

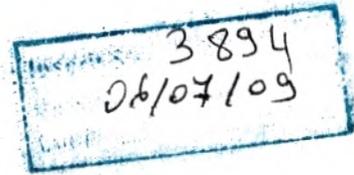
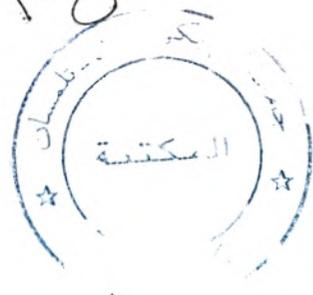


Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

Laboratoire de Catalyse et Synthèse en Chimie Organique

Laboratoire de Produits Naturels

Mag: 163/03.



## Mémoire

Pour l'obtention du diplôme de

## MAGISTER

En Biologie

Option : Substances naturelles, Activité Biologique et Synthèse

Présenté par

**Mr RAHMOUN Mohammed Nadjib**

# Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique de produits dérivés de la Lawsone

Devant les membres du jury :

**Président :**

Mr BOUCHERIT K.

Maître de conférences à l'université de Tlemcen

**Examineurs**

Mme ATIK F.

Professeur à l'université de Tlemcen

Mr ABDELWAHID D.

Maître de conférences à l'université de Tlemcen

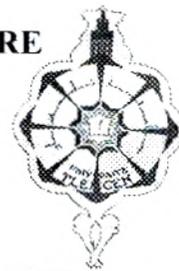
Mr CHOUKCHOU-BRAHAM N.

Maître de conférences à l'université de Tlemcen

**Promoteur**

Mr MOSTEFA-KARA B.

Maître de conférences à l'université de Tlemcen



Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique

Laboratoire de Catalyse et Synthèse en Chimie Organique

Laboratoire de Produits Naturels

## M é m o i r e

Pour l'obtention du diplôme de

## MAGISTER

En Biologie

Option : Substances naturelles, Activité Biologique et Synthèse

Présenté par

**Mr RAHMOUN Mohammed Nadjib**

# Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique de produits dérivés de la Lawsonsie

Devant les membres du jury :

**Président :**

Mr BOUCHERIT K.

Maître de conférences à l'université de Tlemcen

**Examineurs**

Mme ATIK F.

Professeur à l'université de Tlemcen

Mr ABDELWAHID D.

Maître de conférences à l'université de Tlemcen

Mr CHOUKCHOU-BRAHAM N.

Maître de conférences à l'université de Tlemcen

**Promoteur**

Mr MOSTEFA-KARA B.

Maître de conférences à l'université de Tlemcen

# Remerciements

Je remercie avant tout,  
Dieu tout puissant  
pour m'avoir donné la santé, le courage et la foi  
afin de réaliser ce travail dans les conditions les plus  
favorables.

# Remerciements

Je remercie chaleureusement mon directeur de thèse Monsieur MOSTEFA-KARA Bachir, Maître de conférences à l'université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, sans lequel rien ne serait là aujourd'hui. Je le remercie pour avoir accepté de diriger ce travail. Il a été très présent dans mes débuts incertains, et à mes moments de découragements. Il a su gérer mon stress sans jamais me faire part du sien.

Ce travail a été effectué dans le laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique à Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen. Je tiens tout particulièrement à remercier mon directeur de laboratoire Monsieur BOUCHERIT Kebir, Maître de conférences à l'Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen de m'y avoir accueilli et mis à ma disposition tout le matériel nécessaire pour la réalisation de ce travail. Je suis très sensible à l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de ce travail. Je lui adresse mes sincères remerciements.

Je remercie également notre responsable de Magister M<sup>me</sup> ATTIK Fawzia, Professeur à l'Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur ABDELWAHID Djamel Edinne, Maître de conférences à l'Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen qui m'a accueilli au sein de son laboratoire, qui m'a soutenu dans la réalisation de ce travail et qui a toujours fait preuve d'une grande disponibilité et d'une gentillesse à tout moment. Je l'assure de ma profonde gratitude, ainsi que de ma sincère reconnaissance pour le grand honneur qu'il me fait d'être l'examineur de ce mémoire.

Je remercie également Monsieur CHOUKCHOU-BRAHAM NourEddine, Maître de conférences à l'Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Monsieur CHOUKCHOU-BRAHAM Abderahim, Maître de Conférences à l'Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, directeur de laboratoire de Catalyse et Synthèse en Chimie Organique (LCSCO) de m'avoir accueilli dans son laboratoire.

J'aimerais témoigner de ma profonde reconnaissance à Monsieur DRISSI Mourad Maître de conférences à l'Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen qui m'a soutenu pour la réalisation de ce travail. Je le remercie pour ses conseils fructueux, ses orientations et sa gentillesse toute particulière.

# Remerciements

Je remercie également M<sup>lle</sup> BABA AHMED Zahira Zakia Maître assistant à l'Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen qui a fait preuve d'une grande disponibilité et de sa gentillesse à mon égard.

Je tiens aussi à remercier tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail : M<sup>r</sup> BENABDELAH Mohammed, M<sup>r</sup> BENABADJI Bakir, les Responsable de l'institut INRA Adrar, M<sup>me</sup> SEDJELMACI, M<sup>r</sup> BELYAGOUBI Larbi, M<sup>r</sup> REBLAHI Sid Ahmed et M<sup>me</sup> BOUDGHEN Kheira.

Je tiens à remercier en fin tous les membres du laboratoire :

M<sup>me</sup> BOUCHERIT Zahia, M<sup>lle</sup> MEZOUAR Dounia, M<sup>lle</sup> BENARIBA Nabila, pour leurs soutiens et les moments de détente et de plaisir que nous avons partagés ensemble.

Un grand merci tout particulier à tous mes amis : AZZI Rachid, MOUSSAOUI Djilali, GUEMBAZA Chemso, BELKACEM Nacéra, BABA AHMED Zakat, EL HACI Imad, GUERIB Mohammed . . . etc

Je tiens enfin à exprimer toute ma gratitude à ma famille dont le soutien a été essentiel tout au long de mes études, et tout particulièrement au cours de ce travail.

A mes parents, pour leur aide, leur bénédiction et leurs encouragements de tous les jours. A ma future pour son attachement, ses chaleureux encouragements, sa vive compassion, à ma réussite et surtout pour sa compréhension et sa patience. A mes frères, sœurs, beaux-frères et belles-sœurs, neveux et nièces et à tous les miens.

