

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ MENTOURI CONSTANTINE
FACULTÉ DES SCIENCES EXACTES
DÉPARTEMENT DE CHIMIE

N ° d'ordre :

Série :

Mémoire

Présenté pour L'obtention du diplôme de Magister
en chimie organique
option : Substances thérapeutique d'origine naturelle

Caractérisation chimique
des principes à effet antidermatophyte des racines
d'*Anacyclus pyrethrum* L.

Présentée Par :

Melle Hamimed Souad

sous la direction du :

Dr : Belkhir Abdelmalik

Devant le jury :

Président : Mr Belattar Abdelhamid Prof. Dépt de Chimie, UMC

Rapporteur : Mr Belkhir Abdelmalik MC. Dépt de Pharmacie, UMC

Examineurs : Melle Kabouche Zahia Prof. Dépt de Chimie, UMC

Mr Boulebda Nadji MC. Dépt de Pharmacie, UMC

Soutenue le : 24 / 06 / 2009

Remerciements :

Mes remerciements sont d'abord au Dieu de m'avoir donné la force et le courage nécessaire pour mener ce travail à bout.

Ce mémoire n'aurait pu voir le jour sans la participation de nombreuses personnes, je vais m'essayer à trouver les mots justes pour exprimer spécifiquement mes reconnaissances à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

*À mon directeur de thèse, Monsieur **Belkhir** **Abdelmalik**, Docteur d'Etat et Maître de conférences au Département de Pharmacie, Faculté de Médecine. Université Mentouri Constantine. Vous m'avez initié à la recherche. Votre orientation m'a été très bénéfique pour la réalisation de ce travail, Votre rigueur et façon de travailler, m'as permis d'être plus attentif et critique vis-à-vis de mon travail. Merci pour votre patience dans la correction de ce mémoire.*

J'espère avoir été à la hauteur de votre attente.

Mes remerciements vont aussi aux membres de mon jury de mémoire, À ...

*Monsieur, le Professeur **Belattar Abdel Hamid**, Vous me faites un très grand honneur en acceptant de présider ce jury ;*

*Mademoiselle, le Professeur **Kabouche Zahia**, responsable de ma promotion, recevez ici l'expression de ma profonde gratitude. Je vous remercie vivement pour me faire l'honneur de participer à ce jury. C'est grâce à votre bienveillance que j'ai pu réaliser certaines analyses physico-chimiques.*

Monsieur, le Dr Boulebda Nadji, Maître de conférences, biologiste et pharmacologue au département de pharmacie de Constantine, je vous remercie pour les discussions enrichissantes dans le domaine de la biologie, pour votre écoute et votre gentillesse.

Au chef de service du laboratoire de parasitologie du Centre hospitalo-universitaire de Constantine, le Professeur Moulahem Tayeb, qu'il trouve ici toute ma gratitude pour nous avoir fournis les souches fongiques.

Au A. Lobstein, Professeur de pharmacognosie, faculté de pharmacie de Strasbourg (France), pour sa collaboration dans la réalisation des spectres de masse.

Nos remerciements vont aussi À :

Monsieur Ben Abbes Badr-izamane, responsable du laboratoire de parasitologie, pour avoir superviser les tests d'activité antimycosique ;

Monsieur Touil Ahmed, Merci pour votre gentillesse et votre aide dans la réalisation d'analyses physico-chimiques.

Je remercie tous mes amis et camarades chimistes, Notamment Ma très chère amie Warda, collègue du labo, avec qui j'ai passé de très bons moments inoubliables en réalisant ce travail dans une ambiance d'amitié. Merci pour ton encouragement et ton soutien moral depuis le jour où nos chemins se sont croisés.

Enfin, Je ne saurais oublier Monsieur Sami et Mademoiselle Wided qui ont contribué à la réalisation de ce modeste travail.

Merci à tous.

Dédicaces :

Ce qui sont les plus chers au monde, mes parents :

A mon père, pour m'avoir soutenu moralement et matériellement jusqu'à ce jour.

Père, ce travail est le tien.

A ma mère, voici l'aboutissement de tes nombreuses nuits de prières de ta sagesse et ta générosité pour votre petite fille. Chère mère, ce travail est le fruit de tes efforts.

A mon frère Mohamed, le chemin est dur et encore long, il faudrait du courage et beaucoup de chance, que dieu vous garde.

Je n'oublie jamais la générosité illimitée de mes sœurs :

Khadija, Houria, Warda, Nour elhouda et Hanen.

Leurs soutien moral et financier, sans lesquels je n'aurais pu continuer mes études dans de bonnes conditions, tous simplement je voudrais leurs dire je les aime de tout mon cœur.

A mes neveux et nièces :

Je vous souhaite beaucoup de chance. J'espère que vous allez suivre les pas de votre tante, que Dieu vous protège.

Souad

Sommaire :

Remerciements.....	I
Dédicaces.....	III
Abréviation.....	1
Introduction générale.	3

1^{ère} Partie : Etude Bibliographique.

I — Les dermatophytes.

I — 1 Introduction.....	7
I — 2 Classification des dermatophytes.....	7
I — 3 Répartition géographique.....	8
I — 4 Thérapeutiques des dermatophytes.....	9
I — 5 Méthodes de criblage de substances antifongiques :	
I 5 — 1 Méthode de diffusion sur agar (boite pétri).....	12
I 5 — 2 Méthode de dilution sur agar (boite multi puits).....	12
I 5 — 3 Méthode bioautographique.....	13
I — 6 Stratégie de recherche des nouvelles substances antifongiques.....	13

II — Aspects : Botanique, Chimique et Pharmacologique de la plante

II — 1 Aspect Botanique :	
II 1 — 1 Famille Asteraceae.....	15
II 1 — 2 Genre Anacyclus.....	15
II 1 — 3 Espèce Anacyclus pyrethrum.....	15
II — 2 Aspect Chimique :	
II 2 — 1 Chimie du genre Anacyclus.....	17
II 2 — 2 Chimie d' Anacyclus pyrethrum.....	20
II — 3 Aspect biologique et Pharmacologique :	
II 3 — 1 Famille Asteraceae.....	21
II 3 — 2 Espèce Anacyclus pyrethrum.....	23

III — Etude des métabolites secondaires isolées de la plante.

a — les Terpénoides.

III — 1	Introduction.	24
III — 2	Classification structurale et biosynthèse des Triterpènes.	24
III — 3	Méthodes d'analyses des Triterpènes :	
a —	Analyse par Infra — Rouge (IR).	29
b —	Analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN).	29
c —	Analyse par spectroscopie de masse (SM).	30
III — 5	Propriétés biologiques et pharmacologiques des Triterpènes.	31

6 — les Coumarines.

III — 1	Définition.	32
III — 2	les coumarines dans le règne végétal.	32
III — 3	Diversité structurale des coumarines :	
III 3 — 1	Coumarines Simples.	34
3 — 2	Coumarines Prénylées.	35
3 — 3	Furanocoumarines (Linéaires et Angulaires).	35
3 — 4	Pyranocoumarines :	
III 3 — 4 — 1	Pyranocoumarines simples.	35
III 3 — 4 — 2	Dipyranocoumarines.	36
3 — 5	Coumarines à l'état dimérique (Bicoumarines).	37
3 — 6	Coumarines à l'état trimérique (Tricoumarines).	37
III — 4	Etude de la voie de Biosynthèse des coumarines :	
a —	Biosynthèse des coumarines simples.	37
b —	Biosynthèse des furanocoumarines.	39
III — 5	Analyse structurale des coumarines :	
a —	Fluorescence sous la lumière UV.	41
b —	Spectroscopie infrarouge IR.	41
c —	Spectroscopie ultraviolette UV.	41
d —	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire RMN.	42
e —	La spectrométrie de masse des coumarines.	42
III — 6	Intérêt pharmacologique des coumarines.	43

2^{ème} Partie : Partie Expérimentale.

I	—	Matériel végétal.	45
II	—	Méthode d'Extraction.	45
III	—	Méthodes chromatographiques :	
III	—	1 Chromatographie sur couche mince (CCM) analytique.	46
III	—	2 Chromatographie sur colonne de gel de silice (CC) :	
III	—	2 — 1 Fractionnement de l'extrait DCM.	47
III	—	2 — 2 Fractionnement de l'extrait EtOH.	48
III	—	3 Chromatographie sur plaques préparatives.	48
III	—	4 Réactifs de révélation utilisés en CCM.	49
IV	—	Analyses microchimique d'identification.	50
V	—	Méthodes d'analyse spectroscopiques :	
V	—	1 Spectroscopie UV – visible.	50
V	—	2 Spectroscopie infrarouge (IR).	50
V	—	3 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN ¹ H).	51
V	—	4 Masse spectroscopique (MS).	51
VI	—	Activité antidermatophyte :	
VI	—	1 Préparation du milieu de culture.	51
VI	—	2 Préparation des solutions à tester :	
	—	a — Extraits végétaux et fractions enrichies.	52
	—	b — Solution de référence.	52
	—	c — Contrôle.	52
VI	—	3 Préparation des plaques multi puits.	52
VI	—	4 Préparation de l'inoculant fongique.	52
VI	—	5 Mesure de l'activité antifongique.	53
VI	—	6 Traitement statistique des données.	53

3^{ème} Partie : Résultats et Discussion.

I	—	Obtention des extraits bruts d' <i>Anacyclus pyrethrum</i> .	54
II	—	Criblage biologique préliminaire des extraits bruts.	56
III	—	Etude phytochimique approfondie de l'extrait actif DCM :	
III	—	1 Analyses microchimique et chromatographique.	58
III	—	2 Fractionnement bio guidé de l'extrait DCM :	
III	—	2 — 1 Evaluation de l'activité antifongique des fractions riches	61
III	—	2 — 2 Etude du Lot 4 et 5 :	
	—	a — Purification.	65

6	—	Caractéristiques des produits isolés :	
6	—	1 Le Composé A :	
6 ₁₁	—	Propriétés physico-chimiques.....	66
6 ₁₂	—	Spectre IR _c	66
6	—	2 Le Composé B :	
6 ₂₁	—	Propriétés physico-chimiques.....	67
6 ₂₂	—	Spectre UV.....	68
6 ₂₃	—	Spectre IR _c	68
6	—	3 Le Composé C :	
6 ₃₁	—	Propriétés physico-chimiques.....	69
6 ₃₂	—	Spectre IR _c	70
6 ₃₃	—	Spectre RMN ¹	71
6 ₃₄	—	Spectre SM.....	77
III	2	—	3 Etude du Lot 6 :
a	—	Le Composé D :	
a ₁	—	Propriétés physico-chimiques.....	79
a ₂	—	Spectre RMN ¹ H.....	80
a ₃	—	Spectre SM.....	88
IV	—	Etude phytochimique de l'extrait EtOH :	
IV	—	1 Examen par chromatographie en couche mince de l'extrait EtOH.....	90
IV	—	2 Fractionnement de l'extrait EtOH :	
IV	2	—	1 Etude du Lot 6 :
a	—	Caractéristiques du Composé E :	
a ₁	—	Propriétés physico-chimiques.....	93
a ₂	—	Spectre UV.....	93
a ₃	—	Spectre IR _c	94
a ₄	—	Spectre RMN ¹ H.....	95
IV	2	—	2 Etude du Lot 10 :
a	—	Examen du Lot 10 S ₂	101
b	—	Caractéristiques des produits isolés du lot 10S2 :	
b	—	1 Le Composé F :	
b ₁₁	—	Propriétés physico-chimiques.....	102
b ₁₂	—	Spectre UV.....	103
b ₁₃	—	Spectre IR _c	103
b	—	2 Le Composé G :	
b ₂₁	—	Propriétés physico-chimiques.....	104
b ₂₂	—	Spectre UV.....	105
b ₂₃	—	Spectre IR _c	106
b	—	3 Le Composé H :	
b ₃₁	—	Propriétés physico-chimiques.....	107
b ₃₂	—	Spectre UV.....	108
b ₃₃	—	Spectre IR _c	108

<i>Conclusion.</i> -----	110
<i>Références Bibliographiques.</i> -----	112
<i>Annexes :</i>	
<i>Annexe 1 : Glossaire des termes scientifiques.</i> -----	124
<i>Annexe 2 : Les Spectres RMN ¹H des Composés identifiés.</i> -----	128
<i>Annexe 3 : Constantes physiques et données spectrales des composés isolés.</i> -----	136

Abréviations

<i>A.pyrethrum</i>	<i>Anacyclus pyrethrum</i>
ALKAM	Alkamides
CC	Chromatographie sur colonne
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CD Cl ₃	chloroforme deutéré
CH ₃ COOH	acide acétique
CMI	concentration minimale d'inhibition
COUMAR	Coumarines
D _{cont}	Diamètre de croissance dans le contrôle
D _{trait}	Diamètre de croissance dans le traitement
d	doublet
d d	doublet de doublet
DCM	dichlorométhane
DMSO	diméthylsulfoxyde
EP	éther de pétrole
<i>E</i>	<i>Epidermophyton</i>
EtOAc	acétate d'éthyle
EtOH	éthanol
F	fraction
J	constante de couplage
H	proton
HA	hydroalcoolique
HCOOH	acide formique
Hz	Hertz
Hex	Hexane
H ₂ O	Eau distillée
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
INH (%)	Pourcentage de l'inhibition du mycélium
IPP	isoprénique
IR	Infrarouge
Gem	géminal
GRISEO	griseofulvine
<i>M</i>	<i>Microsporium</i>
m	Multiplet
Me OH	méthanol

MHz	Méga Hertz
Moy	Moyenne
MS	Masse spectroscopique
MV	Matière Végétale
m/z	masse/charge d'un ion
n/d	non déterminé
P	facteur statistique de comparaison de populations
PAL	<i>phénylalanine ammonialyase</i>
PHENYLP	Phényle propane
ppm	Partie par million
PHYTOST	Phytostérols
RDA	Rétro Diels – Alder
R _f	Rapport frontal
RMN ¹ H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
S	Singulet
SD	+/- écart type
<i>T</i>	<i>Trichophyton</i>
t	triplet
TRITER	Triterpènes
UV	Ultraviolet
δ	Déplacement chimique
λ _{max}	Longueur d'onde maximale d'absorption
ν _{max}	Fréquences d'absorption
A, B, C, D, E, F, G et H.	Symbole utilisé pour les composés isolés

*Introduction
Générale*

Malgré les progrès réalisés en médecine au cours des dernières décennies, notamment la disponibilité d'une gamme large de produits de santé, les traitements médicamenteux actuels restent insuffisants face aux maladies, telles que les infections d'origine infectieuse, bactérienne ou fongique.

L'émergence de nouvelles maladies qui affaiblissent le système immunitaire (ex. SIDA), ainsi que l'apparition de souches microbiennes (virus, bactéries, champignons), de plus en plus résistantes aux traitements actuels, soulignent l'urgence de la recherche de nouveaux agents thérapeutiques.

Le règne végétal constitue une source inépuisable de nouvelles molécules utilisables directement comme principe actif ou pouvant servir comme molécule guide pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques. La recherche de nouveaux médicaments d'origine naturelle à action antifongique constitue un axe important de recherche au niveau mondial. En Algérie, les maladies infectieuses d'origine bactérienne ou fongique constituent l'une des pathologies, les plus répandues dans les statistiques des maladies dans notre pays.

Le présent travail concerne l'étude d'une plante médicinale locale, de la famille des Asteraceae, en l'occurrence l'*Anacyclus pyrethrum*, une plante vivace commune notamment dans le tell constantinois. La médecine traditionnelle locale utilise les racines de cette espèce médicinale, connue sous l'appellation de « Guentess », pour traiter diverses pathologies. Cette drogue végétale est connue depuis l'antiquité pour ses propriétés médicinales, et surtout son efficacité contre les infections de la peau, notamment les maladies fongiques. L'espèce a fait l'objet de peu d'études chimiques et pharmacologiques. La sélection de cette espèce fait suite à un travail de criblage préliminaire dans notre laboratoire, recherchant les extraits végétaux potentiellement antifongiques vis-à-vis de cultures de dermatophytes. L'extrait hydro-alcoolique des racines d'*A. pyrethrum* s'est révélé très active sur des cultures fongiques de *Microsporum canis*, *M. nanum* et *Trichophyton rubrum*, comparé à la Griséofulvine, médicament antifongique de référence.

Au vu de ces résultats encourageant, la présente étude a été initiée dans le but de déterminer le profil métabolique de la plante et de caractériser le ou les principes responsables de l'effet antifongique.

Pour ce faire, un protocole de travail a été élaboré (schéma 1), s'articulant sur 03 principales étapes :

1° le criblage biologique d'un gradient d'extraits d'*A. pyrethrum* et fractionnement bioguidé des extraits potentiellement actifs ;

2° la caractérisation phytochimique préliminaire des fractions issues des extraits actifs ;

3° la purification et détermination structurale des molécules isolées des fractions actives

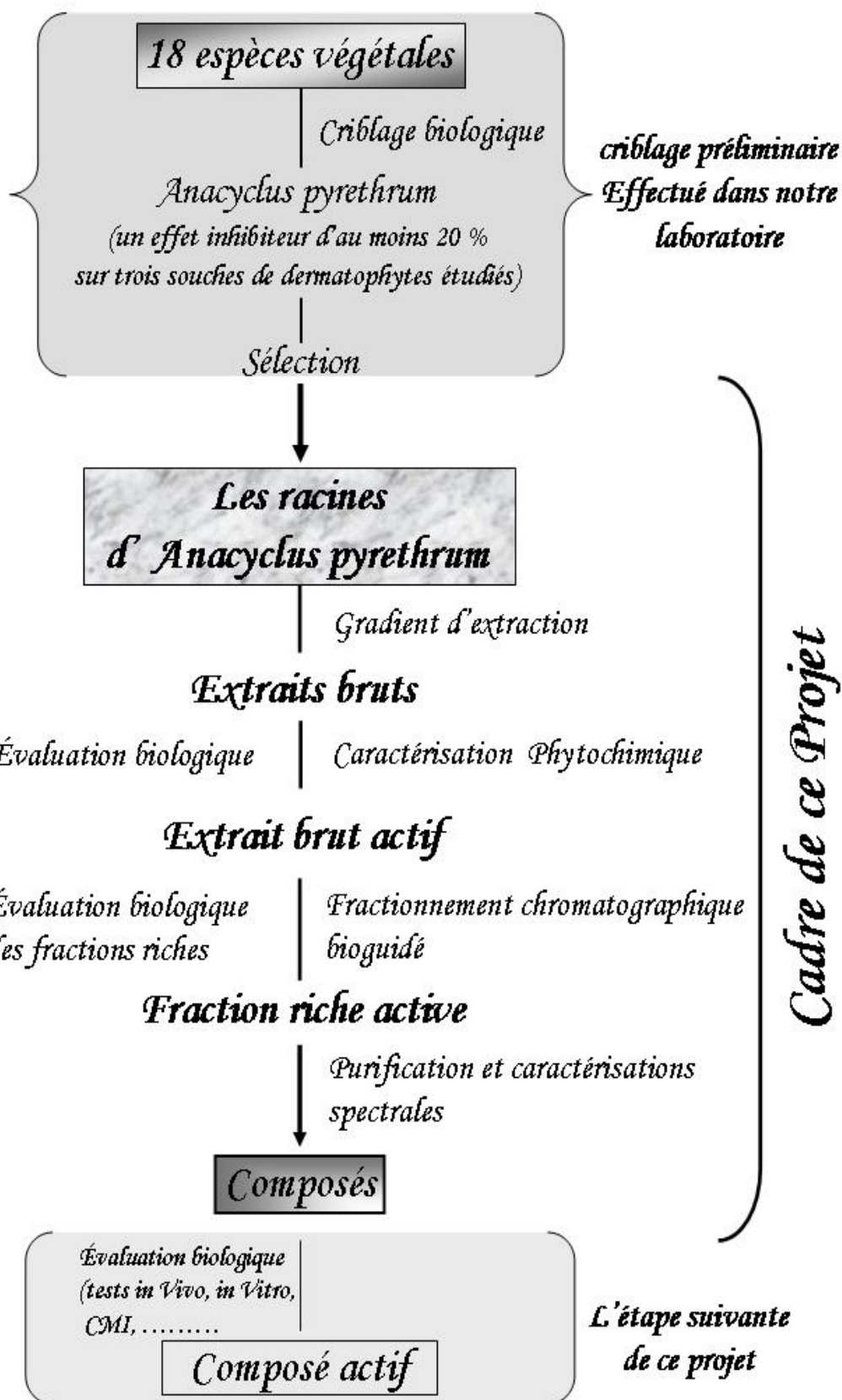


Schéma 1 : De la plante aux phytoconstituants bioactifs.

Ce mémoire est partagé en 3 parties :

La première partie est essentiellement consacrée aux données bibliographiques. Elle traite des dermatophytes pathogènes et des aspects botanique, chimique et pharmacologique d' *Anacyclus pyrethrum*. Elle aborde aussi d'une façon exhaustive la biosynthèse, la diversité structurale, les méthodes de séparation et d'analyses ainsi que les propriétés pharmacologiques des triterpènes et des coumarines, principales molécules isolées pour la première fois dans le cadre de ce travail, à partir des racines d' *A. pyrethrum*

La deuxième partie contient la section expérimentale. Elle décrit le matériel et méthodes chimiques, physico-chimiques et biologiques utilisés dans cette étude.

La troisième partie regroupe les principaux résultats et leur discussion.

Une conclusion avec nos recommandations sur les travaux futurs, suivie de références bibliographiques ainsi qu'une section des annexes, clôturent ce mémoire.

1 ère Partie :

Étude Bibliographique.

I – Les dermatophytes.

I – 1 Introduction :

Les microorganismes fongiques pathogènes constituent une sérieuse menace pour l'homme. La fréquence des infections fongiques a augmenté de façon considérable au cours des dernières années notamment dans les pays en voie de développement, sous l'effet de facteurs socio-économiques.

Les Dermatophytes constituent un groupe de champignons filamenteux adaptés à la kératine humaine et animale. Chez l'homme, la peau et les phanères (ongles, cheveux, poils) sont les sites privilégiés de ces champignons (Harouna.H *et al.*, 1993; Chabasse. D *et al.*, 2004; Zagnoli.A *et al.*, 2005).

I – 2 Classification des dermatophytes:

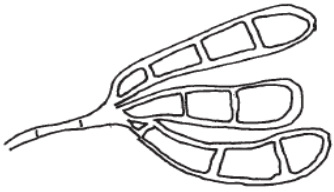
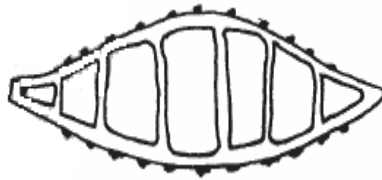
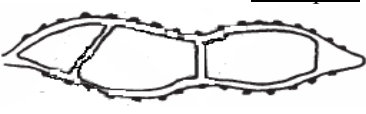
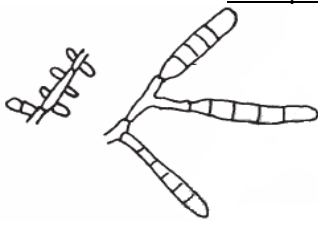

Selon leur habitat naturel, on distingue trois espèces de dermatophytes (Boursiquot, J.M *et al.*, 2002) :

- Les espèces *anthropophiles* : issues exclusivement de l'homme, leur transmission est interhumaine ;
- Les espèces *zoophiles* : issues de l'animal, leur transmission à l'homme nécessite un contact, direct ou indirect, avec un animal infecté.
- Les espèces *géophiles* ou *tellurique* : se transmettent accidentellement à l'homme, suite à une blessure tellurique.

D'un point de vue taxonomique, les dermatophytes sont représentés par 3 genres : *Epidermophyton*, *Microsporum* et *Trichophyton*. Ces microorganismes sont caractérisés par la production de spores diverses : microconidies, macroconidies, arthrospores et chlamydospores. Ils ont une affinité particulière pour la kératine, ils attaquent la peau et les phanères indemnes (Boursiquot, J.M *et al.*, 2002; Zagnoli, A *et al.*, 2005; Carballeira, N.M., 2008).

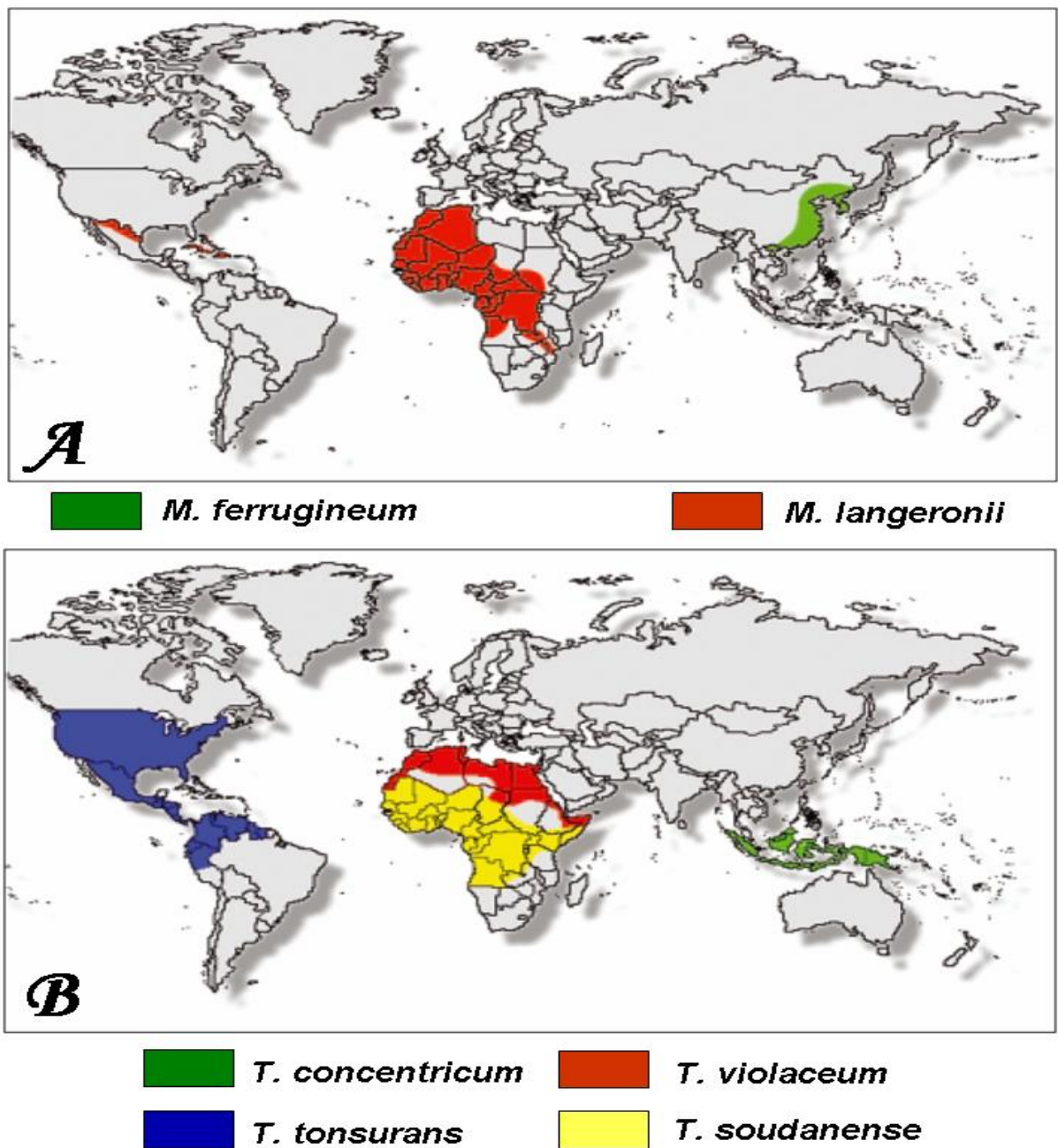
Le tableau suivant présent les principaux dermatophytes.

Tableau I – 1 : Principaux dermatophytes (regroupés selon leur habitat).

Espèces anthropophiles	Espèces zoophiles	Espèces telluriques
<p><u>Genre Epidermophyton :</u> Exemple :</p>  <p><i>Epidermophyton floccosum</i></p>	<p><u>Genre Microsporium :</u> <i>M. canis</i> <i>M. equinum</i> <i>M. nanum</i> <i>M. persicolor</i> <i>M. praecox</i> Exemple :</p>  <p><i>Microsporium canis</i></p>	<p><u>Genre Microsporium :</u> <i>M. cookei</i> <i>M. fulvum</i> <i>M. gypseum</i> <i>M. praecox</i></p>
<p><u>Genre Microsporium :</u> <i>M. ferrugineum</i> <i>M. audouinii</i> Exemple :</p>  <p><i>Microsporium audouinii</i></p>		
<p><u>Genre Trichophyton :</u> <i>T. concentricum</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> <i>T. rubrum</i> <i>T. schoenleinii</i> <i>T. soudanense</i> <i>T. tonsurans</i> <i>T. violaceum</i> Exemple :</p>  <p><i>Trichophyton rubrum</i></p>	<p><u>Genre Trichophyton :</u> <i>T. equinum</i> <i>T. erinacel</i> <i>T. gallinae</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> <i>T. verrucosum</i> Exemple :</p>  <p><i>Trichophyton mentagrophytes</i></p>	<p><u>Genre Trichophyton :</u> <i>T. ajelloi</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> <i>T. terrestre</i></p>

I – 3 Répartition géographique :

La plupart des dermatophytes sont cosmopolites (ex. *E. floccosum*, *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*). D'autres espèces restent spécifiques à certaines régions du globe comme *M. ferrugineum* en Asie et en Afrique (Dieng, M.T *et al.*, 2000; Soussi, A.M *et al.*, 2007) (voir la figure suivante).



*Figure I – 1 : Aire de répartition de
A : *Microsporium ferrugineum* et *M.langeronii*
B : *Trichophytum concentricum*, *T. soudanense*, *T. tonsurans* et *T.violaceum**

I – 4 Thérapeutiques des dermatophytoses :

Les antifongiques sont des molécules capables de détruire spécifiquement les différents champignons impliqués en mycologie médicale. Contrairement au grand nombre d'antibiotiques et malgré d'importants progrès, la gamme d'antifongiques disponibles reste limitée à un petit nombre de produits. En effet, il n'existe à ce jour que trois classes d'antifongiques : les polyènes, les dérivés pyrimidiques et les dérivés azotés (figure I – 2).

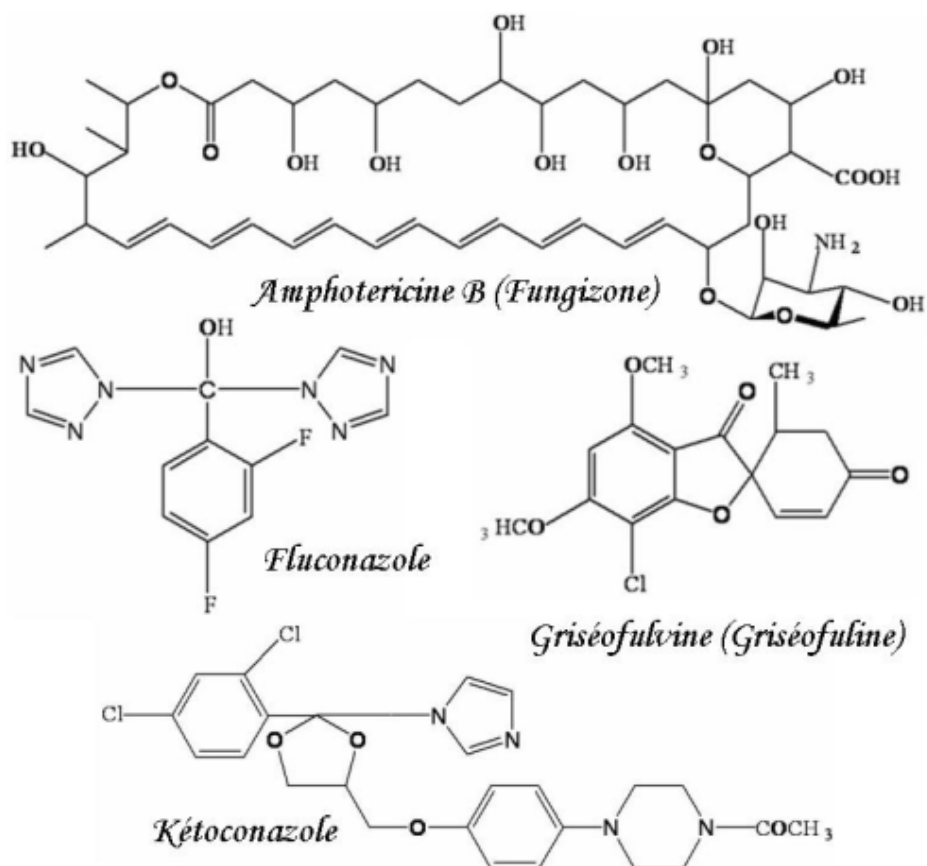


Figure I – 2 : Structures de quelques antifongiques représentatifs.

● Les polyènes :

Le plus connu des polyènes est l'Amphotéricine B, utilisé depuis 1960 comme le chef de file des antifongiques. Il s'agit d'un polyène macrolide, produit naturel d'une bactérie *Streptomyces nodusus*. L'Amphotéricine B comprend une chaîne polyhydroxylée hydrophile, associée à une chaîne polyène lipophile (Sylvie, C *et al.*, 2003).

● Les dérivés azotés :

Les dérivés azotés sont des substances synthétiques ayant un noyau azolé contenant soit deux soit trois atomes d'azote (imidazole et triazole respectivement). La tolérance de ces traitements reste bonne, avec seulement quelques troubles digestifs et de rares réactions cutanées (Sylvie, C *et al.*, 2003; Zagnoli, A *et al.*, 2005; Carballeira, N.M., 2008).

● Les dérivés pyrimidiques :

Le plus connu d'entre eux est la 5-fluorocytosine (5-FC). Il s'agit d'un dérivé fluoré de la pyrimidine, substance hautement soluble dans l'eau, qui peut être administrée par voie orale ou veineuse.

Les dermatophytes sont regroupés selon leur mode d'administration, par voie générale ou en usage local :

Les molécules
à usage local (les dérivés azotés):

- le bifonazole
- l'éconazole, Pévaryl
- l'isoconazole, Fazol
- le Kétoconazole, Kétoderm

Les molécules
utilisées par voie générale :

- la griséofulvine, Griséofuline
- la terbinafine, Lamisil
- le kétoconazole, Nizoral

En raison des nombreux cas d'effets secondaires indésirables, de contre-indications et d'échec thérapeutique reportés suite à l'usage de nombreux antifongiques utilisés actuellement, un besoin urgent de nouveaux agents est nécessaire. C'est dans cette optique que depuis un certain nombre d'année, des efforts ont été consentis en vue de découvrir de nouveaux médicaments (voir la figure suivante). Ces molécules ont été développées pour l'essentiel à partir de chimie de synthèse. Leur taux de succès est par contre relativement faible, en particulier pour les mycoses invasives à *Aspergillus* et les candidémies (Sylvie, C *et al.*, 2003).

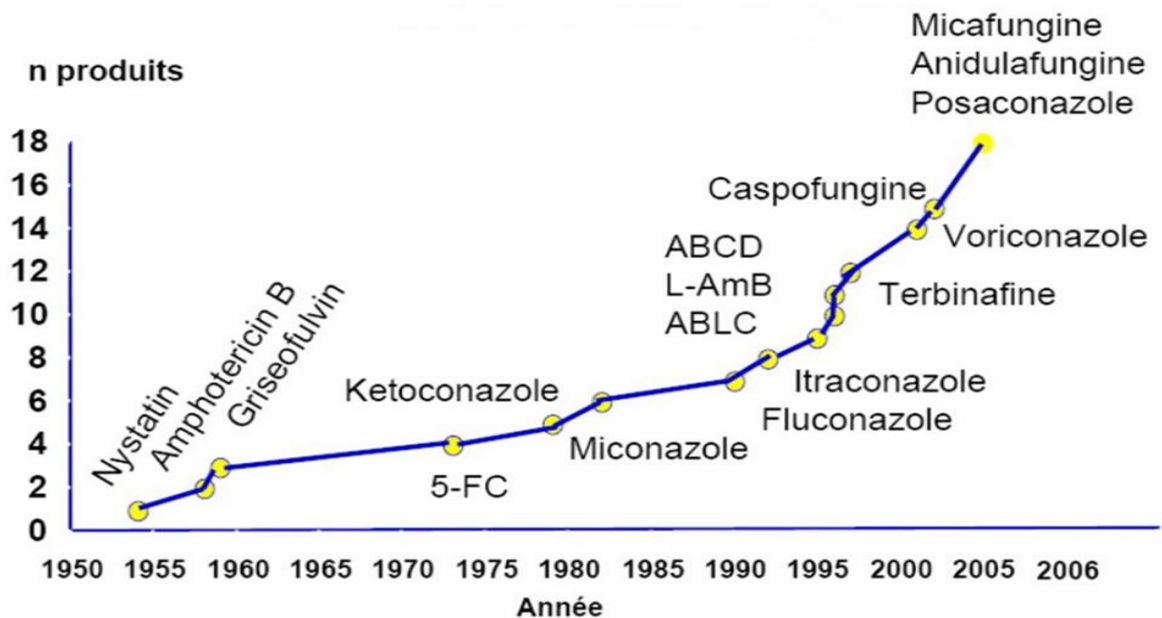


Figure I – 3 : Molécules antifongiques développées entre 1950 à 2006.

I – 5 Méthodes de criblage de substances antifongiques :

Dans le cas de découverte d'agents antibactérien et antifongique, trois tests simples sont décrits dans la littérature : la méthode de diffusion sur agar, la méthode de dilution et la méthode bioautographique (Hostettmann, K *et al.*, 1994).

I 5 – 1 Méthode de diffusion sur agar (boite pétri) :

Elle consiste à faire diffuser dans un milieu gélosé un antifongique et mesurer le diamètre d'inhibition. La souche à étudier est inoculée sur toute la surface de la gélose et entre en compétition durant l'incubation à 37 °C, avec l'effet inhibiteur de l'antifongique. Une zone d'inhibition circulaire se forme pour les concentrations inhibitrices du produit.

I 5 – 2 Méthode de dilution sur agar (boite multi puits) :

Le milieu de culture inoculé avec le microorganisme, puis mélanger avec l'échantillon testé. Les cultures sont maintenues à 37 °C jusqu'à la croissance du matériel fongique comparé avec le contrôle. L'expérience est répétée avec plusieurs dilutions de l'échantillon dans le milieu de culture et avec une dilution supérieure pour déterminé le CMI.

I 5 – 3 Méthode bioautographique :

La méthode bioautographique employé pour localiser l'activité antifongique sur un chromatogramme, la zone d'inhibition est visualisée avec le réactif de détection dehydrogenase, les composés antifongiques apparaître comme des spores colorées dans le fond.

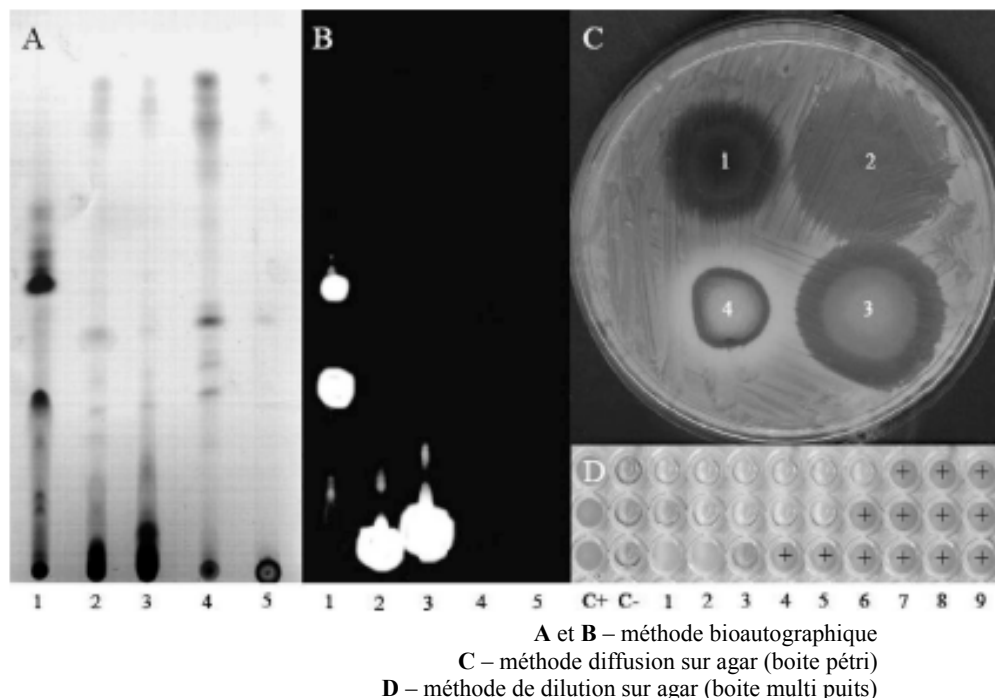


Figure I – 4 :

I – 6 Stratégie de recherche des nouvelles substances antifongiques :

Les produits naturels, notamment d'origine végétale, sont utilisés comme une source de diversité moléculaire dans plusieurs programmes de découverte de nouveaux médicaments (Rahman, A *et al.*, 2005; Steven, M.C *et al.*, 2008).

Dans les nombreux programmes de découvertes de produits naturels bioactifs, dans lesquels le produit final est soit utilisé comme un médicament ou un produit guide pour le développement de nouvelle classe de médicament, des bio tests de criblage simples et reproductibles sont nécessaires pour les étapes de criblage préliminaire et pour guider le processus d'isolement vers la molécule active.

Le tableau suivant rassemble quelques travaux concernant l'activité antifongique des plantes.

Tableau I – 2 : Quelques références sur l'activité antifongique des plantes.

<i>L'espèce</i>	<i>La famille</i>	<i>Parties utilisées</i>	<i>Références</i>
<i>Acorus calamus</i>	Araceae	racines	Webser, D <i>et al.</i> , 2008
<i>Aloe excelsa</i>	Aloeaceae	Feuilles + racines	Coopoosamy, R.M <i>et al.</i> , 2007
<i>Bumelia sartorum</i>	Spotaceae	tiges	Cruz, M.C.S <i>et al.</i> , 2007
<i>Artemisia herba alba</i>	Asteraceae	parties aériennes	Giordani, R <i>et al.</i> , 2007
<i>Clerodendrum uncinatum</i>	Verbenaceae	racines	Hostettmann, K <i>et al.</i> , 2000
<i>Combretum elaeagnoides</i>	Combretaceae	tiges	Liu, M <i>et al.</i> , 2007
<i>Combretum fragrans</i>	Combretaceae	Feuilles	Liu, M <i>et al.</i> , 2007
<i>Combretum kirkii</i>	Combretaceae	Feuilles	Liu, M <i>et al.</i> , 2007
<i>Combretum zeyheri</i>	Combretaceae	Feuilles	Liu, M <i>et al.</i> , 2007
<i>Diospyros abyssinica</i>	Ebenaceae	racines	Diallo, D., 2000
<i>Diplolophium buccinateur</i>	Umbelliferae	Feuilles	Hostettmann, K <i>et al.</i> , 2000
<i>Eriosema tuberosum</i>	Leguminosae	racines	Hostettmann, K <i>et al.</i> , 2000
<i>Fagara zanthoxyloides</i>	Rutaceae	racines	Igor, P.L.B., 2003
<i>Glinus oppositifolium</i>	Aizoaceae	parties aériennes	Diallo, D., 2000
<i>Origanum majorana</i>	Lamiaceae	parties aériennes	Giordani, R <i>et al.</i> , 2007
<i>Parkia biglobosa</i>	Mimosaceae	écorce du tronc	Igor, P.L.B., 2003
<i>Polygala fruticosa</i>	Polygalaceae	racines	Hostettmann, K <i>et al.</i> , 2000
<i>Rapanea melanophloeos</i>	Myrsinaceae	Feuilles	Hostettmann, K <i>et al.</i> , 2000
<i>Rubus rigidus</i>	Roseaceae	Feuilles + tiges	Motsei, M.L <i>et al.</i> , 2003
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Lamiaceae	parties aériennes	Giordani, R <i>et al.</i> , 2007
<i>Stylosanthes micronata</i>	Fabaceae	plante entière	Igor, P.L.B., 2003
<i>Swartzia madagascariensis</i>	Leguminosae	racines	Igor, P.L.B., 2003
<i>Terminalia brachystemma</i>	Combretaceae	Feuilles	Liu, M <i>et al.</i> , 2007
<i>Terminalia mollis</i>	Combretaceae	Feuilles	Liu, M <i>et al.</i> , 2007
<i>Thymelaea lythroides</i>	Thymeleaceae	plante entière	Dohou, N <i>et al.</i> , 2004
<i>Ximenia Americana</i>	Oleraceae	racines	Igor, P.L.B., 2003
<i>Zanthoxylum davyi</i>	Rutaceae	écorce	Steenkamp, V <i>et al.</i> , 2007
<i>Ziziphus joazeiro</i>	Rhamnaceae	tiges	Cruz, M.C.S <i>et al.</i> , 2007

*II – Aspects :
Botanique, Chimique
et Pharmacologique de la
plante.*

II – 1 Aspect Botanique :

II 1 – 1 Famille Asteraceae :

La famille des Astéracées représente l'une des taxons les plus importants du règne végétale. Elle est principalement représentée par des espèces vivaces. Les feuilles sont le plus souvent alternes, mais aussi opposées ou radiales, bractées, simples ou parfois composées (Gaussen, H *et al.*, 1982). Les fleurs ont la caractéristique commune d'être réunies en capitules, c'est-à-dire serrées les unes aux autres (Gaussen, H *et al.*, 1982; Osborn, R.W *et al.*, 1995). La famille des Astéracées (Compositae) compte approximativement 900 genres avec plus de 13000 espèces (Trease, G.E *et al.*, 1983).

II 1 – 2 Genre Anacyclus :

Le genre *Anacyclus* regroupe des espèces à capitules composés en principe de fleurs extérieures ligulées et de fleurs intérieures tubulées (Lloyd, C.G *et al.*, 1911). La principale particularité du genre est la présence d'ailes aplaties entourant les fruits et faisant penser à des paires d'oreilles, Ce sont des plantes annuelles, à feuilles alternes embrassantes, profondément divisées. La tige portant le capitule s'épaissit en dessous de celui-ci. L'involucre est formé de bractées inégales, se recouvrant en partie, ne portant pas d'appendice terminal. Le taxon *Anacyclus*, tel que défini à l'origine par Linné (voir classification), En Algérie le genre *Anacyclus* est représenté par deux espèces, a savoir *Anacyclus pyrethrum* (L.) Link et *Anacyclus clavatus* (Pers) (Julien, A., 1894).

