

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE CONSTANTINE
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT 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 molluscicides des feuilles
de *Nerium oleander* L.**

Présentée par :

Mme TRIFA WARDA, Ep. BOUDRAA

Sous la direction du :

Dr BELKHIRI ABDELMALIK

devant le jury

Présidente	Melle KABOUCHE ZAHIA	Prof. Dépt. de Chimie	UMC
Rapporteur	Mr BELKHIRI ABDELMALIK	M.C. Dépt. de Pharmacie	UMC
Examineur	Mr BELATTAR ABDELHAMID	Prof. Dépt. de Chimie	UMC
Examineur	Mr BOULEBDA NADJI	M.C. Dépt. de Pharmacie	UMC

Soutenue le : 01 /07 / 2009

REMERCIEMENTS

Mes remerciements sont d'abord au Dieu tout puissant et miséricordieux pour m'avoir donné le temps et la force de réaliser ce travail.

Ce mémoire a bénéficié du soutien de plusieurs personnes, qu'ils trouvent ici toute ma gratitude :

- en tout premier lieu, j'aimerais exprimer ma profonde reconnaissance et mes remerciements les plus sincères à mon Directeur de mémoire, Monsieur **Belkhir Abdelmalik**, Dr. et Maître de conférences au Département de pharmacie, Faculté de Médecine de Constantine (UMC). Grâce à votre appui moral, disponibilité exceptionnelle, qualités humaines et scientifiques, j'ai pu acquérir les connaissances indispensables pour m'initier à la rigueur qu'exige un travail de recherche.

Mes remerciements vont aussi aux membres de jury :

- Melle., le professeur **Kabouche Zahia**, responsable de ma promotion, vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury, malgré vos multiples occupations. Votre probité morale, votre honnêteté et votre sens du devoir seront pour nous une source inépuisable d'inspiration. C'est grâce à votre bienveillance que j'ai pu réaliser certaines analyses physico—chimiques. Veuillez agréer cher Maître, l'expression de mon profond respect ;
- Mr., le professeur **Belattar Abdelhamid**, recevez ici tous mes remerciements pour l'honneur que vous me faites de participer au jury de mon examen.
- Mr., le Dr. **Boulebd Nadji**, Maître de conférences, biologiste et pharmacologue au Département de Pharmacie de Constantine (UMC). J'ai beaucoup admiré vos qualités humaine et scientifique. Permettez-moi, Monsieur de vous réitérer, l'expression de mon profonde gratitude.

Je tiens aussi tout particulièrement à remercier Monsieur **Touil Ahmed**, Chargé de Cours et enseignant-chercheur au département de Chimie (UMC), qu'il trouve ici toute ma gratitude pour ses précieux conseils et son aide dans la réalisation d'analyses physico—chimiques. Merci pour votre gentillesse.

Les mois d'expérimentation n'auraient certes pas été supportables sans le courage, les persévérances et la bonne humeur de ma très chère amie **sousou**. Mille mercis pour ton soutien incroyable, ta patience et ta présence affectueuse à mes côtés jusqu'à la dernière minute. Merci pour les bons moments passés ensemble.

Enfin, je remercie spécialement, du fond du cœur à mes collègues et amies. Merci pour votre bonne amitiés et soutien.

Merci

DÉDICACES

Je dédie ce travail :

- ✓ A mon père, pour tous les efforts consentis.
- ✓ A ma mère, pour tous les conseils que tu m'as prodigués et pour toutes les souffrances que tu as endurées, je te dis infiniment merci.

Veillez recevoir ce travail comme un début de récompense de tous vos efforts. Que Dieu vous récompense pour tout ce que vous avez fait et vous accorde encore de nombreuses et belles années de vie aux côtés de vos enfants.

- ✓ A mes grandes mère : pour leurs prières et leur bénédiction.
- ✓ A mes frères : **Farid** et **Amer**, merci de m'avoir soutenue pendant ces années d'études.
- ✓ A mes sœurs

Fifau, durant ce travail j'ai bénéficié de tes encouragements, tes conseils éclairés et ta présence chaleureuse. Retrouve ici toute ma reconnaissance.

Ma petite chère sœur **Widad**, ce travail est aussi le fruit de ton soutien moral, matériel et financier.

Que Dieu nous garde tous unis, car c'est ainsi que nous serons plus forts.

- ✓ A mes cousins et cousine : **khaled, Chouaib, Houssam, Hicham** et **Zahra**
J'espère que ce travail donnera aux plus jeunes, l'envie d'étudier.

- ✓ A mon neveu **Rofi**, ton joie, ton gaieté et ton insouciance me comble de bonheur.

Puisse Dieu te garde et éclaire ta route.

- ✓ A mon cher époux **Fateh** et à sa famille

Je ne saurais trouver les mots pour t'exprimer mes sentiments. Alors je te dirai tout simplement merci pour tes encouragements, ta confiance, ta patience et

surtout ta compréhension m'ont été indispensables pour la réalisation de ce mémoire. Sois assuré de ma fidélité infini.

Merci à ta famille pour les encouragements et aussi de m'avoir accepté parmi les siens. Ce travail est aussi le vôtre.

- ✓ A ma chère amie **Kawter**, pour toutes ces années passées ensemble, pour ton amitié et pour ton soutien. Tu auras toujours une place spéciale dans mon cœur.
- ✓ A mes amies et sœurs : qui ont répandue présent à chaque fois que j'avais besoin d'eux. merci

Rosa

SOMMAIRE

Remerciements.....	I
Dédicace.....	III
Abréviation.....	1
Introduction.....	3

Première partie : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I:	GÉNÉRALITES SUR LA BILHARZIOSE	
A.	ÉPIDEMIOLOGIE DE LA BILHARZIOSE.....	6
1.	Historique.....	6
2.	Agents pathogènes.....	7
2. 1.	Classification du parasite.....	7
2. 2.	Espèces de genre <i>Schistosoma</i>	8
3.	Répartition géographique.....	9
4.	Cycle de vie du Schistosome.....	10
4. 1.	Caractères propres à chaque espèce.....	12
4. 2.	Symptomatologie de la bilharziose	12
B.	LUTTE CONTRE LA BILHARZIOSE.....	13
1.	Traitements médicamenteux.....	13
1. 1.	VANSIL® (oxamniquine).....	13
1. 2.	BILTRICIDE® (praziquantel).....	13
1. 3.	BILARCIL® (metrifonate).....	14
1. 4.	AMBILHAR® (niridazole).....	14
2.	Prophylaxie.....	14
2. 1.	Molluscicides de synthèse.....	15
2. 2.	Molluscicides naturels	16

Chapitre II: ASPECTS BOTANIQUE, CHIMIQUE ET PHARMACOLOGIQUE
DE *Nerium oleander*

A. ASPECT BOTANIQUE.....	20
1. Famille Apocynaceae.....	20
2. Genre <i>Nerium</i>	21
3. Espèce <i>Nerium oleander</i>	21
3. 1. Taxonomie.....	22
3. 2. Description botanique.....	22
3. 3. Distribution géographique.....	23
B. ASPECT CHIMIQUE.....	25
1. Famille Apocynaceae.....	25
2. Genre <i>Nerium</i>	27
3. Espèce <i>Nerium oleander</i>	29
C. ASPECT PHARMACOLOGIQUE.....	32
1. Famille Apocynaceae.....	32
2. Genre <i>Nerium</i>	33
3. Espèce <i>Nerium oleander</i>	33
3. 1. Utilisations traditionnelles dans le monde.....	33
3. 2. Propriété pharmacologie.....	34
4. Toxicités du <i>Nerium oleander</i>	35

Chapitre III : ETUDES DES STEROIDES ET HETEROSIDES
CARDIOTONIQUES

A. INTRODUCTION.....	36
1. Étymologie.....	36
2. Classification et répartition.....	36
3. Origine biosynthétique.....	37
3. 1. Séquences de condensation des unités isopréniques (IPP et DMAPP).....	38
3. 2. Formation des triterpènes et stéroïdes végétaux....	40
4. Nomenclature.....	44
5. Intérêts pharmacologiques et bioactivités des stéroïdes.....	45

B. HÉTÉROSIDES CARDIOTONIQUES.....	46
1. Localisation et répartition dans le règne végétal.....	46
2. Biosynthèse du noyau cardénolide.....	48
3. Structures et propriétés physico-chimiques des hétérosides cardénolides.....	49
3. 1. Partie génine.....	49
3. 2. Partie sucre.....	50
4. Méthodes d'analyse.....	51
4. 1. Réactions de caractérisation.....	51
4. 1. 1. Réactions générales.....	51
4. 1. 2. Réactions spécifiques.....	51
4. 2. Caractérisation par spectroscopie UV.....	52
4. 3. Caractérisation par spectroscopie IR.....	52
4. 4. Caractérisation par spectroscopie RMN.....	53
5. Intérêt thérapeutique des hétérosides cardénolides	54

Deuxième partie : MATERIELS ET METHODES

1. Matériel végétal et extraction.....	55
1. 1. Matériel végétal.....	55
1. 2. Méthode d'extraction.....	55
2. Méthodes chromatographiques.....	57
2. 1. Chromatographie sur couche mince analytique.....	57
2. 2. Chromatographie sur couche mince préparative....	57
2. 3. Chromatographie sur colonne (CC).....	58
3. Réactifs révélateurs de produits naturels.....	59
4. Méthodes d'analyses spectrales.....	60
4. 1. Analyse par spectrophotométrie (UV).....	60
4. 2. Analyse par RMN du proton (RMN ¹ H).....	60
5. Méthode d'évaluation de l'activité molluscicide.....	61
5. 1. Montage expérimental.....	61
5. 2. Collecte et préparation des mollusques.....	61
5. 3. Mesure de l'activité molluscicide.....	62
5. 4. Protocole utilisé dans cette étude.....	63

5. 4. 1.	Criblage des extraits bruts.....	63
5. 4. 2.	Évaluation de l'activité de composé isolé W ₄	64
5. 5.	Traitements statistiques des données.....	64

Troisième partie : **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

1.	Évaluation de l'activité des extraits bruts.....	65
2.	Fractionnement de l'extrait actif (AE) et isolement des hétérosides cardénolides.....	67
2. 1.	Caractérisation phytochimique de l'extrait actif (AE)	67
2. 2.	Fractionnement par colonne chromatographique...	70
2. 3.	Purification des lots 14 et 16.....	71
2. 3. 1.	Résultat du fractionnement du lot 14.....	71
2. 3. 2.	Résultat du fractionnement du lot 16.....	72
3.	Analyses structurales des cardénolides isolées.....	74
3. 1.	Composé W₁	74
3. 1. 1.	Caractéristiques physico-chimique et chromatographique.....	74
3. 1. 2.	Données structurales.....	74
3. 2.	Composé W₂	76
3. 2. 1.	Caractéristiques physico-chimique et chromatographique.....	76
3. 2. 2.	Données structurales.....	77
3. 3.	6.3 Composé W₄	78
3. 3. 1.	Caractéristiques physico-chimique et chromatographique.....	78
3. 3. 2.	Données structurales.....	79
4.	Évaluation de l'activité molluscicide du cardénolide W ₄	88
	CONCLUSION.....	91
	RÉFÉRENCES.....	94
	ANNEXES	
	ANNEXE BIOLOGIQUE.....	104
	LES SPECTRES RMN ¹ H DE COMPOSÉ IDENTIFIÉ.....	105
	CONSTANTES PHYSIQUES ET DONNÉES SPECTRALES DES COMPOSÉS ISOLÉS	109

ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

δ	: Déplacement chimique (RMN)
λ_{\max}	: Longueur d'onde maximale d'absorption (UV)
\varnothing	: Diamètre
AE	: Acétate d'éthyle
CC	: Colonne chromatographique
CCM	: Chromatographie sur couche mince
CHCl_3	: Chloroforme
CDCl_3	: Chloroforme deutéré (RMN)
CONT	: Contrôle
<i>d</i>	: Doublet
<i>dd</i>	: Doublet de doublet
<i>Di</i>	: Digitoxine
<i>DMAPP</i>	: Diméthylallylpyrophosphate
<i>DMSO</i>	: Diméthyl sulfoxide
EE	: Ether d'éthylque
EP	: Ether de pétrole
EtOH	: Ethanol
F, Fract	: Fraction
J	: Constante de couplage (RMN)
lpp	Isoprénique
M	: Molarité
m	: Multiplet (RMN)
MeOH	: Méthanol
MHZ	Méga Hertz
<i>N.oleander</i>	: Espèce <i>Nerium oleander</i>
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé

Prép	: Préparative
ppm	: Unité de δ (partie par million= 10^{-6} , RMN)
R _f	: Rapport frontal (CCM)
RR _f	: Rf relatif à la digitoxine
RMN ¹ H	: Résonance Magnétique Nucléaire du proton
s	: Singulet (RMN)
Sys	: Système solvants
t	: Triplet (RMN)
UV	: Spectrométrie / rayonnement dans le domaine de l'ultra-violet.
VS	: Vanilline sulfurique
W	: Symbole utilisé pour les composés isolés

INTRODUCTION

Introduction :

Dans plusieurs régions tempérées et tropicales, les infections parasitaires demeurent une des premières causes de morbidité et d'invalidité, notamment dans les pays du tiers monde. Si ces pathologies mutilent et parfois tuent, elles limitent toujours l'épanouissement du potentiel humain.

Même éliminées ou simplement contrôlées, ces maladies ont un coût élevé dans le budget des soins de santé. Elles constituent un problème de santé publique. **(Nayama. M. et col., 2007)**

Les bilharzioses ou schistosomiasés sont des maladies parasitaires humaines, Connues depuis l'antiquité, due à la présence dans l'organisme de vers trématodes. Ce parasite présente un cycle de vie faisant intervenir, à côté de l'homme, un mollusque ou escargot hôte. **(Ramanantsizehena. P. et col., 2005; Nayama. M. et col., 2007).**

Actuellement, la bilharziose est considérée comme la deuxième maladie parasitaire après le paludisme à travers le monde. **(Silva. T. M. et col., 2005).**

Dans les zones d'endémie, notamment en Afrique, la bilharziose reste un problème de santé publique majeur **(Raccurt. C.P. et col., 2007)**. Bien que l'incidence de cette maladie en Algérie soit relativement minime par rapport à d'autre pays, il existe cependant plusieurs foyers actifs de ce parasite.

La politique de développement que poursuit notre pays depuis son indépendance, notamment en matière d'agriculture et de développement des barrages, risque fort de multiplier les foyers actifs déjà existants, à l'image de ce qui se passe en Égypte. Dans ce pays la bilharziose représente un problème majeur de santé. Malgré les efforts de contrôle de la bilharziose en Egypte, cette maladie continue d'occasionner des dégâts sur les populations, notamment vivants dans les zones agricoles humides rurales **(Van Schauck. C. P., 1986; Mehat. A. et col., 1993).**

Ce travail s'insère dans un projet national de recherche de substances naturelles à activité molluscicide.

Une étude préliminaire d'évaluation d'un certain nombre d'espèces végétales algériennes a permis d'identifier une liste de plantes potentiellement molluscicide. L'extrait aqueux des feuilles du *Nerium oleander*, un arbuste commun des littoraux, appartenant à la famille des Apocynaceae, s'est révélé particulièrement toxique envers les mollusques-hôtes du parasite.

La nature de ou des agents chimiques responsables de l'effet molluscicide des feuilles de *N. oleander* reste indéterminée.

Ce travail de magister fait suite à l'étude précédente, est à comme objectif spécifique : la caractérisation chimique de ou des principes à effet molluscicide des feuilles de *N. oleander*.

Pour ce faire, le protocole de travail s'articule sur les étapes suivantes :

- Criblage biologique d'un gradient d'extraits bruts et fractionnement bioguidé
- Purification et détermination de structure des molécules isolées des fractions actives
- Evaluation de l'activité des molécules isolées

Le manuscrit est divisé en trois sections :

La première partie, essentiellement bibliographique, concerne des données générales sur les bilharzioses (maladie, son incidence, son traitement), sur le *Nerium oleander* (aspects botanique, chimique et thérapeutique) et une étude restreinte sur les hétérosides cardiotoniques, principal type de métabolites secondaires isolées dans cette étude.

La deuxième partie, concerne la partie expérimentale, où sont détaillés le matériel et méthodes physico-chimique et biologique, utilisés dans le cadre de cette étude.

La troisième partie, regroupe les résultats et la discussion.

Une conclusion générale et les références bibliographiques, ainsi que des annexes clôturent ce manuscrit.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

GÉNÉRALITES SUR LA BILHARZIOSE

A. EPIDEMIOLOGIE DE LA BILHARZIOSE

1. Historique :

La bilharziose ou schistosomiase, sous ses diverses formes, est une maladie parasitaire, transmise à l'homme par des vers trématodes. Connue depuis l'Antiquité, elle se place aujourd'hui dans les statistiques de l'OMS comme la seconde maladie après la malaria (**Rawi. S. M. et col., 1996; Silva. T. M. et col., 2005**). Quelques faits historiques associés à la bilharziose sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1 : historique de la bilharziose (**Konde. H., 2005**)

Année	Événement/découverte
Au moyen âge	les médecins arabes parlent de « pissement de sang » des caravaniers revenant de Tombouctou.
1847	Au Japon, la maladie de KATAYAMA , aujourd'hui synonyme de la schistosomiase aiguë, a été signalée.
1851	THEODOR BILHARZ , un jeune pathologiste allemand découvre le parasite dans la veine d'un jeune Fellah et lui donne son nom.
1854	ZANCAROL parle pour la 1 ^{ère} fois de la pathologie urétérale. Il rapporte l'observation d'un uretère de la taille d'un intestin grêle.
1910	Sir ARMAND RUFFER décrivait les œufs typiques de <i>Schistosoma haematobium</i> trouvés dans les reins de deux momies égyptiennes datant de 1250 à 1000 ans avant Jésus Christ.
1913	KENOSURE MIYARI et MASATSUGU SUZUKI découvrent l'hôte intermédiaire et reconstituent le cycle biologique du parasite chez l'escargot.
1915	ROBERT LEIPER établi au Caire le cycle complet de la maladie.
1917	deux égyptiens DIAMANTIS et LOTSY présentent un cas de bilharziose urétéo-vésicale diagnostiquée par la radiographie grâce aux calcifications vésicales et urétérales.
1919	la tendance de la bilharziose à envahir les uretères et à entraîner l'hydronéphrose fut établie par FAIRLEY .
1937	les aspects urographiques de la bilharziose urétérale furent publiés par VERMOOTEEN .
1948	En Egypte, MAKAR fait le point des lésions anatomiques de l'uretère bilharzie.
1955	PIGANIOL et HERVE établirent le retentissement des sténoses et des atonies urétérales sur le haut appareil urinaire.
1961	THIRAUT.M contribue à l'étude du traitement chirurgical des sténoses urétérales d'origine bilharzienne.

Selon L'OMS, en 1998(Konde. H., 2005) on estime à 200 millions, le nombre de personnes atteintes dans le monde tandis que 500-600 millions encourent le risque d'être infestés par les schistosomoses (Silva. T. M. et col., 2005 ; Nayama. M. et col., 2007). La morbidité observée chez les populations humaines infectées est essentiellement liée à l'étonnante fécondité du parasite femelle dont les œufs, pondus par centaine chaque jour, sont piégés dans de nombreuses muqueuses et tissus, ce qui est à l'origine de la pathologie (Adewunmi. C. O., 1991).

2. Agents pathogènes :

Les bilharzioses humaines, sont dues au développement de vers appartenant à la classe des trématodes et au genre *Schistosoma* (Strahan K. et col., 1991; Morgam. J.A. T. et col., 2003; Silva. T. M. et col., 2005).

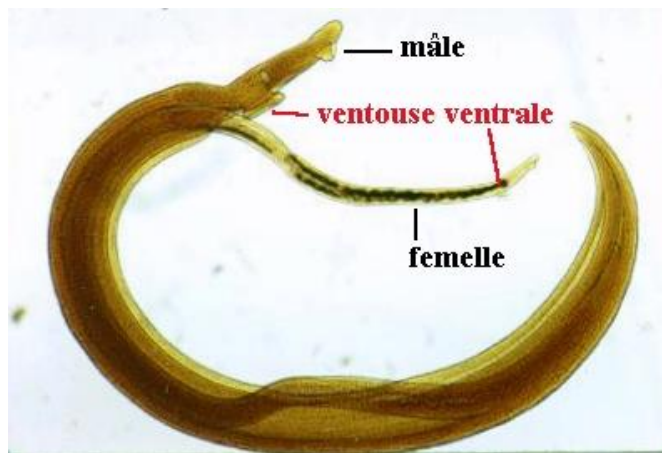


Figure 1: Anatomie des *Schistosoma*

2.1. Classification du parasite :

Règne	<i>Animalia</i>
Embranchement	<i>Platyhelminthes</i>
Classe	<i>Trematoda</i>
Sous-classe	<i>Digenea</i>
Ordre	<i>Strigeatida</i>
Famille	<i>Schistosomatidae</i>
Genre	<i>Schistosoma</i>

2.2. Espèces de genre *Schistosoma* :

Les bilharzies (ou schistosomes) sont des parasites sanguins, minuscules vers plats vivant souvent en très grand nombre, dans les vaisseaux sanguins de l'abdomen.

Cinq espèces sont pathogènes pour l'homme (**N'goran. E. et col., 1997**):

- *Schistosoma haematobium*
- *Schistosoma mansoni*
- *Schistosoma intercalatum*
- *Schistosoma japonicum*
- *Schistosoma mekongi*

Les manifestations cliniques initiales de la maladie sont, soit vésicales ou intestinales. D'autres organes sont envahis par les œufs de ces vers, le foie et la rate étant les deux cibles privilégiées (**Klotz. F. et col., 1998**).

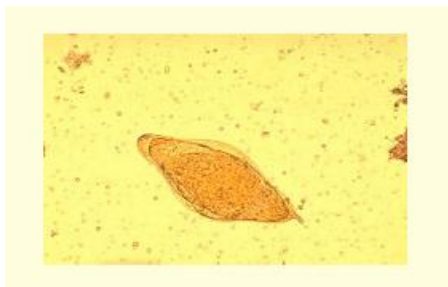
S.haematobium : bilharziose urogénitale



S.mansoni : bilharziose intestinale



S.intercalatum : bilharziose rectale



S. japonicum: bilharziose hépatosplénique

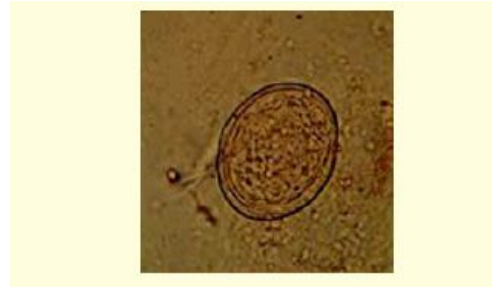


Figure 2: Œufs caractérisant les espèces de *Schistosoma*.

3. Répartition géographique :

Cette parasitose, retrouvée dans 74 pays en zones tropicales et subtropicales en Afrique (figure 3), en Amérique du sud et en Asie (tableau 2) (Ansart. S. et col., 2002), est responsable d'environ 500 000 décès chaque année (Ramanantsizehena. P. et col., 2005; Silva. T. M. et col., 2005).

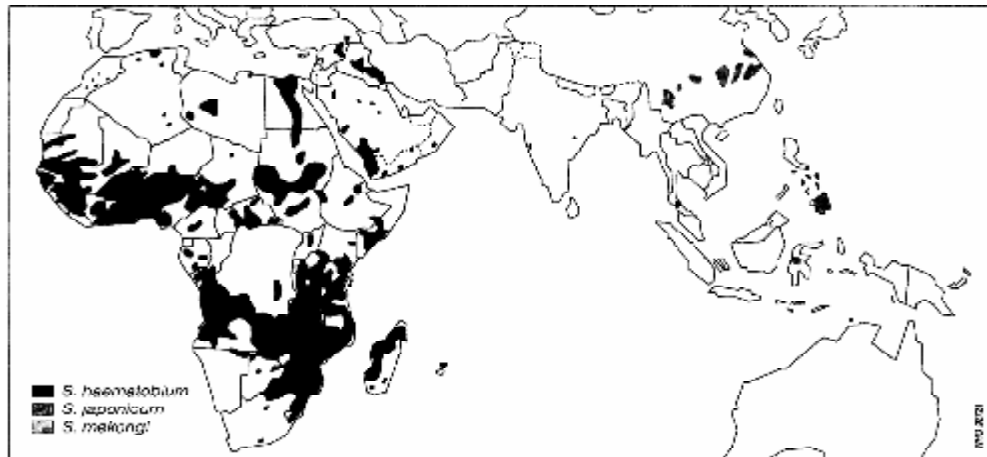


Figure 3 : Distribution mondiale de la schistosomiase due à *S.haematobium*, *S.japonicum* et *S.mekongi*, 1986.

La répartition géographique de chaque espèce est variable (Arfaa. F. et col., 1989; Klotz. F. et col., 1998; Morgam. J.A. T. et col., 2003). et présentée dans le tableau ci-dessous:

Tableau 2: Répartition schistosomes par espèces dans le monde.

<i>S.haematobium</i>	Afrique du nord, Afrique subsaharienne, Madagascar (ouest).
<i>S.mansoni</i>	Proche-Orient, Afrique intertropicale, Madagascar (est), Amérique latin, Antilles.
<i>S.intercalatum</i>	Afrique équatoriale.
<i>S.japonicum</i>	Asie : Chine, Philippines, Indonésie.
<i>S.mekongi</i>	Cambodge, Laos.

En Algérie, il existe trois foyers actifs dans les oasis sahariennes des régions de Djanet, de Béni Abbés et de Biskra et au nord dans la région d'Alger (plaine de la Mitidja, foyers de Reghaia et du Gué de Constantine) enfin près d'Oran (foyer de Jdioua).

4. Cycle de vie du Schistosome :

Ce cycle est identique pour toutes les espèces ; seuls changent les mollusques hôtes intermédiaires qui, par leurs exigences propres, leur présence ou leur absence, rendront possible ou non la transmission dans une région donnée (**Adewunmi. C. O., 1991**). Après avoir atteint leur maturité sexuelle dans le système porte, les femelles fécondées pondent des œufs dans les capillaires. Pour poursuivre leur évolution, ces œufs devront sortir du capillaire et traverser la paroi d'un organe creux pour tomber dans la lumière et être éliminés avec les *excreta*. Cette phase de migration des œufs est extrêmement importante car elle explique toute la pathologie de l'affection. Elle est longue (un ou deux mois) et ceci entraîne des conséquences sur la surveillance des traitements. Elle est toujours incomplète : beaucoup d'œufs restent prisonniers des réactions de l'organisme (granulome à corps étranger) (**Adewunmi. C. O., 1991**).

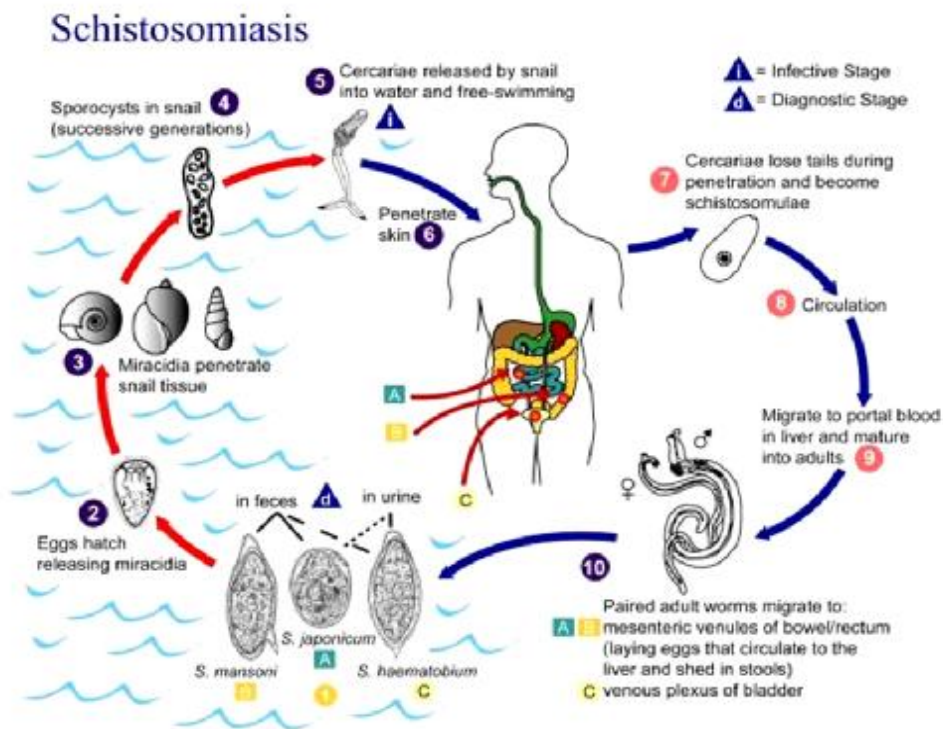


Figure 4: Cycle évolutif des schistosomes.

Les **œufs** présents dans les selles ou dans les urines sont embryonnés ; ils contiennent une larve prête à éclore. En milieu aquatique (eau douce), la coque de

l'œuf se rompt et larve ciliée (ou **miracidium**) commence à nager activement à la recherche d'un mollusque hôte intermédiaire. S'il ne trouve pas ce dernier, le miracidium meurt en quelques heures (**Klotz. F. et col., 1998**).

Dans le cas contraire, après pénétration, le parasite passe par plusieurs formes larvaires successives (**sporocystes**) qui assurent une multiplication sous forme larvaire. Cette phase permet, à partir de chaque miracidium, d'obtenir de très nombreuses formes larvaires terminales, les cercaires. Ces dernières émergent activement du mollusque.

Les **furcocercaires** nagent librement dans l'eau mis sont attirées par l'homme : un chimiotactisme puissant, bas sur les sécrétions cutanées, les amène à se fixer sur la peau qu'elles traversent après s'être débarrassées de leur appendice caudal. C'est à l'occasion d'un bain, de la traversée d'un cours d'eau et plus encore des travaux qui nécessitent un contact avec l'eau que la contamination s'effectue. Si, au bout de quelques heures de sa courte vie libre, la cercaire n'a pas trouvé son hôte elle meurt (**Marston. A. et col., 1993**).

Dans l'organisme de l'hôte, la larve est entraînée, probablement par la circulation lymphatique, jusqu'à la grande circulation. A partir de 48 heures, et pendant plusieurs jours, on peut trouver des larves (schistosomules) dans les capillaires pulmonaires puis dans le cœur où elles sont amenées par les veines pulmonaires. De là, par l'artère hépatique, elles arrivent au foie.

C'est dans les plexus veineux du système porte que se fait la maturation et que se passe l'accouplement avant que les **adultes** ne migrent pour aller pondre dans leur territoire d'élection. Leur longévité chez l'homme est considérable et peut atteindre vingt ans (**Marston. A. et col., 1993**).

4.1. Caractères propres à chaque espèce :

- Les mollusques hôtes intermédiaires de *S. mansoni* sont les planorbes. Ce sont des gastéropodes pulmonés appartenant au genre *Biomphalaria* **(Belkacem. M. et col., 2006)**.
- *S. haematobium* et *S. intercalatum* sont également transmis par des pulmonés appartenant au genre *Bulinus* (et couramment dénommés bulins) **(Baluku. B. et col., 1989; Dobo. A. et col., 1997; Belkacem. M. et col., 2006)**.
- *S. japonicum* et *S. mekongi* sont par contre transmis par un prosobranche du genre ***Oncomelania***, beaucoup plus amphibie **(Wajdi. N., 1996; Morgam. J.A. T. et col., 2003; Belkacem. M. et col., 2006)**.

4.2. Symptomatologie de la bilharziose :

Les symptômes rencontrés dépendent de l'espèce du schistosome qui a infesté l'individu.

Le signe le plus courant est une démangeaison et une rougeur à l'endroit où le parasite a pénétré dans la peau « démangeaison du nageur » **(Klotz. F. et col., 1998)**.

