthanolique, des molécules terpéniques largement répandues mais non connues dans le *M. scaber*. Parmi ces molécules seuls l'AAQ, l'AO et l'AU, le lupeol, l' α et la β -amyrine ont montré des activités antimicrobiennes sur *D. congolensis*.

III.4. Conclusion

Nous avons sélectionné le *M. scaber* car c'est une plante fréquemment utilisée en médecine traditionnelle africaine pour traiter les dermatoses humaines et qui est active *in vivo* sur la dermatophylose bovine. De plus sa phytochimie et ses propriétés pharmacologiques sont peu connues.

La première étape de ce travail consistait à mettre en évidence les principales classes de principes actifs contenus dans la plante. Nous avons ainsi montré que les feuilles de *M. scaber* étaient riches en terpènes et stéroïdes et en huile essentielle. Les feuilles contiennent également des tanins, des flavonoïdes et des alcaloïdes. Ces résultats étaient en concordance avec les données bibliographiques du genre *Mitracarpus* connu pour contenir principalement des alcaloïdes et des terpènes.

Nous avons ensuite entrepris d'étudier les propriétés antimicrobiennes *in vitro* de cette plante sur le *Dermatophilus congolensis* et isoler les molécules responsables de cette activité. Parmi les 3 fractions obtenues par fractionnement sur colonne à pression atmosphérique de l'extrait éthanolique de feuilles, c'est l'extrait le plus apolaire (F₁) qui s'est révélé le plus actif. Une analyse par chromatographie sur couche mince a permis de mettre en évidence la complexité de cette fraction et sa richesse en molécules de la classe des terpènes ou des stéroïdes.

Avant de débiter les fractionnements et les isollements, une grande quantité d'extrait éthanolique a été préparé par percolation. Ensuite, cet extrait a été fractionné par fractionnement liquide – liquide suivi de la MPLC.

De la fraction la plus active des spots migrant aux mêmes R_f que la 2-azaanthraquinone, l'acide oléanolique et l'acide ursolique ont été identifiés. De plus, nous avons identifié un spot migrant au même R_f que la rutine dans la fraction inactive (F₃)

L'extraction spécifique des alcaloïdes totaux nous a permis d'avoir une fraction d'alcaloïde totale et une fraction hexanique toutes deux actives sur le *D. congolensis*. De l'extrait alcaloïdique total, a été purifiée la 2-azaanthraquinone par CCM-prep. La structure du composé isolé a été confirmée par différentes analyses spectrales.

Des fractionnements MPLC ont permis d'identifier après analyse GC/MS 8 molécules non connues de *M. scaber* dont : l' α -amyrine, la β -amyrine, le Lupéol, le campestanol, le stigmastérol, le β -sitostérol, le squalène et le phytol. De cette même fraction hexanique ont été purifiés par MPLC les acides oléanolique et ursolique dont les structures ont été confirmées par différentes analyses spectrométriques (SM, LC/MS, UV, IR et RMN).

Les standards de l' α -amyrine, du β -amyrine, et du lupéol sont actifs sur le *Dermatophilus congolensis* seulement ils sont en de très faible quantité.

La 2-azaanthraquinone et les acides oléanolique et ursolique présentent les meilleures activités antimicrobiennes sur le *D. congolensis*.

La prochaine étape de ce travail sera de quantifier les trois molécules isolées afin de voir si elles agissent par additivité ou en synergie avec d'autres molécules.

IV. Développement et validation de méthodes de quantification

IV. DÉVELOPPEMENT ET VALIDATION DE MÉTHODES DE QUANTIFICATION

Afin d'estimer les teneurs des trois composés actifs isolés, des méthodes de chromatographie à haute performance ont été développées, validées et utilisées pour quantifier ces composés dans la plante.

Le but de cette partie est non seulement de quantifier les composés actifs de *Mitracarpus scaber* sur le *D. congolensis* mais aussi de développer des méthodes fiables rapides et peu coûteuses. Nous avons choisi de développer une technique de chromatographie sur couche mince à haute performance car elle répond bien à ces critères. Pour valider les résultats obtenus en CCMHP pour la quantification des acides triterpéniques, nous avons développé et validé une méthode de chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

IV.1. Généralités

IV.1.1. Objectif de la validation

Le but de la validation d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue. En d'autres termes, la validation a pour objectif de démontrer les performances de la technique de dosage et de prouver que les résultats obtenus sont fiables et, ce dans les limites bien définies.

IV.1.2. Phase de validation

Il est communément admis que la mise en œuvre d'une procédure de dosage peut se décomposer en quatre phases successives :

- une phase de développement (mise au point de la méthode),
- une phase de prévalidation,
- une phase de validation,
- une phase d'application en routine.

IV.1.2.1. PHASE DE PREVALIDATION

Son objectif est de préparer tous les éléments qui sont nécessaires à la validation formelle de la technique. Elle doit permettre d'identifier la fonction de réponse comme courbe de calibration, de définir le seuil de détection, d'estimer les seuils de quantification, d'évaluer l'intervalle de dosage ainsi que le nombre des points de la gamme de calibration, de déterminer le rendement d'extraction (absolu de préférence) et de vérifier la sélectivité.

IV.1.2.2. PHASE DE VALIDATION

Son objectif est de démontrer la sélectivité, de valider le modèle de calibration qui sera utilisé en routine, de vérifier la linéarité, d'estimer l'exactitude, d'estimer la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) et de valider le seuil de quantification.

IV.1.3. Définition des critères de validation

Par souci de clarté, il est primordial de définir les critères de validation utilisés. En effet, selon l'organisme de normalisation, un critère se définit parfois différemment.

IV.1.3.1. SPECIFICITE ET SELECTIVITE

La sélectivité d'une procédure analytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents.

Une procédure d'analyse est dite spécifique lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser et qu'elle permet de mesurer quantitativement un paramètre physico-chimique ou un groupe de fonction d'une ou de plusieurs substances dans l'échantillon. Dans le cadre des méthodes chromatographiques, il est préférable de parler de sélectivité (Vessman J., 1996).

IV.1.3.2. SENSIBILITE

La sensibilité d'une procédure peut être définie comme étant le rapport de la variation de la réponse d'analyse à la variation de la quantité d'analyte.

Une procédure est dite sensible si une faible variation de la concentration ou de la quantité d'analyte entraîne une variation importante de la réponse.

IV.1.3.3. FONCTION DE REPOSE (COURBE DE CALIBRATION)

La fonction de réponse d'une procédure d'analyse traduit, à l'intérieur d'un intervalle de dosage, la relation existant entre la réponse (signal) et la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon. La fonction de réponse monotone la plus simple qui exprime cette relation est appelée courbe de calibration.

V.1.3.4. LIMITE DE DETECTION

La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité à examiner dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure.

IV.1.3.5. RECUPERATION OU RENDEMENT

Le rendement d'extraction absolu peut être obtenu par le rapport des signaux mesurés, d'une part après traitement de l'échantillon chargé avec une quantité connue et d'autre part après injection directe dans le système analytique d'une solution de référence contenant une concentration équivalente de substance à examiner.

Le rendement d'extraction absolu est un critère important pour les procédures nécessitant une extraction préalable du principe actif.

IV.1.3.6. FIDELITE

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion, coefficient de variation) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène (résultats d'essais indépendants) dans des conditions prescrites.

La fidélité fournit une indication sur les erreurs dues au hasard. La fidélité peut être évaluée à trois niveaux : la répétabilité, la fidélité intermédiaire (intra laboratoire) et la reproductibilité (inter laboratoire).

Répétabilité : Conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur un même lot laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps.

Fidélité intermédiaire : Condition où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné.

Reproductibilité : Condition où les résultats d'essais sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents.

IV.1.3.7. JUSTESSE (BIAIS)

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur de référence acceptée (ex : standard international, standard d'une pharmacopée).

La mesure de la justesse est généralement exprimée en terme de biais ou de pourcentage de recouvrement (erreur systématique).

IV.1.3.8. EXACTITUDE

L'exactitude exprime l'étroitesse entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée. L'étroitesse de l'accord ainsi observé est la résultante de la somme des erreurs systématique et aléatoire, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité.

IV.1.3.9. LIMITE DE QUANTIFICATION

La limite de quantification est la petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions décrites avec une exactitude définie.

IV.1.3.10. INTERVALLE DE DOSAGE

L'intervalle de dosage d'une procédure d'analyse est la région entre les niveaux supérieur et inférieur (ces valeurs incluses) pour lequel il a été démontré que la procédure est appropriée quant à la fidélité, l'exactitude et sa linéarité, en utilisant la méthode décrite.

IV.2. Stratégie utilisée

Nous avons choisi de valider notre technique selon la stratégie de la SFSTP (Société française des sciences et technique pharmaceutiques). Ce protocole a été initialement développé pour l'analyse des échantillons biologiques mais peut aisément s'appliquer aux méthodes utilisées dans l'industrie agroalimentaire ou celles utilisées dans l'environnement.

IV.2.1. Préalables

Dans ce travail, il faut remarquer les points suivants :

- les substances à doser sont des substances propres à la matrice, et non des composés résultants d'une addition volontaire ou accidentelle ; ce qui exclut la possibilité de disposer d'une matrice vierge,
- la méthode a été validée pour le standard et utilisée pour quantifier les composés dans l'extrait,
- la matrice n'est pas une matrice type, c'est à dire qu'elle peut différer en fonction de toute une série de paramètres (plante sauvage, conditions de culture, traitement après récolte...),

- une analyse en chromatographie sur couche mince consiste en l'étude d'un certain nombre d'échantillons en même temps ; en ce qui nous concerne, nous avons utilisé des plaques de chromatographie de 10 x 20 cm et nous effectuons des dépôts d'une largeur de 5 mm espacé de 10 mm dans le sens de la longueur de la plaque. Nous déposons ainsi souvent 10 échantillons par plaque,
- les dépôts se font généralement manuellement.

Chacun de ces facteurs ont été considéré lors de l'élaboration de la stratégie de la validation.

IV.2.2. Phase de prevalidation

IV.2.2.1. La sélectivité

Dans ce travail, ce critère est pris en compte par la comparaison des spectres des spots des molécules dans l'extrait et celle du témoin. Il est vérifié dans la partie mise au point de la méthode.

IV.2.2.2. Etablissement de la fonction réponse

Etablir la fonction réponse consiste à déterminer la proportionnalité existant entre la réponse chromatographique (y) exprimée en unité arbitraire de surface et la teneur en analyte (x). Lorsque la regression est linéaire : $Y = ax + b$.

La fonction de réponse est établie à partir d'une gamme de calibrations, chaque point de gamme étant répété 3 fois. L'intervalle d'étalonnage est choisi en tenant compte des limites de détections et de quantifications. Compte tenu du coût élevé des produits de référence, une seule solution mère est préparée par série, à partir de laquelle, les solutions étalon sont préparées de façon indépendante. Par gammes de calibration, il y a autant de solutions étalon qu'il y a de points de gamme, le volume déposé ou injecté étant constant pour chaque analyse (10µl, ou 5µl pour la CCMHP et 20 µl pour l'HPLC). Les 5 séries ou gammes de calibration sont analysées de façon indépendante.

L'ensemble des réponses obtenues pour les cinq séries est représenté graphiquement, c'est à dire en reportant l'absorbance exprimée en surface sous courbe obtenue en fonction

de la concentration (quantité) de composé. La relation entre l'absorbance et la quantité déposées est également recherchée pour chaque série.

Si la relation réponse/concentration ne correspond pas à une relation linéaire, la relation sera linéarisée à l'aide d'une transformation (pondération, modèle polynomial...).

IV.2.2.3. La limite de détection

Une façon de déterminer la limite de détection est de considérer qu'elle correspond à la concentration dont la réponse équivaut à l'amplitude de bruit de fond multipliée par trois (Pharmacopée Européenne 4, 2002).

Cette approche s'applique aux techniques de chromatographie que nous avons utilisées.

IV.2.2.4. Taux de récupération

La récupération (ou rendement d'extraction) correspond au rapport des signaux (surfaces de pic) mesurés d'une part après extraction, selon la procédure décrite, d'échantillons de plante chargés et d'autres part après le dépôt (ou l'injection) direct d'une solution de référence renfermant une concentration équivalente à la quantité ajoutée d'analyte.

Compte tenu de l'impossibilité de disposer d'une matrice vierge en analyte ou de matrice certifiée conforme, la surface du pic occupée par l'analyte dans la plante doit être déterminée pour pouvoir, après soustraction, estimer le rendement d'extraction..

Ainsi, le rendement d'extraction est estimé par :

Taux de récupération (%) = $[(A - B)/C].100$, Où :

- A est la quantité d'analyte extraite du mélange poudre de la plante avec ajout des deux acides,
- B est la quantité d'analyte dans la poudre de la plante sans ajout,
- C est la quantité de AO ou AU ajoutée.

IV.2.3. Phase de validation

IV.2.3.1. Fonction de réponse

La fonction de réponse est établie à partir de cinq niveaux de concentrations ($m = 5$) déposés ou injectés chacun trois fois ($n = 3$) et elle est calculée selon les modalités retenues lors de la prévalidation.

La même solution mère est utilisée pour les p_a séries. A partir de cette solution, m_a solutions filles sont préparées de façon à toujours déposer, sur la plaque ou à injecter le même volume. Comme point de gamme, on prend la limite de quantification, la limite supérieure de concentration choisie et les concentrations médianes et cet intervalle.

IV.2.3.2. Fidélité de la technique

Dans ce travail, nous nous sommes limités à vérifier la répétabilité et la fidélité intra et inter jour pour les techniques de CCMHP et en plus la fidélité intermédiaire pour la CLHP.

La fidélité inter jours est réalisée sur 5 jours et calculée à partir de 5 séries par jour qui servent pour le calcul de la fidélité intra jour.

Pour chaque série, une fonction réponse est établie et 3 standards de validation sont déposés à cinq reprises. Les trois solutions standards de validation sont préparées à partir de trois solutions mères différentes (différentes de celle utilisée pour la fonction réponse ou courbe de calibration). Elles sont préparées de telle manière que la concentration la plus élevée soit inférieure mais proche de la limite supérieure de concentration choisie. La troisième solution correspond à une concentration médiane. Compte tenu que les matrices de plantes ne sont ni des matrices vierges en analyte, ni des matrices « type », les solutions standards sont préparées dans des milieux simples assurant leur solubilisation (comme pour les témoins).

IV.2.3.2.1. Répétabilité

Pour chaque niveau de concentration j , la variance de répétabilité des concentrations X_{ijk} obtenu est estimée globalement pour toutes les p séries comme suit :

$$CV_j(r) = \frac{\sqrt{s_j^2(r)}}{\bar{X}_{\circ j \circ}} \cdot 100 = \frac{s_j(r)}{\bar{X}_{\circ j \circ}} \cdot 100 \quad \text{avec} \quad s^2(r) = \frac{\sum_{k=1}^p \sum_{i=1}^{n_{jk}} (X - \bar{X})^2}{\sum_k^p n_{jk} - p}$$

Dans ce travail, les erreurs de répétabilité sont exprimées sous forme de coefficient de variation (CV) en divisant l'écart type de répétabilité (racine carré de la variance) par la moyenne des concentrations estimées au niveau de la concentration j quelle que soit la série :

IV.2.3.3. Limite de quantification

La limite de quantification est considérée comme étant la limite inférieure de l'intervalle de dosage.

V.3. Développement et validation d'une méthode de quantification des acides oléanolique et ursolique par CCMHP-densitométrique.

IV.3.1. Mise au point de la technique

Nous avons, pour cette quantification, développé et validé une méthode de dosage de ces deux acides qui a été utilisée par la suite pour quantifier ces deux acides dans un extrait de la plante après avoir vérifié la sélectivité/spécificité de la méthode pour cet extrait et déterminé le rendement d'extraction.