II 1 – 3 Espèce Anacyclus pyrethrum :

L'espèce *Anacyclus pyrethrum* (synonyme : *Anthemis pyrethrum*) a été définie par Linné et révisée par Link. Sa taxonomie est décrite dans le tableau I – 3. plante très commune des hauts plateaux et montagnes du Tell, Il s'agit d'une plante de 30 cm de haut maximum, vivace par ses racines longues, épaisses, fibreuses, rudes, brunes à l'extérieur, blanches à l'intérieur (Lloyd, C.G *et al.*, 1911; Paris, R.R *et al.*, 1971). Les tiges sont nombreuses couchées sur le sol, simples ou peu rameuses. Les feuilles sont finement

découpées, délicates et alternes sont pubescentes. Les fleurs sont blanches au cœur jaune ordinairement solitaires (Paris, R.R *et al.*, 1971).

Tableau I – 3 : Taxonomie d’Anacyclus pyrethrum.

DIVISION	: <i>ANGIOSPERMAE</i>
Classe	: <i>Dicotyledoneae</i>
s/Classe	: <i>Asteridae</i>
Ordre	: <i>Asterales</i>
Famille	: <i>Asteraceae</i>
s/Famille	: <i>Asteroideae</i>
Tribe	: <i>Anthemideae</i>
Genre	: <i>Anacyclus</i>
Espèce	: <i>Anacyclus pyrethrum</i> (L.) Link.



Anacyclus pyrethrum (L.) Link

Figure I – 5 : Anacyclus pyrethrum L.

Les noms communs et vernaculaires :

Nom arabe : oued el athas, agargarha, tigenhas, ignens et Guenthus قنطس

Nom français : pyrèthre d'Afrique

Nom anglais : Pellitory

II – 2 Aspect Chimique :

II 2 – 1 Chimie du genre Anacyclus :

Le genre *Anacyclus* a fait l'objet de quelques investigations chimiques, signalant la présence de nombreux types de métabolites secondaires, incluant des triterpènes, des stéroïdes, des coumarines, des lignanes, des polyacétylènes (alkamides) et des flavonoides. Le tableau I – 4 rassemble les différents métabolites secondaires isolés du genre *Anacyclus*.

Tableau I – 4 : Quelques données chimiques sur le genre Anacyclus.

<i>Espèce</i>	<i>Organes étudiés</i>	<i>Molécules extraites</i>	<i>Références</i>
<i>Anacyclus Clavatus</i>	Feuilles	Quatre flavonoides : Isomeric7-glucoside, Luteolin7-glucoside, 7-rhamnosylglucoside, Quercetin7-glucoside.	Harald, G., 1978
<i>Anacyclus cyrtolepidioides</i>	Flours Fraîches	Six stéroïdes : cholestérol, campestérol, stigmastérol, β -sitostérol, delta-7-stigmastérol et delta-5-ovenastérol Un hétéroside stéroïdique: le β -sitostérol-3- O- β -D-glucoside Des hydrocarbures sesquiterpéniques : Le δ -cadinène et le Valencène. Des alcools : le Nonadécane-1-ol, l'Eicosane-1-ol. Des cétones : la 6, 10,14-Triméthyl-pentadécane-2-one. Des esters : le (9Z, 12Z)-Octadéca-9,12-diénonate de méthyle et L'Octadécanoate de méthyle. Des acides carboxyliques : l'acide Hexadécanoïque et l'acide Tétradécanoïque	Bergaoui, A <i>et al.</i> , 2006 (a)
	Flours	Des monoterpènes : 49,55% de la totalité des constituants, le Composé majoritaire (43,81%) Est l'pinène. 26 composés sesqui- Terpéniques : 7,9% de cette huile essentielle, le β -cubébène (2,37%).	Bergaoui, A <i>et al.</i> , 2006 (b)

Suite du Tableau I – 4 :

<i>Anacyclus cyrtolepidioides</i>	Partie aérienne	Deux coumarines : herniarine et 3,4 – dehydroherniarine.	Benkiki, N <i>et al.</i> , 2007
<i>Anacyclus pyrethrum</i>	Feuilles	Deux flavonoïdes : Flavonoï5-glucoside, Diosmetin7-glucoside.	Harald, G., 1978
	Racines	Une alkamide : la Pellitorine. (le principale constituant présent dans <i>A pyrethrum</i>)	Chaaib, K.F., 2004 Sukumaran, K <i>et al.</i> , 1995 Arnason, J.T <i>et al.</i> , 1989 Adesina, S.K <i>et al.</i> , 1988 Crombia, L., 1954
		Iso butylamide: anacycline.	Arnason, J.T <i>et al.</i> , 1989 Bohlmann, F <i>et al.</i> , 1973
		Une série des amides : des amides monosubstituées contenant α β - dienne-unsaturation.	Arnason, J.T <i>et al.</i> , 1989 Harald, G., 1978
		Des polyacétylènes : Artemisia Kétone, triyne-Triene. Divers: acide linolique, Dehydromatricar ester.	Sukumaran, K <i>et al.</i> , 1995 Arnason, J.T <i>et al.</i> , 1989 Harald, G., 1978 Jente, R <i>et al.</i> , 1976
<i>Anacyclus radiatus</i>	Fleurs	Des flavonoïdes : Isorhamnetin5-glucoside, Quercetin5-glucoside, Flavonoï5-glucoside, Quercetin7-glucoside, Isomeric7-glucoside, 7-glucosides de Quercetagine, Patuletine, Quercetagine3-méthyle éther, Quercetagine6, 3'-diméthyl éther (spinacétine).	Harald, G., 1978
	Partie aérienne	Deux flavonoïdes : Isorhamnetine, Quercetine. Une coumarine : isoscopoletine. Un triterpène : Taraxasterole. Trois stéroïdes : sitostérol, campestérol, stigmastérol. Nouveau germacranolide : Marioline.	Gonzalez, C.F.A <i>et al.</i> , 1985
<i>Anacyclus valentinus</i>	Feuilles	Trois flavonoïdes : Luteolin7-glucoside, 7-rhamnosylglucoside, Quercetin7-glucoside.	Harald, G., 1978

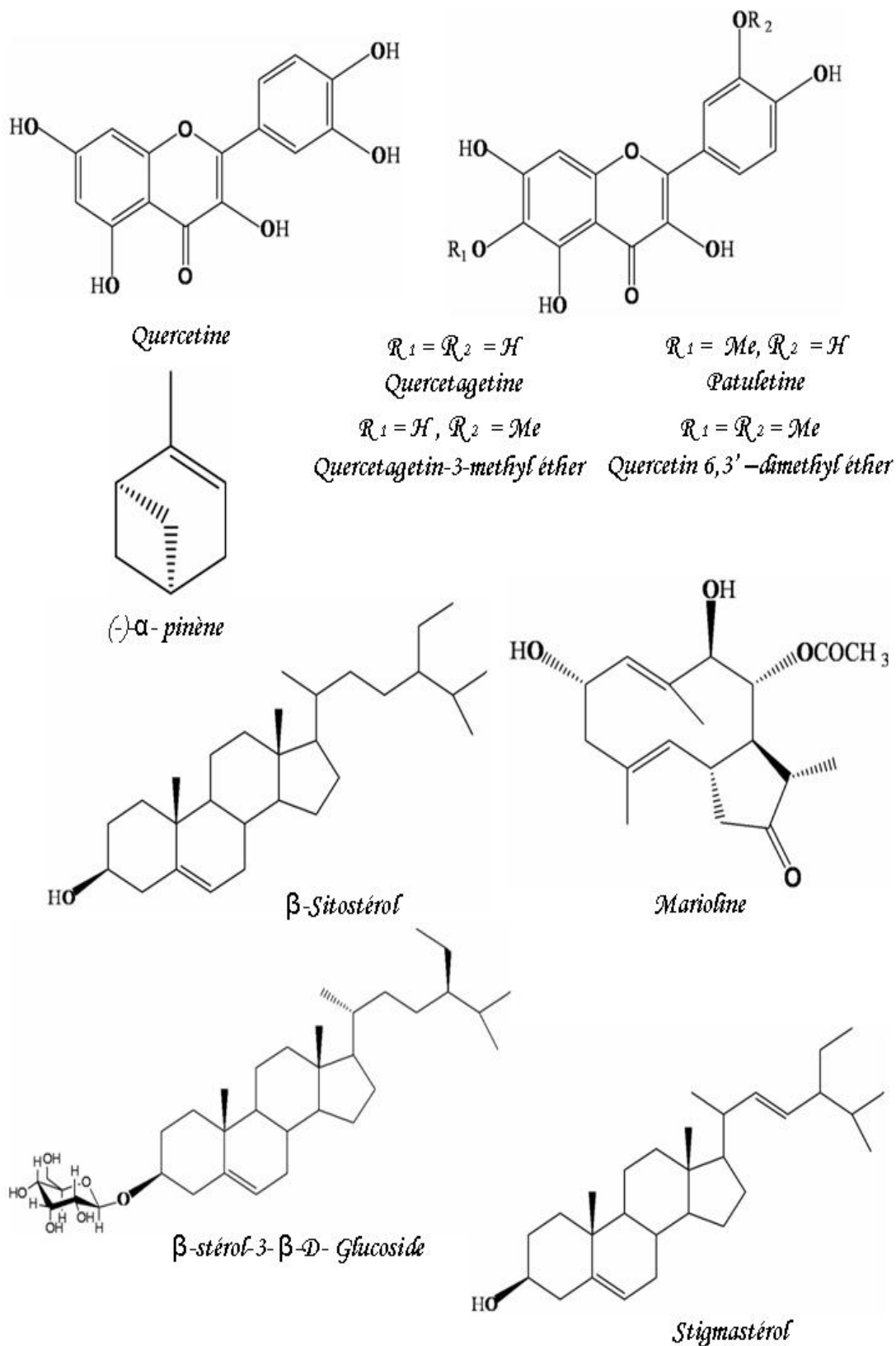


Figure I – 6 : Structures chimiques de quelques métabolites secondaires isolées du genre *Anacyclus*.

II 2 – 2 Chimie d'*Anacyclus pyrethrum* :

A l'opposé de la chimie des autres espèces du même genre, celle d'*Anacyclus pyrethrum* demeure insuffisamment étudiée. La bibliographie signale la présence dans les racines de composés polyacétyléniques (Bohlmann, F *et al.*, 1973; Jente, R *et al.*, 1976; Harald, G., 1978; Arnason, J.T *et al.*, 1989), d'amides (Harald, G., 1978; Arnason, J.T *et al.*, 1989; Sukumaran, K *et al.*, 1995) et de lignanes (Adesina, S.K *et al.*, 1988; Chaaib, K.F., 2004). Les racines accumulent surtout des alkamides (Crombia, L., 1954; Adesina, S.K *et al.*, 1988; Arnason, J.T *et al.*, 1989; Sukumaran, K *et al.*, 1995; Chaaib, K.F., 2004), notamment la Pellitorine, constituant principale présent dans les racines d'*A.pyrethrum*, isolé en **1895** par **Dunstan et Garnett** (Adesina, S.K., 1988; Chaaib, K.F., 2004). Ces substances azotés et insaturées sont associées à l'effet sialagogue connu depuis longtemps (Jacobson, M., 1956).

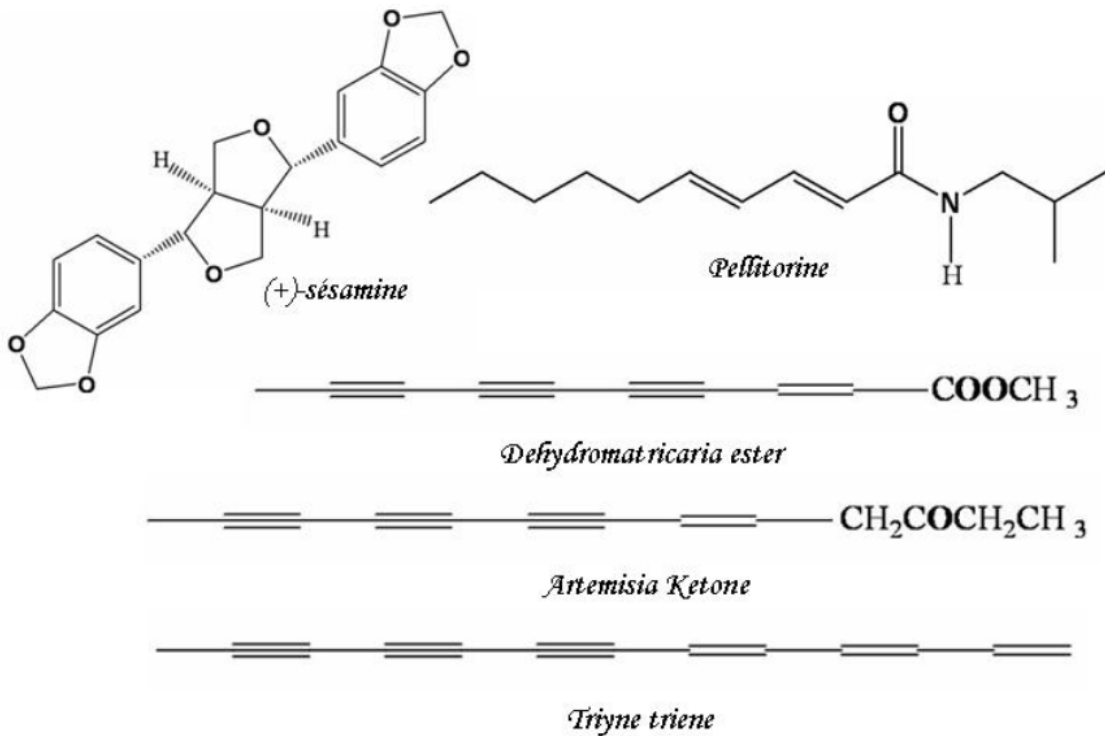


Figure I – 7 : Structures chimiques de principaux métabolites secondaires identifiés chez l'espèce *Anacyclus pyrethrum*.

II – 3 Aspects biologique et Pharmacologique :

II 3 – 1 Famille Asteraceae :

Les Asteraceae est une famille particulièrement riche en espèces médicinales. Elle comprend notamment des plantes utilisées dans le traitement des maladies parasitaires et anti-infectieuses (Bruneton, J., 2001).

Parmi, les molécules isolées et utilisées en thérapeutique, on peut citer le cas de l'Artemisinine, un sesquiterpène lactone isoler de l'Armoise annuelle (*Artemisia annua*), une espèce chinoise. Cette molécule est un antipaludique, indiquée dans le traitement de certaines formes de malaria.

Le tableau ci-après donne quelques exemples sur cette activité chez certaines espèces appartenant à la famille des Asteraceae.

Tableau I – 5 : L'activité antifongique chez certaines espèces d'Asteraceae.

<i>Plante source de La molécule</i>	<i>Partie utilisée</i>	<i>Molécules responsables à l'activité</i>	<i>Microorganismes</i>	<i>Références</i>
<i>Artemisia absinthium</i>	Feuilles et fleurs	<u>Huiles Essentielles :</u> Camphore et 1, 8-cineole	—	José, A.M et al., 2007
<i>Artemisia santonicum</i>				
<i>Artemisia spicigera</i>				
<i>Bidens pilosa</i>	Feuilles et fleurs	Huiles essentielles	<i>Corticium rolfsii</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Fusarium oxysporu</i>	Deba, F et al ., 2008
	Feuilles	Inconnu	<i>Candida albicans</i>	Motsei, M.L et al., 2003
<i>Blumea balsamifera</i>	Feuilles	<u>Flavonoides :</u> hyperoside	<i>Aspergillus niger</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Candida albicans</i>	José, A.M et al., 2007
<i>Blumea gariepina</i>		Inconnu	<i>Cladosporium cucumerinum</i>	
<i>Chrysanthemum coronarium</i>	Feuilles	<u>Huiles Essentielles :</u> Camphore, α et β -Pinène et lyratyle acétate	—	
<i>Cichorium intybus</i>	Racines	Inconnu	<u>Les dermatophytes :</u> Zoophiles et anthropophiles	

Suite du Tableau I – 5 :

<i>Echinacea purpurea</i>	Racines	Polyacétylènes, Alcaloïdes	<i>Candida shehata</i>	Hymete, A et al., 2005	
<i>Echinops ellenbeckii</i>	Fleurs et Racines	Alcaloïdes, Saponosides, Phytostérols, Poly phénols et Caroténoïdes.	<i>Candida albicans</i>		
<i>Echinops longisetus</i>					
<i>Flaujasiopsis flexuosa</i>	Parties aériennes	Inconnu	<i>Aspergillus niger</i>	Motsei, M.L et al., 2003	
<i>Flauresia Cernua</i>	Feuilles	Flavonoides et Sesquiterpènes	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	Jasso, R.D et al., 2007	
<i>Flauresia Microphylla</i>					
<i>Flauresia Oxysporum</i>					
<i>Flauresia Retinophylla</i>					
<i>Helichrysum nitens</i>	Parties aériennes	<u>Flavones :</u> 5,7-diméthoxyflavone	<i>Cladosporium cucumerinum</i>	Hostettmann, K et al., 2000	
<i>Inulanthera nuda</i>		<u>Acétylène :</u> (E)-O-cetyldendranthe- menole	<i>Cladosporium cucumerinum</i>		
<i>Leontodon filii</i>		<u>Triterpènes :</u> triterpeneterole	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Glomerelia cinguiata</i>	José, A.M et al., 2007	
<i>Mutisia friesiana</i>		<u>Coumarines :</u> Scopoletine	<i>Cladosporium cucumerinum</i>		
<i>Psiadia lithospermifolia</i>		Huiles essentiels	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Fusarium moniliform</i>		
<i>Psiadia trinervia</i>		<u>Flavones :</u> 3-O- méthoxylated flavonols	<i>Cladosporium cucumerinum</i>		Hostettmann, K et al., 2000
<i>Pterocaulon Alopecuroides</i>			<u>Coumarines :</u> Prenyletine, Prenyletine-méthyl-ether	<i>Candida albicans</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoophyton rubrum</i> <i>Trichoophyton mentagrophytes</i>	Stein, A.C et al., 2006
<i>Pterocaulon Blansae</i>					
<i>Pterocaulon Polystachyum</i>					
<i>Senecio inaequidens</i>			Inconnu	<i>Trichophyton tonsurans</i>	José, A.M et al., 2007
<i>Senecio Vulgaris</i>					

Suite du Tableau I – 5 :

<i>Spilanthes acmella</i>	Fleurs	<u>Alkamides :</u> Spilanthole	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus paractitu</i>	Sabitha, A.R <i>et al.</i> , 2006
<i>Tagetes minuta</i>	Feuilles	Inconnu	<i>Candida albicans</i>	Motsei, M.L <i>et al.</i> , 2003
<i>Tarhchonanthus camphoratus</i>		Huiles essentielles	<i>Candida albicans</i>	Matasyoh, J. C <i>et al.</i> , 2007
<i>Tithonia diversifolia</i>	Parties aériennes	<u>Isocoumarines :</u> Tithoniamarine	<i>Microbotryum violaceum</i> <i>Chloralla fusca</i>	José, A.M <i>et al.</i> , 2007

II 3 – 2 Espèce *Anacyclus pyrethrum* :

L'utilisation d'*Anacyclus pyrethrum* est décrite dans les pharmacopées de nombreux pays du monde. Les racines sont inscrites à la pharmacopée française depuis 1937, pour leurs propriétés sialagogues (Paris, R.R *et al.*, 1971).

En Algérie, l'infusion des racines du pyrèthre d'Afrique est recommandée en bain de bouche contre les maux de dents et les problèmes liés à la sécrétion salivaire comme sialogogue (Boulos, L., 1983; Beloued, A., 1998). Le décocté des racines est également cité en friction locale en cas de paralysie des membres (Boulos, L., 1983). Les racines sont également utilisées sous forme de crème a base de graisses animales pour traiter la goutte et la sciatique (Boulos, L., 1983). Un mélange de racines et de lait, additionné de miel est proposé comme aphrodisiaque, contre l'infertilité féminine (Boulos, L., 1983). On reconnaît aux racines de pyrèthre des propriétés antiparasitaires et antibiotiques (Beauquesne, B.L *et al.*, 1990; Baba Aissa, F., 1999)

Peu d'études d'évaluation expérimental ont été effectuées sur les racines d'*Anacyclus pyrethrum*. On signale une activité immunostimulante de la fraction riche en polysaccharides (Bendjeddou, D *et al.*, 2003) et une action anesthésique local des extraits aqueux et hydro alcooliques (Panchal, G.M *et al.*, 2001). La Pellitorine, composé connu des racines s'est montré douer d'activités anesthésique local, antibactérienne, larvicide, ainsi que insecticide (Chaaib, K.F., 2004; Molina, T.J., 1999).

*III – Étude des
métabolites secondaires
isolées de la plante :*

a – Les Terpénoïdes.

III – 1 Introduction :

Dans le règne végétal, les terpénoïdes sont des métabolites secondaires, dont le rôle écologique a été prouvé, notamment dans le processus de communications et de défense (Lamarti, A *et al.*, 1994).

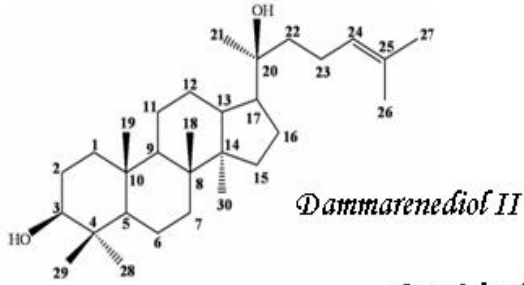
Les triterpènes, dont plus de 4000 structures sont connues, sont représentés par plus de 40 squelettes différents (Bruneton, J., 1999). L'intérêt thérapeutique et l'emploi industriel des triterpènes en font un groupe de métabolites secondaires de première importance (Rodney, C *et al.*, 2000; Yutaka, E *et al.*, 2003).

III – 2 Classification structurale et biosynthèse des Triterpènes:

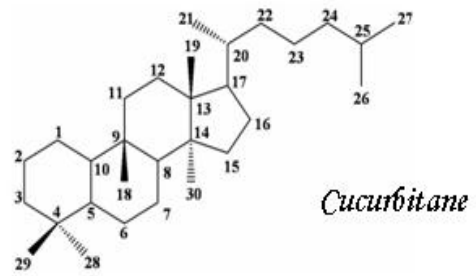
Les triterpènes sont construits à partir de plusieurs entités isopréniques, constituant une famille très diversifiée tant au niveau structural que pharmacologique (Goodwin, T.W., 1971). Selon la nature du noyau, ces métabolites sont regroupés en triterpènes tétracycliques (Dammaranes, Cucurbitanes, Lanostanes) et pentacycliques (Lupanes, Ursanes, Oléananes et Friedelanes) (figure I – 7).

Triterpènes tétracycliques :

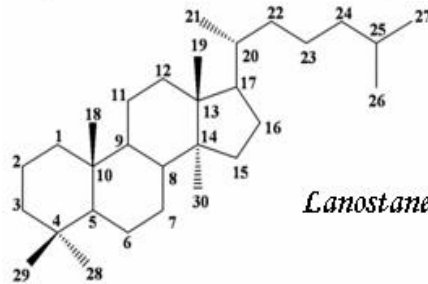
La série des Dammaranes :



La série des Cucurbitanes :

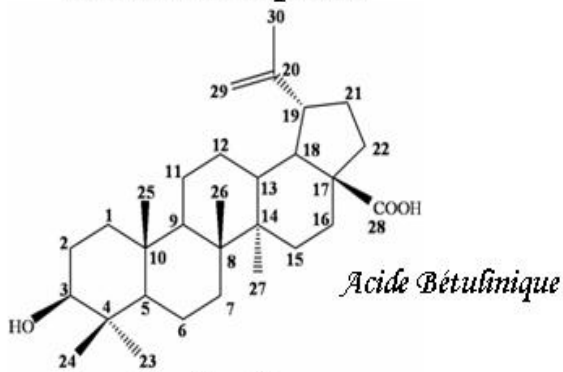


La série des Lanostanes :

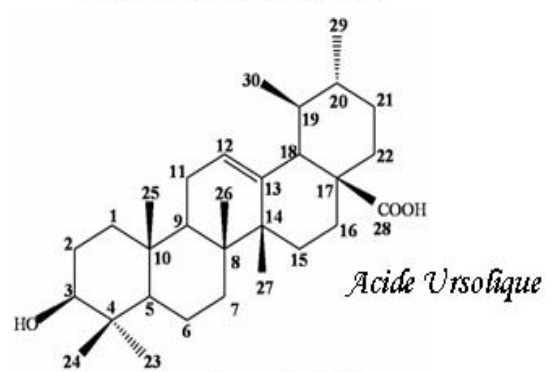


Triterpènes pentacycliques :

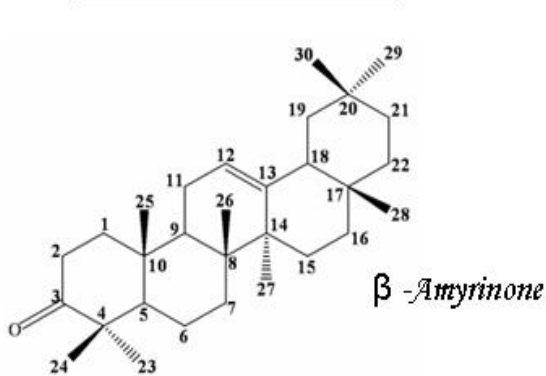
La série des Lupanes :



La série des Ursanes :



La série des Oléananes :



La série des Friedelanes :

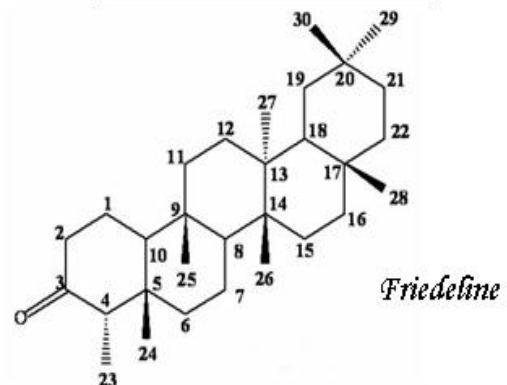


Figure I – 8 : Principaux classes des triterpènes.

La diversité au niveau structurale des triterpènes résulte des nombreuses conformations que peut adopter le substrat acyclique. Pour une réaction de cyclisation donnée, c'est l'enzyme qui impose cette conformation via ses interactions enzymes / substrat au sein du site actif (Alkins, P.W. *et al.*, 1987; Abe, I.M.R. *et al.*, 1993; Brown, G.D., 1998).

Par exemple, les enzymes prényl-transférases et terpène synthase sont responsables de la diversification des triterpènes par deux réactions opérées sur des différents substrats :

L'une de l'addition répétitive d'unité C₅, l'autre de la cyclisation.

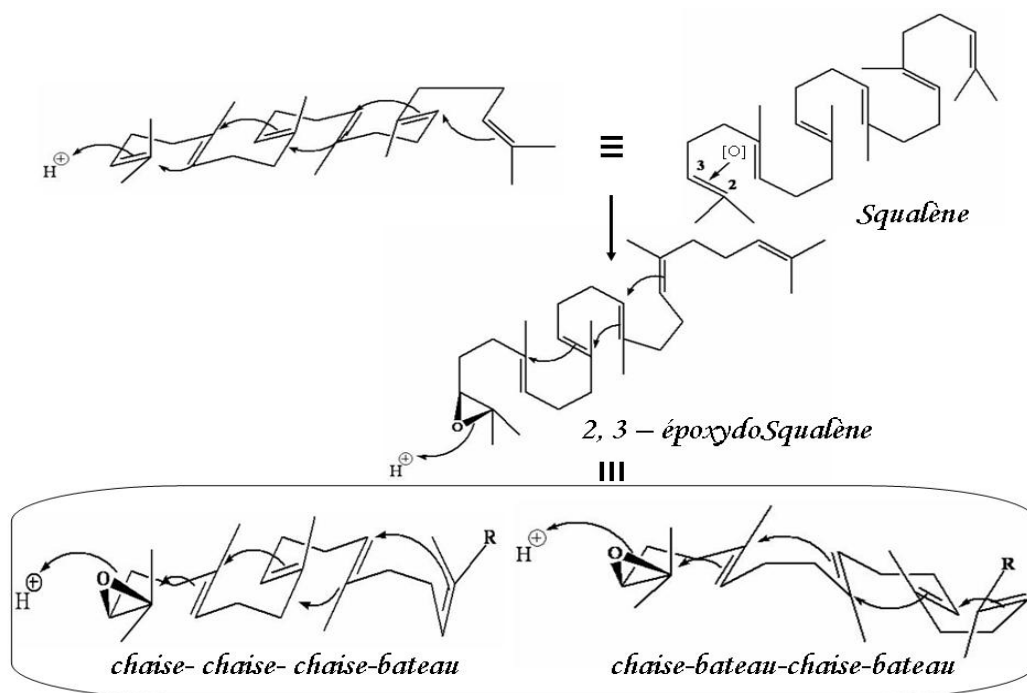


Figure I – 9 : Oxydation du squalène.

(Goodwin, T.W., 1971; Alkins, P.W. *et al.*, 1987)

C'est de la conformation initiale de l'époxysqualène sur la surface de l'enzyme que dépend l'orientation de la biosynthèse vers stéroïdes et les triterpènes d'autre part.

1 – si l'époxysqualène est maintenu dans une conformation chaise-bateau-chaise-bateau, la cyclisation conduit à un cation protostane précurseur immédiat, par une suite de migration 1, 2 de protons et de méthyles, des cycloartanes et des cucurbitanes (ces migrations sont rendues possibles par la disposition trans-antiparallèle des protons et méthyles en C-17, C-13, C-14 et C-8).

2 – si l'époxysqualène est maintenu dans une conformation chaise-chaise-chaise-bateau, la cyclisation conduit à un cation dammarane, qui peut aussi se réarranger :

– soit par des migrations concertées conduisant au tirucallol et à l'euphol, précurseurs des limonoïdes et quassinoïdes.

— soit, et c'est le cas le plus fréquent, par formation d'un cycle supplémentaire ce qui conduit aux triterpènes pentacycliques : Oléananes, Ursanes, Lupanes, Friedelanes et taraxastanes, etc., (Bruneton, J., 1999).

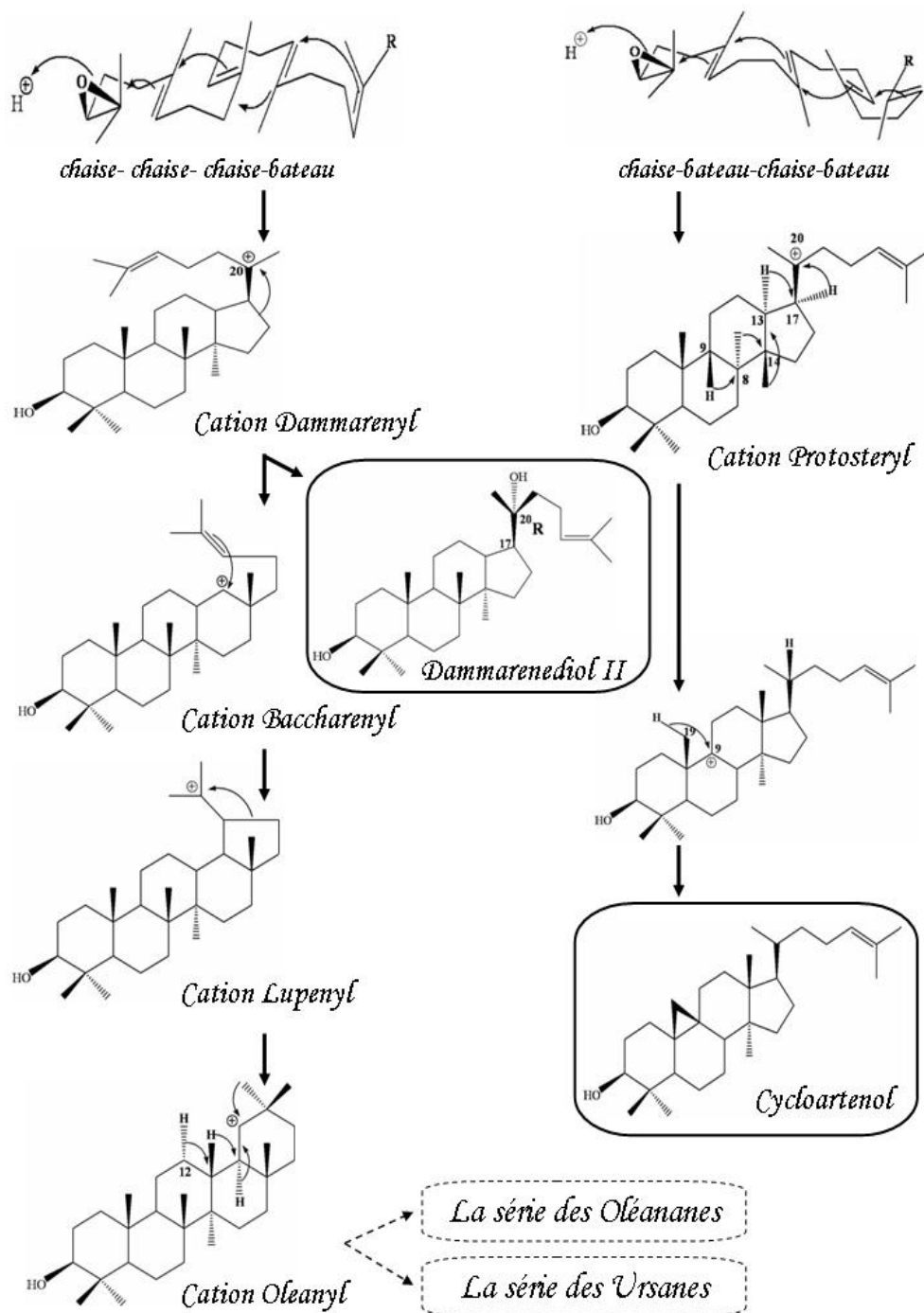


Figure I – 10 : Principaux cations dans la biosynthèse.

(Goodwin, T.W., 1971; Alkins, P.W *et al.*, 1987; Abe, I.M.R *et al.*, 1993; Brown, G.D., 1998; Yutaka, E *et al.*, 2003).

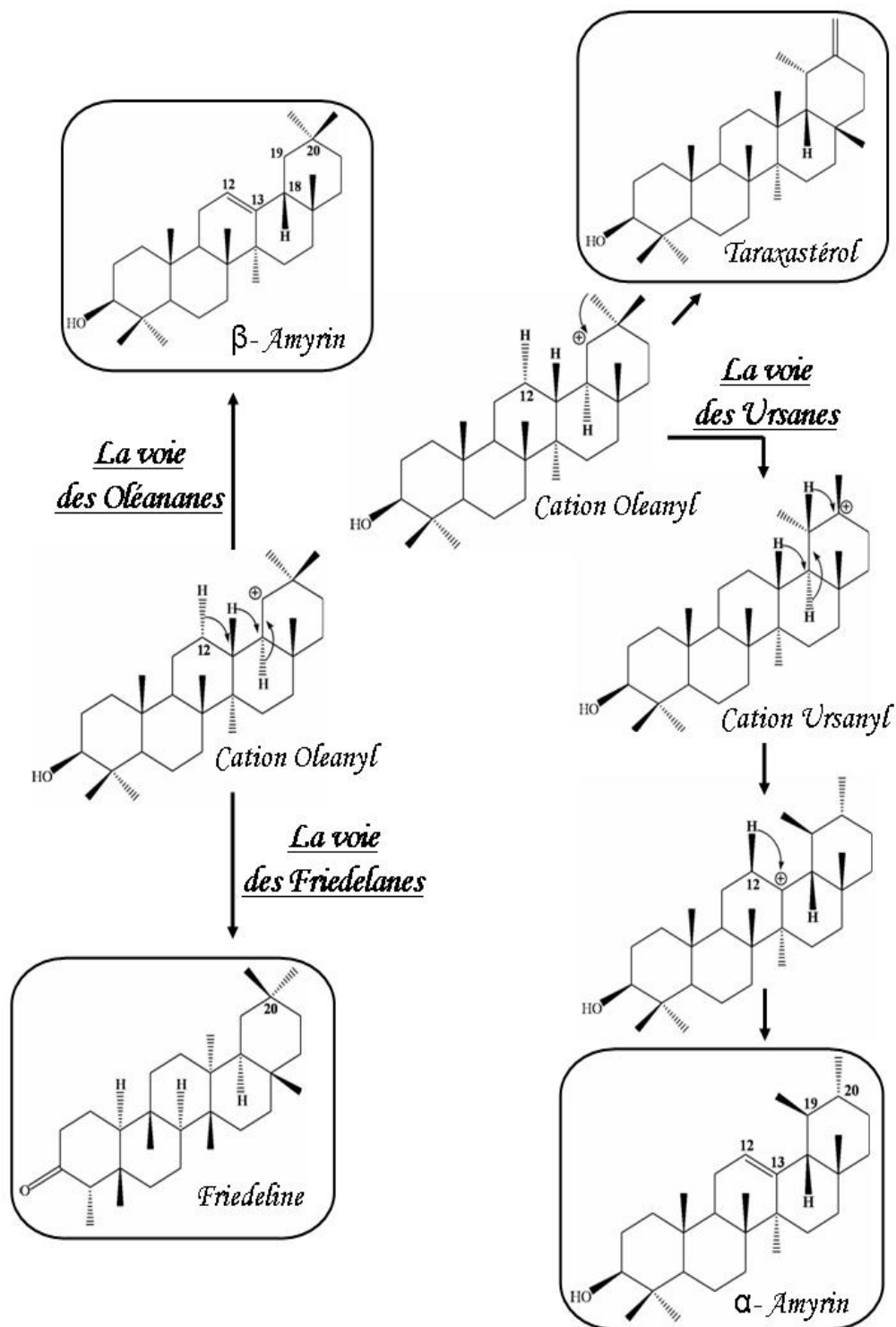


Figure I – 11 : La voie des Oléananes, Friedelines et Ursanes.

(Goodwin, T.W., 1971; Alkins, P.W *et al.*, 1987; Abe, I.M.R *et al.*, 1993; Brown, G.D., 1998; Yutaka, E *et al.*, 2003).

III – 3 Méthodes d'analyses des triterpènes :

Les triterpènes ont fait l'objet de plusieurs études consacrées à l'analyse structurale des triterpènes (Kuo, Y.H *et al.*, 2000; Thanakijcharoenpath, W *et al.*, 2007; Andras, K *et al.*, 2008; Chiy, R.C *et al.*, 2008).

a – Analyse par Infra - Rouge (IR):

Le spectre Infrarouge permet de repérer les fonctions chimiques présentes comme les groupement cétones, alcool, acide carboxylique acétate, etc.... qui caractérisent la plupart des triterpènes (Dosseh, Ch *et al.*, 1980; Druet, D *et al.*, 1986; Ahmed, S.M *et al.*, 2004).

b – Analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN):

Le spectre RMN-¹H des triterpènes est peu spécifique. Il présente néanmoins une série de pics caractéristiques dans l'intervalle 0,5 ppm à 2 ppm, correspondant aux groupements méthyles. Le profil (nombre, multiplicité, déplacement) permettent une orientation concernant le type et la série du noyau triterpénique (Hans, F.J *et al.*, 1973; Charrouf, Z *et al.*, 1991; Marcia, L.N *et al.*, 1999; Asaph, A *et al.*, 2005; Hu, H.J *et al.*, 2005; Hua, S *et al.*, 2006; Yu, Q.L *et al.*, 2006; Mario, J.J *et al.*, 1999; Andras, K *et al.*, 2008; Chiy, R.C *et al.*, 2008; Igoli, J.O *et al.*, 2008; Yuan, J.Q *et al.*, 2008). L'examen de la région 2 à 6 ppm indique l'environnement auquel est soumis les protons fonctionnels (hydroxyle, double liaison,...).

Le spectre RMN-¹³C est plus précieux dans la détermination structurale des noyaux triterpéniques nous permet de bien mettre en évidence les 30 atomes de carbone qui constituent le squelette des triterpènes, et en particulier les groupements carbonyles, acide carboxylique et alcool, par leurs déplacements chimiques spécifiques (environ 210 ppm pour un carbonyle, 170 ppm pour un acide carboxylique et 70 ppm pour un alcool (Marcia, L.N *et al.*, 1999; Mario, J.J *et al.*, 1999).

c – Analyse par spectroscopie de masse (SM):

En spectroscopie de masse, les fragments des triterpènes sont caractéristiques, comme les pics de fragmentation caractéristiques du mécanisme de “Rétro-Diels-Alder” par clivage du cycle D / E et C / D des triterpènes pentacycliques (Hans, F.J *et al.*, 1973; Dosseh, Ch *et al.*, 1980; Branco, A *et al.*, 2004; Viswanadh, G.S *et al.*, 2006).

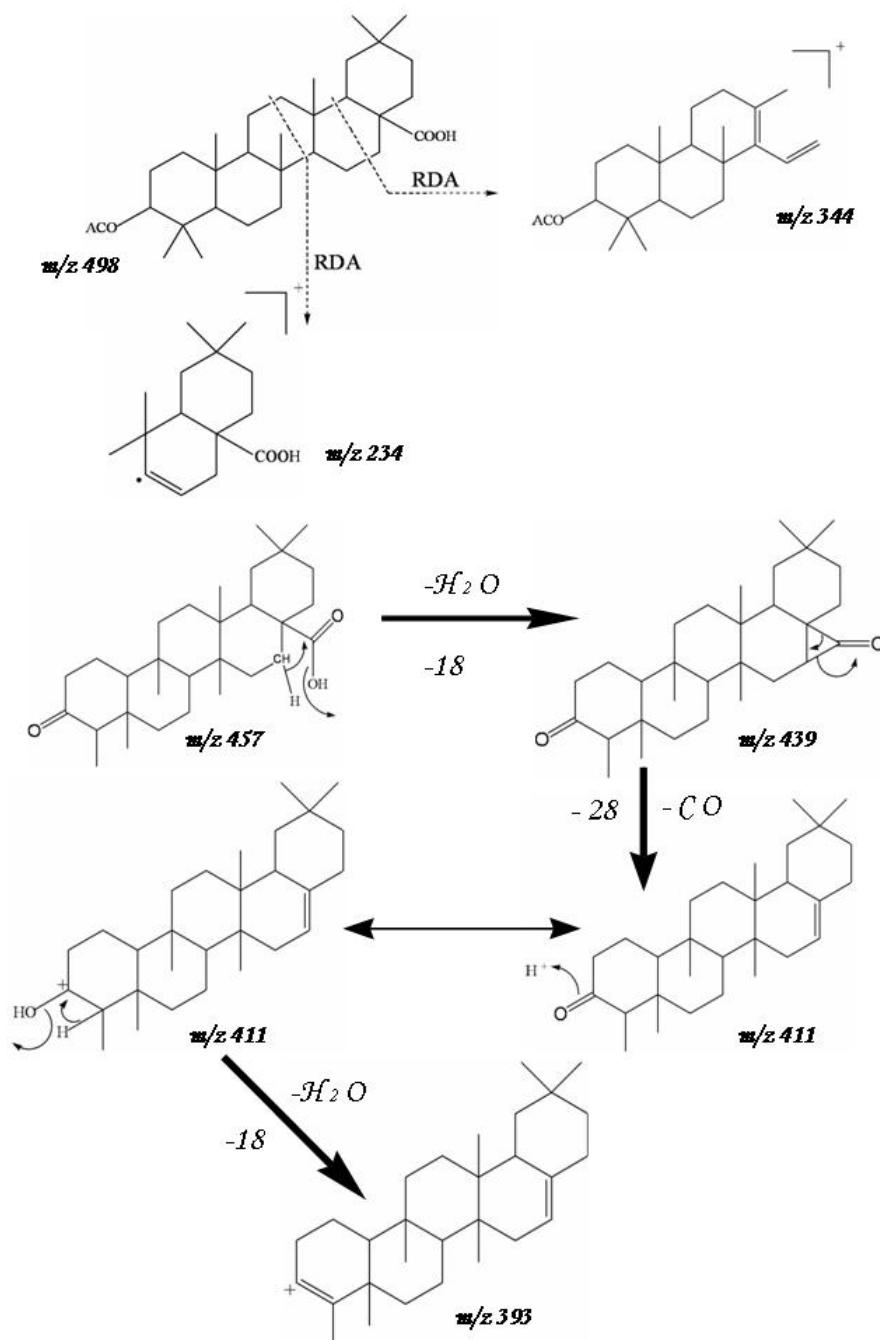


Schéma I – 1 : Exemples des fragmentations en spectrométrie de masse des triterpènes.

III – 4 Propriétés biologiques et pharmacologiques des triterpènes :

Les triterpènes sont caractérisés par une diversité structurale remarquable. Cette diversité chimique se traduit par des propriétés biologiques et pharmacologiques variées et des potentialités thérapeutiques dans les domaines les plus divers :

cytostatiques, antiviraux, anti-inflammatoire, anti-oedémateuses, cytoprotectives, imminomodulatrices, analgésiques et antifongiques (Bruneton, J., 1999; Kazumasa, S *et al.*, 2001; Jiri, P., 2003; Hua, S *et al.*, 2006; Eder, B *et al.*., 2008).

L'activité à l'encontre des champignons est bien établie *in vitro*, aussi bien à l'égard d'espèces phytopathogènes, qu'à l'encontre de divers *Candida* ou dermatophytes. Elle est sans doute la conséquence de la réaction des triterpènes avec les stérols membranaires du micro-organisme (Bruneton, J., 1999).

En dehors des potentialités pharmacologiques des triterpènes, leur toxicité chez les animaux à sang froid est connue depuis l'antiquité. Elle explique à titre simple, les propriétés piscicides (ex. *Balanites*, *Zygophyllaceae*) et molluscicides (*Phytolacca*, *Phytolaccaceae*) des plantes qui les contiennent.

6 – Les Coumarines.