Après quelques semaines, d'autres signes peuvent apparaître en fonction des organes atteints **(Adewunmi. C. O., 1991)** :

- Du sang dans les urines
- Une sensation de brûlure lorsque la personne urine
- Une envie plus fréquente d'uriner
- Du sang dans les selles
- Des diarrhées
- Des douleurs musculaires
- De la fièvre
- Des vomissements
- De la toux
-

B. LUTTE CONTRE LA BILHARZIOSE

Le traitement de la bilharziose est réalisé selon deux schémas :

1. Traitements médicamenteux (lutte contre le parasite adulte) :

L'attitude thérapeutique est équivoque : toute bilharziose évolutive doit être traitée afin d'éviter le risque de complication. L'abstention est possible dans le cas de bilharzioses anciennes, asymptomatiques, manifestement éteintes (œufs morts, taux très bas d'anticorps) (Ansart. S. et col., 2002). Les médicaments à retenir sont ;

1.1. VANSIL[®] (oxamniquine) :

Efficace uniquement dans la bilharziose à *S. mansoni*.

La posologie habituelle est de 15mg/kg, en une seule prise, elle peut sans inconvénient être majorée à 20mg/kg ou plus, La tolérance est très bonne, seuls quelques vertiges ont été constatés (Konde. H., 2005).

1.2. BILTRICIDE[®] (praziquantel) :

Est efficace sur tous les schistosomes (Ansart. S. et col., 2002) à la dose de 40mg/kg en 1à3 prises en un seul jour chez l'adulte. La tolérance est bonne ; les échecs, peu nombreux, réagissent à une seconde cure. Les effets secondaires : nausées, vertiges, douleurs ou crampes épigastriques et de fièvre au long court. Son principal inconvénient est son prix de revient élevé qui limite son utilisation en traitement de masse (Adewunmi. C. O., 1991; Klotz. F. et col., 1998).

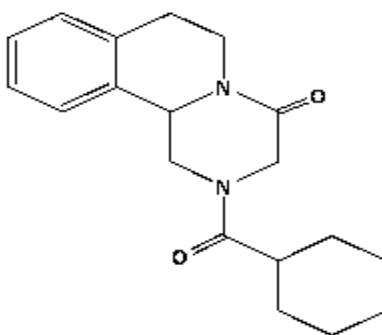


Figure 5:Structure de praziquantel

1.3. BILARCIL® (metrifonate) :

Il est présenté en comprimés dosés à 100mg. Il s'administre à la dose de 7.5 à 10mg/kg en 2 prises à 15 jours ou 3 semaines d'intervalle. Les effets secondaires : nausées, vomissement, douleurs abdominales **(Konde. H., 2005)**.

1.4. AMBILHAR® (niridazole) :

Il est présenté en comprimés dosés à 500mg. Il s'administre à la dose de 25mg/kg chez l'adulte, 30 à 35mg/kg chez les enfants en deux prises journalières pendant 7 jours. Les effets secondaires : troubles de la repolarisation, céphalées, vertiges **(Konde. H., 2005)**.

Quel que soit le produit utilisé, le résultat du traitement doit toujours être contrôlé biologiquement car aucun traitement de la bilharziose n'est efficace à 100%.

2. Prophylaxie :

La chimiothérapie antiparasitaire permet la réduction du taux de prévalence de la bilharziose mais l'endémie se poursuit par réinfection. La prophylaxie reste le meilleur moyen de lutte contre la maladie **(Schall. V. T. et col., 2001)**.

Les actions de lutte sont de deux natures :

- Prophylaxie générale, reposant sur l'interruption du cycle évolutif des schistosomes **(Klotz. F. et col., 1998) :**

- lutte anti mollusque (molluscicides, prédateurs, compétiteurs) ;

- lutte contre le péril fécal (éducation et équipement sanitaires).

- Prophylaxie individuelle reposant sur des mesures sanitaires et des mesures médicales **(Klotz. F. et col., 1998; Ansart. S. et col., 2002) :**

- éviter les bains en eau douce en région d'endémie ;

- dépistage et traitement des populations atteintes en zones d'endémie ;

- recherches en cours sur la vaccination.

L'organisation de la lutte contre les mollusques hôtes constitue une des mesures prophylactiques capitales, très étudiées par l'OMS et par les divers gouvernements intéressés.

La lutte antimollusque est réalisée principalement par l'utilisation de molluscicide de synthèse et par une approche biologique :

2.1. Molluscicides de synthèse :

Parmi les agents molluscicides de synthèse (**Marston. A. et col., 1985; Perrett. S. et col., 1996**), on retrouve des molécules tels que :

- **Niclosamide :**

Il est utilisé comme molluscicide de référence depuis les années 1960, très actif à l'égard de tous les mollusques (**Khallaayoune. K. et col., 1998**).

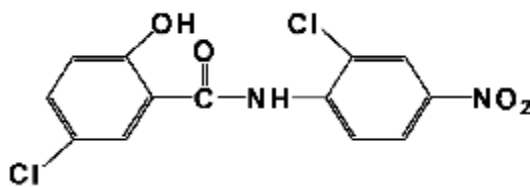


Figure 6: Structure de Niclosamide

- **B-2(sodium 4-bromo2,5-dichlorophenol) :**

Utilisé au Japon contre *Oncemelania mosophora*, en Afrique du sud.

- **Sulfate de cuivre :**

Efficace dans certaines conditions ; inactive à $\text{pH} \geq 9$, utilisé en Egypte.

- **Na PCP(sodium penta chlorophenate) :**

Il est concerné en 1965, utilisé en Chine.

En plus de leur coût de revient élevé, les agents molluscicides de synthèse sont déversés en grande quantité dans les foyers d'endémie et posent d'énormes problèmes à l'environnement par leur impact néfaste sur l'écosystème aquatique dans lequel ils sont employés (les produits chimiques qui tuent les mollusques tuent aussi les poissons; exemples le B-2 et le sulfate de cuivre) (**Marston. A. et col., 1985; Adewunmi. C. O., 1991**).

2.2. Molluscicides naturels :

Les molluscicides naturels d'origine végétale sont d'une actualité croissante en vue d'une application éventuelle comme moyen de lutte et de contrôle de la schistosomiase. Ils pourraient offrir un double avantage sur les molluscicides de synthèse, car ils sont moins polluants (produits naturels biodégradables) et plus économiques (produits purifiés à base d'extraits de plantes locales). Les molécules naturelles pourraient aussi offrir des structures guides pour le développement de nouveaux molluscicide de synthèse (**Marston. A. et col., 1985; Marston. A. et col., 1993**).

- **Plantes à visée molluscicide :**

Les critères prévalent dans le choix de la plante molluscicide ont été fixés par spécifications de l'OMS (**OMS., 1965**) et puis modifiées pour les besoins de criblage des substances naturelles (**Marston. A. et col., 1985; Silva. T. M. et col., 2005**)

Selon cet auteur :

- l'extrait brut est considéré doué d'activité molluscicide, quand la dose létale 90 (DL₉₀) de 100 µg/ml ;
- les fractions enrichies et substances pures 20 µg/ml ;
- la plante en question doit croître abondamment en zone d'endémie, ou peut être facilement cultivée. Les parties employées devraient être régénératives (fruits, feuilles, fleurs) et non pas les racines.
- l'extraction des constituants devrait se faire à l'eau.
- la procédure d'application devrait être simple et non nocive pour l'opérateur.
- la plante employée doit avoir une faible toxicité vis-à-vis des organismes non ciblés y compris l'homme.
- le coût d'exploitation doit être faible.

Plusieurs plantes ont fait l'objet d'évaluation de leur effet molluscicide : feuilles de *Polygonum senegalense* (**Maradufu. A. et col., 1978**), fruits de *Tetrapleura tetraptera* (Aridan) (**Adewunmi. C. O., 1991; Gebremedhim. G. et col., 1994**), différents parties de *Calendula officinalis* et *Ammi majus* (**Rawi. S. M. et col., 1996**), huile essentiel de *Chrysanthemum viscidhirtum* (**Khallouki. F. et col., 2000**), extrait aqueux de *Holarrhena floribunda* (**Tamboura. H. H., 2005**).

- Produits naturels isolés à visée molluscicide :

Quelques plantes à action molluscicide ont été caractérisées d'un point de vue de leur composition chimique (tableau 3).

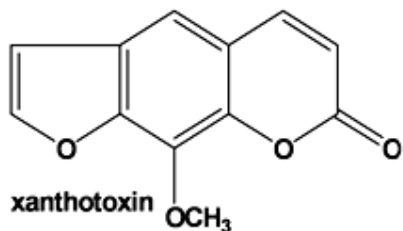
Tableau3 : Plantes molluscicide et leur profile chimique (hôte intermédiaire : *Bulinus truncatus* (Hmamouchi. M. et col., 2000).

Famille	Nom scientifique	Partie utilisée	Constituants
Capparidaceae	<i>Capparis spinosa L.</i>	Parties aériennes	C, S, E.
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium ambrosioides L.</i>	Parties aériennes	Fd, Sa, T, E.
Asteraceae	<i>Artemisia herba alba Asso.</i>	Parties aériennes	P, Fd, AL, S, T, E.
Cucurbitaceae	<i>Citrullus colocynthis L.</i>	Fruits	S, T.
Lamiaceae	<i>Lavandula stoechas L.</i>	Parties aériennes	P, Fd, Sa, S, T, E.
Meliaceae	<i>Melia azedarach L.</i>	Feuilles	Fn, Fd, AL, T.
Meliaceae	<i>Melia azedarach L.</i>	Fruits	Fn, Fd, AL.
Ranunculaceae	<i>Delphinium staphisagria L.</i>	grains	AL, S.
Rhamnaceae	<i>Zizyphus vulgaris Lamk.</i>	Feuilles	P, Fn, Fd, AL, Sa, S, T.
Rutacea	<i>Citrus bigaradia Duhamel.</i>	Feuilles	P, C, Fd, AL, S, T, E.
Zygophyllaceae	<i>Zygophyllum gaetuhum Emb.</i>	Parties aériennes	Fd, Sa, T

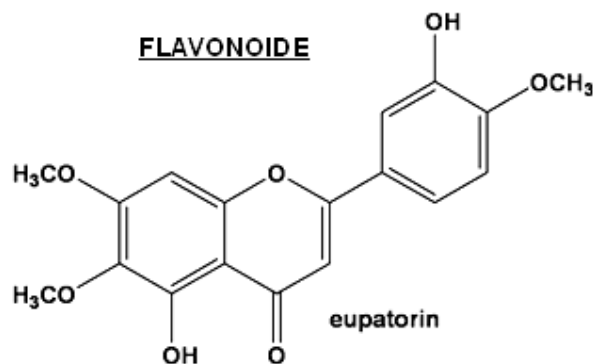
P : phénols ; C : coumarines ; Fn : flavans ; Fd : flavonoïdes ; Al : alcaloïdes ; Sa : saponines ; S : stérols ; T : terpènes ; E : huiles essentielles.

Les molécules à action molluscicide d'origine végétale isolées à ce jour, sont de différents types : triterpènes saponines, spirostanol saponines, sesquiterpènes, iridoïdes glycosides, naphthoquinones, flavonoïdes, furanocoumarines, isobutylamides, alcaloïdes, chalcones et d'autres produits secondaires (Maradufu. A. et col., 1978; Marston. A. et col., 1985; Perrett. S. et col., 1996).

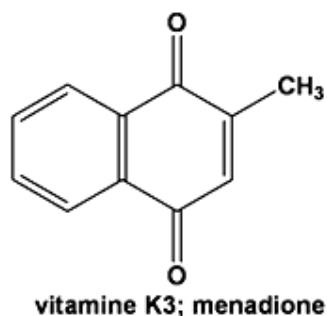
FURANOCOUMARINE



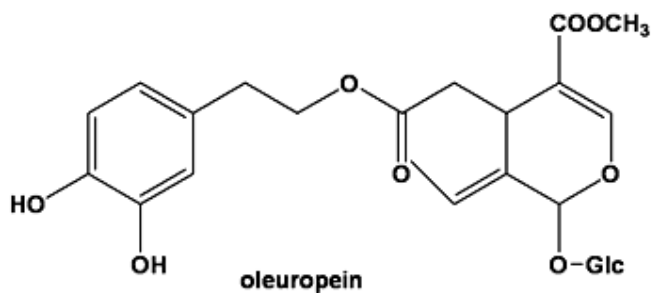
FLAVONOIDE



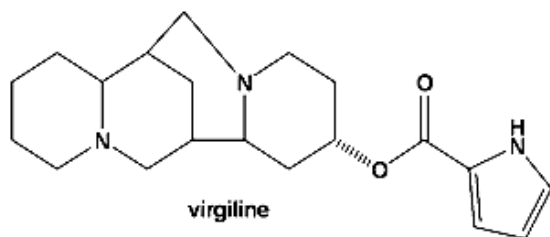
NAPHTHOQUINONE



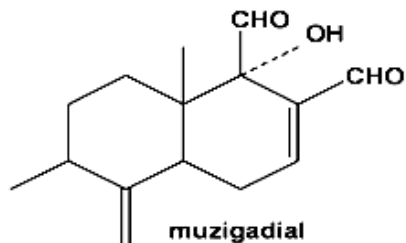
IRIDOIDE GLYCOSIDE



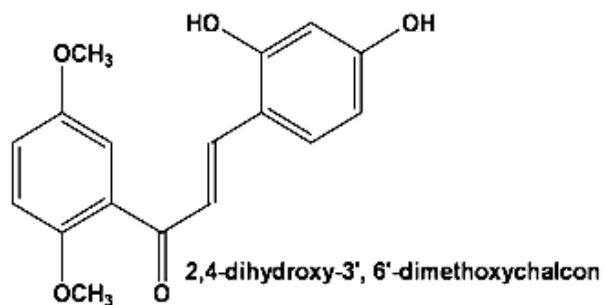
ALCALOIDE



SESQUITERPENE



CHALCONE



SAPONINE TRITERPENIQUE

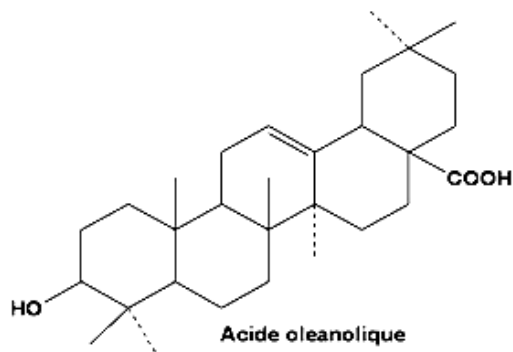


Figure 7 : Quelques exemples des substances molluscicides (Marston. A. et col., 1985)

Malgré le nombre élevé de molécules naturelles à activité molluscicide identifiées jusqu'à ce jour, un faible nombre de ces produits trouvent leur chemin en pratique. Les raisons souvent invoquées sont liées à l'instabilité des produits, leurs effets secondaires toxiques envers les autres espèces aquatiques, ou le coût de faisabilité induit par la transposition de la production à grande échelle **(Marston. A. et col., 1993)**.

CHAPITRE II

ASPECTS BOTANIQUE, CHIMIQUE ET PHARMACOLOGIQUE DE *Nerium oleander*

A. ASPECT BOTANIQUE

1. Famille Apocynaceae :

Les Apocynaceae sont connus pour leur importance comme source de substances médicamenteuses de première importance (ex. Vincristine, Vinblastine, Vincamine,...) (**Hostettman. K. et col., 2000**). La famille comporte plus de 180 genres et 1300 espèces, se développant principalement dans la zone intertropicale (**Bruneton. J., 2001; Shriff. N. et col., 2006**) répartis en 4 sous-familles (**Gausсен. H. et col., 1982**) (Voir tableau 3).

Tableau 4 : Famille des Apocynaceae dans le monde (**Gausсен. H. et col., 1982**).

Sous-famille	Genre	Distribution géographique
Apocynoideae	<i>Apocynum</i>	Amérique du Nord, Mexique
	<i>Nerium</i>	De la méditerranée au Japon
	<i>Strophanthus</i>	De la l'Afrique à la Malaisie
	<i>Adenium</i>	Xérophytes charnues d'Afrique
	<i>pachypodium</i>	Madagascar
Plumériodeae	<i>Allamanda</i>	Amérique tropicale
	<i>Landolphia</i>	Madagascar
		Sud-américaines
	<i>Rauwolfia</i>	Tropique
	<i>Ochrosia</i>	Paléotropicale, absent d'Afrique
	<i>Plumeria</i>	Amérique chaude
	<i>Catharanthus</i>	Tropique, particulièrement Madagascar
<i>Vinca</i>	Méditerranée et Eurasie	
Tabernaemontanoideae	<i>Tabernaemontana</i>	Tropique
	<i>Vacanga</i>	paléotropical
Cerbéroideae	<i>Thevetia</i>	Amérique tropicale
	<i>Cerbera</i>	Madagascar

2. Genre *Nerium*:

Le genre *Nerium* regroupe dans le monde deux espèces (**Popenoe. J., 1975; Yamauchi. T. et col., 1983**):

- *Nerium oleander* L.
- *Nerium indicum* Mill (syn: *N. odorum* Sol.)

Originaire de l'Asie du sud-est. L'espèce *Nerium indicum* Mill. (syn. : *Nerium odorum* Sol.) , est une espèce d'Iran, de l'Inde (**Paris. R.R. et col., 1971**), répandue de l'Arabie au Pakistan, à la Chine. Elle est aussi signalée au Japon. Introduite en Europe au XVII^esiècle, on la cultive souvent sur la côte atlantique, au sud de la Loire. Ses pétales ont un appendice divisé presque jusqu'à la base en franges filiformes (**Bruneton. J., 2001**).

3. Espèce *N. oleander* :

Le *Nerium oleander* ou laurier-rose (appelée localement Défla) est un arbuste appartenant à la famille des Apocynaceae. Le nom latin *Nerium* vient du grec **nerion** signifiant « humide », indiquant la prédilection de cette plante pour les zones humides (**Paris. R.R. et col., 1971**). nom spécifique *oleander* vient de l'italien de « oleandro » qui vient du latin « olea » qui désigne l'olivier faisant référence à la ressemblance des feuillages.

Nerium oleander est connu sous différentes dénominations communes selon les pays et régions considérés :

Nom anglais	rose-bay
Nom allemand	rosenlorbeer
Nom espagnol	laurel rosa
Nom italien	oleandro
Nom français	laurier rose
Nom arabe	el-defla الدفلة

3. 1 Taxonomie :

Selon la flore de l'Europe, le *Nerium oleander* est classé comme suit :

Classification :

Division : *Angiospermae*
Classe : *Dicotyledoneae*
Ordre : *Gentianales*
Famille : *Apocynaceae*
Genre : *Nerium*
Espèce : *Nerium oleander* L.

3. 2 Description botanique :

Arbuste dressé atteignant 3-4m de hauteur, possédant :



- **feuilles** : opposées ou verticillées par 3, longuement lancéolées (8-14 x 5-2.5cm), coriaces, à nervures secondaires pennées, très nombreuses, serrées.
- **fleurs** : en corymbes terminaux, ont une corolle infundibuliforme à gorge rose s'évasant en 5 lobes étalés et ornés d'un appendice à 3-4 dents courtes ; elles

s'épanouissent de juin à septembre, sont de teinte rose ou blanche, disposées en corymbe (**Delille. L., 2007**).

- **fruit** : comporte deux follicules allongés (8-16 x 0.5-1.5cm), soudés jusqu'au début de la déhiscence.
- **graine** : duveteuse, est surmontée d'une aigrette sessile qui en facilite la diffusion (**Paris. R.R. et col., 1971; Bruneton. J., 2001; Hussain. M. A. et col., 2004**).



Figure 8: *Nerium oleander* (<http://www.plantencyclo.com>; consulter le 24-10-2007).

3.3 Distribution géographique:

Le *Nerium oleander* se développe notamment des pays du pourtour du bassin méditerranéen. Il serait originaire du Proche-Orient (**Paris. R.R. et col., 1971**).

L'espèce croît spontanément sur les berges rocailleuses des rivières, par fois même dans les zones littorales, habituellement dévolues aux espèces halophiles. Adaptée à la sécheresse, le *N. oleander* est très décoratif pour la beauté de ses fleurs (**Paris. R.R. et col., 1971; Bruneton. J., 2001**).

En Afrique du Nord, le *N. oleander* est assez commun dans la zone steppique. En Algérie sa présence est assez commune, surtout sur les alluvions et les terrains

rocailleux. Il avance le long des oueds dans le Sahara du Nord et se retrouve dans les montagnes du Tassili et du Hoggar (**Chopra. L.C. et col., 1971**).

Le *N. oleander* se répartit maintenant dans de nombreuses régions du globe au climat méditerranéen ou subtropical (Californie, Australie...). (**Ridings. W. H., 1976; Siddiqui. S. et col., 1987; Siddiqui. S. et col., 1989; Begum. S. et col., 1997; Begum. S. et col., 1999; Banon. S. et col., 2006**).

Elle est fréquemment cultivée comme ornemental (**Ridings. W. H., 1976; Barbosa. R. R. et col., 2008 ; Delille. L., 2007**).

B. ASPECT CHIMIQUE

1. Famille Apocynaceae :

Les hétérosides cardiotoniques et les alcaloïdes à noyaux indolique et stéroïdique sont considérés comme les marqueurs chimiotaxonomiques de la famille des Apocynaceae (**Paris. R.R. et col., 1971; Hostettman. K. et col., 2000**).

- alcaloïdes (stéroïdiques et indoliques) :

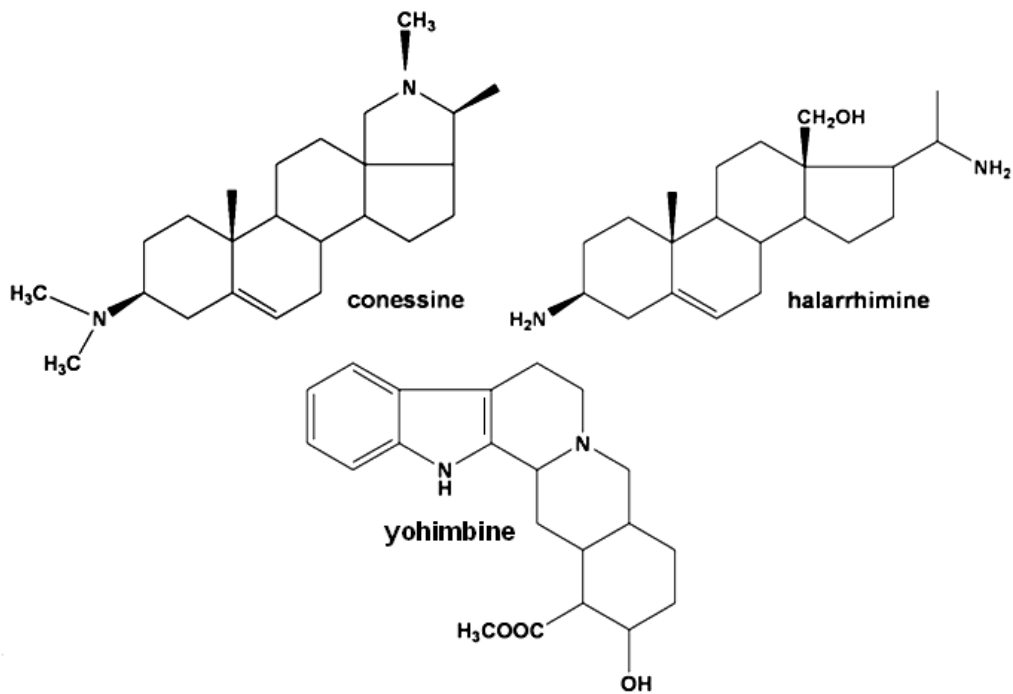


Figure9 : Exemples des alcaloïdes à noyaux stéroïdique et indolique (**R.R. Paris. et col., 1971**).

- hétérosides stéroïdiques cardiotoniques :

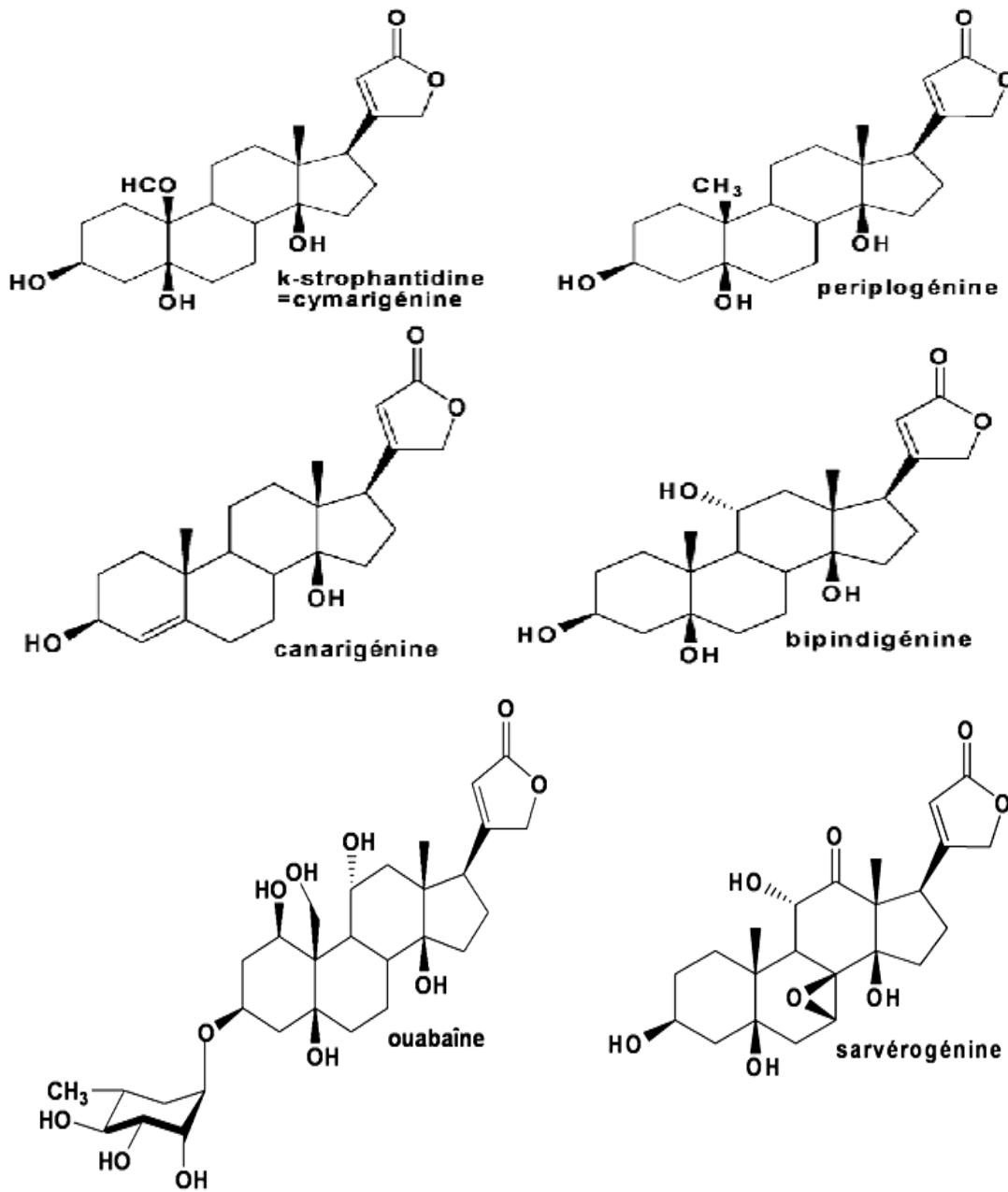


Figure 10 : Hétérosides cardiotoniques des Apocynaceae (Bruneton. J., 2001).

2. Genre *Nerium*:

Le genre *Nerium* est marqué par un métabolisme secondaire orienté vers les terpènes, notamment vers les triterpènes, les cardénolides et pregnanes (**Paris. R.R. et col., 1971**). L'absence des alcaloïdes a été signalée par plusieurs auteurs (**Abe. F. et col., 1992-A; Tiwari. S. et col., 2003**).

Le tableau 5 regroupe une revue des principaux métabolites isolés de l'espèce *N. indicum*.

Tableau 5 : Constituants chimiques de *Nerium indicum* Mill (genre *Nerium*)

Groupe des substances	Substances isolées / (références)
Cardénolides	Odorosides (A à G), digitoxigénine, l'uzarigénine, gitoxigénine (Paris. R.R. et col., 1971), adynerin, neriantin, desacetyloleandrin, neritalosides, strosposide, urechitoxin, oleandrin (Yamauchi. T. et col., 1975), gentiobiosyl-nerigoside, gentiobiosylbeaumontoside, gentibiosyl-oleandrin (Abe. F. et col., 1992-B), neriaside, neriumosides, oleandrin, odoroside (A, B), 5 α -adynerin (Tiwari. S. et col., 2003).
Tritèrenes	Acide urosolique, acide oleanolique, α -amyrin (Tiwari. S. et col., 2003).
Stéroïdes (type Pregnane)	3-O- β -Gentiobiosyl-3 β , 14-dihydroxy-5 α , 14 β -pregnan-20-one. 3 β , 14-Dihydroxy-5 α , 14 β -pregnan-20-one. 21-O- β -D-Glucosyl-14, 21-dihydroxy-14 β -pregn-4-ene-3, 20-dione. (Abe. F. et col., 1992-A).
Polysaccharides	Rhamnogalacturonane, xyloglucane (Shan Yu. M. et col., 2004).

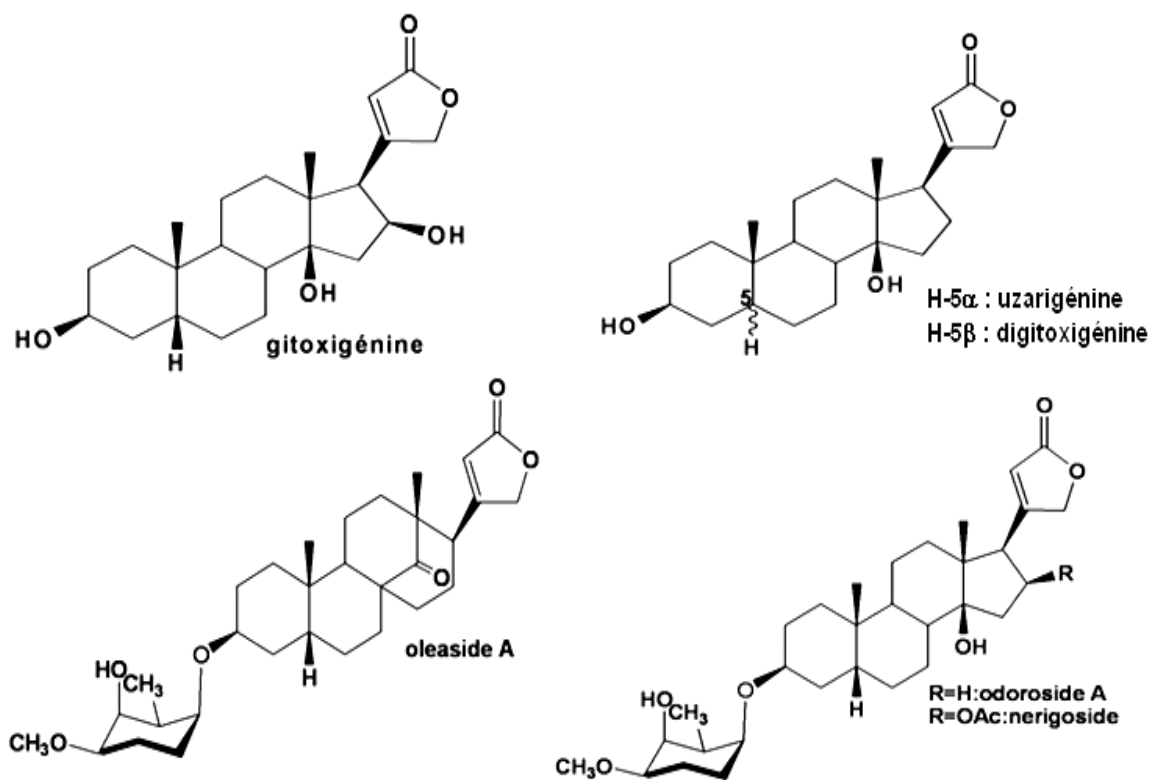
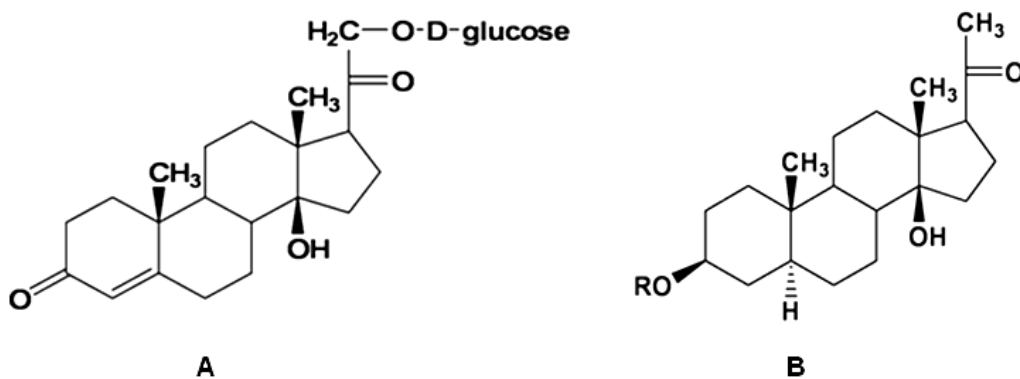


Figure 11: Cardénolides isolées du *Nerium indicum* Mill (Yamauchi. T. et col., 1975; Yamauchi. T. et col., 1983).