IV.3.1.1. Choix du système chromatographique.

Nous avons testé 5 systèmes chromatographiques mais un seul a permis d'obtenir des pics fins analysable par densitométrique et une légère séparation des deux acides (système1 tableau.16).

Mode opératoire

- Phase stationnaire : Plaque CCM de silice F254 (sur support en verre)
Silicagel 60F254S, 10x20cm, Sigma
- Témoins : Acides oléanolique et Ursolique
- Essai : Extrait éthanolique
- Dépôts (5 µl ou 10 µl): En bande de 5mm et espacés de 10mm
- Phases mobiles : voir tableau
- Distance de migration : 80mm
- Révélation : Anisaldéhyde sulfurique pour lecture visuelle mais rien pour la lecture par le scanner 3

Phases mobiles	Rf oléanolique	Rf ursolique	$r_{R_{FAO}/R_{FAU}}$ *	Taille des spots
1 Toluene/ acétate d'éthyle /méthanol (80/18/2, v/v/v), 45min de saturation	0,32	0,33	1,03	fins
2 Hexane/ acétate d'éthyle /méthanol (10/5/2, v/v/v), 45min de saturation	0,30	0,30	1	épais
3 Toluene/ acétate d'éthyle /méthanol (60/18/2, v/v/v), 45min de saturation	0,45	0,45	1	épais
4 Hexane/ acétate d'éthyle (10/5, v/v) 45min de saturation	0,21	0,21	1	épais
5 Toluene/ acétate d'éthyle /acetone (80/18/2, v/v/v) 45min de saturation	0,24	0,24	1	Très épais

$r_{R_{FAO}/R_{FAU}}$ * = Rétention relative de l'acide ursolique par rapport à l'acide (P.E. 2002, 4^e édition)

Tableau. 16 : phase mobile testée

Il faut remarquer que l'acide oléanolique (AO) et l'acide ursolique (AU) sont des isomères de position difficile à séparer par CCM. Les essais repris dans le tableau 16 ont été réalisés sur une plaque CCM classique. Une fois le système optimal obtenu (le système 1), nous sommes passés aux plaques de type CCMHP (Silicagel 60F254S, 10X20cm) pour lesquelles nous avons noté une amélioration des séparations (figure.44). De plus pour améliorer la reproductibilité, nous avons réalisé l'analyse sans révélateur.

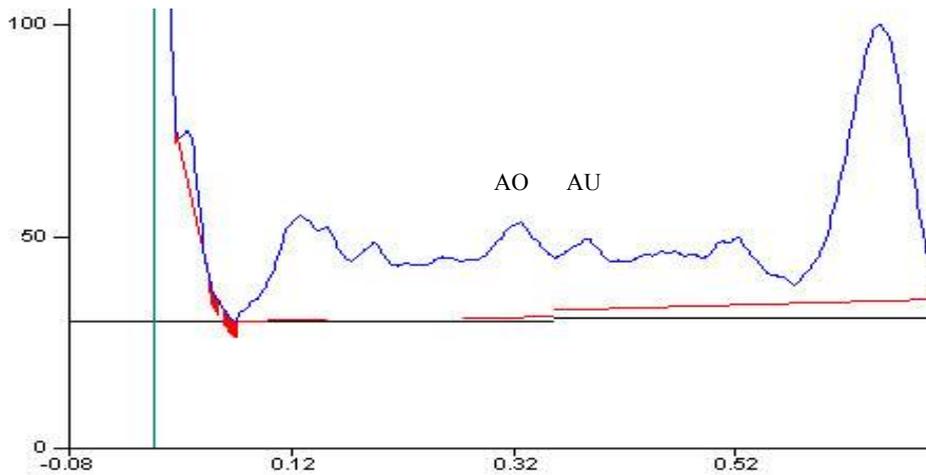


Figure. 44 : Chromatogramme montrant les pics les deux acides (screening à 215 nm) des l'extrait

IV.3.1.2. Détermination de la longueur d'onde de lecture

Les spectres des spots des témoins et ceux correspondant dans les extraits mesurés simultanément au scanner présentent deux optimums, l'un à 200nm, l'autre à 220nm (Figure.45).

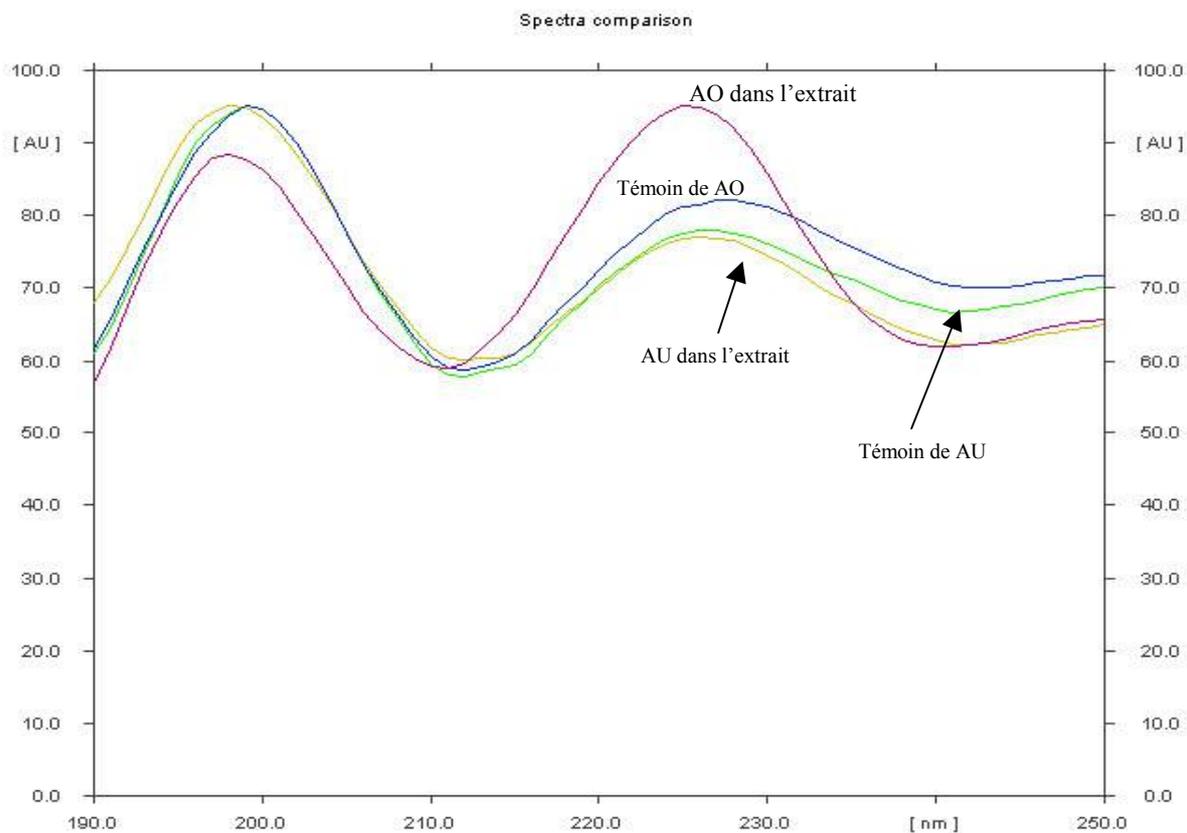


Figure. 45 : Spectres comparés des témoins de AO, AU et des spots correspondants dans l'extrait Éthanolique de *Mitracarpus scaber*

- Spectre UV du témoin AO
- Spectre UV du spot AO dans l'extrait
- Spectre UV du témoin UA
- Spectre UV du spot AU dans l'extrait

Afin de comparer plus tard les résultats de ce dosage à la méthode de CLHP plus fiable, pour lequel la sensibilité est maximale à 215 nm, nous avons choisi 215 nm pour ces analyses afin d'être conforme aux conditions de le CLHP. A cette longueur d'onde, on ne note aucune variation de la sensibilité de lecture au scanner (Figure.46a et b) pour un intervalle compris entre 5 μ g à 50 μ g (10 μ l de 0,5mg/ml à 5mg/ml) par rapport au maximum. Ce qui être s'expliqué par un bruit de fond non négligeable.

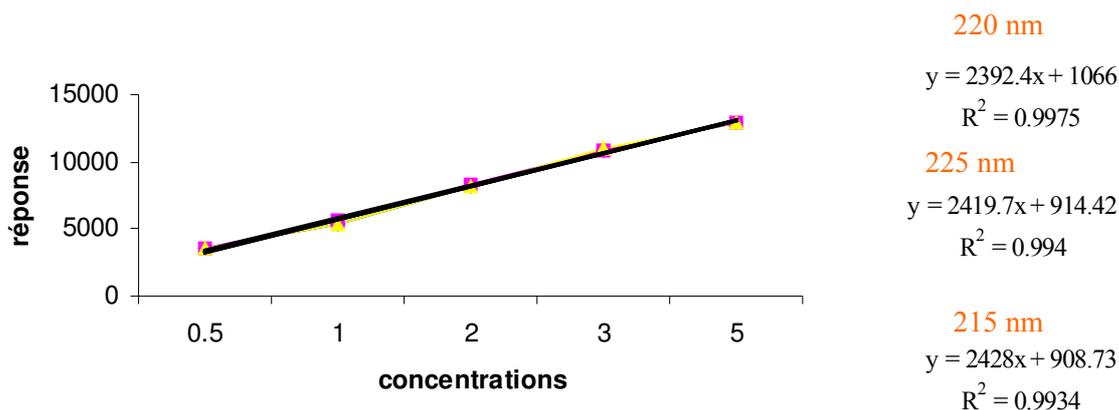


Figure. 46a : comparaison des fonctions de réponses obtenues pour AO après lecture à 200 nm, 215 nm et 225 nm

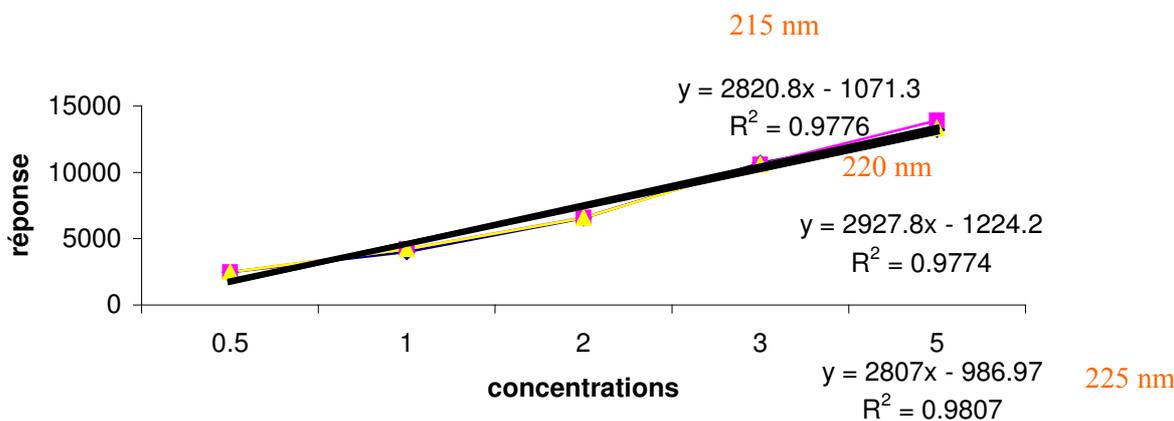


Figure.46b : Comparaison des fonctions de réponses obtenues pour AU après lecture à 200 nm, 215 nm et 225 nm

IV.3.1.3. Mode de lecture

Les plaques ont été lues au mode d'absorption à 20 mm/s

IV.3.1.4. Préparation des solutions témoins

Une série de dilutions de solutions standard ($n = 5$) de OA et UA à 5mg/ml de phase mobile ont été préparées pour obtenir des concentrations de 0.5, 1, 2, 3 et 5mg/ml.

IV.3.2. Phase de prévalidation

V.3.2.2. Etablissement de la fonction réponse

Afin de sélectionner la fonction de réponse la plus appropriée, nous avons comparé les résultats obtenus avec deux modèles de régression. A partir des courbes réponse/concentration établies quotidiennement avec les solutions de référence, nous avons déterminé les coefficients de corrélation des régressions linéaires et polynomiales obtenues pendant cinq jours différents, alors que les essais avaient été répétés trois fois chaque jour. La même gamme de concentrations a été utilisée (0.5 à 5 mg/ml)

Le tableau.17 et les figures 47a, b, c et d illustrent respectivement les profils obtenus avec les différents modèles de régression pour AU et AO.