III – 1 Définition :

Historiquement le nom de coumarine vient de « cumaru » qui est le nom dans une langue amazonienne, de l'arbre de Tonka (*Dipteryx odorata* Willd., Fabaceae) dont les fèves contiennent 1 à 3 % de coumarine. Les coumarines ont été isolées pour la première fois en 1820 (Bruneton, J., 1999). Elles sont présentes en quantités plus faibles dans plusieurs plantes comme le mélilot, la sauge sclarée et lavande. On la trouve aussi dans le miel, le thé vert, etc. Les coumarines sont des composés phénoliques végétaux, portant un noyau benzopyrone dans leur structure (Alignan, M., 2006), ils sont des 2H-1-benzopyran-2-ones que l'on peut considérer, en première approximation, comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-Z-cinnamiques (Bruneton, J., 1999).

III – 2 Les coumarines dans le règne végétal :

Les coumarines et ses dérivés dont plus de 300 structures sont connues, se répartissent dans plus de 70 familles de dicotylédones et 9 familles de Monocotylédones. Ils sont sous forme libre ou hétérosides dans la plus part des familles de dicotylédones incluant Apiaceae, Asteraceae, Fabiaceae, Moraceae, Rosaceae, Rubiaceae, Rutaceae et Solanaceae. le tableau suivant rassemble les principaux coumarines et leur distribution dans le règne végétal.

Tableau I – 6 : Distribution des coumarines chez certaines plantes.

Coumarines	Plantes	Localisation	Références
Aesculetine	<i>Anethum graveolens</i>	fruits	Kostova, I., 2005
Angelicine	<i>Angelica archangelica</i>	fruits, feuilles et racines	Steck, W <i>et al.</i> , 1969
2'-Angeloyl-3'-isovaleryl vaginate	<i>Angelica archangelica</i>	racines	Mulier, M <i>et al.</i> , 2004
Apterine	<i>Aegopodium podagraria</i>	racines	Sarker, S.D <i>et al.</i> , 2005
	<i>Angelica archangelica</i>	racines	Mulier, M <i>et al.</i> , 2004
	<i>Levisticum officinale</i>	racines	
	<i>Peucedanum palustre</i>	racines	Shults, E.E <i>et al.</i> , 2003
Archangelicine	<i>Angelica archangelica</i>	racines	Steck, W <i>et al.</i> , 1969
Archangeline	<i>Angelica archangelica</i>	racines	
Bergaptene	<i>Anethum graveolens</i>	fruits	Kostova, I., 2005
	<i>Angelica archangelica</i>	fruits, feuilles et racines	Steck, W <i>et al.</i> , 1969
	<i>Levisticum officinale</i>	racines	
	<i>Peucedanum palustre</i>	racines	Shults, E.E <i>et al.</i> , 2003
	<i>Ruta graveolens</i>	tiges et feuilles	Lièvre, K. 2004
(-)-Byakangelicine	<i>Ruta graveolens</i>	racines	
Byakangelicin-2'-O-isovalerate	<i>Angelica archangelica</i>	racines	Kostova, I., 2005
Chalepensine			
Columbianadine	<i>Ruta graveolens</i>	racines	Lièvre, K. 2004
Columbianadinoxide	<i>Peucedanum palustre</i>	fruits et racines	Shults, E.E <i>et al.</i> , 2003
Daphnoretine	<i>Peucedanum palustre</i>	fruits	
Daphnoretine methyl ether	<i>Ruta graveolens</i>	parties aériennes	Kostova, I., 2005
Dophnorine	<i>Ruta graveolens</i>	racines	
Gravelliférone	<i>Ruta graveolens</i>	racines	
Gravelliférone methyl ether	<i>Ruta graveolens</i>	racines	
Graveolone	<i>Ruta graveolens</i>	racines	
Heraclenole			
Heraclenol-2'-O-isovalerate	<i>Anethum graveolens</i>	parties aériennes	Kostova, I., 2005
Heraclenol-2'-O-seneciote	<i>Petroselinum crispum</i>	tiges	
Herniarine	<i>Angelica archangelica</i>	racines	
8-Hydroxybergaptene			
Imperatorine	<i>Angelica archangelica</i>	racines	
	<i>Ruta graveolens</i>	racines	
Isobergaptene	<i>Angelica archangelica</i>	fruits	
Isoyakangelicine angelate	<i>Angelica archangelica</i>	fruits, feuilles et racines	
Isoimperatorine	<i>Peucedanum palustre</i>	fruits et racines	Shults, E.E <i>et al.</i> , 2003
	<i>Angelica archangelica</i>	racines	
	<i>Peucedanum palustre</i>	racines	
Isooxypeucedanine	<i>Angelica archangelica</i>	fruits, feuilles et racines	Steck, W <i>et al.</i> , 1969
Isopeulustrine	<i>Peucedanum palustre</i>	fruits et racines	
Isopimpinelline	<i>Ruta graveolens</i>	tiges et racines	
Isorutarine	<i>Peucedanum palustre</i>	fruits	
Marmesine	<i>Peucedanum palustre</i>	fruits	
Marmesinine	<i>Angelica archangelica</i>	fruits, feuille et racines	Steck, W <i>et al.</i> , 1969
	<i>Ruta graveolens</i>	racines	Lièvre, K. 2004
	<i>Ruta graveolens</i>	racines	
	<i>Ruta graveolens</i>	racines	
5-Methoxy-heraclenol isovalerate	<i>Angelica archangelica</i>	racines	Steck, W <i>et al.</i> , 1969
Oroselone	<i>Angelica archangelica</i>	fruits et racines	
Osthenole	<i>Angelica archangelica</i>	fruits et racines	
Osthole	<i>Angelica archangelica</i>	fruits et racines	
(+)-Oxypeucedanine	<i>Angelica archangelica</i>	fruits, feuilles et racines	
Pangeline	<i>Ruta graveolens</i>	racines	Lièvre, K. 2004

Suite du Tableau I – 6 :

Peucedanine	<i>Peucedanum palustre</i>	fruits et racines	Hehn, A., 2007
Phellopterine	<i>Peucedanum palustre</i>	fruits et racines	Steck, W <i>et al.</i> , 1969
Pimpinelline	<i>Angelica archangelica</i>	fruits	
Psoralene	<i>Angelica archangelica</i>	fruits	Lièvre, K. 2004
	<i>Angelica archangelica</i>	racines	
Rutacultine	<i>Ruta graveolens</i>	tiges et racines	Lièvre, K. 2004
Rutamarine	<i>Ruta graveolens</i>	racines	
Scopoletine	<i>Ruta graveolens</i>	parties aériennes + racines	Lièvre, K. 2004
Suberenone	<i>Anethum graveolens</i>	fruits, feuilles et racines	
Umbélliferone	<i>Anethum graveolens</i>	racines	Steck, W <i>et al.</i> , 1969
	<i>Angelica archangelica</i>	fruits et racines	
	<i>Livisticum officinale</i>	feuilles et racines	Lièvre, K. 2004
	<i>Ruta graveolens</i>	racines	
Umbelliprenine	<i>Anethum graveolens</i>	fruits	Kostova, I., 2005
	<i>Angelica archangelica</i>	fruits et racines	Steck, W <i>et al.</i> , 1969
	<i>Peucedanum palustre</i>	fruits	Kostova, I., 2005
Xanthotoxine	<i>Anethum graveolens</i>	fruits	
	<i>Angelica archangelica</i>	fruits, feuilles et racines	Steck, W <i>et al.</i> , 1969
	<i>Ruta graveolens</i>	tiges et feuilles	Lièvre, K. 2004
Xanthotoxole	<i>Angelica archangelica</i>	fruits et racines	Steck, W <i>et al.</i> , 1969
Xanthyletine	<i>Ruta graveolens</i>	racines	Lièvre, K. 2004

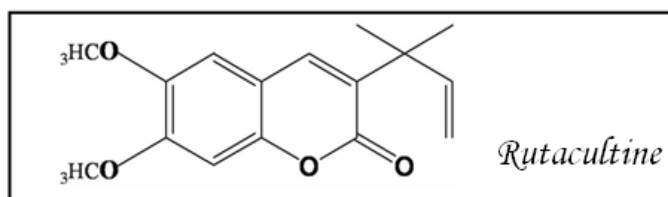
III – 3 Diversité structurale des coumarines :

La coumarine est une famille de composés, qui se forment par une substitution sur un cycle aromatique, de ce faire et d'après la nature des substitutions, on peut classer les coumarines en :

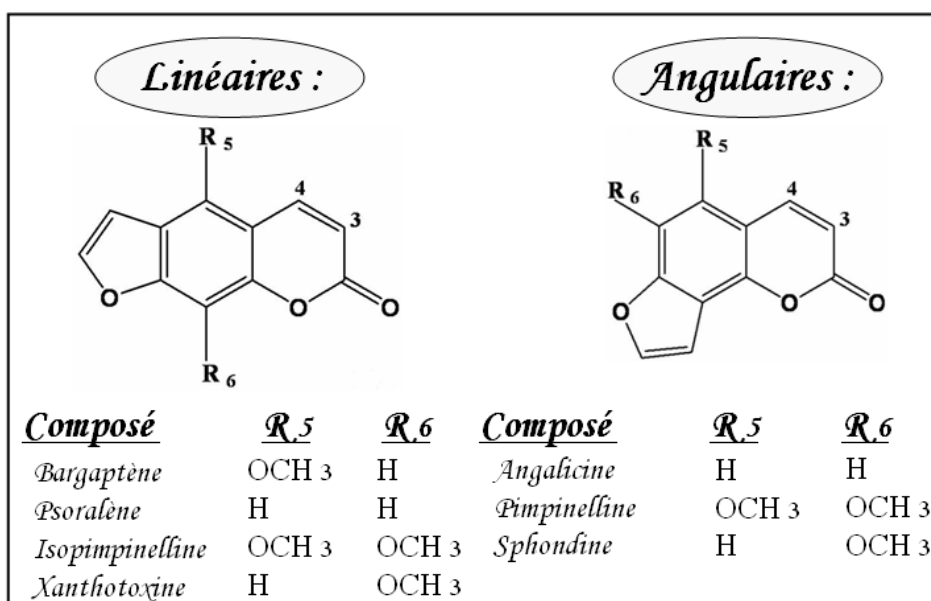
III 3 – 1 Coumarines Simples :

	<u>Composé</u>	<u>R₆</u>	<u>R₇</u>	<u>R₈</u>
	<i>Daphnétine</i>	H	OH	OH
	<i>Erioside</i>	OH	OH	O-Glc
	<i>Esculétine</i>	OH	H	OH
	<i>Esculine</i>	O-Glc	H	OH
	<i>Fraxétine</i>	OCH 3	OH	OH
	<i>Scopolétine</i>	OCH 3	H	OH
	<i>Umbélliferone</i>	H	H	OH

III 3 – 2 Coumarines Prénylées :

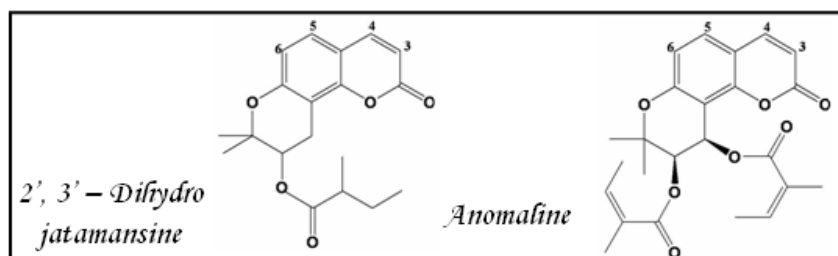


III 3 – 3 Furanocoumarines (Linéaires et Angulaires):



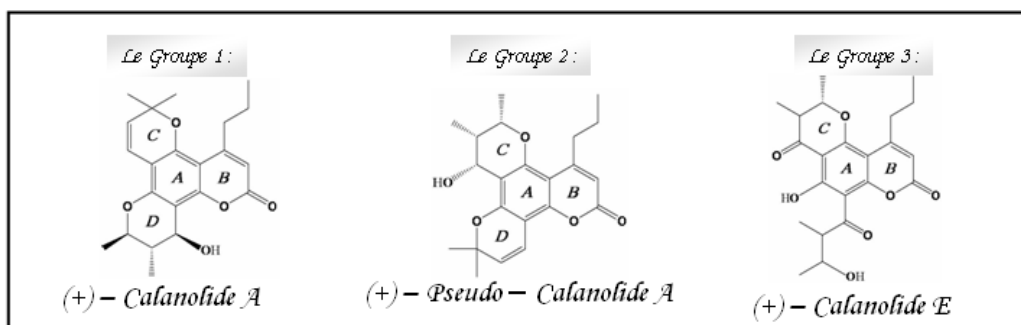
III 3 – 4 Pyranocoumarines :

III 3 – 4 – 1 Pyranocoumarines simple :

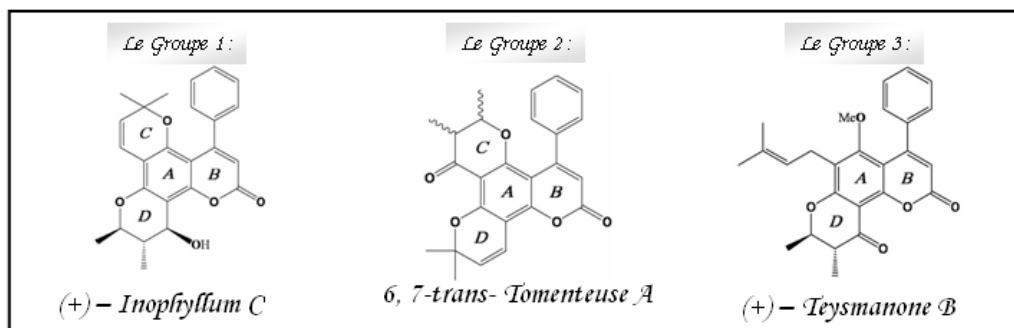


III 3 – 4 – 2 Dipyranocoumarines :

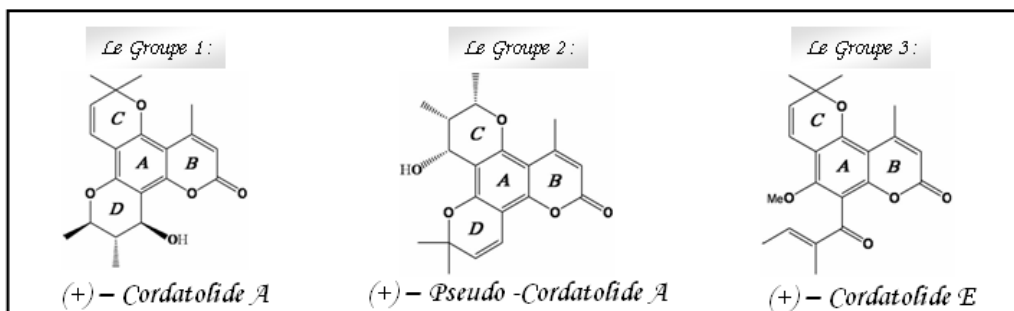
● La série des Calanofides :



● La série des Inophyllums :

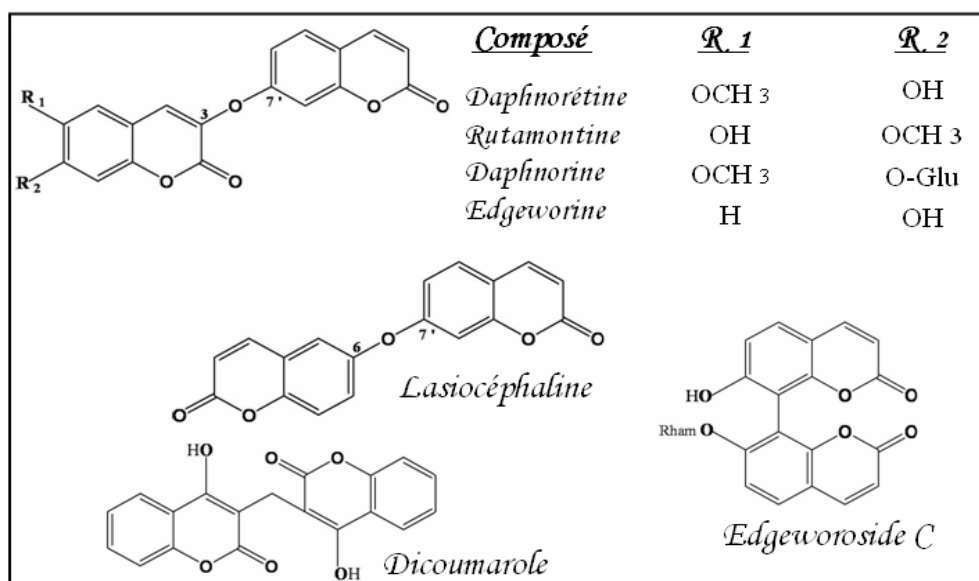


● La série des Cordatofides :

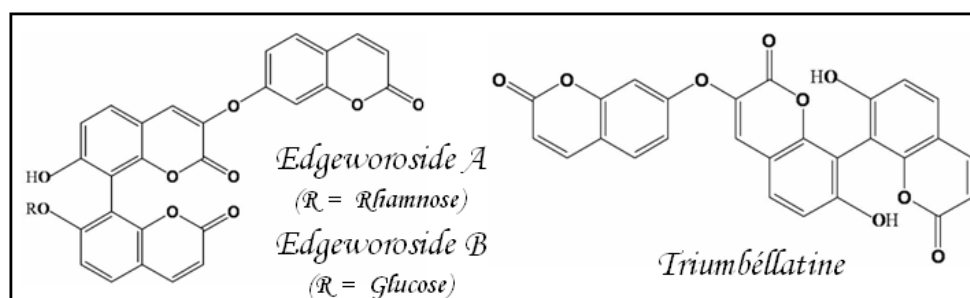


Les coumarines peuvent également exister à deux états :

III 3 – 5 Coumarines à l'état dimérique (Bicoumarines):



III 3 – 6 Coumarines à l'état trimérique (Tricoumarines):



III – 4 Etude de la voie de Biosynthèse des coumarines :

a – Biosynthèse des coumarines simples :

La formation de la phénylalanine à partir de l'acide chorismique implique un réarrangement de claisen catalysé par l'enzyme *chorismate mutase*.

La conversion de la phénylalanine en acide cinnamique par la *phénylalanine ammonialyase* (PAL) marque l'entrée dans la voie des phénylpropanoïdes (Lièvre, K., 2004).

La voie exacte des coumarines à partir d'acides cinnamiques spécifiques est quasi inconnue, bien que la *cinnamate-2-hydroxylase* ait été proposée comme une étape enzymatique clé.

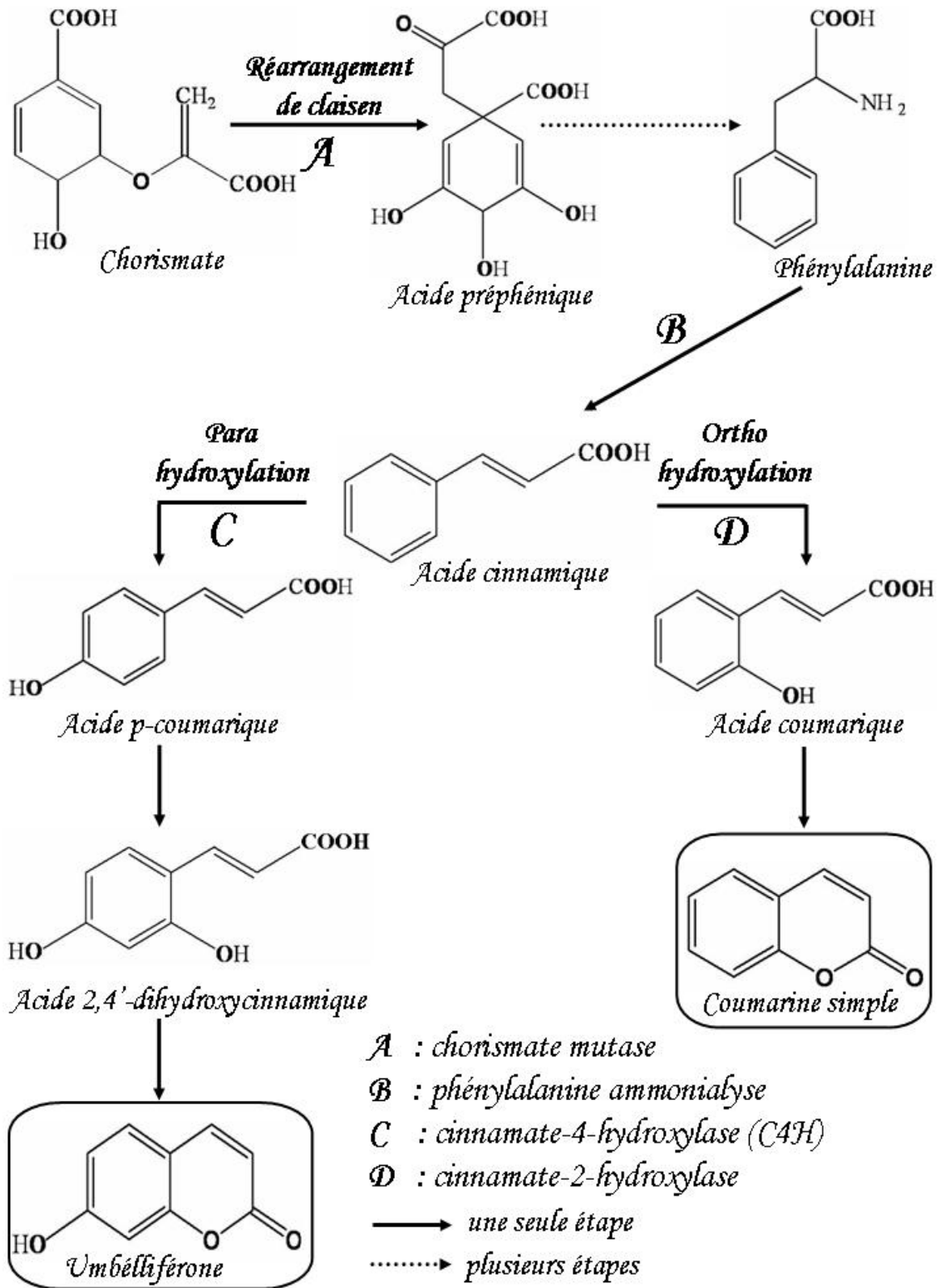


Figure I – 12 : Schéma récapitulatif des voies de biosynthèse des coumarines simples et l'Umbelliférone.

6 – Biosynthèse des coumarines furanocoumarines :

La voie des furanocoumarines est présente chez un petit nombre d'espèces végétales (Lièvre, K., 2004). La première étape propre de la voie de biosynthèse est proposée comme étant une para-hydroxylation de l'acide p-coumarique qui conduit à l'Umbélliférone (Bourgau, F *et al.*, 2006). Certains auteurs suggèrent que cette réaction est catalysée par une enzyme de la famille des cytochromes P450 (C4H) (une enzyme « clé » dans la voie des phénylpropanoïdes) (Hehn, A., 2007).

La production de dérivés de la 7-O-prenylUmbelliferone ne se fait que dans certaines conditions d'élicitations comme a été décrit par Hamerski et ses collaborateurs en 1990.

Il a été démontré que la prénylation de l'Umbelliferone pour former la demethylsubérosine était due à une activité enzymatique (Hehn, A., 2007).

L'étape suivante est la synthèse de la démethylsubérosine par ajout d'une unité isoprénique (IPP) catalysée par la diméthylallylpyrophosphatase (Prenyltransferase).

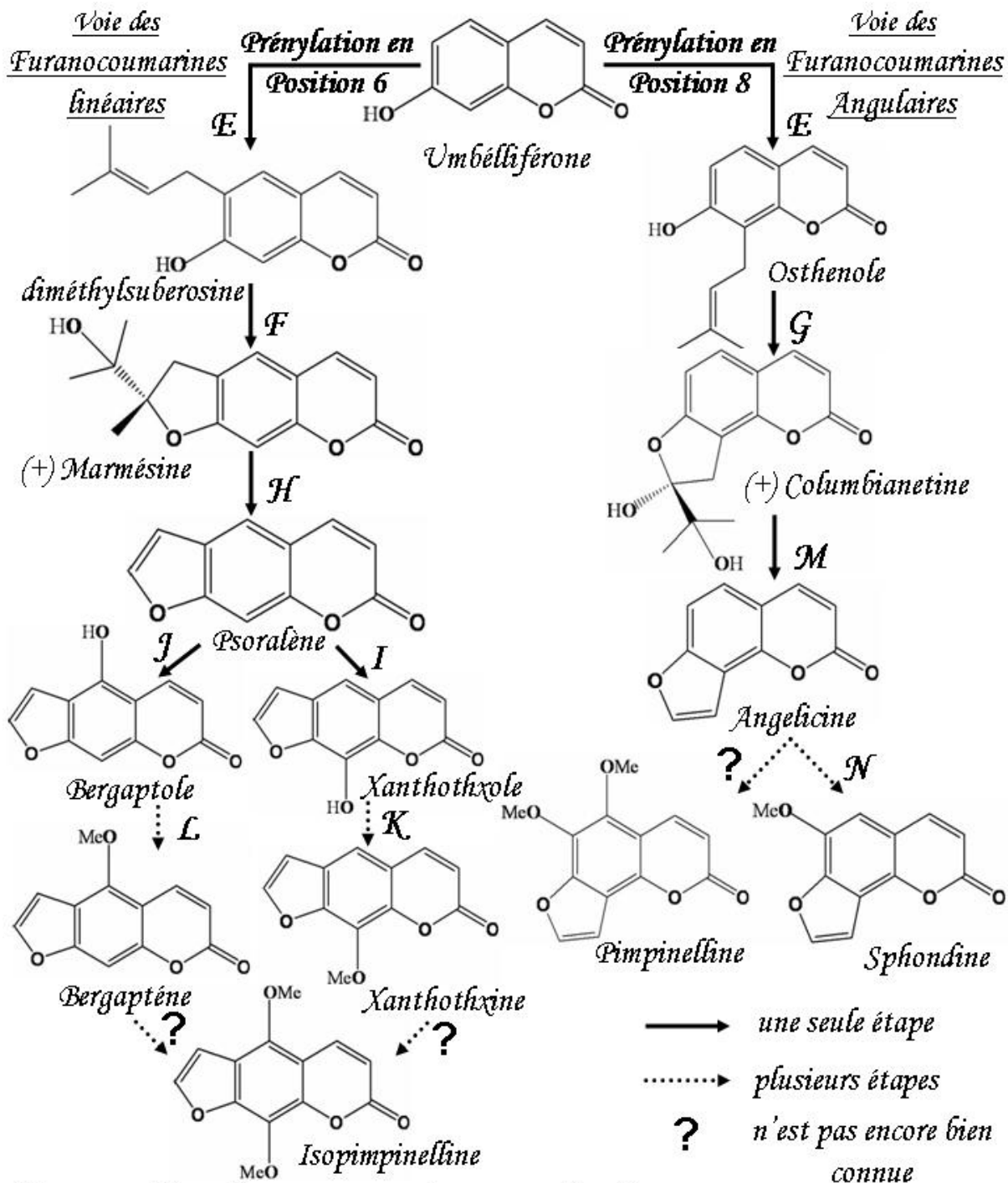
L'étape suivante conduisant à la cyclisation de la diméthylsuderose en (+) marmésine, puis sa conversion en psoralène est prise en charge par des cytochromes P450 (Lièvre, K., 2004).

L'utilisation de marmésine radio marquée a permis de suivre l'apparition de psoralène en présence de NADPH (l'enzyme responsable de la réaction est stéréo sélective) (Bourgau, F *et al.*, 2006; Hehn, A., 2007).

L'hydroxylation en position 5 et 8 du psoralène génère la formation de xathotoxole et de Bergaptole, cette double hydroxylation séquentielle est nécessaire pour permettre la formation du 5-8 dihydroxypsoralène, précurseur non méthoxylé d'un produit mineur de la voie de biosynthèse : l'isopimpinelline.

La méthylation du Bergaptole et de xathotoxole est catalysée par des méthyltransférases, pour finalement donner la Xanthotoxine et le Bergaptène.

La figure suivante rassemble les voies de biosynthèse possible conduisant aux furano- coumarines linéaires et Angulaire.



- | | |
|---|--|
| E : <i>prenyl transferase</i> | J : <i>psoralène 5-monooxygenase</i> |
| F : <i>marmésine synthase</i> | K : <i>xanthotoxole O-methyltransferase</i> |
| G : <i>columbianétine synthase</i> | L : <i>bergaptole O-methyltransferase</i> |
| H : <i>psoralène synthase</i> | M : <i>angelicine synthase</i> |
| I : <i>psoralène 8-monooxygenase</i> | N : <i>angelicine monooxygenase</i> |

Figure I – 13 : Schéma récapitulatif des voies de biosynthèse des furanocoumarines.

III – 5 Analyse structurale des coumarines :

a – Fluorescence sous la lumière UV :

Les coumarines sont caractérisées par une fluorescence à l'UV à 366 nm (Mead, J.A.R *et al.*, 1958; Macek, K., 1972; Harbone, J.B., 1984; Wagner, H *et al.*, 1984; Bruneton, J., 1999). Cette fluorescence est en général :

- Bleue pour les coumarines hydroxylées en 7 (Umbélliférone).
- Pourpre pour les coumarines prénylées.
- Jaune pour les furanocoumarines (Wagner, H *et al.*, 1984).

Cette fluorescence est intensifiée en chromatogramme par les vapeurs de NH₃ observée sous la lumière UV, par pulvérisation du chromatogramme par le réactif de Borntrager ou l'acétate de plomb (Macek, K., 1972; Harbone, J.B., 1984; Wagner, H *et al.*, 1984).

b – Spectroscopie infrarouge IR :

Cette technique fournit des informations sur les groupements fonctionnels d'une molécule. Pour les coumarines :

- L'absorption C=O de la lactone conjuguée apparaît pratiquement dans la région (1550-1750 cm⁻¹) (Prachyawarakorn, V *et al.*, 2006; Kostova, I *et al.*, 2007).
- L'absorption OH du phénol est observée à 3550 cm⁻¹.

c – Spectroscopie ultraviolette UV :

Les coumarines ont un spectre UV caractéristique, fortement influencé par la nature et la position des substituants, profondément modifié en milieu alcalin : KOH, NaOH, NaOCH₃ et en présence d'AlCl₃.

AlCl₃ forme un complexe avec les hydroxyles portés par des carbones adjacents, ce qui induit un déplacement bathochrome (Bruneton, J., 1999).

Pour la coumarine, les absorptions maximales sont présentées dans deux bandes en 276 cm⁻¹ et 311 cm⁻¹. La présence des substituants alkylés induit par des modifications des valeurs de la bande en 311 cm⁻¹ vers 325 cm⁻¹ (Abu, E.R.A *et al.*, 1985; Shults, E.E *et al.*, 2003). Selon la position de OH, le déplacement est plus au moins fort (Bruneton, J., 1999).

d – Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire RMN :

L'allure des spectres RMN ^1H des coumarines est caractéristique, les protons oléfiniques H-3 et H-4 apparaissent respectivement sous forme de deux doublets à :

δ (ppm) [6,10 – 6,40] , [7,50 – 7,90] pour les coumarines simples et les furanocoumarines (Sariaslani, S.F *et al.*, 1983; Lalande, J *et al.*, 2003; Tosun, A *et al.*, 2005; Xiao, W.L *et al.*, 2007 ; Widodo, G.P *et al.*, 2008).

e – La spectrométrie de masse des coumarines :

Les composés cycliques fortement insaturés tels que la « coumarines », et mêmes les ions qui ont formés par fragmentation α au niveau d'un groupement carbonyle, ont la propriété de pouvoir perdre un groupement CO (28 uma). S'il y a plusieurs groupements CO dans une molécule, ils peuvent être éliminés les uns après les autres (Harbone, J.B., 1984; Lalande, J *et al.*, 2003; Prachyawarakorn, V *et al.*, 2006).

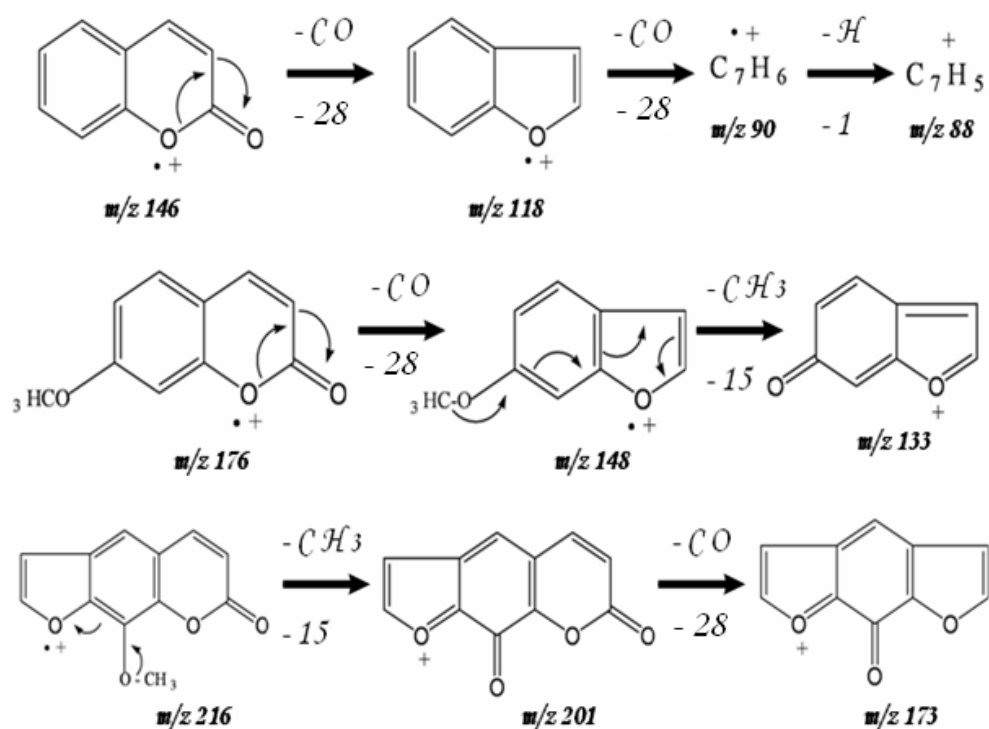


Schéma I – 1 : Exemples des fragmentations en spectrométrie de masse des coumarines.

III – 6 Intérêt pharmacologique des coumarines :

Les coumarines manifestent diverses activités biologiques, qui varient selon la substitution sur le cycle benzopyrone (Barnard, D.L *et al.*, 2002; Kostova, I., 2005; Sarker, S.D *et al.*, 2005; Kostova, I *et al.*, 2006).

Les coumarines simples contribuent généralement à fluidifier le sang par leur activité veinotonique et vasculoprotecteur, c'est le cas de l'esculoside du Marronnier d'Inde, ou anticoagulateur du dicoumarol produit par le Mélilot (*Melilotus officinalis*). L'intérêt des furanocoumarines a été signalé dans le cas du traitement des spasmes néphrétiques, de l'angine de poitrine (khelline de l'*Ammi visnaga*). La capacité que possèdent diverses structures furanocoumariniques à provoquer une hyperpigmentation cutanée transitoire est bien connue. Ces propriétés photodynamisantes sont mises à profit dans le traitement des manifestations du vitiligo, du psoriasis et d'autres affections dermatologiques. Elles peuvent aussi être utiles dans les cures de bronzage (crèmes à base de psoralène, Bergaptène). La visnadine, une pyranocoumarine, est douée de propriétés vasodilatatrices coronariennes et présentée comme ayant une action favorable sur les troubles de la sénescence cérébrale.

Le tableau suivant rassemble quelques exemples sur l'activité biologique des coumarines.

Tableau I – 7 : Quelques exemples sur l'activité biologique des coumarines.

<i>L'activité</i>	<i>Coumarines</i>	<i>Information</i>	<i>Références</i>
<i>anti-inflammatoire</i>	Angelicine Athamantine Bergaptène Herniarine Impératorine Ledebouviellole Psoralène Scopoletine	Cette activité dépend de la nature des substituants des coumarines, Plus intéressant, les coumarines peuvent posséder des effets pro inflammatoires : Le Psoralène et Impératorine à une baisse dose possèdent une activité anti-inflammatoire , mais à une forte dose a un effet pro inflammatoire .	Rouxel, T., 1989
<i>Antimicrobienne</i>	Angalicine Cichoriine Ciichoriine acétate Herniarine Umbelliprenine	ils sont montrant que le groupe hydroxyle libre en position 6 des coumarines est très important pour l'activité antifongique , tandis que le même libre en position 7 est important pour l'activité antibactérienne .	
<i>Phototoxicité</i>	Athamantine Bergaptène Isopimpinelline Peucedanine Psoralène Umbélliférone Xanthotoxine	Les Psoralènes, furanocoumarines typiques sont des photosensibilisateurs dans la gamme de 320-380 nm, une gamme où les acides nucléiques et les protéines cellulaires montrent les bandes d'adsorption faible.	Crépy, M.N., 2006.
<i>Cytotoxicité</i>	Niffcoumarine Paepalantine Seseline 5-methoxy Seseline Suberosin Xanthyletine Xanthoxyletine	Cette activité baser sur les substituant ortho-dihydroxy , en plus le groupe phényle avoir un rôle très important dans cette activité.	Kostova, I., 2005.
<i>Inhibiteurs de HIV</i>	(+)-Calanolide A (-)-Calanolide B Cordatolite A Cordatolite B Coriandrine Imperatorine Suksdorfine	Quelques coumarines inhibent différents stades du cycle de réplication de HIV.	Kostova, I <i>et al.</i> , 2006. Spino, C <i>et al.</i> , 1998. Singh, I.P <i>et al.</i> , 2005.

2 ème Partie :

Partie Expérimentale.

I – Matériel végétal :

Les racines d'*Anacyclus pyrethrum* ont été obtenues de source commerciale en Avril 2007. La drogue a été identifiée grâce à ses caractères botaniques macro- microscopiques selon les standards. Un spécimen de l'échantillon de référence se trouve dans l'herbier du laboratoire de botanique médicale et de pharmacognosie, du département de pharmacie de l'Université Mentouri Constantine, sous le n° APY 001-97.

II – Méthode d'Extraction :

Les racines d'*Anacyclus pyrethrum* sèches sont finement pulvérisées dans un broyeur à couteaux. La poudre d'*A pyrethrum* (700 g) est macérée à froid en contact avec l'hexane (Hex) pendant 3 jours. Après filtration, le solvant est éliminé par évaporation sous vide à une température modérée (<40 ° C). L'extrait Hex est obtenu avec une masse de 12,64 g. Le résidu récupéré est mis de nouveau à macérer dans le dichlorométhane (DCM) pendant 4 jours, cette opération est répétée deux fois avec renouvellement du solvant. Les deux solutions extractives de DCM sont combinées et concentrées sous vide à une température modérée (<40 ° C). L'extrait DCM est obtenu avec une masse de 12,64 g.

Le résidu de l'extraction précédente est de nouveau macéré dans l'acétate d'éthyle (EtOAc) pendant 4 jours, l'opération est répétée deux fois. Les deux solutions extractives de EtOAc sont combinées et concentrées sous vide à une température modérée (<40 ° C). L'extrait EtOAc est obtenu avec une masse de 4,57 g.

Le résidu de l'extraction précédente est mis à nouveau à macérer dans l'éthanol (EtOH) pendant 2 jours, l'opération est répétée deux fois. Les deux solutions extractives de EtOH sont combinées et concentrées sous vide à une température modérée (<40 ° C). L'extrait EtOH est obtenu avec une masse de 18,77 g.

Enfin, la macération dans un milieu hydro alcoolique (30 % éthanol, 70 % eau) du résidu issu de l'étape précédente pendant 3 jours, puis la filtration et enfin l'évaporation sous vide du filtrat, a permis d'obtenir 26,06 g de l'extrait hydroalcoolique (HA).

L'ensemble du protocole d'extraction est résumé dans le schéma III – 1 (3^{ème} partie).

Les caractéristiques des extraits obtenus sont regroupées dans le tableau III – 1

III – Méthodes chromatographiques :

III – 1 Chromatographie sur couche mince (CCM) analytique :

Les plaques chromatographiques en couche mince analytiques ont été obtenues de source commerciale (Merck). Elles sont constituées d'une plaque d'aluminium recouverte d'un gel de silice 60F₂₅₄. Après leur développement, les chromatogrammes sont examinés, à la lumière du jour et sous lampe UV à 254 et 366 nm. Elles sont révélées ensuite par les réactifs de détection.

Tableau II – 1 : Composition des solvants pour l'analyse par CCM des extraits bruts.

<i>L'extrait testé</i>	<i>Mélange du solvant</i>	<i>Pourcentage</i>
Hex	Hex / EtOAc	9 : 1
	Hex / EtOAc	7 : 3
DCM	EP / EtOAc	9 : 1
	Hex / CH ₂ Cl ₂	9 : 1
	CHCl ₃ / Acétone	6,5 : 3,5
	CHCl ₃ / Me OH	9 : 1
	EtOAc / Me OH	9 : 1
	Hex / EtOAc	9 : 1
EtOAc	Hex / EtOAc	8 : 2
	Hex / EtOAc	1 : 9
EtOH	EtOAc / Me OH	6 : 4
	EtOAc / Me OH / H ₂ O	6 : 4 : 1
HA	Hex / EtOAc	8 : 2
	EtOAc / Me OH	8 : 2

Pour l'analyse de la pureté des composés isolés par CCM, les systèmes de solvants suivants ont été utilisés (tableau II – 2).

Tableau II – 2 : Conditions chromatographiques particulières.

<i>Composés</i>	<i>Mélange du solvant</i>	<i>Pourcentage</i>
A, B et C	EP / EtOAc	9 : 1
D	CH ₂ Cl ₂ / Acétone	9 : 1
	CH ₂ Cl ₂	100 %
	Cyclohexane / EtOAc	4 : 1
E	Toluène / EP / CH ₃ COOH glacial	1 : 1 : 1
F, G et H	EtOAc / HCOOH / CH ₃ COOH glacial / H ₂ O	100 : 11 : 11 : 27

III – 2 Chromatographie sur colonne de gel de silice (CC):

Les caractéristiques de la colonne en verre utilisée dans le fractionnement des extraits bruts DCM et EtOH sont reportées dans le tableau II – 4.

Tableau II – 3 : Caractéristiques de la colonne chromatographique (CC).

Diamètre de la colonne	2,5 cm
Hauteur de la colonne	40 cm
Hauteur du gel de silice dans la colonne	23 cm
Poids du gel de silice	48 g
Type de Gel de silice	60 (0.063-0.200 mm),(70-230 mesh ASTM) Fournisseur MERCK

III – 2 – 1 Fractionnement de l'extrait DCM :

L'extrait DCM (2 g) a été fractionné par chromatographie sur une colonne de gel de silice en phase et pression normale. L'élution est réalisée au moyen de l'hexane dont augmente la polarité par l'addition progressive de l'acétate d'éthyle. La polarité de l'éluant est ensuite augmentée par l'addition graduelle du méthanol. L'élution complète de la colonne est réalisée avec du méthanol pur.

Tableau II – 4 : Composition de l'éluant utilisé dans le fractionnement par CC de l'extrait DCM.

Fractions	Eluant %			Volume (ml)
	Hexane	EtOAc	Me OH	
F ₁ →F ₃	100	00	00	200
F ₄ →F ₇	90	10	00	300
F ₈ →F ₁₀	80	20	00	200
F ₁₁ →F ₁₅	70	30	00	300
F ₁₆ →F ₂₀	60	40	00	300
F ₂₁ →F ₂₃	50	50	00	200
F ₂₄ →F ₂₆	40	60	00	200
F ₂₇ →F ₃₃	30	70	00	400
F ₃₄ →F ₃₈	20	80	00	300
F ₃₉ →F ₄₃	10	90	00	300
F ₄₄ →F ₄₆	00	100	00	300
F ₄₇ →F ₅₃	00	90	10	200
F ₅₄ →F ₅₉	00	50	50	200
F ₆₀ →F ₆₂	00	10	90	100
F ₆₃ →F ₆₇	00	00	100	150

III – 2 – 2 Fractionnement de l'extrait EtOH :

L'extrait EtOH (2 g) a été fractionné sur colonne de gel de silice en phase et pression normale. L'élution est réalisée au moyen de l'acétate d'éthyle dont augmente la polarité par l'addition progressive de méthanol.

Tableau II – 5 : Composition de l'éluant utilisé dans le fractionnement par CC de l'extrait EtOH.

<i>Fractions</i>	<i>Eluant %</i>		<i>Volume (ml)</i>
	<i>EtOAc</i>	<i>MeOH</i>	
F ₁ →F ₇	100	00	150
F ₈ →F ₁₀	95	05	100
F ₁₁ →F ₁₄	90	10	100
F ₁₅ →F ₁₉	80	20	100
F ₂₀ →F ₂₃	75	25	100
F ₂₄ →F ₃₀	70	30	100
F ₃₁ →F ₃₇	65	35	100
F ₃₈ →F ₄₀	60	40	50
F ₄₁ →F ₄₄	55	45	50
F ₄₅ →F ₄₇	50	50	50
F ₄₈ →F ₅₀	40	60	50
F ₅₁ →F ₅₃	30	70	50
F ₅₄ →F ₆₀	20	80	100
F ₆₁ →F ₆₇	10	90	100
F ₆₈ →F ₇₄	00	100	100

III – 3 Chromatographie sur plaques préparatives :

Des plaques chromatographiques de verre (20x20cm), recouvertes de gel de silice 60F254, d'épaisseur de 2 mm ont été utilisées dans un but de séparation et purification. Les plaques sont préparées selon la méthode standard (Macek, K., 1972) et activées dans une étuve à 105°C pendant 30 min.

Tableau II – 6 : Systèmes de solvants utilisés pour la CCM préparative.

<i>Lot purifié</i>	<i>Mélange du solvant</i>	<i>Pourcentage</i>
Lot 4 et 5 (pour l'extrait DCM)	EP / EtOAc	9 : 1
Lot 6 (pour l'extrait EtOH)	EtOAc	100 %
Lot 10 (pour l'extrait EtOH)	EtOAc / Me OH	6 : 4
Lot 10 S ₂ (pour l'extrait EtOH)	EtOAc / HCOOH / CH ₃ COOH glacial / H ₂ O	100 : 11 : 11 : 27

III – 4 Réactifs de révélation utilisés en CCM :

Les réactifs chimiques d'identification ont été préparés selon les méthodes standards (Macek, K., 1972; Wagner, H *et al.*, 1984). Les principaux réactifs de révélation sont présentés dans le tableau II – 9 suivant :

Tableau II – 7 : Réactifs de révélation en CCM utilisés.