A: 21-O- β -D-Glucosyl-14, 21-dihydroxy-14 β -pregn-4-ene-3, 20-dione.

B: R= H: 3 β , 14-dihydroxy-5 α , 14 β -pregnan-20-one.

R= β -gentibiose: 3-O- β -gentiobiosyl-3 β , 14-dihydroxy-5 α , 14 β -pragnan-20-one.

Figure 12: Prégnanes isolées du *Nerium indicum* Mill (Abe. F. et col., 1992-A).

3. Espèce *N. oleander* :

Les études phytochimiques effectuées sur *le N. oleander* ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires tels que les cardénolides, tritèrènes, prégnanes, flavonoïdes, coumarines et des dérivés stéroïdiques (**Hanson. J. R., 1985**). Une trentaine de cardénolides ont été séparés ou caractérisés, majoritairement représentés par l'oléandrine, les odorosides A-M et l'adigoside (**Paris. R.R. et col., 1971**).

La plante accumule les hétérosides cardénolides dans tous les organes. Les feuilles renferment environ 1,5% de cardénolides, dont 0.1% d'oléandrine ou 3-o- α -L-oléadrosyl-16-acétylgitoxigénine. Ces concentrations varient selon des considérations génétiques et environnementales. L'oléandrine est accompagné d'analogues stéroïdiques tel que : la gitoxigénine, adynérigénine, l'uzarigénine... (**Bruneton. J., 1999**). Les graines renferment de l'oléandrine et des composés voisins : odorosides, adigoside, gluco-strospéside, etc. (**Bruneton. J., 2001**).

Toute la plante est dangereuse, ni l'ébullition ni la dessiccation des feuilles ne permettent d'inactiver les toxines constituées essentiellement d'hétérosides cardénolides. Les mécanismes responsables de la toxicité sont à superposer à ceux des hétérosides digitaliques classiques agissant principalement sur l'inhibition de l'ATPase Na-K membranaire et par l'élévation du calcium intracellulaire (**Bruneton. J., 1999**).

Le tableau 6 suivant rassemble les constituants chimiques isolés des différentes parties de la plante :

Tableau 6: Constituants chimiques des différentes parties de *Nerium oleander*

Parties utilisées	Groupe des substances / (références)	Substances isolées
Feuilles	cardénolides (Hanson. J. R., 1985; Siddiqui. S. et col., 1987; Bruneton. J., 1999; Begum. S. et col., 1999)	adynerin, folinerin, kaneroside, neriaside, neridiginoside, neritaloside, neriumoside, nerizoside, odorobioside-G-pentaacetate, odoroside-H, oleandrin, strosopeside, urechitoxin.
	triterpènes (Hanson. J. R., 1985; Siddiqui. S. et col., 1989; Begum. S. et col., 1997)	acide butulinique, acide 12,13-dihydroursolique, acide isoneriuocoumarique, acide oleanderolique, acide oleanolique, acide ursolique, acide neriuocoumarique, acide kanerique, α - amyrin, betulin, kanerocin, kanerodione, kanerin, kanerol, cis-karenin, trans-karenin, neriumin, neriuminin, oleanderen, oleanderol, uvaol.
	prégnanes (Hanson. J. R., 1985)	3-O- β -gentiobiosyl-3 β -14-dihydroxy-5 α , 14 β -pregnan-20-one. 21-O- β -D-glucosyl-14, 21-dihydroxy-14 β -pregn-4-ene-3, 20-dione. 12- β -hydroxy-pregna 4,6-dien-3,20-dione. 12- β -hydroxy-pregna 4-en-3,20-dione. 12- β -hydroxy-16 α -methoxy-pregna 4, 6-dien-3, 20-dione
Racines	cardénolides (Paris. R.R. et col., 1971; Hanson. J. R., 1985; Huq. M. M. et col., 1999)	β -anhydroepidigitoxigenin, 12 β -hydroxy-5 β -carda-8, 14, 16, 20(22)-tetraenolide, 3 β -hydroxy-5 β -carda-8, 14, 16, 20(22)-tetraenolide, 12 β -hydroxy-5 β -carda-8, 14, 16, 20(22)-tetraenolide, neriumogenin-A-3 β -D-digitaloside, neriumogenin- β , neriumoside A-1, neriumoside A-2, neriumoside B-1, neriumoside B-2, neriumoside C-1.
Écorces		graciloside, neriodorein, neriodorin, odorobioside -K, odoroside-A, odoroside-B, 1-strophanthin.
Grains		oleandrin, odorosides.
Différent parties	cardénolides (Hanson. J. R., 1985)	odoroside-D, odoroside-H, oleandrigenin, oleaside A, oleaside B, oleaside C, oleaside D, oleaside E, oleaside F.
	flavonoïdes (Hanson. J. R., 1985)	campherol-3rhamnoglucoside, quercetin, quercetin-3-rhamnoglucoside, rutin.
	coumarines (Hanson. J. R., 1985)	scopoletin, scopolin.
	phytostérols (Hanson. J. R., 1985)	sitostérol, β -sitostérol, stigmastérol...
	acides gras (Hanson. J. R., 1985)	nerifol, neriumol.

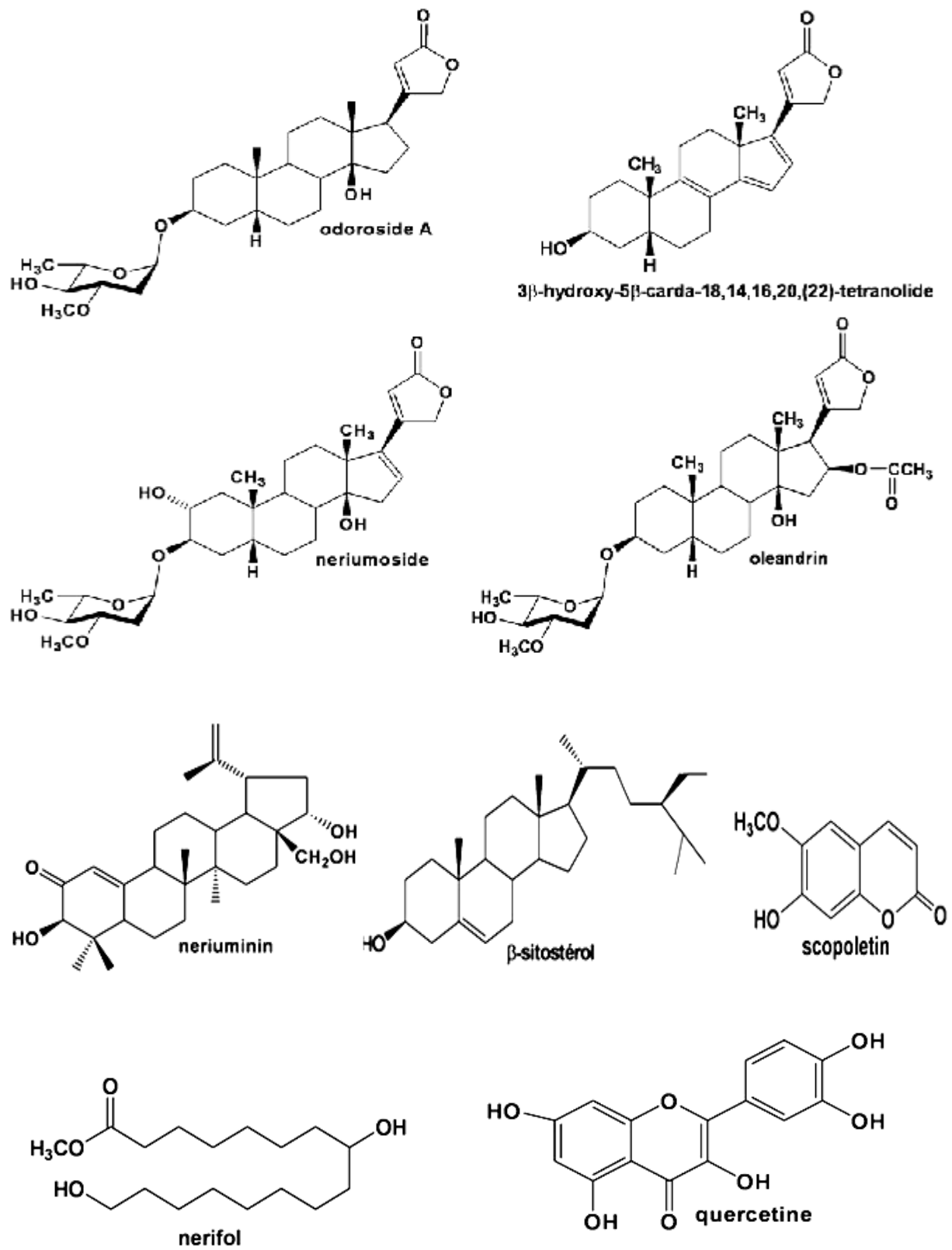


Figure 13 : Quelques substances isolées de *Nerium oleander*

C. Aspects pharmacologiques

1. Famille Apocynaceae :

Au point de vue des ouvrages classiques de la matière médicale, la famille des *Apocynaceae* fournit des drogues de première importance en thérapeutique (**Paris. R.R. et col., 1971; Pauwels L., 1979**). C'est le cas des alcaloïdes indoliques anticancéreux (ex. vinblastine et vincristine extraites de la pervenche de Madagascar ou celle de la vincamine obtenue la pervenche mineur) (**Gaussen. H. et col., 1982**).

Tableau 7 : Propriétés et indications thérapeutiques associées à l'usage de quelques espèces Apocynaceae

Espèce	Organe utilisé	Principe actif	Propriétés et usage thérapeutique / (références)
<i>Rauwolfia serpentina</i>	racines	réserpine et autres dérivés	utilisés dans le traitement des hypertensions artérielles. (Eyog. O. M. et col., 1999)
	plante	-	paludisme ; ovulation (Okafor. J. et col., 1999)
	plante	ajmaline	Antirythmique (Gaussen. H. et col., 1982)
<i>Strophanthus gratus</i>	grains	ouabaïne	réputé pour le traitement des cardiopathies. (Eyog. O. M. et col., 1999)
<i>Tabernanthe iboga</i>	racines	ibogaïne	utilisé comme tonique nerveux musculaire (Eyog. O. M. et col., 1999)
<i>Holarrhena flobunda</i>	écorces de tige ou de racines	conessine	utilisé dans le traitement de la dysenterie amibienne, puis abandonnée en raison de sa neurotoxicité. (Guisson. J. P. et col., 1992)
	écorces de tige et feuilles	-	utilisé dans le traitement des amibiases maladies (Guisson. J. P. et col., 1992)
<i>Catharanthus roseus</i>	plante	vincalécoblastine	propriétés leucopéniathes, elle abaisse le nombre de globules blancs. (Gaussen. H. et col., 1982)
		vincristine	utilisé dans la thérapie des leucémies et de la maladie de hodgkin (cancer de ganglions) (Gaussen. H. et col., 1982)

2. Genre *Nerium*:

Les espèces de *Nerium*, *Nerium indicum* et *Nerium oleander*, sont des plantes toxiques. A ce titre leur utilisation en phytothérapie est limitée à l'usage externe. *Nerium indicum* est largement utilisée en médecine traditionnelle chinoise, pour stimuler les muscles cardiaques, soulager les douleurs et comme insecticide (**Eun Jeong. S., 2001; Shan Yu. M. et col., 2004**). Les écorces de *N. indicum* ont été signalées comme douées d'une activité molluscicide contre *Lymnaea acuminata* (**Singh. S. et col., 1998**).

3. Espèce *Nerium oleander* :

Malgré sa toxicité établie, l'espèce *N. oleander* est utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement de nombreuses maladies et fait d'ailleurs partie de plusieurs pharmacopées populaires (**Adom. R. O. et col., 2003**).

3.1 Utilisations traditionnelles dans le monde:

Le *Nerium oleander* est employé en médecine traditionnelle pour le traitement de nombreuses maladies et fait d'ailleurs partie de plusieurs pharmacopées locales (**Adom. R. O. et col., 2003; Almahy. H. A. et col., 2006**). Les usages traditionnels des différents organes de *Nerium oleander* selon les pays sont décrits dans le tableau 8 :

Tableau 8 : Principales utilisations de *Nerium oleander* en médecine traditionnelle selon les pays.

Parties utilisées	Pays	Indications / (références)	Mode d'emploi
feuilles fraîches ou séchées	Afrique du sud	abortif (Adom. R. O. et col., 2003)	*
	Algérie	nettoyage et assouplissement des pieds (peau), contre les caries dentaires (Maftah. T. et col., 2003).	décoction
	Iran	cardiotonique et diurétique (Adom. R. O. et col., 2003).	infusion
	Maroc	antidiabétique, abortif, démangeaison, male de tête (Bnouham. M. et col., 2002), antigale, contre la chute des cheveux et l'eczéma (Oukal. Z., 2008).	Décoction, infusion, macération
	Tanzanie et Turquie	antibactérien (Erdemoglu. N. et col., 2003; Adom. R. O. et col., 2003).	décoction
différents organes	Cuba	médecine de folklore (Adom. R. O. et col., 2003).	*
	Inde et Bangladesh	antibactérien (Adom. R. O. et col., 2003)	*

* non précis

3.2 Propriétés pharmacologiques :

D'après la littérature, les diverses parties du *N. oleander* ont exhibé in-vitro et in-vivo une série d'activités biologiques et pharmacologiques (voir le tableau 9) :

Tableau 9 : Propriétés pharmacologiques de *Nerium oleander*

Parties utilisées	Propriétés pharmacologiques et utilisation / (références)
Feuilles	cardiotoniques, antibactériens. (Hussain. M. A. et col., 2004; Delille. L., 2007), inhibition du système nerveux central (CNS) chez les souris. (Hanson. J. R., 1985; Huq. M. M. et col., 1999), anticancéreux (Hanson. J. R., 1985; Bor. N. M. et col., 1988; Begum. S. et col., 1999).
Racines	anticancéreux, antilépreux, anti-ulcèreux, antibactériens, cardiotoniques. (Hanson. J. R., 1985; Siddiqui. S. et col., 1989; Huq. M. M. et col., 1999).
Différents parties	antimalaria, antivirale, anti-ulcèreux, anticancéreux, antidote (Ibrahim. K. A. et col., 2007) et comme insecticide (Adom. R. O. et col., 2003). Emménagogue, comme Abortif, antispasmodique et dans le traitement d'angine de poitrine... (Al-yahya. M. A. et col., 2000; Aouinty. B. et col., 2006), antiparasitaires... (Siddiqui. S. et col., 1987; Siddiqui. S. et col., 1989; Adom. R. O. et col., 2003; Ibrahim. K. A. et col., 2007).

4. Toxicité du *N. oleander* :

Nerium oleander est une plante toxique par ingestion de ces diverses parties (feuilles, fleurs, tiges,...). Sa toxicité envers l'homme, l'animal et certains insectes a fait l'objet de plusieurs études (**Adom. R. O. et col., 2003; Almahy. H. A. et col., 2006 ; Barbosa. R. R. et col., 2008**).

Nerium oleander étant plus souvent associé à des intoxications accidentelles chez les enfants ou même chez les animaux domestiques (**Bruneton. J., 2001**). Toutefois, des tentatives de suicide au *Nerium oleander* sont régulièrement colligées par les toxicologues dans différentes parties du globe, et un cas d'utilisation à visée criminelle a été récemment rapporté (**Bourgeois. B. et col., 2005**).

L'empoisonnement peut être causé par l'ingestion d'une seule feuille verte ou séchée qui peut s'avérer mortelle pour un adulte. Les premiers signes de l'intoxication : inconscience, irritation de muqueuses, nausées, vomissement, douleurs abdominales, diarrhée, polypnée, troubles cardiaques graves, brûlure de la peau parfois signalée chez les sujets sensibles. Les symptômes apparaissent plusieurs heures (72 h) après l'ingestion d'une quantité toxique (**Adom. R. O. et col., 2003**). Les hétérosides cardiotoniques principaux constituants de *N. oleander* sont les toxiques reconnus à cette espèce (**Bruneton. J., 2001**).

CHAPITRE III

ÉTUDES DES STEROÏDES ET CARDÉNOLIDES

A. INTRODUCTION

1. Étymologie :

A l'origine le nom de « stérol » (du grec stéréos= solide) a été donné aux alcools solides issus de l'insaponifiable des extraits lipidiques des tissus végétaux. Le nom général de « stéroïde » fut introduit en 1936 pour couvrir tous les composés dont le squelette est du type stérol, appelé perhydrocyclopenténophénanthrène (**Klyne. K., 1966**), (figure11) :

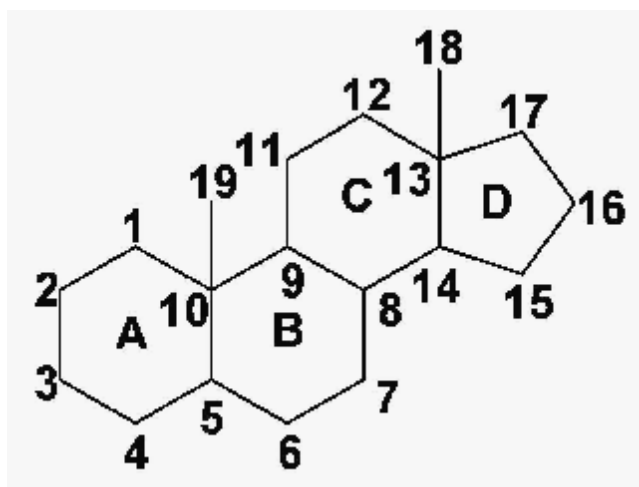


Figure 14: Noyau perhydrocyclopenténophénanthrène

2. Classification et répartition :

Les stéroïdes constituent une grande famille de composés largement répandus dans la nature, aussi bien dans le monde végétal qu'animal (figure 12) :

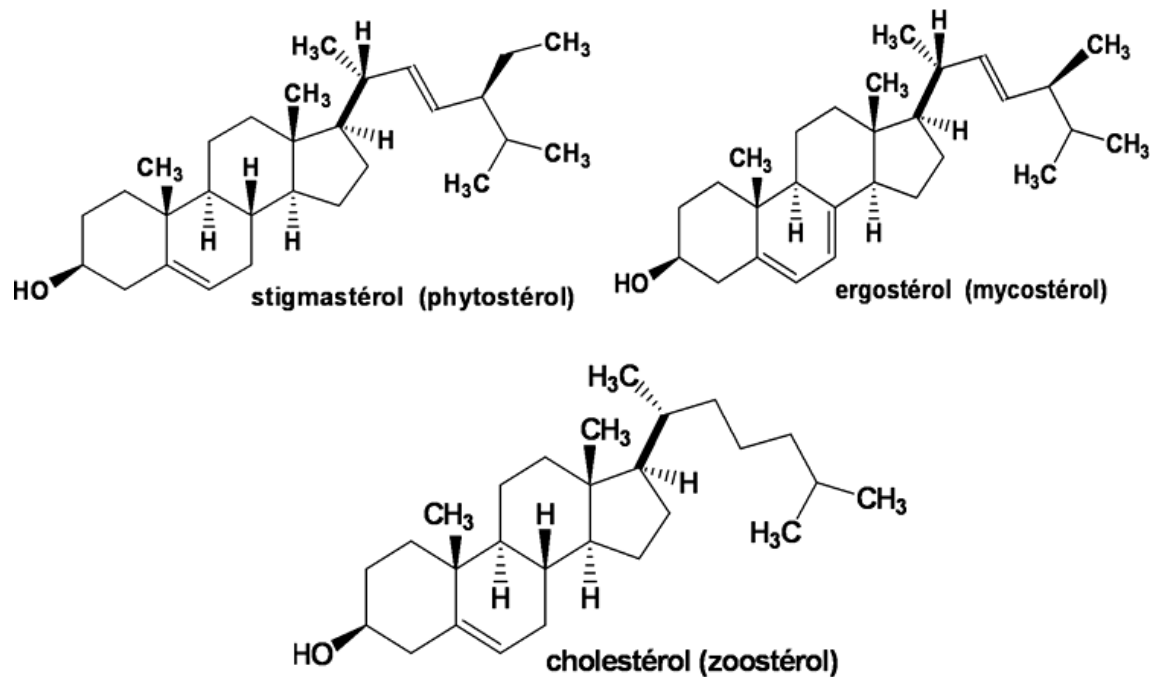


Figure 15 : Répartition des stéroïdes dans la nature (**Geoffrey. D. B., 1998**)

Les stéroïdes végétaux se distinguent par une grande diversité structurale. Ceci induit des composés aussi différents quant à leurs propriétés que les phytostérols, les saponosides, les ecdystéroïdes, les glycosides cardiotoniques ou les alcalamines stéroïdiques (figure 22) (**Bruneton. J., 1999**).

3. Origine biosynthétique :

Les terpènes (stéroïdes et triterpènes compris) sont issus de la voie acétate, à partir de l'acétyl-CoA (**Bruneton. J., 1999; Rodney. C. et col., 2000**). L'unité isoprénique constitue le motif de base (**Goodwin. T. W., 1971; Lamarti. A. et col., 1994-A**).

Il existe deux routes de biosynthèse de l'unité isoprène, la route de l'acide mévalonique (MVA pour « mevalonic acid ») et celle du 2-désoxyxylulose (**Rodney. C. et col., 2000**).

Les deux voies partent du glucose et utilisent l'acide pyruvique comme intermédiaire (figure 16) :

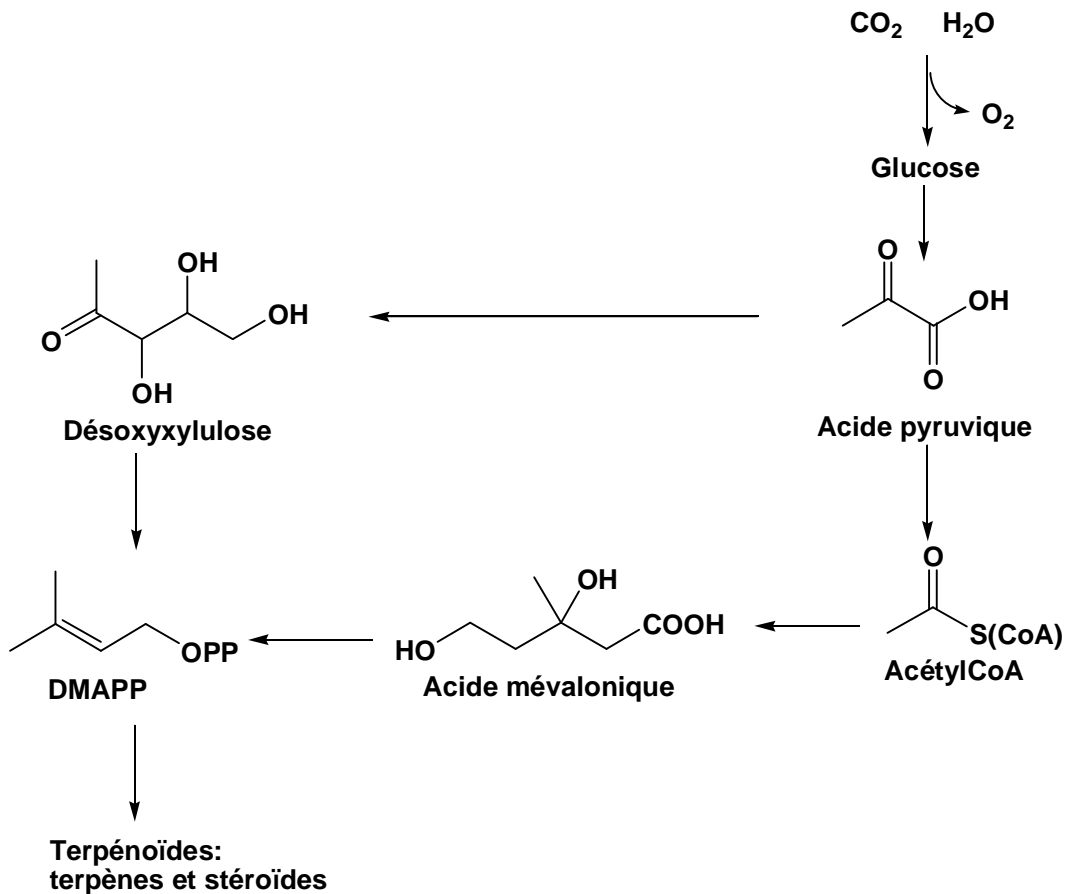


Figure 16 : principales voies de biosynthèse impliquées dans la production des terpénoïdes (Rodney. C. et col., 2000).

3.1 Séquences de condensation des unités isopréniques (IPP et DMAPP):

Deux types de séquences de couplage des unités isopréniques existent (Lamarti. A. et col., 1994-A):

- **Condensation tête-à-queue:**

Tel que décrit en figure 17, la condensation du DMAPP avec l'IPP conduit au pyrophosphate de géranyle à 10 carbones (GPP pour « geranyl pyrophosphate »), qui le précurseur des monoterpènes (Lamarti. A. et col., 1994-B). Une autre unité isoprène s'ajoute par condensation tête-à-queue du GPP avec l'IPP, ce qui donne le pyrophosphate de farnésyle à 15 carbones (FPP pour « farnesylpyrophosphate »), le précurseur des sesquiterpènes. L'ajout d'IPP au FPP donne le pyrophosphate de géranylgéranyle (GGPP), le précurseur des diterpènes (C₂₀). Ceci est réalisé à l'aide d'une jonction tête-à-queue (Bruneton. J., 1999; Rodney. C. et col., 2000; Croteau. R. et col., 2000).

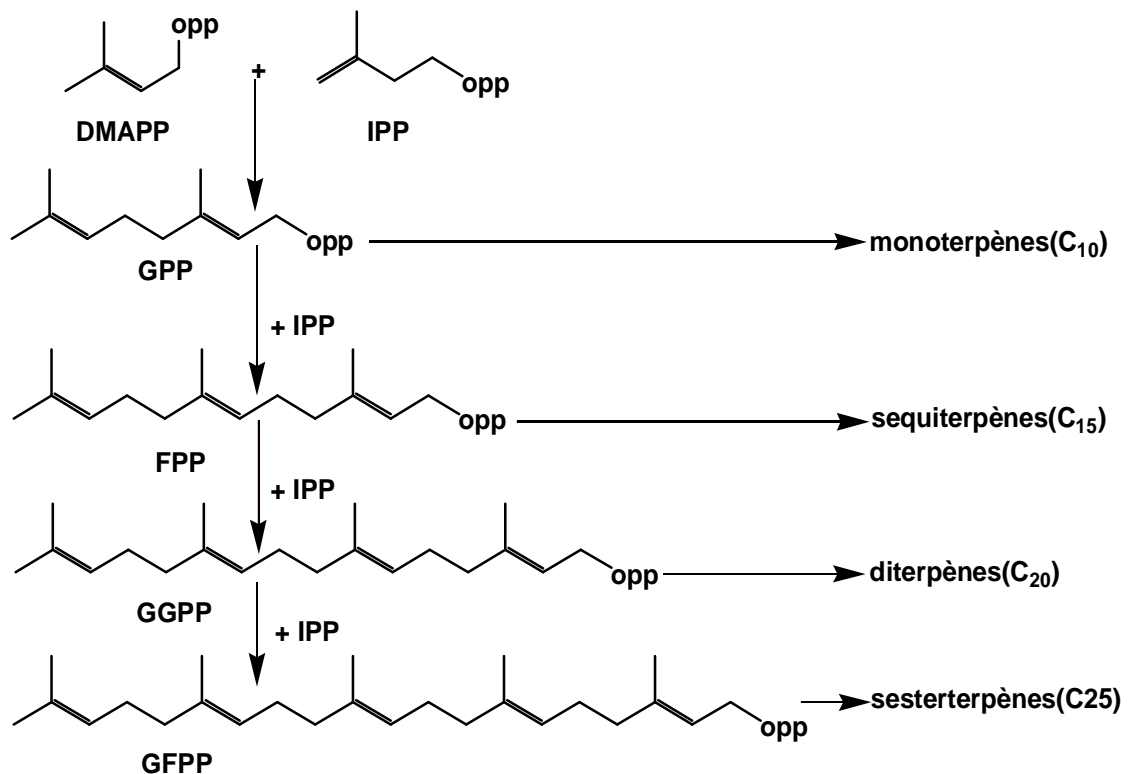


Figure 17 : Formation des précurseurs de chaque classe des terpènes
(Bruneton. J., 1999; Rodney. C. et col., 2000).

- **Condensation queue-à-queue: (formation du squalène) :**

La figure 18 montre la formation du squalène à partir de deux molécules de FPP, c'est une condensation qui correspond formellement d'un couplage queue-à-queue, les transformations sur la page suivante rendent bien compte les opérations suivantes (Bruneton. J., 1999; Vercauteren. J., 2007) :

- 1) Deux molécules de FPP se condensent ;
- 2) Le NAD(P)H est nécessaire pour cette condensation et que l'atome H du NAD(P)H est incorporé dans le squalène ;
- 3) L'absence de NADPH, un intermédiaire ayant un noyau cyclopropane, le pyrophosphate de présqualène, s'accumule ;
- 4) Une seule des deux molécules de FPP perd un proton ;

5) Il y a inversion de configuration au carbone 1 de l'autre molécule de FPP.

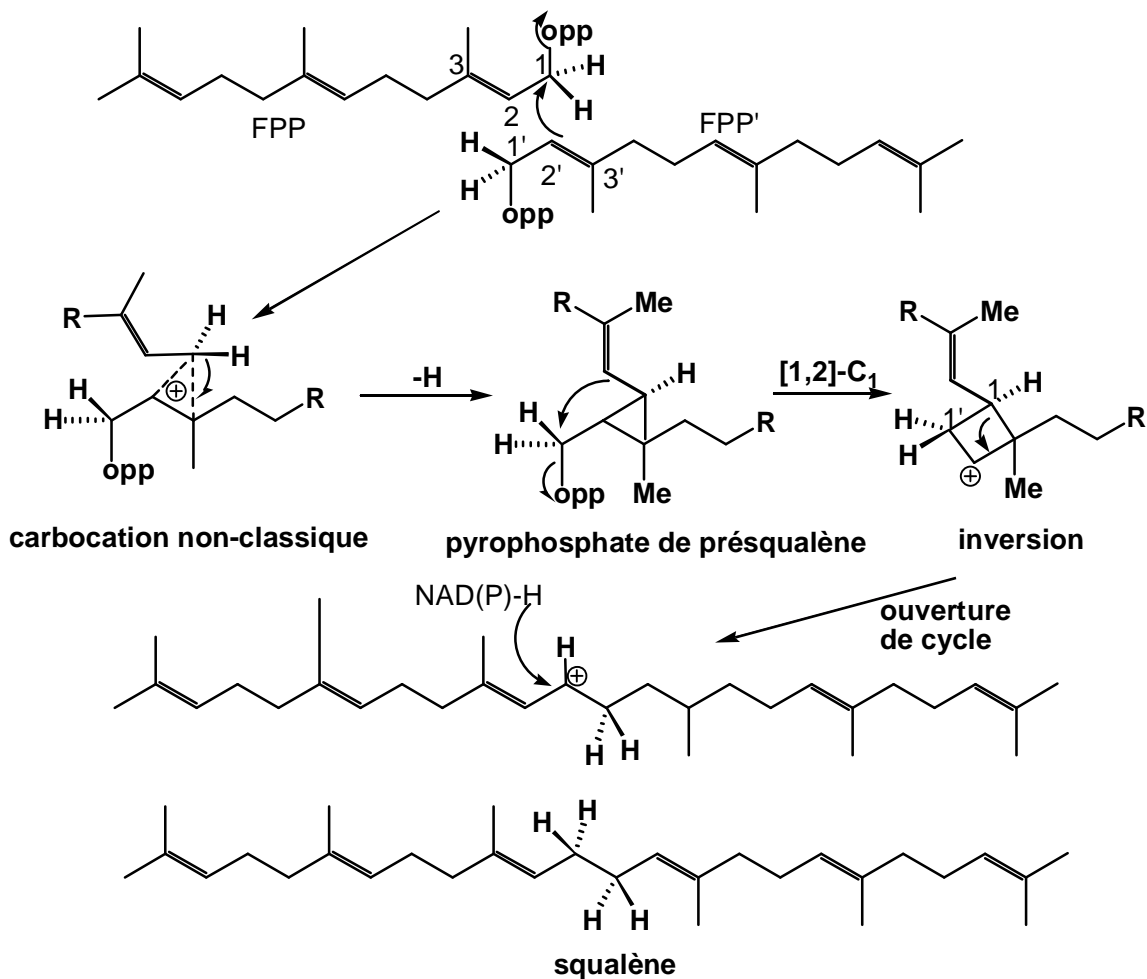


Figure 18: Formation du squalène.