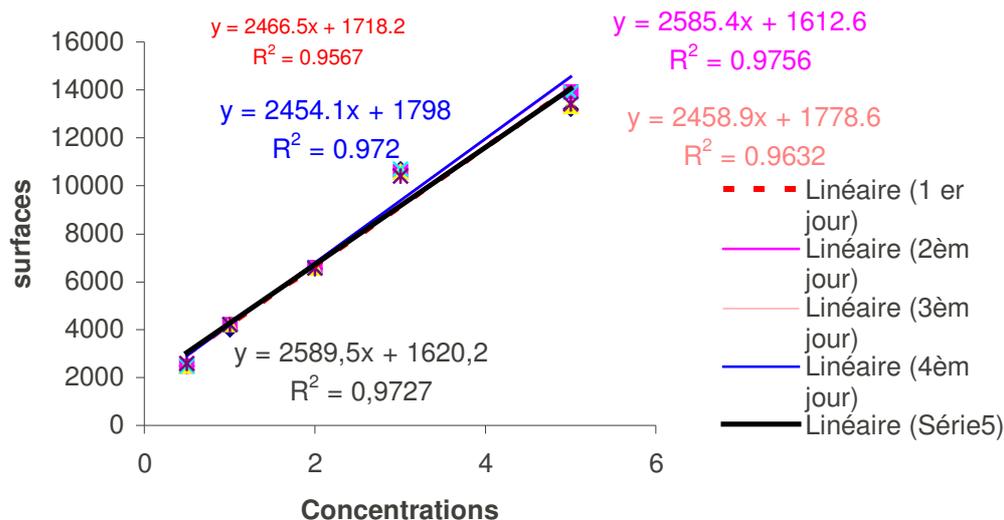


Figure.47a : modèle de régression linéaire pour UA

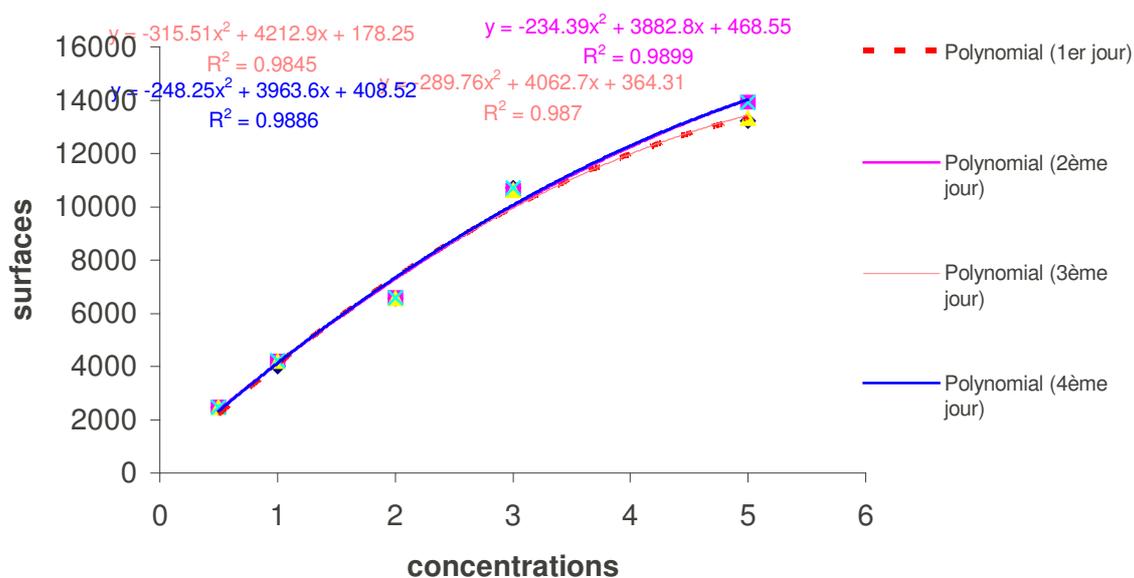


Figure.47b : modèle de régression polynomiale pour UA

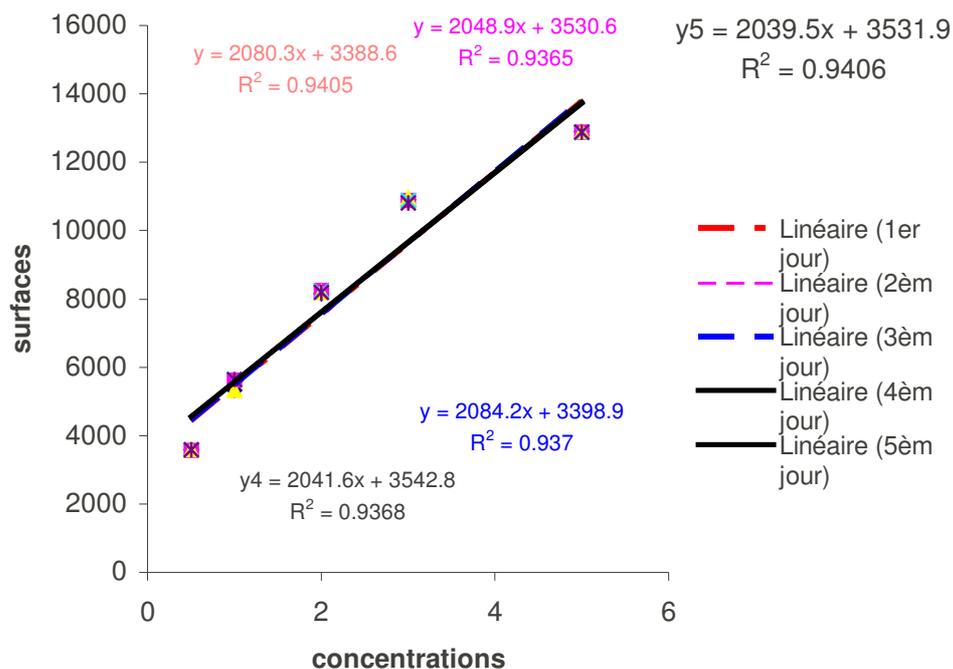


Figure.47c: modèle de régression linéaire pour AO

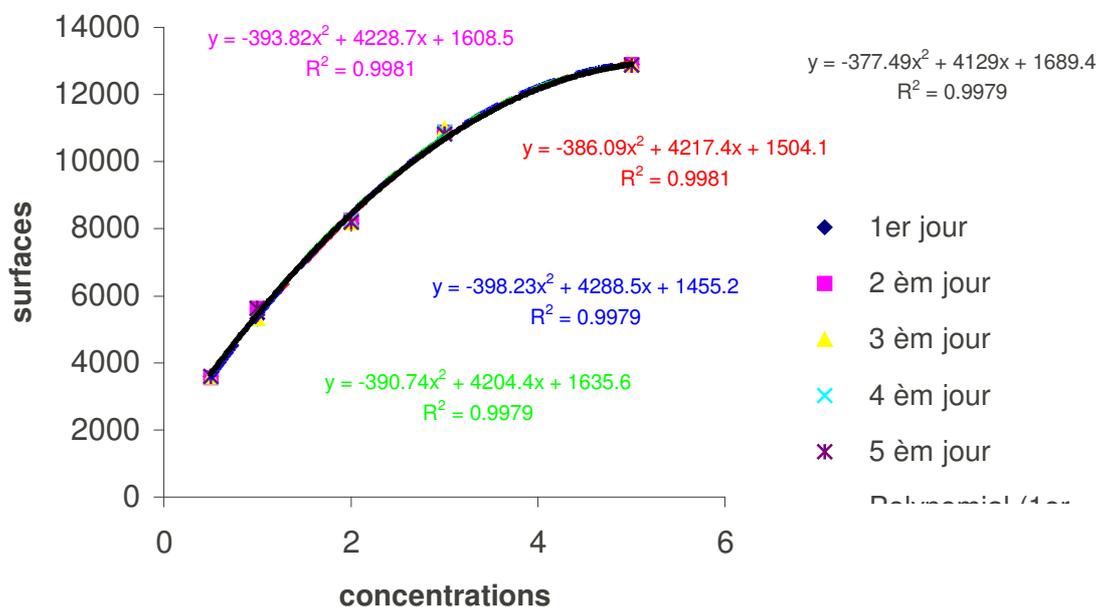


Figure.47d : modèle de régression polynomiale pour AO

Standards	Équations linéaires	Corrélation R ²	Equation polynomiales	Corrélation R ²
AU	$y = 2466.5x + 1718.2$	$R^2 = 0.9567$	$y = -315.51x^2 + 4212.9x + 178.25$	$R^2 = 0.9845$
	$y = 2585.4x + 1612.6$	$R^2 = 0.9756$	$y = -234.39x^2 + 3882.8x + 468.55$	$R^2 = 0.9899$
	$y = 2458.9x + 1778.6$	$R^2 = 0.9632$	$y = -289.76x^2 + 4062.7x + 364.31$	$R^2 = 0.987$
	$y = 2589.5x + 1620.2$	$R^2 = 0.9727$	$y = -248.25x^2 + 3963.6x + 408.52$	$R^2 = 0.9886$
	$y = 2454.1x + 1798$	$R^2 = 0.972$	$y = -248.44x^2 + 3829.3x + 585.41$	$R^2 = 0.9898$
AO	$y = 2080.3x + 3388.6$	$R^2 = 0.9405$	$y = -386.09x^2 + 4217.4x + 1504.1$	$R^2 = 0.9981$
	$y = 2048.9x + 3530.6$	$R^2 = 0.9365$	$y = -393.82x^2 + 4228.7x + 1608.5$	$R^2 = 0.9981$
	$y = 2084.2x + 3398.9$	$R^2 = 0.937$	$y = -398.23x^2 + 4288.5x + 1455.2$	$R^2 = 0.9979$
	$y = 2041.6x + 3542.8$	$R^2 = 0.9368$	$y = -390.74x^2 + 4204.4x + 1635.6$	$R^2 = 0.9979$
	$y = 2039.5x + 3531.9$	$R^2 = 0.9406$	$y = -377.49x^2 + 4129x + 1689.4$	$R^2 = 0.9979$

Tableau. 17 : Modèles de régressions testés pour AU et AO

L'examen des figures 47a, b, c, d et le tableau.17 montrent bien que les deux types d'équations (pour les deux molécules) ont des coefficients de régression supérieurs à 0,93. On constate que les R² des équations polynomiales sont meilleurs (> à 0,98). Mais les coefficients de corrélation linéaire sont tous supérieurs à 0,93, ce qui montre qu'il existe une bonne linéarité entre les concentrations et les valeurs des absorbances mesurées, nous avons donc choisi de travailler avec le modèle linéaire.

IV.3.2.2. La limite de détection

La limite de détection est de 1 µg par dépôt (soit 10 µl de 100 µg/ml) pour les deux composés (concentration ou quantité donnant un pic de hauteur égal à trois fois le bruit de fond).

IV.3.3. Phase de validation

IV.3.3.1. Fidélité de la technique

Afin d'estimer la fidélité de la technique à chaque niveau de concentration, les Cv de répétabilité (fidélité intra jour) et la fidélité inter jours (tableau : 18), ont été estimés

Standard	Concentration (mg/ml)	CV (%)	
		Intra jour (n = 5)	Inter jours (n = 5)
AO	0.5	4,60	0.32
	1	0.72	0.13
	2	0.65	0.10
	3	0.49	1.27
	5	0.10	2.45
AU	0.5	1.89	0.15
	1	2.21	0.45
	2	0.25	0.11
	3	1.13	0.15
	5	2.45	0.092

Tableau.19 : Coefficients des variations sur les analyses intra jour et inter jours

Les coefficients des variations (CV) intra jour ou répétabilité (n = 5) et inter jours ou fidélité intermédiaire (n = 5) des analyses des deux acides sont inférieurs à 5% pour toute la série des concentrations analysées (tableau. 18).

IV.3.3.2. La limite de quantification

La limite de quantification est de 3 μ g par dépôt (soit 10 μ l de 300 μ g/ml) pour les deux composés (concentration donnant un pic de hauteur égal à 10 fois le bruit de fond).

IV.3.4. Application à un extrait de *Mitracarpus Scaber*

IV.3.4.1. Extraction des acides à partir de la plante

Compte tenu de la complexité de l'extrait brut, une pré-purification a été faite.

80g de poudre ont été macérés sous agitation dans 400ml de dichlorométhane pendant 24 heures après pesée du mélange. Après réajustement du poids, 200ml du surnageant ont été filtrés sur un filtre hydrophobe PTFE FLUOROPOR[®], l'extrait total obtenu après évaporation a été repris dans 100 ml de NaOH 1N pendant 30 min et extrait avec trois fois 100 ml d'hexane. La phase aqueuse a été acidifiée avec de l'acide sulfurique 1N et extraite trois fois avec 100 ml de dichlorométhane. La phase dichlorométhanique après évaporation a été reprise dans 1ml de la phase mobile pour le dépôt sur plaque.

IV.3.4.2. Taux de récupération

Le rendement d'extraction a été déterminé à partir de 80g de poudre avec des ajouts de 3 mg, 5 mg et 6 mg.

Quantité ajoutée (mg)	% de récupération	
	AO	AU
3	98.8	97.8
5	96.7	93.8
6	96.66	97

Tableau.19 : Estimation de la récupération de AO et AU

Les rendements d'extraction sont compris entre 93 et 98% (tableau : 19), ce qui est excellent compte tenu du fait que la matrice est végétale.

IV.3.4.3. Pureté des pics analysés

La pureté des pics analysés dans l'extrait a été vérifiée en comparant les spectres UV pris au scanner des témoins des deux acides et des spots correspondants dans l'extrait (Figure.45). La similitude des spectres montre la spécificité des analyses.

IV.3.5. Conclusion

La méthode de CCMHP-densitométrique développée en utilisant un modèle linéaire, présente une bonne répétabilité et fidélité pour la gamme de concentrations utilisées (0.5 à 5mg/ml). Les coefficients de variations (CV) intra jour (n = 5) et inter jours (n = 5) pour l'analyse des deux acides étaient inférieurs à 5% pour toute la série des concentrations analysées. Le taux de récupération pour quantifier les deux acides dans la plante est supérieur à 98%.

La méthode ainsi validée a été utilisée pour quantifier les deux acides. En suivant les corrélations et différentes dilutions, la quantité de AO et AU sont respectivement de (2,60+/- 0.06) mg (n = 5) et de (4.90+/-0.11)mg (n = 5) dans 80g de plante. Ceci correspond à 0.00325% de AO à 0.006125% de AU.

IV.4. Développement et validation de méthode de quantification des acides oléanolique et ursolique par CLHP

Choix de la procédure de référence

Vu la faible séparation des isomères de positions que sont les acides oléanolique et ursolique en CCMHP, nous avons choisi la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) qui est la seule méthode décrite jusque là dans la littérature (Ding et al., 2002; Wang et al., 2002; Xie et al., 2001; Zhu et al., 2000; Yuan et al., 1999) pour doser ces acides dans d'autres plantes comme technique de référence pour vérifier les valeurs obtenues en CCMHP. Afin de vérifier la sélectivité de nos pics, nous avons dû développer puis valider une nouvelle méthode CLHP compatible à la détection de masse car aucune des méthodes de la littérature ne convenait à notre extrait ou n'étaient compatibles avec la SM.

IV.4.1. Mise au point de la technique

Nous avons pour cette quantification développé et validé une méthode de dosage des standards de ces deux acides utilisée par la suite pour quantifier les deux molécules dans la plante.

IV.4.1.1. Choix du système chromatographique.

Après plusieurs essais des méthodes existantes qui ne nous a pas permis de séparer les deux acides dans nos extraits (Ding et al., 2002; Wang et al., 2002; Xie et al., 2001; Zhu et al., 2000; Yuan et al., 1999), nous avons sélectionné les conditions suivantes qui ont permis de bien séparer les deux acides dans l'extrait éthanolique de *M. scaber*.

Appareillage :

La chaîne HPLC-MS est composée des éléments suivants :

D'un bain thermostatique DINKELBERG model MTH231220 SN896

D'une pompe Merck-Hitachi L-6200 Intelligent Pump SN0126-006

D'un injecteur manuel Rhéodyne 7725i, 5098

D'un injecteur automatique SPARK Midas model 830 NS70034

Un détecteur LCQ Advantage S/N LAD00293

Une pompe à vide E2M28 et E2M30 Rotary Vacuum Pumps

Conditions opératoires :

Phase mobile : 85 % Acétonitrile (HPLC grade) / 15 % eau milli-Q

Colonne HPLC : Merck LiChroCart RP 250-4 cat.1.50983

Phase Stationnaire : LiChroSpher 100 RP-18 5 μ m

Volume d'injection : 20 μ l

Flux de la phase mobile : 0.6 ml/min

Temps d'analyse : 20 ou 25 min

Longueur d'onde UV : 215 nm

Range UV: 0.2 FS

RSPT UV: 0.5 s

Source MS: APCI

Tune MS: UA_OA_APCI_200ul

Source APCI: Vaporizer T: 455°C

Sheath Gas: 45

Aux gas: 20

Discharge Current: 5 μ V

Ion transfer Capillary T : 200°C

Capillary voltage: 35 V

Tube lens offset: 15 V

Ionization: positif

Ce mode opératoire, nous a permis de séparer les deux acides mieux qu'en CCMHP (figure. 48).

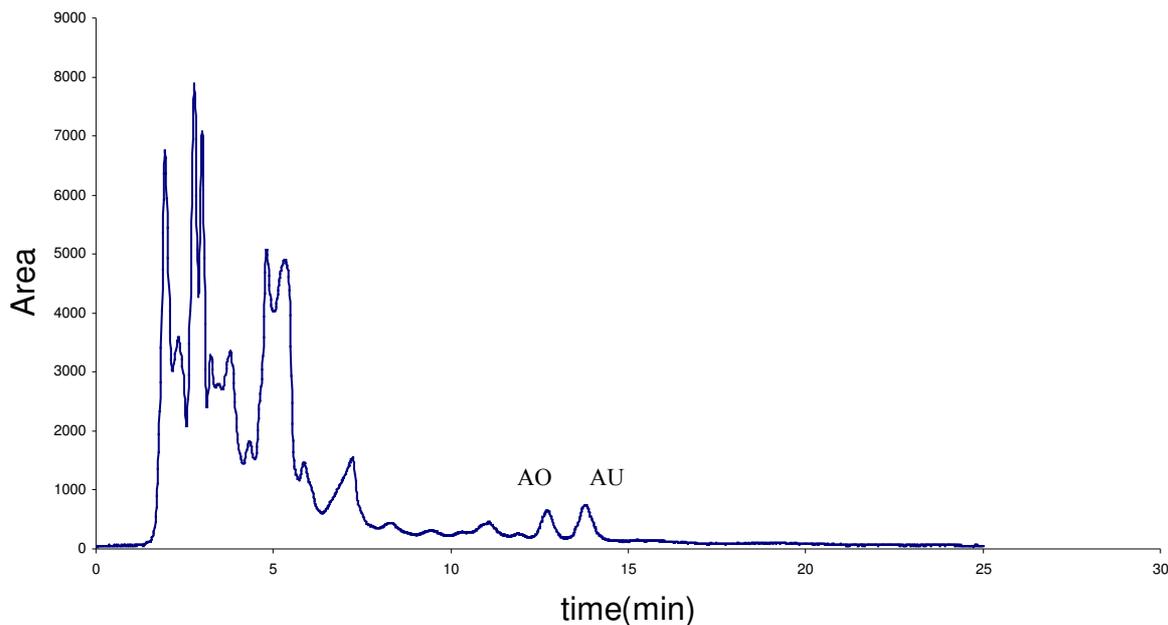


Figure.48: Chromatogramme type de l'extrait dichlorométhanique de *Mitracarpus scaber*

IV.4.1.2. Détermination de la longueur d'onde de lecture

Les analyses ont été réalisées à 215 nm longueur d'onde à laquelle on observe une meilleure sensibilité au CLHP/UV.