## Liste des abréviations

|                     |  |
|---------------------|--|
| <i>A.flavus</i>     | <i>Aspergillus flavus parasiticus</i>  |
| <i>A.niger</i>      | <i>Aspergillus niger</i>   |
| ADN                 | Acide Désoxyribonucléique  |
| ATCC                | American Type Culture Collection   |
| <i>C.albicans</i>   | <i>Candida albicans</i>  |
| CAS                 | Chemical Abstracts Service   |
| CaSfm               | Comité de l'antibiogramme, société Française de Microbiologie  |
| Chl                 | Chloroforme  |
| CLSI                | Clinical and Laboratory Standards Institute  |
| CMI                 | Concentration Minimale Inhibitrice   |
| DMSO                | Diméthyle sulfoxyde  |
| D.O                 | Densité optique  |
| <i>E. coli</i>      | <i>Escherichia coli</i>  |
| <i>E.faecalis</i>   | <i>Enterococcus faecalis</i>   |
| FAO                 | Food and Agriculture Organisation  |
| Ether               | Ether di-éthylique   |
| EtOH                | Ethanol  |
| EUCAST              | European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing  |
| <i>F.oxysporum</i>  | <i>Fusarium oxysporum</i>  |
| Fig.                | Figure   |
| HNQ                 | 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone  |
| INRA                | Institut National de Recherche Agronomique   |
| J.C                 | Jésus Christ   |
| <i>L.inermis</i>    | <i>Lawsonia inermis</i>  |
| min                 | Minute   |
| N                   | Nord   |
| NAD                 | Nicotinamide adénine dinucléotide  |
| NADPH               | Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  |
| <i>P.aeruginosa</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  |
| PPD                 | Paraphenylenediamine   |
| <i>R.stolinifer</i> | <i>Rhizopus stolinifer</i>   |
| S                   | Sud  |
| <i>S.aureus</i>     | <i>Staphylococcus aureus</i>   |
| SCCNFP              | The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers de l'union européenne |
| UVB                 | Ultra-Violets B  |

## Liste des Figures

|                   |   |     |
|-------------------|---|-----|
| <b>Figure 01.</b> | Structures de quelques Les hydroxynaphthoquinones                   | p03 |
| <b>Figure 02.</b> | Photo de la plante <i>L.inermis</i>                                 | p08 |
| <b>Figure 03.</b> | Les différents composants isolés des feuilles de <i>L.inermis</i>   | p10 |
| <b>Figure 04.</b> | Naphtoquinones isolés à partir des tiges de <i>L.inermis</i>        | p11 |
| <b>Figure 05.</b> | La fleure de la plante <i>L.inermis</i>                             | p11 |
| <b>Figure 06.</b> | Lawsaritol isolé à partir des racines de <i>L.inermis</i>           | p12 |
| <b>Figure 07.</b> | La Lawsone ou 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone (HNQ)                     | p17 |
| <b>Figure 08.</b> | Structure de la vitamine K  | p18 |
| <b>Schéma 09.</b> | Biosynthèse de la Lawsone dans la plante <i>Impatiens balsamina</i> | p21 |
| <b>Schéma 10.</b> | Hypothèse concernant la fixation de la Lawsone sur la kératine      | p22 |
| <b>Schéma 11.</b> | Formes tautomériques de la HNQ                                      | p23 |
| <b>Figure 12.</b> | Structure de la Conocurvone   | p27 |
| <b>Schéma 13.</b> | Synthèse de la Lawsone  | p28 |
| <b>Schéma 14.</b> | Synthèse de Parvaquone  | p29 |
| <b>Schéma 15.</b> | Synthèse de l'A'  | p29 |
| <b>Schéma 16.</b> | Schéma réactionnel des dérivés acétonitriles                        | p33 |
| <b>Figure 17.</b> | Structure des dérivés acétonitriles                                 | p34 |
| <b>Figure 18.</b> | Schéma de la fixation de la Lawsone sur la kératine                 | p38 |
| <b>Figure 19.</b> | Rendement de la Lawsone   | p42 |
| <b>Schéma 20.</b> | Fixation de la Lawsone sur la kératine                              | p49 |
| <b>Photo 21.</b>  | Résultat de la culture de <i>S.aureus</i>                           | p51 |
| <b>Photo 22.</b>  | Résultat de la culture de <i>E.faecalis</i>                         | p51 |
| <b>Photo 23.</b>  | Résultat de la culture de <i>S.aureus</i>                           | p53 |
| <b>Photo 24.</b>  | Résultat de la culture de <i>L.inermis</i>                          | p58 |
| <b>Photo 25.</b>  | Résultat de la culture de <i>L.inermis</i>                          | p58 |
| <b>Photo 26.</b>  | Résultat de la culture de <i>F.oxysporum</i>                        | p62 |
| <b>Photo 27.</b>  | Résultat de la culture de <i>Penicilium sp</i>                      | p62 |
| <b>Photo 28.</b>  | Résultat de la culture de <i>S.aureus</i>                           | p69 |
| <b>Photo 29.</b>  | Résultat de la culture de <i>S.aureus</i>                           | p73 |
| <b>Photo 30.</b>  | Résultat de la culture de <i>S.aureus</i>                           | p73 |

## Liste des Tableaux

|                    |   |     |
|--------------------|---|-----|
| <b>Tableau 01.</b> | Solvants et modes d'extraction  | p31 |
| <b>Tableau 02.</b> | Synthèse de 2-hydroxynaphtoquinométhane dans le solvant aqueux  | p33 |
| <b>Tableau 03.</b> | Effet du DMSO sur la croissance des microorganismes utilisés  | p43 |
| <b>Tableau 04.</b> | Effet du DMSO sur la croissance mycélienne des moisissures  | p44 |
| <b>Tableau 05.</b> | Etude comparative des CMI (mg/ ml) de la Lawsonie avec deux méthodes de préparations différentes  | p46 |
| <b>Tableau 06.</b> | Résultats des diamètres des zones d'inhibition (mm) de la Lawsonie  | p47 |
| <b>Tableau 07.</b> | Résultats des CMI de la Lawsonie (mg/ml)  | p48 |
| <b>Tableau 08.</b> | Résultats des diamètres des zones d'inhibition (mm) des dérivés de synthèse   | p50 |
| <b>Tableau 09.</b> | Résultats des CMI (mg/ml) des produits actifs   | p52 |
| <b>Tableau 10.</b> | Résultats des zones d'inhibition (mm) des différents extraits des feuilles de <i>L.inermis</i>  | p55 |
| <b>Tableau 11.</b> | Solvants utilisés pour l'extraction des composants actifs   | p56 |
| <b>Tableau 12.</b> | Résultats des CMI (mg/ml) des différents extraits des feuilles de <i>L.inermis</i>  | p59 |
| <b>Tableau 13.</b> | Résultats des diamètres d'inhibition (mm) de la croissance mycélienne   | p62 |
| <b>Tableau 14.</b> | Résultats des zones d'inhibition (mm) des dérivés de synthèse vis-à-vis de <i>C.albicans</i>  | p63 |
| <b>Tableau 15.</b> | Résultats des pourcentages d'inhibitions de la croissance mycélienne des moisissures par la Lawsonie et des dérivés de synthèse               | p64 |
| <b>Tableau 16.</b> | Résultats des zones d'inhibitions (mm) des différents extraits des feuilles de <i>L.inermis</i> vis-à-vis de <i>C.albicans</i>                | p67 |
| <b>Tableau 17.</b> | Résultats des CMI (en mg/ml) des différents extraits vis-à-vis de <i>C.albicans</i>   | p67 |
| <b>Tableau 18.</b> | Résultats des pourcentages d'inhibitions de la croissance mycélienne des moisissures par différents extraits des feuilles de <i>L.inermis</i> | p68 |
| <b>Tableau 19.</b> | Résultats de la CMI de l'extrait éthanolique vis-à-vis <i>F.oxysporum</i>   | p69 |
| <b>Annexe II :</b> |   |     |
| <b>Tableau 20.</b> | Les rendements obtenus avec les différents solvants.  |     |
| <b>Tableau 21.</b> | Limites inférieurs des diamètres d'inhibitions des produits de synthèse vis-à-vis <i>F.oxysporum</i>  |     |
| <b>Tableau 22.</b> | Limites inférieurs des diamètres d'inhibitions des produits de synthèse vis-à-vis <i>A.flavus</i>   |     |