3.2 Formation des triterpènes et stéroïdes végétaux:

Les triterpènes sont des composés en C₃₀ issus de la cyclisation du 2,3-époxydosqualène (le squalène est converti par oxydation en 2,3-époxydosqualène (figure 19) (Abe. I. et col., 1993 ; Ebizuka. Y. et col., 2003) ou, plus rarement, du squalène lui-même (Bruneton. J., 1999).

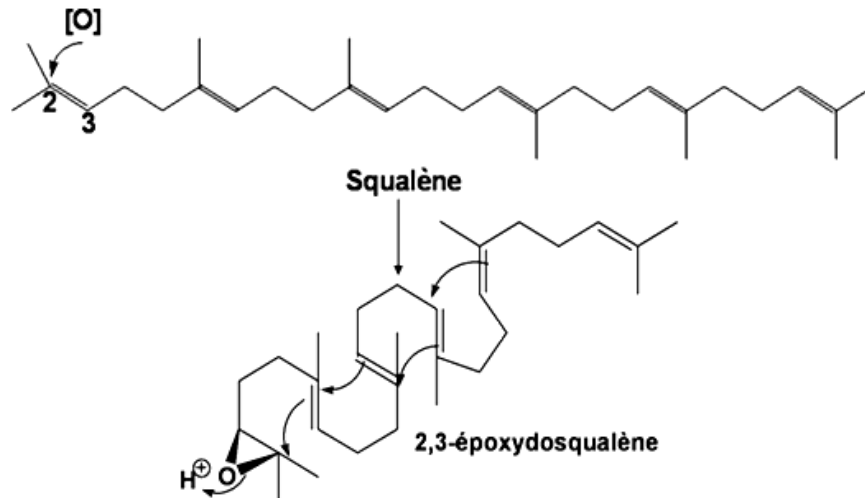


Figure 19 : cyclisation du 2,3-époxydosqualène.

De la conformation initiale de 2,3-époxydosqualène, dépend l'orientation de la biosynthèse vers les stéroïdes d'une part, et les triterpènes tétracycliques (**Huang. Z. et col., 2007**), d'autre part, il apparaît ainsi que :

- Si l'époxydosqualène est maintenu dans une conformation chaise-bateau-chaise-bateau, la cyclisation conduit à un cation protostane qui réarrange ensuite en cycloarténol, par l'intermédiaire du cycloeucaéanol et de l'obtusifoliol. Celui-ci conduit aux phytostérols (**Bruneton. J., 1999**).
- Si l'époxydosqualène est maintenu dans une conformation chaise-chaise-chaise-bateau, la cyclisation conduit à un cation dammarane, ce dernier peut subir un réarrangement, formant un cycle supplémentaire qui conduit aux triterpènes pentacycliques (**Goodwin. T. W., 1971; Abe. I. et col., 1993; Bruneton. J., 1999**)

Ces deux processus de cyclisation sont illustrés dans la figure 20.

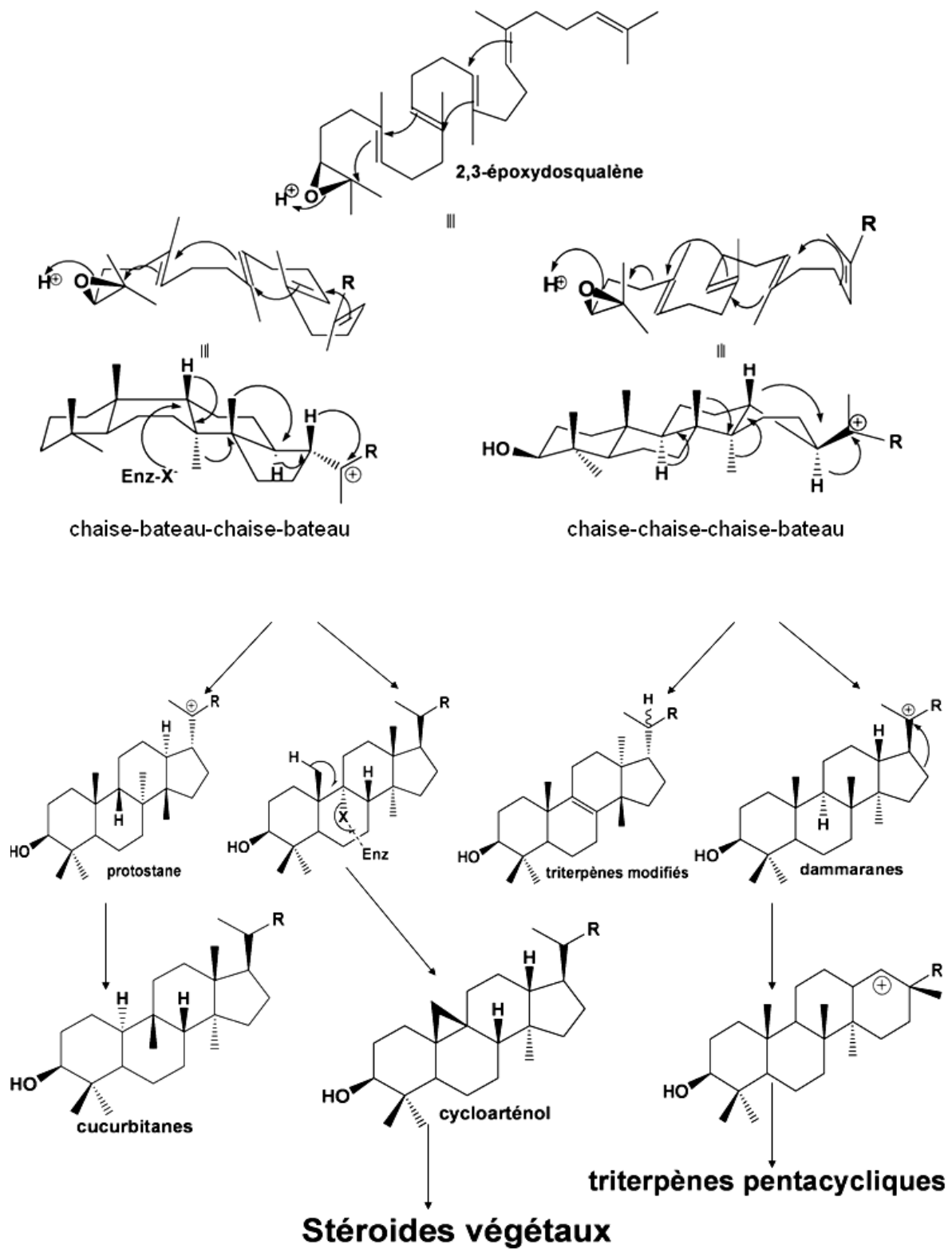


Figure 20 : Biosynthèse des triterpènes et stéroïdes végétaux (Bruneton. J., 1999).

Le passage d'un squelette en C₃₀ à un squelette en C₂₇, c'est-à-dire aux stéroïdes, implique au minimum une déméthylation progressive en C-4 et en C-14. On note également une rupture du cyclopropane du cycloarténol et un déplacement de la double liaison engendrée par cette rupture. Les deux méthyles en C-4 sont perdus par une décarboxylation. Une oxydation préalable de l'hydroxyle en C-3 conduit à un α-cétoacide, ce qui facilite la décarboxylation finale. Le méthyle en C-14 est éliminé après oxydation sous forme d'acide formique (**Bruneton. J., 1999**).

La diversité structurale des stéroïdes découle essentiellement de la modification de la chaîne latérale (**Bruneton. J., 1999**) :

- fonctionnalisation et cyclisée (spirocétals, alcalamines, ecdystéroïdes) ;
- raccourcissement (prégnanes) et fonctionnalisée (cardénolides, conanines) ;
- incorporation d'un ou deux carbones supplémentaires, sous la forme d'un groupe méthyle (ou méthylène) ou éthyle (ou éthylidène) fixé en C-24.

Les possibilités d'évolution du noyau stéroïde, sont schématisées sur la figure 21 :

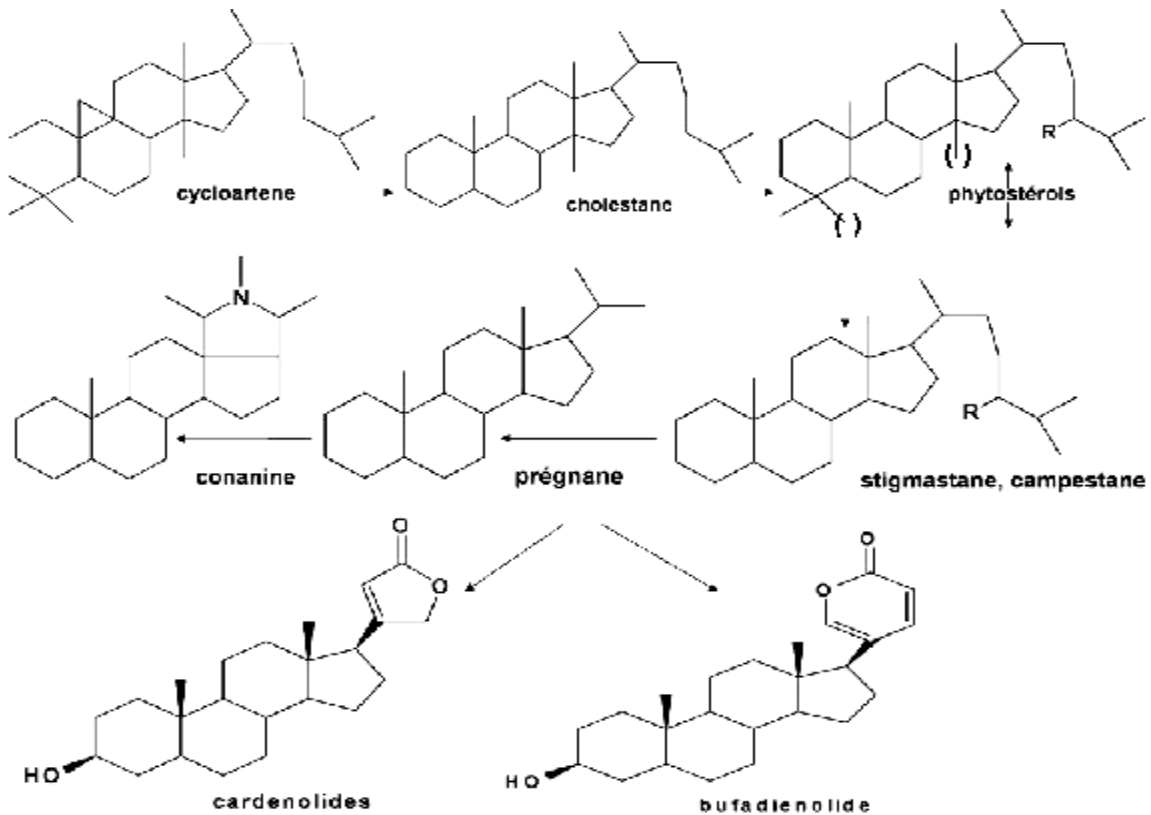
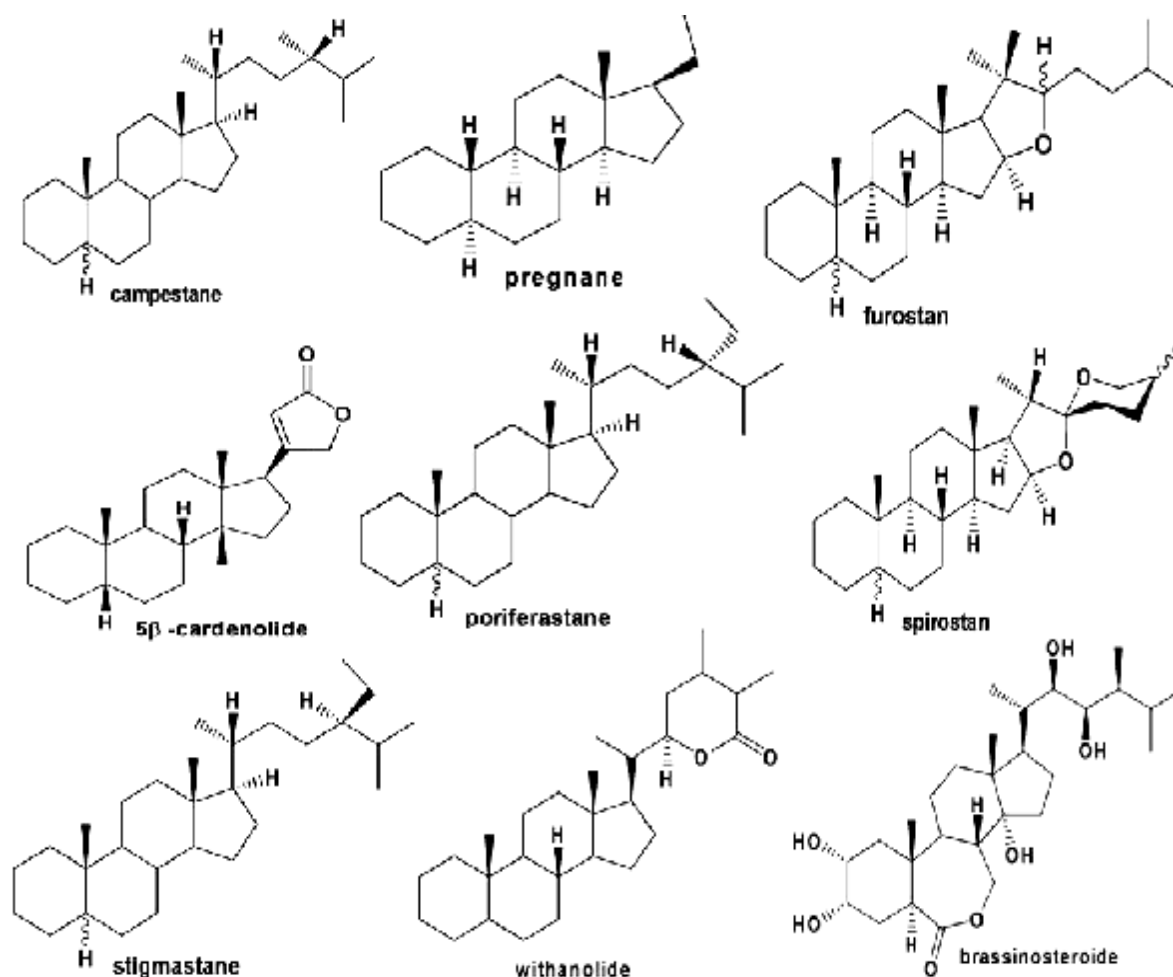


Figure 21 : Principaux enchaînements stéroïdiens de base rencontrés chez les végétaux (**Bruneton. J., 1999**).

4. Nomenclature :

La nomenclature des stéroïdes est basée généralement sur le nom du squelette de base tel que : Choléstrane, Campéthane, Prégnane, Stigmastane et Poriferastane, Cardenolide et Bufadéolide, Furostane, Spirostane, Withanolide et Brassinostéroïde (Moss. G. P., 1989; Dinan. L. et col., 2001) qui sont représentés dans la Figure 22:



5. Intérêts pharmacologiques et bioactivités des stéroïdes :

Les triterpènes et stéroïdes constitue un groupe de molécules de première importance, non seulement pour leurs propriétés thérapeutiques, mais aussi de leur intérêt comme matières premières, utilisées par divers secteurs de l'industrie (pharmaceutique, agro-alimentaire,...) **(Bruneton. J., 1999).**

Les différents groupes de stéroïdes végétaux se distinguent par une grande diversité structurale (figure 14). Ceci induit des composés aussi différents quant à leurs propriétés, intérêts pharmacologiques et potentiels toxiques

- Intérêt des sapogénines spirostaniques, du sitostérol ou du stigmastérol qui sont des matières premières aisément valorisables par des procédés biotechnologiques. Elles demeurent indispensables pour couvrir les besoins de l'industrie pharmaceutique en médicaments stéroïdiques (contraceptifs, anabolisants, anti-inflammatoires) ;
- Intérêt thérapeutique de nombreuses drogues à saponosides à noyau stéroïdiques utilisées pour l'extraction de molécules actives (ascine, glycyrrhizine), pour l'obtention de formes galéniques simples ou pour celle de préparation de phytothérapie **(Bruneton. J., 1999)**;
- Intérêt thérapeutique des hétérosides cardiotoniques est notamment illustré par leur continuelle utilisation, comme médicaments majeurs de l'insuffisance cardiaque **(Perlin. D. S., 1998; Melero. C. P. et col., 2000 ; Lefranc. F. et col., 2008)**

Les stéroïdes renferment aussi des potentialités thérapeutiques dans divers domaines thérapeutiques. Ceci est illustré par les diverses propriétés qui leur sont attribuées, notamment des activités antitumorale, antivirale, anti-inflammatoire, analgésique, antiparasitaire, etc. **(Bruneton. J., 1999).**

B. HÉTÉROSIDES CARDIOTONIQUES

Les hétérosides cardiotoniques sont des glycostéroïdes qui se distinguent chimiquement par leur noyau lactonique (**Perlin. D. S., 1998**).

Selon la taille du cycle lactonique, on distingue deux groupes de génines (**Perlin. D. S., 1998; Bruneton. J., 1999; Dinan. L. et col., 2001; Lefranc. F. et col., 2008**).

- les cardénolides en C₂₃ à γ -lactone $\alpha\beta$ -insaturée (=buténolide) ;
- les bufadiénolides en C₂₄ à δ -lactone di-insaturée (=pentadiénolide).

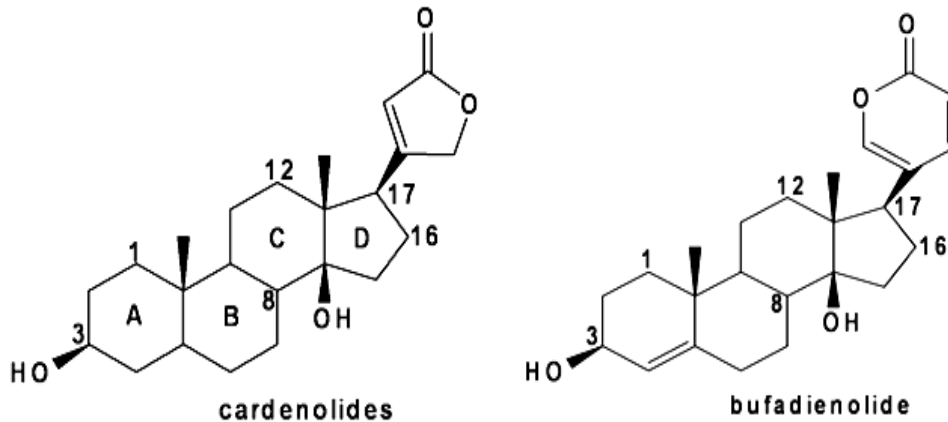


Figure 23 : Structure des génines des hétérosides cardiotoniques

1. Localisation et répartition dans le règne végétal :

Les hétérosides cardiotoniques ont une distribution assez restreinte : on les signale dans quelques dizaines de genres répartis inégalement dans plusieurs familles (**Swain. R. H., 1978; Bruneton. J., 1999; Dinan. L. et col., 2001**). Dans la plupart des cas la faculté d'élaborer ces structures ne concerne qu'un nombre de genres très limité par famille (voir le tableau 10) :

Tableau 10: la distribution des hétérosides cardiotoniques dans le règne végétal
(Melero. C. P. et col., 2000)

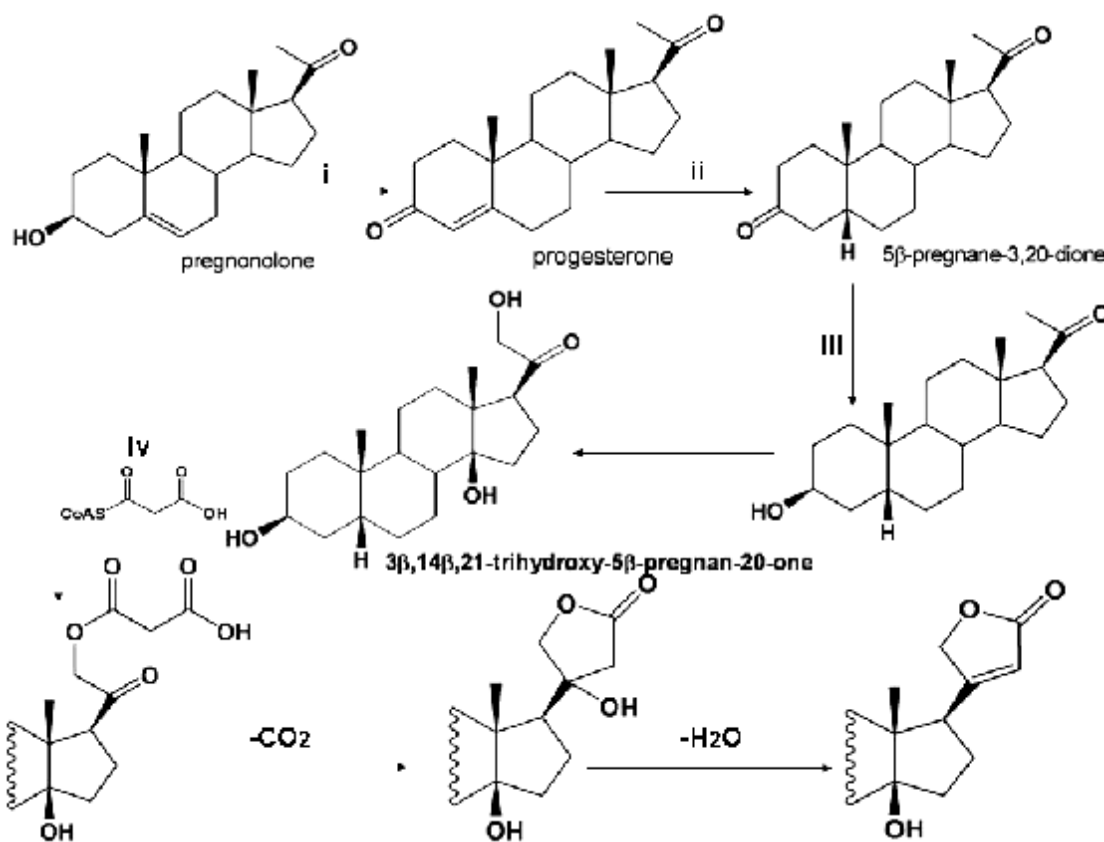
Famille	Espèce	Hétérosides cardiotoniques
Apocynaceae	<i>Nerium oleander</i> <i>Nerium odorum</i>	Oleandrin, neriin, neriantin. Odoroside A et B.
	<i>Strophantus gratus</i> , <i>S. kombe</i> , <i>S. hispidus</i> , <i>S. sarmentosus</i> , <i>S. emini</i> .	Ouabaïne (G-strophantin), cymarin, sarmentocymarin, periplocymarin, K-strophantin.
	<i>Acokanthera schimpri</i> (<i>A. ouabaïo</i>), <i>A. venenata</i> , <i>A. abyssinica</i>	Ouabaïne.
	<i>Thevetia nereifolia</i> <i>Thevetia yecotli</i> <i>Cerbera odollam</i> <i>Cerbera tanghin</i> <i>Adenium boehmanianum</i>	Thevetin, cerberin, peruvoside. Thevetosin, thevetin A. Cerberin. Tanghinin, deacetyltanghinin, cerberin. Echujin, hongheloside G.
Asclepiadaceae	<i>Periploca graeca</i> <i>Periploca nigrescens</i>	Periplocin. Strophantidin, strophantidol, nigresscin.
	<i>Xysmalobium undulatum</i> <i>Gomphocarpus fruticosus</i> <i>Calotropis procera</i>	Uzarin. Uzarin. Calotropin.
	<i>Cheiranthus cheiri</i>	Cheiroside A, cheirotoxin.
	<i>Euonymus europaeus</i> , <i>E. atropurpureus</i>	Eounoside, euobioside, euomonoside.
Crassulaceae	<i>Kalanchoe lanceolata</i> <i>Kalanchoe tomentosa</i>	Lancetoxin A et B. Kalanchoside.
	<i>Kalanchoe tubiflorum</i> <i>Kalanchoe pinnatum</i> <i>Tylecodon wallichii</i>	Bryotoxin A-C. Bryotoxin C, bryophyllin B. Cotiledoside.
	<i>Tylecodon grandiflorus</i> <i>Cotyledon orbiculata</i>	Tyledoside A-D, F et G. Orbicuside A-C.
	<i>Coronilla sp.</i>	Alloglaucotoxin, corotoxin, coroglaucin, glaucorin.
Iridaceae	<i>Homeria glauca</i> <i>Moraea polystachya</i> , <i>M. graminicola</i>	Scillirosidin derivatives. Bovogenin A derivatives.
	Liliaceae	<i>Urginea scilla</i> , <i>U. maritime</i>
<i>Urginea rubella</i> <i>Convalaria majalis</i>		Rubelin. Convalloside, convallatoxin.
<i>Bowiea volubilis</i> , <i>B. kilimand-scharica</i>		Bovoside A, glucobovoside A, bovoruboside.
Moraceae	<i>Antiaria africana</i> , <i>A. toxicaria</i>	Antiarin α .
Ranunculaceae	<i>Helleborus niger</i> , <i>H. viridis</i> , <i>H. foetidus</i>	Helleborein, helleborin, hellebrin.
	<i>Adonis vernalis</i> , <i>A. aestivalis</i> , <i>A. autumnalis</i> , <i>A. flammea</i>	Adonidin, adonin, cymarin, adonitoxin.
Santalaceae	<i>Thesium lineatum</i>	Thesisuside.
Scrophulariaceae	<i>Digitalis purpurea</i> , <i>D. lanta</i>	Digitoxin, gitoxin, gitalin, digoxin, F-gitonin, digitonin, lanatoside A-C.

En raison de leur intérêt vis-à-vis du présent travail, la biosynthèse des stéroïdes à noyau cardénolide est approfondie dans le paragraphe qui suit.

2. Biosynthèse du noyau cardénolide :

On admet généralement que les cardénolides sont issus de la condensation d'un dérivé de la série du prégnone (un 20-cétoprégnone fonctionnalisé comme la 5 β -prégnan-3,14,21-triol-20-one) avec une unité dicarboxylée (acétate).

L'introduction de l'hydroxyle en C-14 avec inversion de la configuration du carbone doit être précoce. (Geoffrey. D. B., 1998; Bruneton. J., 1999; Trigo. J. R., 2000; Janeczke. A. et col., 2005)



i: 3 β -HSD; ii: progestérone 5 β -reductase; iii: 3 β -hydroxysteroid-5 β -oxidoreductase; iv: malonyl-coenzyme A: 21-hydroxypregnane-21-hydroxy-malonyltransferase

Figure 24: Biosynthèse des cardénolides (Geoffrey. D. B., 1998; Janeczke. A. et col., 2005).

3. Structures et propriétés physico-chimiques des hétérosides cardénolides :

Les cardénolides constituent un groupe de stéroïdes à 23 carbones qui existent sous forme de glucosides dans différentes plantes, principalement dans la famille des Scrophylariaceae. Les glucosides sont hydrolysés par les acides et les bases, et aussi par certaines enzymes qui co-existent parfois à leur côté dans la plante même (Klyne. K.,1966).

3.1 Partie génine :

Tout les génines possèdent en commun le noyau tétracyclique habituel des stéroïdes. L'enchaînement des cycles A, B, C et D est normalement du type cis-trans-cis (digitoxigénine) ou, plus rarement, trans-trans-cis (uzarigénine, génines d'Asclepiadaceae). Commune également à toute les génines est la présence de deux hydroxyles : L'un, secondaire en C-3 β , et l'autre, tertiaire en C-14 β . Le dernier élément de cette structure de base commune à toute les génines est la substitution du carbone C-17 par une lactone $\alpha\beta$ -insaturée en orientation β (Bruneton. J.,1999)

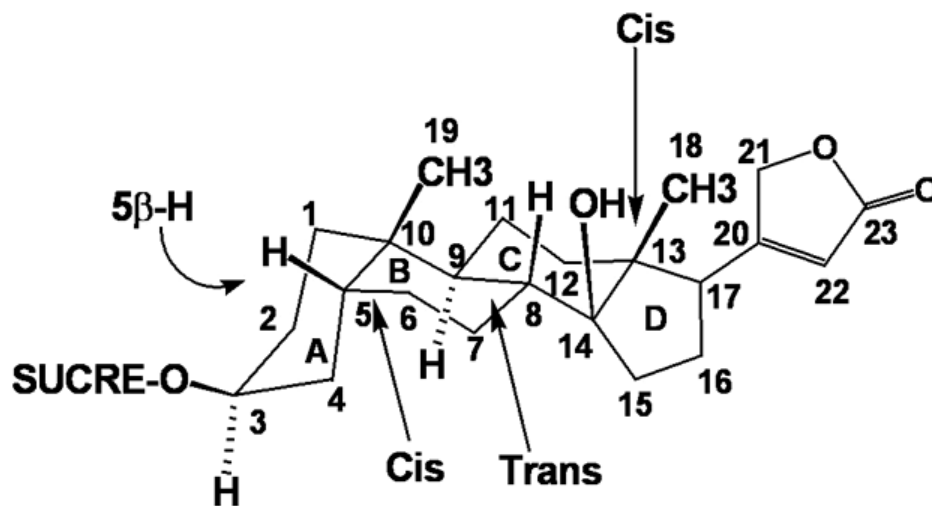


Figure 25 : Digitoxine : A/B cis- B/C trans-C/D cis

3.2 Partie sucre :

La partie osidique est habituellement liée à la génine par l'intermédiaire de l'hydroxyle en C-3. La majorité des oses rencontrés dans les hétérosides cardiotoniques sont quasiment spécifiques de ces molécules.

Ce sont des 2,6-didésoxyhexoses comme le D-digitoxose (=2,6-didésoxy-D-allose) et des 2,6-didésoxy-3-méthylhexoses comme le L-oléandrose (=2,6-didésoxy-3-méthyl-L-mannose) ou le D-diginose (=2,6-didésoxy-3-méthyl-D-galactose).

A côté des ces oses particuliers on rencontre également des 6-désoxyhexoses (L-rhamnose,

D-fucose) et des 6-désoxy-3-méthylhexoses tels que le L-thévétose ou 6-désoxy-3-méthyl-L-glucose) et le D-digitalose (=6-désoxy-3-méthyl-D-galactose). (Voir figure 26) (Bruneton. J., 1999; Vercauteren. J., 2007).