<i>Réactifs</i>	<i>Mode opératoire</i>	<i>Métabolites secondaires détecté</i>
<i>L'acétate de Plomb</i>	Vaporiser une solution aqueuse d'acétate de plomb à 5 % sur la plaque et voir directement sous la lampe UV à 366 nm.	Coumarines.
<i>Acide sulfurique</i>	Solution d'acide sulfurique 10 %. Après la pulvérisation du réactif mettre la plaque CCM pendant une dizaine de minutes à l'étuve (100 °C).	Stéroïdes, Terpènes et dérivés phénylepropane.
<i>L'anisaldéhyde</i>	Mélanger 0,5 ml d'anisaldéhyde (4-méthoxybenzaldéhyde) avec 10 ml d'acide acétique glacial. Ajouter 85 ml de méthanol puis mélanger. Ajouter 5 ml d'acide sulfurique concentré, la solution ainsi obtenue est homogénéisée et gardée à 4 °C pendant toute la durée d'utilisation. Après la pulvérisation du réactif mettre la plaque CCM pendant une dizaine de minutes à l'étuve (100 °C).	Stéroïdes, Terpènes, dérivés phénylepropane et Alkamides.
<i>Borntrager</i>	10 % éthanolique potassium hydroxyde (KOH). Après la pulvérisation du réactif voir la plaque CCM sous la lampe UV à 366 nm.	Coumarines.
<i>Dragendorff</i>	une solution de 0,85 g de nitrate basique de bismuth et 10 g d'acide tartarique dans 40 ml d'eau (solution A), une solution contenant 16 g de KI dans 40 ml d'eau (solution B). Mélanger 5 ml de A, 5 ml de B, 100 ml d'eau et 20 g d'acide tartarique, vaporiser le mélange sur la plaque.	Alcaloïdes.
<i>Liebermann Burchard</i>	Une première solution composée d'un mélange à volume égale (5 ml) d'acide sulfurique et l'anhydride acétique, À cette solution, on rajoute 50 ml d'éthanol absolu. La préparation est effectuée à froid dans de la glace. Après la pulvérisation du réactif mettre la plaque CCM pendant une dizaine de minutes à l'étuve (100 °C).	Stéroïdes et Terpènes.
<i>Vanilline sulfurique</i>	mélange d'une solution éthanolique d'acide sulfurique et d'une solution éthanolique de vanilline à 1 %. Après la pulvérisation du réactif mettre la plaque CCM pendant une dizaine de minutes à l'étuve (100 °C).	Stéroïdes, Terpènes et dérivés phénylepropane.

IV – Analyses microchimique d'identification:

Des réactions en tube ont été utilisées pour la caractérisation préliminaire des principes présents dans les extraits bruts. Leur préparation s'est faite selon les protocoles standards décrits dans la littérature (Debray, M.M., 1970; Dohou, N *et al.*, 2003; Akinlolu, A.A *et al.*, 2006; Egwaikhide, P.A.E *et al.*, 2008).

Tableau II – 8 : Réactions de caractérisation chimique en tubes.

<i>Classes des Composés</i>	<i>Mode opératoire</i>	<i>Observation</i>
<i>Anthracéniques libres</i>	A 1 ml d'extrait DCM ajouter 1 ml d'ammoniaque.	la coloration rouge indiquant la présence d'anthracéniques libres.
<i>Coumarines</i>	Dissoudre 1 ml d'extrait DCM dans deux tubes à essai, au contenu de l'un des tubes ajouter 0,5 ml de NH ₄ OH à 25 %.	Procéder à l'observation sous UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.
<i>Stérols et Triterpènes</i>	Dissoudre 1 ml d'extrait DCM dans 1 ml d'anhydride acétique puis 1 ml de chloroforme et répartir la solution entre 2 tubes à essai. A l'aide d'une pipette ajouter 1 ml de H ₂ SO ₄ concentré au fond du tube sans agiter.	La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et une coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence de stérols et triterpènes.
<i>Tanins</i>	A 5 ml d'extrait DCM ajouter 1 ml d' HCl.	en présence de tanins il se développe un précipité rouge.

V – Méthodes d'analyse spectroscopiques :

V – 1 Spectroscopie UV – visible :

Les spectres UV des différents produits sont enregistrés dans le MeOH grade spectroscopie, sur un appareil Shimadzu UV – 3101 PC (Laboratoire de physique, Université de Mentouri, Constantine).

V – 2 Spectroscopie infrarouge (IR):

Les spectres IR des différents produits sont enregistrés, en utilisant des pastilles de KBr, sur un appareil de type Shimadzu FT / IR – 460 (Unité d'analyses physico-chimiques, département Chimie, Université de Mentouri, Constantine).

V – 3 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN¹H):

Les spectres de résonance magnétique nucléaire, en mode ¹H, sont réalisés sur un appareil Bruker 250MHz (Unité d'analyses physico-chimiques, département Chimie, Université de Mentouri, Constantine). Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm), les constantes de couplage J sont exprimées en Hertz (Hz).

V – 4 Spectromètre de masse :

Les spectres de masse des produits C et D ont été enregistrés en EI (Impact Electronique) sur un spectromètre de masse de type Bruker Daltonics Data Analysis 3.4, (Faculté de pharmacie, Université Louis Pasteur de Strasbourg, France, voir remerciements).

VI – Activité antidermatophyte :

VI – 1 Préparation du milieu de culture :

Le milieu de culture Sabouraud glucosée classique (voir le tableau II – 12) est modifié par l'ajout de 0,4 g de chloramphénicol et 0,5 g cycloheximide par litre au milieu reconstitué. Après stérilisation (1bars, 120 °C, 20 min) à l'autoclave le milieu est conservé à basse température jusqu'à l'utilisation.

Tableau II – 9 : Composition (g/l) du milieu Sabouraud pour la culture de dermatophytes.

<i>Constituants</i>	<i>Teneur (g/l)</i>
Peptone pour mycologie	10
Glucose	40
agar	15

VI – 2 Préparation des solutions à tester :

a – Extraits végétaux et fractions enrichies:

Les extraits et fractions enrichies secs ont été reconstitués en solution en utilisant 70 % de méthanol dans l'eau, additionnée de 1% de DMSO. Les préparations végétales ont été additionnées au milieu de culture avec une concentration de 100 µg/ml.

b – Solution de référence :

L'antifongique témoin, Griséofulvine, est mis en solution par dissolution de la quantité requise dans l'eau distillée contenant 1% de DMSO. La griséofulvine est additionnée à une concentration de 0,6 µg/ml, correspondant à la CMI vis-à-vis de la souche fongique de *Microsporium canis* (Larpent, J.P *et al.*, 1989).

c – Contrôle :

Le contrôle est constitué par addition d'une solution alcoolique à 70% d'eau distillée, additionnée de 1% de DMSO.

VI – 3 Préparation des plaques multi puits :

La méthode d'évaluation de l'activité antifongique a été adaptée pour les besoins du criblage des extraits et fractions des racines d'*Anacyclus pyrethrum*. Des plaques multi puits stériles, 12 puits de diamètre 2 cm, obtenues de chez IWAKI Japan, ont été utilisées à la place des boîtes pétri classiques.

VI – 4 Préparation de l'inoculant fongique :

L'inoculation des cultures est réalisée sous hotte, à partir de matériel fongique jeune, à croissance rapide contenant du mycélium et chlamydozoospores. Un disque du mycélium prélevé sur le pourtour d'une culture fongique âgée de 5-8 jours est trituré dans un volume suffisant d'eau stérile utilisant un agitateur vortex pour libérer le maximum de mycélium dans le milieu. La qualité (densité et homogénéité) de la solution

d'inoculation est appréciée par examen sous microscope avant chaque série l'inoculation. Celle-ci est réalisée sous des conditions d'asepsie, par l'addition d'un volume déterminé de l'inoculant fongique au milieu de culture. Les cultures sont maintenues à 37 ° C pendant 5 à 8 jours, jusqu'à une croissance appropriée du matériel fongique.

VI – 5 Mesure de l'activité antifongique :

L'activité antifongique est réalisée par comparaison du diamètre de croissance des souches, en présence et en absence des préparations végétales testées, du contrôle et de l'antifongique témoin (Griséofulvine). Le diamètre de la croissance des colonies est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse électronique à affichage digitale (Velleman DCA 150, lecture aux 1/100 près).

Le pourcentage de l'inhibition du mycélium (INH) est calculé comme suit :

$$\text{INH (\%)} = [(D_{\text{cont}} - D_{\text{trait}}) / D_{\text{cont}}] \times 100$$

D_{cont} : Diamètre de croissance dans le contrôle.

D_{trait} : Diamètre de croissance dans le traitement.

VI – 6 Traitement statistique des données :

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes affectées de l'écart type [Moy ± SD]. Pour l'étude statistique, les différents relevés ont été analysés par le test student, sur un logiciel Microcal, version 6,0 Windows (Microcalsoftware, USA).

3 ème Partie :

Résultats et Discussion.

Introduction

Une étude effectuée auparavant sur l'extrait hydroalcoolique des racines d'*Anacyclus pyrethrum* a révélé une forte activité antifongique sur trois souches de dermatophytes étudiées : *Microsporum canis*, *Microsporum nanum* et *Trichophytum rubrum*.

Ce présent travail est une continuité de l'étude citée et a comme objectif de contribuer à caractériser le profil métabolique des racines d'*A.pyrethrum* et la nature chimique des substances intervenant dans l'activité inhibitrice des dermatophytes.

I – Obtention des extraits bruts d'*Anacyclus pyrethrum* :

Cinq extraits bruts de polarité distincte, ont été obtenus selon le protocole d'extraction décrit en partie expérimentale, est repris dans le schéma III – 1. Les extraits bruts présentent les caractéristiques physiques reportées dans le tableau III – 1.

Tableau III – 1 : Caractéristiques physiques des extraits bruts d'*A.pyrethrum*.

<i>Extraits</i>	<i>Masse (g)</i>	<i>Rapport d'extraction (masse extrait/MV)</i>	<i>Aspect</i>	<i>Couleur</i>
Hex	12,64	(1 : 55)	Sirop	Jaune citron
DCM	16,22	(1 : 43)	Résineux	Marron brillant
EtOAc	04,57	(1 : 153)	Résineux	Marron brillant
EtOH	18,77	(1 : 37)	Résineux	Marron foncé
HA	26,06	(1 : 27)	Résineux	Marron très foncé

MV : matière végétale

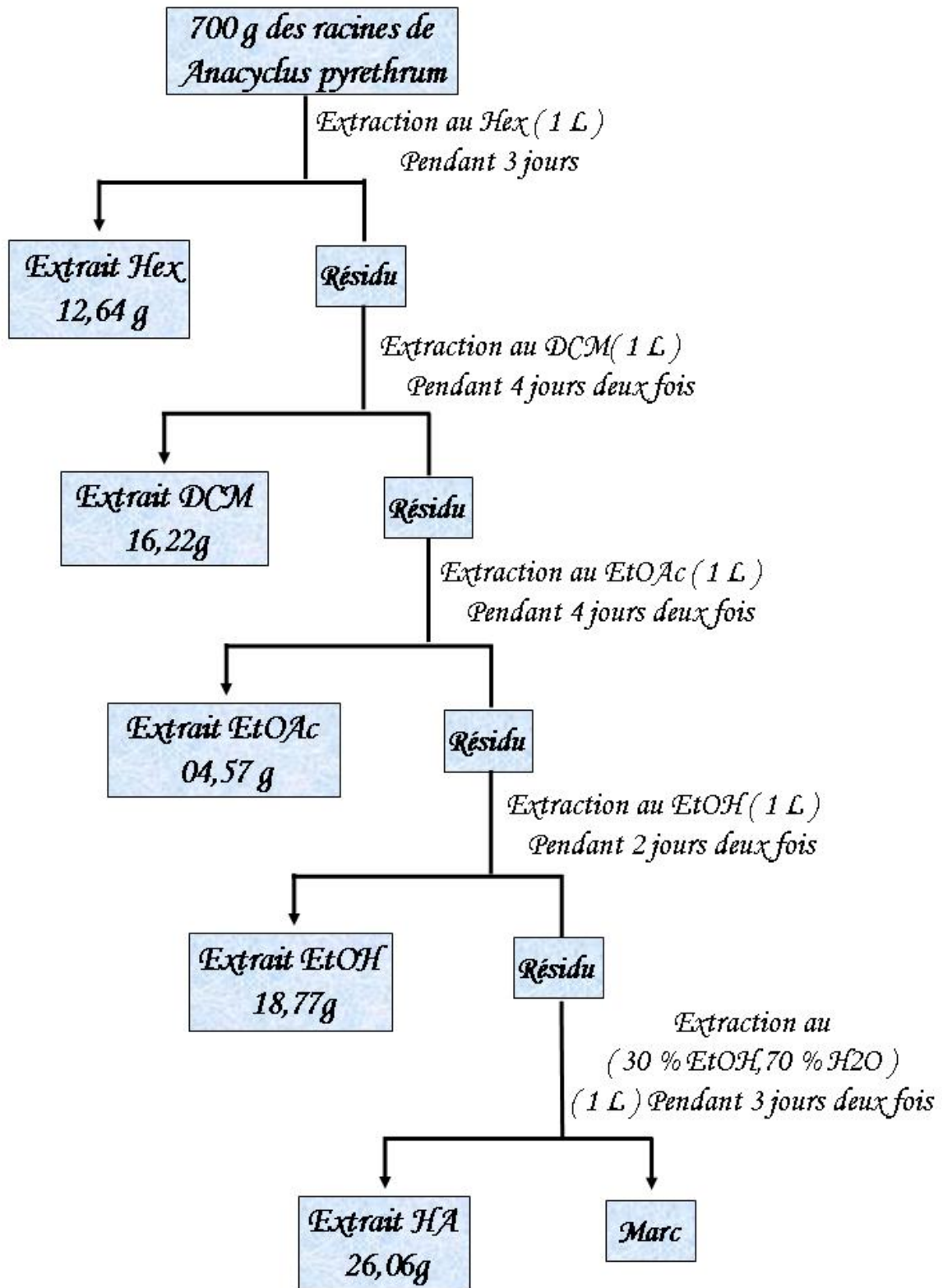


Schéma III – 1 : Protocole d'extraction en mode gradient.

II – Criblage biologique préliminaire des extraits bruts :

L'évaluation biologique des cinq extraits bruts des racines d'*A. pyrethrum* a été effectuée selon la procédure décrite en partie expérimentale (§ VI, page 51), en utilisant une souche de dermatophyte, le *Microsporum Canis*.

Les solutions d'extraits bruts de concentration 100 µg / ml, sont reconstituées dans un mélange de 70% de méthanol dans l'eau distillé, additionné de 1% de DMSO. La croissance des colonies de dermatophyte au contact des divers extraits est comparée à celle du contrôle (solution d'alcool + 1%DMSO) et de l'antifongique témoin (griseofulvine, GRISEO). Le test d'activité est répété au moins 3 fois pour chaque traitement.

Les résultats de cette évaluation d'activité sont exprimés en diamètre de croissance (tableau III – 2) et en pourcentage d'inhibition (tableau III – 3, figure III – 1)

Tableau III – 2 : Effet des extraits bruts d'*A.pyrethrum* sur les cultures de *M. canis* (exprimé en diamètre de croissance fongique +/- écart type ou SD).

<i>Extraits</i> (100 µg / ml)	<i>diamètre de croissance (m m)</i>			
	<i>crois 1</i>	<i>crois 2</i>	<i>crois 3</i>	<i>Crois. Moy. ± SD</i>
Hex	9.84	11.3	10.03	10.39 ± 0.79
DCM	03.87	03.10	04.03	03.67 ± 0.50
EtOAc	05.15	04.80	05.03	04.99 ± 0.18
EtOH	10.13	09.77	08.80	09.57 ± 0.69
HA	14.40	16.03	15.17	15.20 ± 0.82
Contrôle	18.04	19.25	16.45	17.91 ± 1.40
GRISEO [‡]	00.00	00.00	00.00	00.00 ± 0.00

([‡]) : CMI griseofulvine 0,6 µg / ml. (Ali, S.M.S *et al.*, 1999)

Tableau III – 3 : Effet inhibiteur des extraits bruts d'*A.pyrethrum* sur les cultures de *M. canis* (exprimé en pourcentage d'inhibition de la croissance fongique +/- écart type ou SD).

Extraits (100 µg/ml)	Inhibition en pourcentage (INH)			
	INH 1	INH 2	INH 3	INH. Moy. ± SD [¶]
Hex	45.46	41.30	39.03	41.93 ± 2.66 ^{**}
DCM	78.55	83.90	75.50	79.32 ± 3.47 ^{***, □□}
EtOAc	71.45	75.07	69.42	71.98 ± 2.33 ^{***, ¥}
EtOH	43.85	49.25	46.51	46.53 ± 2.20 ^{**}
HA	20.18	16.73	07.78	14.90 ± 5.22
Contrôle	00.00	00.00	00.00	00.00 ± 00
GRISEO [£]	100.00	100.00	100.00	100.00 ± 00

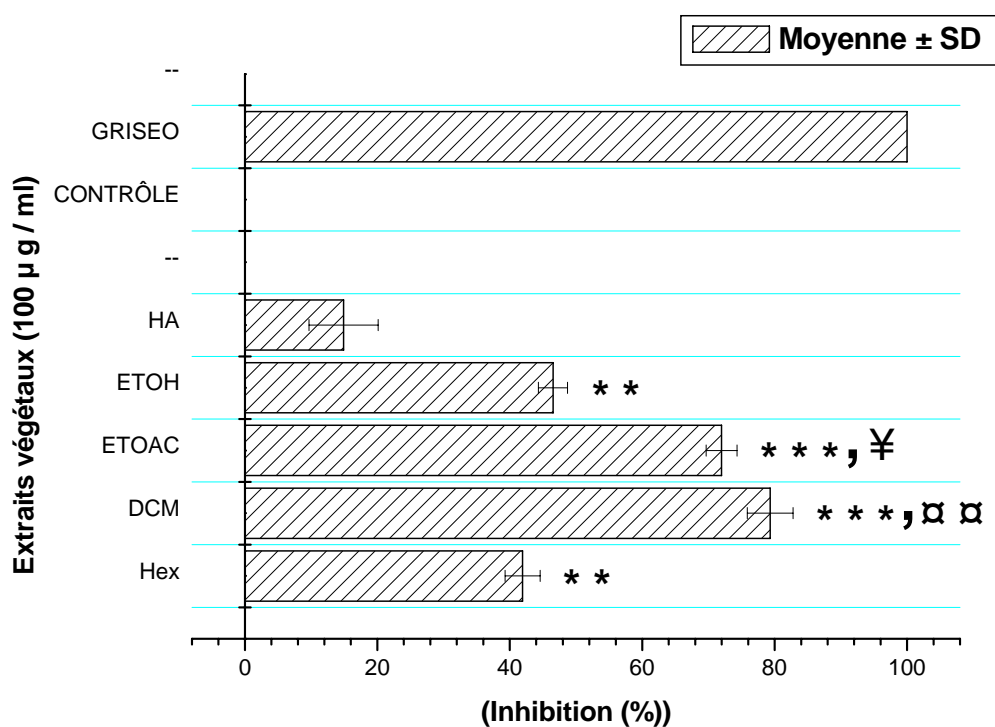
([£]) : 0,6 µg / ml.

([¶]) : les valeurs sont significatives :

(^{**}) P < 0,01 ; (^{***}) P < 0,001 [extraits vs control]

(^{□□}) P < 0,01 [extrait DCM vs autres extraits Hex, EtOH et HA]

([¥]) P < 0,05 [extrait EtOAc vs autres extraits Hex, EtOH et HA]



les valeurs sont significatives :

(^{**}) P < 0,01 ; (^{***}) P < 0,001 [extraits vs control]

(^{□□}) P < 0,01 [extrait DCM vs autres extraits Hex, EtOH et HA]

([¥]) P < 0,05 [extrait EtOAc vs autres extraits Hex, EtOH et HA]

Figure III – 1 : Activité antifongique des extraits bruts sur *Microsporum Canis*, (exprimée en pourcentage d'inhibition de la croissance fongique +/- écart type ou SD).

La lecture du tableau III – 3 (% d'inhibition) fait ressortir qu'à part l'extrait HA, les autres extraits bruts à la concentration de 100 µg /ml des racines d'*A. pyrethrum* et la griséofulvine =GRISEO à 0,6 µg/ml (Ali, S.M.S *et al.*, 1999) ont exhibé un effet inhibiteur significatif sur la souche fongique testée par rapport au control. Les croissances des colonies *M. canis* sont significativement inhibées par les extraits Hex (p<0.01), DCM (p<0.001), EtOAc (p<0.001) et EtOH (p<0.01) avec des valeurs d'inhibition respectivement de 41.93, 79.32, 71.98, et 46.53 (figure III – 1). De même, ces valeurs indiquent, d'une part que les extraits DCM et EtOAc exhibent un effet inhibiteur comparable entre eux, mais largement plus prononcé (minimum p<0,01) que celui des autres extraits, en l'occurrence ceux de Hex, EtOH et HA. Néanmoins, les effets inhibiteurs relativement modérés des extraits Hex, EtOH et HA envers la souche testée, pourraient être le résultat d'un effet dose de molécules présentent en faible concentration.

En raison de l'effet inhibiteur relativement prononcé de l'extrait DCM sur la croissance fongique de la souche testée, par rapport aux autres extraits bruts d'*A. pyrethrum*, à savoir Hex, EtOH et HA, et de sa masse relativement importante vis-à-vis de l'extrait EtOAc, l'étude de l'extrait DCM actif est réalisée en priorité. Pour ce faire, une caractérisation phytochimique préliminaire de l'extrait DCM actif est effectuée, en vue d'établir son profil métabolique. Ensuite, un fractionnement bio guidé des composantes de cet extrait sera réalisé.

III – Etude phytochimique approfondie de l'extrait actif DCM :

III – 1 Analyses microchimique et chromatographique :

Au vu des résultats précédents, faisant ressortir un effet inhibiteur notoire pour l'extrait DCM, un examen phytochimique plus approfondie est réalisé. Celui-ci s'articule sur des réactions microchimiques plus spécifiques combinées à des analyses chromatographiques sur couche mince. Ces analyses ont pour but de fournir des informations sur la composition chimique de l'extrait actif de DCM et d'établir un protocole de fractionnement bio guidé des ces composantes actives.

Les résultats sont reportés dans le tableau III – 4 suivant :

Tableau III – 4 : Résultats des tests microchimiques et chromatographiques sur l'extrait DCM.

<i>Classes chimiques</i>	<i>Tests microchimiques</i>	<i>Tests chromatographiques</i>	<i>Références</i>
Phytostérols	+ +	+ + <i>AS, LB et VS</i>	Non signalé dans l'espèce, mais signalé dans le genre (Gonzalez, C.F.A et al., 1985; Bergaoui, A et al., 2006 a et b)
Triterpènes	+ +	+ + <i>AS, LB et VS</i>	Non signalé dans l'espèce, mais signalé dans le genre (Gonzalez, C.F.A et al., 1985)
Alkamide		+ + <i>AN</i>	Signalé dans l'espèce (Crombia, L., 1954; Bohlmann, F et al., 1973; Adesina, S.K et al., 1988; Arnason, J.T et al., 1989; Sukumaran, K et al., 1995)
Saponosides		+/-	Non signalé (genre et l'espèce)
Anthracénosides	--	-- <i>BO</i>	Non signalé (genre et l'espèce)
Tanins condensés	--		Non signalé (genre et l'espèce)
Alcaloïdes		-- <i>DR</i>	Non signalé (genre et l'espèce)
Dérivées Phénylpropanes		+ + <i>AS et VS</i>	Signalé dans l'espèce (Adesina, S.K et al., 1988)
Coumarines	+ +	+ + <i>AP, BO et VA</i>	Non signalé dans l'espèce, mais signalé dans le genre (Gonzalez, C.F.A et al., 1985)

Légende :

– Réactifs révélateurs :

AN : anisaldéhyde, *AP* : Acétate de Plomb, *AS* : Acide sulfurique, *BO* : réactif de Borntrager,

DR : Dragendorff, *LB* : Liebermann Burchard, *VA* : Vapeurs d' NH₃, *VS* : Vanilline sulfurique.

– Lecture de l'analyse :

+ + présence -- absence +/- présence incertaine

Les tests microchimiques et chromatographiques de révélation ont permis d'établir la nature des principaux métabolites secondaires caractérisant l'extrait brut DCM des racines d'*A.pyrethrum*. Les tests ont été positifs pour les phytostérols, les triterpènes, les dérivées phényle propanes et les coumarines. Par contre, l'absence des anthracénosides, les alcaloïdes et des tanins est notée sur l'extrait brut DCM testé. La présence des saponosides est incertaine.

III – 2 Fractionnement bio guidé de l'extrait DCM :

L'extrait brut DCM (2 g) a été soumis à un fractionnement sur colonne en verre de gel de silice 60 (70-230 mesh.ASTM, Merck). L'élution est réalisée en mode gradient, en utilisant en premier des proportions variables d'hexane et d'acétate d'éthyle. L'élution complète de la colonne a été obtenue par ajout progressif de méthanol au système d'éluant initial. Les fractions collectées au nombre de 67 ont été analysées par chromatographie sur couche mince et combinée selon leur homogénéité, pour fournir à la fin 23 lots distincts (tableau III – 5).

Tableau III – 5 : Fractions issus de la CC de l'extrait DCM.

Poids mg	Fractions	N° des Lots	Aspects	Couleurs	Observation en CCM
1	F ₁ → F ₄	00	-	-	traces
2	F ₅	10	Subst. amorphe	Jaune	Trois taches + une tache bleue violette
3	F ₆	10	Subst. amorphe	Jaune	Une tache + une tache bleue violette
4	F ₇	10	Subst. amorphe	Blanche	Une tache + une tache bleue violette + une tache verte
5	F ₈	40	Subst. amorphe	Blanche	une tache verte majoritaire
6	F ₉	4	Cristaux	Blanche	rien
7	F ₁₀	60	Subst. amorphe	Jaune vert	Deux taches + mélange complexe
8	F ₁₁	60	Subst. amorphe	Orangée	Mélange complexe
9	F ₁₂	130	Résineux	Caramel	Trois grosses taches
10	F ₁₃	80	Résineux	Caramel	Trois grosses taches
11	F ₁₄	200	Résineux	Marron foncé	Deux taches
12	F ₁₅	50	Résineux	Marron foncé	Deux taches
13	F ₁₆ → F ₁₇	30	Pâteux	Marron foncé	Deux taches
14	F ₁₈ → F ₁₉	20	Résineux	Miel	Cinq taches
15	F ₂₀ → F ₂₁	10	Résineux	Miel	Trois taches
16	F ₂₂ → F ₂₄	10	Résineux	Miel	Deux taches
17	F ₂₅	10	Résineux	Jaune	Deux taches
18	F ₂₆ → F ₂₇	10	Résineux	Miel	Deux taches
19	F ₂₈ → F ₃₄	40	Résineux	Miel	Une tache + traînée + une tache bleue fluorescente majoritaire
20	F ₃₅ → F ₃₉	20	Huileux	Miel	Traînée + une tache bleue fluorescente majoritaire
21	F ₄₀ → F ₄₄	20	Huileux	Miel	Traînée + une tache bleue fluorescente majoritaire
22	F ₄₅ → F ₅₂	70	Huileux	Miel	Traînée + une tache bleue fluorescente majoritaire
23	F ₅₃ → F ₆₇	20	Huileux	Miel	Traînée

III – 2 – 1 Evaluation de l'activité antifongique des fractions riches :

Pour des raisons pratiques, une sélection est opérée parmi les 23 lots obtenus et a permis de réduire le nombre de lots destinés au test d'activité à cinq (05) échantillons, représentés par les lots 3, 4, 7, 16 et 19. Ces lots tests, dits "fractions riches", elles sont définis ci-après.

Tableau III – 6 : Désignation des 5 fractions riches.

<i>Lot n°</i>	<i>Composition</i>	<i>fraction riche testée (lot représentatif)</i>
1 à 3	Phytostérols	PHYTOST (lot 3)
4 à 6	Triterpènes	TRITER (lot 4)
8 à 11	Alkamides	ALKAM (lot 7)
14 à 18	Dérivés de phénylpropane	PHENYLP (lot 16)
19- 23	Coumarines	COUMAR (lot 19)

L'évaluation de l'activité antifongique des cinq fractions enrichies a été effectuée selon la procédure décrite dans la partie expérimentale (§ VI, page 51), en utilisant une souche de dermatophyte, le *Microsporum Canis*.

Les solutions des fractions riches, de concentration 100 µg/ml, sont constituées dans un mélange de 70% de méthanol dans l'eau distillé additionné de 1% de DMSO. La croissance des colonies de dermatophyte au contact des diverses fractions est comparée à celles du contrôle (solution d'alcool + 1%DMSO) et de l'antifongique témoin. Le test est répété au moins 3 fois pour chaque traitement.

Les résultats de cette évaluation d'activité sont exprimés en diamètre de croissance (tableau III – 7) et en pourcentage d'inhibition (tableau III – 8, figure III – 2).

Tableau III – 7 : Effet des fractions riches d'*A.pyrethrum* sur la culture de *M. canis*
(exprimé en diamètre de croissance fongique +/- écart type ou SD).

fraction riche (100 µg / ml)	diamètre de croissance (m m)			
	crois 1	crois 2	crois 3	Crois. Moy. ± SD
PHYTOST	14.75	13.54	16.05	14.78 ± 1.02
COUMAR	11.05	10.8	11.30	11.05 ± 0.20
ALKAM	03.33	04.11	04.60	04.01 ± 0.52
TRITER	02.95	03.75	03.85	03.52 ± 0.40
PHYNYLP	08.71	08.45	09.01	08.72 ± 0.23
Contrôle	18.34	19.05	16.88	18.09 ± 1.40
GRISEO [‡]	00.00	00.00	00.00	00.00 ± 0.00

([‡]) : 0,6 µg / ml.

Tableau III – 8 : Effet des fractions riches d'*A.pyrethrum* sur la culture de *M. canis*
(exprimé en pourcentage d'inhibition de la croissance fongique +/- écart type ou SD).

fraction riche (100 µg / ml)	Inhibition en pourcentage (INH)			
	INH 1	INH 2	INH 3	INH. Moy. ± SD [¶]
PHYTOST	18.46	25.15	11.28	18.30 ± 5.66 [*]
COUMAR	38.92	40.30	37.53	38.92 ± 1.13 ^{***}
ALKAM	81.59	77.28	74.57	77.81 ± 2.89 ^{***, ¥}
TRITER	83.69	79.27	78.72	80.56 ± 2.22 ^{***, □□}
PHENYLP	51.85	53.29	50.19	51.78 ± 1.27 ^{***}
Contrôle	00.00	00.00	00.00	00.00 ± 00
GRISEO [‡]	100.00	100.00	100.00	100.00 ± 00

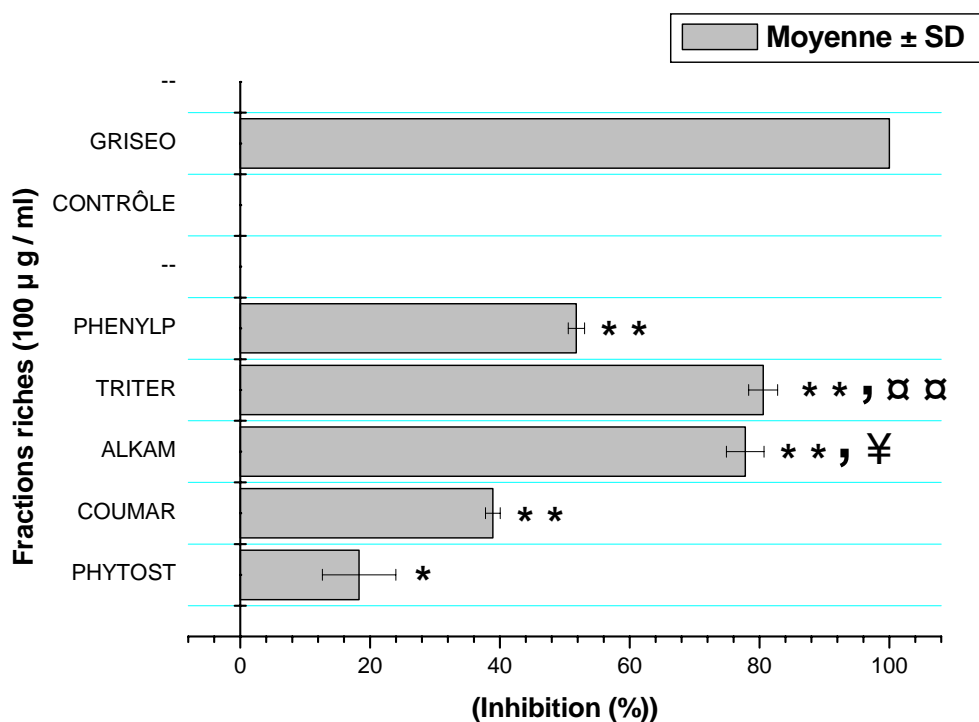
([‡]) : 0,6 µg / ml.

([¶]) : les valeurs sont significatives :

(^{*}) P < 0,05 ; (^{***}) P < 0,001 [fractions enrichies vs control] ;

(^{□□}) P < 0,01 [fraction enrichie TRITER vs autres fractions enrichies PHYTOST, COUMAR et PHENYLP]

([¥]) P < 0,05 [fraction enrichie ALKAM vs autres fractions enrichies PHYTOST, COUMAR et PHENYLP]



Les valeurs sont significatives :

- (*) $P < 0,05$; (***) $P < 0,001$ [fractions riches vs control] ;
- (α α) $P < 0,01$ [fraction riche TRITER vs autres fractions riches PHYTOST, COUMAR et PHENYL P]
- (¥) $P < 0,05$ [fraction riche ALKAM vs autres fractions riches PHYTOST, COUMAR et PHENYL P]

Figure III – 2 : *Activité antifongique des fractions riches sur Microsporium Canis, (exprimée en pourcentage d'inhibition de la croissance fongique +/- écart type ou SD).*

La lecture du tableau III – 7 (% d'inhibition) fait ressortir que toutes les fractions riches (100 µg/ml), issues de l'extrait brut DCM des racines d'*A.pyrethrum* et l'antifongique témoin (GRIS), ont exhibé un effet inhibiteur significatif sur la souche fongique testée par rapport au control. Les croissances des colonies *M. canis* sont significativement inhibées par les fractions riches PHYTOST ($p < 0.05$), COUMAR ($p < 0.001$), ALKAM ($p < 0.001$), TRITER ($p < 0.001$), et PHENYL P ($p < 0.001$) avec des valeurs d'inhibition respectivement de 18.30, 38.92, 77.81, 80.56 et 51.78 (figure III – 2). Ces valeurs indiquent aussi que les effets inhibiteur des fractions riches TRITER et ALKAM sont comparables, et sont largement plus prononcés ($p < 0,001$) que celui des autres fractions, en l'occurrence ceux de PHENYL P, COUMAR et PHYTOST.

Néanmoins, les effets inhibiteurs relativement modérés des ces dernières fractions envers la souche testée, pourraient être le résultat d'un effet dose de molécules présentent en faible concentration.

En raison de l'effet inhibiteur prononcé de la fraction riche en triterpènes sur la croissance fongique, une étude approfondie des lots 4, 5 et 6 constituant cette fraction active a été réalisée.

III – 2 – 2 Etude du Lot 4 et 5 :

Les deux lots 4 et 5, se présentent sous forme d'une poudre blanche. Leur analyse par CCM, avec ou sans réactif révélateur, dans plusieurs systèmes d'éluants, a permis de distinguer la présence de 03 taches principales communes aux deux lots 4 et 5. Cependant, ces lots (4 et 5) présentent des différences, notamment quant à la présence plus importante de composés se déplaçant avec le front dans le cas du lot 5.

Les 03 taches présentent dans les lots 4 et 5 sont dénotées, ci-après par polarité croissante, en A, B et C. Leurs caractéristiques chromatographiques sont exprimées dans le tableau III – 9 :

Tableau III – 9 : Caractéristiques chromatographique du Lot 4 et 5.

<i>Les constituants présents (R_f)</i>	<i>Avant la révélation</i>			<i>Après la révélation</i>		
	<i>à la lumière de jour</i>	<i>sous UV</i>		<i>à la lumière de jour</i>	<i>sous UV</i>	
		<i>à 254 nm</i>	<i>à 366 nm</i>		<i>à 254 nm</i>	<i>à 366 nm</i>
Substances apolaires	n/d	sombre	sombre	marron	marron	marron
Composé A ($R_f = 0,45$)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	jaune ^{AS}
Composé B ($R_f = 0,36$)	n/d	n/d	Vert	n/d	n/d	n/d
Composé C ($R_f = 0,25$)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	orangé ^{LB} violet ^{AS}
Substances polaires	jaune	sombre	jaune	marron	marron	Marron

R_f dans le système solvant : EP – EtOAc (9 : 1)

Légende :

Réactifs révélateurs : **AS** : Acide sulfurique et **LB** : Liebermann Burchard.

a – Purification :

Les lots 4 (10 mg) et 5 (40 mg) ont été soumis à des CCM préparatives sur plaque de gel de silice, avec un mélange d'éther de pétrole et éthyle acétate dans la proportion (9 : 1). Trois produits ont été obtenus : Composé A (5,2 mg), Composé B (4,3 mg) et Composé C (10,4 mg).

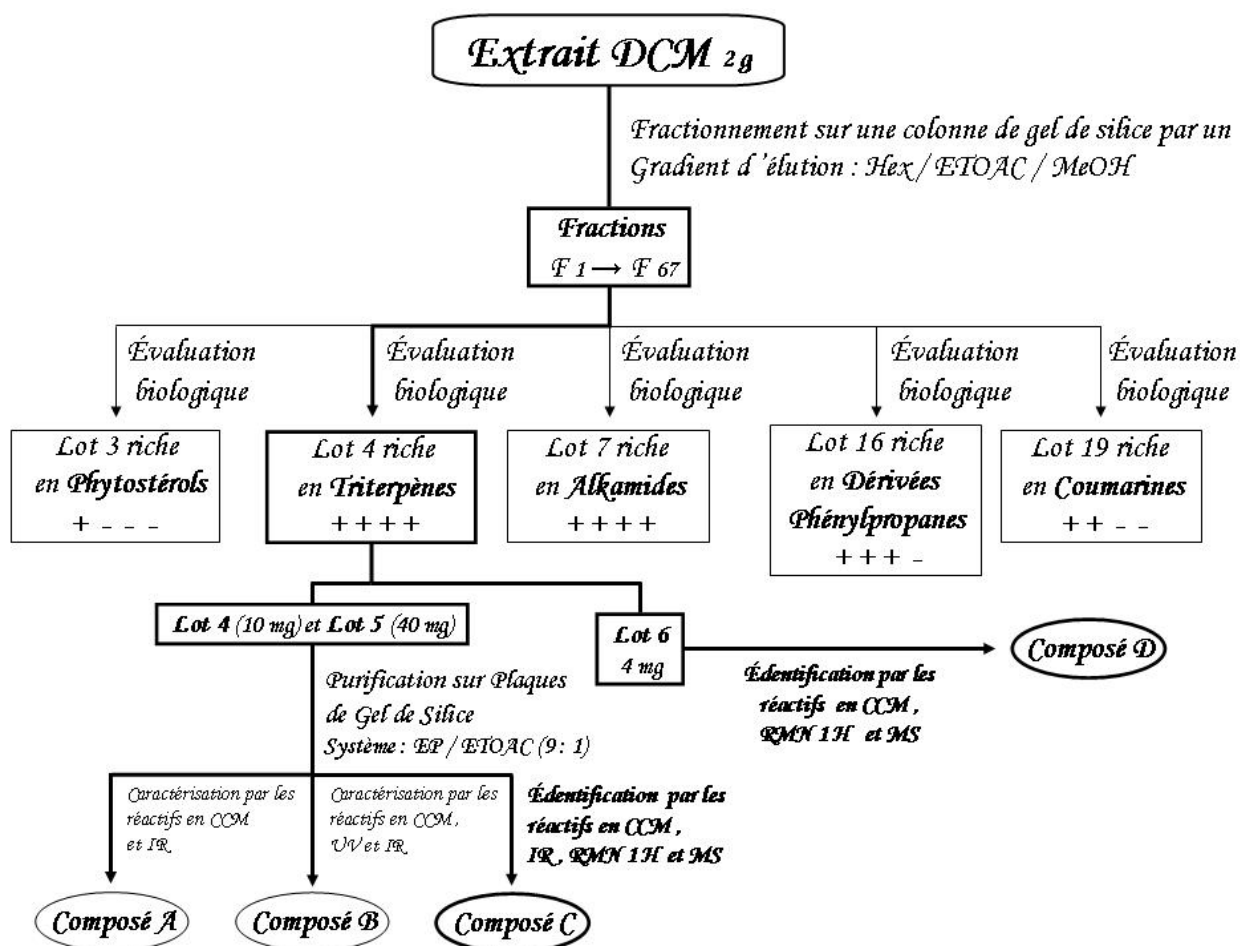


Schéma III – 2 : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait DCM.

6 – Caractéristiques des produits isolés :

Note. Les spectres RMN ¹H des composés isolés sont présentés en annexes III.

6 – 1 Le Composé A :

6₁₁ – Propriétés physico-chimiques :

- Substance amorphe jaune clair.
- Soluble dans les solvants apolaires.
- Caractéristiques chromatographiques :

Les caractéristiques du composé A sont illustrées dans le tableau suivant (III-10)

Tableau III – 10 : Caractéristiques chromatographiques du composé A.

<i>Avant la révélation</i>		<i>Après la révélation (10 % de H₂SO₄)</i>	
<i>à la lumière du jour</i>	<i>sous UV</i>	<i>à la lumière du jour</i>	<i>sous UV à 366 nm</i>
n/d	n/d	—	Jaune
R _f dans le système solvant : EP – EtOAc (9 : 1) : 0,45			

6₁₂ – Spectre IR:

Le spectre IR (Figure III – 3) du Composé A montre la présence des groupements fonctionnels suivants :

- Une bande large à 3440,8 cm⁻¹ attribuée au groupement **OH** d'un alcool.
- Deux pics à 2923,9 et 2854,5 cm⁻¹ correspondant aux **C-H S p³** : **CH** et **CH₂** de la chaîne aliphatique.

Plus les bande à 1461,9 cm⁻¹ confirmant la présence du **CH₂** de la chaîne aliphatique et à 1373,2 cm⁻¹ caractéristique du groupe **CH₃**.

- Un pic à 1737,7 cm⁻¹ représentant le groupement **C=O** d'une lactone.
- Une bande à 1641,3 cm⁻¹ correspondant à la vibration de la liaison carbonyle **C=O**.
- Une bande située à 700,1 cm⁻¹ caractérise la liaison **C-H S p²**.

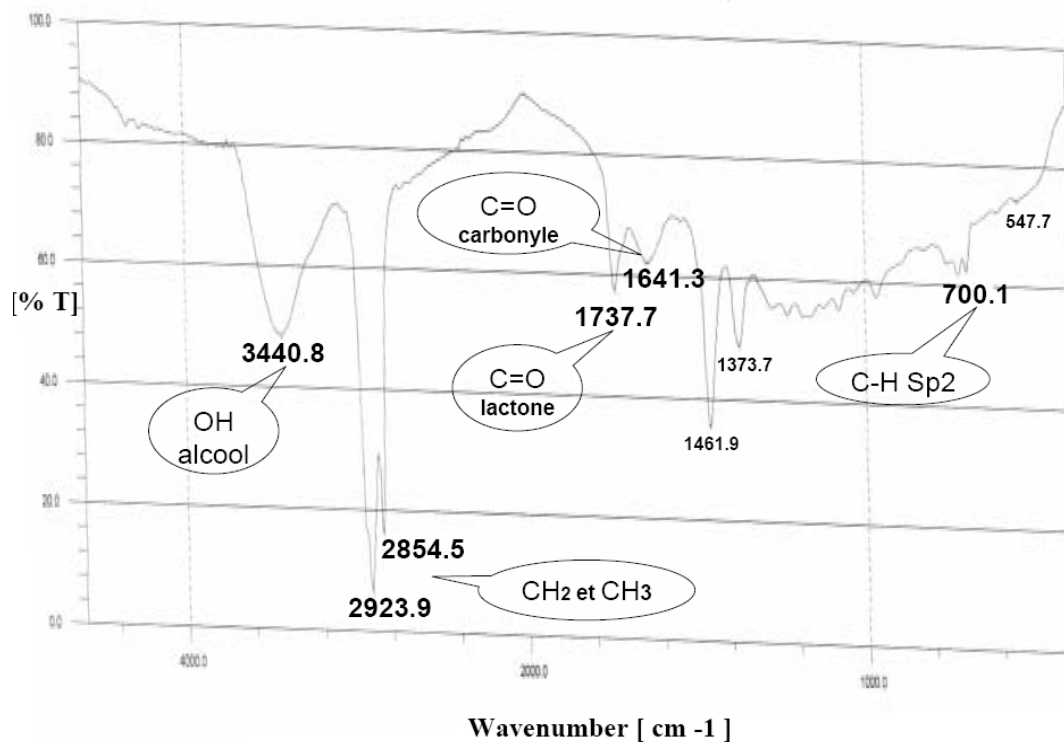


Figure III – 3 : Spectre IR du Composé A.

6 – 2 Le Composé B :

6₂₁ – Propriétés physico-chimiques :

- Substance amorphe blanche jaune.
- Soluble dans les solvants apolaires.
- Caractéristiques chromatographiques :

Les caractéristiques du composé B sont illustrées dans le tableau suivant (III – 11)

Tableau III – 11 : Caractéristiques chromatographiques du composé B.

<i>Avant la révélation</i>		<i>Après la révélation</i>	
<i>à la lumière du jour</i>	<i>sous UV</i>	<i>à la lumière du jour</i>	<i>sous UV à 366 nm</i>
n/d	à 254 nm	Avec les vapeurs d' NH ₃ :	
	à 366nm	—	Verte intense
n/d	verte	Aucune révélation Avec les autres réactifs	
R _f dans le système solvant : EP – EtOAc (9 : 1) : 0,36			

b₂₂ – Spectre UV:

Remarque générale : La lecture du spectre UV révèle trois λ max : 203, 265 et 303.

Aucune information, ne peut être déduite de la lecture du spectre UV quant à la nature du composé B.