IV.4.1.3. Mode de lecture

Nous avons utilisé un détecteur UV (pour les analyses) et la masse pour confirmer la pureté des pics.

IV.4.1.4. Préparation des solutions témoins

Une série (n = 5) de dilutions de solutions standards de OA et UA à 10mg/100ml dans la phase mobile ont été préparées et diluées par la même phase pour obtenir des concentrations filles de 0.5, 1, 2, 4 et 10µg/ml.

IV.4.1.5. Stabilité des molécules dans la phase mobile

Afin d'apprécier la stabilité des acides dans la phase mobile, les solutions mères déposées à la température du laboratoire sont analysées chaque mois pendant trois mois pour évaluer les variations de quantité d'analytes (Tableau.20)

Composés	1 mois	2 mois	3 mois
AO	106%	104%	92%
AU	112%	106%	98%

Tableau.20 : stabilité de AO et AU dans la phase mobile pendant trois mois

Après trois mois à température du laboratoire, les acides sont encore à plus de 92% dans la phase mobile. Ceci montre que les acides sont bien stables dans la phase mobile.

IV.4.2. Phase de prévalidation

V.4.2.1. Etablissement de la fonction réponse

A partir des réponses obtenues pendant 5 jours et répétées trois fois chaque jour avec les solutions de référence, nous avons calculé les coefficients de corrélations des regressions linéaires pour chaque jour. La gamme de concentrations utilisée était de 0.5, 1, 2, 4 et 10 $\mu\text{g/ml}$.

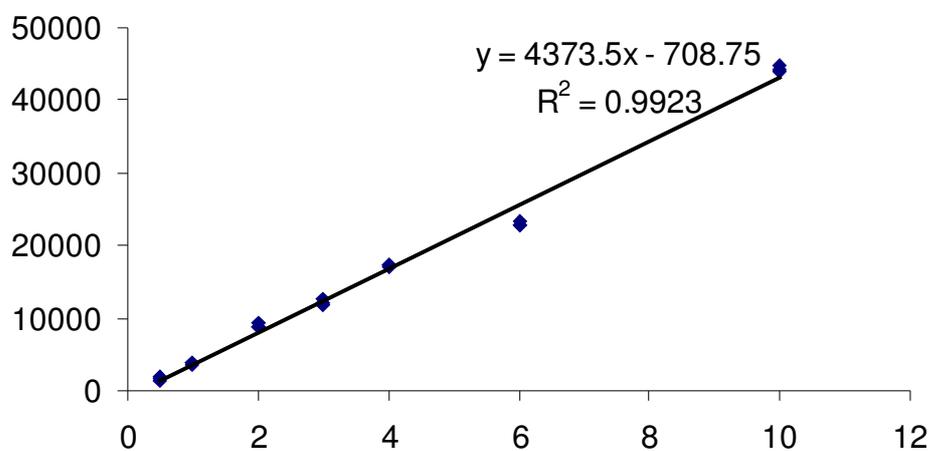


Figure.49a : modèle de régression linéaire de standard de AO

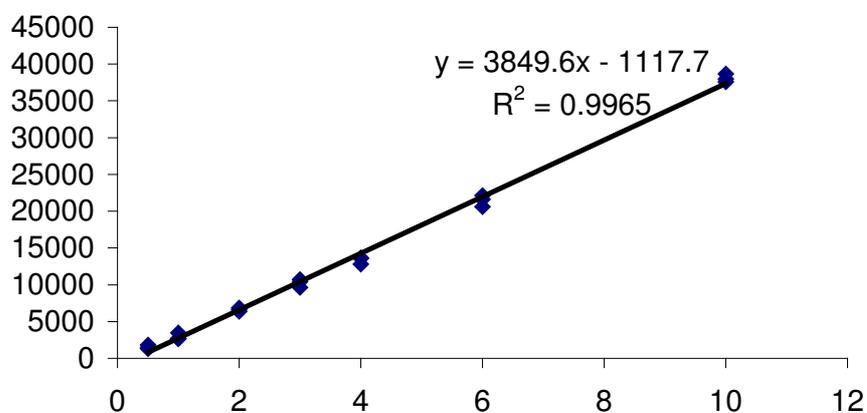


Figure.49b: modèle de régression linéaire de standard de AU

Les figures 49a et 49b montrent bien une bonne relation linéaire entre les concentrations des standards des deux acides et les réponses mesurées. Les coefficients de régression sont supérieurs à 99 pour les deux acides. Le modèle de régression linéaire a été choisi pour la validation de la méthode.

IV.4.2.2. La limite de détection

La limite de détection est de 4 ng par injection (soit 20 µl de 0,2 µg/ml) pour les deux composés (concentration donnant un pic de hauteur égal à trois fois le bruit de fond).

IV.4.3. Phase de validation

IV.4.3.1. Fidélité de la technique

Afin d'estimer la fidélité de la technique à chaque niveau de concentration, les CV de répétabilité (fidélité intra jour) et la fidélité inter jours (tableau : 21), ont été estimés

Standards	Concentration (µg/ml)	CV%	
		Intra jour (n = 5)	Inter jours (n = 5)
OA	0.5	2.06	2.52
	3	0.22	3.72
	6	0.22	2.13
UA	0.5	1.79	3.39
	3	0.98	1.79
	6	2.13	1.61

Tableau.21 : Coefficients des variations sur les analyses intra jour et inter jours

Les coefficients des variations (CV%) intra jour ou répétabilité (n = 5) et inter jours ou fidélité intermédiaire (n = 5) pour l'analyse des deux acides par cette méthode sont inférieurs à 4% pour toutes la série des concentrations analysées (tableau. 21).

IV.4.3.2. La limite de quantification

La limite de quantification est de 10 ng par injection (soit 20 µl de 0.5 µg/ml) pour les deux composés (concentration donnant un pic de hauteur égal à 10 fois le bruit de fond).

IV.4.4. Application à un extrait de *Mitracarpus Scaber*

IV.4.4.1. Extractions des acides à partir de la plante

Les études phytochimiques que nous avons réalisés ont montré que les acides sont beaucoup mieux extraits par des solvants lipophiles. Pour trouver les meilleures conditions d'extraction, nous avons comparé les résultats obtenus avec deux solvants (hexane et CH₂CL₂) en fonction de la durée d'extraction.

Pour cela 2 g de poudre de plante sont mis en macération dans 20 ml de solvant (12 échantillons par solvant). Chaque flacon est pesé, agité au départ puis toutes les 15 min par une baguette en verre. Toutes les 15 minutes, un échantillon de chaque solvant est traité comme suit : le poids est ajusté avec le solvant d'extraction puis 1 ml du surnageant est repris dans un tube sec et séché à l'azote. Le résidu est dissout dans 3 ml de la phase mobile et filtré sur un filtre hydrophobe (hydrophobic PTFE FLUOROPOR[®] filter). 20 µl de cette solution sont injectés dans le système CLHP et les surfaces des pics sont mesurées. Les valeurs obtenues en fonction des temps d'extractions sont reprises pour chaque solvant et chaque acide dans les figures 50a et b.

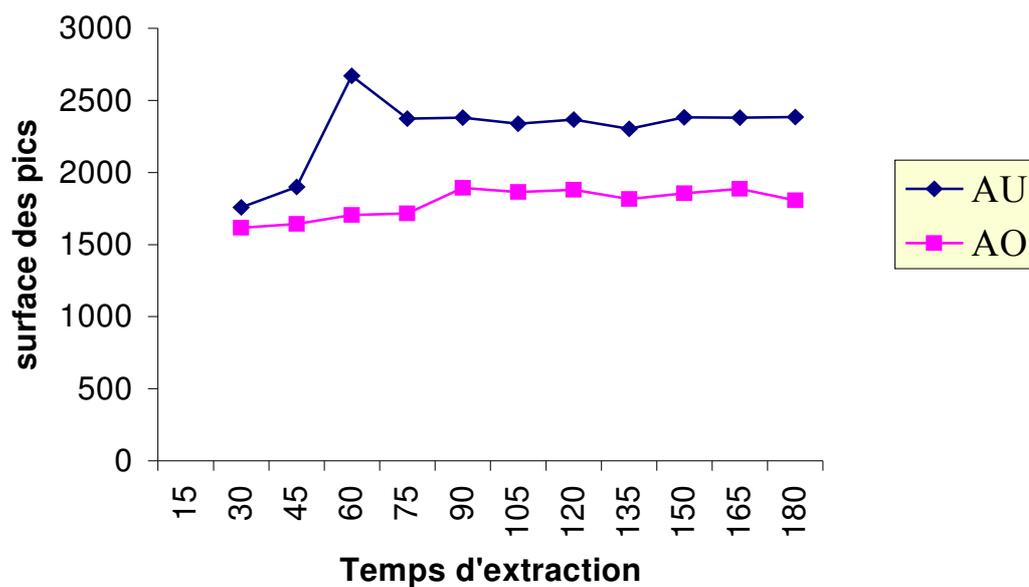


Figure.50a : profil d'extraction de AO et de AU avec l'hexane

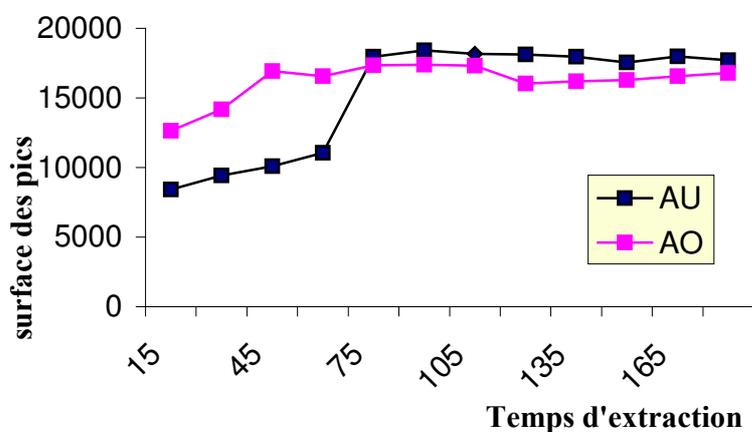


Figure.50b : profil d'extraction de AO et de AU avec le dichlorométhane

Les deux figures montrent qu'on a un maximum d'extraction après environ 90 min d'extraction. On constate aussi que le dichlorométhane extrait mieux les deux acides en comparant les valeurs d'absorbance de la figure.50b à celle dans la figure.50a. Nous avons pour la quantification choisie le dichlorométhane pour extraire les molécules.

IV.4.4.2. Taux de récupération

Le rendement d'extraction a été déterminé à partir de 2g de poudre avec des ajouts de 3, 5 et 6 µg.

Quantité ajoutée (µg)	Pourcentage de récupération	
	AO	AU
3	98.8	97.8
4	97.9	97.8
6	97.7	97

Tableau.22 Taux de récupération de AO et AU

Les rendements d'extractions sont compris entre 97 et 98% (tableau.22) pour les deux composés, ce qui est excellent compte tenu de la complexité de la matrice végétale.

IV.3.4.3. Pureté des pics analysés

La pureté des pics a été contrôlée par comparaison des spectres UV et SM des pics correspondant à AU et AO dans l'extrait (Figure 51).

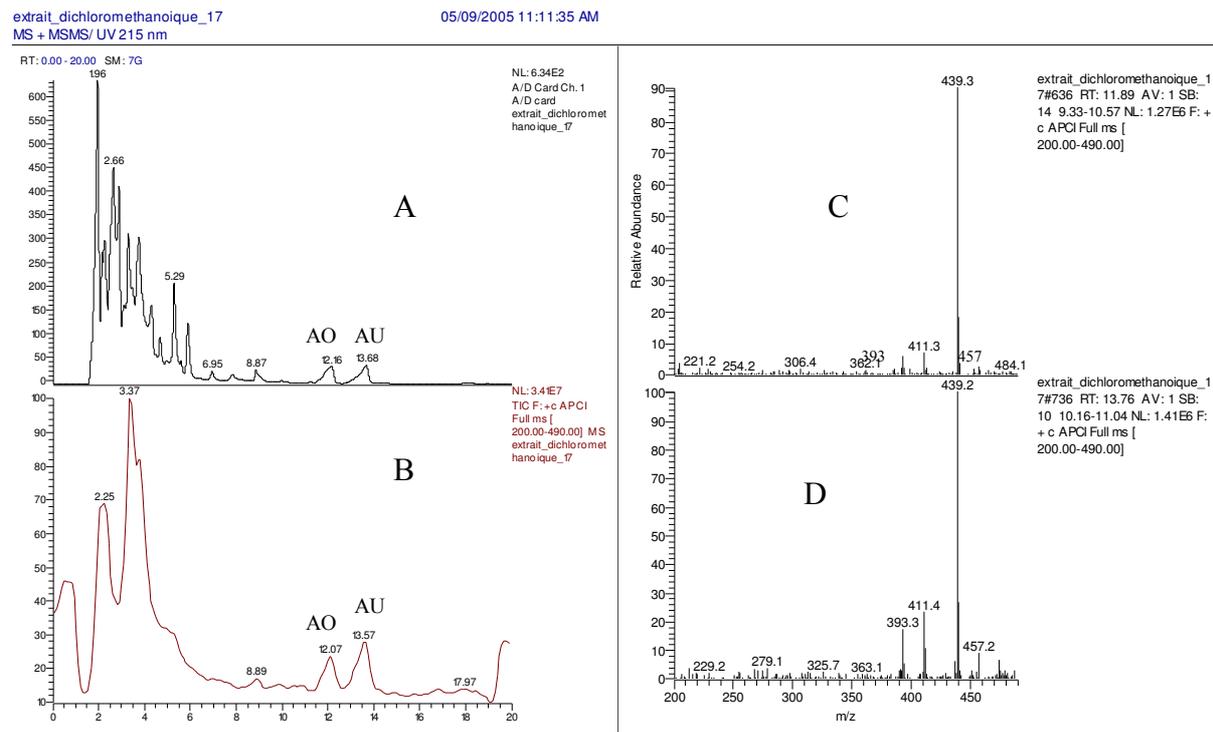


Figure.51 : chromatogrammes types par CLHP/UV (215 nm, A), CLHP/SM (TIC, B) de l'extrait et spectre de masse (m/z 200-490) des pics correspondant à AO (C) et de AU (D).

IV.4.5. Conclusion

La nouvelle méthode de CLHP compatible à une détection de masse développée présente une bonne relation linéaire entre les concentrations et les réponses (absorption UV), et une bonne répétabilité et fidélité pour la gamme de concentrations analysées (0.5 à 5mg/ml). Les coefficients de variations (CV) intra jour (n = 5) et inter jours (n = 5) pour l'analyse des deux acides étaient inférieurs à 4% pour toute la série des concentrations analysées. Le taux de récupération des deux acides dans la plante est supérieur à 98%.