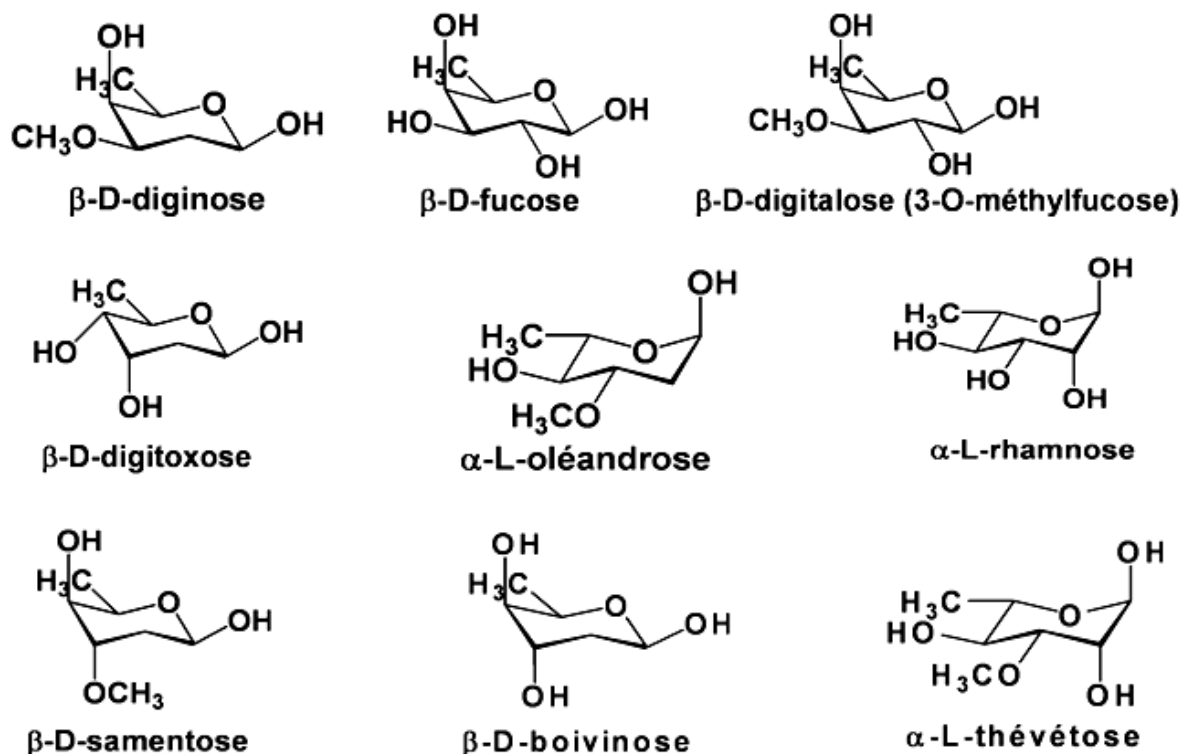


Figure 26 : Structure de la partie osidique (Bruneton. J.,1999).

4. Méthodes d'analyse :

4.1 Réactions de caractérisation :

Ce sont principalement des réactions de coloration et de précipitation qui sont réalisées le plus souvent sur des extraits plus ou moins purifiés. Ces réactions sont générales aux stéroïdes ou spécifiques aux cardénolides ou stéroïdes avec un noyau lactone (**Bruneton. J., 1999; Vercauteren. J., 2007**)

4.1.1 Réactions générales, caractérisant la génine stéroïdique:

Les réactions classiques de caractérisation des stéroïdes, comme celle donnée par le réactif de Libermann ou Vanilline-sulfurique, peuvent être utilisées.

La réaction de Libermann est basée sur l'utilisation de l'anhydride acétique en milieu sulfurique ; elle donne une coloration différente selon la génine triterpénique stéroïdique. Toutefois, cette réaction présente l'inconvénient d'être non distinctive envers le type de stéroïdes.

Une autre réaction peut être utilisée : c'est celle basée sur le réactif de VS (vanilline, acide sulfurique). Elle est générale à tous les terpènes, mais aussi aux dérivés du phénylpropane. Elle donne une coloration rose violette avec les stéroïdes, détectée à la lumière de jour.

4.1.2 Réactions spécifiques aux stéroïdes à noyau cardénolides :

Dans le cas des hétérosides cardénolides, il est beaucoup plus utile d'utiliser des réactions relativement plus spécifiques, liées soit à l'existence γ -lactone α,β -insaturée ou de celle des sucres du type desoxyhexoses :

- Réactions (Kedde et Baljet) :

Ces réactions sont liées à l'existence de la γ -lactone α,β -insaturée de type cardénolide (**Bruneton. J., 1999; Vercauteren. J., 2007**)

Le point commun de ces réactions est d'employer un dérivé aromatique nitré qui, en

milieu alcalin (hydroxyde de sodium), s'additionne sur la lactone pour former un dérivé fortement coloré.

La réaction de Kedde utilise l'acide 3,5-dinitrobenzoïque : la coloration obtenue est rouge violacé et assez stable.

La réaction de Baljet utilise l'acide picrique et donne une coloration orangée stable.

Ces réactions sont négatives avec les saponosides, négatives ou beaucoup moins sensibles avec les bufadiénolides (**Bruneton. J., 1999; Vercauteren. J., 2007**)

- Réactions spécifiques (Pesez, Keller-kiliani) :

Ces réactions spécifiques des 2,6-didésoxyhexoses, mettent en œuvre le xanthydro, également connue sous le nom de réaction de Pesez ou la réaction de Keller-Kiliani.

- réaction de Pesez :

Addition de xanthydro à une solution d'hétérosides dans l'acide acétique concentré puis chauffage au bain-marie ; il se développe une coloration rouge.

- réaction de Keller-Kiliani :

Addition d'acide sulfurique concentré contenant des traces de sels ferriques à une solution d'hétéroside dans l'acide acétique concentré contenant également des sels ferriques ; il se forme un anneau brun-rouge et la solution acétique se colore lentement en bleu-vert.

4.2 Caractérisation par spectroscopie UV :

Les cardénolides en C₂₃ possèdent un cycle lactone (Cycle buténolide attaché par le carbone C₁₇), cette fonction absorbe à une longueur d'onde bien déterminée vers 220nm dans le méthanol (**Begum. S. et col., 1999; Dinan. L. et col., 2001**).

4.3 Caractérisation par spectroscopie IR :

Le spectre des cardénolides en C₂₃ à γ -lactone α β -insaturée (=buténolide) est caractérisé par les deux bandes à 1747 et 1780 cm⁻¹. On peut observer aussi une bande à 3450 cm⁻¹ dans le cas où des groupements hydroxyles (OH) existent sur la génine (**De Carvalho. J.E. et col., 1991; Begum. S. et col., 1999**)

4.4 Caractérisation par spectroscopie RMN :

L'examen du spectre RMN ^1H montre la présence d'un ensemble de signaux des protons portés par le noyau stéroïdique dans l'intervalle 1-2,50 ppm, à l'exception du singulet large attribuable au proton H-3, observé entre 4,02-4,36ppm. Ces signaux (entre 1-2,5 ppm) sont ceux en partie dus aux protons portés par les carbones primaires, secondaires et tertiaires du noyau stéroïdique (**Drakenberg. T. et col., 1990**) mais aussi ceux des protons des méthyles angulaires, à savoir Me-18 (s, 0.82-1.07 ppm) et Me-19 (s, 0.81-1.11ppm).

Le spectre RMN H des hétérosides cardénolides se distingue de celui des autres stéroïdes, par les signaux relatifs aux protons du cycle lactonique (**Abe. F. et col., 1996; Kawamura. A. et col., 1999; Abe. F. et col., 2000; Lei. Z.H. et col., 2000; Kamel. M.S. et col., 2001; Padua. R.M. et col., 2007**).

Ainsi, on observe en général (figure 27):

- un signal s'intégrant pour un proton et sous forme de dd correspondant au proton H-17 à (2.74-3.40 ppm) ;
- deux signaux, chacun s'intégrant pour un proton, sous forme de dd correspondant aux deux protons H-21 (4.80-5.40 ppm) et H-21 (4.80-5.43 ppm) ;
- un signal sous forme d'un singulet large, d'intégration 1 H, attribuable au proton H-22 (5.85-6.34 ppm)

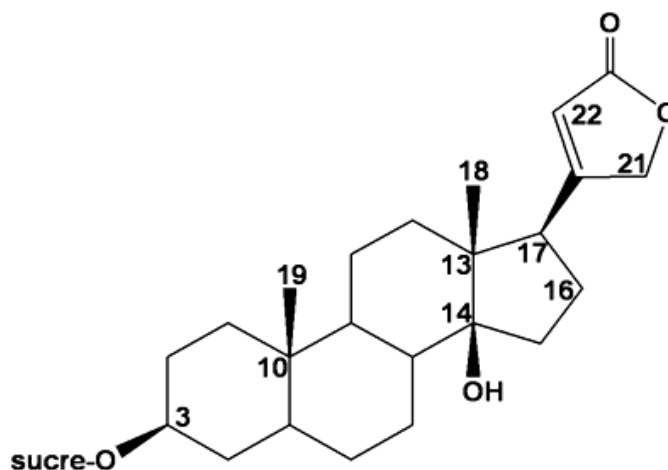


Figure 27: structure des hétérosides cardénolides.

Les signaux relatifs à la partie sucre sont communs et non spécifiques.

5. Intérêt thérapeutique des hétérosides cardénolides:

Un certain nombre de stéroïde à noyau cardénolide sont utilisés en thérapeutique : c'est le cas de la Digitoxine (ou Digitaline), la Digoxine et l'Ouabaïne. D'autres servent toujours de poisons pour les flèches dans les pays « moins évolués », comme dans certaines régions de l'Afrique (**Klyne. K., 1966**), d'Amérique du sud et le Sud- Est Asiatique (**Dinan. L. et col., 2001**).

A dose faible, les hétérosides cardiotoniques de type cardénolides comme la digitoxine (Digitaline), la digoxine ou ouabaïne ont une action directe et puissante sur le cœur. Ils l'aident à maintenir le rythme cardiaque en cas d'affaiblissement (des inhibiteurs enzymatiques) (**Perlin. D. S., 1998; Grosa. G. et col., 2005; Lefranc. F. et col., 2008**). Ces molécules naturelles d'origine végétale demeurent des médicaments intéressants pour le traitement au long cours de l'insuffisance cardiaque (**Bruneton. J., 1999**). Ces cardénolides sont également diurétiques. Ils contribuent à transférer les liquides des tissus et du système circulatoire vers les conduits urinaires (**Bruneton. J., 1999**).

Les hétérosides cardénolides ou budiénolides sont aussi des poisons puissants. Il n'est pas sans intérêt de noter qu'à la fin des années soixante on enregistrait encore, au Kenya, de nombreux cas d'utilisation de ces poisons à des fins criminelles ; 81%des flèches utilisées contenaient de l'ouabaïne (**Bruneton. J., 2001**).

Beaucoup des cardénolides ont des effets physiologiques variés : antibactériens, insecticides (**Dinan. L. et col., 2001**), inflammatoire (**Baggarwal. B. et col., 2006**) et cytotoxiques (**Kawamura. A. et col., 1999; Mijatovic. T., 2006; Lefranc. F. et col., 2008; Barbosa. R. R. et col., 2008**).

Finalement, il est utile de souligner que la littérature ne signale aucune étude sur le *N. oleander* et l'effet molluscicide.

DEUXIÈME PARTIE

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel végétal et Extraction

1.1 Matériel végétal :

La récolte du matériel végétal a été réalisée au mois d'avril 2007 sur la route d'Ain Smara, Constantine. Les parties aériennes fleuries récoltées (feuilles et fleurs) ont été séchées à l'abri du soleil, puis entreposées dans un endroit ventilé, dans des sacs en papier, jusqu'à leur analyse.

Un Voucher spécimen de la plante, enregistré sous le n° NO 407, est déposé dans l'herbier du laboratoire de pharmacognosie et de botanique médicale, du département de pharmacie, Université Mentouri Constantine

1.2 Méthode d'extraction :

Les matières végétales récoltées et séchées de *N. oleander* ont été pulvérisées à l'aide d'un broyeur électrique à couteau. La poudre obtenue (500 g) est mise à macérer dans le mélange méthanol : eau (70:30 v/v) pendant 72 heures. Cette opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant. Les filtrats hydro-alcooliques combinés ont été concentrés sous vide à une température réduite, ne dépassant pas 45° C. Le résidu aqueux obtenu subit alors une série d'extraction par partage, dans une ampoule à décanter, par confrontation avec des solvants non miscibles à l'eau et de polarité croissante.

Extraction de la phase aqueuse est réalisée en premier par l'éther de pétrole 40°-65° C, en utilisant un volume égal à la solution aqueuse. Après agitation, la phase organique est séparée. L'opération d'extraction est répétée 3 fois et les phases organiques combinées sont concentrées à sec, sous vide à basse température (< 45°C) à l'aide d'un évaporateur rotatif.

La phase aqueuse résultant de la confrontation avec l'éther de pétrole (EP) et ensuite soumise successivement à l'action de l'éther éthylique (EE) et l'acétate d'éthyle (AE) dans les mêmes conditions opératoires.

Ainsi, quatre extraits de polarité croissante sont obtenus :

- l'extrait de l'éther de pétrole (EP, 4.5g)
- l'extrait de l'éther éthylique (EE, 2g) ;
- l'extrait de l'acétate d'éthyle (AE, 4.5g) ;
- Le résidu aqueux résultant (AQ, 5.35g).

Le protocole d'extraction est résumé dans le schéma 1 suivant :

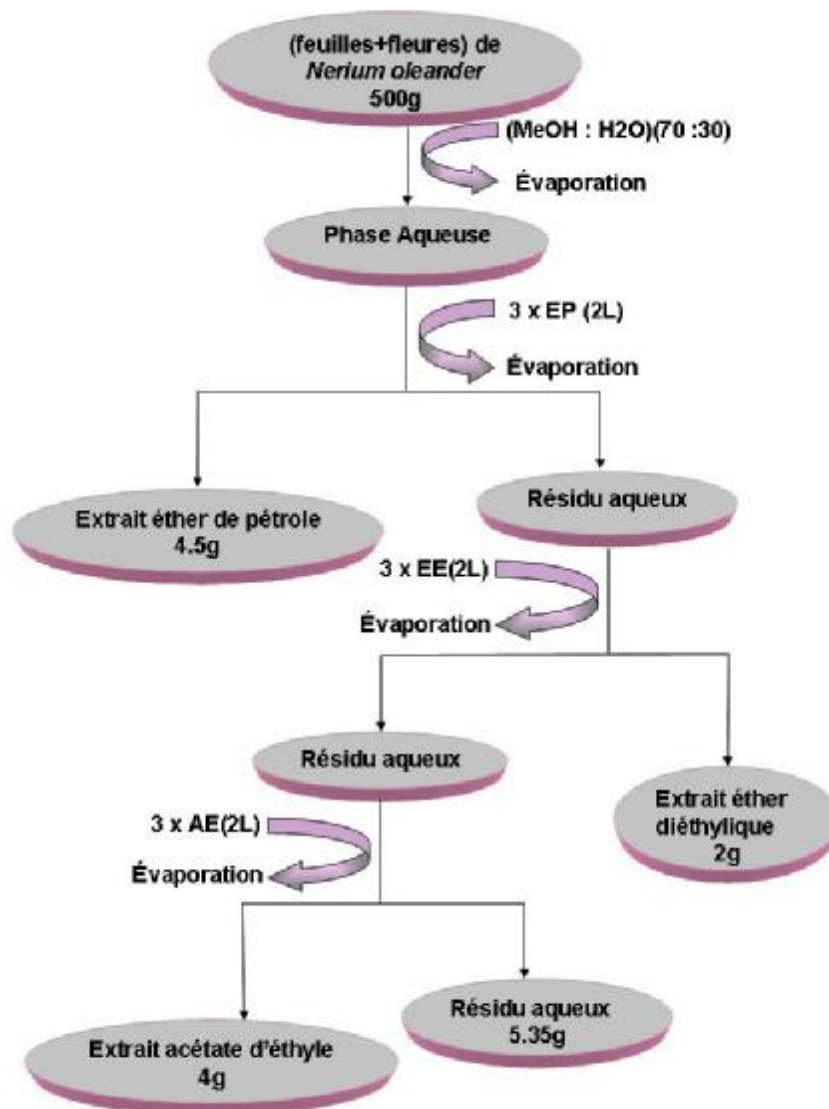


Schéma 1 : Protocole d'extraction des parties aériennes (feuilles+fleures) de *N. oleander*.

2. Méthodes chromatographiques

Les techniques de chromatographies sur couche mince (CCM) et sur colonne (CC) ont été utilisées dans un but analytique et/ou préparatif.

2.1 Chromatographie sur couche mince analytique (CCM) :

Les plaques CCM de gel de Silica 60G d'origine commerciale (Merck, Germany), d'épaisseur 0,2mm, avec ou sans agent fluorescent (F254), ont été utilisées. Les extraits EP, EE, AE et AQ ont été examinés en utilisant différents systèmes de solvants (voir tableau 1). Après leur développement, les plaques sont ensuite séchées et examinées à la lumière du jour et sous UV (254 nm, 365 nm), et puis après traitement par des réactifs révélateurs.

Tableau 1 : systèmes de solvants utilisés dans l'analyse par CCM des gradients extraits de *N. oleander*

Extraits	Elution
EP	(EP : AE) – (9:1), (8:2) et (7:3),
EE	(EP : AE) – (6:4), (1:1) et (4:6)
AE	(CHCl ₃ : AE) – (2: 8) ; (AE) – (100%) ; (AE : MeOH) – (9:1)
AQ	(AE : MeOH) – (8 :2), (7:3) et (1:1)

2.2 Chromatographie sur couche mince préparative :

Des plaques de CCM en verre (10x20 mm, 20x20 mm) ont été préparées selon la méthode standard (**Macek. K., 1972**). La phase stationnaire est constituée de gel de silice (Camag), sans indicateur fluorescent, additionné de 5% de CaSO₄ comme agent liant. Les plaques ainsi préparées ont été activées avant d'être utilisées, dans un four réglé à 110°C pendant 30 mn.

2.3 Chromatographie sur colonne (CC) :

Une colonne chromatographique, de dimension (25 mm de Ø, 160 mm de Long), muni d'un robinet en verre, a été utilisée pour le fractionnement de l'extrait AE. Le remplissage de la colonne a été réalisé par la méthode humide (Macek. K., 1972), en utilisant du gel de silice 60 (70-230 mesh. ASTM, Merck). L'élution est effectuée avec un mélange des solvants de différentes proportions de CHCl₃, AE et MeOH (tableau 2). Un nombre de 123 fractions ont été collectées.

Tableau 2 : Fractionnement de l'extrait AE

Fractions	Eluants (%)			Volume (ml)
	CHCl ₃	AE	MeOH	
F ₁ -F ₆	100	-	-	200
F ₇ -F ₂₂	90	10	-	300
F ₂₃ -F ₃₅	85	15	-	200
F ₃₆ -F ₄₈	80	20	-	200
F ₄₉ -F ₅₉	70	30	-	200
F ₆₀ -F ₇₁	60	40	-	200
F ₇₂ -F ₈₀	50	50	-	200
F ₈₁ -F ₈₆	40	60	-	100
F ₈₇ -F ₉₁	30	70	-	100
F ₉₂ -F ₉₄	20	80	-	50
F ₉₅ -F ₉₇	10	90	-	50
F ₉₈ -F ₁₀₀	-	100	-	50
F ₁₀₁ -F ₁₀₃	-	90	10	50
F ₁₀₄ -F ₁₀₆	-	80	20	50
F ₁₀₇ -F ₁₀₉	-	70	30	50
F ₁₁₀ -F ₁₁₁	-	60	40	50
F ₁₁₂ -F ₁₁₃	-	50	50	50
F ₁₁₄ -F ₁₁₅	-	40	60	50
F ₁₁₆ -F ₁₁₇	-	30	70	50
F ₁₁₈ -F ₁₁₉	-	20	80	50
F ₁₂₀ -F ₁₂₁	-	10	90	50
F ₁₂₂ -F ₁₂₃			100	50

3. Réactifs révélateurs de produits naturels

L'analyse du profil phytochimique des divers extraits et fractions a été effectuée en utilisant des réactifs de caractérisation de produits naturels, dont la composition est illustrée dans le tableau 3, selon des procédures standards (**Macek. K., 1972 ; Wagner. H. et col., 1984**).

Tableau 3 : Réactifs chimiques pour la révélation des plaques CCM (**Macek. K., 1972 ; Wagner. H. et col., 1984**)

Réactif révélateur	Produits naturels cibles	Interprétation
Acide sulfurique concentré	Types de cardénolides	La coloration à la lumière du jour permet de distinguer l'Adynérine (rouge, rouge violet) de d'Odoroside A (marron et vert marron)
Libermann-Burchard	stéroïdes et triterpènes	Selon le type de coloration sous UV à 365nm, on distingue les triterpènes (rouge ou orangé) des stéroïdes (jaune ou vert)
Dragendorff	alcaloïdes	Les alcaloïdes apparaissent à la lumière du jour sous forme de tache orangée sur fond jaune
Kedde	cardénolides	La coloration obtenue à la lumière du jour est rouge violacé et assez stable.
Vapeur ammoniacale	coumarine	La coloration obtenue sous UV à 365 nm s'intensifie

4. Méthodes d'analyses spectrales

4.1 Analyse par spectrophotométrie (UV) :

Les spectres UV (région 200-500 nm) des composés ont été mesurés dans le méthanol (grade analytique) à l'aide d'un spectrophotomètre de type Shimadzu UV-3101PC (Laboratoire de Physique, Université de Mentouri. Constantine).

4.2 Analyse par RMN du proton (RMN ¹H) :

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton (en mode proton RMN ¹H) sont enregistrés dans du solvant deutérié, CDCl₃ (δ H = 7.28 ppm) sur un appareil Bruker (250MHz) (Dépt. 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).

5. Méthode d'évaluation de l'activité molluscicide

La méthode utilisée dans cette étude pour la mesure de l'effet molluscicide d'une substance est celle recommandée par l'OMS (**OMS., 1965**) et modifiée par Marston pour les besoins du criblage des produits naturels

5.1. Montage expérimental :

Le test utilise des conteneurs d'eau distillée contenant des mollusques (minimum de 40 ml par mollusque) et observe la mortalité de ces derniers quant ils sont exposés à la substance étudiée (extrait, fraction, molécule).

5.2. Collecte et préparation des mollusques :

Des spécimens de bulin ou *Bulinus truncatus* récoltés dans leur gîte naturel (lacs n°2 et 4 du Parc forestier de Djebel Ouahch, 3 km au nord de Constantine) ont été identifiés et un voucher spécimen est déposé au niveau du laboratoire de parasitologie de la faculté de médecine de l'Université de Constantine sous le n° BT0401.



Figure 1 : Morphologie de la coquille des mollusques de l'espèce *Bulinus truncatus* (à gauche) et *Lymnaea acuminata* (à droite) récoltés à Djebel Ouahch.

Les bulins proprement identifiés sont maintenus dans des conditions suivantes (**Singh. S et col., 1998; Molgaard. P. et col., 2000**), avant le test d'évaluation :

Tableau 4 : Conditions de culture des mollusques

<i>paramètres</i>	désignation
Température	26-28°C
Luminosité	Eclairage naturel diurne
Alimentation	Salade verte lavée à l'eau distillée
Milieu	Eau filtrée, sans chlorure
Oxygénation	Pompe pour aquarium

Les bulins sont conditionnés par suppression seul de la nourriture 24 heures avant d'être exposés aux extraits végétaux et substances pures.

5.3. Mesure de l'activité molluscicide :

L'expérience d'évaluation de l'activité molluscicide a été réalisée selon la méthode standard de l'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS., 1965**), modifiée pour les besoins du criblage (**Marston. A. et col., 1985**).

Les critères d'activité molluscicide (Doses létales ou mortelles DL₅₀ ou DL₉₀) ont été définis par Mott (**Mott. K. E., 1987**) :

- les extraits sont considérés actifs pour une concentration égale ou inférieure à 100 µg/ml pouvant être mortelle à 90 % de la population de mollusques ;
- les composés isolés sont actifs pour une concentration égale ou inférieure à 20 µg/ml pouvant être mortelle à 90 % de la population de mollusques

Pour le criblage préliminaire des extraits bruts, une concentration minimale de 20µg/ml a été utilisée pour les déceler les substances potentiellement actives qui pourraient être présents dans les extraits à faible dose, et non détecter à seuil de concentration plus important à 100µg/ml.

La détermination des mollusques morts est effectuée comme suit :

Les spécimens morts sont placés dans une boîte pétri et examinés à l'aide d'une loupe et une lumière inverse pour confirmer la mortalité (immobilité, absence de contraction, décoloration). Les spécimens morts sont éliminés rapidement pour éviter d'éventuelle contamination. **(Molgaard. P. et col., 2000).**

5.4. Protocole utilisé dans cette étude :

Les préparations végétales suivantes ont été utilisées pour le test d'activité molluscicide préparé. Il s'agit d'extraits bruts (EP, EE, AE et AQ), de fractions enrichies et de molécules. Le protocole standard a été modifié et adapté comme suit pour le besoin des criblages.

5.4.1 Criblage des extraits bruts :

L'évaluation de l'activité molluscicide des extraits bruts a été effectuée utilisant de 5 à 8 mollusques de taille uniforme (\varnothing moyen de la coquille 0,8-1,0cm) par flacon (figure 2), exposés aux extraits végétaux à une concentration de 20 μ g/ml pour une période de 24 h **(Molgaard. P. et col., 2000).**



Figure 2 : mollusque du genre *Bulinus* (*Bulinus truncatus*) en contact avec la solution contenant les substances végétales extraites du *N. oleander*

La quantité requise de chaque extrait est d'abord dissoute dans de l'eau, additionnée de 0,1% de diméthyl sulfoxyde ou DMSO comme agent homogénéisant (**Silva. T. M. et col., 2005**). Les tests sont répétés deux fois et confrontés au contrôle sans traitement (mollusque avec H₂O et 0,1% DMSO). Des observations de la mortalité des spécimens sont effectuées pour des périodes de 8h, 16 et 24 h.

Les extraits bruts provoquant au moins 90% de mortalité des mollusques dans les 24 heures seront d'office retenus comme source potentielle de substances molluscicides.

5.4.2 Evaluation de l'activité de composé isolé W₄:

L'évaluation de l'activité molluscicide proprement dite, détermine les concentrations létales DL₉₀ et DL₅₀ de molécule isolée W₄. Elle a été réalisée en utilisant une dizaine de mollusques de taille uniforme (Ø moyen de la coquille 0,8-1,0cm) par compartiment, exposés à un gradient de concentration de composé pur W₄ pendant une période de 24h (**Gebremedhim. G. et col., 1994**). Des observations de la mortalité des spécimens sont effectuées pour des périodes de 8h, 16 et 24 h.

Les lots de mollusques sont répartis en deux groupes :

- le premier groupe contrôle (ne recevant aucun traitement à l'exception de l'eau + 0,1% DMSO) ;
- le deuxième groupe traité par les solutions de produit isolé W₄, avec des concentrations variables: 50, 10 et 1 µg/ml.

Les essais d'évaluation sont répétés trois fois pour chaque traitement.

5.5. Traitements statistiques des données :

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes affectées de l'écart type [Moy ± ET]. Pour l'étude statistique, les différents relevés ont été analysés par le test student, sur le logiciel Microcal, version 6.0 Windows (Microcalsoftware-USA).

TROISIÈME PARTIE

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Une étude effectuée auparavant sur l'extrait aqueux des parties aériennes de *N. oleander* a révélé une forte activité molluscicide sur l'espèce d'escargots, *Bulinus truncatus*, vecteur de la bilharziose urogénitale, maladie transmise à l'homme par un ver parasite du genre *Schistosoma* (Samaï. A., 2006).

Ce présent travail est une continuité de l'étude citée ; il a pour but de contribuer à caractériser la nature chimique des substances intervenant dans cette toxicité.

Pour ce faire, l'extrait hydro-alcoolique des parties aériennes de *N. oleander*, préparé selon le protocole décrit en section (§1.2), a été soumis à un gradient d'extraction pour fournir 4 extraits de polarités distinctes : éther de pétrole (EP), éther éthylique (EE), acétate d'éthyle (AE) et le résidu aqueux (AQ) (tableau 1) :

Tableau 1: Caractéristiques des extraits bruts de *N. oleander*

Extraits	EP	EE	AE	AQ
Masse (g)	4.5	2	4.5	5.35
Rapport d'extraction [§]	(1:111)	(1:250)	(1:111)	(1:93)
Texture	Huileux	Résineux	Résineux	Résineux

§ : Rapport d'extraction = 1 g d'extrait/masse de matière végétale sèche.

1. Evaluation de l'activité des extraits bruts

Le résultat de la figure 1 montre l'activité molluscicide, exprimée en pourcentage de mortalité des mollusques, de chacun des extraits (EP, EE, AE et AQ) de *N. oleander*, appliqué chacun à 20 µg/ml, comparé au contrôle (sans traitement) durant une période d'exposition maximale de 24 h. Le test d'activité a été réalisé selon le protocole décrit dans la partie expérimentale (§ 5.4.1).

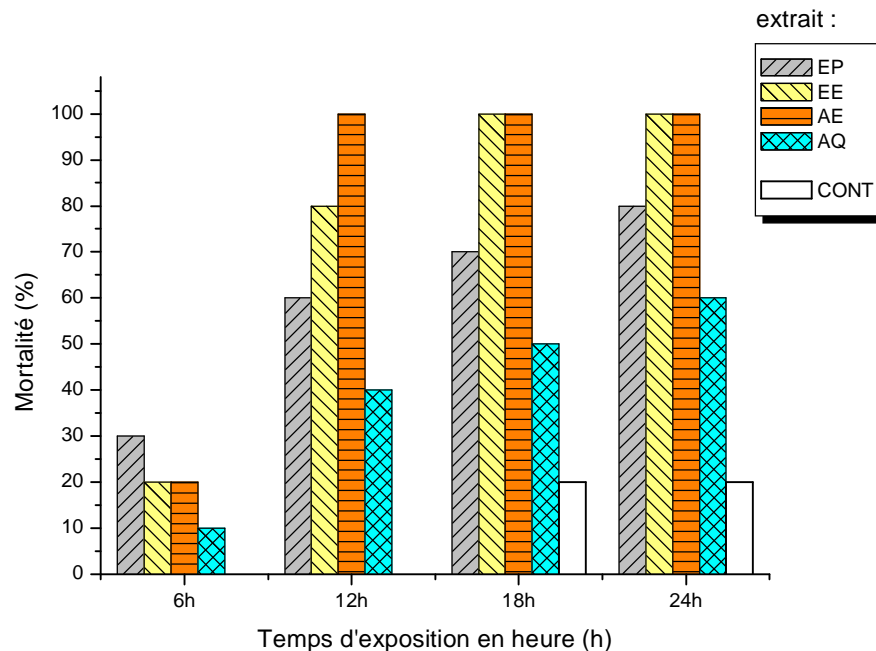


Figure 1 : Variation en fonction du temps de la mortalité des mollusques (valeur moyenne, n = 2, exprimée en pourcentage), exposés à 20 µg/ml de chacun des extraits de *N. oleander*.

La lecture de la figure 1 montre que tous les extraits bruts de *N. oleander* se sont révélés doués d'activité molluscicide à une concentration de 20 µg/ml. Les valeurs respectives de la mortalité des mollusques (exprimée en pourcentage) après 24 heures d'exposition à 20 µg/ml de chacun des extraits bruts, sont de :

- 80 % pour l'extrait brut apolaire, de l'éther de pétrole (EP) ;
- 100 % pour l'extrait brut peu polaire, obtenu avec l'éther éthylique (EE) ;
- 100 % de l'extrait brut moyennement polaire, obtenu avec l'acétate d'éthyle (AE) ;
- 60 % de l'extrait brut polaire, obtenu avec l'eau (AQ).

Dans les mêmes conditions opératoires, la mortalité dans le contrôle (CONT) n'a pas dépassé les 20 % de la population, après 24 heures d'exposition.