# Résumé

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à évaluer l'activité antibactérienne et antifongique de :

- La Lawsone pure : ou hydroxynaphtoquinone (principal colorant des feuilles de Henné).
- Huits produits de synthèses, obtenus par modification du noyau naphtoquinone de la Lawsone.
- Extraits naturels obtenus par macération des feuilles de Henné dans divers solvants.

Deux types de méthodes ont été mises en œuvre :

- la technique de diffusion sur disques, nous a permis de mettre en évidence une bonne activité pour la Lawsone vis à vis d'*E.coli*, *S.aureus* et *E.feacalis* et une activité moyenne des deux produits nommés 2i (5) et 2h (6) vis-à-vis de *S.aureus*.

- L'étude de la concentration minimale inhibitrice, a été effectuée sur les trois produits qui ont montré les activités les plus intéressantes. Les CMI obtenues sont considérées dans ce travail comme étant intéressantes (CMI du p06 =0,032mg/ ml vis-à-vis de *S.aureus*, CMI du p05 =0,064mg/ ml vis-à-vis de *S.aureus*).

Les résultats obtenus vis-à-vis des champignons n'ont révélé aucune activité intéressante des dérivés de synthèse. Ce ce qui nous a ramener à conclure que la modification par voie de synthèse du noyau naphtoquinone n'augmenterait pas d'avantage l'activité antimicrobienne de la Lawsone.

Les résultats des extraits naturels obtenus nous ont permit de conclure que les feuilles de Henné possèdent bien un pouvoir antimicrobien et que cette activité serait due à son principal colorant : la Lawsone.

*Mots clés* : Lawsone, activite antibactérienne, activite antifongique, *Lawsonia inermis* (Henné), produits de synthèse.

# Table des matières

|  |    |
|--|----|
| <b>Introduction</b> .....                                      | 1  |
| <b>Chapitre I. Partie Bibliographique</b> .....                | 5  |
| <b>I. <i>Lawsonia inermis</i> (le Henné)</b> .....             | 6  |
| I.1 . Présentation .....                                       | 6  |
| I.2 . Classification botanique.....                            | 8  |
| I.3 . Description morphologique .....                          | 8  |
| I.4 . Origine et répartition géographique.....                 | 9  |
| I.5 . Les variétés de henné .....                              | 9  |
| I.6 . La composition chimique de <i>L.inermis</i> .....        | 9  |
| I.6.1 . Les feuilles.....                                      | 10 |
| I.6.2 . Les tiges.....   | 11 |
| I.6.3 . Les fleurs.....  | 11 |
| I.6.4 . les racines.....                                       | 11 |
| I.7 . Propriétés biologiques de <i>L.inermis</i> .....         | 12 |
| I.7.1 . Usages de <i>L.inermis</i> en cosmétique .....         | 12 |
| I.7.2 . Effets thérapeutiques de <i>L.inermis</i> .....        | 14 |
| I.7.3 . Autres usages.....                                     | 16 |
| I.7.4 . Effets secondaires.....                                | 16 |
| <b>II. La Lawsone</b> .....                                    | 17 |
| II.1. Introduction .....                                       | 17 |
| II.2. Généralités sur les quinones et les naphtoquinones ..... | 18 |
| II.3. Caractéristiques de la Lawsone.....                      | 19 |
| II.4. Biosynthèse de la Lawsone .....                          | 20 |
| II.5. Propriétés biologiques de la Lawsone.....                | 21 |
| II.5.1 Propriétés cosmétiques .....                            | 21 |
| II.5.2. Propriétés thérapeutiques.....                         | 22 |
| II.5.3. Propriétés chimiques.....                              | 23 |
| II.6. Toxicité de la Lawsone.....                              | 24 |
| <b>III. Synthèse organique</b> .....                           | 26 |
| III.1. Généralités.....  | 26 |
| III.2. Synthèse de la Lawsone et ses dérivés.....              | 28 |
| <b>Chapitre II : Matériels et Méthodes</b> .....               | 30 |
| <b>I Matériel végétal</b> .....                                | 31 |
| I.1 Plante .....   | 31 |
| I.2 Extraction .....   | 31 |
| <b>II Synthèse organique</b> .....                             | 33 |

|  |    |
|--|----|
| <b>III Recherche de l'activité antimicrobienne</b> .....   | 35 |
| <b>III.1 Evaluation de l'activité antibactérienne</b> .....  | 35 |
| III.1.1 Souches utilisées .....  | 35 |
| III.1.2 Repiquages, conservation et contrôle de qualité des souches .....                                      | 35 |
| III.1.3 Activité antibactérienne .....   | 36 |
| III.1.3.1 Milieu .....   | 36 |
| III.1.3.2 Inoculum.....  | 36 |
| III.1.3.3 Méthode de diffusion des disques sur milieu solide.....  | 37 |
| III.1.3.4 Méthode des dilutions .....  | 38 |
| III.1.3.4.1 <i>Méthode des dilutions sur milieu liquide</i> .....  | 38 |
| III.1.3.4.2 <i>Méthode des dilutions sur milieu solide</i> .....   | 39 |
| <b>III.2 Evaluation de l'activité antifongique</b> .....   | 39 |
| III.2.1 La levure .....  | 39 |
| III.2.2 Les moisissures .....  | 40 |
| <b>Chapitre III : Résultats et Discussion</b> .....  | 41 |
| <b>I. Les différents solvants pour l'extraction</b> .....  | 42 |
| <b>II. Effet de la concentration du DMSO</b> .....   | 43 |
| <b>III. Evaluation de l'activité antibactérienne</b> .....   | 45 |
| <b>III.1 Evaluation de l'activité antibactérienne de la Lawsone</b> .....                                      | 45 |
| III.1.1 La concentration de l'étude .....  | 45 |
| III.1.2 Charge du disque .....   | 46 |
| III.1.3 Evaluation de l'activité antimicrobienne de la Lawsone par la méthode<br>de diffusion des disques..... | 47 |
| III.1.4 Etude de la Concentration minimale inhibitrice de la Lawsone .....                                     | 48 |
| <b>III.2 Evaluation de l'activité antibactérienne des dérivés de synthèse</b> ...                              | 49 |
| III.2.1 Evaluation de l'activité des dérivés de synthèse par la méthode de<br>diffusion des disques .....      | 49 |
| III.2.2 L'étude de la CMI des dérivés de synthèse .....  | 52 |
| <b>III.3 Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits naturels</b> .....                              | 54 |
| III.3.1 Evaluation de l'activité des extraits par la méthode de diffusion sur<br>milieu solide .....           | 55 |
| III.3.2 Etude de la CMI des différents extraits .....  | 58 |