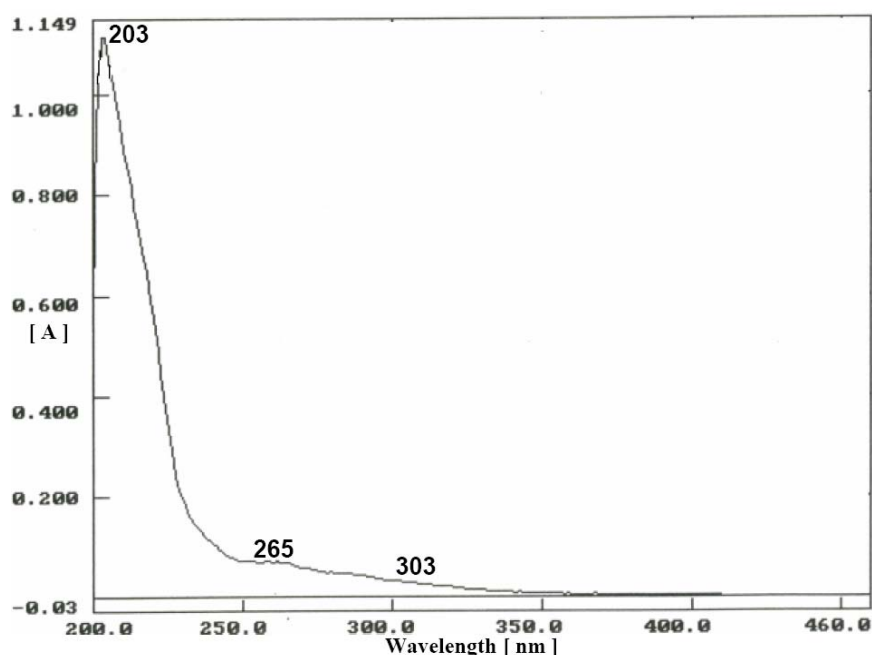


Figure III – 4 : Spectre UV dans le méthanol du Composé B.

b₂₃ – Spectre IR:

Le spectre IR du Composé **B** est montré dans la figure III – 5.

L'examen du spectre révèle quatre bandes d'absorption :

- Une bande à $3442,7 \text{ cm}^{-1}$ attribuée au groupement **OH** d'un alcool.
- Les deux bandes à $2923,9$ et $2854,5 \text{ cm}^{-1}$ correspondant aux **C-H S p³** : **CH₂** et **CH₃** cette présence est justifiée par les bande à $1461,9 \text{ cm}^{-1}$ confirmant la présence du **CH₂** de la chaîne aliphatique et à $1373,2 \text{ cm}^{-1}$ caractéristique du groupe **CH₃**.
- Un pic situé à 1744 cm^{-1} correspondant au groupement **C=O** d'un aldéhyde, la présence de cette fonction justifiée par la présence du pic à 2731 cm^{-1} qui caractérise **C-H** d'un aldéhyde.
- La zone $1200\text{-}600 \text{ cm}^{-1}$ comprend de nombreuses vibrations attribuables aux chaînes saturées et insaturées, le pic à $968,2 \text{ cm}^{-1}$ caractéristique d'un **C-H S p²**.

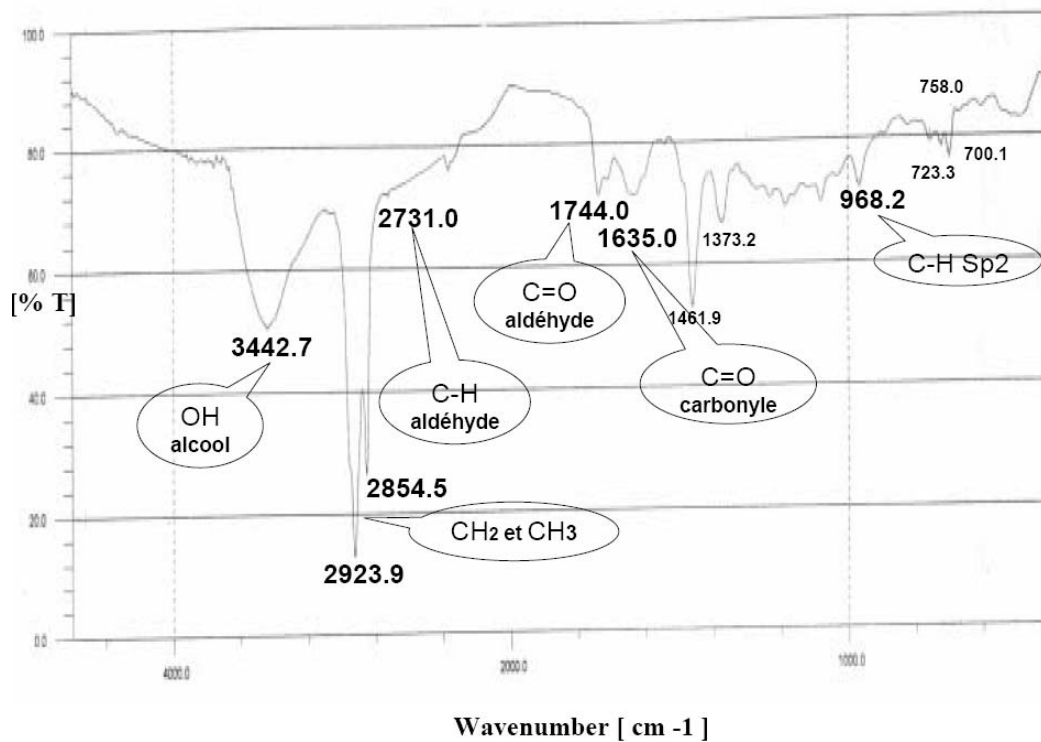


Figure III – 5 : Spectre IR du Composé B.

b – 3 Le Composé C :

b₃₁ – Propriétés physico-chimiques :

- Substance amorphe jaune.
- Soluble dans les solvants apolaires.
- Caractéristiques chromatographiques :

Les caractéristiques du composé C sont illustrées dans le tableau suivant (III – 12).

Tableau III – 12 : Caractéristiques chromatographiques du composé C.

<i>Avant la révélation</i>		<i>Après la révélation</i>	
<i>à la lumière du jour</i>	<i>sous UV</i>	<i>à la lumière du jour</i>	<i>sous UV à 366 nm</i>
n/d	n/d	<u>Avec le réactif à l'anisaldéhyde :</u>	
		bleue violette	orangée
		<u>Avec le réactif de Liebermann Burchard :</u>	
		violette	orangée
		<u>Avec 10 % de H₂SO₄ :</u>	
		—	orangée
		<u>Avec la Vanilline Sulfurique :</u>	
rose violette	—		
R _f dans le système solvant : EP – EtOAc (9 : 1) : 0,25			

Toutes ces données chromatographiques, nous oriente vers une structure triterpéniques pour les composés C.

6₃₂ – Spectre IR :

Le spectre IR du composé C est reporté sur la figure III – 6, on peut reconnaître les bandes d'absorption des principales fonctions :

- Une bande large à 3396,4 cm⁻¹ attribuée à l'élongation de la liaison **O—H** de fonction **alcool**.
- Elongation de la liaison **C_{sp3}—H** entre 2800-3000 cm⁻¹ à 2920 et 2852,5 cm⁻¹.
déformation de la liaison **C_{sp3}—H** d'un groupe **CH**, **CH₂** ou **CH₃** entre 1415-1470 cm⁻¹ à 1465,8 cm⁻¹.
déformation de la liaison **C_{sp3}—H** d'un groupe **CH₃** entre 1365-1385 : deux pics à 1365,5 cm⁻¹.
- Une bande située à 1710,7 cm⁻¹ caractéristique de élongation de la liaison **C=O** de la fonction **ester**, la présence de cette fonction justifiée par le pic à 1232,4 cm⁻¹ qui caractérise l'élongation de la liaison **C—O** d'un **ester**.
- Deux bondes situées entre 650-770 cm⁻¹ à 721,3 et 700,1 cm⁻¹ attribuée à l'élongation de la liaison **C_{sp2}—H**.

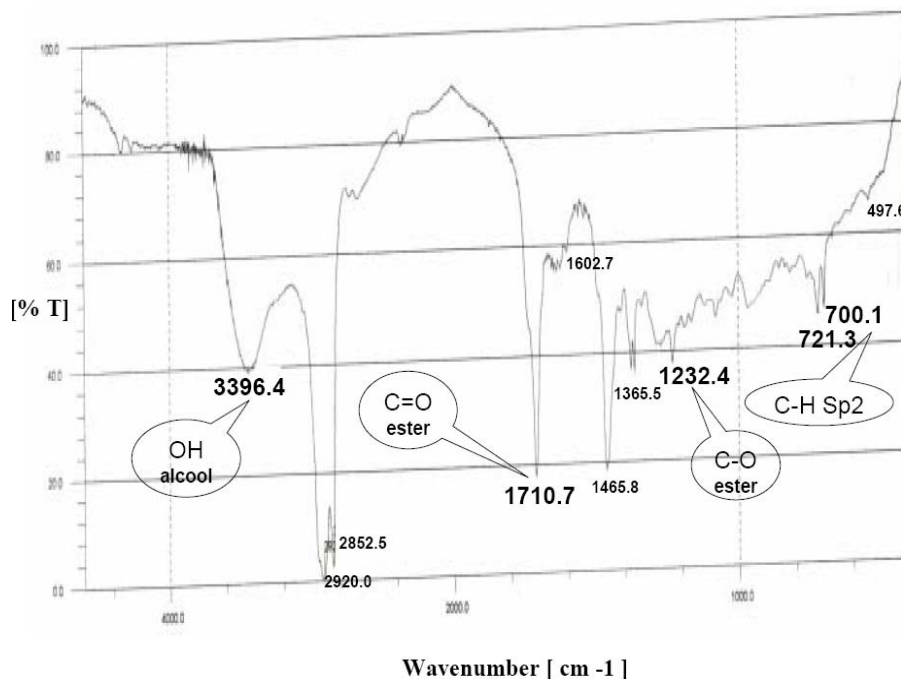


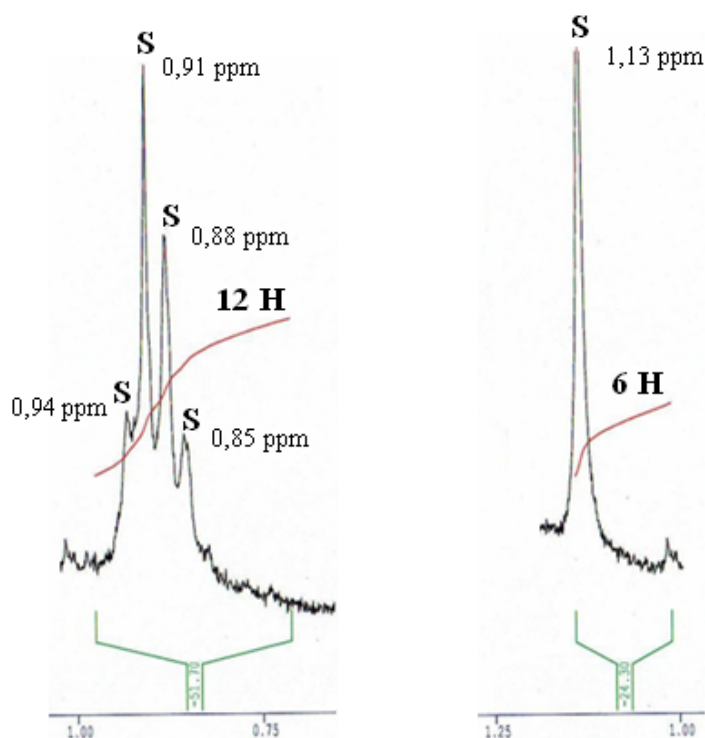
Figure III – 6 : Spectre IR du Composé C.

b₃₃ – Spectre RMN¹H :

L'analyse des triterpènes par RMN ¹H est largement décrite dans la littérature, mais ne permet pas une identification complète, celle-ci nécessite la combinaison de nombreuses techniques d'analyses (notamment 2D (COSY H-H, HSQC *J*-modulé, HMBC et NOESY). Le spectre RMN ¹H du composé C a permis d'affecter sans ambiguïté les principaux signaux caractéristiques, et ceci par comparaison avec ceux indiqués dans la littérature (Hans, F.J *et al.*, 1973; Dosseh, Ch *et al.*, 1980; Druet, D *et al.*, 1986; Adnyana, K.I *et al.*, 2000; Ahmed, S.M *et al.*, 2004; Asaph, A *et al.*, 2005; Yu, Q.L *et al.*, 2006; Andras, K *et al.*, 2008; Chiy, R.C *et al.*, 2008; Igoli, J.O *et al.*, 2008; Yuan, J.Q *et al.*, 2008).

Nos données chromatographiques (section *b₃₁*), nous ont orienté vers une structure triterpéniques. Celle-ci ne peut être que de deux natures : pentacyclique ou tétracyclique (Wagner, H *et al.*, 1984; Ahmed, S.M *et al.*, 2004). Le spectre RMN ¹H des triterpènes, de nature pentacyclique ou tétracyclique, présente dans la zone des champs forts, les signaux attribuables aux groupements méthyles. La nature des ces signaux donne des indications quant à la nature de la génine. Ainsi, signaux singulet des groupement méthyles et pas de doublet observables entre (δ 0,7-1,25 ppm) sont favorables à une structure de nature pentacyclique, type Oléanane (Druet, D *et al.*, 1986; Jiri, P., 2003; Tanaka, J.C.A *et al.*, 2003).

- La chose la plus remarquable dans un spectre des triterpènes c'est bien les signaux des groupements méthyle. Ceux obtenus pour le composé C sont détaillés dans la partie suivante et les valeurs des déplacements lues sont comparables à celles de la littérature (tableau III – 12).



Dans la région blindée, on note la présence de 4 singulets à 0,85 ppm, 0,88 ppm, 0,91 ppm et 0,94 ppm, s'intégrant en 12 protons. Ceux-ci correspondent à 4 groupes méthyles attachés respectivement aux carbones C-4, C-8 et C-10 (Adnyana, K.I *et al.*, 2000; Ahmed, S.M *et al.*, 2004), le carbone C-4 portant deux méthyles (Ahmed, S.M *et al.*, 2004). On remarque aussi la présence d'un singulet à 1,13 s'intégrant en 6 protons. Son déplacement chimique et le nombre de proton s'accordent avec ceux de deux méthyles portés par un même carbone, à savoir le C-20 (Kang, W.Y *et al.*, 2003).

Sur la base de ces assignations, les 6 méthyles se répartissent comme suit :

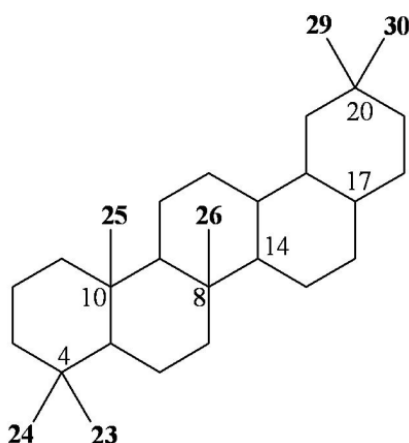


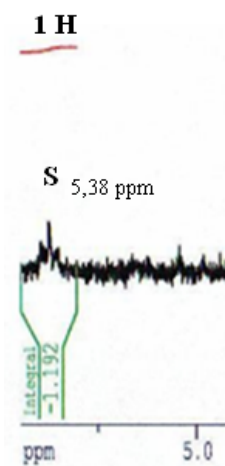
Tableau III – 13 : Attribution des signaux des groupements méthyles du composé C et comparaison à la littérature.

Groupements de méthyle	valeurs des déplacements chimiques		Affectation des méthyles
	Valeurs de la littérature (*)	Valeurs obtenus	
23	entre 0,85 et 1,05 ppm.	0,85 ppm	23
24	entre 0,74 et 1,05 ppm.	0,88 ppm	24
25	entre 0,83 et 0,97 ppm.	0,91 ppm	25
26	entre 0,82 et 1,03 ppm.	0,94 ppm	26
27	entre 1,02 et 1,22 ppm.	-	Absent
28	entre 0,84 et 1,10 ppm.	-	Absent
29	entre 0,85 et 1,22 ppm.	1,13 ppm	29
30	entre 0,85 et 1,22 ppm.	1,13 ppm	30

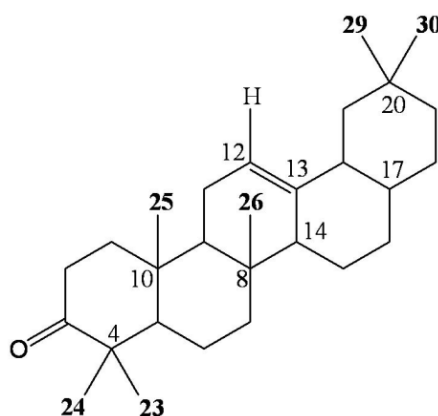
(*) : Hans, F.J *et al.*, 1973; Dosseh, Ch *et al.*, 1980; Druet, D *et al.*, 1986; Ahmed, S.M *et al.*, 2004; Asaph, A *et al.*, 2005; Yu, Q.L *et al.*, 2006; Andras, K *et al.*, 2008; Chiy, R.C *et al.*, 2008; Igoli, J.O *et al.*, 2008; Yuan, J.Q *et al.*, 2008.

- L'absence de signal dans la région (δ 0,8-1,37 ppm), relatif au proton du carbone C-3, peut être interpréter, en l'absence d'autres données (notamment ^{13}C -RMN), comme étant une indication sur l'état d'oxydation du C-3. Celui-ci pourrait être un carbonyle $\text{C}_3=\text{O}$ (Ahmed, S.M *et al.*, 2004; Yonghong, L *et al.*, 2006; Anwer, S.M *et al.*, 2008). L'examen de la région du spectre infrarouge, normalement affectés au groupement carbonyle ($1680\text{-}1740\text{cm}^{-1}$) (Adnyana, K.I *et al.*, 2000; Chen, J *et al.*, 2002; Anwer, S.M *et al.*, 2008), montre la présence d'une bande à 1710 cm^{-1} relative à un carbonyle d'une fonction ester (Hua, S *et al.*, 2006). Malheureusement, la forte intensité de cette bande ne permet pas de distinguer celle du groupement carbonyle de la fonction cétone, qui pratiquement se trouve dans la même région ($1680\text{-}1740\text{cm}^{-1}$) (Monaco, P *et al.*, 1973; Adnyana, K.I *et al.*, 2000). L'examen du spectre H-RMN du composé D, de même nature pentacyclique, permettra par la suite de se prononcer d'une façon plus éclairée sur la nature cétonique du carbone C-3 dans le composé C.

- La présence d'un signal sous forme massif centré à 5,38 ppm, s'intégrant pour 1 proton, est celui d'un proton oléfinique H-12 selon la littérature (Dosseh, Ch *et al.*, 1980; Adnyana, K.I *et al.*, 2000; Kuo, Y.H *et al.*, 2000). On note aussi la présence d'un pic sur le spectre IR, relatif à l'élongation d'une liaison C_{sp2}-H (Dosseh, Ch *et al.*, 1980; Druet, D *et al.*, 1986). A ce stade, on peut confirmer que le composé C appartient au groupe des Oléananes insaturés, désigné par la **série 12 – Oléanène**.

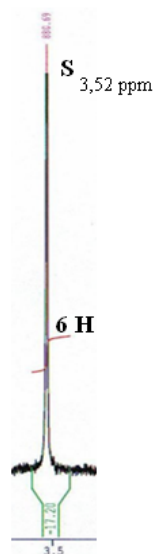


Sur la base de ces assignations, La structure est comme suit :



- L'examen du spectre RMN ¹H du composé C, notamment dans la région (δ 0,84 à 1,22 ppm), permet de conclure quant à l'absence de groupements méthyles en position C-14 et C-17 (à savoir les Me – 27 et Me – 28). Ces positions sont certainement occupées par des groupements fonctionnels (Suokas, E *et al.*, 1977; Druet, D *et al.*, 1986). Cette hypothèse est confortée par nos données IR. Celles-ci informent sur l'existence d'une fonction alcool à 3396,4 cm⁻¹ et ester à 1710 cm⁻¹ (section 6₃₂) dans le composé C (Monaco, P *et al.*, 1973).

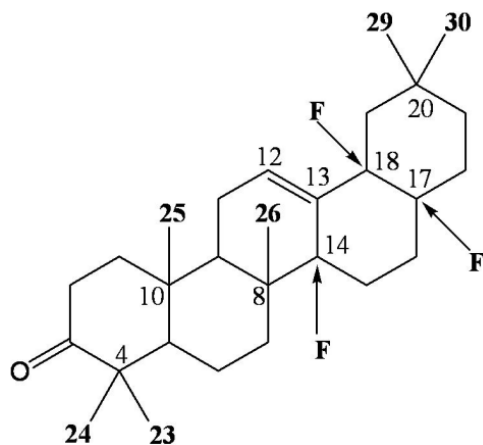
- Un signal est observé à 3,52 ppm sous forme d'un singulet avec une intégration de 6 protons. Ce signal correspond à deux méthyles portés par deux fonctions esters (COOMe) (Monaco, P *et al.*, 1973; Kuo, Y.H *et al.*, 2000).



- L'examen du reste du spectre permet de postuler sur la nature du carbone porteur de la fonction alcoolique. L'absence de tout signal dans la région δ 3 à 4 ppm (proton porté par un C—OH alcoolique), nous renseigne sur la nature quaternaire de ce carbone.

A ce stade, nous pouvons émettre les deux remarques suivantes :

1° Etant donné que l'analyse du composé C nous laisse avec la possibilité de 3 carbones quaternaires sur la structure, à savoir C-14, C-17 et C-18 ;



2° Etant donné que sur une base biosynthétique, le C-17 contient une fonction ester (Hua, S *et al.*, 2006).

En conclusion, en l'absence d'autres données spectrales, et en tenant compte de ces deux remarques, les structure C1 et C2 sont proposées comme structures partielles du composé C :

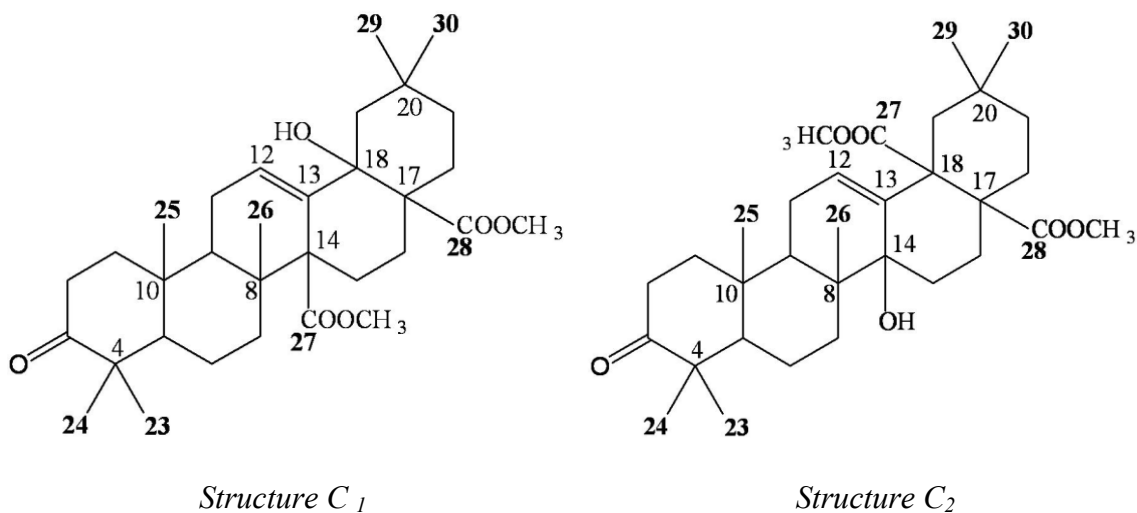


Figure III – 7 : Structures partielles proposés pour le composé C.

Ainsi, les noms systématiques du composé C₁ et C₂ sont :

Le composé C₁ : 18 α -hydroxy 3-oxo Oléan-12-ène 14, 17-dicarboxylate de méthyle.

Le composé C₂ : 14 α -hydroxy 3-oxo Oléan-12-ène 17, 18-dicarboxylate de méthyle.

Remarques :

- L'attribution des autres protons est très difficile, dans la mesure où notre spectre RMN ^1H porte des informations insuffisantes.
- Les signaux correspondent aux protons CH et CH₂ du squelette n'ont pas été attribués à cause de la complexité et la superposition des différents signaux dans la région entre 1,25 et 1,75 ppm. De même, les constantes de couplages ne sont pas observables dans cette région.

Le tableau suivant regroupe les déplacements chimiques et les constantes de couplage des protons du composé C.

Tableau III – 14 : Tableau récapitulatif des déplacements chimiques et constantes de couplage des protons du composé C enregistrés dans le CDCl₃ (250 MHz).

Positions	Déplacement chimique δ (ppm)	Constante de couplage J (Hz)	Multiplicité	Intégration
23	0,85	—	S	12
24	0,88	—	S	
25	0,91	—	S	
26	0,94	—	S	
29 et 30	1,13	—	S	6
n/d	2,05	3,01	d	2
n/d	2,20	—	S	1
n/d	2,31	3,56	d	1
n/d	2,38	1,97 7,445	d t	1
Me lié au C 28 et 27	3,52	—	S	6
12	5,38	—	S	1

6₃₄ – Spectre SM :

Le spectre de masse (figure III – 8), ne permet pas de confirmer le pic moléculaire de 528 (absence de spectre par ionisation chimique), mais on distingue nettement la présence de pics de fragmentation caractéristiques des triterpènes pentacycliques (Hans, F.J *et al.*, 1973; Dosseh, Ch *et al.*, 1980; Branco, A *et al.*, 2004; Viswanadh, G.S *et al.*, 2006) :

Les pics de fragmentation caractéristiques du clivage des cycle D / E et C / D du composé C, selon un mécanisme de “Rétro – Diels – Alder” sont à m/z : 338, 279, 242 et 201.

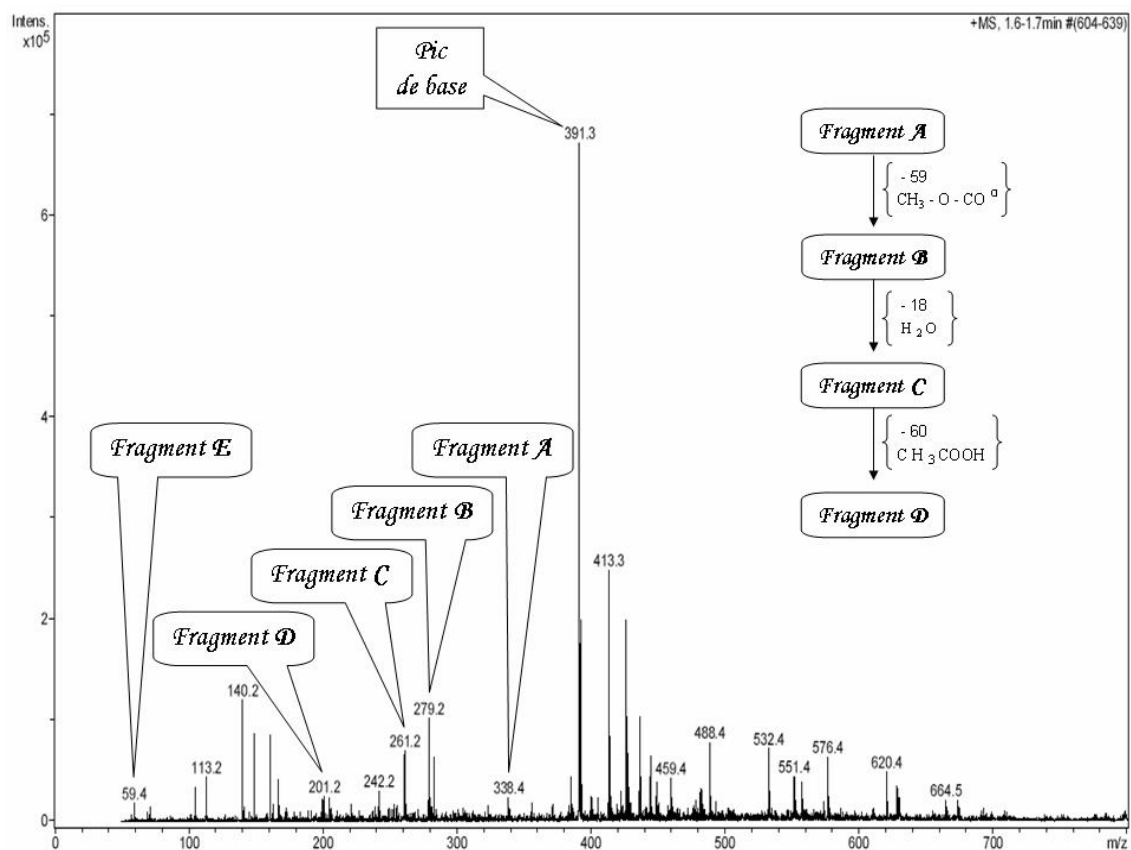


Figure III – 8 : Spectre SM du Composé C.

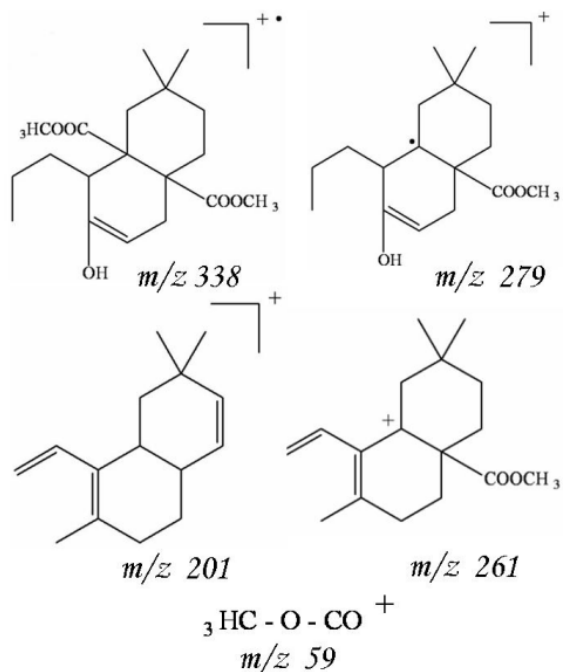


Schéma III – 3 : Les principaux ions du spectre de masse du composé C.

Les pics de fragmentation à m/z 338, 279 sont clairement favorables à la structure C₂, où le groupement hydroxyle se situe au niveau du C-14.

Sur la base de ces nouvelles données provenant de l'analyse par spectrométrie de masse, nous retiendrons la structure C₂: 14 α -hydroxy 3-oxo Oléan-12-ène 17, 18-dicarboxylate de méthyle, comme celle du composé C.

III – 2 – 3 Etude du Lot 6 :

L'analyse par CCM sur gel de silice, utilisant plusieurs solvants, a révélé une seule tache uniquement visible à la lumière du jour et sous UV à 366 nm Après révélation par les réactifs (section a₁).

a – Le Composé D :

a₁ – Propriétés physico-chimiques :

- Cristaux blancs (aiguilles).
- Soluble dans les solvants apolaires.
- Caractéristiques chromatographiques :

Tableau III – 15 : Caractéristiques chromatographiques du composé D.

<i>Avant la révélation</i>		<i>Après la révélation</i>	
<i>à la lumière du jour</i>	<i>sous UV</i>	<i>à la lumière du jour</i>	<i>sous UV à 366 nm</i>
n/d	n/d	<u>Avec le réactif à l'anisaldéhyde :</u>	
		bleue violette	orangée
		<u>Avec le réactif de Liebermann Burchard :</u>	
		violette	orangée
		<u>Avec 10 % de H₂SO₄ :</u>	
		—	orangée
		<u>Avec la Vanilline Sulfurique :</u>	
rose violette	—		
<u>R_f dans les systèmes solvants :</u> CH ₂ Cl ₂ – Acétone (9 : 1) : 0,75 CH ₂ Cl ₂ 100 % : 0,275 Cyclohexane – EtOAc (4 : 1) : 0,25			

Toutes ces données nous orientent vers un squelette triterpéniques pour le composé D.

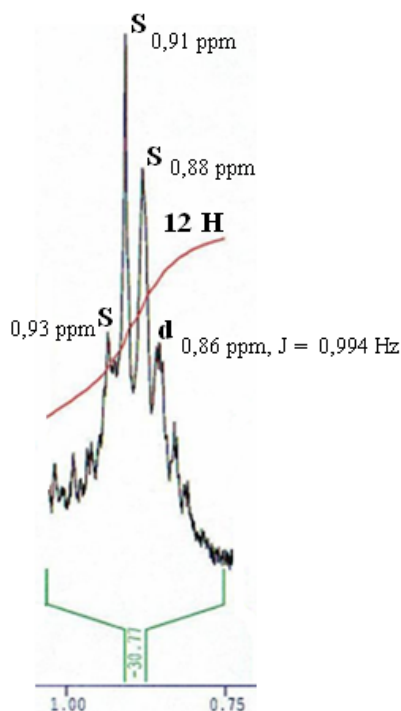
*a*₂ – Spectre RMN¹H:

L'analyse du spectre RMN ¹H (Voir Annexe 3) du composé D a permis d'assigner un certains nombres de signaux, et ceci par regroupement de données bibliographiques.

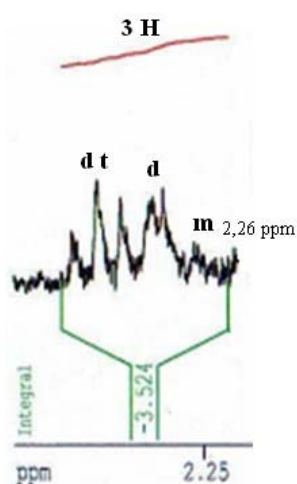
Nos données chromatographiques (section *a*₁), nous ont orienté vers une structure triterpénique (Wagner, H *et al.*, 1984; Ahmed, S.M *et al.*, 2004).

Le spectre RMN ¹H des triterpènes présente dans la zone des champs forts, des signaux attribuables aux groupements méthyles. La nature de ces signaux donne des indications quant à la nature de la génine (Chen, J *et al.*, 2002). Dans le cas du composé D, 5 signaux singulet et un seul doublet, attribuables à des groupements méthyles, sont observés entre (δ 0,7-1,25 ppm). Ces signaux sont favorables à une structure de nature pentacyclique, type Fridelène (Ahmed, S.M *et al.*, 2004). Le spectre H-NMR du composé D est comparable à celui déjà traité pour le composé C, avec qui on trouve les mêmes caractéristiques majeures que pour le composé D, avec toutefois quelques différences significatives. L'analyse préliminaire des données spectrales suggère un même squelette, en l'occurrence pentacyclique, avec un profil de substitution différent.

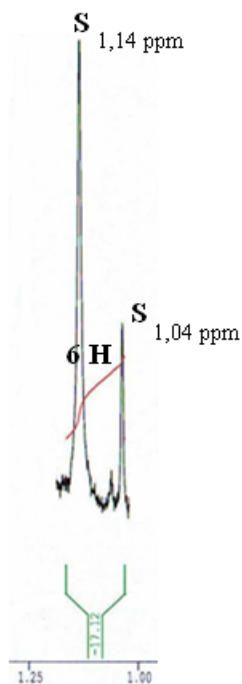
- Dans la région blindée, entre (δ 0,86 et 0,93 ppm), 4 signaux sont observés. Un doublet (1 groupe de méthyle) à 0,86 ppm et trois singulet (3 groupes méthyles) respectivement à 0,88, 0,91 et 0,93 ppm. L'ensemble s'intègre en 12 protons. Les 3 singulets observés correspondent respectivement aux méthyles 24, 25 et 26 (Ahmed, S.M *et al.*, 2004). Il est utile de remarquer que le signal singulet à 0,85 ppm, observé pour le composé C, est remplacé dans le cas du composé D par un signal sous forme d'un doublet ($\delta = 0,86$ ppm, $J = 0,994$ Hz). Ceci est une indication que ce signal est celui du méthyle 23, porté par un carbone tertiaire possédant un proton. Ce qui revient à dire que le composé D appartient à la série Fridelène, type de squelette pentacyclique caractérisée par la présence de deux méthyles, en C4 et C5 (Ahmed, S.M *et al.*, 2004; Chiy, R.C *et al.*, 2008; Igoli, J.O *et al.*, 2008).



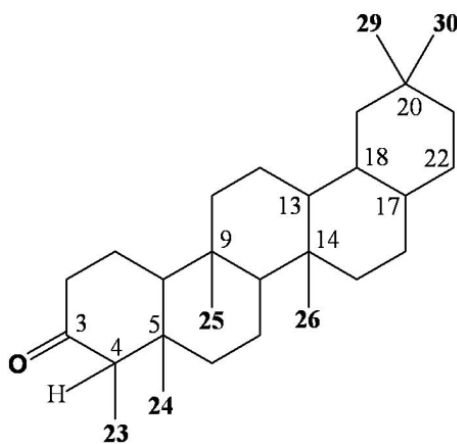
- Le signal multiplié à 2,26 ppm s'intégrant en un proton, correspond au proton H – 4 en configuration α , selon les données publiées (Ahmed, S.M *et al.*, 2004). La valeur du déplacement chimique et le profil du signal du proton H – 4, tendent à indiquer que ce proton est accolé à un carbone tertiaire, dont le carbone voisin est cétone (Ahmed, S.M *et al.*, 2004). Les déplacements chimiques de H – 4 ainsi que la multiplicité des signaux sont comparables avec ceux fournis par la littérature : 2,25 ppm (1 H, q, J = 7 Hz pour H– 4 α) (Ahmed, S.M *et al.*, 2004); 2,23 ppm (1H, m, pour H– 4 α) (Thanakijicharoenpath, W *et al.*, 2007; Igoli, J.O *et al.*, 2008).



- Deux singulets avec une intégration de 6 protons sont observés à 1,04 ppm et 1,14 ppm. Ces signaux correspondent aux méthyles 29 et 30 ((Kang, W.Y *et al.*, 2003).



Plus d'information sur les deux méthyles porté par C – 20 seront détaillés dans la partie suivante. La répartition des méthyles sur le squelette triterpénique pentacyclique s'effectue comme suit :



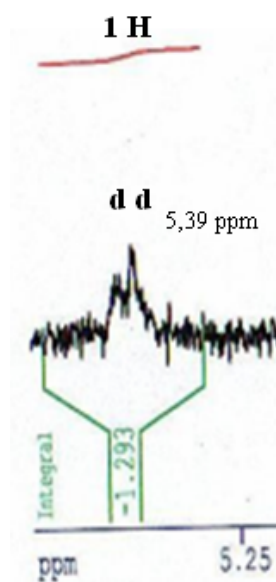
Les valeurs des déplacements lues sont comparables à celles de la littérature (voir le tableau suivant) :

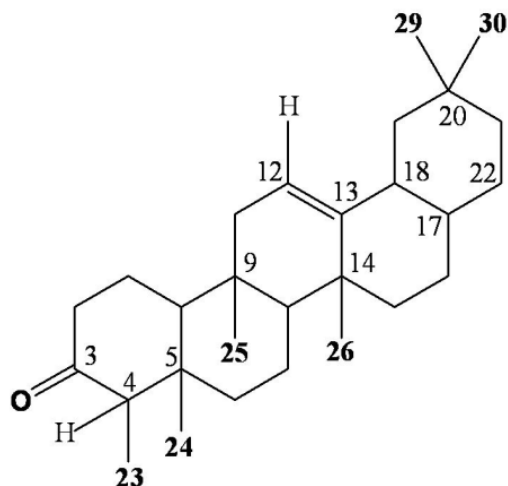
Tableau III – 16 : Attribution des signaux des groupements méthyles du composé D et comparaison à la littérature.

Groupements de méthyle	Valeurs des déplacements chimiques		Affectation des méthyles
	Valeurs de la littérature (*)	Valeurs obtenus	
23	entre 0,86 et 0,87 ppm.	0,86 ppm	23
24	entre 0,70 et 1,05 ppm.	0,88 ppm	24
25	entre 0,85 et 0,95 ppm.	0,91 ppm	25
26	entre 0,98 et 1,04 ppm.	0,93 ppm	26
27	entre 1,03 et 1,17 ppm.	-	Absent
28	entre 0,72 et 1,16 ppm.	-	Absent
29	entre 0,93 et 1,10 ppm.	1,04 ppm	29
30	entre 0,98 et 1,10 ppm.	1,14 ppm	30

(*) : Hans, F.J *et al.*, 1973; Dosseh, Ch *et al.*, 1980; Druet, D *et al.*, 1986; Ahmed, S.M *et al.*, 2004; Branco, A *et al.*, 2004; Asaph, A *et al.*, 2005; Yu, Q.L *et al.*, 2006; Andras, K *et al.*, 2008; Chiy.R.C *et al.*, 2008; Igoli.J.O *et al.*, 2008; Yuan.J.Q *et al.*, 2008.

- Le signal centré à 5,39 ppm, sous forme d'un double de doublet et s'intégrant pour 1 proton, est celui d'un proton oléfinique (Dosseh, Ch *et al.*, 1980; Adnyana, K.I *et al.*, 2000; Kuo, Y.H *et al.*, 2000). La présence de la double liaison en C₁₂ – C₁₃, permet d'émettre l'hypothèse que le composé D appartient au groupe des Fridelènes insaturés ou à la série 12 – Fridelène (Ahmed, S.M *et al.*, 2004; Thanakijicharoenpath, W *et al.*, 2007; Igoli, J.O *et al.*, 2008). D'un autre côté, cette hypothèse est renforcée par l'absence du signal correspondant au **Me 27**, qui est très significatif chez les Friedelènes saturés (Igoli, J.O *et al.*, 2008).





- L'examen du spectre RMN ^1H , notamment dans la région caractéristique des méthyles d'un squelette triterpénique, permet de conclure quant à l'absence des méthyles en position C 14 et C17 (Me 27 et Me 28). D'après Druet, ces positions sont souvent occupées par des groupements fonctionnels (Druet, D *et al.*, 1986).
- Le déblindage du signal à δ 1,14 ppm d'un des méthyles porté par le C-20 du composé D (Me-29 ou Me-30) corrobore l'hypothèse émise par certains auteurs de l'existence d'un centre électro-négatif en C – 22 (Kang, W.Y *et al.*, 2003; Taskin, M.K *et al.*, 2005). Selon ces auteurs, la présence d'une fonction en C – 22 aurait une influence sur les déplacements chimiques d'un des deux méthyles portés par le C-20. Ce phénomène est observé dans le cas du composé D (figure III – 9).

La structure du composé dans la figure suivante montre cette différence :

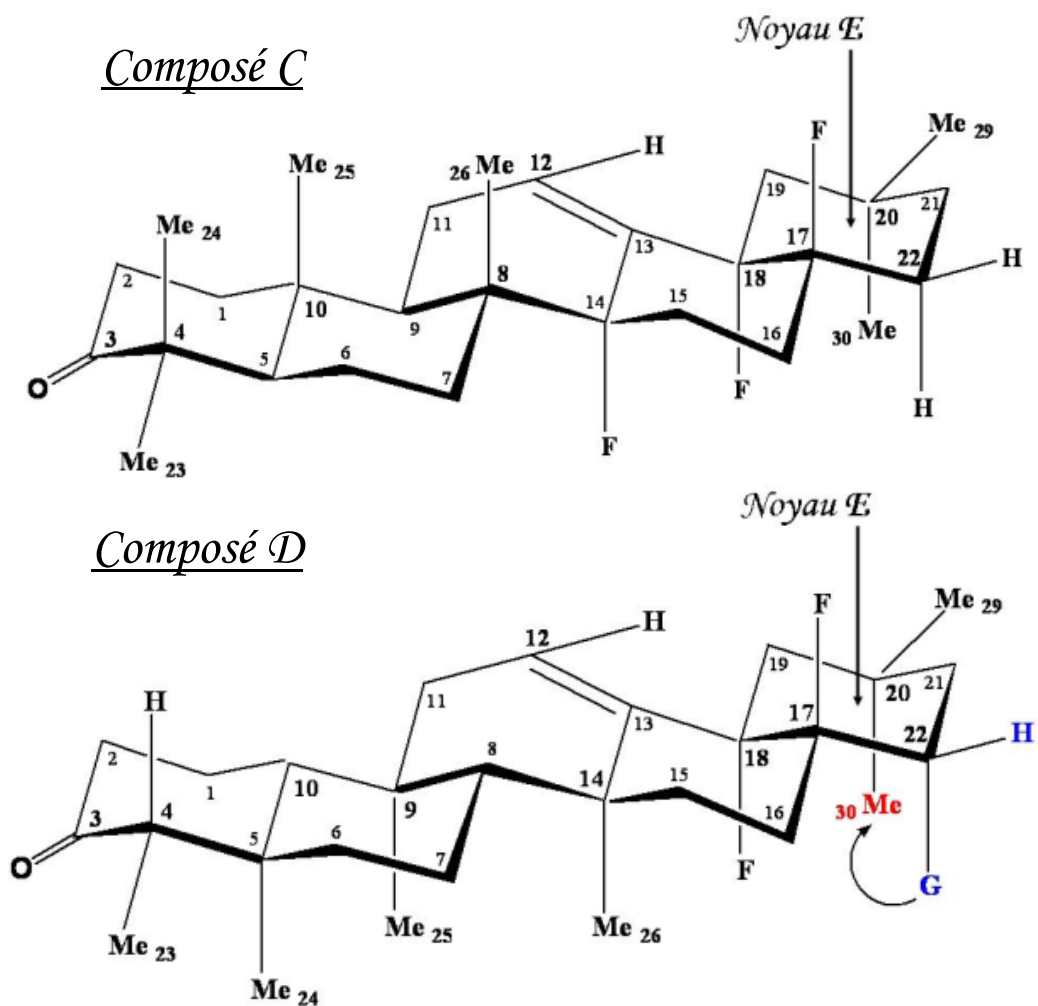
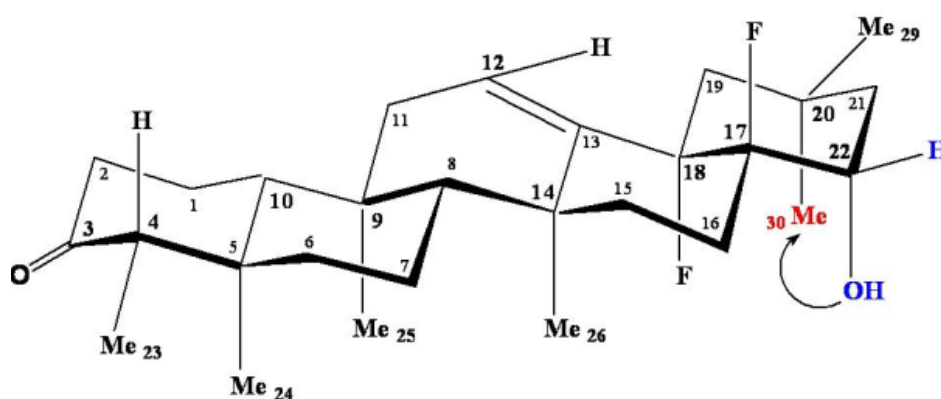
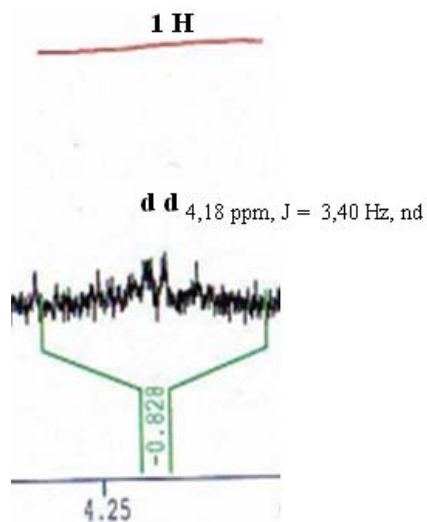
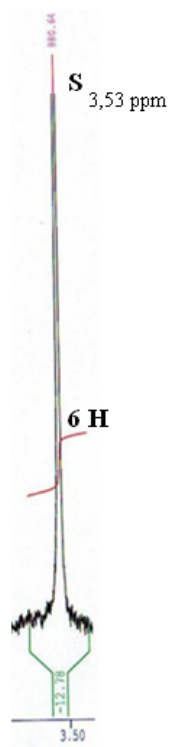


Figure III – 9 :

- L'apparition d'un signal multiplié à 4,18 ppm, s'intégrant pour 1 proton, est compatible selon la littérature à celui d'un proton attaché à un carbone porteur d'une fonction alcool (Kuo, Y.H *et al.*, 2000). En prenant en compte l'hypothèse émise précédemment sur l'existence d'un centre électro-négatif en C – 22, le carbone porteur de la fonction alcool ne peut être que le carbone C – 22. La présence de cette fonction en C – 22 justifie le déplacement observé (δ 1,14 ppm) d'un des méthyles du carbone C – 20 vers les champs faibles.