Dans l'extrait, la quantité de AO et AU estimée par la méthode est respectivement de (86 +/- 0.94) µg (n = 5) et de (250 +/-0.11) µg (n = 5) dans 2g de plante. Ceci correspondait à 0.0043% de AO et à 0.0125% d'AU dans la plante.

Comparaison des résultats :

En comparant les résultats obtenus par les deux méthodes, on peut dire que la CLHP estime mieux la quantité des deux acides dans la plante, mais en tenant compte de la précision entre les deux méthodes (efficacité de séparation, sensibilité et méthode d'extraction) et la variation entre les valeurs des teneurs des deux acides dans la plante exprimées par les deux méthodes (soit un écart de 0.001% et 0.004% de AO et AU), la méthode CCMHP peut être validé pour les molécules pures mais ne permet pas de bien quantifier ces deux acides dans l'extrait brut.

IV.5. Validation de méthode de CCMHP-densitométrique et quantification de la 2-Azaanthraquinone

IV.5.1. Mise au point de la technique

Nous avons pour cette quantification développé et validé une méthode de dosage de la 2-azaanthraquinone (AAQ) standard qui a été utilisée par la suite pour quantifier la molécule dans la plante.

IV.5.1.1. Choix du système chromatographique.

Nous avons testé 4 systèmes chromatographiques qui nous avaient permis d'identifier l'azaanthraquinone dans l'extrait éthanolique de la plante (tableau.23). Le choix du système chromatographique de quantification a été fait en tenant compte de l'épaisseur des spots obtenus.

Mode opératoire

Phase stationnaire	: Plaque CCM de silice F254 (sur support en verre) Silicagel 60F254S, 10X20cm, Sigma
Témoins déposés	: 2- azaanthraquinone (Sigma)
Essai déposé	: Extrait alcaloïdique total
Dépôts	: En bande de 5mm et espacés de 10mm
Volume déposé	: 5 μ l
Phases mobiles	: voir tableau
Distance de migration	: 80mm
Révélation	: Dragendoff pour lecture visuelle et pas de révélation pour la quantification au scanner 3

Phases mobiles	R _f	Taille des spots
1 Toluene/ethyl acetate/methanol (80/18/2,v/v/v)	0,55	fins
2 Chloroforme/Méthanol/Ammoniac 10 % (80/40/1.5, v/v/v)	0,70	Epais (traînés)
3 Toluène/Acétate d'éthyle/ Diéthylamine (70/20/10, v/v/v)	0,62	Epais (traînés)
4 Acétone/butanone/ acide formique (10/7/1, v/v/v)	0,82	épais

Tableau. 23: Phases mobiles testées

Seule la phase mobile 1 permet une bonne séparation de l'azaanthraquinone en un spot fin. Au départ nous avons réalisé les essais sur une plaque de type CCM normale. Une fois le système optimal obtenu (le système 1), nous sommes passés aux plaques de type CCMHP (Silicagel 60F254S, 10X20cm) pour lesquelles nous avons noté une amélioration des séparations (figure.52)

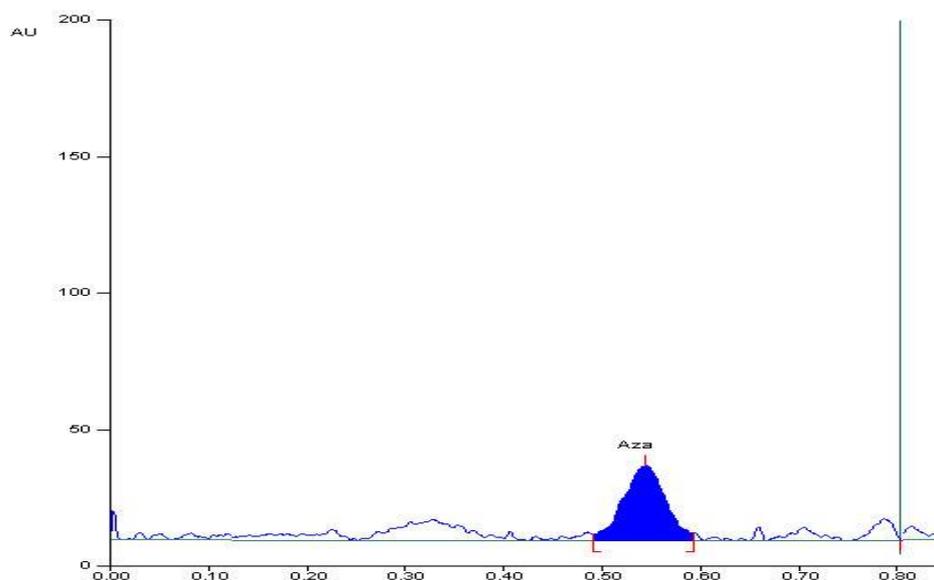


Figure. 52 : Chromatogramme montrant le pic l'azaanthraquinone

IV.5.1.2. Détermination de la longueur d'onde de lecture

Le spectre UV du témoin obtenu par le scanner en CCMHP (Figure.53) montre bien un maximum d'absorption entre 215 et 360 nm. Nous avons choisi 310 nm qui présente une meilleure sensibilité au scanner.

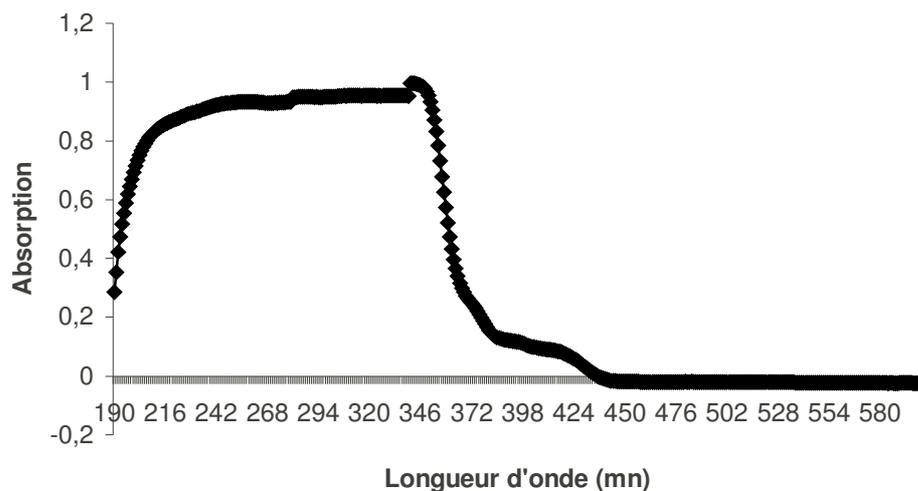


Figure. 53 : Spectre UV de standard de

IV.5.1.3. Mode de lecture

Nous avons utilisé le mode d'absorption à 310 nm

IV.5.1.5. Préparation des solutions témoins

Une série de dilutions du standard de AAQ (Sigma) a été préparée à partir de solutions mères ($n = 4$) à 1mg/ml avec un mélange acétonitrile-eau (85/15, v/v) pour obtenir des solutions filles de 10, 20, 25, 50 et 100 μ g/ml.

IV.5.2. Phase de prévalidation

IV.5.2.1. Etablissement de la fonction réponse

A partir des valeurs réponses/concentrations obtenues pendant 4 jours différents avec 3 répétitions quotidiennes pour les solutions de référence ($n = 3$), nous avons calculé les coefficients de corrélation des droites de régression obtenues.

La figure.54 montre qu'il existe une bonne relation de linéarité entre les concentrations du standard de AAQ et les réponses d'absorbance : les coefficients de régression sont supérieurs à 0,97 pour les 4 différentes courbes. Le modèle de régression linéaire a été choisi pour la validation de la méthode.

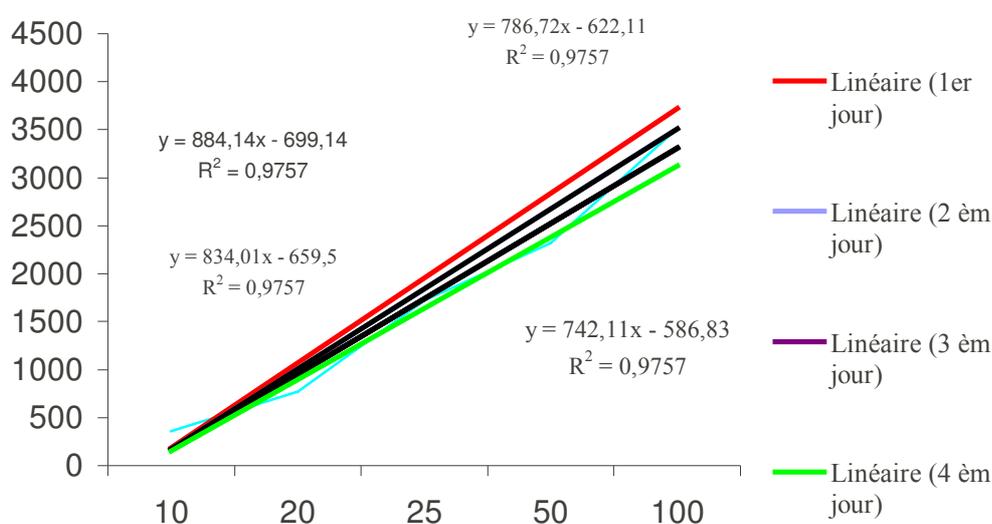


Figure. 54 : Modèles de régressions testés pour AU et AO

IV.5.2.2. La limite de détection

La limite de détection est de 15 ng par dépôt (soit 5 µl de 3 µg/ml) (concentration donnant un pic de hauteur égal à trois fois le bruit de fond)

IV.5.3. Phase de validation

IV.5.3.1. Fidélité de la technique

Afin d'estimer la fidélité de la technique à chaque niveau de concentration, les CV de répétabilité (fidélité intra-jour) et la fidélité inter-jours (tableau : 24), ont été déterminés.

Standard	Concentration (µg/ml)	CV (%)	
		Intra jour (n = 5)	Inter-jours (n = 5)
	100	1.93	5.65
	50	1.13	3.41
	25	0.98	3.59
	20	1.72	3.43
	10	1.59	3.96

Tableau.24 : Coefficients des variations des analyses intra-jour et inter-jours

Les coefficients des variations (CV) intra-jour ou répétabilité (n = 5) et inter-jours ou fidélité intermédiaire (n = 5) sont inférieurs à 6% pour toute la série des concentrations analysées (tableau10).

IV.5.3.2. Limite de quantification

La limite de quantification est de 30ng par dépôt (soit 5 µl de 6µg/ml) (concentration donnant un pic de hauteur égal à 10 fois le bruit de fond)

IV.5.4. Application à un extrait de *Mitracarpus Scaber*

IV.5.4.1. Extractions de la 2-azaanthraquinone à partir de la plante

Compte tenu de la complexité de l'extrait brut, une pré-purification a été faite.

500g de poudre ont été macérés dans 4 l d'éthanol (Merck) pendant 72 heures sous agitation constante, puis filtrés. Le filtrat a été concentré par évaporation. Le rendement de cette extraction est de 15.9%. 5g de cet extrait ont été dissous dans 100ml d'acide sulfurique normal pour amener à pH 2.5 et extraits après 60min d'agitation par trois fois 100ml d'hexane. La phase aqueuse a été alcalinisée à pH 9.9 et après 60min extrait avec trois fois 100ml de dichlorométhane. La phase dichlorométhane (extrait total alcaloïdique) a été concentrée (rendement 2.9%) et conservée au congélateur.

- Préparation de solution d'extrait

A partir de l'extrait alcaloïdique total obtenu comme décrit ci-dessus, une solution mère de 2mg par ml a été préparée dans le mélange acétonitrile-eau (85/15, v/v) puis filtrée sur un filtre hydrophobe PTFE FLUOROPOR[®]. Cette solution mère a été ensuite diluée pour obtenir une concentration de 1000µg/ml.

IV.5.4.2. Taux de récupération

Le rendement d'extraction a été déterminé à partir de 50g de poudre avec des ajouts de 100 µg, 500 µg et 1000 µg.

Quantité ajoutée (µg)	Pourcentage de récupération
100	98.8
500	99.5
1000	97.66

Tableau.25 : Estimation de la récupération de AQ

Les rendements d'extractions sont compris entre 97 et 99% (tableau : 25), ce qui est excellent compte tenu de la complexité de la matrice végétale.

IV.5.4.3. Pureté des pics analysés

La pureté des pics a été contrôlée par l'analyse comparée des spectres UV des standard des spots correspondant à la 2-azaanthraquinone obtenus en CCMHP pour le standard et l'extrait alcaloïdique (Figure.55) et l'analyse LC/UV/MS des spots après grattage et extraction de la silice par le dichlorométhane qui donne un spectre identique au standard (Figure.55). La conformité du spectre MS (C) avec celui de AAQ isolé (Figure.34) montre la spécificité des pics analysés.

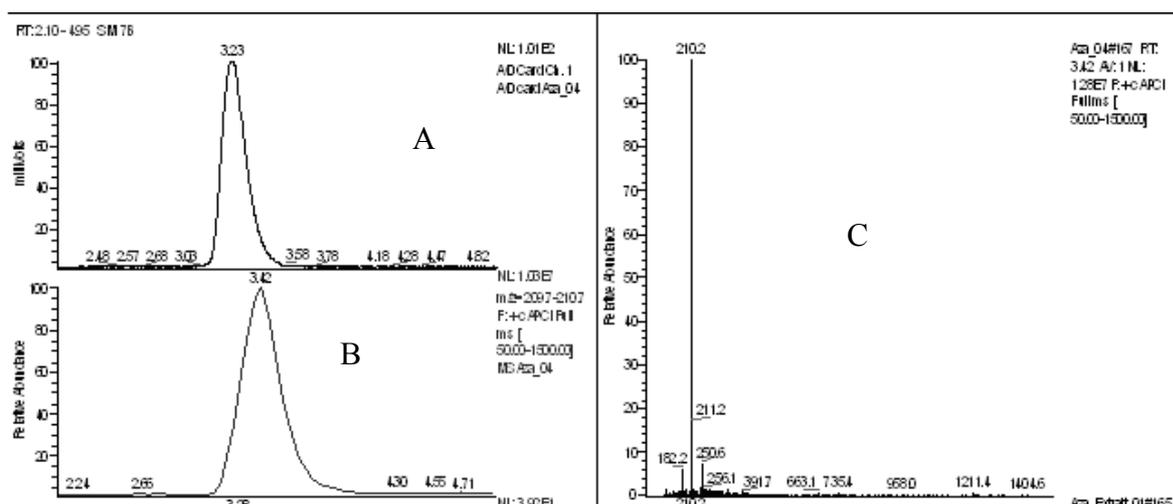


Figure. 55: chromatogrammes types par CLHP/UV (310 nm, A), CLHP/SM (TIC, B) de l'extrait et le spectre de masse (m/z 200-1000) du pic correspondant à AAQ (C).

IV.5.5. Conclusion

La méthode de CCMHP-densitométrique développée en utilisant un modèle linéaire, présente une bonne répétabilité et fidélité pour la gamme de concentrations analysées (10, 20, 25, 50 et 100 μ g/ml). Les coefficients de variations (CV) intra-jour (n = 5) et inter-jours (n = 5) sont inférieurs à 6% pour toute la série des concentrations analysées. Le taux de récupération de la molécule dans la plante par la méthode est supérieur à 98% pour les trois doses testées.

Nous avons ensuite utilisé la méthode pour déterminer la quantité de l'azaanthraquinone dans l'extrait alcaloïdique brut soit (19,5 \pm 0.26) μ g (n = 5) dans 1mg d'extrait d'alcaloïde et donc une teneur de 1.95% dans l'extrait total alcaloïdique, soit 0.058% dans l'extrait brut éthanolique et 0.00848% dans la plante.