|  |    |
|--|----|
| <b>IV. L'évaluation de l'activité antifongique</b> .....                         | 61 |
| IV.1 Evaluation de l'activité antifongique de la Lawsonsone .....                | 61 |
| IV.2 Evaluation de l'activité antifongique des dérivés de synthèse .....         | 63 |
| IV.2.1. Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis de la levure .....       | 63 |
| IV.2.2. Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis de les moisissures ..... | 64 |
| IV.3 Evaluation de l'activité des extraits naturels .....                        | 65 |
| IV.3.1 Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis de la levure.....         | 66 |
| IV.3.1.1 Méthode de diffusion des disques .....                                  | 66 |
| IV.3.1.2 Etude de la CMI .....   | 67 |
| IV.3.2 Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis de des moisissures .....  | 67 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Conclusion et perspectives</b> ..... | 70 |
|---|----|

## **Références bibliographiques**

### **Annexes**

**Annexe I : Milieux de culture**

**Annexe II : Tableaux**

**Annexe III**

...

روى البخاري في " تاريخه" وأبو داود في " السنن" أن رسول الله - صلي الله عليه و سلم- ما شكى إليه أحد وجعا في رأسه إلا قال له : "إحتجم" و لا شكى إليه وجعا في رجله إلا قال له " إختصب بالحناء".

[أبو داود(3757) و الترمذي (2055) و أحمد (6/462)]

# Introduction

**L**es maladies infectieuses causées par les bactéries, champignons, virus et parasites demeurent à ce jour une menace majeure pour la santé publique (Cos *et al*, 2006).

Les substances antibiotiques sont des molécules issues du métabolisme secondaire qui ont été particulièrement étudiées du fait de leur importance en thérapie humaine (Ginolhac, 2006). Depuis leurs découvertes par Fleming en 1928 (Sung *et al*, 2006), les antibiotiques sont devenus indispensables au système courant de santé, aidant et complétant le fonctionnement du système immunitaire contre les microbes pathogènes. Depuis, l'humanité a connu un succès historique dans le contrôle de la morbidité due aux maladies infectieuses à travers l'antibiothérapie.

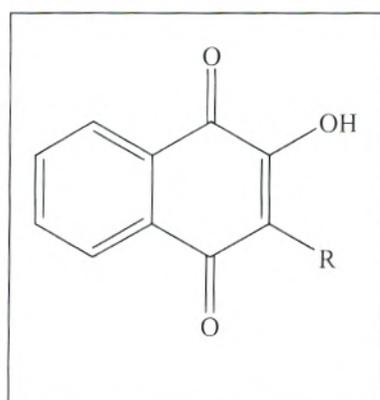
Mais suite à l'utilisation abusive des agents chimiothérapeutiques, les microorganismes à travers leur potentiel à muter, ont généré des mécanismes de résistance aux classes connues d'antimicrobiens (Okeke, 2005 ; Yongmoon Han, 2007). Ce qui est devenu un grave problème au cours des dernières années et présente un défi clinique continu (Sung *et al*, 2006). Ainsi, un besoin pressant pour de nouvelles classes efficaces d'antimicrobiens avec de nouveaux modes d'action demeure et toutes les stratégies possibles devraient être explorées.

Les stratégies à lutter contre ce défi incluent donc la conception des versions améliorées de classes d'antimicrobiennes déjà connues ou la conception de nouvelles classes de molécules, en se basant sur le potentiel démesuré des produits naturels.

Cependant, la complexité chimique de beaucoup de produits issus de la nature fait qu'actuellement le développement de la chimie organique s'associe à la chimie des produits naturels dans lesquels les techniques d'extraction, de séparation, de détermination de la structure et particulièrement de synthèse ont été développées pour comprendre la variation structurale des produits naturels afin d'identifier les composés biologiquement actifs pour l'usage médicinal.

Les composés chimiques ayant la structure naphthoquinone sont des molécules bioactives largement distribuées dans la nature. Les naphthoquinones sont une sous classe des composés phénoliques capables d'exercer un effet antimicrobien et sont à travers cette vertu employées commercialement pour l'usage clinique tel que la famille des ansamycins (**Bryskier, 1999**), la Marinone et la debromomarinone (**Zhang et Arnold, 2005**).

Les hydroxynaphthoquinones comme la Lawsone (**Sauriasari et al., 2007**), le Phthicol (**Lira et al., 2007**) et l'Atovaquone (fig. 01) ont retenu notre attention en raison de leurs propriétés pharmacologiques intéressantes (antibactériennes, antifongiques, antiparasitaire, ... etc).



R= H ;            Lawsone  
 R=Me ;            Phthicol  
 R= Cyclohexyl ;    Parvaquone  
 R=4-(4-Chlorophenyl)cyclohexyl ;    Atovaquone

**Figure 01.** Structures de quelques hydroxynaphthoquinones.

La Lawsone est l'agent bioactif responsable des propriétés colorantes des feuilles de *Lawsonia inermis*. La plante *Lawsonia inermis* (syn *Lawsonia alba*) (**Wichtl, 1999**) appelé couramment "le Henné" est un arbuste très populaire en Algérie qui appartient à la famille des Lythracées (**Ben M'Rad et al., 2003**). Elle est très utilisée comme colorant naturel des cheveux, des mains et des pieds depuis l'antiquité. Le henné est aussi connu en médecine traditionnelle pour ses vertus pharmacologiques

Du fait du potentiel démesuré qu'offrent les produits naturels, en particulier ceux d'origine végétale, et de l'intérêt de leur étude tant du point de vue fondamental qu'appliqué, nous nous sommes fixés au cours de ce travail trois grands objectifs :

- L'étude de l'activité antibactérienne et antifongique de la Lawsone pure, molécule majoritairement retrouvée dans la plante *Lawsonia inermis*.
- L'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique de structures analogues à celle de la Lawsone obtenus par modification d'un des sites cétone du noyau naphthoquinone.
- L'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique de différents extraits des feuilles de la plante *Lawsonia inermis* (Henné), cultivé dans la région d'Adrar.

# Chapitre I

## Partie Bibliographique

Ce chapitre représente une étude bibliographique divisé en trois parties. La première partie rappelle des données générales sur la plante *Lawsonia inermis*. La deuxième partie rappelle des données sur la molécule de la Lawsons. La troisième partie rapporte des exemples de quelques molécules synthétisées par voie chimique.