Une mortalité moyenne d'au moins 90 % de la population de mollusques a été observée dans la période de 24h pour chacun des extraits (EE) et (AE), appliqués à

une concentration de 20 µg/ml. Ces deux extraits contenant des phytoconstituants peu et moyennement polaires, ont exhibé des mortalités de 100 % de la population des mollusques, dès les 12h pour l'extrait (AE) et dès les 18h pour l'extrait (EE).

Une activité molluscicide moins important (mortalité \leq 80%) est cependant observée après 24h avec les extraits bruts (EP) et (AQ). Leur relativement faible toxicité envers les mollusques après 24 heures d'exposition, comparée aux extraits (EE) et (AE), est probablement liée à l'existence de substances actives, mais à faible dose **(Mendes N.M., 1999)**.

Selon les critères standards **(OMS., 1965; Marston. A. et col., 1985)** : les résultats obtenus permettent de retenir en priorité les extraits (EE) et (AE) comme sources potentielles de substances molluscicides.

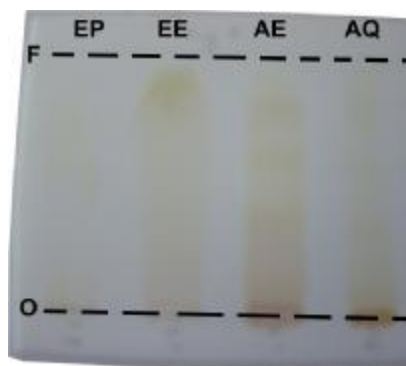
En raison de l'effet molluscicide important et relativement rapide de l'extrait brut (AE) (100 % de mortalité de la population de mollusque dès 12h d'exposition), son étude est réalisée en priorité comme source potentielle de substances molluscicides. Il sera soumis à une étude phytochimique de fractionnement en vue d'isoler de potentiels agents bioactifs.

2. Fractionnement de l'extrait actif (AE) et isolement des hétérosides cardénolides

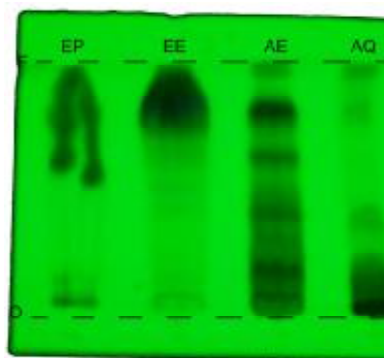
2.1. Caractérisation phytochimique de l'extrait actif (AE) :

Les résultats du criblage chimique de caractérisation de l'extrait actif (AE) a été réalisé par chromatographie sur couche mince selon le protocole décrit en section (§2.1). A titre de comparaison, les extraits bruts (EP), (EE) et (AQ) ont été utilisés dans cette analyse chromatographique.

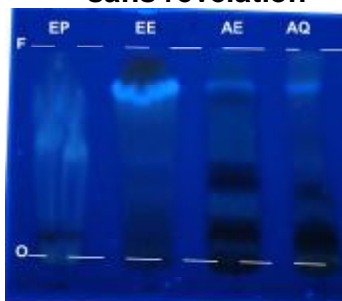
A titre d'exemple, le chromatogramme obtenu en utilisant le système de solvants (AE : MeOH : H₂O, 81/11/8) avec révélation multiple est visible dans la figure 2, qui suit :



(I) à la lumière du jour, sans révélation



(II) à la lumière UV254nm, sans révélation



(III) à la lumière UV 366nm, sans révélation



(IV) à la lumière du jour, taches révélées par le réactif Kedde

Figure 2 : Chromatogrammes des extraits (EP), (EE), (AE) et (AQ), [Révélations à la lumière du jour (I), sous lumière UV254 (II) et UV366 (III) et après application du réactif de Kedde (IV) ; système d'élution (AE : MeOH : H₂O, 81/11/8)]

Le résultat de l'examen phytochimique est montré dans le tableau 2 :

Tableau 2 : Profil métabolique des extraits bruts de *N. oleander*.

Extraits	Groupes de métabolites secondaires bioactifs				
	Alcaloïdes	Cardénolides*	Flavonoïdes*	Stéroïdes*	Triterpènes*
E.P	-	+	-	+	+
E.E	+	++	-	+	++
A.E	++	+++	++	++	+
AQ	+	+	++	+	+

(*) Présence déjà signalée dans la littérature

(+++) présence en grande quantité ; (++) présence positive ; (+) présence en trace ; (-) absence .

Sur la base de l'examen chromatographique, une constatation peut être faite en ce qui concerne le contenu de l'extrait actif (AE) : la présence en grande quantité (par rapport à l'importance de la densité des taches) de substances secondaires appartenant aux groupes suivants : hétérosides cardénolides (Hcar), alcaloïdes (Alc), flavonoïdes (Flav), avec des quantités moindres de triterpènes (Triterp) et stéroïdes (Ster) autres que cardénolides.

En raison de la complexifié de l'extrait actif (AE), son fractionnement bioguidé ne permettrait pas d'isoler l'activité au sein d'une ou d'un nombre limité de fractions.

Au vu de cette constatation, l'hypothèse que les hétérosides cardénolides, présents en grande quantité dans l'extrait actif (AE) (figure 3) soient responsables de l'activité molluscicide a été avancée par plusieurs auteurs (**Singh. S. et col., 1998; Hamdy. I. et col. 1999**). Pour vérifier cette hypothèse dans le cas de l'extrait actif (AE) de *N. oleander*, un fractionnement et purification d'un certain nombre d'hétérosides cardénolides est réalisée. Ceci sera suivi, d'une évaluation de l'effet molluscicide de la ou des substances isolées en vue de s'assurer de leur contribution ou non à l'activité observé de l'extrait (AE) envers le *Bulinus truncatus*.

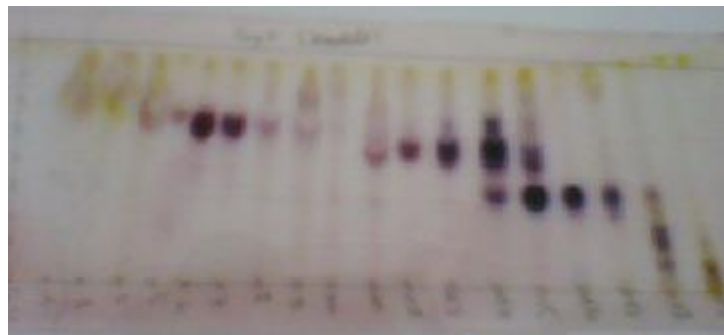


Figure 3 : Chromatogramme des lots (1-20) de l'extrait actif AE, Éluant : (AE:MeOH : H₂O; 81 : 11 :8) ; révélation réactif de Kedde.

2.2. Fractionnement par colonne chromatographique :

Le fractionnement de l'extrait (2 g) sur colonne chromatographique de gel de silice, en mode gradient et selon la procédure décrite en section (§2.3), a permis de récupérer 123 fractions.

Ces fractions examinées par CCM, utilisant différents systèmes de solvants et de réactifs révélateurs, ont été regroupées en 20 lots (tableau 3) selon leur homogénéité chimique :

Tableau 3: Fractions issues de l'extrait actif (AE)

Fract.	Système d'élution CC	Masse (mg)	Lot	Phytoconstituants majoritaires
F ₁ -F ₉	CHCl ₃ (100%) → (CHCl ₃ : AE)(90 :10)	trace	01	-
F ₁₀ -F ₁₆	(CHCl ₃ : AE) (90 :10)	39.9	02	Triterp
F ₁₇ -F ₂₁	(CHCl ₃ : AE) (90 :10)	22.7	03	Triterp
F ₂₂ -F ₂₅	(CHCl ₃ : AE)(90 :10) → (CHCl ₃ : AE) (85 :15)	8.3	04	Triterp
F ₂₆ -F ₂₉	(CHCl ₃ : AE) (85 :15)	12.1	05	Hcar +Triterp
F ₃₀ -F ₄₈	(CHCl ₃ : AE) (85 :15) → (CHCl ₃ : AE) (80 :20)	3.2	06	Hcar +Triterp+ Alc
F ₄₉ -F ₆₀	(CHCl ₃ : AE) (70 :30) → (CHCl ₃ : AE) (60 :40)	10.2	07	Hcar +Triterp+ Alc+ Ster
F ₆₁ -F ₆₃	(CHCl ₃ : AE) (60 :40)	4.1	08	Hcar+ Triterp+Ster
F ₆₄ -F ₆₆	(CHCl ₃ : AE) (60 :40)	3.6	09	Triterp+Ster
F ₆₇ -F ₇₁	(CHCl ₃ : AE) (60 :40)	3.5	10	Triterp+Ster
F ₇₂ -F ₇₆	(CHCl ₃ : AE) (50 :50)	3.5	11	Hcar +Triterp
F ₇₇ -F ₈₃	(CHCl ₃ : AE) (50 :50) → (CHCl ₃ : AE) (40 :60)	9.2	12	Hcar +Triterp+ Alc
F ₈₄ -F ₉₁	(CHCl ₃ : AE) (40 :60) → (CHCl ₃ : AE) (30 :70)	10.4	13	Hcar +Alc
F ₉₂ -F ₉₉	(CHCl ₃ :AE) (20 :80) → (CHCl ₃ : AE) (10 :90) → AE: 100%	49.2	14	Hcar +Alc
F ₁₀₀ -F ₁₀₁	AE : 100% → (AE : MeOH) (90 :10)	14.7	15	Hcar +Triterp+ Alc
F ₁₀₂ -F ₁₀₆	(AE : MeOH)(90 :10) → (AE : MeOH) (80 :20)	45.7	16	Hcar +Triterp
F ₁₀₇ -F ₁₀₉	(AE : MeOH) (70 :30)	19.6	17	Hcar +Triterp+ Alc
F ₁₁₀ -F ₁₁₇	(AE :MeOH)(60 :40) → (AE :MeOH)(50 :50) → (AE :MeOH)(40 :60) → (AE :MeOH)(30 :70)	37.9	18	Hcar +Flav
F ₁₁₈ -F ₁₂₁	(AE : MeOH)(20 :80) → (AE : MeOH) (10 :90)	50.2	19	Flav
F ₁₂₂ -F ₁₂₃	MeOH : 100%	22.8	20	Triterp

Hcar : hétérosides cardénolides, Alc : alcaloïdes, Flav : flavonoïdes, Triterp : triterpènes, Ster : stéroïdes

Les lots 14 et 16 ont été sélectionnés au vu de leur richesse en hétérosides cardénolides, accompagnés de faibles quantités d'autres types de métabolites.

2.3. Purification des lots 14 et 16 :

Les lots 14 et 16 ont été soumis à une CCM préparative de gel de silice selon le protocole décrit en section (§2.2).

2.3.1. Résultat du fractionnement du lot 14 :

Le fractionnement du lot 14 (49.2 mg) par CCM, en utilisant le système d'éluant (AE:EtOH ; 95 :5), a permis d'isoler 3 principales produits majoritaires, identifiées comme celles de cardénolides, et dénotées ci-après W_1 , W_2 et W_3 . Les caractéristiques chromatographiques des 3 produits sont décrites dans le tableau 4 et figure 4. Les produits W_1 et W_2 se comportent comme celles de composés pures, alors que celle de la tache W_3 se révèlent être un mélange complexes, d'au moins deux autres taches.



Figure 4 : Chromatogramme des substances W_1 , W_2 et W_3 isolées du lot 14, cochromatographiées avec la digitoxine (Di) ; Eluant : (AE:EtOH ; 95 :5) ; révélation réactif de Kedde.

Tableau 4 : Caractérisation chimique des composés W₁, W₂ et W₃.

Système d'éluant	Phytoconstituant					
	W ₁		W ₂		W ₃	
	S1	S2	S1	S2	S1	S2
Rf	0,81	0,74	0,76	0,68	0.65	0.56
Révélation par Kedde	positif		positif		positif	
Nature chimique	cardénolide		cardénolide		Mélange de cardénolide (avec 2 taches majoritaires)	

Système d'éluant utilisés : S1 (AE:EtOH : H₂O ; 81 :11 :8) ; S2 (AE : EtOH ; 95 :5)

2.3.2. Résultat du fractionnement du lot 16 :

Le fractionnement du lot 16 (45,7 mg) par CCM, en utilisant le système d'éluant (AE:MeOH ; 85 :15), a permis d'isoler 1 produit majoritaire, identifiée comme celle d'un cardénolide, et dénotée ci-après W₄. Les caractéristiques chromatographiques de produit W₄ sont décrites dans le tableau 5 et figure 5.



Figure 5: Chromatogramme de substance W₄ isolée du lot 16, cochromatographiées avec la digitoxine (Di) ; Eluant : (AE:MeOH ; 85 :15) ; révélation réactif de Kedde.

Tableau 5 : Caractérisation chimique des composés W₄.

Composé	W ₄	
Système d'éluant	S1	S3
Rf	0,54	0,44
Révélation par Kedde	positif	
Nature chimique	cardénolide	

Système d'éluants utilisés : S1 (AE:EtOH : H₂O ; 81 :11 :8) ;
S3 (AE : MeOH ; 85 :15)

Récapitulatif du protocole du fractionnement et purification des hétérosides cardénolides (schéma 1) :

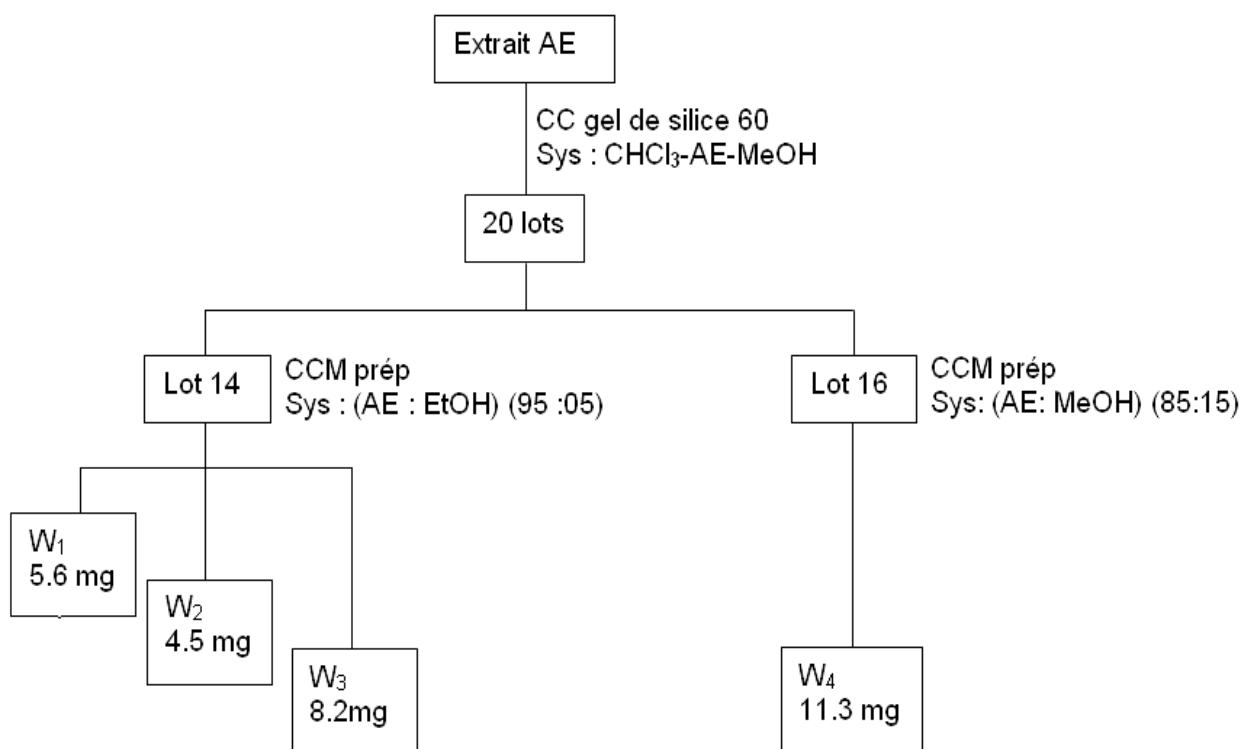


Schéma 1: Fractionnement et isolement des métabolites de l'extrait actif (AE)

3. Analyses structurales des cardénolides isolées

Les composés isolés des lots 14 (composé W₁, composé W₂) et 16 (composé W₄) ont été soumis aux analyses physico-chimiques, dont les résultats sont résumés en ce qui suit :

3.1 Composé W₁ :

3.1.1. Caractéristiques physico-chimiques et chromatographiques :

Les caractéristiques de la substance W₁ sont exprimées dans le tableau 6 suivant :

Tableau 6 : caractérisation physico-chimique et chromatographique du composé W₁.

Consistance	Solide amorphe de couleur blanche,
Solubilité	CHCl ₃ , MeOH
Rf (système)	0,81 S ₁ (AE : MeOH : H ₂ O) (81 :11 :8)
RRf§ x 100	128,57
Réactions microchimique de révélation	(positif avec le réactif de Kedde)– présence de cycle lactone d'un noyau cardénolide (positif avec Liebermann) – noyau Stéroïde

(§) RRf : rapport relatif à la digitoxine, RRf = (Distance **w1**/Distance **digitoxine**) x100

3.1.2. Données structurales :

Le spectre UV du composé W₁ est illustré dans la figure 6.

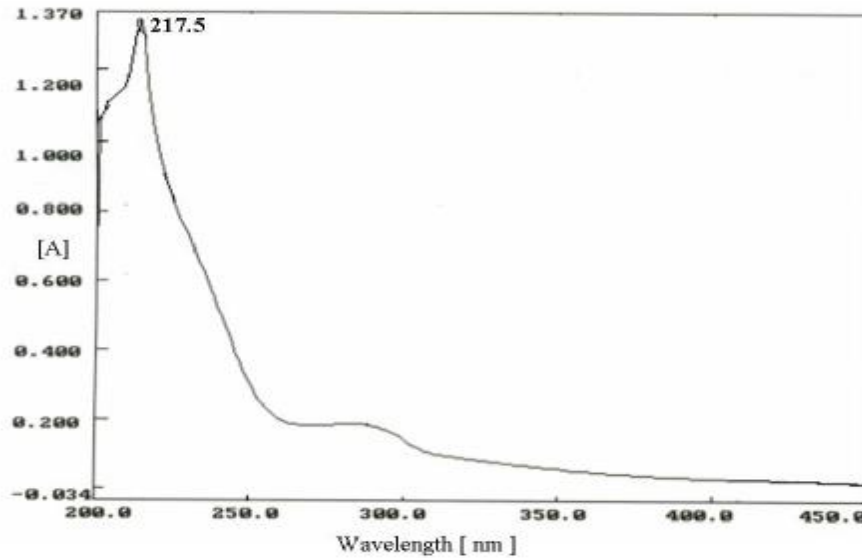


Figure 6: Spectre UV dans le méthanol du composé W_1

La lecture des bandes d'absorption dans la figure 6 permet de distinguer celle à 217 nm, caractéristique du cycle γ -lactonique α , β insaturé d'un cardénolide (**Begum. S. et col., 1999 ; Dinan. L. et col., 2001; Padua. R.M. et col., 2007**). Cette valeur appuie le résultat de l'analyse chromatographique, où le composé W_1 a réagit positivement avec le réactif de Kedde, spécifique au noyau lactone, et avec le réactif de Liebermann, indicateur de noyau stéroïdique (**Bruneton. J., 1999; Xing. G.T. et col., 2002**).

En l'absence d'autres analyses, l'identité du composé W_1 , de nature cardénolide, ne peut être établie. Cependant, la valeur du RRf obtenus pour le composé W_1 (Rf relatif à la digitoxine) est très proche de ceux de la littérature, publiés pour l'Adynerine et l'Odoroside A., déjà isolés de *N. oleander* (**Wagner. H. et col., 1984**).

La réaction obtenue avec l'acide sulfurique concentré pour le composé W_1 (coloration violette), selon Wagner, est favorable pour la structure d'Adynérin.

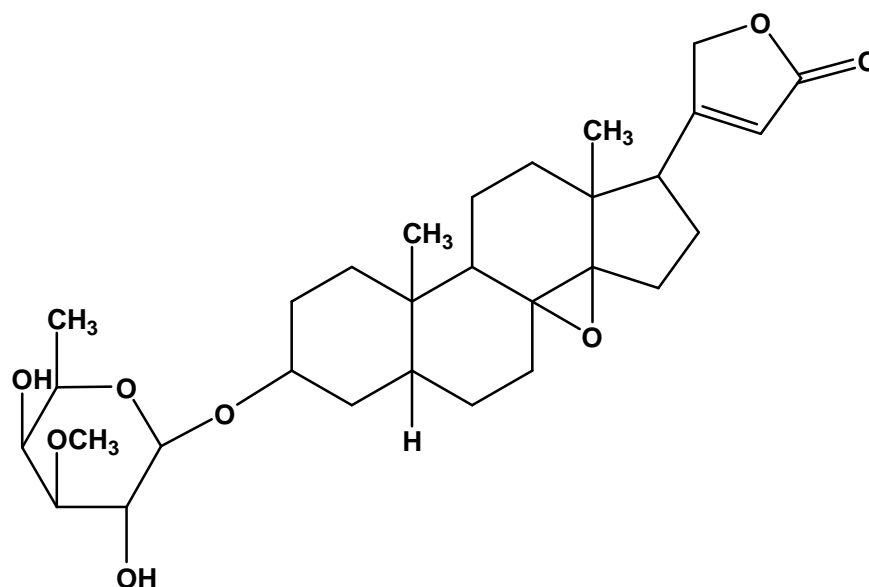


Schéma 2: structure proposé pour le composé W_1 (Adynérin)

3.2 Composé W_2 :

3.2.1. Caractéristiques physico-chimique et chromatographique :

Les caractéristiques de la substance W_2 sont exprimées dans le tableau 7 suivant :

Tableau 7 : caractérisation physico-chimique et chromatographique du composé W_2 .

Consistance :	Solide amorphe de couleur blanche,
Solubilité :	CHCl_3 , MeOH
Rf (système) :	0,76 S_1 (AE : MeOH : H ₂ O) (81 :11 :8)
RRf § (digitoxine) x 100 :	120,63
Réactions microchimique de révélation	(positif avec le réactif de Kedde)– présence de cycle lactone d'un noyau cardénolide (positif avec Liebermann) – noyau Stéroïde

(§) RRf : rapport relatif à la digitoxine, $\text{RRf} = (\text{Distance } w_2 / \text{Distance digitoxine}) \times 100$

3.2.2. Données structurales :

Le spectre UV du composé W_2 est illustré dans la figure 7 :

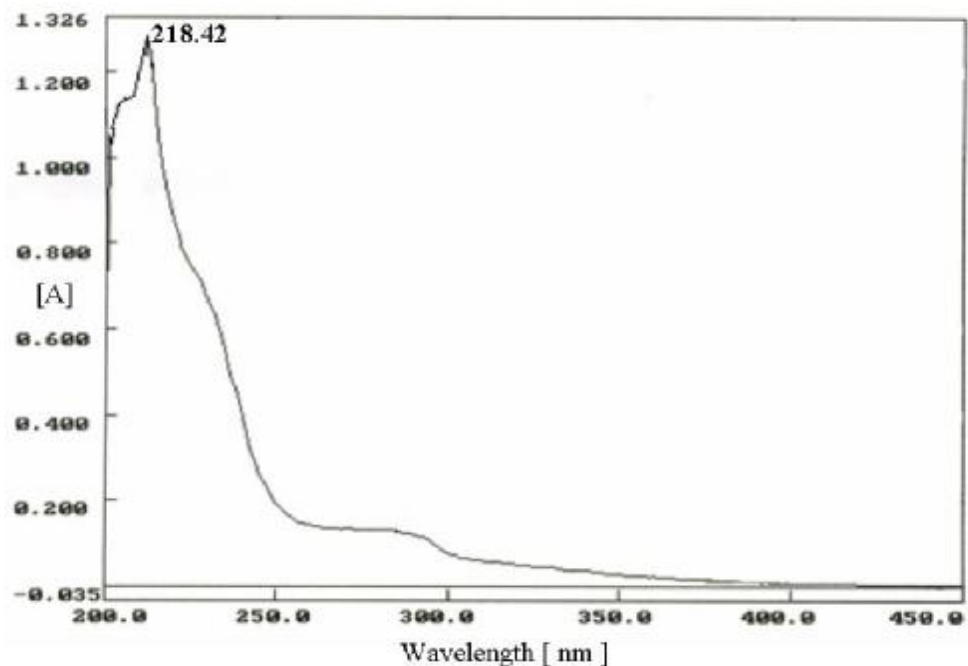


Figure 7: spectre UV dans le méthanol du composé W_2

La lecture des bandes d'absorption dans la figure 7 permet de distinguer celle à 218,2 nm, caractéristique du cycle γ -lactonique α , β insaturé d'un cardénolide (**Begum. S. et col., 1999 ; Dinan. L. et col., 2001; Padua. R.M. et col., 2007**). Cette valeur appuie le résultat de l'analyse chromatographique, où le composé W_2 a réagit positivement avec le réactif de Kedde, spécifique au noyau lactone, et avec le réactif de Liebermann, indicateur de noyau stéroïdique (**Bruneton. J., 1999; Xing. G.T. et col., 2002**).

En l'absence d'autres analyses, l'identité du composé W_2 , de nature cardénolide, ne peut être établie. Cependant, la valeur du RRf obtenus pour le composé W_2 (Rf relatif à la digitoxine) est très proche de celle de la littérature, publiée pour l'Oléaside A. (**Wagner. H. et col., 1984**).

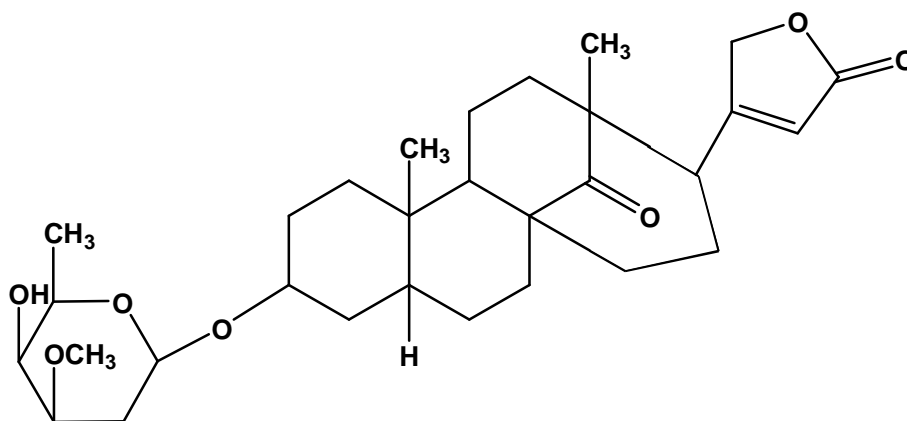


Schéma 3: structure proposé pour le composé W_2 (Oleaside-A)

3.3 Composé W_4 :

3.3.1. Caractéristiques physico-chimique et chromatographique :

Les caractéristiques de la substance W_4 sont exprimées dans le tableau 8 suivant :

Tableau 8 : caractérisation physico-chimique et chromatographique du composé W_4 .

Consistance	Solide amorphe de couleur blanche,
Solubilité	CHCl_3 , MeOH
Rf (système)	0,54 (AE : MeOH : H ₂ O) (81 :11 :8)
RRf § (digitoxine) x 100	85.71
Réactions microchimique de révélation	(positif avec le réactif de Kedde)– présence de cycle lactone d'un noyau cardénolide (positif avec Liebermann) – noyau Stéroïde

(§) RRf : rapport relatif à la digitoxine, $\text{RRf} = (\text{Distance } w_4 / \text{Distance digitoxine}) \times 100$

3.3.2. Données structurales :

a) Analyse par spectroscopie Ultra-Violet (UV) :

Le spectre UV du composé W_4 est illustré dans la figure 8.

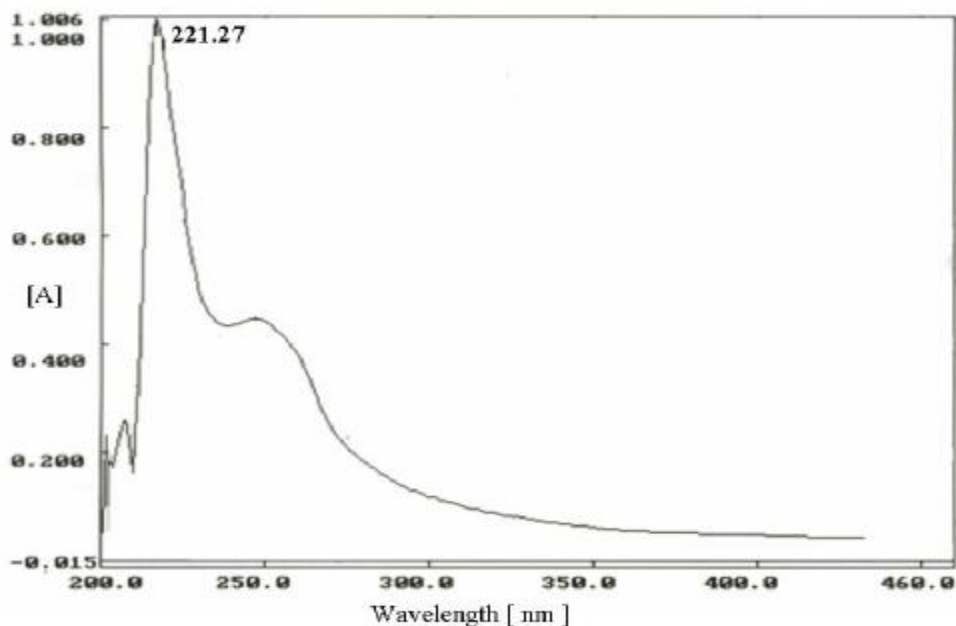


Figure 8: spectre UV dans le méthanol de composé W_4

La lecture des bandes d'absorption dans la figure 8 permet de distinguer celle à 221,27 nm, caractéristique du cycle γ -lactonique α , β insaturé d'un cardénolide (**Begum. S. et col., 1999; Dinan. L. et col., 2001; Padua. R.M. et col., 2007**). Cette valeur appuie le résultat de l'analyse chromatographique, où le composé W_4 a réagit positivement avec le réactif de Kedde, spécifique au noyau lactone, et avec le réactif de Liebermann, indicateur de noyau stéroïdique (**Bruneton. J., 1999; Xing. G.T. et col., 2002**).

b) Analyse par résonance magnétique nucléaire en mode proton (RMN ^1H) :

Le spectre RMN proton du composé W_4 est illustré dans la figure 9.