V. Etude de l'huile essentielle de *M.* *scaber*

V. ETUDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *M. SCABER*

V.1. Introduction

Lors du criblage phytochimique nous avons mis en évidence la présence d'huile essentielle dans la partie aérienne de *M. scaber*, ce qui avait déjà été décrit par Ekpendu et al. (1993). Les travaux de cet auteur montrent que l'acide hexadécanoïque était le composé majoritaire puis par ordre décroissant l'acide pentadécanoïque, l'acide (Z)-octadéc-9-énoïque, l'acide trétranoïque, l'acide (ZZ) octadéca-9,12-diénoïque, acide (Z)-hexadec-9-énoïque, l'acide octadécanoïque et l'acide dodécanoïque. Ils ont aussi identifié six esters d'acides gras, deux aldéhydes et six monoterpènes oxygénés. D'autres travaux ont montré que les acides gras ont des activités antimicrobiennes avec moins d'effets secondaires que certains composés souvent utilisés comme antibiotiques (Michael Hornitzky, 2003).

Comme nous avons observé que les fractions lipophiles avaient une meilleure activité antimicrobienne, nous nous sommes proposés d'étudier l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de certains de ses composés susceptibles d'être présents dans ces fractions.

Nous avons donc d'abord déterminé le pourcentage d'huile essentielle dans la plante, réalisé une analyse par GC/MS, et testé certains composés identifiés afin de déterminer leurs contributions à l'activité de l'huile essentielle et de la plante et / ou de l'extrait éthanolique.

V.2. Matériels et Méthodes

V.2.1. Matériels et méthodes d'extraction

250g de poudre de la partie aérienne de *M. Scaber* additionnés de 500 ml d'eau ont été extraits par distillation pendant 4 heures avec un appareil de type Clevenger (European Pharmacopea 4^{ème} édition 2002, figure 56). La distillation a été répétée 3 fois pour déterminer le rendement de l'huile essentielle. L'huile essentielle a été stockée à une température de -20°C pour les tests antimicrobiens et analyse GC/MS.

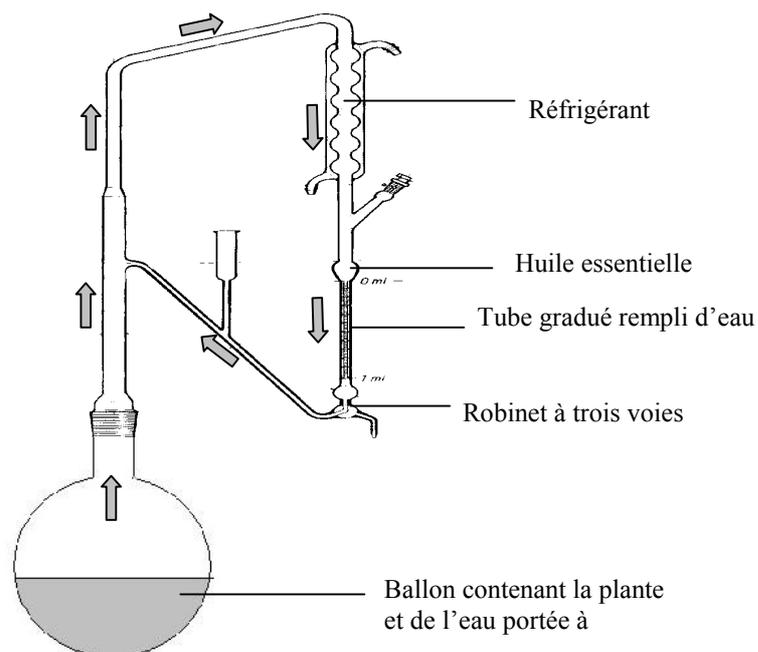


Figure. 56: appareil à distillation décrit par la Pharmacopée Européenne (4^{ème} édition, 2002).

V. 2.2. GC/MS

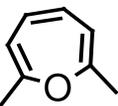
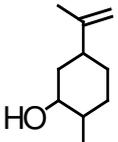
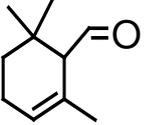
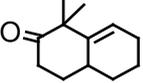
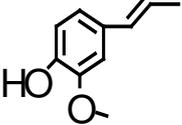
Selon la méthode décrite en III.3.2.4.

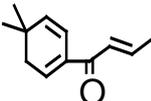
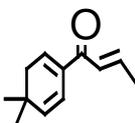
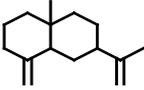
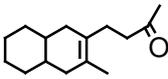
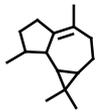
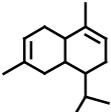
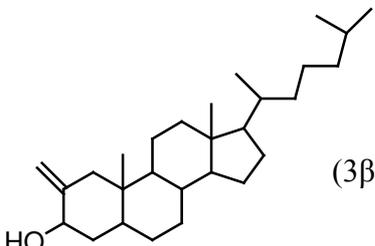
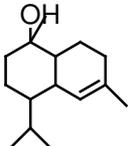
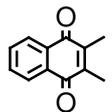
V.2.3. Tests antimicrobiens

L'analyse selon la méthode décrite en III.3.2.7.

V.3. Résultats et discussions

(0,1 µl/g de poudre de plante soit 10 µl/100g). L'analyse GC/MS (Taleau.26) a montré la présence d'acides gras et d'aldéhydes linéaires ainsi que différents dérivés terpéniques comme le limonène, le bornéol, le α -caryophyllène, le β -caryophyllène, l'oxyde de caryophyllène, le phytol et l'isophytol. Ces résultats confirment bien les résultats d'Ekpendu (Ekpendu et al. 1993).

Composés	Temps de rétention
Hexanal	1.37
Heptanal	1.71
Tétradécanal	1.77
	1.96
Oxépine	
3,5-diMe Phénol	1.94
Octanal	3.21
D-Limonene	3.48
	3.55
2-methyl-5-(prop-1-en-2-yl)cyclohexanol	
Bicyclo[3,1,1] heptanal	4.34
(E) 7-Me oct-6-enal	4.59
Nonanal	5.71
Bornéol	7.24
(E) Nonan-2-enal	7.76
Décanal	9.01
	9.26
2,6,6-trimethylcyclohex-2-enecarbaldehyde	
	11.07
1,1-dimethyl-3,4,4a,5,6,7-hexahydronaphthalen-2(1H)-one	
	14.79
(E)-2-methoxy-4-(prop-1-enyl)phenol	

	15.54
(<i>E</i>)-1-(4,4-dimethylcyclohexa-1,5-dienyl)but-2-en-1-one	
β -Caryophyllène	16.41
	16.76
(<i>E</i>)-1-(4,4-dimethylcyclohexa-1,5-dienyl)but-2-en-1-one	
α - Caryophyllène	17.90
10- Méthylundécane-2-one	18.49
	19.47
	
4a-methyl-1-methylene-7-(prop-1-en-2-yl)-decahydronaphthalene	
	19.81
	
4-(3-methyl-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydronaphthalen-2-yl)butan-2-one	
	20.5
	
(<i>Z</i>)-1,1,4,7-tetramethyl-1a,2,3,5,6,7,7a,7b-octahydro-1 <i>H</i> -cyclopropa[<i>e</i>]azulene	
	20.67
	
1-isopropyl-4,7-dimethyl-1,2,4a,5,8,8a-hexahydronaphthalene	
	22.41
	
(3 β , 5 α)-2- Méthylène cholestan-3-ol	
HO	
Hexadéca-7,11-diène	22.49
Oxyde de caryophyllène	23.18
Tétradécane	24.77
	25.96
	
Tau-cadénol	
	26.41
	
2,3-dimethylnaphthalene-1,4-dione	
Tétradécane	28.54
Acide tétradécanoïque	30.98
Acide (8 <i>z</i> ,11 <i>z</i> ,14 <i>z</i>)-eicosa-8,11,14-trièneoïque	32.22
Pentadécane-6,10,14-triène-2-one	32.96

(12z,17z)-octadéca-12,17-diène	34.60
(9z,12z,15z)-octadéca-9,12,15-triène	34.86
6,10,14-Triméthylpentadéca-5,9,13-trien-2-one	35.22
14-Méthylpentadécanoate de méthyle	35.73
Isophytol	36.14
Acide tétradécanoïque	38.25
Acide hexadécanoïque	38.26
Acide pentadécanoïque	40.9
Phytol	41.56
(z)-octadec-9-énoïque	43.01
Acide oléique	44.83

Tableau.26 : Composition de l'huile essentielle

L'huile essentielle, l'eau florale et certains composés identifiés n'ont présenté aucune activité inhibitrice sur le *Dermatophilus congolensis* (tableau 27) dans les conditions testées.

Extrait et composés (1000ppm)	Diamètre de zone (cm) d'inhibition	
	10µl (10µg)	20µl (20µg)
Tétracycline	8	8.5
Oxacilline	8	8.5
Huile essentielle	Pas d'activité	Pas d'activité
Eau florale	Pas d'activité	Pas d'activité
β-caryophyllène	Pas d'activité	Pas d'activité
Oxyde de caryophyllène	Pas d'activité	Pas d'activité
bornéol	Pas d'activité	Pas d'activité
Acide oléique	Pas d'activité	Pas d'activité
Phytol	Pas d'activité	Pas d'activité
Tau-cadénol	Pas d'activité	Pas d'activité
2,3-diméthylnaphtalène-1,4-dione	Pas d'activité	Pas d'activité

Tableau. 27 : activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de certains composés identifiés par GC/MS

V.4. Conclusion

Le rendement en huile essentielle de la partie aérienne est très faible soit de 0,1 µl/g de poudre de plante. L'analyse GC/MS a montré la présence d'acides gras et d'aldéhydes linéaires ainsi que différents dérivés terpéniques comme le limonène, le bornéol, le α -caryophyllène, le β -caryophyllène, l'oxyde caryophyllène, le phytol et l'isophytol, ce qui confirme les résultats de Ekpendu et al. (1993).

L'huile essentielle, l'eau florale et les standards de l'acide oléique précédemment connu pour son activité antimicrobienne (Michael Hornitzky, 2003) et certains terpènes (le bornéol, le α -caryophyllène, le β -caryophyllène, l'oxyde caryophyllène, le phytol, tau-cadénol et la 2,3-dimethylnaphtalène-1,4-dione) ne présentent aucune activité antimicrobienne sur le *D. congolensis*.

VI Conclusion Générale et perspectives

VI. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

La dermatophilose bovine est une dermatose qui sévit dans les régions inter tropicales. Cette maladie est difficile à traiter car même un traitement antibiotique par voie parentérale n'empêche pas les récurrences. Cependant, des essais préliminaires utilisant en usage topique des pommades à base de 3 plantes médicinales se sont révélés prometteurs. Parmi les 3 préparations testées, c'est celle à base d'extrait de *M. scaber* qui s'est avérée la plus efficace. Le *M. scaber* est une « mauvaise herbe » qui est utilisée depuis des générations en médecine traditionnelle africaine pour traiter différentes dermatoses et d'autres maladies et n'a pas encore fait l'objet d'études phytochimiques exhaustives. Toutes ces raisons, ainsi que l'activité antimicrobienne prometteuse de l'extrait éthanolique de *M. scaber* nous ont conduit à sélectionner cette plante, à entreprendre des études phytochimiques et tenter d'identifier des composés antimicrobiens sur le *Dermatophilus congolensis*.

Cette plante fait partie de la large famille des Rubiacées connues pour contenir différentes classes de métabolites secondaires. Des études précédentes sur *M. scaber* ont montré la présence de différents métabolites secondaires (flavonoïdes, quinones,...) mais aucun composé terpénique n'avait été identifié dans la plante.

Nous avons tout d'abord confirmé, *in vitro* que l'extrait éthanolique de *M. scaber* avait une activité antimicrobienne sur le *Dermatophilus congolensis*. Nous avons, dès lors, entrepris d'identifier et d'isoler les composés actifs de cet extrait. Pour cela, nous avons développé une méthode de fractionnement de l'extrait actif par chromatographie liquide à pression atmosphérique (CLPA), extractions liquide – liquide et MPLC. Le choix de la CLPA comme méthode de fractionnement s'est révélé tout à fait judicieux car elle nous a permis d'avoir des fractions de différentes polarités, et d'obtenir des informations sur les polarités des molécules actives qui se retrouvaient principalement dans les fractions lipophiles. De plus, le fractionnement nous a permis de séparer les molécules actives sur le *D. congolensis*. En effet, nous avons montré que les fractions les plus antimicrobiennes sur *D. congolensis* étaient nettement moins cytotoxiques que l'extrait brut. Suite à cette CLPA de l'extrait brut, nous avons obtenu 3 fractions. Nous avons tout d'abord analysé ces fractions par chromatographie sur couche mince pour obtenir des informations préliminaires sur leurs composés majoritaires et rechercher des composés déjà identifiés dans la plante. Les composés actifs de certaines fractions les plus actives ont ensuite été isolés après mise au point de techniques de séparations par chromatographies sur colonnes à moyenne pression (MPLC). Leurs structures ont été élucidées grâce à l'interprétation des données fournies par la spectrométrie UV, de

masse, la RMN et l'infra rouge. D'autres ont été identifiées par des méthodes analytiques de pointe comme la GC/MS et la HPLC/MS.

Ces travaux nous ont permis finalement d'identifier 12 molécules (la 2-azaanthraquinone, l'acide oléanolique, l'acide ursolique, l' α -amyrine, la β -amyrine, le lupéol, le campestanol, le stigmastérol, le β -sitostérol, le squalène, le phytol et la rutine) dont seules la 2-azaanthraquinone et la rutine étaient connus pour être présents dans des échantillons de *M. scaber* provenant d'autres pays.

Parmi les composés identifiés, la 2-azaanthraquinone, l'acide oléanolique, l'acide ursolique, l' α -amyrine, la β -amyrine et le lupéol se sont révélés actifs sur le *D. congolensis* la 2-azaanthraquinone, l'acide oléanolique et l'acide ursolique étant les plus actifs.

Cette partie phytochimique a conduit à l'isolement, l'identification et la détermination de structure des composés présents dans l'extrait éthanolique de *M. scaber* et a permis de réaliser des avancées importantes dans la connaissance phytochimique du *Mitracarpus scaber*. Nous avons ainsi montré que les feuilles de cette plante sont riches en triterpènes de type oléane, ursane et en stérols. Ces molécules se retrouvent dans d'autres espèces de *Mitracarpus* confirmant ainsi la chimiotaxonomie de ce genre qui reste une source de nombreux triterpènes.

Dans une deuxième partie de notre travail, nous avons développé et validé des méthodes de dosage par chromatographie sur couche mince à haute performance-densitométrie et/ou chromatographie liquide à haute performance pour quantifier les trois composés isolés dans l'extrait éthanolique. Chaque méthode a été mise au point et validée avec des standards. Nous avons également optimisé les conditions d'extractions des triterpènes et de la 2-azaanthraquinone afin d'obtenir le maximum de rendement d'extraction. Nous avons ensuite appliqué ces méthodes à un échantillon de *M. scaber* en vue d'estimer la quantité de ces molécules dans la plante après vérification de la spécificité et détermination des rendements d'extraction. Ces méthodes validées sont donc applicables à tout échantillon de *M. scaber*.

Aucune méthode HPTLC-densitométrie n'avait été décrite précédemment pour doser ces molécules pures ou dans un extrait végétal. Par contre, des méthodes HPLC existaient pour le dosage des acides oléanolique et ursolique dans différentes plantes. Cependant, aucune des méthodes testées compatibles avec une détection en spectrométrie de masse ne permettait un dosage spécifique de ces deux acides dans nos extraits de *M. scaber*.