Au cours de la première partie, nous nous sommes intéressés à la description botanique de la plante *L.inermis* et à sa répartition géographique. En suite nous aborderons les différents types de henné ainsi que la composition chimique des différentes parties de la plante et enfin son usage en cosmétologie, en médecine et sa toxicité.

## **I. Lawsonia inermis (le Henné)**

### **I.1. Présentation**

Le mot henné qui désigne “ devenir reine ”, est une preuve que la plante a une valeur d’élégance chez les civilisations qui l’utilisent. Pendant des siècles, les feuilles de la plante de henné (fig. 02) ont été connues comme étant des agents colorants, utilisés dans plusieurs civilisations (**Botros et al., 2004**).

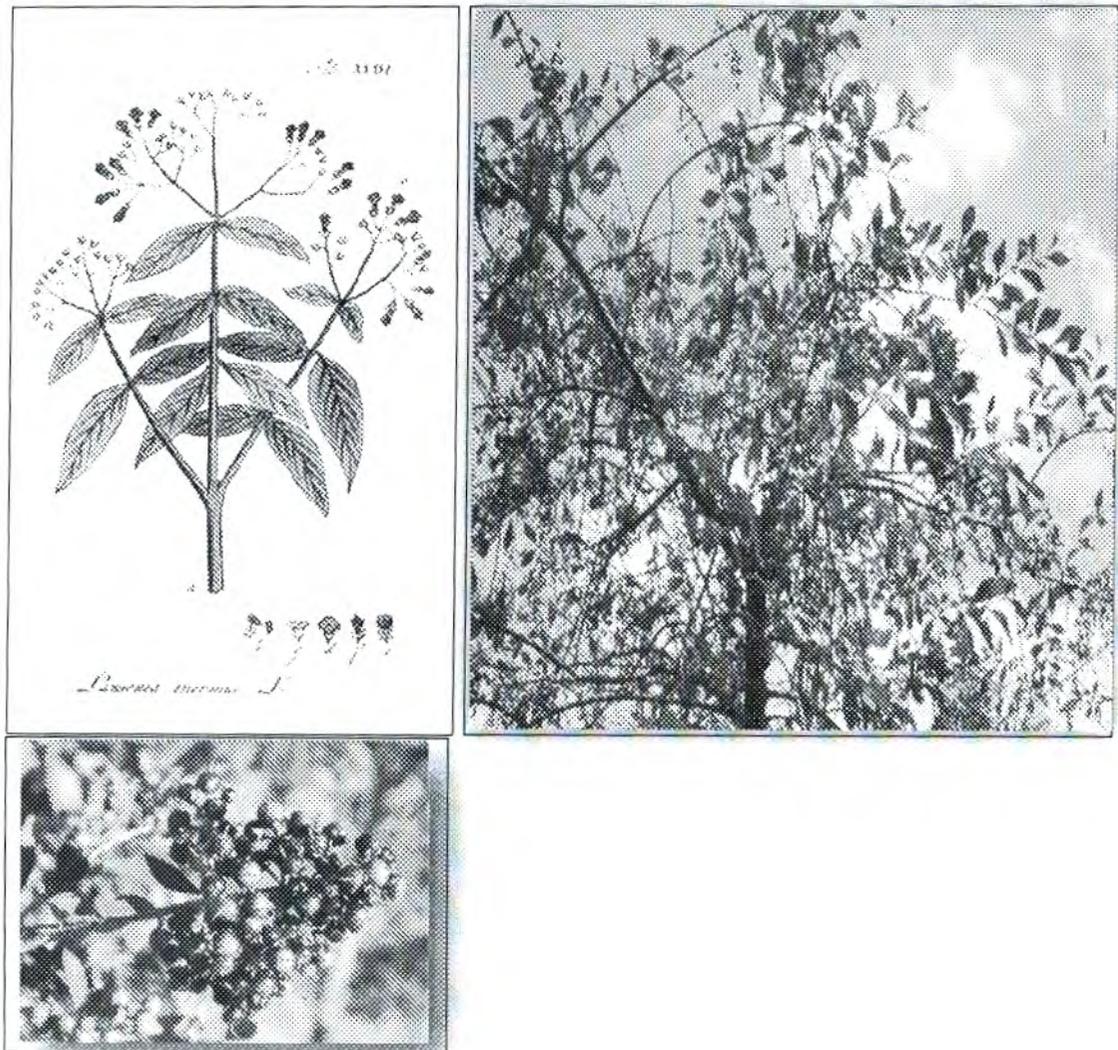
Forme de tatouage varié et éphémère, le rituel du henné se présente comme un phénomène à la fois esthétique, médicinal et spirituel (**Gallo et al., 2008**). Depuis l'antiquité, les femmes s'y adonnent en Afrique du Nord au moyen Orient et en Inde. Elles l'adoptent comme moyen de fascination et d'embellissement, "Celui-ci représente un symbole d'amour, de joie et de bonheur"( **Oliveres-Ghouti, 2006**).

Le henné est une plante de renommée, connue non seulement comme agent ayant des propriétés cosmétiques pour teindre les cheveux, la peau, les ongles etc... mais également comme un agent efficace ayant des propriétés médicinales intéressantes (**Malekzadeh., 1968 ; Sharma, 1990 ; Gupta et al., 1992**).

Connu communément sous le nom vernaculaire d'EL Hanna, d'alkanna ou de réséda (Ben M'Rad *et al*, 2004), le henné est en réalité la préparation obtenue à partir de la plante qui porte le nom scientifique de *Lawsonia inermis* Linn (Ernst, 2000 ; Joy *et al*, 2001).

C'est un arbuste qui appartient à la famille des Lythracées et qui porte plusieurs noms scientifiques : *Lawsonia alba*, *Lawsonia spinosa*, *Ligustrum egypticum* (Wichtl, 1999 ; Dweck, 2002 ; Botros *et al*., 2004) (fig.02). La plante doit son nom scientifique au botaniste Suédois Carl Linnaeus, qui lui donna le nom de son assistant, l'Écossais physicien, Isaac Lawson. Inermis, est un mot latin qui signifie non armé (unarmed : sans défense) (Kazandjieva *et al*, 2007).

L'agent bioactif responsable des propriétés colorantes de la plante est un dérivé naphtoquinonique nommé la **Lawsonie** ou 2-Hydroxy-1,4-naphtoquinone (Rostkowska *et al*, 1998) qui fut isolé et identifié pour la première fois par Tommasi (Badri et Burkinshaw, 1993).



**Figure 02.** Photo des différentes parties de la plante *L.inermis*

## I.2. Classification botanique : (Roques, 1960 ; Joy, 2001)

*L.inermis* est la plante la plus connue de la famille des Lythracées. Cette famille est connue pour sa possession d'un potentiel colorant important.