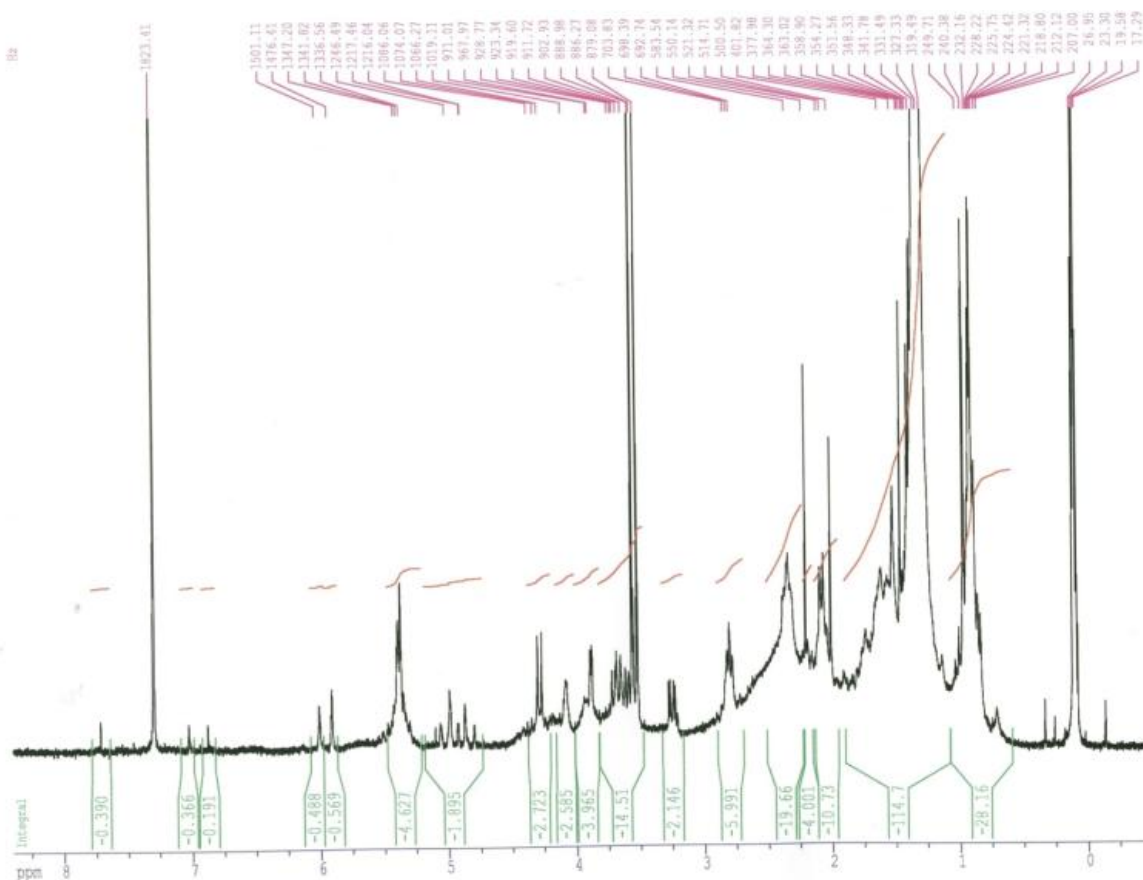


Figure 9: Spectre ^1H RMN dans le CDCl_3 du composé W_4

La lecture préliminaire des données spectrales obtenues à partir de la figure 9 permet de conforter les résultats UV et chromatographiques quant à la nature du composé W_4 . Il s'agit d'un hétéroside cardénolide.

- Identification de la partie aglycone :

Le spectre RMN du proton présente une série dense de pics dans l'intervalle δ 0.80 ppm à 2.50 ppm (figure 10), relative aux protons des carbones primaires, secondaires et tertiaires (CH_3 , CH_2 et CH) du noyau stéroïdique (**Drakenberg. T. et col., 1990**).

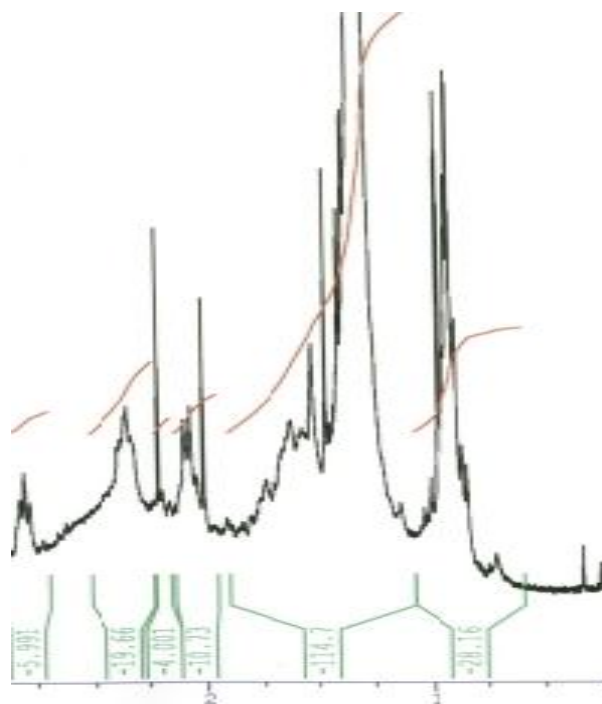


Figure 10: Spectre ^1H RMN étalé du composé W_4 (région δ 0,75 -2,75 ppm)

Parmi ces signaux, on peut reconnaître ceux des groupements méthyles angulaires, attachés aux carbones C-10 et C-13, se trouvant dans la région des basses ppm entre δ 0, 85-1,0 ppm (figure 11).

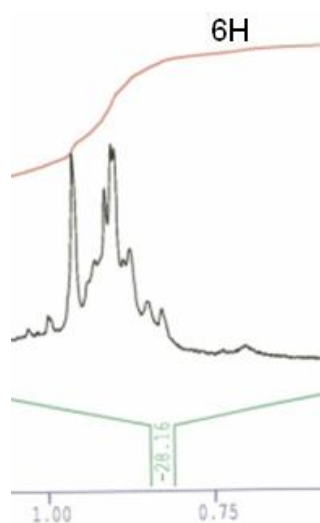


Figure 11: Spectre ^1H RMN étalé du composé W_4 (région δ 0,75 -1,00 ppm)

Le signal du proton attaché au carbone 3 du noyau stéroïdique, se retrouve à δ 4,08 ppm sous forme d'un large singulet (figure12). Ces valeurs correspondent à celles publiées dans la littérature pour le noyau cardénolide; (**Abe. F. et col., 1996; Kawamura. A. et col., 1999; Abe. F. et Yamauchi. T. 2000; Lei. Z. H. et col., 2000; Kamel. M.S. et col., 2001; Padua. R.M. et col., 2007**).

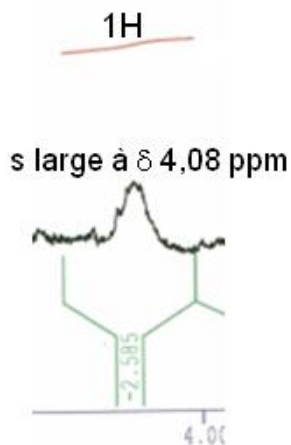


Figure 12: Spectre ^1H RMN étalé du composé W_4 (région δ 4,00 -4,10 ppm)

Le spectre RMN ^1H exhibe, dans la région δ 3,2 à 6,0 ppm, un certain nombre de pics, dont ceux caractéristiques du noyau lactone, attaché en C-17 (figure 13) :

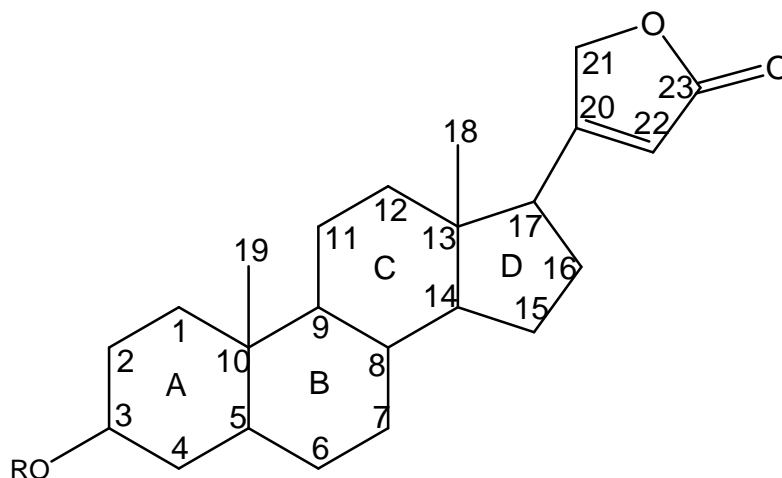


Schéma 4: Noyau cardénolide, avec la numérotation du squelette stéroïdique.

- un signal à δ 3,25 ppm s'intégrant pour un proton, sous forme de doublet dédoublé, correspondant au proton H-17 dont les constantes de couplage $J=9,21$ et $J= 3,48\text{Hz}$.

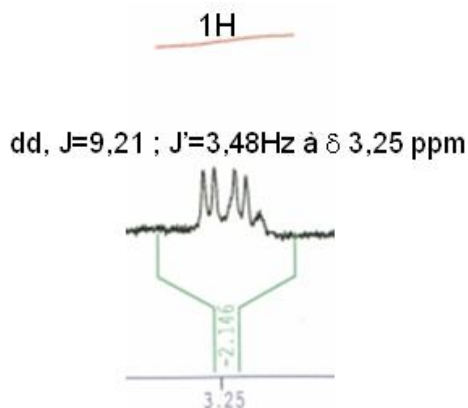


Figure 13: Spectre ^1H RMN étalé du composé W_4 (région δ 3,20 – 3,30 ppm)

- deux signaux à δ 4,82 et δ 5,01 relatifs aux deux protons en C-21, respectivement $\text{H}\beta$ et $\text{H}\alpha$ (figure 14). Ces signaux apparaissent sous forme de doublet de double, avec pour $\text{H}\beta$ -21 (1H ; dd ; $J=1,5$; $J'= 17,7$) et $\text{H}\alpha$ -21 (1H ; dd ; $J=1,5$; $J'= 17,9$). La multiplicité des pics observée est le résultat des couplages des deux protons, $\text{H}\alpha$ et $\text{H}\beta$ entre eux, et avec le proton oléfinique H-22.

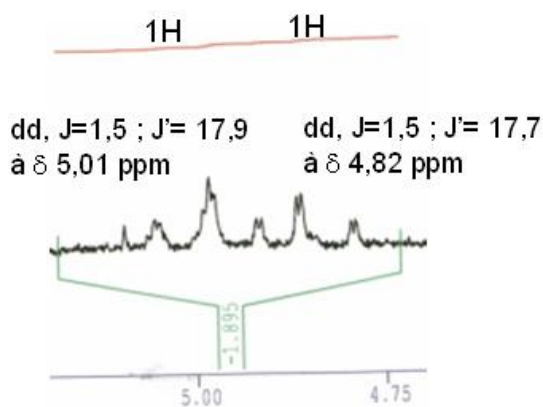


Figure 14: Spectre ^1H RMN étalé du composé W_4 (région δ 4,75 -5,10 ppm)

On observe deux signaux, sous forme de singulet large, intégrés chacun en 1H (figure 15), l'un à δ 5,90 ppm et δ 6,0 ppm, correspondant respectivement à un hydroxyle en C-14 et l'autre à un H attaché au carbone 22 du noyau lactone (le déplacement chimique de H-22 confirme la localisation du groupe carbonyle) (**Abe. F et col., 1992-A; Abe. F. et col., 1996**).

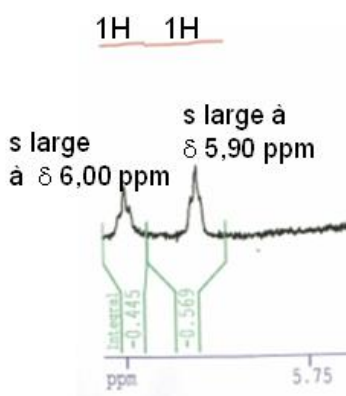


Figure 15: Spectre ^1H RMN étalé du composé W_4 (région δ 5,75-6,00 ppm)

- Identification de la partie osidique :

La nature osidique du composé W_4 est d'abord révélée par la valeur de R_f comparable à celles publiées dans la littérature pour les hétérosides à noyau cardénolide (**Wagner. H. et col., 1984**).

Les données RMN ^1H relèvent des signaux relatifs à la partie sucre, des pics complexes intégrables en 6 protons d'une part entre δ 3,57 et 3,75 ppm (figure16), et d'autres part de deux doublets relatifs aux deux protons anomériques, l'un à δ 4,28 ppm ($J = 7,8$ Hz) et l'autre à δ 4,37 ($J = 7,85$ Hz) (figure17). Ceci suggère au moins la présence de deux sucres, liés l'un à l'autre en configuration β (**Kamel. M.S. et col., 2001**).

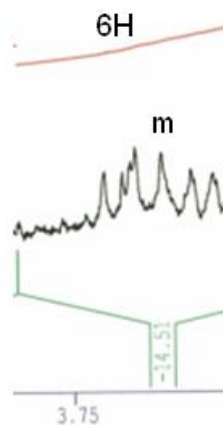


Figure 16: Spectre ^1H RMN étalé du composé W_4 (région δ 3,57 - 3,75 ppm)

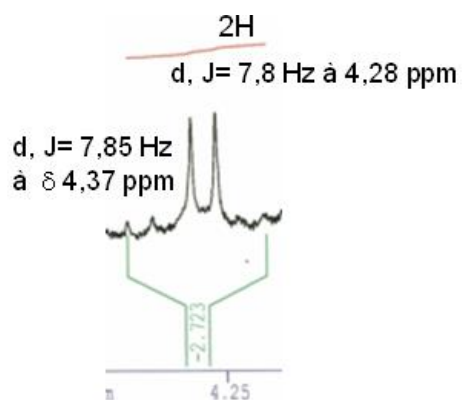


Figure 17: Spectre ^1H RMN étalé du composé W_4 (région δ 4,25-4.40 ppm)

On observe en outre, la présence dans le spectre RMN ^1H de 3 singulets intégrables en 3 protons, deux situés à (δ 3,52 ppm et δ 3,55 ppm) (figure 18) et l'autre à (δ 2,00 ppm) (figure19), respectivement correspondant à deux groupements O-CH_3 et un groupement $-\text{OCOCH}_3$. Leur affectation ne peut être faite à ce niveau de données.

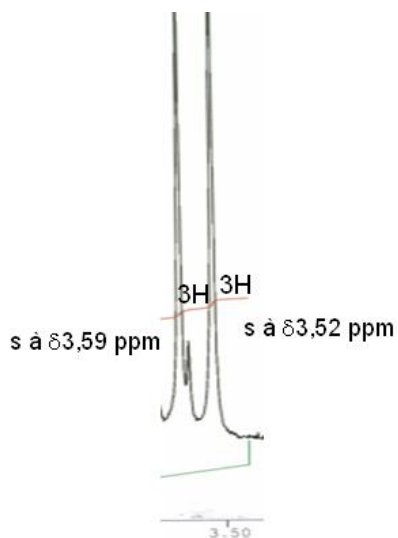


Figure 18: Spectre ^1H RMN étalé du composé W_4 (région δ 3,50-3,58 ppm).

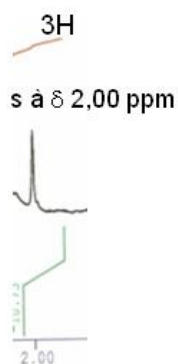


Figure 19: Spectre ^1H RMN étalé du composé W_4 (région δ 1,89-2,00 ppm)

- Hydrolyse du cardénolide W_4 :

L'hydrolyse acide du cardénolide W_4 et l'analyse chromatographique par CCM de son hydrolysats, en présence de la digitoxine et son hydrolysats, a révélé une seule tache correspondante quant à sa position et sa couleur (réactif de Kedde) à la digitoxigénine (tableau 9) :

Tableau 9 : Comparaison de Rf de cardénolide W₄ et de digitoxine avant et après l'hydrolyse acide

	Rf §	
	avant l'hydrolyse acide	après l'hydrolyse acide
Cardénolide W ₄	0,48	0,74
Digitoxine	0,57	0.75

§ système de solvants : AE/MeOH/H₂O (81/11/8) ; révélation réactif de Kedde

En conclusion les données du spectre UV indiquent la présence d'une lactone d'un noyau stéroïdique sur le cardénolide W₄. Le spectre RMN ¹H conforte ce mémoire en indiquant la présence d'un stéroïde du type cardénolide, avec la présence d'un dissaccharide, probablement liée en position C-3, la plus communément substituée par des oses dans le cas des cardénolides (**Drakenberg. T. et col., 1990; Abe. F. et col., 1996; Begum. S. et col., 1999 ; Padua. R.M. et col., 2007**). L'hydrolyse du cardénolide W₄, en présence de la digitoxine, suggère que la partie génine est proche de celle de la digitoxigénine. La position et la nature de ce disaccharide ne peuvent toutefois pas être établies en l'absence d'autres données spectrales.

Sur la base des données recueillies nous proposons la structure partielle de la partie génine du cardénolide W₄ isolée.

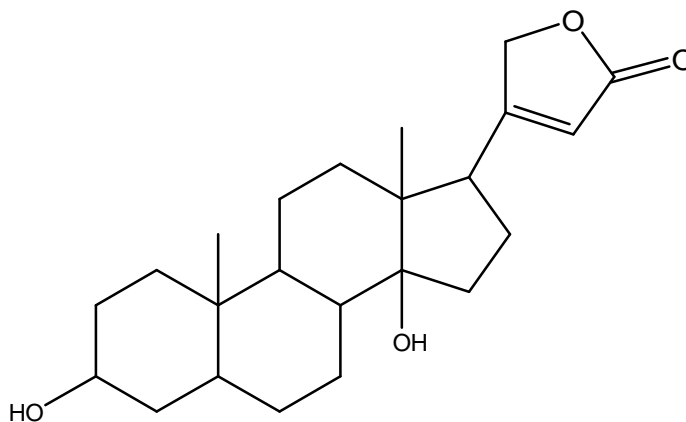


Schéma 5: partie génine proposé pour le cardénolide W₄

4. Évaluation de l'activité molluscicide du cardénolide W₄

Le tableau 10 et figure 20 représentent les variations de la mortalité des populations de mollusque (valeur moyenne, n = 3, exprimée en pourcentage), exposées à des concentrations variables (1, 10 et 50 µg/ml) du stéroïde cardénolide W₄ isolée de l'extrait (AE) actif, durant des temps d'exposition variable (8h, 16h et 24h).

Tableau 10 : Variation de l'activité molluscicide du stéroïde cardénolide W₄, exprimée en pourcentage de mortalité (valeur moyenne ± ET, n=3), en fonction de la concentration et du temps d'exposition.

Concentration (µg/ml)	Temps d'exposition en heure (h)		
	8h	16h	24h
1	0,00 ± 0,00 ^{Δ Ψ Ω}	16,67 ± 5,77 ^{Δ* ⊗ ¥}	36,67 ± 5,70 ^{Δ \$}
10	0,00 ± 0,00 ^{Δ Ψ #}	30,00 ± 10,00 ^{Δ o \$}	90,00 ± 10,00 ^{Δ \$}
50	90,00 ± 10,00 ^{\$}	100,00 ± 0,00 ^{\$}	100,00 ± 0,00 ^{\$}
Contrôle	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

effet concentration : ^Δ p < 0,001 : vs 50µg ; ^{*} p < 0,01 : vs 10 µg/ml ;
 effet temps : ^Ψ p < 0,001 : vs 24h ; ^Ω p < 0,01 : vs 16h ; ^o p < 0,01 : vs 24 h ; [#] p < 0,05 : vs 16 h ; [⊗] p < 0,05 : vs 24 h.
 mortalité : ^{\$} p<0,001 : vs contrôle ; [¥] p<0,01 : vs contrôle ; [§] p<0,05 : vs contrôle.

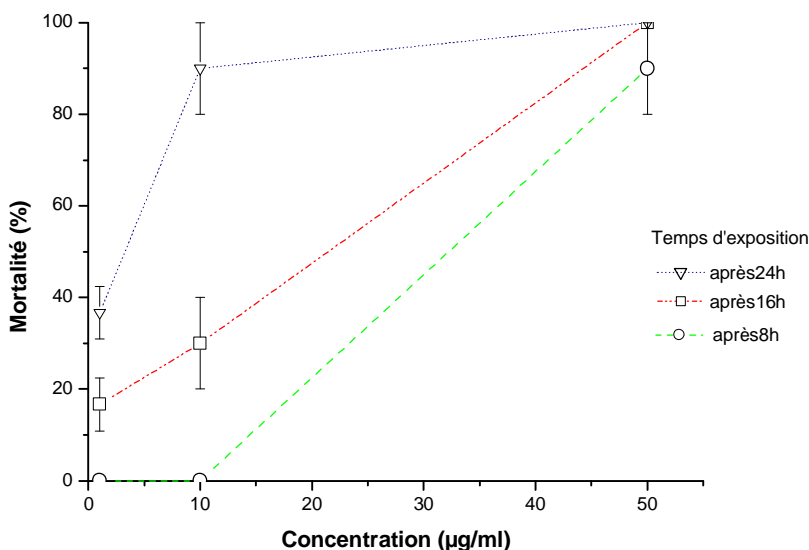


Figure 20 : Variation de l'activité molluscicide du stéroïde cardénolide W₄, exprimée en pourcentage de mortalité, en fonction de la concentration et du temps d'exposition

Le tableau 10 montre que durant toute la période d'essai (24h), aucun cas de mortalité n'a été signalé parmi les mollusques évoluant dans le milieu dépourvu d'extrait (contrôle). Contrairement, les populations de mollusques exposées aux concentrations 1, 10 et 50 µg/ml pour la même période au cardénolide W₄ ont montré une mortalité significative par rapport au contrôle (p<0,001).

Durant la période 0 à 24 h, un faible effet toxique est observé chez les populations de mollusques exposés à une concentration de 1 µg/ml du stéroïde cardénolide W₄ (mortalités moyennes de 0% à 8h, 16,67% à 16h et 36,67 % à 24h). L'effet toxique du stéroïde cardénolide W₄ devient plus apparent vis-à-vis des mollusques à des concentrations au dessus de 10 µg/ml (mortalités moyennes de 0% à 8h, 30,00% à 16h et 90,00 % à 24h). Les populations de mollusques exposés à une concentration de 50 µg/ml du stéroïde cardénolide W₄ enregistrent des mortalités moyennes ≤ 90% significatives par rapport au contrôle (p<0,001) pour les périodes de 8h, 16h et 24h.

A ce niveau, trois constatations peuvent être faites :

- Le cardénolide W₄ exhibe une activité molluscicide significative par rapport au contrôle à des concentrations de 1 µg/ml (p<0,01) et 10 µg/ml (p<0,05) à partir de 16h, et à une concentration de 50µg/ml (p<0,001) à partir de 8h ;
- A l'exception des mortalités observées à 8h pour les doses 1 et 10µg/ml, l'effet de mortalité des populations des mollusques est positivement corrélé à l'augmentation des concentrations du cardénolide W₄ à la limite des doses utilisées ;
- Les résultats indiquent aussi qu'indépendamment des concentrations testées du cardénolide W₄, la mortalité des mollusques augmente d'une façon significative en fonction de la période d'exposition. Cette observation est même valable à des faibles concentrations, puisque l'effet toxique de la substance testée à 1 µg/ml, produit des mortalités en progression 16,67 ± 5,77 à 16h (p<0,01) et 36,67± 5,70 à 24h (p<0,001).

Le tableau 11 suivant représente les variations des doses létales DL₅₀ et DL₉₀ du stéroïde cardénolide W₄ (exprimée en valeur moyenne ± ET, n = 3), durant des temps d'exposition de 8h, 16h et 24h.

Tableau 11: Variation en fonction du temps des doses létales 50 et 90 (DL₅₀ et DL₉₀) du stéroïde cardénolide W₄

Dose létale (µg/ml)	Temps d'exposition en heure (h)		
	8h	16h	24h
DL ₅₀	32,53 ± 2,55 ^{♦♦}	20,74 ± 4,16 [*]	3,35 ± 1,19
DL ₉₀	50,60 ± 4,67 [◇]	44,15 ± 0,76 [#]	19,13 ± 10,67 [#]

effet temps d'exposition : • p<0,001 : vs 24h ; * p<0,01 : vs 24h ; ♦ p<0,05 : vs 16h ; ◇ p<0,01 : vs 24h ; # p<0,05 : vs 24h

Les résultats représentés dans le tableau 11 tendent à montrer une augmentation significative de l'effet toxique du stéroïde cardénolide W₄, selon les périodes d'exposition de 8h, 16h et 24h. Ceci est expliqué par une diminution sensible des DL₅₀ (32,53 µg/ml à 8h ; 20,74 µg/ml à 16h ; 3,35 µg/ml à 24h d'exposition) et des DL₉₀ (50,60 µg/ml à 8h ; 44,15 µg/ml à 16h; 19,13 µg/ml à 24h d'exposition).

A ce niveau, une autre constatation peut être faite :

- A la limite de la période testée de 24h, il apparait une corrélation temps vs dose létale, qui indique que plus le temps d'exposition est important plus la dose létale diminue. Ce qui permet d'envisager d'utiliser le cardénolide W₄ à des concentrations toxiques plus faible, en allongeant le temps d'exposition.

CONCLUSION

La valorisation des ressources naturelles, notamment végétale, dans le système de soins de notre pays, est une priorité stratégique pour minimiser notre dépendance vis-à-vis des médicaments importés.

Le présent travail s'insère dans un projet national de recherche visant à la découverte de nouveaux produits naturels à activité molluscicide, comme moyen de lutte contre la bilharziose.

Cette maladie parasitaire, qui reste marginale dans notre pays, risque de se développer à l'image de ce qui s'est produit en Égypte. Depuis une décennie, l'Algérie poursuit une politique soutenue de développement des barrages. Les foyers de bilharziose, localisés au niveau de certaines régions, notamment du nord pays, risquent de s'étendre à d'autres sites. Ceci aura une conséquence dramatique sur les riverains des sites infectés, en matière de contamination et par conséquent de prise en charge des malades par les pouvoirs publics.

Notre travail a permis de confirmer les résultats obtenus précédemment sur l'activité molluscicide importante des feuilles de *Nerium oleander*.

Sur le volet chimique, des fractions actives issus de l'extrait brut AE, une série d'hétérosides cardénolides ont pu être isolés et caractérisés.

Sur le volet activité, les résultats obtenus par le fractionnement bioguidé a permis de situer une activité molluscicide notable au niveau des extraits (EE) et (AE) comparés aux autres extraits. Ces deux extraits actifs sont riches particulièrement en hétérosides cardénolides. Ces substances sont notamment connues pour leur haute toxicité. Un des 3 hétérosides cardénolides isolés, le cardénolide W4, a subi une évaluation de l'activité molluscicide, exprimée par les doses létales DL₅₀ et DL₉₀.

Il ressort de cette évaluation d'activité molluscicide que le cardénolide W4, isolé de l'extrait actif (AE) des feuilles de *N. oleander*, possède une activité molluscicide, comme exprimée par la valeur de DL₉₀ de 19,13 µg/ml, en accord avec les critères d'activités fixés par l'OMS (**OMS., 1965**) et modifiés par Marston (**Marston. A. et col., 1985**).

A l'issue de cette évaluation de la substance isolée (W4), plusieurs constatations peuvent être faites :

- Le cardénolide W4 exhibe une activité molluscicide significative par rapport au contrôle à des concentrations de 1 µg/ml ($p < 0,01$) et 10 µg/ml ($p < 0,05$) à partir de 16h, et à une concentration de 50µg/ml ($p < 0,001$) à partir de 8h ;
- A l'exception des mortalités observées à 8h pour les doses 1 et 10µg/ml, l'effet de mortalité des populations des mollusques est positivement corrélé à l'augmentation des concentrations du cardénolide W4 à la limite des doses utilisées ;
- Les résultats indiquent aussi qu'indépendamment des concentrations testées du cardénolide W4, la mortalité des mollusques augmente d'une façon significative en fonction de la période d'exposition. Cette observation est même valable à des faibles concentrations, puisque l'effet toxique de la substance testée à 1 µg/ml, produit des mortalités en progression $16,67 \pm 5,77$ à 16h ($p < 0,01$) et $36,67 \pm 5,70$ à 24h ($p < 0,001$).
- A la limite de la période testée de 24h, il apparait une corrélation temps vs dose létale, qui indique que plus le temps d'exposition est important plus la dose létale diminue. Ce qui permet d'envisager d'utiliser le cardénolide W4 à des concentrations toxiques plus faible, en allongeant le temps d'exposition.

Nos résultats corroborent des observations précédentes pratiquées sur une espèce le *Nerium indicum* appartenant au même genre que la plante étudiée. Selon cette étude les écorces de *N. indicum* ont été signalées comme douées d'une activité molluscicide contre *Lymnaea acuminata* (Singh. S. et col., 1998). Selon les auteurs de ces travaux, les cardénolides pourraient être associés à l'effet toxique sur l'espèce de mollusque testée. Dans le même ordre, des travaux ont reporté une activité molluscicide d'un cardénolide, isolés de *Calotropis procera*, sur *Monacha obstructa*, escargot terrestre (Hamdy. I. et col. 1999).

De cette étude, il ressort que :

- L'activité molluscicide du *N. oleander* est concentrée dans les extraits peu ou moyennement polaires, en l'occurrence les extraits de l'éther éthylique (EE) et de l'acétate d'éthyle (AE) ;
- Au moins l'un des cardénolides (W4) est associé à cette activité.

Finalement, les résultats obtenus appuient dans une certaine mesure l'usage de certaines plantes en médecine traditionnelle dans le traitement de diverses maladies parasitaires (ex. la bilharziose), et souligne l'importance de l'approche ethnopharmacologique, associée à des considérations chimiotaxonomique et toxique dans la sélection des plantes lors du criblage à la recherche de nouvelles sources de molécules parasitaires.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abe. F et Yamauchi. T. (1992-A)

Two pregnanes from Oleander leaves.
Phytochemistry., vol. **31**, pp. 2819-2820.

Abe. F et Yamauchi. T. (1992-B)

Cardenolide triosides of Oleander leaves.
Phytochemistry., vol. **31**, pp. 2459-2463.

Abe. F., Yamauchi. T., Minato. K. (1996)

Presence of cardenolides and ursolic acid from Oleander leaves in larvae and frass of *Daphinis nerii*.
Phytochemistry., vol. **42**, n°. 1, pp. 45-49.

Abe. F et Yamauchi. T. (2000)

An andeostane bioside and 3'-thiazolidinone derivatives of doubly-linked cardenolide glycosides from the roots of *Asclepias tuberosa*.
Chem. Pharm. Bull., vol. **48**, no. 7, pp. 991-993.

Abe. I., Rohmer. M., Prestwich. G. D. (1993)

Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes.
Chemical. Reviews., vol. **93**, pp. 2189-2206.

Adewunmi. C. O. (1991)

Plant molluscicides: potential Aridon, tetrapleura, for Schistosomiasis control in Nigeria.
The science of the total Environment., vol.**102**, pp. 21-33.

Adom. R. O., Gachichi. J. W., Onegi. B., Tamale. J., Apio. S. O. (2003)

The cardiotoxic effect of the crude ethanolic extract of *Nerium oleander* in the isolated guinea pig hearts.
African health sciences., vol. **3**, pp. 77-82.

Almahy. H. A et Khalid. H. E. (2006)

Chemical examination of the leaves of *Nerium oleander*
International journal of tropical medicine., vol. **1**, n°. 2, pp. 58-61.

Al-yahya. M. A., Al-farhan. A. H., Aadam. S. E. I. (2000)

Preliminary toxicity study on the individual and combined effects of *Citrullus colocynthis* and *Nerium oleander* in rats.
Fitoterapia., vol. **71**, 385-391.

Ansart. S et Caumes. E. (2002)

Pneumopathies au retour de voyage.
Rev Mal Respir., vol. **19**, pp. 693-697. SPLF, Paris, 2002.

Aouinty. B., Oufara. S., Mellouki. F., Mahari. S. (2006)

Evaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles de ricin.
Biotechnol. Agron. Soc. Environ., vol. **10**, n°. 2, pp. 67-71.

- Arfaa. F., Mahboubi. E., Al jeffri. M., Selim. A, Russell. G. (1989)**
 The potential role of various species of intermediate hosts of *Schistosoma haematobium* in Saudi Arabia.
Trasactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene., vol. **83**, pp. 216-218.
- Baggarwal. B., Jchikawa. H., Garodia. P., Weerasinghe. P., Sechi. G., Dharr. I., Pandey. M., Shishdia. S., Nair. M. (2006)**
 From traditional ayurvedic medicine to modern medicine: identification of therapeutic targets for susppression of inflammation and cancer.
Expert opin. ther : targets., vol. **10**, n°. 1, pp. 87-118.
- Baluku. B., Josens. G., Loreau. M. (1989)**
 Etude préliminaire de la densité et de la répartition des mollusques dans deux cours d'eau du Zaïre oriental.
Revue zool. Afr. -J. Afr. Zool., vol.**103**, pp. 291-302.
- Banon. S., Ochoa. J., Alarcon. J. A., Sanchez-blanco. M. J. (2006)**
 Hardening of oleander seedlings by deficit irrigation and low air humidity.
Environmental and Experimental Botany., vol. **56**, pp. 36-43.
- Barbosa. R. R., Fontenele-neto. J. D., Soto-blanco. B. (2008)**
 Toxicity in goats caused by oleander (*Nerium oleander*).
Research in Veterinary Science., vol. 85, issue 2, pp. 279-281.
- Begum. S., Sultana. R., Siddiqui. B. S. (1997)**
 Triterpenoids from the leaves of *Nerium oleander*.
Phytochemistry., vol. **44**, pp. 329-332.
- Begum. S., Siddiqui. B. S., Sultana. R., Zia A., Suria. A. (1999)**
 Bio-active cardenolides from the leaves of *Nerium Oleander*
Phytochemistry., vol. **50**, pp. 435-438.
- Belkacem. M et Jana. M. (2006)**
 Curage et traitement molluscicide pour la lutte contre la Schistosomiase.
Easten Mediterranean Health Journal., vol. **12**, n°. ½, pp. 129-136.
- Bnouham. M., Mekhfi. H., Legssyer. A., Ziyyat. A. (2002)**
 Ethno pharmacology forum.
 Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco.
Int. J. diabetes et Metabolism., vol.**10**, pp. 33-50.
- Bor. N. M., Dereagzi. H., Ibrahimoglu. Z., Karabiyikoglu. A., Ugurbas. S. H. (1988)**
 Promotion of phagocytosis by *Nerium oleander* extract
Journal of Islamic academy of science., vol. **1**, pp. 141-142.
- Bourgeois. B., Incagnoli. P., Hanna. J., Tirard. V. (2005)**
 Traitement par anticorps antidigitalique d'une Intoxication volontaire par laurier rose.
Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation., vol. **24**, pp. 640-642.