Grâce à ces dosages nous avons pu montrer que :

- l'acide oléanolique et l'acide ursolique sont présents respectivement à 0.0043% et 0.0125% dans la plante et l'azaanthraquinone à 0.00848%.

- en comparant l'activité de ces composés et leur quantité dans l'extrait, ils sont en partie responsable de l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique *in vitro* sur le *D. congolensis*.

Par ailleurs, les propriétés anti-inflammatoires des acides oléanolique et ursolique (K Ziterl-Eglseer, et al.1997; Hyung-HS, et al. 1996; Huang, et al. 1994; Kosuge, et al.1985 ;Takagi, et al. 1980 ; Batina, et al. 2003 ; Krohn, et al. 2001, E. Nadinic et al., 1999 ; E. Alvarez et al., 2000 ; A.M. Diaz et al., 2000) pourraient aussi expliquer en partie l'activité sur les lésions observée *in vivo*.

Nous avons enfin extrait et déterminé le pourcentage (0,1 µl/g de poudre de plante) d'huile essentielle dans la plante puis réalisé une analyse par GC/MS de cette huile. Certains composés identifiés disponibles commercialement ainsi que l'huile essentielle et l'eau florale ont ensuite été testés sur le *D. congolensis* afin de déterminer leurs contributions potentielles à l'activité de l'extrait brut. L'analyse GC/MS a montré la présence d'acides gras et d'aldéhydes linéaires ainsi que de différents dérivés terpéniques comme le limonène, le bornéol, le α -caryophyllène, le β -caryophyllène, l'oxyde de caryophyllène, le phytol ou l'isophytol. Ces résultats confirment bien les résultats analytiques obtenus sur un autre échantillon par Ekpendu (Ekpendu et al. 1993).

Les essais sur le *D. congolensis* ont montré que l'huile essentielle, l'eau florale et les standards de l'acide oléique et de certains terpènes (le bornéol, le α -caryophyllène, le β -caryophyllène, l'oxyde de caryophyllène, le phytol, le tau-cadénol et la 2,3-diméthylnaphtalène-1,4-dione) ne présentent aucune activité antimicrobienne sur ce germe aux doses testées, alors que certains d'entre eux sont connus pour être antimicrobiens (Michael Hornitzky, 2003 ; Fanaki et al. 1997)

Au vu de ces résultats, des perspectives intéressantes offertes par ce travail seraient d'analyser d'autres échantillons de *M. scaber* collectés à différents périodes pour déterminer l'éventuelle variabilité des teneurs, et vérifier si les composés identifiés pourraient avoir une importance dans d'autres propriétés pharmacologiques de la plante telles que le traitement des convulsions hyperpyrétiques, des affections hépatiques, des dyspepsies, de la constipation et des candidoses bucco-orales et digestives (Pr.Adjadohoun et al. 1989), de la lèpre, des morsures de serpent (Dalziel.J.M.1948) et de la syphilis (Kambu Kabangu. : 1990, Kerharo J. et al. 1974).

. Il serait aussi intéressant de vérifier le mode d'action des composés actifs sur le *D congolensis* et d'autres germes, d'étudier leur toxicité et d'identifier d'autres principes actifs de la plante.

VII. BIBLIOGRAPHIE

VI. BIBLIOGRAPHIE

A. Denoël, cours de galénique 1971

A. de Hoffmann et V. Stroobant. Mass spectrometry, 2001

Abe, Fumiko; Yamauchi, Tatsuo; Nagao, Tsuneatsu; Kinjo, Junei; Okabe, Hikaru; Higo, Hiroo; Akahane, Hiroshige. Ursolic acid as a trypanocidal constituent in rosemary. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* (2002), 25(11), 1485-1487

Adjanooun E.J., Adjakidje V., Ahyi M.R.A., Ake Assi L., Akoegninou A., d'Almeida J., Apovo F., Boukef K., Chadare M., Cusset G., Dramane K., Eyme J., Gassita J.-N., Gbaguidi N., Goudote E., Guinko S., Hounnon P., Lo Issa, Keita A., Kiniffo H.V., Kone-Bamba D., Musampa Nseyya A., Saadou M., Sodogandji Th., de Souza S., Tchabi A., Zinsou Dossa C., Zohoun Th., 1989. Contribution aux études ethnobotaniques et Floristiques en République Populaire du Bénin. Agence de coopération culturelle et technique.

Ali N. Thèse de Doctorat: Dermatophilose bovine en République du Bénin; Chimithérapie et phytothérapie comparée. 2002.

Ali N., Moudachirou M., Akakpo J.A., Quetin-Leclercq J. (2003). Treatment of bovine dermatophilosis with *Senna alata*, *Lantana camara* et *Mitracarpus scaber*. *J Ethnopharmacol.* 86, 167-171.

Alziel J.-M., 1948. The useful plants of West Tropical Africa. London S.W1.

Assogba, h. 1976. La dermatophilose bovine: la situation en République Populaire du Bénin. Thèse Doc. Vet. 10, Dakar 133 p.

Auger (R.), laporte-cru (J.) - Flore du domaine atlantique du Sud-Ouest de la France et des Régions de plaines - Bordeaux : CNDP, 1985

Bisignano G., Sanogo R., Marino A., Aquino R., D'Angelo V., Germano M.P., De Pasquale R., Pizza C., 2000. Antimicrobial activities of *Mitracarpus scaber* extract and isolated

Identification, purification, isolement et quantifications de principes actifs de *Mitracarpus scaber* et évaluation de leurs activités antimicrobiennes sur *Dermatophilus congolensis*. 163

constituents. *Lett. Appl. Microbiol*, 30(2), 105-108.

Blancou, J. M. 1976 a. The treatment of infection by *Dermatophilus congolensis* with particular reference to the disease in cattle. In *Dermatophilus Infection in Animal and Man*. Edited by Lloyd D. H. and Sellers K.C. Academic Press London. p 246 - 259.

Blancou, J. M. 1976 b. Bilan de 7 ans de prophylaxie de la dermatophilose. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 29, 122 – 125.

Blancou, J. M. 1969. Traitement de la streptothricose bovine par une injection unique D'antibiotiques à haute dose. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 22 (1), 33 - 40.

Balanehru, et al. *Medical Science Research*; 24(1994) 981-990 Batina, et al. *Current Medicinal Chemistry*; 2003 10(2), 155-171

Begum, Sabira; Sultana, Ishrat; Siddiqui, Bina S.; Shaheen, Farhana; Gilani, Anwar H. Structure and spasmolytic activity of eucalyptanoic acid from *Eucalyptus camaldulensis* var. obtusa and synthesis of its active derivative from oleanolic acid. *Journal of Natural Products*; (2002), 65(12), 1939-1941

Boris, M. 1968. Bacterial interference: protection against staphylococcal disease. *Bull. N.Y. Acad. Med.* 44, 1212 -1221.

Borges-Argaez, Rocio De L.; Escalante-Erosa, Fabiola; May-Pat, Filogonio; Medina-Baizabal, Leticia; Ojeda-Uc, Yazmin Del C.; Peraza-Sanchez, Sergio R.; Perez-Rodriguez, Matilde; Salazar-Aguilar, Norma E.; Sima-Polanco, Paulino; Pena-Rodriguez, Luis M. Grupo de Quimica Organica, Unidad de Biotecnologia, Centro de Investigacion Cientifica de Yucatan, A.C., Merida Yucatan, Mex. Editor(s): Shahidi, Fereidoon; Ho, Chi-Tang. Bioactive metabolites from Yucatecan medicinal plants. *Phytochemicals and Phytopharmaceuticals* (2000), 332-341.

Braghiroli L., Mazzanti G., Manganaro M., Mascellino M. T., Vespertilli T. (1996). Antimicrobial activity of *Calluna vulgaris*. *Phytotherapy Research.* 10, S86-S88.

- Bruneton J., 1999. In *Pharmacognosie-Phytochimie-Plantes médicinales*.
Techniques et Documentation-Lavoisier, Paris.
- Cirad : Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le
Développement Informations légales (2001) - epidemio@cirad.fr
- Chalwood B.V. 1991 Plant Cell and Molecular Sciences Group, division of Biosphere
Sciences, Kings College London, UK
- Coleman, c.m. 1967. Cutaneous streptothricosis of cattle in West Africa. *Vet. Rev.* 81 (11),
251-254.
- Collins, M.A. and Charles, H.P. (1987). Antimicrobial activity of carnosol and ursolic acid:
two anti-oxidant constituents of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Microbiology*. 4:311-315.
- Commission SFSTP (1997), Méthode chromatographiques de dosage dans les milieux
biologiques: stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP, STP Pharma
Prat., 7, 169-194.
- Currasson, G., Mornet, P. 1941. Une maladie grave et commune en Afrique Occidentale et
cependant connue : la streptothricose cutanée du bœuf. *Bull. Serv. Zoot. Epi. Afr. Occid. Fr.*
4, 181 p.
- Dalziel J.-M., 1948. The useful plants of West Tropical Africa. London S.W1.
- Dewick PM. The biosynthesis of C₅-C₂₅ terpenoid compounds. *Nat Prod Report*, 2002, 19,
125-132.
- Ding Q., Xu D., Wang Z., (2002). Determination of oleanolic acid and ursolic acid in
Liuwei Dihuang pellet and *Liuwei Dihuang capsules* by HPLC. *Zhongguo Zhong Yao Za
Zhi*. 27, 587-589.
- Dusch (H.), Huszar (A.), Nicolet (J.), Von GRAEVENITZ (A.) et COLLINS (M.D.) :
Characterization of an unusual human isolate of *Dermatophilus congolensis*. *Med.
Microbiol. Lett.* 1994, 3, 36-41.

Ellis (t.m.), Masters (A.M.), Sutherland (S.S.), Carsno (J.M.) et Gregory (A.R.) : Variation in cultural, morphological, biochemical properties and infectivity of Australian isolates of *Dermatophilus congolensis*. *Vet. Microbiol.*, 1993, 38, 81-102.

European Pharmacopoea. Fourth edition, Council of Europe, Strasbourg, 2002; 121-122.

Ekpendu, T. O. E.; Adesomoju, A. A.; Okogun, J. I. Chemical studies of *Mitracarpus villosus* (Sw.) DC - a medicinal rubiaceous weed. Department of Chemistry, Benue State University, Benue State, Nigeria. *Journal of Chemical Society of Nigeria* (2001), 26(1), 69-74.

Ekpendu. 1993. Constituents of the volatile oil of *Mitracarpus scaber* Zucc. Publié dans *Nigeria. J.*, 8 (5), 269-271.

E. Hoffmann et V. Stroobant. *Mass spectrometry: Principles and Application*, 2nd edition 2001.

Eisenreich W, Rohdich F, Bacher A. *Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids*. *Trends Plant Sci.*, 2001, 6, 78-84.

Farina, Carlo; Pinza, Mario; Pifferi, Giorgio. Synthesis and anti-ulcer activity of new derivatives of glycyrrhetic, oleanolic and ursolic acids. *Farmaco*. 1998 Jan ; 53(1) :22-32
Review

Favel, A.; Steinmetz, M. D.; Regli, P.; Vidal-Ollivier, E.; Elias, R.; Balansard, G. In vitro antifungal activity of triterpenoid saponins. *Planta Medica* ; 60(1), (1994) 50-453

Fisher AJ, Baker BM, Greenberg JP, Fall R. *Enzymatic synthesis of methylbutenol from dimethylallyl diphosphate in needles of Pinus sabiniana*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, 383, 128-134.

Freire, Marcia de Fatima Inacio; Geraldo de Carvalho, Mario; Berbara, Ricardo Luis Louro; Freire, Ronald Bastos. Antimicrobial activity of lupeol acetate from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers., Asteraceae. *Revista Brasileira de Farmacia* (2002), 83(1/4), 83-87.

Gan, et al. Chinese Pharmaceutical J ; 40(1988) 77-84

Gupta, M. B.; Bhalla, T. N.; Gupta, Gyan P.; Mitra, Chittaranjan R.; Bhargava, Krishna P.
Antiinflammatory activity of natural products Triterpenoids. Eur J of Pharmacology ; 6
(1969) 67-70

Germano, M. P.; Songo R.; Costa C.; D'angelo V.; De Pasquale R. Hépatoprotectrice
properties in the the rat of *itracarpus scaber* (Rubiaceae). Journal of Pharmacie and
Pharmacology. 1999 (06) 51(6), 729-34.

Gordon (M.A.) : Genus *Dermatophilus* Van Saceghem 1915, 357, *emend. mut. char.*
Gordon 1964, 521AL. In S.T.Williams, M.E. Sharpe, J.G. Holt (eds.) Bergey's Manual of
Systematic Bacteriology. Vol. 4. The Williams and Wilkins Compagny, Baltimore,
1989, 2409-2410.

Han, D. W., Ma, X. H., Zhao, Y. C. and Yin, L. (1981). The protective effects
of oleanolic acid on experimental cirrhosis. Journal of Traditional Chinese Medicine 3
(1981), 217-223

Harouna H.; Blansard G.; Boudon G.; Faure R.; Elias R.; Debrauwer L.; Saadou M. 1995.
Harounoside a pentalongin hydroquinone diglycoside from *Mitracarpus scaber*
Phytochemistry 39, 1483-1484.

Hart, C. B., Tszkiewicz, K., Kane, G. J. 1967. Mycotic dermatitis in sheep. II.
Dermatophilus congolensis and its reaction compounds in vitro. *Vet. Rec.* 81, 623-626.

Hart, C. B., Tyskiewicz, K. 1968. Mycotic dermatitis in sheep. III. Chemotherapy with
potassium aluminium sulphate. *Vet. Rec.* 82, 272-275.

Heron, I. D. and Morrow, A.N. 1989. The antibacterial activity of acaricides in relation to
streptothricosis. *J. Vet. Med. B.* 36, 69-71.