En botanique, la plante *L.inermis* est classée comme suit:

|                 |                           |
|-----------------|---------------------------|
| Règne           | : Plantae                 |
| Embranchement   | : Phanerogames            |
| S/embranchement | : Angiospermes            |
| Division        | : Magnoliophyta           |
| Classe          | : Magnoliopsida           |
| Ordre           | : Myrtales                |
| Famille         | : Lythraceae              |
| Genre           | : Lawsonia                |
| Espèce          | : <i>L.inermis</i> L.     |
| Nom binomiale   | : <i>Lawsonia inermis</i> |

## I.3. Description morphologique

La plante *L.inermis* est un arbuste gracieux de 2 à 6 m de hauteur qui possède une écorce blanchâtre. Les feuilles desséchées sont légèrement froissées, de 2 à 4 cm de longueur, glabres, entières, à nervures pennées. Les 4 ou 5 nervures secondaires se rejoignent à l'extrémité en arcs successifs à une faible distance du bord. Le limbe est ovale, lancéolé, terminé par une petite pointe, à bord révoilé à la face inférieure. Les jeunes branches inermes, non épineuses sur les arbres âgés portent des feuilles opposées à pétiole court. (Wichtl, 1999).

Les feuilles sont odoriférantes de saveurs non caractéristiques, un peu astringentes et amères tandis que les fleurs sont odoriférantes de couleur blanche ou rose pâle, d'odeur suave de rose disposées en grandes panicules (Paul, 2001).

Les fleurs sont de type 4 et comprennent : 4 sépales, 4 pétales, 8 étamines, 4 carpelles soudés en un ovaire à 4 loges pluriovulées. Le fruit est petit, capsulaire, globuleux, rougeâtre, renfermant plusieurs graines anguleuses dans chaque loge (Roques, 1960 ; Crété, 1965; Merad., 1973).

## **1.4. Origine et répartition géographique**

La zone géographique d'où est originaire le henné est la savane tropicale et les zones arides tropicales (**Malekzadeh, 1968**). En général, cette plante est cultivée dans les latitudes entre 15° et 25° N et S de l'Afrique à la bande pacifique occidentale. Elle supporte bien le climat subtropical. Originaires d'Inde occidentale, la plante *L.inermis* s'est répandue aussi bien vers l'Ouest que vers l'Est au point qu'on la trouve maintenant cultivée dans la plupart des régions tropicales et subtropicales du monde (**Wikipédia, 2008**).

En Asie, *L.inermis* est cultivée dans tout le Proche Orient, Iran, Perse, l'Inde occidentale et en Chine. En Afrique, elle est cultivée dans le Maghreb, le Sénégal, le Mali et le Soudan (**Lekouch et al., 2001**).

La plante ne grandit pas lorsque les températures minimales sont inférieures à 11°C. La molécule responsable des propriétés colorantes de la plante, la Lawsone est produite à son haut niveau là où la température est entre 35°C et 45°C. Ses feuilles sont récoltées au cours de la saison du printemps (**Badri et Burkinshaw, 1993 ; Paul, 2001**).

## **1.5. Noms vernaculaires de henné**

Il existe sous le nom vernaculaire de henné trois plantes différentes, qui n'appartiennent pas à la même famille botanique. Le henné naturel est différent du henné neutre lequel est encore différent du henné noir. On différencie donc :

❖ *Le henné naturel* est le henné "renforcé": son nom botanique est *Lawsonia inermis*, de la famille des Lythracées (**Joy, 2001**).

❖ *Le henné neutre*: *Cassia obovata*, proche de la casse du Sénégal, fait partie de la famille des crucifères. Celle-ci n'a pas de pouvoir teignant mais elle aide à purifier le cuir chevelu (sébum, pellicules, démangeaisons), rend les cheveux brillants et les fortifie (**Forestier, 1981**).

❖ *Le henné noir* : *Indigofera tinctorium*, de la famille des Papillonacées, connu sous le nom d'indigotier, pour la teinture bleue extraite de ses feuilles (**Laval, 2008**).

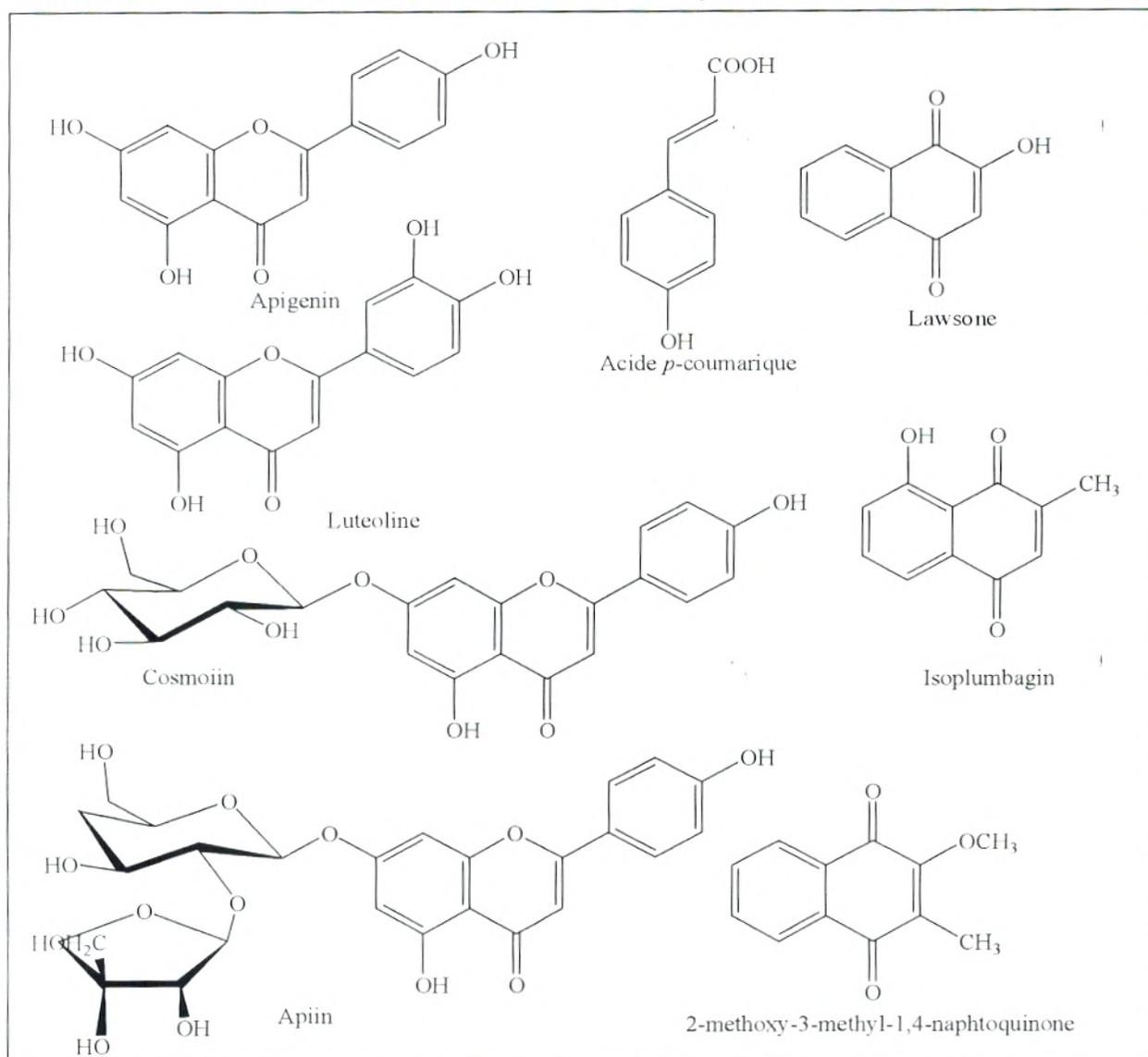
## **1.6. La composition chimique de *L.inermis***

Les composants responsables des propriétés colorantes dans la plante *L.inermis* appartiennent à la famille des quinones (**Shivananda Nayak et al., 2007**). Les principaux composants sont de type 1,4-naphtoquinone, représentés principalement par la 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone appelé couramment la Lawsone (**Wichtl, 1999**).