Le signal résonnant à 3,53 ppm sous forme d'un singulet, avec une intégration de 6 protons, est similaire à celui observé pour le composé C. Selon la littérature, ce signal est compatible à celui de méthyle d'une fonctions ester : $-\text{COOMe}$ (Kuo, Y.H *et al.*, 2000). L'intégration en 6 protons suggère deux méthyles de deux fonctions esters. Selon des critères biogéniques, ces deux fonctions esters ne peuvent occupés que les C - 17 et C - 18 du squelette Friedelène.



En conclusion, en l'absence d'autres données spectrales, et en tenant compte des données recueillies, nous proposons pour le composé D le structure suivante :

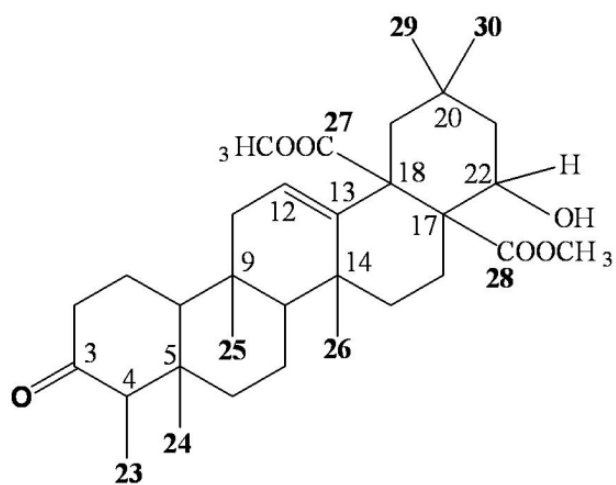


Figure III – 10 : Structure plane proposée du composé D.

Le composé D : 22 β -hydroxy 3-oxo Fridel-12-ène 17,18-dicarboxylate de méthyle

Tableau III – 17 : Tableau récapitulatif des déplacements chimiques et constantes de couplage des protons du composé D enregistrés dans le CDCl₃ (250 MHz).

Position	Déplacement chimique δ (ppm)	Constante de couplage J (Hz)	Multiplécité	Intégration
n/d	0,71	4,742	d	1
24	0,86	0,994	d	12
23	0,88	—	S	
25	0,91	—	S	
26	0,93	—	S	
29	1,04	—	S	
30	1,14	—	S	6
n/d	2,06	3,01	d	2
n/d	2,20	—	S	1
4	2,26	n/d	m	1
n/d	2,31	3,56	d	1
n/d	2,38	1,97 7,445	d t	1
Me lié au C 28 et 27	3,53	—	S	6
22	4,18	4,56 n/d	d d	1
12	5,39	3,40 n/d	d d	1

a₃ – Spectre SM :

Le spectre de masse (figure III – 11), ne permet pas de confirmer le pic moléculaire de 528 (absence de spectre par ionisation chimique), mais on distingue nettement la présence de pics de fragmentation issus du composé D (Hans, F.J *et al.*, 1973; Dosseh, Ch *et al.*, 1980; Branco, A *et al.*, 2004; Viswanadh, G.S *et al.*, 2006):

Les pics de fragmentation caractéristiques observés sont à m/z: 279, 241 et 205 issus par clivage des cycles D / E et C / D du composé D, selon un mécanisme de RDA (Dosseh, Ch *et al.*, 1980).

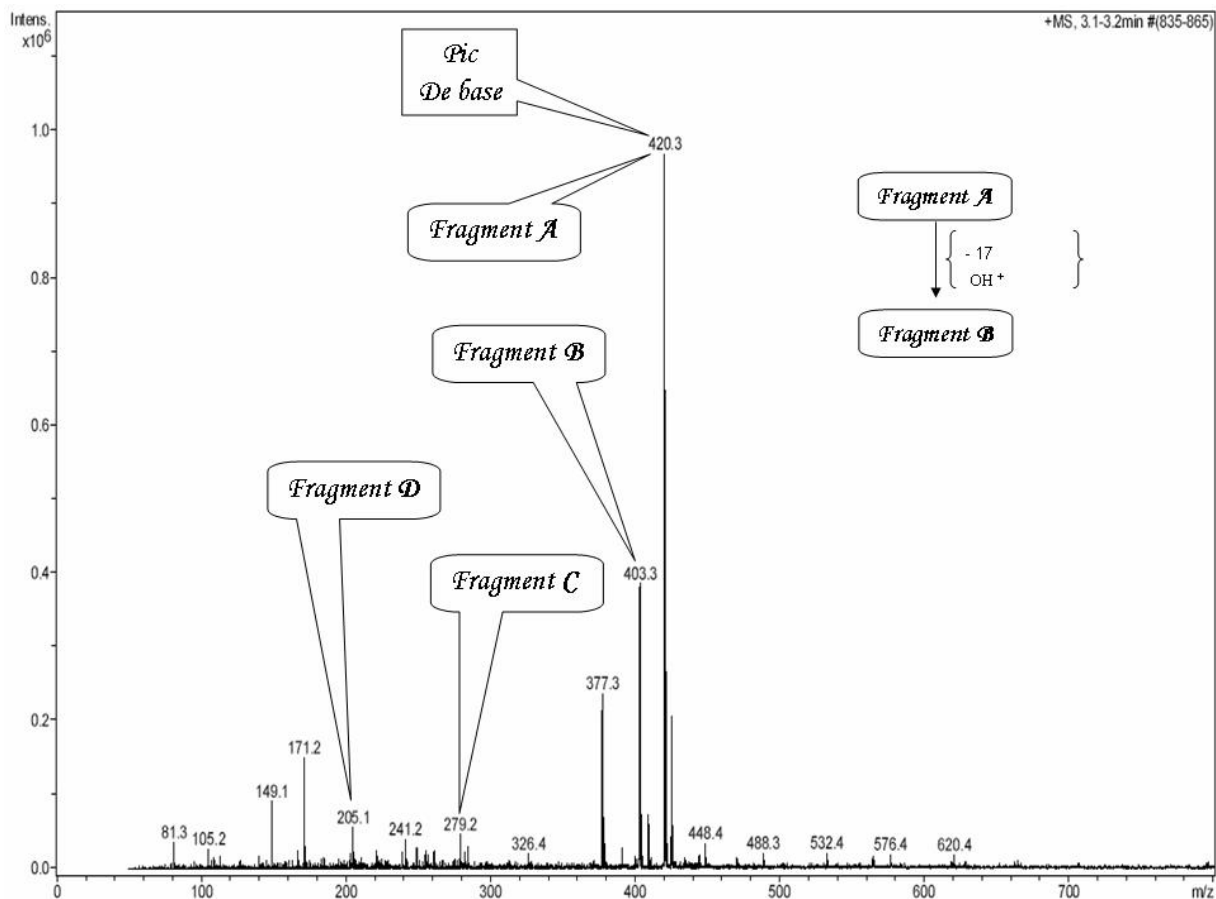


Figure III – 11 : Spectre SM du Composé D.

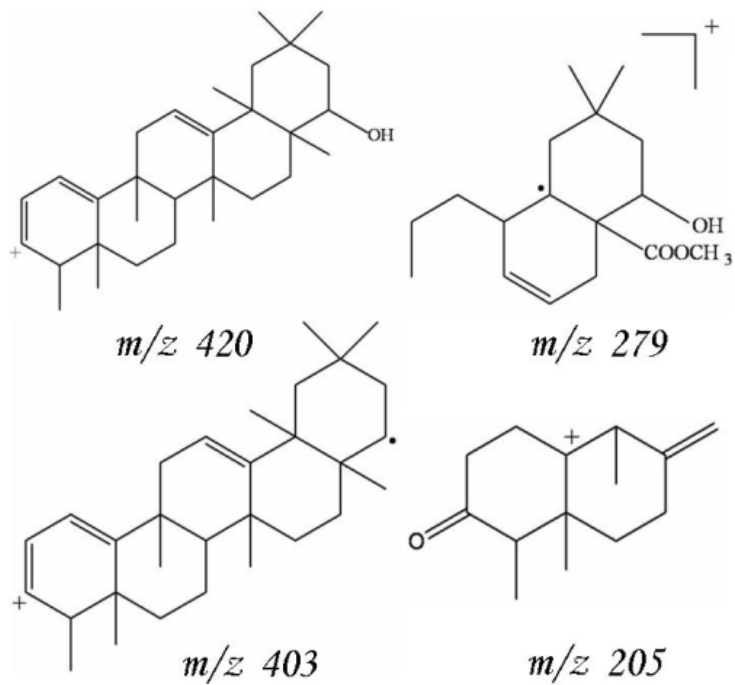


Schéma III – 4 : Les principaux ions de spectre de masse du composé D.

IV – Etude phytochimique de l'extrait EtOH :

Ce travail constitue un complément de l'investigation des extraits d'*A. pyrethrum*. Il concerne l'identification d'une coumarine, de lignanes et d'alkamides, composés présents dans l'extrait alcoolique.

IV – 1 Examen par chromatographie en couche mince de l'extrait EtOH :

L'analyse chromatographique sur gel de silice de l'extrait ETOH dans le système EtOAc / Me OH (6 : 4), a révélé la présence d'alkamides, de lignanes et d'une tache distincte, identifiée comme celle d'une coumarine.

Les données chromatographiques caractérisant les composants de l'extrait ETOH sont reportées dans le schéma III – 5 :

Système d'éluition :

EtOAc / Me OH
(6 : 4)



L'extrait ETOH	Avant la révélation			Après la révélation				
	¶	§	§	¶ AS	§ AN	§ BO	§ AP	§ VA
Substances apolaires	--	++		++	++	--	--	--
Alkamides	--	++	--	--	++	--	--	--
Coumarines	--	++	++	--	--	++	++	++
Lignanes	--	++	++	++	++	--	--	--
Substances polaires	++	++	++	++	--	--	--	--

Légende :

– Réactifs révélateurs : AN : anisaldéhyde, AP : Acétate de Plomb, AS : Acide sulfurique

BO : réactif de Borntrager et VA : Vapeurs d'NH₃

– Lecture de l'analyse : ++ présence -- absence

– L'état d'examen : ¶ : à la lumière de jour, § : à 245 nm et § : à 366 nm

Schéma III – 5 : Profil chromatographique schématisé de l'extrait ETOH.

Sur la base de cette caractérisation préliminaire, l'extrait a été soumis à un fractionnement chromatographique.

IV – 2 Fractionnement de l'extrait EtOH :

Le fractionnement chromatographique de l'extrait alcoolique (2 g) est réalisée sur colonne de gel de silice 60 (70-230 mesh.ASTM, Merck) avec un mélange de différentes proportions d'EtOAc et MeOH. A l'issue de la CC, une série de 74 fractions sont récupérées. Les fractions sont analysées par chromatographie sur couche mince et regroupées selon leur homogénéité en une dizaine (10) de lots (tableau III – 18).

Parmi les lots recueillis, deux sont jugés intéressants : ce sont les **lots 6 et 10** .

Tableau III – 18 : Fractions issus de la CC de l'extrait ETOH.

N° des Lots	Fractions	Poids mg	Observation en CCM	
			à 254 nm	à 366 nm
1	F ₁ →F ₂	—	rien	rien
2	F ₃ →F ₆	2	Tache sombre	Tache bleue
3	F ₇ →F ₁₁	1	Traînée jaune	Tache bleue
4	F ₁₂ →F ₁₃	1	Mélange complexe	Tache bleue
5	F ₁₄ →F ₂₃	1,8	Traînée jaune	—
6	F₂₄→F₃₀	12,92	Traînée jaune	Tache bleue verte
7	F ₃₁ →F ₃₆	6,28	Traînée complexe	Tache bleue verte
8	F ₃₇ →F ₄₀	7,50	Traînée complexe	Tache bleue verte + Tache bleue violette
9	F ₄₁ →F ₄₈	10	Traînée jaune	Tache bleue verte + Tache bleue violette
10	F₄₉→F₇₄	115,9	Traînée jaune	Tache bleue verte + Tache bleue violette

Les lots 6 et 10 résultants du regroupement des fractions F₂₄→F₃₀ et F₄₉→F₇₄ respectivement, ont été purifiés à leur tour par CCM, selon la procédure indiquée en partie expérimentale, pour fournir les composés E, F, G et H.

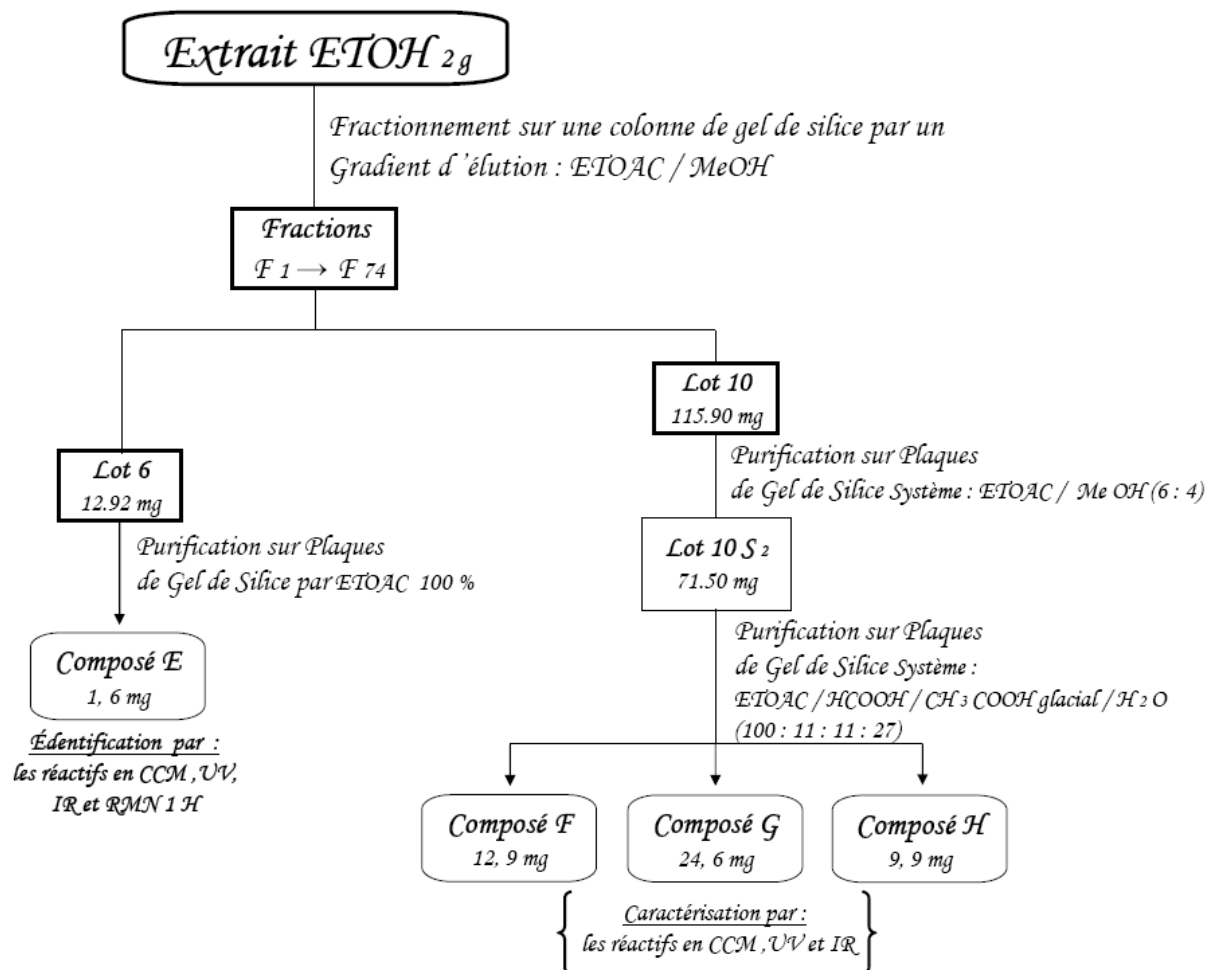


Schéma III – 6 : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait EtOH.

IV – 2 – 1 Etude du Lot 6 :

La tache majoritaire de couleur bleu vert présente dans le lot 6 a été purifiée par CCM préparative pour fournir un composé, de masse 1,6 mg et dénoté E.

Note. Le spectre complet RMN ¹H de composé E est présenté en annexes III.

Caractéristiques du Composé E :

c₁ – Propriétés physico-chimiques :

- Résine jaune foncé.
- Soluble dans CHCl₃.
- Caractéristiques chromatographiques :

Les caractéristiques du composé E sont regroupées dans le tableau III-19.

Tableau III – 19 : Caractéristiques chromatographiques du composé E.

<i>Avant la révélation</i>		<i>Après la révélation</i>		
<i>à la lumière du jour</i>	<i>sous UV</i>		<i>à la lumière du jour</i>	<i>sous UV à 366 nm</i>
n/d	à 254 nm	à 366nm	<u>Avec d'acétate de plomb à 5 %, le réactif de Borntrager et les vapeurs d' NH₃ :</u>	
	Bleue fluorescente	Bleue fluorescente	—	Bleue intense
	Aucune révélation Avec le réactif à l'anisaldéhyde, Libermann et VS			
R _f dans le système solvant : Toluène – éther de Pétrôle – acide acétique (1 : 1 : 1) : 0,19				

Toutes ces données chromatographiques nous orientons vers une structure d'une Coumarine.

c₂ – Spectre UV:

Le spectre UV (figure III – 12), présente des valeurs mesurées, dont celles de 263 et 307 nm, caractéristiques d'un cycle benzène et d'une pyrone respectivement (Widodo, G.P *et al.*, 2008).

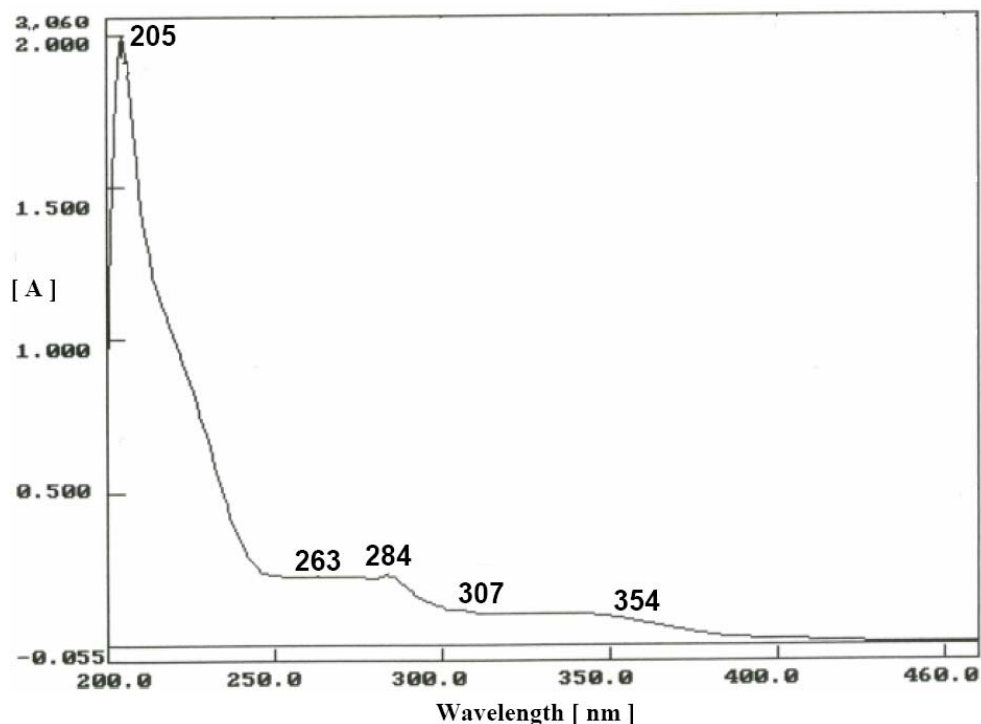


Figure III – 12 : Spectre UV dans le méthanol du Composé E.

c₃ – Spectre IR :

Le spectre IR du composé **D** est reporté sur la figure III –13, les signaux majoritaires sont interprétés comme suit :

- Une bande large à $3442,7\text{ cm}^{-1}$ attribuée à l'élongation de la liaison **O–H** de fonction **alcool** ;
- Deux pics à $2923,9$ et $2854,5\text{ cm}^{-1}$, correspondent respectivement à une élongation de la liaison **C_{sp³}–H** ;
- Une déformation de la liaison **C_{sp³}–H** d'un groupe **CH, CH₂** ou **CH₃** à 1460 cm^{-1} ;
- Une déformation de la liaison **C_{sp³}–H** d'un groupe **CH₃** exprimée en deux pics fins observables à $1384,8\text{ cm}^{-1}$;
- Une bande située à 1744 cm^{-1} caractéristique de élongation de la liaison **C=O** de **lactone** ;
- Une bande d'absorption à $1643,2\text{ cm}^{-1}$ attribuée à l'élongation de la liaison de groupement **carbonyle** ;
- Un pic à 1514 cm^{-1} caractérise de la liaison **C=C** d'un cycle aromatique.

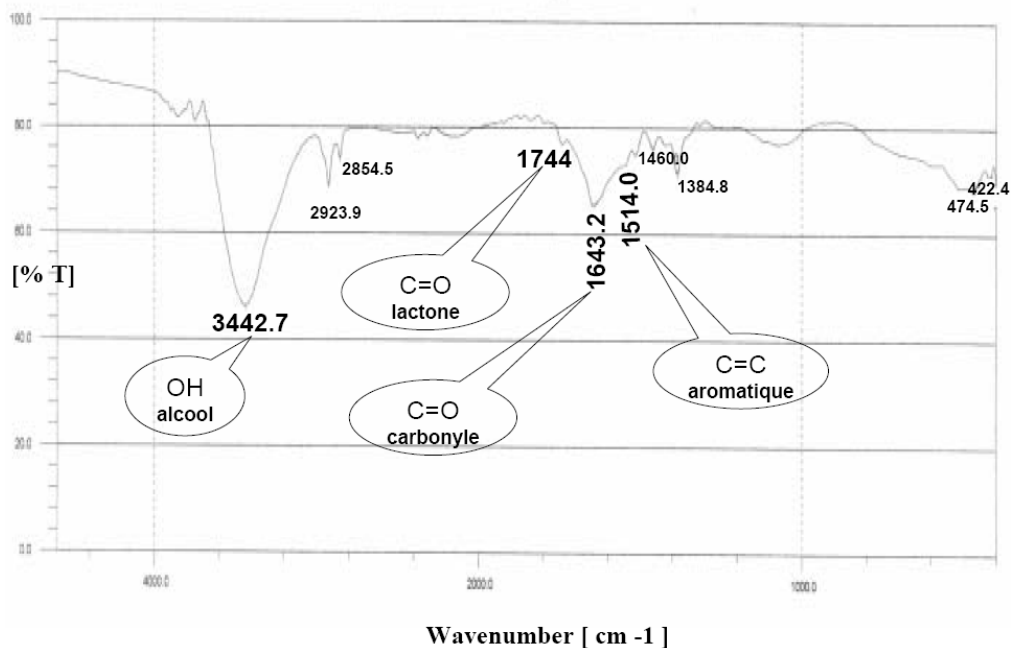
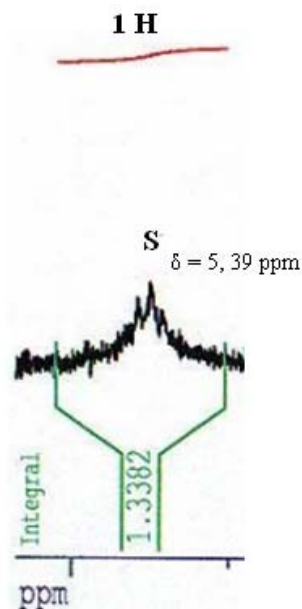


Figure III – 13 : Spectre IR du Composé E.

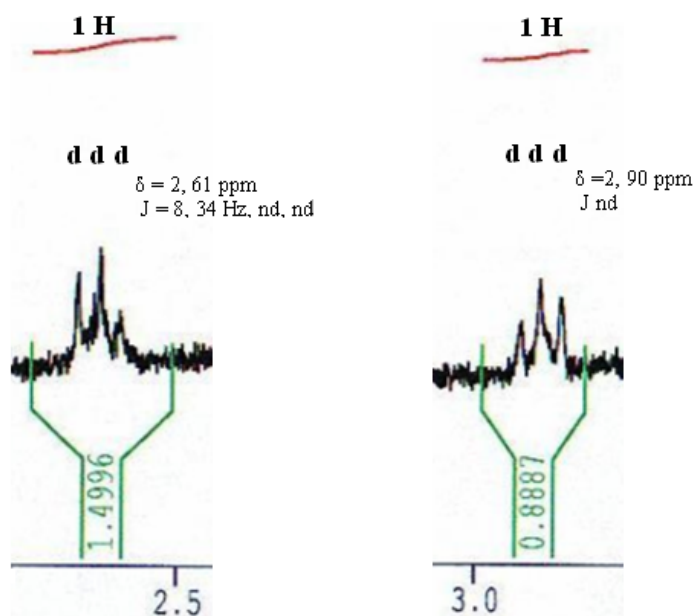
c₄ – Spectre RMN¹H:

Les données chromatographiques recueillies du composé E renseignent sur sa nature coumarinique (section *c₁*). (Mead, J.A.R *et al.*, 1958; Sariaslani, S.F *et al.*, 1983; Wagner, H *et al.*, 1984). Le spectre IR est caractérisé notamment par la présence de 2 bandes relatives à des groupements (C=O), observables à 1744 cm⁻¹ et 1643 cm⁻¹, respectivement celles d'une lactone et d'une phényl cétone d'une pyranocoumarine (Cruz, F.G *et al.*, 2001; Wu, Y.C.J *et al.*, 2003; Prachyawarakorn, V *et al.*, 2006). Ces données convergent avec les données du spectre UV vers un noyau benzopyrone (Abu, E.R *et al.*, 1985). L'absence de signaux caractéristiques d'une coumarine simple (Widodo.G.P *et al.*, 2008), et de ceux d'une furanocoumarine (Steck, W *et al.*, 1969; Shults, E.E *et al.*, 2003; Mulier, M *et al.*, 2004) sont notées dans le spectre ¹H RMN. Cependant les signaux suivants suggèrent la présence d'un noyau pyrone d'une coumarine (Cruz, F.G *et al.*, 2001; Sarker, S.D *et al.*, 2005; Prachyawarakorn, V *et al.*, 2006) :

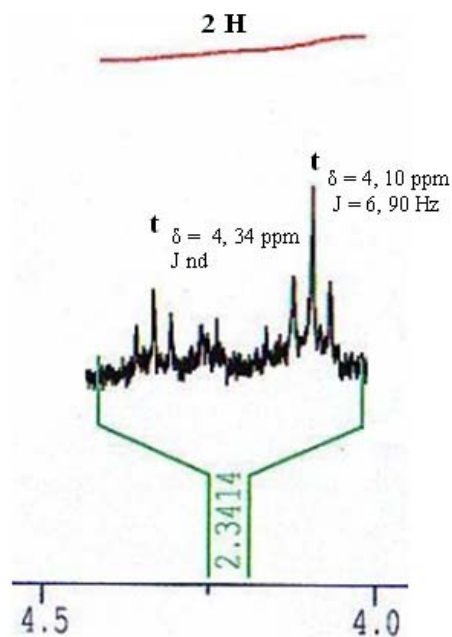
- Le signal résonnant à 5,39 ppm, sous forme d'un singulet large avec une intégration de 1 proton, est compatible à celui H – 3 d'une coumarine.



- Deux signaux résonnant à 2,61 ppm (1 H, ddd, $J = 8,34$ Hz) et 2,90 ppm (1 H, ddd J n/d), présentent des valeurs comparables avec celles fournies par les deux protons portés par C – 4 (Prachyawarakorn, V *et al.*, 2006).



- Deux signaux résonnant à 4,10 ppm (1 H, t, $J = 4,34$ Hz) et 4,34 ppm (1 H, t, J n/d) sont affectés aux deux protons portés par C – 5 (Prachyawarakorn, V *et al.*, 2006).



A ce stade, les données recueillies et comparées à celles de la littérature (Cruz, F.G *et al.*, 2001; Barnard, D.L *et al.*, 2002; Catalan, C.A.N *et al.*, 2003; Wu, Y.C.J *et al.*, 2003; Sarker, S.D *et al.* , 2005; Prachyawarakorn, V *et al.*, 2006), suggèrent que le composé E est une pyranocoumarine avec des radicaux au niveau des carbones 7 et 9 :

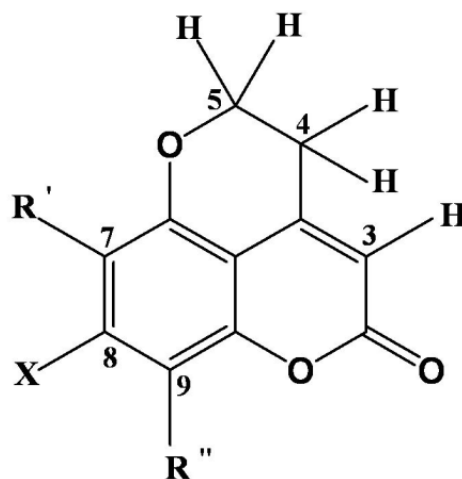
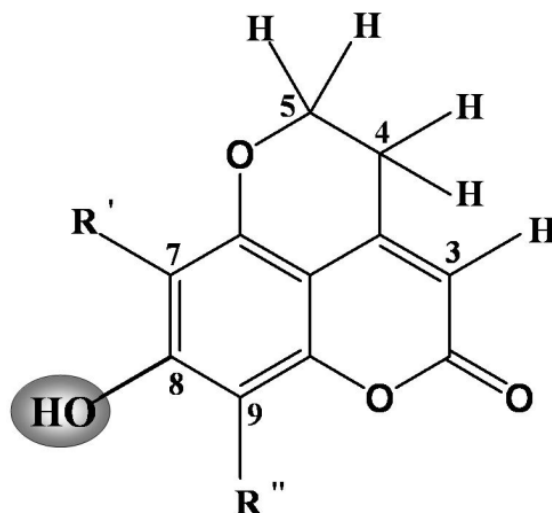
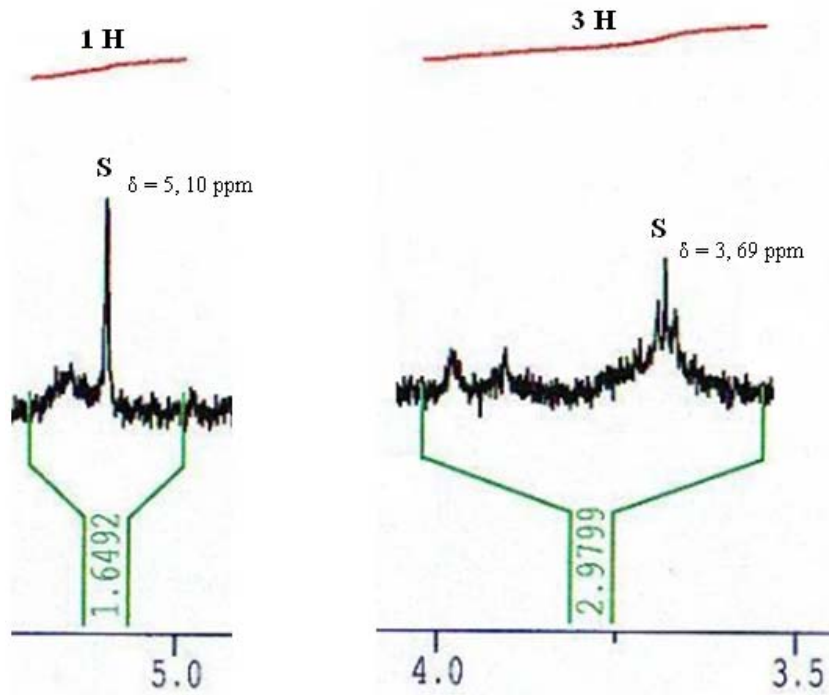


Figure III – 14 : Structure partielle du composé E.

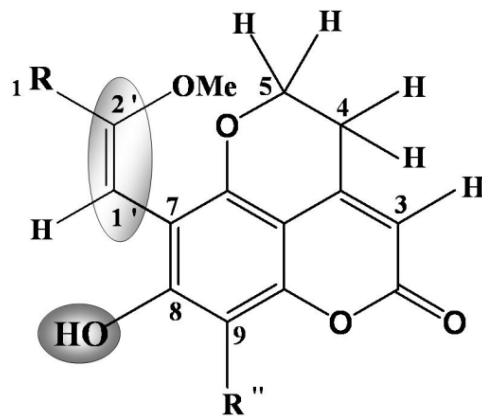
- Le spectre IR montre bien la présence d'un hydroxyle phénolique par une bande large à $3442,7\text{ cm}^{-1}$ (section c_3). Pour des raisons strictement biogénétiques, la position 8 ne peut être occupée que par un hydroxyle (Barnard, D.L *et al.*, 2002; Bourgaud, F *et al.*, 2006). Malheureusement sa présence effective sur le spectre RMN, vers $14,57\text{ ppm}$ selon la littérature (Prachyawarakorn, V *et al.*, 2006) n'a pu être vu dans notre spectre (limité à 7 ppm).



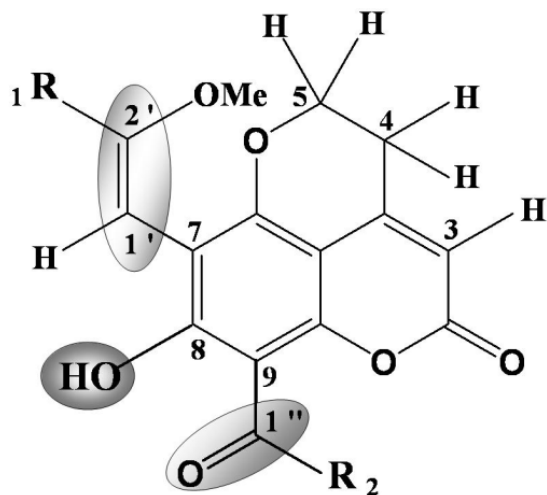
- Deux signaux singulets distincts, l'un à $5,10\text{ ppm}$ (s'intégrant pour 1 H) et l'autre à $3,69\text{ ppm}$ (s'intégrant pour 3H), correspondent respectivement à un proton oléfinique et à un groupement méthoxylé attaché à une double liaison (Silverstein, R.M *et al.*, 1967; Maire, J.C *et al.*, 1969). Selon les règles de Tobey et col. (Silverstein, R.M *et al.*, 1967), la valeur théorique correspondant au déplacement chimique du proton de l'oléfine est de 5.06 ppm . Cette valeur est comparable à celle observée à $5,10\text{ ppm}$ pour le composé E, et appuie l'hypothèse que le groupement méthoxy et l'hydrogène H sont portés par la double liaison, et que leur position est en configuration géométrique E. D'un autre côté, sur des considérations biogénétiques, la double liaison ne peut être située que sur le carbone 7, portant le radical R1 (Barnard, D.L *et al.*, 2002; Bourgaud, F *et al.*, 2006). La valeur théorique recueillie du déplacement du proton oléfinique, est en faveur d'un groupement alkyle en position Z. Cependant nos données ne permettent pas de définir la composition structurale du groupement alkyle, puisque la région spectrale du ^1H RMN, relative aux signaux alkyles est couverte.



Ces données nous ont permis de proposer pour R' la structure suivante :

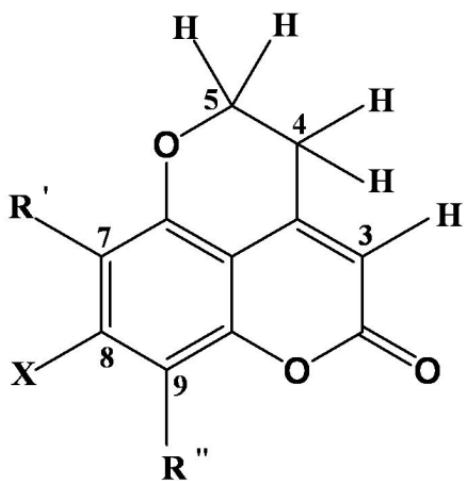


- En ce qui concerne la nature du groupement R'', seule la présence d'un groupement carbonyle (C=O), directement attaché au cycle aromatique en C – 9, est établie.



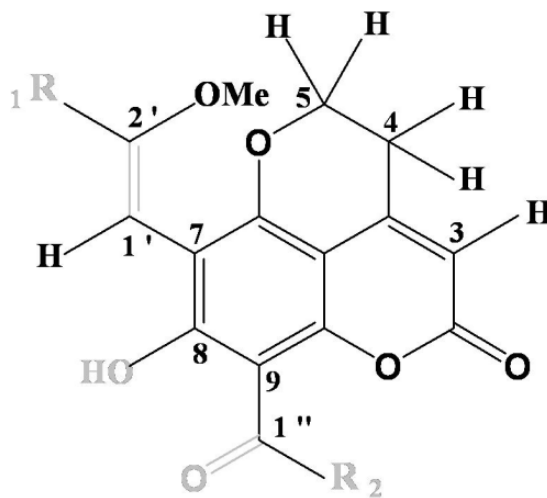
En conclusion, les structures partielles I et II suivantes sont proposées pour le composé E :

Composé E



Structure I :

Structure partielle du composé E établie strictement sur la base des données recueillies



Structure II :

Structure partielle du composé E établie strictement sur la base des données recueillies et des considérations biogénétiques

Les données spectrales du composé E sont détaillées dans le tableau III – 20, suivant :

Tableau III – 20 : Tableau récapitulatif des déplacements chimiques et constantes de couplage des protons du composé E enregistrés dans le CDCl₃ (250 MHz).

<i>Position</i>	<i>Déplacement chimique δ (ppm)</i>	<i>Constante de couplage J (Hz)</i>	<i>Multiplicité</i>	<i>Intégration</i>
n/d	2,22	8,17	d	1
n/d	2,28	—	S	1
4	2,61	8,34 n/d n/d	d d d	1
	2,90	nd n/d n/d	d d d	1
2'	3,69	—	S	3
5	4,10	6,90	t	1
	4,34	n/d	t	1
1'	5,10	—	S	1
3	5,39	—	S large	1

IV – 2 – 2 Etude du Lot 10 :

Le lot 10 correspondant à 115,9 mg a été soumis à une CCM préparative dans le système de solvant EtOAc – MeOH (6 : 4) pour fournir 2 sous fractions, dénotée lot 10 S₁ et lot 10S₂.

L'examen du lot 10S₁ montre les mêmes caractéristiques que le lot 6 précédemment étudié. Les résultats de l'examen du lot 10S₂ sont détaillés en ce qui suit :

6 – Examen du Lot 10 S₂ :

Le lot 10 S₂ (71,50 mg) a été soumis à des CCM sur plaque de gel de silice, en mode préparative, avec comme éluant le mélange : acétate d'éthyle – acide formique – acide acétique glacial – eau (100 : 11 : 11 : 27). Trois produits ont été récupérés, dénotés ci-après : composé F (12,9 mg), composé G (24,6 mg) et composé H (9,9 mg).

Les caractéristiques physico-chimiques, chromatographiques et spectrales pour les composés F, G et H sont exprimées en ce qui suit :

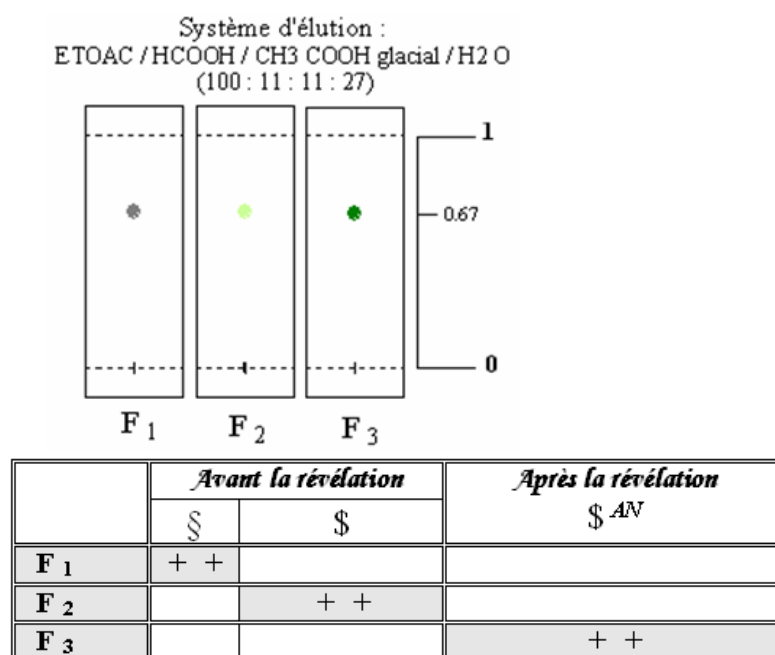
d – Caractéristiques des produits isolés du lot 10S2:

d – 1 Le Composé F :

d₁₁ – Propriétés physico-chimiques :

- Solide amorphe jaune.
- Insoluble dans les solvants et les mélanges des solvants apolaires, peu soluble dans le méthanol et l'eau.
- Caractéristiques chromatographiques:

Les caractéristiques chromatographiques du composé F sont les suivantes :



Légende :

- Réactifs révélateurs : AN : anisaldéhyde
- Lecture de l'analyse : + + présence
- L'état d'examen : § : à 245 nm et \$: à 366 nm

Schéma III – 7 : Profil chromatographique schématisé du composé F.

d₁₂ – Spectre UV:

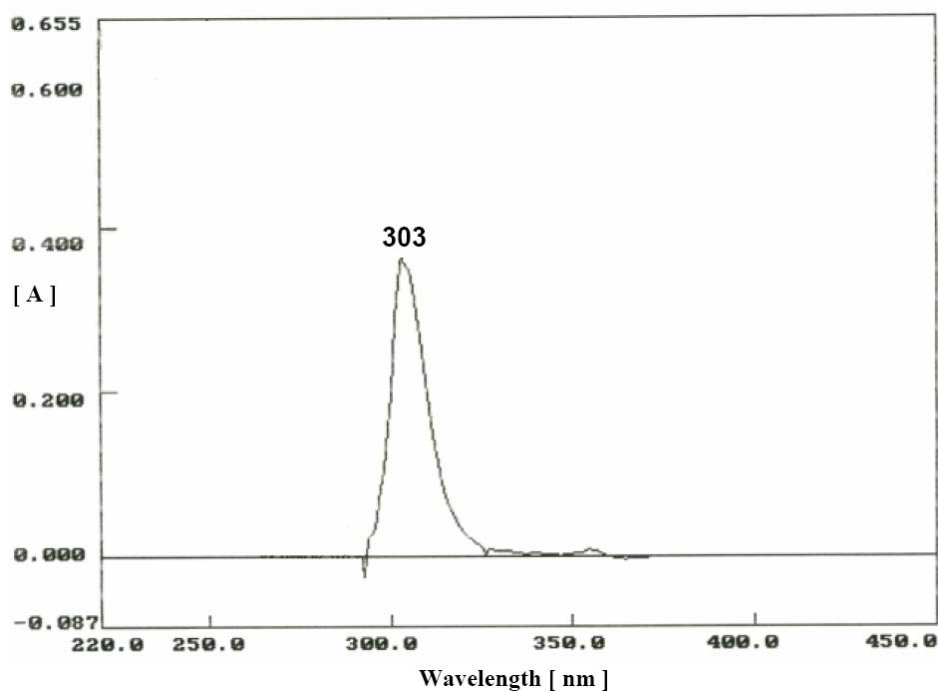


Figure III – 15 : spectre UV dans le méthanol du Composé F.

d₁₃ – Spectre IR:

Sur le spectre IR du composé E (figure III – 16), on peut reconnaître les bandes d'absorption des principales fonctions :

- Une bande large à 3381 cm^{-1} est attribuée au groupement **OH** d'un alcool.
- Le pic situé à 3001 cm^{-1} est celui de la liaison **C-H S p²**, accompagné de bandes caractéristiques à $1028, 954,7, 900,7$ et $705,9\text{ cm}^{-1}$.
- Une bande à $1652,9\text{ cm}^{-1}$ correspond aux vibrations des liaisons carbonyle.
- Le pic situé à $2914,2\text{ cm}^{-1}$ est attribuable aux vibrations **C-H** aliphatiques des groupes **CH₂** et **CH₃**. Les bandes observées d'une part à 1406 et $1436,9\text{ cm}^{-1}$, et d'autre part à $1315,4$ et $1338,5\text{ cm}^{-1}$, confirment respectivement la présence du groupe **CH₂** et du groupe **CH₃**.