Bruneton. J. (1999)

Pharmacognosie, Phytochimie- Plantes médicinales-Techniques et documentations, 3^{ème} édition, Lavoisier, pp. 463, 661-670,721-730.

Bruneton. J. (2001)

Plantes toxiques :-végétaux dangereux pour l'homme et les animaux, 2^{ème} édition, pp.129-136.

Chopra. L.C., Abrol. B. K., Handa. K. L. (1971)

Les plantes médicinales des régions arides considérées surtout du point de vue botanique. Première partie, pp. 45-50.

Croteau. R., Kutchan. T. M., Lewis. N. G. (2000)

Natural products (secondary metabolites)-chapter 24
Biochemistry and molecular biology of plants., B.2000, pp.1250-1318.

De Carvalho. J.E., Torres. L.M.B., Lapa. A.J. (1991)

Cardiac glycosides isolated from the indian-snuff, *Maquira Sclerophylla* Ducke.
Men. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro., vol. **86**, Suppl. II, pp. 235-236.

Delille. L. (2007)

Les plantes médicinales d'Algérie, Berti éditions, pp. 141-142. Alger.

Dinan. L., Harmatha. J., Lafont. R. (2001)

Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids.
Journal of Chromatography A., vol. **935**, 105-123.

Dobo. A., Durand. P., Morand. S., Diakite. M., Langand. J., Establet. D. I.,

Doumbo. O., Jourdane. J. (1997)

Distribution and genetic diversity of *Schistosoma haematobium* within its bulinid intermediate hosts in Mali.
Acta Tropica., vol. **66**, pp.15-26.

Drakenberg. T., Brodelius. P., Mcinture. D.D., Vogel. H.J. (1990)

Structural studies of digitoxin and related cardenolides by two-dimensional NMR
Can. J. Chem., vol. **68**, pp. 272.

Ebizuka. Y., Katsube. Y., Tsutsumi. T., Kushiro. T., Shibuya. M. (2003)

Functional genomics approach to the study of triterpene biosynthesis.
Pure Appl. Chem., vol. **75**, n°. 2-3, pp. 369-374.

Erdemoglu. N., Kûpeli. E., Yesilada. E. (2003)

Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine.
Journal of Ethnopharmacology., vol. **89**, pp. 123-129.

Eun Jeong. S. (2001)

Effects of the sap of the common oleander *Nerium indicum* (Apocyanaceae) on male fertility and spermatogenesis in the oriental tobacco budworm *Helicoverpa assulta* .
The Journal of Experimental Biology., vol. **204**, pp. 3935-3942.

- Eyog. O. M., Adjanohoum. E., De Souza. S., Sinsin. B. (1999)**
Espèces ligneuses médicinales. (Compte rendu la première réunion du réseau).
Programme de ressources génétiques forestières en Afrique au sud du Sahara
(programme SAFORGEN) Bénin, pp. 35-90.
- Gausсен. H., Leroy. J.-F., Ozenda. P. (1982)**
Précis de botanique : 2. Végétaux supérieures, 2^{ème} édition, pp.393-395
- Gebremedhim. G., Adewunmi. C. O., Becker. W., Agbedahunsi. J. M., Dôrfler. G. (1994)**
Hirudinicidal activities of some natural molluscicid used in schistosomiasis control.
Journal of Ethnopharmacology, vol. **41**, pp. 127-132.
- Geoffrey. D. B. (1998)**
The biosynthesis of steroids and triterpenoids.
Natural Product Reports., vol. **7**, pp. 653-678.
- Goodwin. T. W. (1971)**
Biosynthesis of carotenoids and plants triterpenes.
Biochem. J., vol. **123**, pp. 293-329.
- Grosa. G., Allegrone. G., Grosso. E. D. (2005)**
LC-ESI-MS/MS characterization of strophnthin-K.
Journal of pharmaceutical and biomedical analysis., vol. **38**, pp. 79-86.
- Guisson. J. P., Millogo-kone. H., Kabore. I. Z. (1992)**
Etude comparative de l'activité pharmacologique de *Euphorbia hirta* L.
(Euphorbiaceae) et *Holarrhena floribunda* G.don (Apocynaceae) vis-à-vis d'amibes non
pathogènes du genre *Amoeba proteus*.
Médecine d'Afrique noire., vol. **39** , pp. 358-363.
- Hamdy. I., Hussein. D. Al-rajhy., Fikry. I. El-shahawi., Hashem. S. M. (1999)**
Molluscicidal activity of *Pergularia tomentosa* (L.), methomyl and methomyl and methomyl
and methiocarb, against land snails.
International journal of management., vol. 45, n°. 3, pp. 211-213.
- Hanson. J. R. (1985)**
The chemistry of natural products, (R. H. Thomson ed.), chapter 4. Blackie USA:
Chapman et Hall, New York, pp. 42-92.
- Hmamouchi. M., Lahlou. M., Agoumi. A. (2000)**
Molluscicidal activity of some Moroccan medicinal plants.
Fitoterapia., vol. **71**, pp. 308-314.
- Hostettman. K., Marston. A., Ndjoko. K., Wolfender. J. L. (2000)**
The potential of Africa plants as a source of drugs.
Current Organic Chemistry., vol. **4**, pp. 973-1010.

Huang. Z., Jiang. K., Pi. Y., Hou. R., Liao. Z., Cao. Y., Han . X., Wang. Q., Sun. X., Tang. K. (2007)

Molecular cloning and characterization of the new gene encoding squalene synthase from *Taxus cuspidata*.

Journal of Biochemistry and Molecular Biology., vol. **40**, n°. 5, pp. 625-635.

Huq. M. M., Jabbar. A., Rashid. M. A., Hasan. C. M. (1999)

A novel antibacterial and cardiac steroid from the roots of *Nerium oleander*.

Fitoterapia., vol. **70**, pp. 5-9.

Hussain. M. A et Gorski. M.S. (2004)

Antimicrobial activity of *Nerium oleander* Linn.

*Asian Journal of Plant Sciences*3., vol. **2**, pp. 177-180.

Ibrahim. K. A., Khalagi. S., Youssef. D., Khan. I., Mesbah. M. (2007)

Stimulation of oleander in production by combined *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and fungal elicitation in *Nerium oleander* cell cultures.

Enzyme and Microbial Technology., vol. **41**, pp. 331-336.

Janeczke. A et Skoczowski. A. (2005)

Mammalian sex hormones in plants

Folia Histochemica et cytobiologica., vol. **43**, n°. 2, pp. 71-79.

Kamel. M.S., Aassaf. M.H., Abe. Y., Ohtani. K., Kassai. R., Yamasaki. K. (2001)

Cardiac glycosides from *Cryptostegia grandiflora*

Phytochemistry., vol. **58**, pp. 537-542.

Kawamura. A., Guo. J., Maggiali. F., Berova. N., Nakanishi. K. (1999)

Structure of endogenous ouabain

Pure Appl. Chem., vol. **71**, n°. 9, pp. 1643-1648.

Khallaayoune. K., Madsen. H., Laamrani. H. (1998)

Evaluation of three methods to control *Bulinus truncatus* the intermediate host of *Schistosoma haematobium* in an irrigation scheme, Tessaout-Amont, morocco.

Acta Tropica., vol. **69**, pp. 51-63.

Khallouki. F., Hmamouchi. M., Younos. C., Soulimani. R., Bessiere. J. M., Essassi. E. M. (2000)

Antibacterial and molluscicidal activities of the essential oil of *Chrysanthemum viscidifolium*.

Fitoterapia., vol. **71**, pp. 544-546.

Klotz. F et Debonne. J. M. (1998)

La bilharziose hépatique.

Acta Endoscopica., vol. **28**, n°. 3, pp. 271-274.

Klyne. K. (1966)

La chimie des stéroïdes., pp. 13, 177-188.

Konde. H. (2005)

Prise en charge des séquelles de la bilharziose urogénitale dans le service d'urologie de l'hôpital du point-G.

Université de Bamako, pp. 26-27. (Thèse de Doctorat en Médecine), Bamako.

Lamarti. A., Badoc. A., Deffieux. G., Carde. J.-P. (1994-A)

Biogénèse des monoterpènes : II-la chaîne isoprénique.

Bull. Soc. Pharm. Bordeaux., vol. **133**, pp. 79-99.

Lamarti. A., Badoc. A., Deffieux. G., Carde. J.-P. (1994-B)

Biogénèse des monoterpènes : III- monoterpènes syntétases.

Bull. Soc. Pharm. Bordeaux., vol. **133**, pp. 100-118.

Lefranc. F et Kiss. R. (2008)

The sodium pump α_1 subunit as a potential target combat apoptosis-resistant glioblastomas¹.

Neoplasia., vol. **10**, n^o. 3, pp. 198-206.

Lei. Z.H., Yahara. S., Nohara. T., Tai. B.S., Xiong. J.Z., Lima. Y. (2000)

Cardiac glycosides from *Erysimum cheiranthoides*.

Chem. Pharm. Bull., vol. **48**, n^o2, pp. 290-292.

Macek. K. (1972)

Pharmaceutical application of Thin-Layer and Paper Chromatography, New York.

Maftah. T., Sengui. R., Djennas. A. K. (2003)

Programme UICN d'Afrique du Nord, cosmétologie au naturel, p. 11, Algérie.

Maradufu. A. et Ouma. J. H. (1978)

A new chalcone as a natural molluscicide from *Polyconum senagalense*.

Phytochemistry., vol. **17**, pp. 823-824. Pergamon Press Printed in England.

Marston. A. et Hostettmann. K. (1985)

Review article number 6: plants molluscicides.

Phytochemistry., vol. **24**, n^o. 4, pp. 639-652.

Marston. A., Maillard. M., Hostettmann. K. (1993)

Search for antifungal, molluscicidal and larvicidal. Compounds from African medicinal plants.

Journal of Ethnopharmacology., vol. **38**, pp. 215-223.

Medhat. A., Abdel-aty. M. A., Nafeh. M., Hammam. H., Abdel-samia. A., Strickland. G. T. (1993)

Foci of *Schistosoma mansoni* in Assiut in Middle Egypt.

Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene., vol. **87**, pp. 404-405.

Melero. C. P., Medarde. M., Feliciano. A. S. (2000)

A short review on cardiotonic steroids and their aminoguanidine analogues.

Molecules., vol. **5**, pp. 51-81.

Mendes. N.M. (1999)

Screening of Asteraceae (Compositae): plant extracts for molluscidal activity.
Mem. Inst. Oswaldo Cruz., vol. 3, pp. 411-412.

Mijatovic. T. (2006)

Cardenolide-induced lysosomal membrane permeabilization demonstrates therapeutic benefits in experimental human non-small cell lung cancers.
Neoplasia., vol. 8, n° 5, pp. 402-412.

Molgaard. P., Chihaka. A., Lemmich. E., Furu. P., Windberg. C., Ingerslev. F., Halling-Sorensens. B. (2000).

Biodegradability of the molluscicidal saponins of *Phytolacca dodecandra*.
Regulatory Toxicology and Pharmacology., vol. 32, pp. 248-255.

Morgam. J.A. T., Dejong. R. J., Kazibwe. F., Mkoji. G. M., Loker. E. S. (2003)

A newly identified lineage of *Schistosoma*.
International journal for parasitology., vol. 33, pp. 977-985.

Moss. G. P. (1989)

Nomenclature of steroids.
Pure and Appl. Chem., vol. 61, n° 10, pp. 1783-1822. (IUPAC).

Mott. K. E. (1987)

Plant molluscicides, John Wiley, Chichester.

Nayama. M., Garba. A., Boulama-jackou. M. L., Toure. A., Idi. N., Nouhou. H., Decanter. C. (2007)

Bilharziose uro-génitale à *S. haematobium* et infertilité Au Niger.
Mali médical 2007, Tome. XXII, n° 3, pp. 15-16.

N'goran. E., Bremoud. P., Sellin. E., Sellin. B., Theron. A. (1997)

Intraspecific diversity of *Schistosoma haematobium* in west Africa: chronobiology of cercarial emergence.
Acta Tropica., vol. 66, pp. 35-44.

Okafor. J et Ham. R. (1999)

Identification, utilisation et conservation des plantes médicinales dans le sud du Nigéria.
Le programme d'appui à la biodiversité N°3, juillet 1999.

OMS. (1965)

Molluscicide screening and evaluation.
Bull. WHO., vol. 33, pp. 567-581.

Oukal. Z. (2008)

les principales plantes toxiques chez les animaux domestiques au Maroc. (Thèse de Doctorat), Maroc.

Padua. R.M., Oliverira. A.B., Souza filho. J.D., Takahashi. J.A., Silva. M., Braga. F.C. (2007)

Biotransformation of Digitoxinigenin by *Cochliobolus lunatus*.
J. Braz. Chem, Soc., vol. **18**, n°. 7, pp. 1303-1310.

Paris. R.R et Moyse. H. (1971)

Précis de matière médicale, pharmacognosie spéciale dicotylédones (tome III), pp.32-52

Pauwels, L. (1979)

Revue de recherche scientifique, spécial : médecine traditionnelle au Zaïre, volume unique, pp. 185-188. Institut de recherche scientifique.

Perlin. D. S. (1998)

Ion pumps as targets for therapeutic intervention: old and new paradigms.
Journal of Biotechnology Issn.,vol. **1**, n°.2, pp. 0717-3458.

Perrett. S et Whitfield. P. J. (1996)

Currently available molluscicides.
Parasitology Today., vol. **12**, n°. 4, pp. 156-159.

Popenoe. J. (1975)

Oleander cultivars at the Fairchild tropical garden.
Florida state horticultural society, p.426.

Raccurt. C.P., EL Samad. Y., Chouaki. T., Borel. A., Agnamey. P., Totet. A., Schmit. J.L. (2007)

Bilharziose à schistosoma mansoni au retour de guinée: défaillance du sérodiagnostic.
Med Trop., vol. **67**, pp.175-178.

Ramanantsizehena. P et Ramirana. B. (2005)

Système d'information géographique et épidémiologie de la bilharziose dans la région de Manadriana, Madagascar.
Téledétection.,vol. **5**, n°. 1-2-3, pp. 139-152.

Rawi. S. M., El-gindy. H., Abd-el-kader. A. (1996)

New possible molluscicides from *Calendula officinalis* and *Ammi majus*.
Ecotoxicology and Environmental safety., vol. **35**, n°. 0109, pp. 261-267.

Ridings. W. H. (1976)

Sphaeropsis witches' broom of *Nerium oleander*.
Proc. Fla. State Hort. Soc., vol. **89**, pp. 302-303.

Rodney. C., Toni. M. K., Norman. G. L. (2000)

Natural products (secondary metabolites).
Biochemistry et Molecular Biology of Plants., Chapter 24, pp. 1250-1318.

Samaï. A. (2006)

Criblage de plantes a la recherche de substances molluscicides et antidermatophyte
Centre universitaire LARBI BEN M'HIDI, pp. 42. (Mémoire de magister),Oum El-Bouaghi.

Schall. V. T., Vasconcellons. M. C., Rocha. R. S., Souza. C. P., Mendes. N. M. (2001)
The control of the schistosome transmitting snail *Biomphalaria glabrata* by the plant molluscicide *Euphorbia splendens* Var. hislopilii (sy *milli* Des. Moul): a longitudinal field study in an endemic area in Brazil.
Acta Tropica., vol. **79**, pp. 165-170.

Shan Yu. M., Wanilai. S., Funmlin. K., Nianfang. J., Hungyuen. W., Chung. R. C. (2004)
Characterization of polysaccharides from the flowers of *Nerium indicum* and their neuroprotective effects.
International Journal of Molecular Medicine., vol. **14**, pp. 917-924.

Shriff. N., Saudarshana. M. S., Umesha. S., Hariprasad. P. (2006)
Antimicrobial activity of *Rauvolfia tetraphylla* and *Physalis minima* leaf and callus extracts.
Africa journal of biotechnology., vol. **5**, n°. 10, pp. 946-950.

Siddiqui. S., Hafeez. F., Begum. S., Siddiqui. B. S. (1987)
Isolation and structure of two cardiac glycosides from the leaves of *Nerium oleander*.
Phytochemistry., vol. **26**, pp. 237-241.

Siddiqui. S., Begum. S., Siddiqui. B. S., Hafeez. F. (1989)
Kanerin and 12, 13-dihydrourosolic acid, two new pentacyclic triterpenes from the leaves of *Nerium oleander*.
Journal of Natural Products., vol. **52**, pp. 57-62.

Silva. T. M., Camara. C. A., Barbosa. T. P., Soares. A. Z., Da Cunha. L. C., Pinte. A. C., Vargas. M. D. (2005)
Molluscicidal activity of synthetic lapachol amino and hydrogenated derivatives.
Bioorganic and Medicinal Chemistry., vol. **13**, pp. 193-196.

Singh. S et Singh. D.K. (1998)
Molluscicidal activity of *Nerium indicum* bark.
Brazilian Journal of Medical and Biological Research., vol. **31**, pp. 951-954.

Strahan. K., Kane. R. A., Rollinson. D. (1991)
Development of cloned DNA probes for the identification of snail intermediate hosts within the genus *Bulinus*.
Acta Tropica., vol. **48**, pp. 117-126.

Swain. R.H. (1978)
Progress in phytochemistry., vol **5**, first edition, pp. 286-287.

Tamboura. H. H. (2005)
Ecological distribution, morphological characteristics and acute toxicity of aqueous extracts of *Holarrhena floribunda* (G. DON) Durand and schinz, *Leptadenia hastata* (pers) de dence and *Casia sieberiana* (DC) used by veterinary healers in Burkina Faso.
Afr. J. Trad. CAM., vol. **2**, n°.1, pp.13-24.

Tiwari. S et Singh. A. (2003)

Control of common freshwater predatory fish, *Channa punctatus*, through *Nerium indicum* leaf extracts.
Chemosphere., vol. **53**, pp. 865-875.

Trigo. J. R. (2000)

The chemistry of antipredator defense by secondary compounds in Neotropical lepidoptera: facts, perspectives and caveats.
J. Braz. Chem. Soc., vol. **11**, n°. 6, pp. 551-561.

Van Schauck. C. P. (1986)

The effect of several methods of aquatic plant control on two bilharzias-bearing snail species.
Aquatic Botany., vol. **24**, pp. 303-309.

Vercauteren. J. (2007)

Plan du cours de pharmacognosie-formation commune de base.
Edition Université de Montpellier2007., pp. 151-165.

Wagner. H., Bladt. S., Zgainsni. E.M. (1984)

Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas.
Berlin Heidelberg New York Tokyo., pp. 195-213, 300-303.

Wajdi. N. (1996)

Immunity to *Schistosoma haematobium* in *Bulinu truncatus*
Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene., vol. **60**. n°. 6, pp. 774-776.

Xing. G.T., Xiao. R. Z., Ming. K. W., Shu. L. P., Li Sheng. D. (2002)

Two new cardenolide glycosides from *Biondia hemsleyana*
Chineses chemical letters., vol. **13**, n°. 6, pp. 547-548.

Yamauchi. T., Takata. N., Mimura. T. (1975)

Cardiac glycosides of the leaves of *Nerium odorum*.
Phytochemistry., vol. **14**, pp. 1379-1382.

Yamauchi. T., Abe. F., Tachibana. Y., Atal. C. K., Sharma. B. M., Imre. Z. (1983)

Quantitative variations in the cardiac glycosides of oleander.
Phytochemistry., vol. **22**, pp. 2211-2214.

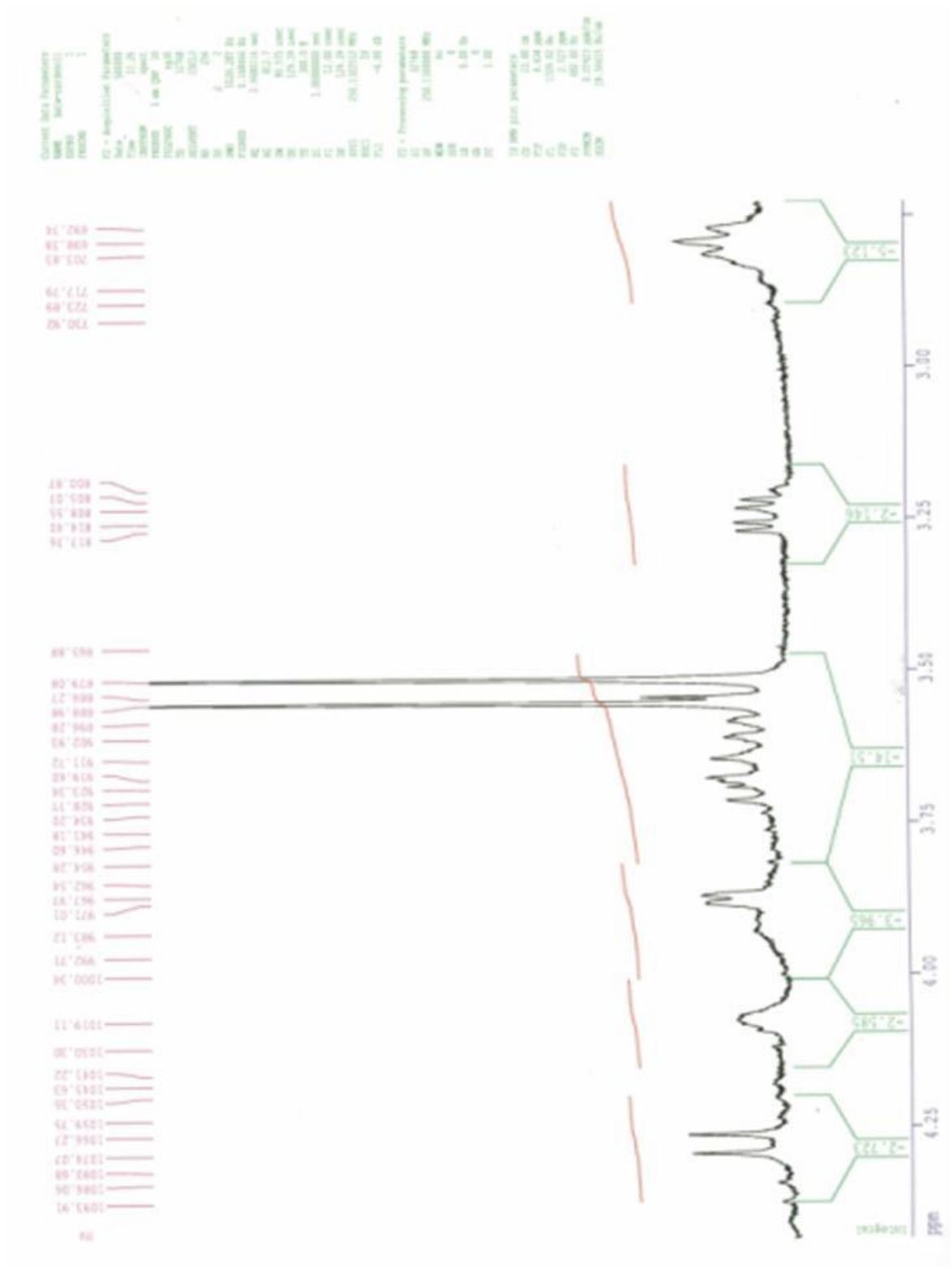
ANNEXES

GLOSSAIRE DES TERMES SCIENTIFIQUES

Amibe	: Parasite qui touche surtout l'intestin, et est transmis par l'eau non potable et les aliments souillés.
Amibiase maladie	: Infections par les amibes , avec troubles digestifs.
Antidiabétique	: Substance destinée à lutter contre le diabète. On distingue l' <i>insuline</i> (utilisée en injection) et les antidiabétiques oraux : sulfamides hypoglycémiants, biguanides, autres.
Analgésique	: Antidouleur.
Anti-inflammatoire	: Substance destinée à la lutte contre l'inflammation.
Antirythmique	qui combat l'irrégularité du rythme cardiaque
Cardiopathie	: maladie de cœur.
Cardiotonique	: (Médicament) qui augmente la tonicité du muscle cardiaque.
Diurétique	: Substance permettant une élimination d'eau par les reins et donc qui favorise, stimule l' excrétion urinaire .
Dysenterie	: Infection intestinale avec diarrhée grave.
Hypertensions	: tension (artérielle) supérieure à la normale.
Inhibition	: 1) Physiol. : action nerveuse ou hormonale empêchant ou modérant le fonctionnement d'un organe - 2) Psycho. : action d'un fait psychique qui empêche d'autres faits de se produire.
Leucémie	: Affection, avec augmentation considérable des globules blancs dans le sang, et présence de cellules anormales.
Leucopénia	: Diminution du nombre de globules blancs (sang).
Molluscicide	: Lutte contre les mollusques
Ovulation	: Libération des ovules après rupture du follicule de Graaf.
Tonique	: 1) Relatif au tonus musculaire - 2) qui stimule, fortifie.

LES SPECTRES RMN ¹ H DE COMPOSÉ IDENTIFIÉ

Spectre RMN ¹H du composé W₄:
(étalement de la région 2.50-4.25 ppm)



**CONSTANTES
PHYSIQUES ET
DONNÉES SPECTRALES
DES COMPOSÉS ISOLÉS**

Composé W₁ :

Consistance	Solide amorphe de couleur blanche,
Solubilité	CHCl ₃ , MeOH
Rf (système)	0,81 (AE : MeOH : H ₂ O) (81 :11 :8)
UV λ _{max} nm (MeOH)	217,5 (1,31) ; 287,5 (0,20).
Coloration avec Kedde :	rose violet
Coloration avec Liebermann :	jaune

Composé W₂ :

Consistance	Solide amorphe de couleur blanche,
Solubilité	CHCl ₃ , MeOH
Rf (système)	0,76 (AE : MeOH : H ₂ O) (81 :11 :8)
UV λ _{max} nm (MeOH)	218,42 (1,27) ; 285 (0,14).
Coloration avec Kedde :	rose violet
Coloration avec Liebermann :	jaune

Composé W₄ :

Consistance	Solide amorphe de couleur blanche,
Solubilité	CHCl ₃ , MeOH
Rf (système)	0,54 (AE : MeOH : H ₂ O) (81 :11 :8)
UV λ _{max} nm (MeOH)	221,27 (1,006) ; 250 (0,428).
Coloration avec Kedde :	rose violet
Coloration avec Liebermann :	jaune
RMN ¹ H δ _H ppm (250 MHz, CDCl ₃)	0,89(3H, s, H-18); 0,95 (3H, s, H-19); 2,00 (3H, s, CH ₃ CO); 3,25 (1H, dd, J= 9.21, 3,48 Hz, H-17); 3,52 (3H, s, -OCH ₃); 3,55 (3H, s, -OCH ₃); 3,57-3,75(6H, m, protons du sucres); 4,08(1H, s large, H-3); 4,28 (1H, d, J=7,8 Hz, H-1'), 4,37 (1H, d, J=7,85 Hz, H-1''); 4,82(1H, dd, J=17,7, 1,5 Hz, H-21β); 5,01(1H, dd, J=17,9, 1,50 Hz, H-21α); 5,90(1H, s large, OH-14); 6,00(1H, s large, H-22).

Résumé

L'évaluation de l'activité molluscicide des extraits de polarité différentes obtenu de feuilles de *Nerium oleander* a permis de localiser un effet molluscicide notable au niveau des extraits bruts de l'éther éthylique (EE) et l'acétate d'éthyle (AE). Le fractionnement de l'extrait actif (AE) a permis d'isoler 3 hétérosides cardénolides. L'un d'eux, désigné par (W_4) est partiellement identifié comme un dérivé de la digitoxigénine avec un disaccharide attaché au carbone 3 de la génine. Une activité molluscicide importante a été mesurée après 24 h d'exposition au cardénolide W_4 . Des doses létales DL_{50} et DL_{90} obtenues, sont respectivement de $3,35 \pm 1,19$ et $19,13 \pm 10,67$. L'activité molluscicide du cardénolide W_4 , vis-à-vis des mollusques adultes de l'espèce *Bulinus truncatus*, vecteur dans le cycle du développement du parasite causant la bilharziose urogénitale, est signalée par la présente étude pour la première fois. A la limite de la période testée de 24h, l'étude a permis d'établir une corrélation inverse temps vs dose létale. Ceci permet d'envisager d'utiliser le cardénolide W_4 à des concentrations toxiques plus faibles, en allongeant le temps d'exposition des mollusques.

Mots clés : *Nerium oleander*, Apocynaceae, feuilles, cardénolide molluscicide.

Abstract

Molluscicidal screening of *N. oleander* leaf gradient extracts (20µg/ml) localized strong activities in both diethyl ether (EE) and ethyl acetate (AE) crude extracts. Ethyl acetate extract fractioning leads to three cardenolides glycosides. One of which, hereafter named as W_4 , contains a digitoxigenine aglycone with disaccharides attached to carbone 3. A potent molluscicidal activity is revealed after exposing snails for 24 hours to cardenolide W_4 . Lethal concentrations DL_{50} et DL_{90} were found to be, respectively equal to $3,35 \pm 1,19$ et $19,13 \pm 10,67$. Molluscicidal activity of cardenolide W_4 , towards snails of *Bulinus truncatus* species, vector in growth cycle of urogenital Bilharzia parasites, is reported by this study for the first time. In the expand of time used (24 hours), the study showed also an inverse relationship between exposing time and lethal concentration of cardenolide W_4 . This indicates that lethal concentration may be minimized with expanding time of snails exposing to the tested cardenolide W_4 .

Key words: *Nerium oleander*, Apocynaceae, leaves, molluscicidal cardenolide.

ملخص

إن النشاط ضد الرخويات للمستخلصات ذات القطبية المتباينة و المتحصل عليها من أوراق الدفلة، سمح بتحديد فعالية النشاط ضد الرخويات مميزة على مستوى مستخلصات الايثيل ايثيليك (EE) و أسينات الايثيل(AE). الفصل الكروماتوغرافي للمستخلص النشط (AE)، سمح بفصل كريدنوليدات سكرية ، واحد منها أطلق عليه رمز W_4 ، حيث تم تحديد بنيته جزئيا كمشتق لبنية الديجيتوكسين مع سكرين متصل بالكربون 3 من البنية. تم قياس نشاط ضد الرخويات مهم بعد 24 ساعة للمركب W_4 . التركيزات DL_{50} و DL_{90} المحصل عليها هي على التوالي $3,35 \pm 1,19$ و $19,13 \pm 10,67$. إن النشاط ضد الرخويات للكريدنوليد W_4 ، مواجهة مع الرخويات البالغة من صنف *Bulinus truncatus* ، عامل في دورة تطور الطفيلي المسبب للبلهارسيا، تم الإشارة إليه في هذه الدراسة لأول مرة. في حدود المدة المجربة ب 24 ساعة، الدراسة سمحت بتبيان علاقة عكسية بين الوقت و التركيز. هذا ما يعني انه يمكن استعمال الكريدنوليد W_4 بتركيز سمية أقل ضعفا، و ذلك مع الاخذ بعين الاعتبار وقت التعرض بالنسبة للرخويات.

كلمات المفتاح: الدفلة، أوراق، Apocynaceae، كريدنوليد ضد الرخويات.