### 1.6.1. Les feuilles

La Lawsone existe dans les feuilles de *L.inermis* à des proportions variant entre 0,4 à 1,5% de matière sèche. Cette molécule est libérée après hydrolyse des hétérosides précurseurs. (Talaat et Hanke, 1961 ; Wichtl, 1999 ; Kirkland et Marzin, 2003 ; McMillan *et al.*, 2004).

Les analyses phytochimiques des feuilles de *L.inermis* ont mis en évidence en plus de la Lawsone la présence d'autres constituants chimiques (fig.03): les dérivés hydroxylés du naphthalène (1,2-dihydroxy-4-glucosyloxy-naphtalène), l'Isoplumbagin (2-méthyl-8-hydroxy-1,4-naphthoquinone), le luteoline et ces 7-O-glucoside, acacetin-7-O-glucoside, des petites quantités de stérols (beta-sitosterolglucoside), les xanthones, le glucose, le mannitol, la résine et le mucilage (Gupta *et al.*, 1993 ; Ahmed *et al.*, 2000 ; Dasgupta *et al.*, 2003 ; Botros *et al.*, 2004 ; SCCP., 2005 ; Khare, 2007 ; Shivananda Nayak *et al.*, 2007).



**Figure 03.** Les différents composants isolés des feuilles de *L.inermis* (Botros *et al.*, 2004)

En plus, il a été montré que les feuilles de la plante sont riches en composés phénoliques à un taux de **11,07** mg équivalent d'acide gallique/g de matière sèche (**Saadaoui et al., 2004**). D'autres études montrèrent la présence des flavonoïdes (**Gupta et al., 1992**), des coumarines (**SCCP., 2005**) principalement la 7,7-diacétoxycoumarine (**Bhardwaj et al., 1976**) et des tanins (5 à 10 %) principalement l'acide gallique (**Cowan, 1999 ; Wichtl, 1999**).

Dans une étude récente, les analyses par GC et GC/MS de l'huile essentielle des feuilles de *L.inermis* d'origine nigériane ont permis d'identifier trente-six éléments qui constituent 80,4% de l'huile. Les principaux composants sont : l'hexadécanoate d'éthyle (24,4%), le (E) méthyle cinnamate (11,4%), l'isocaryophyllène (8,1%), le (E)- $\beta$ -ionone (5,8%) et le méthyle linolenate (4,1%) (**Oyedeji et al, 2005**). Une autre étude a montré la présence de la cinéole (58,6%), l' $\alpha$ -pinène (18.2 %) et du p-cymène (14.7%)(**Ogunbinu et al, 2007**).

Il a été rapporté que l'extrait chloroformique des feuilles de la plante contient la Lawsone, la 2-methoxy-3-methyl-1,4-naphthoquinone, l'apigenin, le luteolin, et le cosmosiin, alors que l'extrait d'acétate d'éthyle contient l'acide para-coumarique et l'apiin (**Botros et al., 2004**).

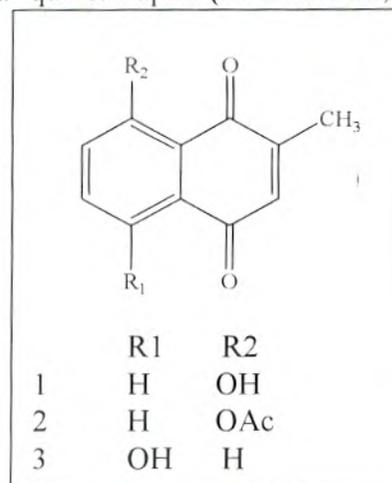
### 1.6.2. Les tiges

Les tiges de la plante renferment différentes substances complexes. Il a été rapporté que l'écorce de la plante contient des dérivés naphthoquinoniques (fig.04) tels que : la 2-méthyl-8-hydroxy- 1,4-naphthoquinone (**Gupta, 1993**).

En plus, deux triterpènes pentacycliques ont été isolés à partir de l'écorce et identifiés comme étant le 3 $\beta$ ,30-dihydroxylup-20(29)-ène (hennadiol) et le (20*S*) 3 $\beta$ ,30-dihydroxylupane (**Chakrabartty et al., 1982**).

### 1.6.3. Les fleurs (fig.05)

La fleur de la plante s'est avérée contenir certains métabolites secondaires tels que le (Z)-2-hexenol, linalol et la  $\beta$ - ionone et ses dérivés (**Wong et Teng, 1995 ; Oyedeji et al, 2005**).



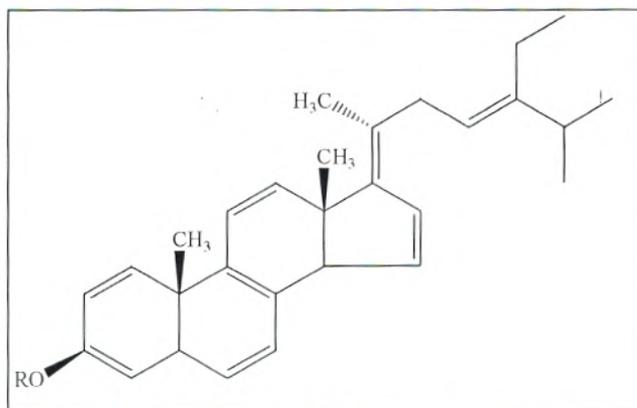
**Figure 04.** Napthoquinones isolés à partir des tiges de *L.inermis*



**Figure 05.** La fleur de la plante *L.inermis*

### I.6.4. les racines

Des études phytochimiques basées sur des analyses spectrales et des réactions chimiques effectuées sur les racines de la plante *L.inermis* ont permis de mettre en évidence un stérol. Ce dernier, nommé lawsaritol, fut isolé à partir de l'extrait alcoolique. Sa structure (fig.06) est :



**Figure 06.** Lawsaritol isolé à partir des racines de *L.inermis*

24 $\beta$ -éthylcholestest-4-en-3 $\beta$ -ol (Gupta *et al.*, 1992).