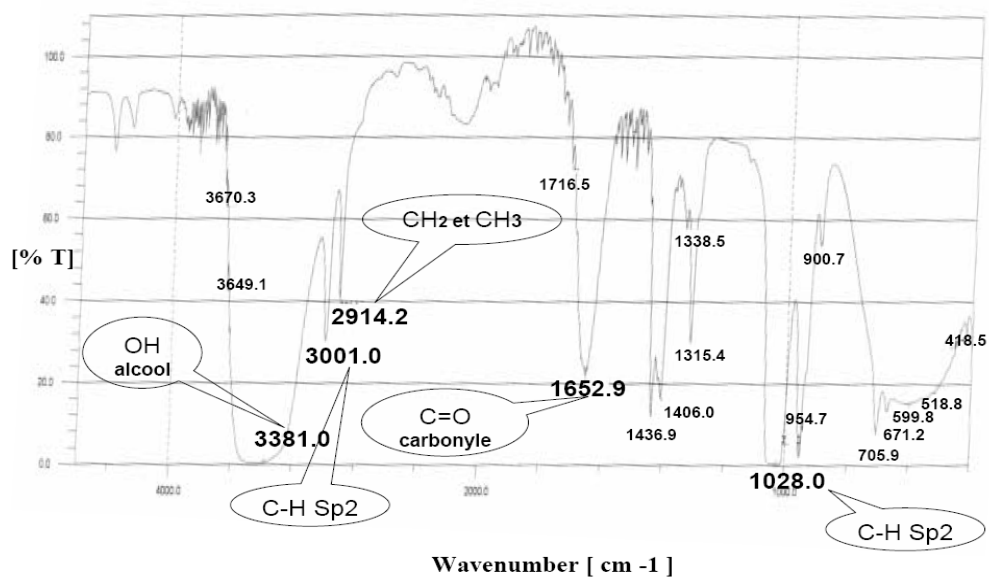


Figure III – 16 : Spectre IR du Composé F.

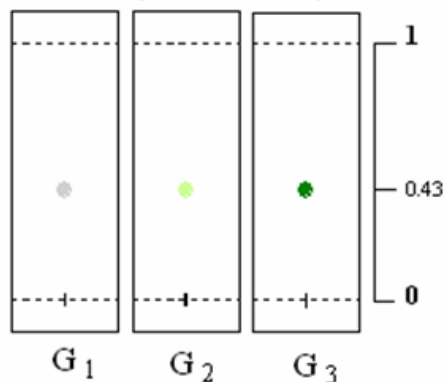
d – 2 Le Composé G :

d₂₁ – Propriétés physico-chimiques :

- Solide amorphe blanc.
- Insoluble dans les solvants et les mélanges des solvants apolaires, peu soluble dans le méthanol et l'eau.
- Caractéristiques chromatographiques :

Les caractéristiques chromatographiques du composé G sont les suivantes :

Système d'élution :
 ETOAC / HCOOH / CH₃ COOH glacial / H₂O
 (100 : 11 : 11 : 27)



	<i>Avant la révélation</i>		<i>Après la révélation</i>
	§	§	§ ^{AN}
G₁	+	+	
G₂		+	+
G₃			+

Légende :

- *Réactifs révélateurs* : AN : anisaldéhyde
- *Lecture de l'analyse* : + + présence
- *L'état d'examen* : § : à 245 nm et § : à 366 nm

Schéma III – 8 : Profil chromatographique schématisé du composé G.

d₂₂ – Spectre UV :

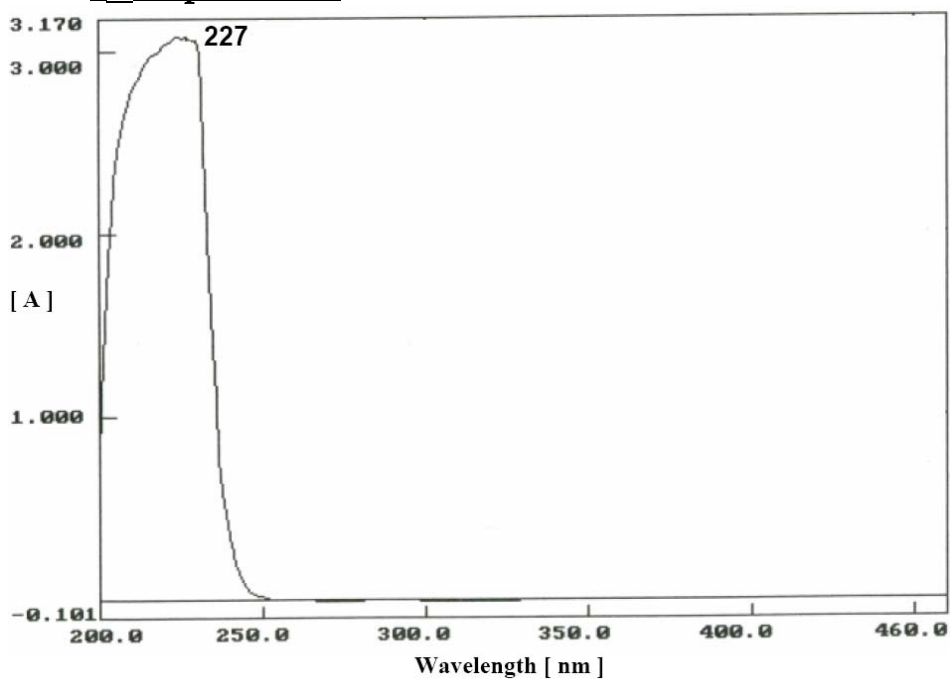


Figure III – 17 : Spectre UV dans le méthanol du Composé G.

*d*₂₃ – Spectre IR :

Le spectre IR du composé **F** (figure III – 18) montre des signaux très semblable aux signaux du composé **E** avec quelques différences :

- Une bande large à 3408 cm⁻¹ attribuée au groupement **OH** d'un alcool.
- Le pic situé à 3001 cm⁻¹ caractéristique de la liaison **C-H Sp²**, plus les bandes à 1028, 954,7, 900,7 et 705,9 cm⁻¹.
- Une bande à 1652,9 cm⁻¹ correspond aux vibrations des liaisons carbonyle.
- Le pic situé à 2914,2 cm⁻¹ attribuable aux vibrations **C-H** aliphatiques des groupes **CH₂** et **CH₃**. Plus, les bandes à 1406 et 1436,9 cm⁻¹ confirmant la présence du **CH₂** de la chaîne aliphatique et à 1315,4 et 1338,5 cm⁻¹ caractéristique du groupe **CH₃**.

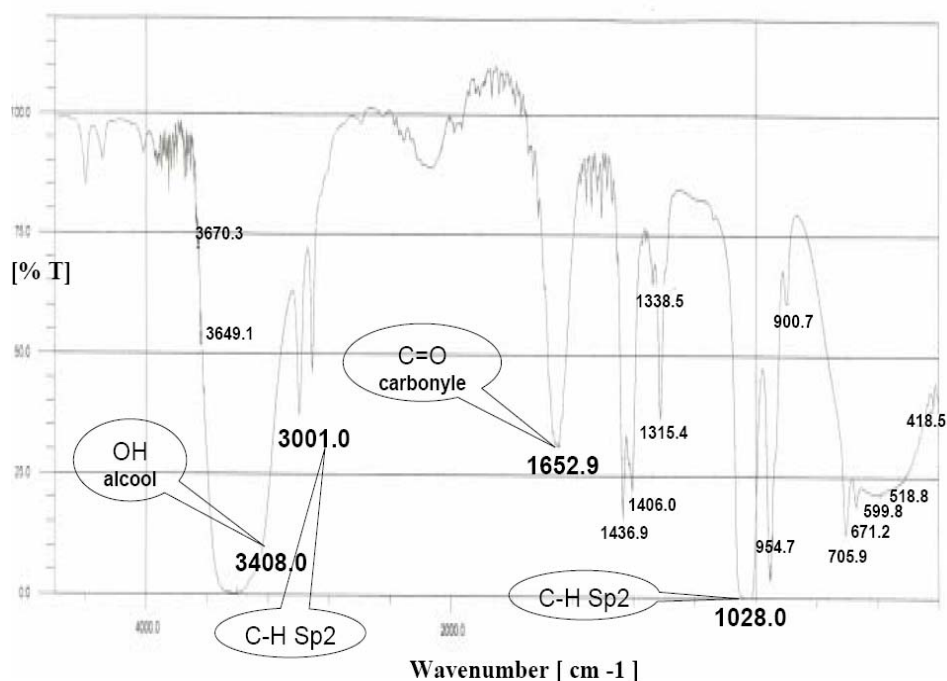


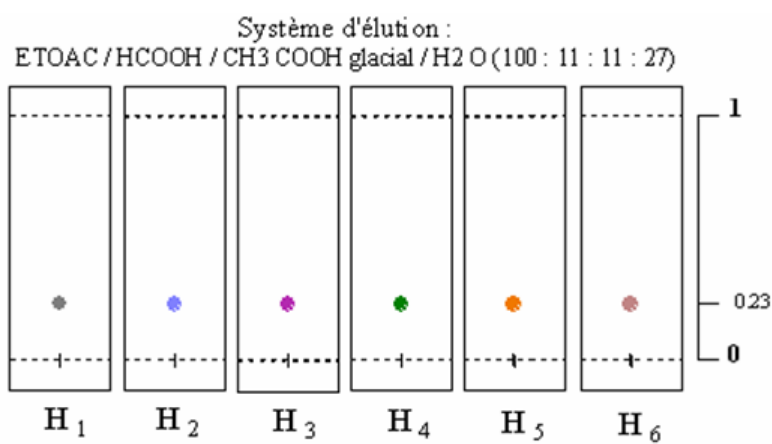
Figure III – 18 : Spectre IR du Composé G.

d – 3 Le Composé H :

d₃₁ – Propriétés physico-chimiques :

- Solide amorphe blanc.
- Insoluble dans les solvants et les mélanges des solvants apolaires, peu soluble dans le méthanol et l'eau.
- Caractéristiques chromatographiques :

Les caractéristiques chromatographiques du composé H sont les suivantes :



	Avant la révélation		Après la révélation				
	§	\$	¶ ^{VS}	¶ ^{AS}	\$ ^{AN}	\$ ^{AS}	
H₁	+	+					
H₂							
H₃			+	+			
H₄					+	+	
H₅						+	+
H₆				+	+		

Légende :

- Réactifs révélateurs : AN : anisaldéhyde, AS : Acide sulfurique et VS : Vanilline sulfurique.
- Lecture de l'analyse : + + présence
- L'état d'examen : ¶ : à la lumière de jour, § : à 245 nm et \$: à 366 nm

Schéma III – 9 : Profil chromatographique schématisé du composé G.

d₃₂ – Spectre UV :

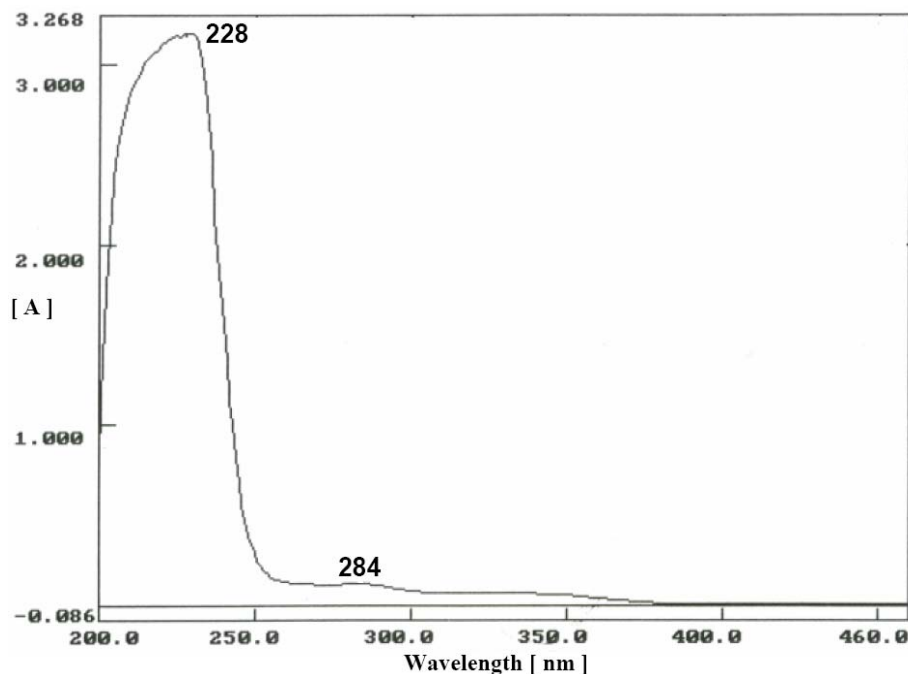


Figure III – 19 : Spectre UV dans le méthanol du Composé H.

d₃₃ – Spectre IR :

L'examen du spectre IR du composé **G** (figure III – 20), permet de distinguer les bandes d'absorption suivantes :

- Une bande large à $3406,1 \text{ cm}^{-1}$ est attribuée au groupement **OH** d'un alcool.
La présence de cette fonction est confirmée aussi par une bande observée à $1118,8 \text{ cm}^{-1}$, celle de la liaison **C-O** d'un alcool.
- Les deux bandes à 2913 et 2848 cm^{-1} sont attribués aux vibrations **C-H** aliphatiques des groupes **CH₂** et **CH₃**. Une bande est observée à 1379 cm^{-1} , confirmant la présence du **CH₃** de la chaîne aliphatique.
- Une bande d'absorption à $1620,1 \text{ cm}^{-1}$ correspond au groupement carbonyle conjugué.
- Un pic à 1595 cm^{-1} caractérise la liaison **C=C** aromatique.

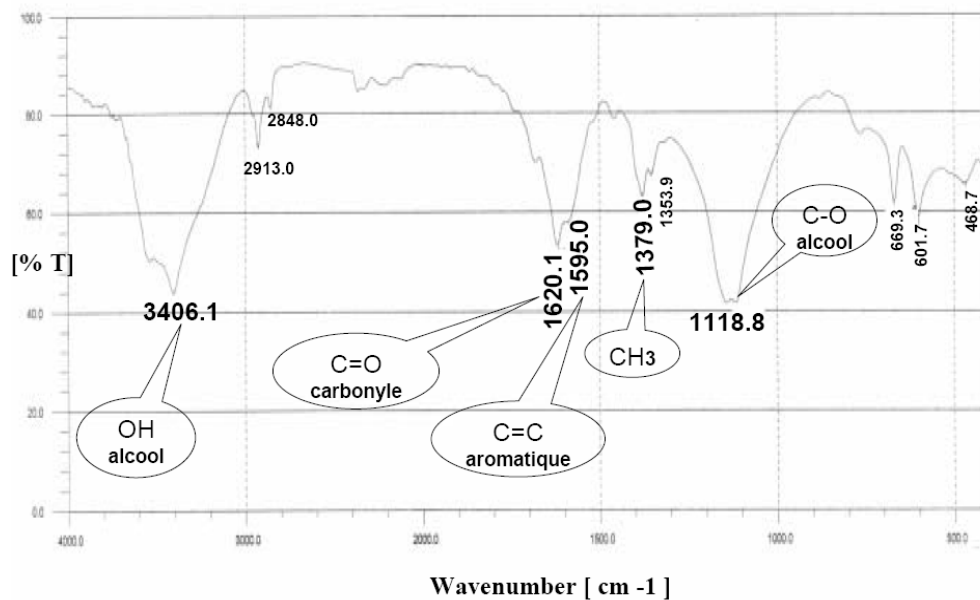


Figure III – 20 : Spectre IR du Composé H.

Conclusion

La pharmacopée traditionnelle Algérienne utilise de nombreuses plantes en médecine traditionnelle. Les Astéracées est une des familles les plus riches en espèces à valeur médicinale. L'*Anacyclus pyrethrum*, connue localement sous les noms de «Guenthus» ou pyrèthre d'Afrique est un bon exemple de plante médicinale. La médecine populaire utilise les racines de cette plante dans le cas des problèmes liés à la sécrétion salivaire comme sialagogue (ainsi les maladies infectieuses et parasitaires). Malgré sa large utilisation en médecine traditionnelle, la plante demeure peu étudiée quant à sa chimie et sa pharmacologie. La littérature (travaux ultérieure, chimie et pharmacobiologie).

Ce présent travail s'intéresse à l'effet antiparasitaire des racines d'*A. pyrethrum*, notamment à son activité antidermatophyte. Une étude effectuée dans notre laboratoire auparavant sur l'extrait hydroalcoolique des racines d'*Anacyclus pyrethrum* a révélé une forte activité antifongique sur trois souches de dermatophytes : *Microsporum canis*, *Microsporum nanum* et *Trichophytum rubrum*.

Cette étude est une continuité du travail précédemment cité, et a comme objectif de contribuer à caractériser la nature chimique des substances intervenant dans cette activité.

Un travail de criblage bioguidé préliminaire a permis de localiser une activité antidermatophyte importante au niveau de l'extrait de dichlorométhane (DCM) des racines d'*A. pyrethrum*. Le fractionnement chromatographique de l'extrait actif de DCM a permis de situer l'activité au niveau d'un certain nombre de fractions, notamment celles enrichies en triterpènes (TRITER) et alkamides (ALKA). De la fraction enrichie en triterpènes (TRITERP), quatre composés ont été isolés, dont deux identifiés formellement comme des triterpènes pentacycliques.

Un travail complémentaire effectué sur l'extrait brut alcoolique (EtOH) a permis d'isoler quatre produits, dont un a été identifié formellement comme une pyranocoumarine, et les trois autres des dérivés phénylpropanes. La nature de ces phénylpropanes, probablement des lignanes, n'a pu être formellement établie.

Sur le volet chimique, les résultats obtenus dans ce travail permettent une meilleure connaissance du métabolisme secondaire au niveau des racines d'*A. pyrethrum*. Le profil métabolique des racines est caractérisé par la présence de triterpènes pentacycliques, de phénylpropanes, de coumarines et d'alkamides. A part les alkamides déjà signalés par des études ultérieures, les autres types de métabolites sont cités pour la première fois par cette présente étude dans l'espèce étudiée ;

Sur le volet d'activité, les résultats obtenus par le fractionnement bioguidé a permis de situer une activité notable au niveau des métabolites moyennement polaires, notamment des fractions enrichies en triterpènes et en alkamides. Ces types de métabolites ont été déjà signalés comme doués d'un effet inhibiteur vis-à-vis d'autres souches fongiques. Leur activité vis-à-vis des souches de *M. canis* est signalée ici pour la première fois.

Finalement, la chimie des racines d'*A. pyrethrum* s'est révélée intéressante, et riche par la présence de produits connus pour fournir des molécules bioactives . C'est le cas des triterpènes (antibactérienne, antioxydant, ...), d'alkamides (activité anesthésique local, antimalariale, propriétés insecticides (Clifford, L.J *et al.*, 2002; José, L.B *et al.*, 2006; Burkhard, H *et al.*, 2007; Maria, Y.R *et al.*, 2007; Mun, C.R *et al.*, 2007)), de coumarines, et probablement de lignanes (agents cytotoxiques).

La possible implication des triterpènes et/ou des alkamides dans l'activité antidermatophyte devrait être déterminée dans l'étape suivante de ce projet (calcul des CMI) , vis-à-vis de plusieurs souches fongiques pathogènes, résistants aux thérapies actuels (activité in-vitro et in-vivo).

Enfin, ce travail soulève d'autres questions, notamment ceux de composés, autres que les triterpènes et alkamides, présents en faible quantité dans les extraits et fractions enrichies, et leur possible implication dans l'activité observée (effet de synergie).

*Références
Bibliographiques*



Abe, I.M.R et Glenn, D.P. (1993). Enzymatic Cyclization of Squalene and Oxidosqualene to Sterols and Triterpenes. *Chem.Rev*, **93**, 2189-2206.

Abu, E.R.A et El-Tawil, B.A. (1985). The electronic absorption spectra of some coumarins. A molecular orbital treatment, *Can.J.Chem*, **63**, 1173-1178.

Adesina, S.K (1988). Arnottianamides and other constituents of *Znathoxylum Gillettii* Root. *Journal of Natural Products*, **51**,601-602.

Adnyana, K.I., Tezuka, Y., Banskota, H.A., Tran, Q.K et Kadita, S. (2000). Quadranosides VI-XI, Six New Triterpene Glucosides from the Seeds of *Combretum quadrangulare*. *Chem.Pharm.Bull*, **48**, 1114-1120.

Ahmed, S.M., Sandra, G et Gustavo, B. (2004). Antinociceptive activity of triterpenes isolated from *Clusia ellipticifolia*. *Rev.Col.Cienc.Quim. Farm*, **33**, 156-162.

Akinlolu, A.A., Sadiq, M.O., Ayoola, M.D., Otulana, J.O., Abimbola, O., Ejiwunmi, A.B. (2006). Morphological gastroprotective effects of *Heliotropium indicum* on gastric ulcerated mucosa. *Pak J Pathol*, **17**, 60-64.

Alignan, M. (2006). Thèse de doctorat : Phoma du Tournesol : déterminisme de la tolérance de l'hôte à la maladie, Toulouse.

Ali, S.M.S et Abu, G.S.I. (1999). Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses*, **42**, 665-672.

Alkins, P.W., Holher, J.S.E et A, K.H. (1987). Secondary Metabolism. Chapitre 3 (Biosynthesis of Triterpenoids (Pentacyclic) and Steroids, 2 nd edition.Clarendon Press.Oxford.

Andras, K., Curt, L.B et William, F.J. (2008). A molecular perspective on terpene variation in Australian Myrtaceae. *Australian Journal of Botany*, **56**, 197-213.

Anwer, S.M., Mohtasheem, M., Azhar.I., Ahmed, W.S et Bano, H. (2008). Chemical Constituents from *Melilotus officinalis*. *Journal of Basic and Applied Sciences*, **4**, 89-94.

Asaph, A., Maarten, J.A et Harro, B.J. (2005). Volatile science ? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *TRENDS in Plant Science*, **10**, 595-602.

Arnason, J.T., Philogène, B.J.R et Morand, P. (1989). Insecticides of Plants origin (ACS symposium series 387), American Chemical Society, Washington.



Baba Aissa, F. (1999). Encyclopedie des plantes utiles, Edas Edition, Alger

Barnard, D.L., Xu, Z.Q., Stowell, V.D., Yuan, H., Smee, D.F., Samy, R., Sidwell, R.W., Nielsen, M.K., Sun, L., Cao, H., Li, A., Quint, C., Deignan, J., Crabb, J et Flavin, M.T. (2002). Coumarins and pyranocoumarins, potential novel pharmacophores for inhibition of measles virus replication. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, **13**, 39–59.

Beauquesne, B.L., Pinkas, M., Torck, M et Troitin, F. (1990). Plantes médicinales des régions tempérées. 2^{ème} Edition, Maloine, Paris

Beloued, A. (1998). Plantes médicinales d'Algérie. OPU, Alger

Bendjeddou, D., Lalaoui, K et Satta, D. (2003). Immunostimulating activity of the hot water-soluble polysaccharide extracts of *Anacyclus pyrethrum*, *Alpinia galangal* and *Citrullus colocynthis*. *Journal of Ethnopharmacology*, **88**, 155-160.

Benkiki, N., Kabouche, Z et Bruneau, C. (2007). Two coumarins and A Thienylbutylamide from *Anacyclus cyrtolepioides* from the Algerian septentrional sahara. *Chemistry of Natural Compounds*, **43**, 612-613.

Bergaoui, A., Sakka, R.L., Benjannet, H., Ben Halima, K.M et Mighri, Z (a) (2006). Activités antibactériennes, anti-insectes et composition chimique de l'huile essentielle des fleurs de la plante *Anacyclus cyrtolepidioides* Poussant en Tunisie. International Symposium on Perfume, Aromatic and Medicinal Plants: From Production to Valorisation. SIPAM, 2-4 novembre, Jarba-Tunisia.

Bergaoui, A., Sakka, R.L., Benjannet, H., Ben Halima, K.M et Mighri, Z (b) (2006). Etude biologique et chimique de l'extrait chloroformique de la plante *Anacyclus cyrtolepidioides* Poussant en Tunisie. International Symposium on Perfume, Aromatic and Medicinal Plants: From Production to Valorisation. SIPAM, 2-4 novembre, Jarba-Tunisia.

Bohlmann, F., Burkhardt, T et Zedero, C. (1973). Naturally Occurring Acetylenes Berlin, Germany.

Boulos, L. (1983). Medicinal plants of North Africa. Reference Publications Inc.Michigan.

Bourgaud, F., Hehn, A., Lariat, R., Doerper, S., Gontier, E., Kellner, S et Matern, U. (2006). Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochem Rev*, **5**, 293–308.

Boursiquot, J.M., Garcia, A et Murisier, F. (2002). Bulletin de l'O.I.V., **75**, 853-854.

Branco, A., Pinto, A.C et Filho, R.B. (2004). Chemical constituents from *Vellozia graminifolia* (Velloziaceae). *An Acad Bras Cienc*, **76**, 505-518.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie et Plantes médicinales, 3^{ème} Edition, Tec et Doc, Paris

Bruneton, J. (2001). Plantes toxiques : végétaux dangereux pour l'homme et les animaux, 2^{ème} Edition, Tec et Doc, Paris

Brown, G.D. (1998). The biosynthesis of steroids and triterpenoids. *Natural Product Reports*; **7**, 653-678.

Burkhard, H., Karin, W et Rudolf, B. (2007). Alkamides from *Echinacea* inhibit cyclooxygenase – 2 activity in human neuroglioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **360**, 441-446.



Carballeira, N.M. (2008). New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents. *Progress in Lipid Research*, **47**, 50–61.

Catalan, C.A.N., Vega, M.I., Lopez, M.E., Cuenca, M.R., Gedris, T.E., Herz, W. (2003). Coumarins and Kaurane from *Gochnatia polymorpha* SSp. *polymorpha* from *Paraguay*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **31**, 417-422.

Chaaib, K.F. (2004). Thèse de doctorat : Investigation phytochimique d'une brosse à dents africaine *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler (Syn. *Fagara zanthoxyloides* L.) (Rutaceae), Genève.

Chabasse, D., Bouchara, J.P., Gentile, L., Brun, S., Cimon, B et Penn, P. (2004). Les Dermatophytes. Ouvrage réalisé par le laboratoire de parasitologie – Mycologie du CHU d'Angers. **31**, 1-159.

Charrouf, Z., Fkih, T.S., Charrouf, M et Mouchel, B. (1991). Triterpènes et Stérols extraits de la Pulpe d'*Argania spinosa* (L.), Sapotaceae. *Plantes médicinales et phytothérapie*, **3**, 112-117.

Chen, J., Chen, B., Tian, J et Wu, F. (2002). Two New Pentacyclic Triterpenes from *Sabia parviflora*. *Chinese Chemical Letters*, **13**, 345-348.

Chiy, R.C., Hung, W.C et Chi, I.C. (2008). D:C-Friedooleanane Type Triterpenoids from *Lagenaria siceraria* and Their Cytotoxic Activity. *Chem. Pharm. Bull*, **56**, 385-388.

Clifford, L.J., Nair, M.G., Ran, J et Dewitt, D.L. (2002). Bioactivity of alkamides isolated from *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *Phytomedicine*, **9**, 249-253.

Coopoosamy, R.M et Magwa, M.L. (2007). Traditional use, antibacterial activity and antifungal activity of crude extract of *Aloe excelsa*. *African Journal of Biotechnology*, **6**, 2406-2410.

Crépy, M.N. (2006). Dermatoses professionnelles aux végétaux. *Méd Trav*, **105**, 77-90.

Crombia, L. (1954). Isolation and Structure of an *N-iso* Butyldienedynamide from Pellitory (*Anacyclus pyrethrum* DC.). *Nature*, **174**, 832-833.

Cruz, F.G., Silva, N.J.T et Guedes, M.L.S. (2001). Xanthonés and Coumarins from *Kielmeyera lathrophyton*. *J.Braz.Chem.Soc*, **12**, 117-122.

Cruz, M.C.S., Santos, P.O., Barbosa, A.M., Mélo, D.L.F.M., Alviano, C.S., Antonioli, A.R., Alviano, D.S., Trindade, R.C. (2007). Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. *Journal of Ethnopharmacology*, **111**, 409-412.



Debray, M.M. (1970). Contribution à l'inventaire des plantes médicinales du massif du Tsaratanana. *Mém.ORSTOM*, **37**, 231-236.

Deba, F., Xuan, D.T., Yasuda, M et Tawata, S. (2008). Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilose* Linn.Var.Radiata. *Food Control*, **19**, 346-352.

Dieng, M.T et Ndiaye, B. (2000). Efficacité et tolérance du Fenticonazole dans les dermatophyties circinnns de la peau glabre au senegal. *Médecine d'Afrique Noire*, **47**, 346-348.

Dohou, N., Yamni, K., Badoc, A., Douira, A. (2004). Activité antifongique d'extraits de *Thymelaea lythroides* sur trois champignons pathogènes du Riz. *Bull.Soc.Pharm.Bordeaux*, **143**, 31-38.

Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, T., Idrissi, H.L.M., Badoc, A et Gmira, N. (2003). Screening phytochimique d'une endémique ibéromorocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bull. Soc.Pharm.Bordeaux*, **142**, 61-78.

Dosseh, Ch., Moretti, Ch., Tessier, A.M et Delaveau, P. (1980). Etude chimique des feuilles de *Byrsonima verbascifolia* Rich. Ex JUSS. *Plantes médicinales et phytothérapie*, **3**, 136-142.

Diallo, D. (2000). Thèse de doctorat : Ethnopharmacological survey of medicinale plants in Mali and phytochemical study of four of them : *Glinus appositifolius* (Aizoaceae), *Diospyros abyssinica* (Ebenaceae), *Entada Africana* (Mimosaceae) and *Trichillia emetica* (Meliaceae), Lausanne.

Druet, D., Comeau, L et Jean, P.Z. (1986). Structure de l'opigenine: triterpènes pentacyclique isole d'*Opilia celtidifolia*. *CAN.J.CHEM*, **64**, 295-299.

E

Eder, B., Walmir, S.G., Lidilhone, H., Caroline, T et Fernanda, R.G. (2008). Bioactive Pentacyclic Triterpenes from the Stems of *Combretum laxum*. *Molecules*, **13**, 2717-2728.

Egwaikhide, P.A.E., Okeniyi, S.O.O., Akporhonor, E.E et Emua, S.O. (2008). Studies on Bioactive Metabolites Constituents and Antimicrobial Evaluation of Leaf Extracts of *Eucalyptus Globulus*. *Agricultural Journal*, **3**, 42-45.

G

Gausсен, H., Leroy, F.J et Ozenda, P. (1982). Précis de botanique : 2. végétaux supérieures, 2^{ème} édition.

Giordani, R., Hadehd, Y et Kaloustian, J. (2007). Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitote*, **1640**, 1-7.

Gonzalez, C.F.A., Macias, F.A., Massanet, G.M., Luis, R.F., Salva, J et Vergara, C. (1985). Mariolin, A Germacranolide from *Anacyclus Radiatus*. *Phytochemistry*, **24**, 2447-2448.

Goodwin, T.W. (1971). Biosynthesis of Carotenoides and Plant Triterpenes. *Biochem.J*, **123**, 293-329.

H

Hans, F.J et Klaus, B. (1973). The Structure of Novel C₃₅ Pentacyclic Terpenes from *Acetobacter xylinum*. *Biochem.J*, **135**, 133-143.

Harald, G. (1978). Comparative Phytochemistry and Systematics of *Anacyclus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **6**, 11-17.

Harbone, J.B. (1984). *Phytochemical Methods. A Guide to modern Techniques of Plant analysis*, second edition.

Harouna, H., Favel, A., Delmas, E., Elias, R., Saadou, M et Balansard, G. (1993). Screening of some plants used in traditional medicine in Niger for antiparasitic and antifungal activities. Actes du 2e Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 11^e Conférence internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg.

Hehn, A. (2007). Thèse de doctorat : Métabolisme secondaire : les cytochromes P 450 s acteurs de l'adaptation des plantes à leur environnement, Strasbourg.

Hostettmann, K et Marston, A. (1994). Search for new antifungal compounds from higher plants. *Pure & Appl.Chem*, **66**, 2231-2234.

Hostettmann, K., Marston, A., Ndjoko, K et Wolfender, J.L. (2000). The Potential of African Plants as a Source of Drugs. *Current organic chemistry*, **4**, 973-1010.

Hua, S., Wei, S.F., Wang, W.Z et Chum, Hu. (2006). Structure-activity relationships of oleanane and ursane type triterpenoids. *Botanical Studies*, **47**, 339-368.

Hu, H.J., Wang, K.w., Wu, B., Sun, C. et Pan, Y.j. (2005). Chemical shift assignments of two oleanane triterpenes from *Euonymus hederaceus*. *J Zhejiang Univ SCI*, **6**, 719-721.

Hymete, A., Iversen, T.H., Rohloff, J et Erko, B. (2005). Screening of *Echinops ellenbeckii* and *Echinops longisetus* for biological activities and chemical constituents *Phytomedicine*, **12**, 675-679.

J

Igoli, J.O et Gray, A.I. (2008). Friedelanone and other triterpenoids from *Hymenocardia acida*. *International Journal of Physical Sciences*, **3**, 156-158.

Igor, P.L.B. (2003). Thèse de doctorat : Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxyloides* Lam (Rutaceae), Bamako.

J

Jacobson, M. (1956). Pellitorine Isomers. III. The Synthesis of N-Isobutyl-trans-4-trans-6-decadienamide and the Structure of Spilanthol. *J.Pharm.Soc*, **70**, 43.

Jasso, R.D., Hernandez, C.D., Angulo, S.J.L., Rodriguez, G.R., Villarreal, Q.J.A et Lira, S.R.H. (2007). Antifungal activity in Vitro of *Flourensia* Spp.extrqcts on *Alternaria* Sp., *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. *Industrial Crops and Products*, **25**, 111-116.

Jente, R et Eberhard, R. (1976). Zur Biosynthese des Dehydromatriaesters *J.Chem.Soc*, **15**, 1673-1679.

Jiri, P. (2003). Biologically active pentacyclic triterpene and their current medicine signification. *Journal of Applied Biomedicine*, **1**, 7-12.

José, A.M., Ansuategui, M et Bermejo, P. (2007). Active antifungal substances from natural sources, *ARKIVOC*, **VII**, 116-145.

José, L.B., Gustavo, A.H., Enrique, R.C., Jorge, M.T et Luis, H.E. (2006). Novel signals for plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, **9**, 523-529.

Julien, A. (1894). Flore de la région de Constantine. Imprimerie Louis Marle, Constantine

K

Kang, W.Y., Li, G.H et Hao, X.J. (2003). Two New Triterpenes from *Neonauclea sessilifolia*. *Acta Botanica Sinica*, **45**, 1003-1007.

Kazumasa, S., Mie, O., Akira, I., Shinjiro, N., Norimoto, U et Mikito, A. (2001). Structure-Activity Relationships of Triterpenoid Derivatives Extracted From *Gymnema inodorum* Leaves on Glucose Absorption. *Jpn.J.Pharmacol*, **86**, 223-229.

King, C et Miller, M.F. (1949). The reaction of Diazoketines with thioamides Derivatives. *J.Chem.Soc*, **69**, 367.

Kostova, I. (2005). Synthetic and Natural Coumarins as Cytotoxic Agents. *Curr.Med. Chem.-Anti-Cancer Agents*, **5**, 29-46.

Kostova, I., Momekov, G et Stancheva, P. (2007). New Samarium (III), Gadolinium (III), and Dysprosium (III) Complexes of Coumarin-3-Carboxylic Acid as Antiproliferative Agents. *Metal-Based Drugs*, **10**, 1-8.

Kostova, I., Raleva, S., Genova, P et Argirova, R. (2006). Structure –Activity Relationships of Synthetic Coumarins as HIV-1 Inhibitors. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, **68274**, 1-9.

Kuo, Y.H et Chiang, Yi.M. (2000). Six New Ursane and Oleanane Type Triterpenes from the Aerial Roots of *Ficus microcarpa*. *Chem.Pharm.Bull*, **48**, 593-596.

L

Lalande, J et Parenty, A. (2003). Synthèse d'une coumarine. *L'actualité chimique*, **16**, 27-30.

Lamarti, A., Badoc, A., Deffieux, G et Carde, J.P. (1994). Biogénèse des monoterpènes II – la chaîne isoprénique. *Bull.Soc.Pharm.Bordeaux*, **133**, 79-99.

Larpent, J.P et Sanglier, J.J. (1989). Biotechnologie des antibiotiques, Masson, Paris.

Liu, M., Seidel, V., Katerere, D.R., Gray, A.I. (2007). Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. *Method*, **42**, 325-329.

Lièvre, K. (2004). Thèse de doctorat : Modification de la composition en molécules pharmaceutiques (furocoumarines) de la Rue officinale (*Ruta graveolens*) par transformation génétique, Strasbourg.

Lloyd, C.G et U, J. (1911). Botany, Pharmacy and Materia Medica. Bulletin, **18**, Pharmacy Series, NO.4.

M

Macek, K. (1972). Pharmaceutical application of Thin-Layer and Paper Chromatography, New York.

Maire, J.C et Waegell, B. (1969). Structure Mécanismes et Spectroscopie, 120 Problèmes, 60 Solutions. Volume 2, New York.

Marcia, L.N., Fabiano, M.C., Maria, C.Y.M et Vanderlan, S.B. (1999). Complete Assignments of ¹H and ¹³C-NMR Spectra of the 3, 4-*seco*-Triterpene Canaric Acid isolated from *Rudgea jasminoides*. J.Braz.Chem.Soc, **10**, 237-240.

Maria, Y.R., Berenice, A.A.G et Maria, C.G. (2007). Analgesic activity of affinin, an alkamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). Journal of Ethnopharmacology, **110**, 364-367.

Mario, J.J., Joao, F.B., Paulo, C.V., Maria, F.G.F.S et Edson, R.F. (1999). The Use of ¹³C and ¹H-NMR in the Structural Elucidation of New *Nor*-Lupane Triterpene. J.Braz.Chem.Soc, **10**, 317-320.

Matasyoh, J.C., Kiplimo, J.J., Karubiu, N.M et Hailstorks, T.P. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Tarchonanthus camphoratus* Food chemistry, **101**, 1183-1187.

Mead, J.A.R., Smith, J.M et Williams, R.T. (1958). The Metabolism of Hydroxycoumarins. J.Biochem, **68**, 61-67.

Molina, T.J. (1999). Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used In Mesoamerica: affinin and capsaicin. Journal of Ethnopharmacology, **64**, 241-248.

Monaco, P., Caputo, R., Palumbo, G et Mangoni, L. (1973). Triterpenes from the galls of *Pistacia lentiscus*. Phytochemistry, **12**, 2534-2537.

Motsei, M.L., Lindsey, K.L., Staden, J et Jager, A.K. (2003). Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. Journal of Ethnopharmacology, **86**, 235-241.

Mulier, M., Byres, M., Jaspars, M., Kumarasamy, Y., Middleton, M., Nahar, L., Shoeb, M et Sarker, S.D. (2004). 2D NMR spectroscopic analyses of archangelicin from the seeds of *Angelica archangelica*. Acta Pharm, **54**, 277-285.

Mun, C.R., Seung, W.L., Park, H.R., Jung, H.C., Ji, Y.K., Koanhoi, K., Lee, H.S et Young, K.K. (2007). ACAT inhibition of alkamides identified in the fruits of *Piper nigrum*. *Phytochemistry*, **68**, 899-903.

P

Osborn, R.W., Samblanx, G.W., Thevissen, K., Goderis, I., Torrekens, S., Leuven, F., Attenborough, S., Rees, Sh.B et Broekaert, W.F. (1995). Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Letters*, **368**, 257-262.

P

Panchal, G.M., Venkatakrishna, B.H., Devasankaraiah, G., Gopalakrishna, G et Patel, V.K. (2001). Local Anaesthetic activity of *Anacyclus pyrethrum* in laboratory animals: A preliminary study. *Indian Journal of Pharmacology*, **33**, 296-308.

Paris, R.R et Moyse, H. (1971). Précis de matière médicale, pharmacognosie spéciale dicotylédones (tome III).

Prachyawarakorn, V., Mahidol, C et Ruchirawat, S. (2006). Pyranocoumarins from the twigs of *Mammea siamensis*. *Phytochemistry*, **67**, 924-928.

R

Rahman, A., Choudhary, M.I et Thomson, W.J. (2005). *Bioassay Techniques for Drug Development*, Harwood academic publishers, London.

Rodney, C., Toni, M.K et Norman, G.L. (2000). Natural Product (Secondary Metabolites). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, **18**, 1250-1318.

Rouxel, T. (1989). Les phytoalexines et leur intervention dans la résistance hypersensible aux champignons phytopathogènes. *Agronomie*, **9**, 529-545.

S

Sabitha, A.R et Murty, S.U. (2006). Antifungal potential of flower head extract of *Spilanthes acmella* Linn. *African Journal of Biomedical Research*, **9**, 67-69.

Sariaslani, S.F et Rosazza, J.P. (1983). Novel Biotransformations of 7-thoxycoumarin by *Streptomyces griseus*. *Applied and Environmental Microbiology*, Aug, **46**, 468-474.

- Sarker, S.D., Nahar, L., Rahman, M.N., Siakalima, M et Kumarasamy, Y. (2005).** Bioactivity of umbelliprenin, the major component found in the seeds of *Angelica sylvestris*. *Ars Pharm*, **46**, 35-41.
- Shults, E.E., Petrova, T.N., Shakirov, M.M., Chernyak, E.I., Pokrovskiy.L.M., Nekhoroshev, S.A et Tolstikov, G.A. (2003).** Coumarin Compounds from Roots of Peucedanum (*Peucedanum morisonii* Bess.). *Chemistry for Sustainable Development*, **11**, 649-654.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C et Morrill.T.C. (1967).** Spectrometric Identification of Organic Compounds, Third edition, New York.
- Singh, I.P., Bharate, B.S et Bhutani, K.K. (2005).** Anti-HIV natural products. *Current Science*, **89**, 269-290.
- Soussi, A.M., Boutayeb, H et Guessous, I.N. (2007).** Flore fongique du sable de deux plages à Casablanca (Maroc). Analyse et corollaires épidémiologiques. *Journal de Mycologie Médicale*, **17**, 58-62.
- Spino, C., Dodier, M et Sotheeswara, S. (1998).** Anti-HIV coumarins from *Calophyllum* seed oil. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **8**, 3474-3478.
- Steck, W et Bailey, K.B. (1969).** Leaf coumarins of *Angelica archangelica* *Canadian Journal of Chemistry*, **47**, 2425-2430.
- Steenkamp, V., Fernandes, A.C et Rensburg, C.E.J. (2007).** Screening of Venda medicinal plants for antifungal activity against *Candida albicans*. *South African Journal of Botany*, **73**, 256-258.
- Stein, A.C., Alvarez, S., Avancini, C., Zacchino, S., Poser, G. (2006).** Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **107**, 95-98.
- Steven, M.C et Russell, J.M. (2008).** Detection and Isolation of Bioactive Natural Products, (In *Bioactive natural products : Detection, Isolation and Structure Determination*, 2nd edition, CRC Press New York.
- Sukumaran, K et Kuttan, R. (1995).** Inhibition of tobacco-induced mutagenesis by eugenol and plant extracts. *Mutation Research*, **343**, 25-30.
- Suokas, E et Hase, T. (1977).** Triterpenes, p-Toluenesulfonic Acid Catalysed Rearrangement of 18 α , 19 α and 18 β , 19 β isomers of 3 β , 28- Diacetoxy-epoxylupane. *Acata Chem.Scand*, **31**, 182-183.
- Sylvie, C., Pharm, B et M, S. (2003).** Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel*, **36**, 25-40.

T

Tanaka, J.C.A., Vidottii, G.J et Cleuza, C.S. (2003). A New Tormentic Acid Derivative from *Luhea divericata* Mart. (Tiliaceae). J.Braz.Chem.Soc, **14**, 475-478.

Taskin, M.K., Caliskan, O.A., Anil, H., Hassan, A.G., Khan, I.A et Bedir, E. (2005). Triterpene Saponins from *Nigella sativa* L. Turk J Chem, **29**, 561-569.

Thanakijcharoenpath, W et Theanphong, O. (2007). Triterpenoids from the stem of *Diospyros glandulosa*. Thai J.Pharm, **3**, 1-8.

Tosun, A., Ozkal, N., Baba, M et Okuyama, T. (2005). Pyranocoumarins from *Seseli gymmiferum* subsp. *Corymbosum* Growing in Turkey. Turk J Chem, **29**, 327-334.

Trease, G.E et Evans, W.C. (1983). Pharmacognosy. Baillière Tiddall, Eastbourne

V

Viswanadh, G.S., Ramaiah, A.P., Laatsch, H et Maskey, R. (2006). Chemical constituents of the heartwood and bark of *Homonoia riparia*. J.Trop.Med.Planta, **7**, 21-25.

W

Wagner, H., Blatt, S et Zgainski, E.M. (1984). Plant Drug Analysis, springer, Berlin.

Widodo, G.P., Sukrasno, S.E.Y et Adnyana, I.K. (2008). A coumarin from Ageratum Leaves (*Ageratum conyzoides* L.). International Journal of Pharmacology, **4**, 56-59.

Wu, Y.C.J., Fong, W.F., Zhang, J.X., Leung, C.H., Kwong, H.L., Yang, M.S., Cheung, H.Y. (2003). Reversal of multidrug resistance in cancer cells by pyranocoumarins isolated from *Radix peucedani*. European Journal of Pharmacology, **473**, 9-17.

X

Xiao, W.L., Li, S.H., Shen, Y.H., Niu, X.M et Sun, H.D. (2007). Two New Coumarin Glucosides from the Roots of *Angelica apaensis* and Their Anti-Platelet Aggregation Activity. Arch Pharm Res, **30**, 799-802.