Heywood (H.) - Les Plantes à Fleurs - Paris : Nathan, 1996

- Ho You, Jin; Choi, Chul Yung; Kim, Ji Young; Park, Sung Jun; Hahm, Kyung-Soo; Jeong, Hye Gwang. Ursolic acid enhances nitric oxide and tumor necrosis factor- α production via nuclear factor- κ B activation in the resting macrophages. *FSBS Lett.* 509 (2001) 156-160
- Hostettmann K, Marston A, Hostettmann M. dans *Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Product Isolation*. 1998. Springer Verlag Edt.
- Houghton PJ, Raman A. dans *Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts*. 1998, Chapman et Hall, London.
- Hsu, Hsue-Yin; Yang, Jenq-Jer; Lin, Chun-Ching. Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice. *Cancer Letters* (Shannon, Ireland) (1996), Volume Date 1997, 111(1,2).
- Huang M. T., CT Ho, ZY Wang, T Ferraro, YR Lou, K Stauber, W Ma, C Georgiadis, JD Laskin, and AH Conney. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid *Cancer Res* 1994 54: 701-708.
- Hubert Ph., Chiap P., Crommen J., Boulanger B., Chapuzet E., Mercier N., Bervoas-Martin S., Chevalier P., Grandjean D., Lagorce P., Lallier M., Laparra M.C., Laurentie M., Nivet J.C. (1999), The SFSTP guide on validation of chromatographic methods for drug bioanalysis : from the Washington Conference to the laboratory, *Anal. Chim. Acta*, 391, 135-148.
- Hyung-HS, et al. *Cancer Letter* 94 (1995) 213-218
- Hyslop N. S. T. G. 1980. Dermatophilosis (streptothricosis) in animal and man. *Comp. Imm. Microbiol. Infect. Dis.* 2, 389-404.
- Ilemobade, A. A., Gyang, E. O., Bida, S. A., Addo, P. B. 1979. Cure of *Dermatophilus congolensis* infection in cattle by long acting Oxytetracyclin. *Rev. Vet. Sci.* 27, 302-305.
- Isitor, G.N., Njoku, C.O., Adogwa, A.O., Oyekan, A.O. 1993. Etude sur l'efficacité du Identification, purification, isolement et quantifications de principes actifs de *Mitracarpus scaber* et évaluation de leurs activités antimicrobiennes sur *Dermatophilus congolensis*. 168

- Lamstreptocide A et B sur les cas de dermatophilose dans les Caraïbes. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 46 (1-2), 303 -308.
- Jie Liu. *J. Of Ethnopharmacology*; 49(1995) 57-68
- Kambu Kabangu. : *Elément de Phytothérapie comparée.* 1990
- Kingali, J. M., heron, I .D., Morrow, a. n. 1990. inhibition of *dermatophilus congolensis* by substances produced by bacteria found on.
- K Ziterl-Eglseer, et al. *J of Ethnopharmacology.* 1997 May 13; 57 139-144
- Kashiwada Y, Y.; Wang, H.K.; Nagao, T.; Kitanaka, S.; Yasuda, I.; Fujioka, T.; Yamagishi, T.; Cosentino, L. M.; Kozuka, M.; Okabe, H.; Ikeshiro, Y.; Hu, C.Q.; Yeh, E.; Lee, K.H. *J. Nat. Prod.* 1998 Sept; 61(9) 1090-5 ;
- Keith G. L. and David J. Tucker (1983). The separation of substituted olean-12-en-28-oic acide isomers. *Aust. J. Chem.* 36, 2297-305.
- Kerharo J., 1974. *La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques.* Edit Vigot-Frères-Paris.
- Kesselmeier J, Staudt M. *Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology.* *J. Atm. Chem.*, 1999, 33, 23–88.
- Kosuge, et al. *Chemical and Parmaceutical Bull.* ; 33(1985) 5355-5357
- Krohn, K.; Rao, M. S.; Raman, N. V.; Khalilullah, M. High-performance thin layer chromatographic analysis of anti-inflammatory triterpenoids from *Boswellia serrata* Roxb. *Phytochemistry analysis*; (2001), 12(6), 374-376
- Lee, et al *Japon cancer research and oncology* 120(1994) 513-518
- Lin, Chun Nan; Tome, Whey Pin. *Antihepatotoxic principles of Sambucus formosana.* *Planta Medica* (1988), 54(3), 223-4.
- Identification, purification, isolement et quantifications de principes actifs de *Mitracarpus scaber* et évaluation de leurs activités antimicrobiennes sur *Dermatophilus congolensis*. 169

Lin, et al. Chinese Pharmacological Bull. ; 4 (1987) 14-15

Liu J; Liu Y; Parkinson A; Klaassen C D. Effect of oleanolic acid on hepatic toxicant-activating and detoxifying systems in mice. Journal of pharmacology and experimental therapeutics (1995 Nov), 275(2), 768-74.

Liu Y, et al. Toxicol Lett. 1998 mar 31; 95(2) : 77-85

Lloyd, D. H., Hawkins, J. P., Pragnell, J. 1990. Efficacy of long acting oxytetracyclin in the treatment and control of bovine dermatophilosis. *Veterinary Dermatology*. 1 (2), 79-84

Lloyd, D.H., Noble, W.C. 1982. Interaction between antibiotic producing bacteria and *D. congolensis*: a potential therapeutic tool. In: Antimicrobials and Agriculture. Edited by Woodbine M. Butterworths, London. p 277 -283.

Lichtenhaler hk, zeidler j, schwender j, müller c, z. naturforsch., teil c, 2000, 55, 305.

Loreto F, Mannozi M, Maris C, Nascetti P, Ferranti F, Pasqualini S. *Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in plants*. Plant Physiol., 2001, 126, 1-8.

Martinez, D., Aumont, G., Moutoussamy, M., Gabriel, D., Tatareau, A.H., Barré, N., Vallée, F., Mari, B. 1993. Etudes épidémiologiques sur la dermatophilose dans les Antilles. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 46 (1-2), 323-327.

Martinez (D.) et Prior (P.) : Survival of *Dermatophilus congolensis* in tropical clay soils submitted to different water potentials. *Vet. Microbiol.*, 1991, 29, 135-145.

Marouf (A.) - Dictionnaire de Botanique - Paris : Dunod, 2000.

Mahran, Gamal; Shehata, Ibrahim; Koheil, Mahmoud; El-Shabrawy, Abdel Rahman; Al-Ahmady, Ali. Phytochemical and biological studies on two *Acalypha* species. *Zagazig Journal of Pharmaceutical Sciences* (1993), 2(2), 169-

77.

- Morrow, A. N., Arnott, J. L., Heron, I. D., Koney, E. B. M., Walker, A. R. 1993. L'effet d'une lutte contre les tiques sur la fréquence de la dermatophilose chez les bovins autochtones au Ghana. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 46 (1-2), 317-322.
- Mourouzaa, M. 1957. Revue des rapports annuels des Services de l'Elevage et des Industries Animales du Dahomey (1955). *Bull. Epiz. Afr.* 5 (1), 88-89.
- Michael Hornitzky . Fatty acids– an alternative control strategy for honeybee diseases. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Rural Industries Research and Development Corporation. April 2003
- Neuwinger. H. D. African traditional medicine
- Noble, W. C, Willie, J. A. 1980. Interactions with antibiotic producing and non producing *Staphylococcus* in skin surface and sub-surface models. *Br. J. Exp. Path.* 61, 339-341.
- Nwufoh, K. J. 1985. Anatomical and bacteriological studies of bovine cutaneous streptothricosis infection in Nigeria. Thesis M. Phil. University of Ibadan. 298p.
- Nwufoh, K. J. and Amakiri, S. I. 1981. The normal skin bacterial flora of some cattle breeds in Nigeria. *Bull. Anim. Hlth. Prod. Afr.* 29, 103.
- Ohigashi, et al. *Cancer Lett.* ; 30(1986) 143-151
- Ogundaini, 1999. Antimicrobial agent from some Nigerian plants. Publié dans *Niger. J. Nat. Prod. Med.* 3, 26-27.
- Ogwu, D. A., Osori, D.I.K. 1981. Effectiveness of long action terramycin injectable solution in the treatment of sterptothrocosis in cattle. *Br. Vet. J.* 137, 585-589.
- Ojo, M. O. 1975. *Bacillus pumilus* an inhibitor of *Dermatophilus congolensis* Infection in a mouse model by antibiotic producing Staphylococci. *Br. J. Exp. Path.* 61,
- Identification, purification, isolement et quantifications de principes actifs de *Mitracarpus scaber* et évaluation de leurs activités antimicrobiennes sur *Dermatophilus congolensis*. 171

- Okunade, Adewole L., Alice M. Clark, Charles D. Hufford and Babajide O. Oguntimein, 1999. Azaanthraquinone: An Antimicrobial Alkaloid from *Mitracarpus scaber*. *Planta Medica*. 447-448.
- Okoli, C. O.; Akah, P. A.; Nwafor, S.V. Anti-inflammatory activity of plants. *Journal of Natural Remedies*
- Oppong, E. N. W. 1976. Epizootiology of *Dermatophilus* Infection in Cattle in the Accra Plains of Ghana. In *Dermatophilus* Infection in Animals and Man. Edited by Lloyd D.M. and Sellers K.C. Academic Press London, p 17 -32.
- Peleton, H. R. 1975. La dermatophilose cutanée dans le Sud-Est de la République du Tchad. Essais de traitement à l'aide d'une injection unique d'antibiotiques. *Acta Veterinaria Hungarica* 37 (4), 197-199.
- Pialat, 1998. Synthesis and extraction of pentalongin, a naphthoquinoid from *Mitracarpus scaber*. Publié dans *Fr. Nat. Prod. Lett.*, 12 (1), 23-30.
- Pesler, D. 1973. Contribution à l'étude de la streptothricose ou dermatite contagieuse des bovidés. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*. 53 (3), 187-194.
- Parvente'eva, et al. *Chemical abstracts* ; 91 (1979) 9279r
- Pedersen, et al. *Blood* (2002), 100(8), 2965-2972
- Ranaivoson, A., Ranaivoson, R, Rambelomanana. 1984. Essai de traitement de la dermatophilose bovine à Madagascar par injections de spyramycine. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.* 37, 260-267.
- Ramesh, N.; Viswanathan, M. B.; Saraswathy, A.; Balakrishna, K.; Brindha, P.; Lakshmanaperumalsamy, P. Phytochemical and antimicrobial studies on *Drynaria quercifolia*. *Fitoterapia* (2001), 72(8), 934-936.
- Rouessac F, Rouessac A, Ourisson G dans *Analyse Chimique : Méthodes et Techniques Instrumentales Modernes*. 1998. Ed. Dunod.
- Identification, purification, isolement et quantifications de principes actifs de *Mitracarpus scaber* et évaluation de leurs activités antimicrobiennes sur *Dermatophilus congolensis*. 172

- Richards, R. M. E., Durham, D. G., Liu, X. (1994). Antimicrobial activity of compounds from *Rubus pinfaensis*. *Planta Med.* 60, 471-3.
- Rohmer M. *The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants*. *Nat. Prod. Rep.*, 1999, 16, 565-574.
- Saidu, N. A. A. Adbulkadir, J. A. 1986. Effects of selected acaricides on dermatophilosis. In streptothricosis in Nigeria. Edited by Uzoukwu M., p 105 -114.
- Samui KL, Hugh-Jones ME. The financial and production impacts of bovine dermatophilosis in Zambia. Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement 1986.
- Sarradin, P., Akapko, A. J., Bornarel, P., Mohamadou, B. 1985. Essai de traitement de la dermatophilose bovine au Cameroun. Intérêt de l'association antibiotique-bain acaricide. *Rev. Méd. Vét. Pays trop.* 38 (3), 239-246.
- Schuhr CA, Hect S, Kis K, Eisenreich W, Wungsintaweekul J, Bacher A, Rohdich F. *Studies on the non-mevalonate pathway-preparation and properties of isotope-labeled 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate*. *Eur. J. Org. Chem.*, 2001, 3221-3226.
- Silverstein RM, Bassler GC, Morill TC dans *Spectrometric identification of organic compounds*. 5th edition. 1991. John Wiley INC.
- Shim J.-S., Park K.-M., Chung J.-Y., Hwang J.-K. (2002). Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Physalis angulata* against oral pathogens. *Nutraceuticals and Food.* 7, 215-218.
- Singh, B.; Singh, S. Antimicrobial activity of terpenoids from *Trichodesma amplexicaule* Roth Department of Botany, University of Rajasthan, Jaipur, India. *Phytotherapy Research* (2003), 17(7), 814-816.
- Singsaas EL, Lerda M, Winter K, Sharkey TD. *Isoprene increases thermotolerance of isoprene-emitting species*. *Plant Physiol.*, 1997, 115, 1413–1420.
- Suh N, et al. *Cancer Res.* 1998 FeB 15 58(4) : 717-23

Takagi, et al. *Chemical and Pharmacological Bulletin*; 28(1980) 1183-1188

Tan GT, et al. *Biochem. J.* 1996 Mar 15; 314 (Pt3) : 993-1000

Tan, Nur; Kaloga, Macki; Radtke, Oliver A.; Kiderlen, Albrecht F.; Oksuz, Sevil; Ulubelen, Ayhan; Kolodziej, Herbert. Abietane diterpenoids and triterpenoic acids from *Salvia cilicica* and their antileishmanial activities. *Phytochemistry*; (2002), 61(8), 881-884

Tsuruga, et al; *Chemical and Pharmacology Bull*; 39(1991) 3276-3278

Thiery, G., Memery, G. 1961. Etiologie, Traitement et Prophylaxie de la streptothricose. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 14, 413 - 427.

Vaissaire (J.) et Dufrene (M.) : A propos de cas de dermatophilose à *Dermatophilus congolensis* en France dans les différentes espèces animales. *Bull. Acad. Vét. de France.*, 1995, 68, 63-68.

Van der Doelen, G.A., Van den Berg, K.J., Boon, J.J., Shibayama, N., De la Rie and E.R., Genuit, W.J.L., Analysis of fresh triterpenoid resins and aged triterpenoid varnishes by HPLC-APCI-MS (/MS), *Journal of Chromatography A*, 809 (1998), 21-37.

Vasilenko, et al. *Chemical Abstracts*; 91 (1981) 49279r

Vasilenko, et al. *Farmakology and Toksikology*; 45 (1982) 66-

Verdes, N.; pop, T.; Tarcurta, E. 1989. Treatment of dermatophilosis with Crezogal. *Lucrarile-Institut-de Cercetari-Veterinary-si-Biopreparate-Pasteur.* 18: 89-99.

Vessman J. (1959), selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 14, 867-869.

Wagner H, Hörhammer L, Kiraly IC. *Flavon-C-glykoside in Croton zambezicus*. *Phytochem.*, 1970, 9, 897.

- Wang BH, et al. *Phytochemistry*. 1996 Jan ; 41(1) : 55-63
- Wang X., Cui T., Qi X., Du G., Zhao J., Liu M., (2002). Determination of oleanolic acid and ursolic acid in *Jujuba* by HPLC. *Shipin Kexue*. **23**, 137-138
- Wekhe (S.N.) : New media for the isolation of *Dermatophilus congolensis*. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, 1989, 21, 231-232.
- Wilson, O. B., Amakiri, S. F. 1989. Chemotherapy of dermatophilosis in a herd of Fulani cattle. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa* 37 (4), 315 - 317.
- Wolfertz M, Sharkey TD, Boland W, Kühnemann F, Yeh S, Weise SE. *Biochemical regulation of isoprene emission*. *Plant, Cell Environment.*, 2003, 26, 8, 1357.
- Woldemichael G. M., Singh M. P., Maiese W. M., Timmermann B. N. (2003). Constituents of antimicrobial extract of *Caesalpinia paraguariensis* Burk. *J Biosci.* 58, 70-75.
- Xie Y., Hang T., Cheng Z., Zhang Z., (2001); HPLC determination of oleanolic and ursolic acid in Chinese medicina herbs. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 26, 615-616.
- Yoshikawa M, et al. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1996 Juin; 44(6): 1212-7
- Yoshikawa M, et al. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1996 Oct, 44(10): 1923-7
- Young, et al. *Biological Pharmacology Bulletin*; 17(1994) 990-992
- Yuan K., LiG., Junzhi Y., (1999). Determination of ursolic acid and oleanolic acid in asiatic plantain by HPLC. *Zhong Cao Yao*. 30, 901-903.
- Zaria, L. T. 1993. *Dermatophilus congolensis* infection (dermatophilosis) in animals and man: an update. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 16 (3), 179 - 222.
- Zaria, L.T. 1991. In vitro and in vivo inhibition of *Dermatophilus congolensis* coagulase negative antibiotic-producing staphylococci from pigs. *Res. Vet. Sci.* 50 (2), 245 - 246.
- Identification, purification, isolement et quantifications de principes actifs de *Mitracarpus scaber* et évaluation de leurs activités antimicrobiennes sur *Dermatophilus congolensis*. 175

Zhang LR, et al. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao*. 1995 Nov; 16(6): 527-30. Chinese

Zhang, et al, *Traditional Medicine and Clinical Pharmacology*; 8 (1996), 24-26

Zhang, et al. *Chinese pharmaceutical Bulletin*; 1 (1984) 300-301

Zhou, et al. *Journal of Clinical Pharmacological Sciences*; 2 (1993) 69-79

Zuc, et al. *Cancer Letters* (2002) 175(1), 17-25

Zhu L., Wu Y., Liao X., Yao H., (2000). Determination of oleanolic acid and ursolic acid in the leaves of *Vaccinium bracteatum* thumb by HPLC. *Jiangxi Nongye Daxue*. 22, 167-169.