Y

Yonghong, L et Pedreo, A. (2006). Tirucallane triterpenes from the roots of *Ozoroa insignis*. *Phytochemistry*, **67**, 1309-1315.

Yuan, J.Q., Yang, X.Z., Miao, J.H., Tang, C.P., Ke, C.Q., Zhang, J.B., Ma, X.J et Ye, Y. (2008). New Triterpene Glucosides from the Roots of *Rosa laevigata* Michx. *Molecules*, **13**, 2229-2237.

Yutaka, E., Yuji, K., Takehiko, T., Tetsuo, K et Masaaki, S. (2003). Functional genomics approach to the study of triterpene biosynthesis. *Pure Appl.Chem*, **75**, 369-374.

Yu, Q.L., Duan, H.Q., Takaishi, Y et Gao, W.Y. (2006). A Novel Triterpene from *Centella asiatica*. *Molecules*, **11**, 661-665.

Z

Zagnoli, A., Chevalier, B et Sassolas, B. (2005). Dermatophytosis and dermatophytes. *EMC-Pédiatrie*, **2**, 96-115.

Annexes :

*Glossaire des
termes scientifiques*

A

Agar	Polymère de l'agarose qui rentre dans la composition des milieux de culture solides en microbiologie, aussi appelé gélose.
Anthropophile	Se dit d'un champignon qui se développe préférentiellement ou exclusivement chez l'homme, les anthropophiles sont des parasites humains exclusifs.
Ascomycète	Champignon dont la reproduction sexuée est assurée de manière endogène, par production d'ascospores à l'intérieur d'un asque. Aussi appelés Ascomycotina.
Arthrospore	Spore asexuée issue de la fragmentation progressive et rétrograde d'un filament au niveau des septa. Aussi appelée arthroconidie.

B

Bractée	Petite feuille à l'aisselle de laquelle se différencie une fleur ou une inflorescence. Elles peuvent être nombreuses (entourant le capitule des Asteraceae), développées et enveloppantes.
---------	--

C

Capitule	Inflorescence à fleurs sessiles ou subsessiles portées par le sommet élargi du pédoncule (ex : marguerite).
Champignon	Qui vit dans les champs. Au sens littéraire (Larousse, Petit Robert), sur un plan scientifique, il définit tout organisme appartenant au règne des Mycètes.
Chlamydospore	Forme de résistance produite par les champignons lorsque les conditions deviennent défavorables et caractérisée par

une paroi très épaisse. Elle se forme à partir d'un article du filament mycélien (ou parfois d'un article d'une spore pluricellulaire). Il ne s'agit pas réellement d'une spore car il n'y a pas de mécanisme de libération.

Conidie

Spore asexuée externe. Chez les champignons produisant plusieurs types des conidies, on peut y ajouter selon leur taille les préfixes micro- (spores souvent unicellulaire) ou macro- (spores souvent pluricellulaires).

D

Dermatophyte

champignon kératinophile à l'origine de lésions superficielles de la peau et des phanères.

Dermatophytie

Mycose produite par un dermatophyte.

E

Eliciteur

Molécule induisant des réactions de défense chez la plante, associé ainsi à la synthèse de phytoalexines.

L'éliciteur est de nature chimique variable (protéine, oligosaccharide).

Epidermophytie

Mycose superficielle de la peau (épiderme) provoquée habituellement par un dermatophyte.

F

Filamenteux

Qualitatif courant en mycologie pour les champignons qui produisent des filaments par opposition aux levures au thalle unicellulaire.

Fongique

Qui se rapporte aux champignons.

G

Genre	Unité de classification des êtres vivants qui se situe entre l'unité de base qui est l'espèce et un niveau taxonomique plus élevé qui est la famille. Dans la dénomination binomiale des êtres vivants, le premier nom qui commence toujours par une majuscule désigne le genre.
Géophile	Se dit des champignons dont le biotope habituel est la terre ou le sol.

I

Immunostimulant	Qui amplifie des réactions de défense de l'organisme.
-----------------	---

K

Kératine	Scléroprotéine complexe, soufrée, de consistance dure, imperméable, très répandue dans le monde animal et parfois présente dans la paroi de certains champignons. Chez l'homme, la kératine est abondante dans l'épiderme et les phanères (cheveux, poils, ongles).
----------	--

M

Macroconidie	Terme utilisé chez des champignons produisant deux types de spores pour désigner des conidies de grande taille, habituellement pluricellulaires (avec plusieurs logettes).
Microconidie	Terme utilisé chez des champignons produisant deux types de spores pour désigner des conidies de petite taille, habituellement unicellulaires.
Milieu de la Sabouraud	Milieu de culture habituel en mycologie. Il contient de la gélose (agar, de peptone, du glucose et de l'eau distillée) ainsi qu'un antifongique (cycloheximide) pour inhiber la

croissance de certaines moisissures et levures indésirables.
Mycose Manifestation provoquée par la présence d'un champignon microscopique dans l'organisme. On distingue les mycoses superficielles, et les mycoses profondes ou systémiques.

P

Parasite Agent pathogène qui est capable de vivre aux dépens de tissus vivants ou morts de la plante hôte.
Peptone Mélange de peptides issus d'une hydrolyse enzymatique ou chimique de viandes (ou de végétaux) et entrant dans la composition de certains milieux utilisées en mycologie.
Pubescent Se dit d'une feuille, d'une tige qui est couverte de poils fins et courts.

S

Spore Élément issu de la reproduction sexuée des champignons et destiné à assurer la survie du champignon et sa propagation.

T

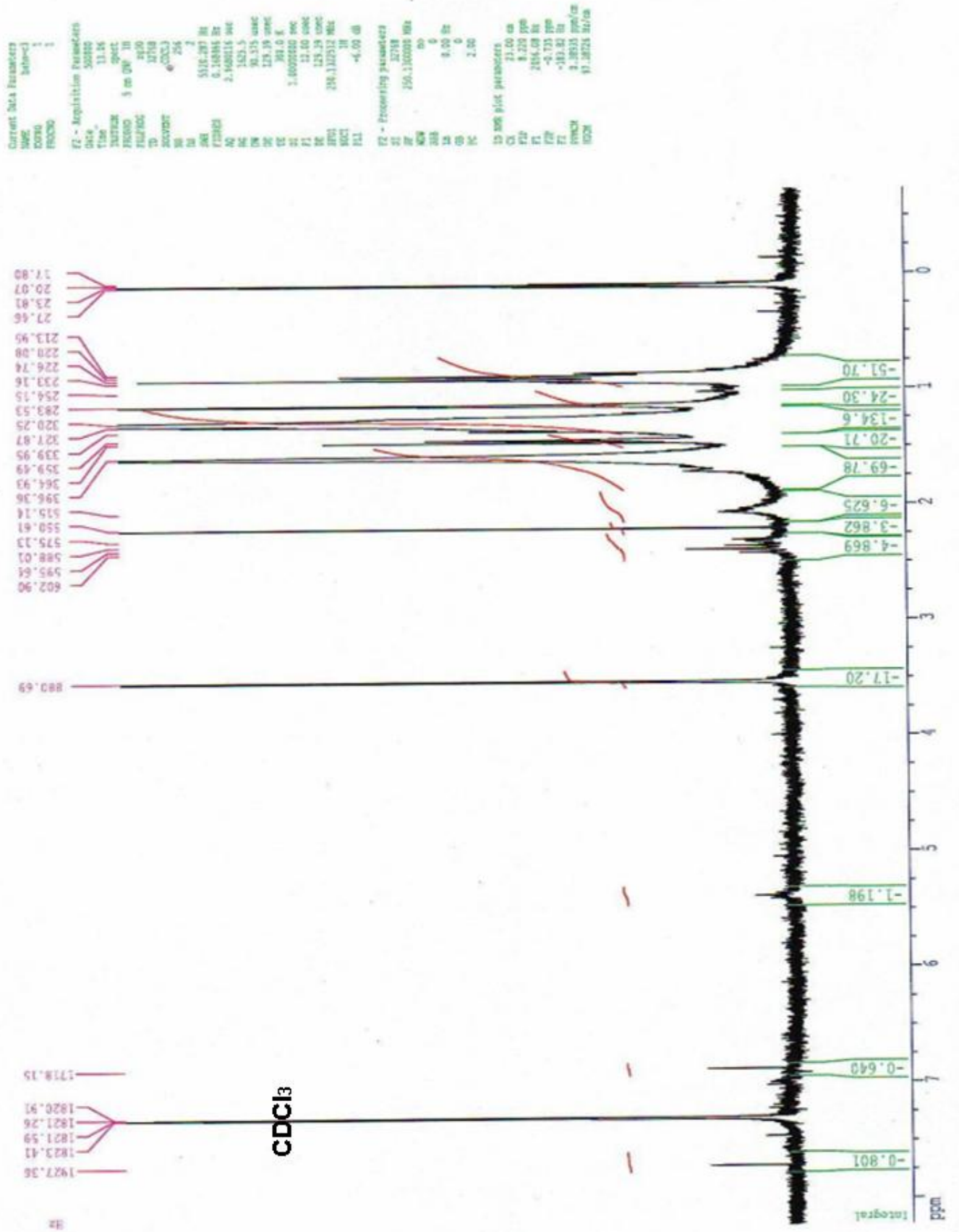
Tellurique En relation avec la terre, le sol.

Z

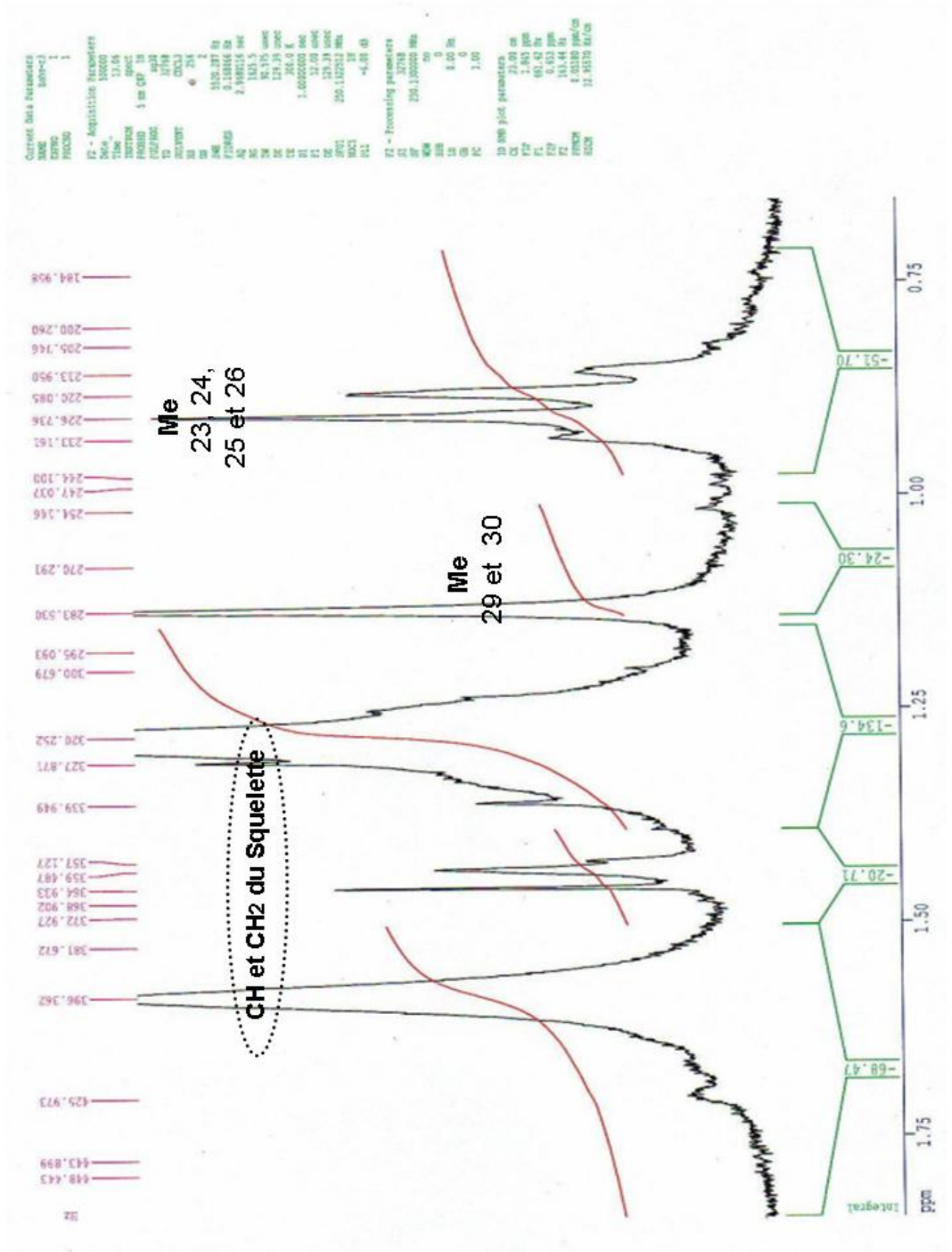
Zoophile Se dit d'un champignon qui se développe préférentiellement ou exclusivement chez l'animal.

*Les Spectres
RMN 1 H des
Composés identifiés*

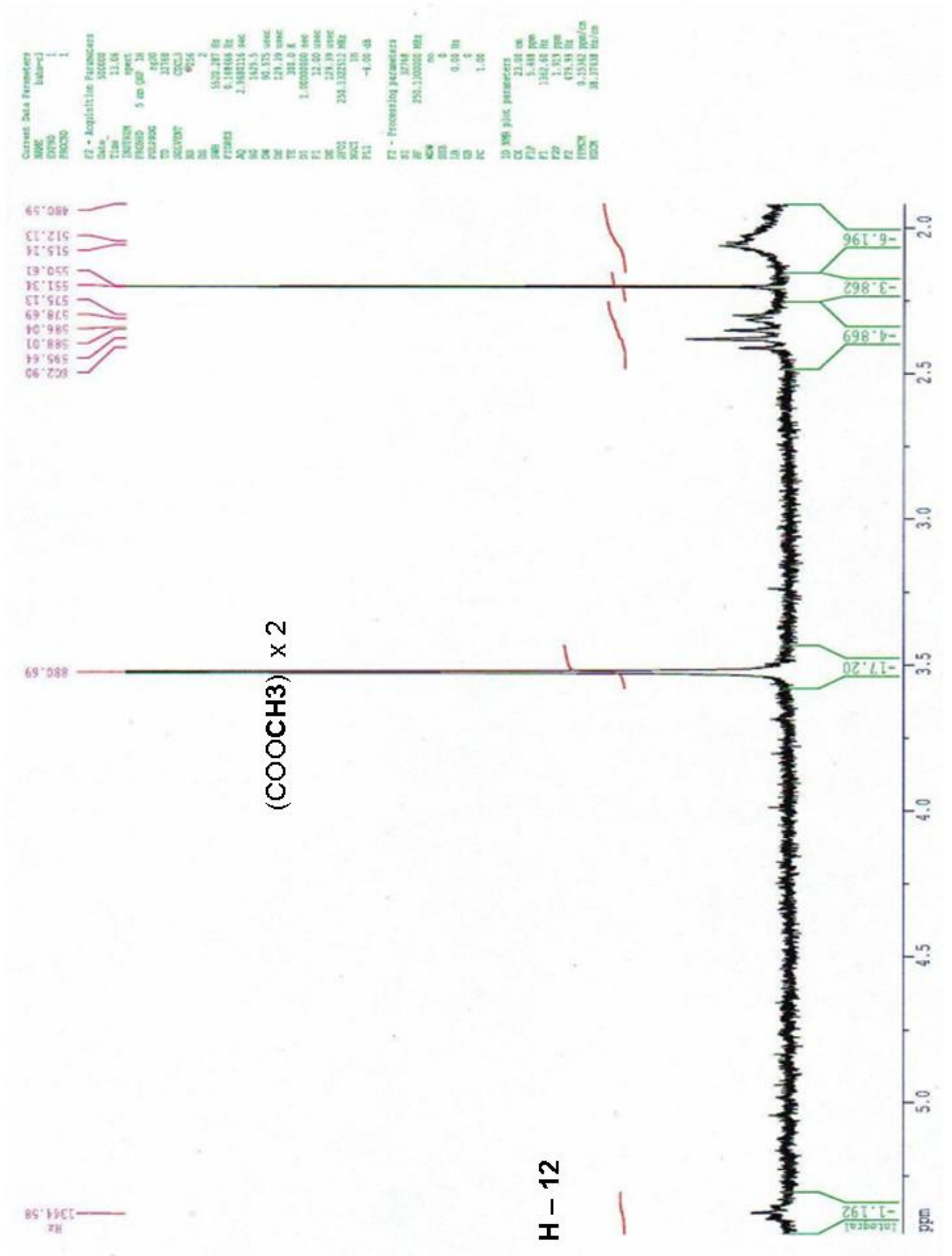
Spectre RMN¹H du Composé C :



*Spectre RMN¹H du Composé C
(Étalement de la région 0,75 - 1,75 ppm):*



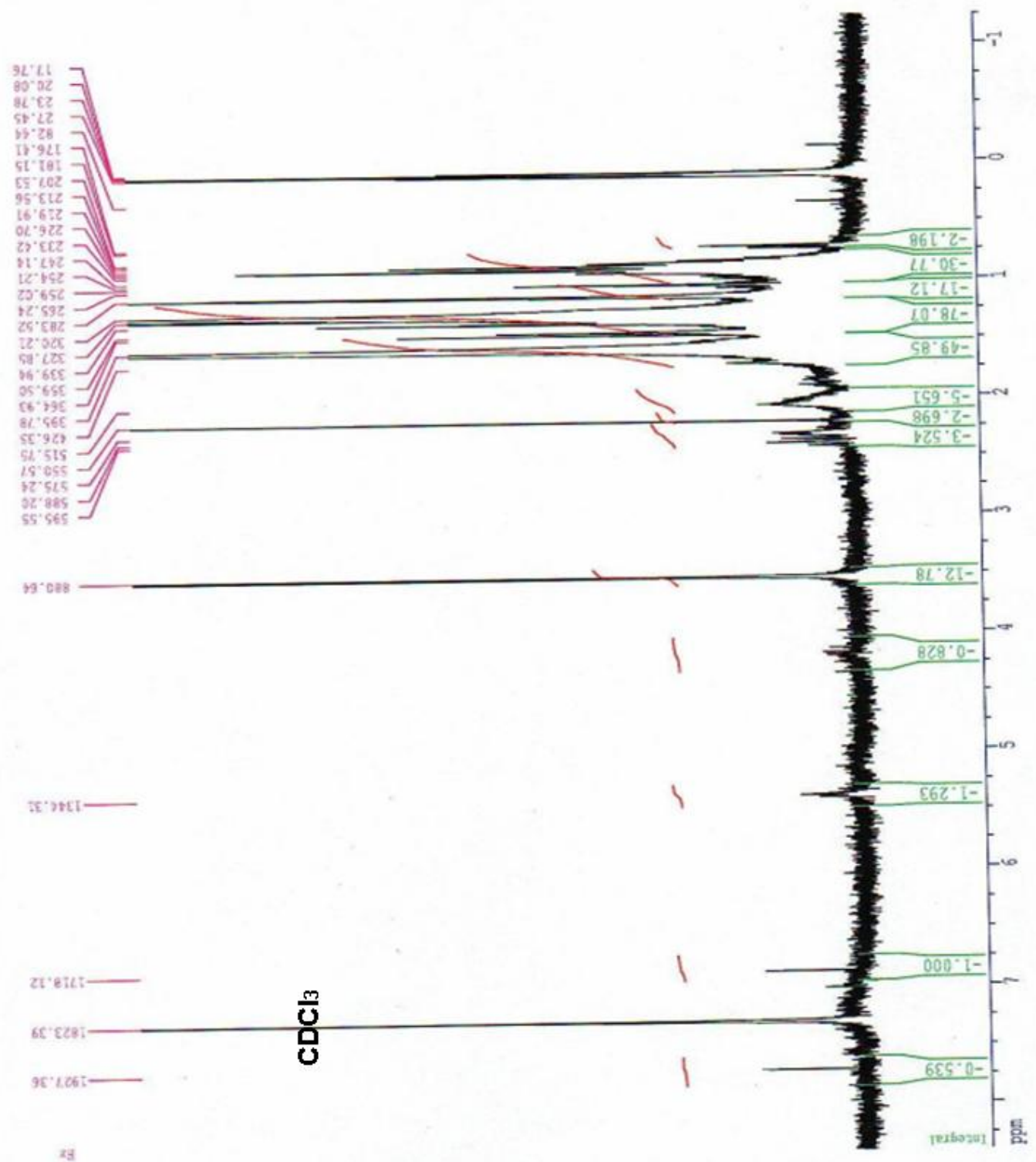
*Spectre RMN¹H du Composé C
(Étalement de la région 2 - 5 ppm):*



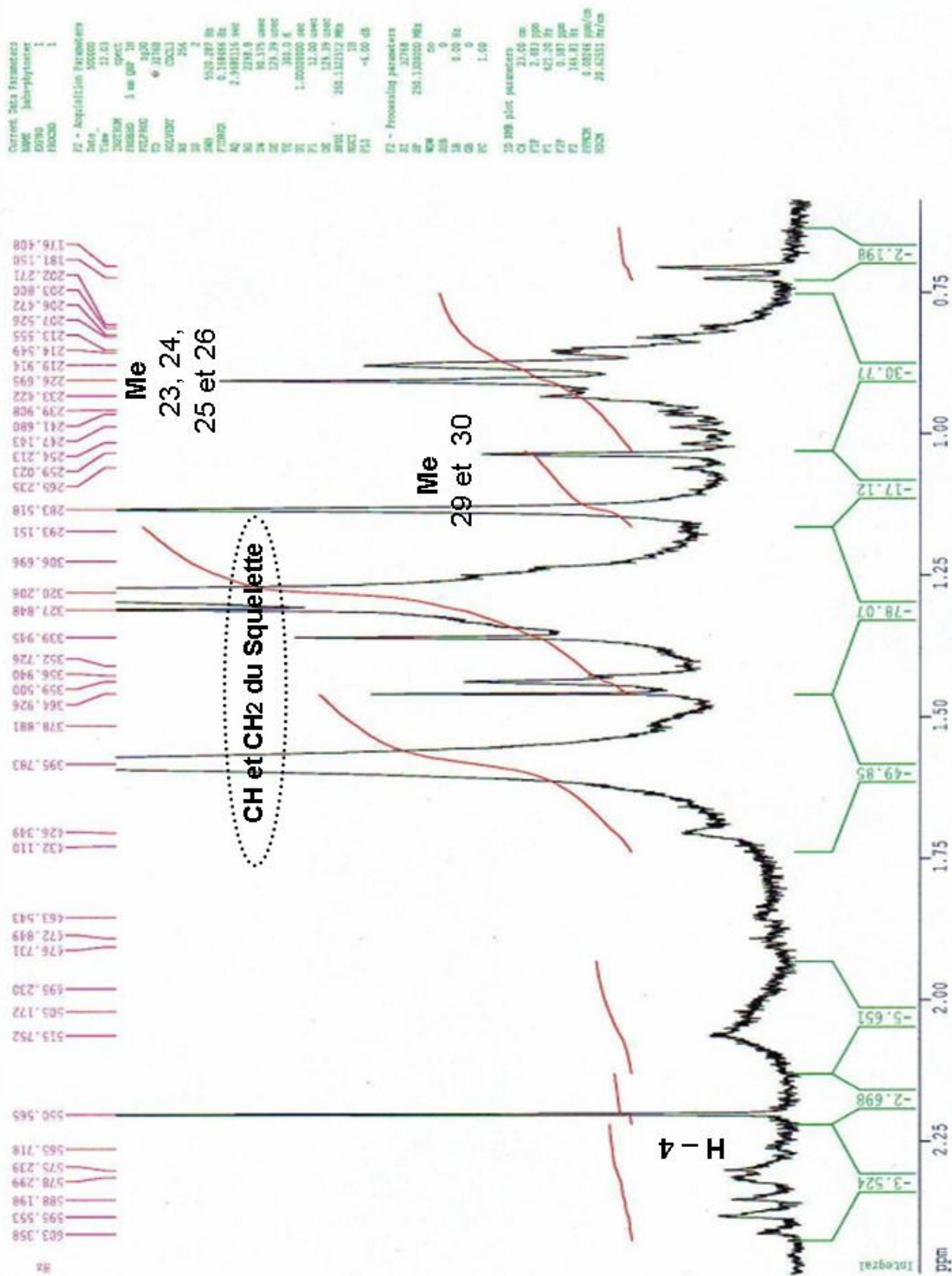
Spectre RMN¹H du Composé D :

Current Data Parameters
 NAME: Ant-ephydrocin
 EXPNO: 1
 PROCNO: 1

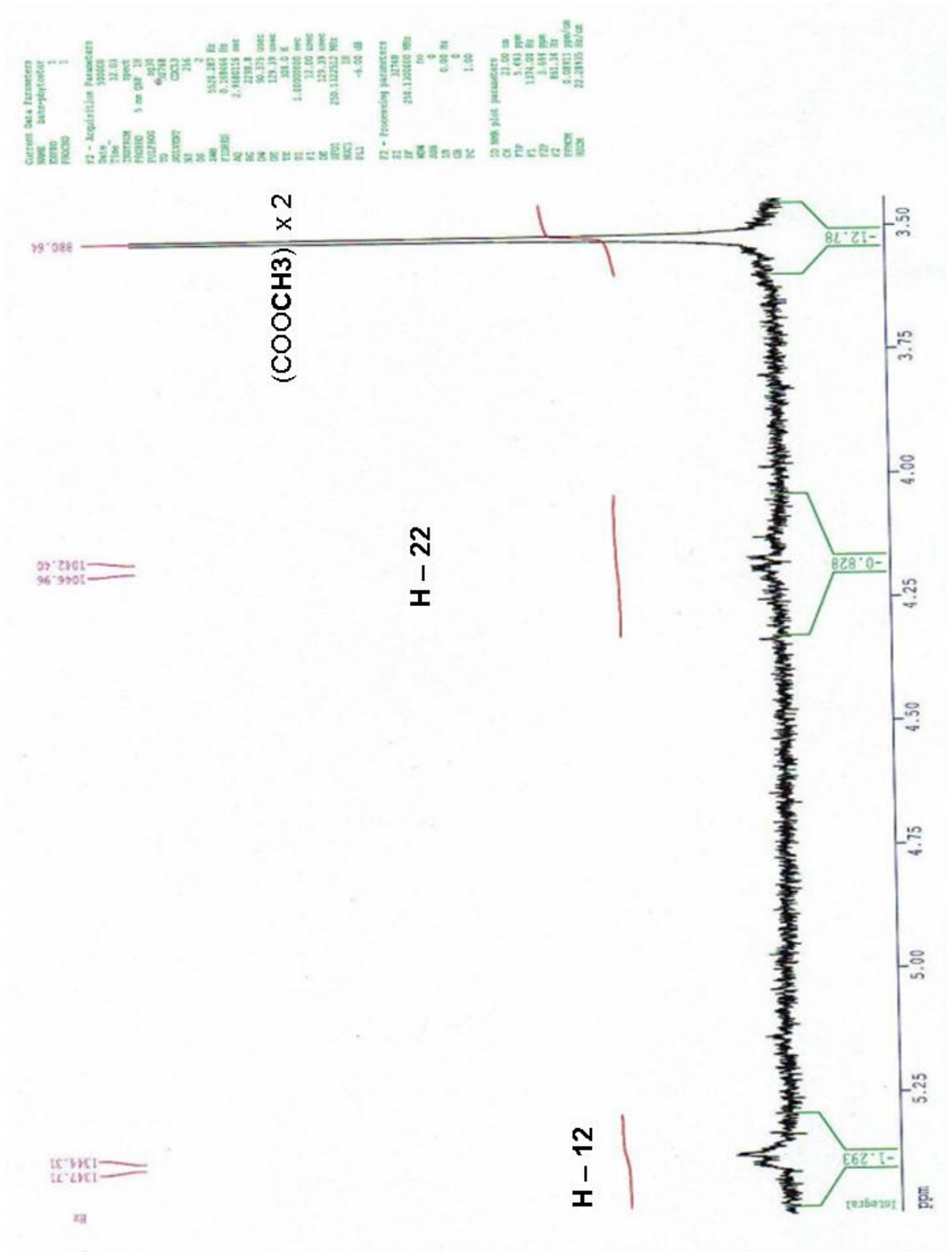
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ Time: 11.01
 Time: 11.01
 INSTRUM: spect
 PULPROG: zgpg30
 5 mm QNP 3B
 F2: 500.1361000 MHz
 F1: 12.5000000 MHz
 F0: 12.5000000 MHz
 SFO1: 250.1325312 MHz
 SFO2: 12.5000000 MHz
 SFO3: 12.5000000 MHz
 SFO4: 12.5000000 MHz
 P1: 12.00
 P2: 12.00
 P3: 12.00
 P4: 12.00
 P5: 12.00
 P6: 12.00
 P7: 12.00
 P8: 12.00
 P9: 12.00
 P10: 12.00
 P11: 12.00
 P12: 12.00
 P13: 12.00
 P14: 12.00
 P15: 12.00
 P16: 12.00
 P17: 12.00
 P18: 12.00
 P19: 12.00
 P20: 12.00
 P21: 12.00
 P22: 12.00
 P23: 12.00
 P24: 12.00
 P25: 12.00
 P26: 12.00
 P27: 12.00
 P28: 12.00
 P29: 12.00
 P30: 12.00
 P31: 12.00
 P32: 12.00
 P33: 12.00
 P34: 12.00
 P35: 12.00
 P36: 12.00
 P37: 12.00
 P38: 12.00
 P39: 12.00
 P40: 12.00
 P41: 12.00
 P42: 12.00
 P43: 12.00
 P44: 12.00
 P45: 12.00
 P46: 12.00
 P47: 12.00
 P48: 12.00
 P49: 12.00
 P50: 12.00
 P51: 12.00
 P52: 12.00
 P53: 12.00
 P54: 12.00
 P55: 12.00
 P56: 12.00
 P57: 12.00
 P58: 12.00
 P59: 12.00
 P60: 12.00
 P61: 12.00
 P62: 12.00
 P63: 12.00
 P64: 12.00
 P65: 12.00
 P66: 12.00
 P67: 12.00
 P68: 12.00
 P69: 12.00
 P70: 12.00
 P71: 12.00
 P72: 12.00
 P73: 12.00
 P74: 12.00
 P75: 12.00
 P76: 12.00
 P77: 12.00
 P78: 12.00
 P79: 12.00
 P80: 12.00
 P81: 12.00
 P82: 12.00
 P83: 12.00
 P84: 12.00
 P85: 12.00
 P86: 12.00
 P87: 12.00
 P88: 12.00
 P89: 12.00
 P90: 12.00
 P91: 12.00
 P92: 12.00
 P93: 12.00
 P94: 12.00
 P95: 12.00
 P96: 12.00
 P97: 12.00
 P98: 12.00
 P99: 12.00
 P100: 12.00



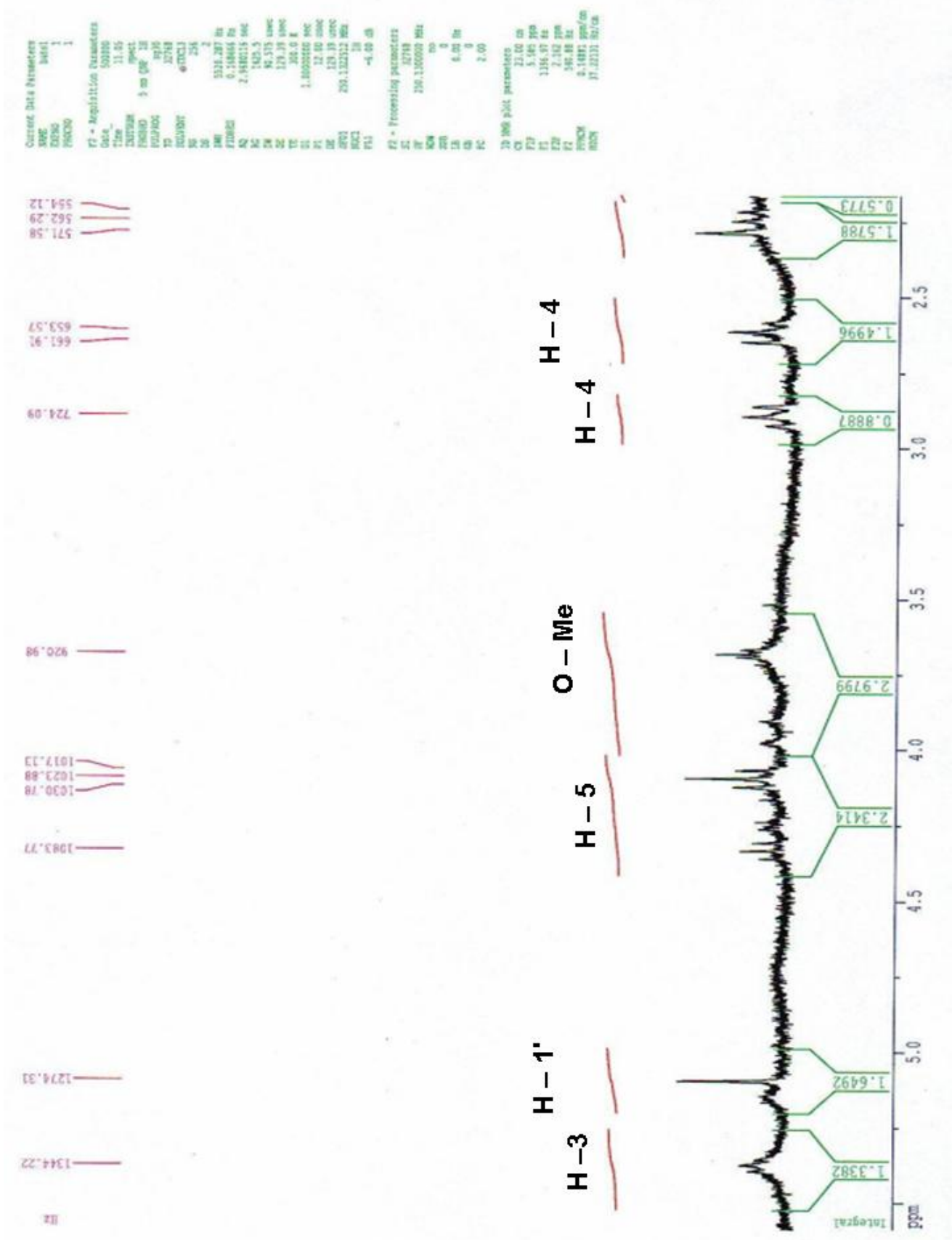
*Spectre RMN¹H du Composé D
(Étalement de la région 0,75 - 2,25 ppm):*



*Spectre RMN¹H du Composé D
(Étalement de la région 3,5 – 5,25 ppm):*



*Spectre RMN¹H du Composé E
(Étalement de la région 2,5 - 5
ppm):*



*Constantes
Physiques et
données spectrales
des composés isolés*

Composé A :

<i>Aspect</i>	Substance amorphe jaune clair
R_f	0,447 dans EP / EtOAc (9 : 1)
<i>IR</i> ν_{max} cm^{-1} (KBr)	3440,8; 2923,9; 2854,5; 1737,7; 1641,3; 1461,9; 1373,7; 700,1; 547,7.

Composé B :

<i>Aspect</i>	Substance amorphe blanche jaune.
R_f	0,355 dans EP / EtOAc (9 : 1)
<i>UV</i> λ_{max} nm (MeOH)	203 (1,116), 265 (0,074), 303 (0,042).
<i>IR</i> ν_{max} cm^{-1} (KBr)	3442,7; 2923,9; 2854,5; 2731; 1744; 1635; 1461,9; 1373,2; 968,2; 758; 723,3; 700,1.

Composé C :

<i>Aspect</i>	Substance amorphe jaune.
R_f	0,250 dans EP / EtOAc (9 : 1)
<i>IR</i> ν_{max} cm^{-1} (KBr)	3396,4; 2920; 2852,5; 1710,7; 1602,7; 1465,8; 1365,5; 1232,4; 721,3; 700,1; 497,6.
<i>RMN</i> ¹ H δ ppm (250 MHz, CDCl ₃)	0,85 (3H,S); 0,88 (3H,S); 0,91(3H,S); 0,94 (3H,S); 1,13 (6H,S); 2,05 (2H,d,J = 3,01 Hz);2,20 (1H,S);2,31 (1H,d, J = 3,56 Hz);2,38 (1H,d t, J = 1,97, 7,445 Hz); 3,52 (6H,S); 5,38 (1H,S).
<i>MS</i> m/z	576 (C ₃₃ H ₅₂ O ₈); 551; 532 (C ₃₂ H ₅₂ O ₆); 488 (C ₃₁ H ₅₂ O ₄); 459 (C ₂₉ H ₄₇ O ₄); 413; 391(C ₂₄ H ₃₉ O ₄) ; 338; 279 (C ₁₇ H ₂₇ O ₃); 261(C ₁₇ H ₂₅ O ₂); 242; 201(C ₁₅ H ₂₁); 140; 113; 59 (C H ₃ O – C O ⁺).

Composé D :

<i>Aspect</i>	Cristaux blancs.
<i>R_f</i>	0,750 dans DCM / Acétone (9 : 1) 0,275 dans DCM 100 % 0,250 dans Cyclohexane / EtOAc (4 : 1)
<i>RMN¹H δ ppm</i> (250 MHz, CDCl ₃)	0,71 (1H,d, J = 4,742 Hz); 0,86 (3H,d, J = 0,994 Hz); 0,88 (3H,S); 0,91 (3H,S); 0,93 (3H,S); 1,04 (3H,S); 1,14 (3H,S); 2,06 (2H,d, J nd); 2,20 (1H,S); 2,26 (1H,m); 2,31 (1H,d, J = 3,06 Hz); 2,38 (1H,d t, J nd, 7,58 Hz); 3,53 (6H,S); 4,18 (1H,d d, J nd, 4,56 Hz); 5,39 (1H,d d, J nd, 3,40 Hz).
<i>MS m/z</i>	576 (C ₃₃ H ₅₂ O ₈); 532 (C ₃₂ H ₅₂ O ₆); 488(C ₃₁ H ₅₂ O ₄); 448; 420(C ₃₀ H ₄₄ O); 403(C ₃₀ H ₄₃); 377; 326; 279 (C ₁₇ H ₂₇ O ₃); 241; 205(C ₁₄ H ₂₁ O); 171; 149; 105; 81.

Composé E :

<i>Aspect</i>	Résine jaune foncé.
<i>R_f</i>	0,188 dans Toluène / EP / CH ₃ COOH glacial (1 : 1 : 1).
<i>UV λ_{max} nm</i> (MeOH)	205 (2,000), 263 (0,225), 284 (0,226), 307 (0,120), 354 (0,093).
<i>IR ν_{max} cm⁻¹</i> (KBr)	3442,7; 2923,9; 2854,5; 1744; 1643,2; 1514; 1460; 1384,8; 474,5; 422,4.
<i>RMN¹H δ ppm</i> (250 MHz, CDCl ₃)	2,22 (1H,d,J = 8,17 Hz); 2,28 (1H,S); 2,61 (1H,d d d, J = 8,34 Hz, nd, nd); 2,90 (1H,d d d, J nd); 3,69 (3H,S); 4,10 (1H,t,J = 6,90 Hz); 4,34(1H,t,J nd); 5,10(1H,S); 5,39 (1H,S).

Composé F :

<i>Aspect</i>	Solide amorphe jaune.
R_f	0,666 dans EtOAc / HCOOH / CH ₃ COOH glacial / H ₂ O (100 : 11 : 11 : 27).
<i>UV</i> λ_{max} nm (MeOH)	303 (0,370).
<i>IR</i> ν_{max} cm ⁻¹ (KBr)	3670,3; 3649,1; 3381; 3001; 2914,2; 1716,5; 1652,9; 1436,9; 1406; 1315,4; 1338,5; 1028; 954,7; 900,7; 705,9; 671,2; 599,8; 518,8; 418,5.

Composé G :

<i>Aspect</i>	Solide amorphe blanc.
R_f	0,433 dans EtOAc / HCOOH / CH ₃ COOH glacial / H ₂ O (100 : 11 : 11 : 27).
<i>UV</i> λ_{max} nm (MeOH)	227 (3,078).
<i>IR</i> ν_{max} cm ⁻¹ (KBr)	3670,3; 3649,1; 3408; 3001; 1652,9; 1436,9; 1406; 1315,4; 1338,5; 1028; 954,7; 900,7; 705,9; 671,2; 599,8 ; 518,8; 418,5.

Composé H :

<i>Aspect</i>	Solide amorphe blanc.
R_f	0,233 dans EtOAc / HCOOH / CH ₃ COOH glacial / H ₂ O (100 : 11 : 11 : 27).
<i>UV</i> λ_{max} nm (MeOH)	228 (3,173), 284 (0,124).
<i>IR</i> ν_{max} cm ⁻¹ (KBr)	3406,1; 2913; 2848; 1620,1; 1595; 1379; 1353,9; 1118,8; 669,3; 601,7; 468,7.

Résumé

Un travail de criblage bioguidé préliminaire a permis de localiser une activité antidermatophyte importante au niveau de l'extrait de dichlorométhane des racines d'*Anacyclus pyrethrum* L. (Asteraceae). Le fractionnement chromatographique bioguidé de l'extrait actif de DCM a permis de situer l'activité au niveau d'un certain nombre de fractions, notamment celles enrichies en triterpènes et alkamides. De la fraction enrichie en triterpènes, quatre composés ont été isolés, dont deux identifiés formellement comme des triterpènes pentacycliques. L'extrait brut alcoolique des racines d'*A. pyrethrum*, étudié aussi dans le cadre de ce travail, a permis d'isoler quatre produits, dont un a été identifié formellement comme une pyranocoumarine, et les trois autres des dérivés phénylpropanes. La nature de ces phénylpropanes, probablement des lignanes, n'a pu être formellement établie.

Sur le volet chimique, les résultats obtenus dans le cadre de ce travail permettent une meilleure connaissance du métabolisme secondaire au niveau des racines d'*A. pyrethrum*. Le profil métabolique des racines est caractérisé par la présence de triterpènes pentacycliques, de phénylpropanes, de coumarines et d'alkamides. A part les alkamides déjà signalés par des études ultérieures, les autres types de métabolites sont cités pour la première fois dans l'espèce étudiée par la présente étude ;

Sur le volet d'activité, les résultats obtenus par le fractionnement bioguidé a permis de situer une activité antidermatophyte notable au niveau des métabolites moyennement polaires, notamment des fractions enrichies en triterpènes et en alkamides. Ces types de métabolites ont été déjà signalés comme doués d'un effet inhibiteur vis-à-vis d'autres souches fongiques. Leur activité vis-à-vis des souches de *M. canis* est signalée ici pour la première fois.

Mots clés : *Anacyclus pyrethrum*, racines, Asteraceae, criblage phytochimique, bioactivities, antifongique, triterpènes pentacycliques et coumarines.

Abstract

A preliminary biological evaluation of *Anacyclus pyrethrum* roots (Asteraceae) for antifungal effect localized a potent activity in the dichloromethane (DCM) extract. Bio guided fractionation of DCM active extract able us to track down a major activity in enriched fractions of triterpenes and alkamides. From the triterpene fraction, four compounds were isolated, from which two were formally identified as pentacyclic triterpenes. From the crude alcoholic extract of the roots, also investigated in this work, four products were isolated, one of which is a pyranocoumarin, and the other three compounds were identified as a phenylpropane derivatives. The nature of these phenylpropane, probably of lignan type, is under investigation.

From the chemical point of view, the results obtained in this work provide a better understanding of secondary metabolism in the roots of *A. pyrethrum*. The metabolic profile of the roots is characterized by the presence of pentacyclic triterpenes, phenylpropane derivatives, coumarins and alkamides. Besides the already reported alkamides, the other types of secondary metabolites are reported for the first time in this species.

From the biological point of view, the results obtained by bioguided fractionation allowed to track a significant antifungal activity in the moderately polar fractions, mainly containing triterpenes and alkamides compounds.

Key words: *Anacyclus pyrethrum*, roots, Asteraceae, phytochemical screening, bio guided isolation, antifungal, pentacyclic triterpenes and coumarins.

ملخص

إن الدراسة الاولية البيوموجهة على مستوى مستخلص جذور القنطس مكنت من تحديد فعالية مستخلص ثنائى كلور الميثان ضد الفطريات. الفصل الكروماتوغرافى البيوموجه لمستخلص ثنائى كلور الميثان الفعال سمح بتحديد الفعالية على مستوى بعض الكسور؛ خاصة منها الغنية بالتربينات الثلاثية ذات النوع الخماسى و الالكاميدات. انطلاقا من الكسر الغني بالتربينات الثلاثية ذات النوع الخماسى؛ تم فصل أربعة مركبات؛ إثنان منها تم تعيين صيغتهما الكيميائية كتربينات ثلاثية ذات النوع الخماسى. المستخلص الكحولى المجمل لجذور القنطس تمت أيضا دراسته فى إطار هذا البحث؛ سمح بفصل أربعة مركبات؛ واحد منها تم تحديد صيغته الكيميائية كبيرانوكومرين؛ و الثلاثة المتبقية منها كمشتقات الفينيل بروبان. هذه الاخيرة يحتمل أن تكون من طبيعة اللينانات.

على المستوى الكيميائى؛ النتائج المتحصل عليها فى إطار هذا البحث سمحت بالتعرف على نواتج الايض الثانوى على مستوى جذور القنطس. الجانب الأيضى للجذور متميز بوجود التربينات الثلاثية ذات النوع الخماسى؛ الفينيل بروبان؛ الكومارينات و الألكميدات باستثناء الألكميدات التى تم التعرف عليها فى دراسات سابقة؛ الأنواع الأخرى من نواتج الايض الثانوى تم التعرف عليها لأول مرة فى هذه الدراسة.

على المستوى البيولوجى؛ النتائج المتحصل عليها بواسطة الفصل الكروماتوغرافى البيوموجه سمح بتحديد الفعالية ضد الفطريات خاصة على مستوى نواتج الايض الثانوى ذات القطبية المعتدلة؛ خاصة على مستوى الكسور الغنية بالتربينات الثلاثية ذات النوع الخماسى و الالكاميدات.

كلمات المفتاح :

Anacyclus pyrethrum (القنطس الإفريقي)، جذور، Asteraceae، دراسة فيتو كيميائية، دراسة بيوموجهة، ضد الفطريات التربينات الثلاثية ذات النوع الخماسى و الكومارينات.