## I.7. Propriétés biologiques de *L.inermis*

D'origine très ancienne, *L.inermis* est aujourd'hui associée aux populations indiennes et maghrébines. Historiquement, nos ancêtres utilisaient ses feuilles surtout comme une teinture traditionnelle pour les cheveux, la peau et les ongles (Kirkland et Marzin, 2004).

### I.7.1. Usages de *L.inermis* en cosmétique

Le henné a été de tout temps le cosmétique le plus employé. Son utilisation remonte à des millénaires (plus de 4000 ans) par les hébreux, les assyriens, les chinois, les perses, les musulmans ...etc (Kirkland et Marzin, 2003 ; Nohynek *et al.*, 2004).

Les hébreux ont été les premiers à avoir utilisé le Henné comme produit de beauté. Les égyptiens, eux aussi, ont eu recours pour la momification. Les cheveux de Ramsès ont été passés au Henné 1 300 ans avant Jésus Christ pour les protéger contre les aléas du temps et garder leur sacralité religieuse. En plus, le henné fut utilisé durant cette époque pour teindre les momies et réaliser des peintures corporelles. Dans le rif Egyptien, le henné obéit à un code très secret. L'Afrique et le Maghreb ont découvert le Henné et ses vertus bien après (Bentley et Eganathan, 1982 ; Nohynek *et al.*, 2004).

En suite, des textes assyriens du VII<sup>ème</sup> siècle avant J.C décrivent les préparatifs du mariage précisant que la jeune fille avait les paumes et les ongles teints au henné (Kazandjieva *et al.*, 2007).

Les propriétés colorantes du henné ont été utilisées dès les premiers temps de l'islam, il fut recommandé par le prophète Mohamed (paix et prière sur lui) qui l'utilisait pour colorer sa barbe (**Forestier et al., 1982 ; Demello, 2007**), ce qui a donné à l'utilisation du henné un aspect religieux. Depuis lors, le henné servait à composer une préparation destinée à teindre la paume des mains, les ongles, les doigts, les pieds, les cheveux et le corps particulièrement lors de festivités (**Paul, 2001**).

Le henné a été largement introduit en Europe à partir de 1890. De nos jours il est utilisé partout dans le monde et il est même utilisé même dans l'industrie comme ingrédient dans beaucoup de colorants capillaires et de produits de préconisés pour les cheveux fins et dévitalisés (**Sauriasari et al., 2007**).

Ainsi, dernièrement apparait l'utilisation du henné dans les tatouages provisoires qui sont devenus très populaires chez les populations occidentales (**Matulich et Sullivan, 2005**). Popularité due surtout aux adolescents attirés par ces tatouages très "mode" et qui considèrent les tatouages comme des agents attrayants et embellisseurs (**Oliveres-Ghouti, 2006**).

L'utilisation des fleurs de henné pour produire un parfum de qualité peut être dans quelques secteurs bien plus communs que l'utilisation de la feuille en tant que colorant (**Kazandjieva et al., 2007**). Ainsi, actuellement, le henné est utilisé comme ingrédient dans certains produits de shampoings (**Ernst, 2000**).

Le pouvoir colorant du henné n'est pas directement lié à son application, il se développe au cours de la fermentation obtenue en mélangeant la poudre (tige + feuilles) avec de l'eau tiède et mis en contact avec des matières contenant de la kératine telles la peau, la soie ou la laine. Selon que l'on veuille utiliser le henné pour les cheveux ou pour les mains, on ajoutera une faible quantité d'eau jusqu'à l'obtention d'une consistance qui soit pâteuse ou crémeuse introduite alors dans une seringue ou une douille (**Nils et al., 2005 ; Laval, 2008**).

Dans une étude réalisée sur des extraits de cheveux traités au henné (feuille de *L.inermis*), il a été prouvé que la Lawsone constitue le seul colorant du henné capable de s'attacher aux cheveux (**Forestier, 2007**).

### **I.7.2. Effets thérapeutiques de *L.inermis***

Historiquement, les propriétés médicinales de la plante ont été connues et appliquées pendant longtemps. Ces vertus médicinales merveilleuses sont aujourd'hui incontestables (**Badri et Burkinshaw, 1993**).

A travers les différentes civilisations et durant des siècles, *L.inermis* a été préconisée pour des affections aussi variées qu'astringentes, antihémorragiques, antifongiques, antibactériennes, sédatives, hypotensives, anti-amibiases et comme traitement de l'ictère et de la lèpre (**Shivananda Nayak et al., 2007**).

Selon certaines citations du prophète Mohamed (paix et prière sur lui), des préparations à base de henné étaient recommandées pour divers maux (migraine, ulcère). A partir du 14<sup>ème</sup> siècle, l'imam Ibn elkaim Eljawzia recommandait le henné sous forme de cataplasme pour cicatriser les blessures et pour calmer les douleurs (**Al-Jawziyya, 1998**).

Au cours de son usage en cosmétologie, l'application du henné permettait de protéger la peau contre plusieurs affections (**Talaat et Hanke, 1961 ; Jain, 1973**). Ceci à fait l'objet de plusieurs recherches récentes pour l'évaluation de son activité biologique. Ainsi, plusieurs chercheurs ont démontré que l'extrait éthanolique de la plante entière de *L.inermis* présentait une activité antibactérienne (**Malekzadeh, 1968 ; Bakkali1 et al., 1997**) et antifongique (**Tripathi et al, 1978 ; Kandil et al, 1996 ; Ahmed et al., 2000**).

Certains tests biologiques ont permis d'évaluer différentes activités biologiques telles que l'activité antihelminthique (nématodes tels que l'ascaride lombricoïde), antiprotozoaire (contre la maladie de sommeil), antispasmodique (**Bakkali1 et al., 1997**) et même des propriétés antituberculeuses (**Sharma, 1990**).

D'autres tests révèlent que l'extrait de la plante *L.inermis* sert par voie externe comme antiparasitaire, antiseptique, antimycotique, contre la gale et comme traitement de l'abcès (**Ali et al, 1995 ; Yogisha et al., 2002**). Par contre, l'utilisation interne de l'extrait de la plante sert contre la dysenterie amibienne, les ulcères gastro-intestinaux et comme anti-diarrhéique (**Wichtl, 1999**).

Les propriétés antimicrobiennes de cette plante ont retenu notre attention particulièrement lorsqu'elles entrent dans l'axe de recherche de notre équipe qui s'intéresse à l'étude de l'activité antibiotique et antifongique des produits naturels et de synthèse. Et sous cette base, nous avons essayé de synthétiser des analogues de la Lawsone, la molécule bioactive de *L.inermis* dont on lui attribue plusieurs propriétés thérapeutiques.

En plus de l'activité antimicrobienne, la décoction de l'écorce et des feuilles de la plante possède des propriétés anesthésique, analgésique, anti hémorragique, anti-inflammatoire et inhibitrices de certaines enzymes peptiques (**Ali et al., 1995 ; Ahmed et al., 2000 ; Yogisha et al., 2002**). Certains auteurs attribuent l'activité anti-inflammatoire principalement au composé : la 5-hydroxy-2-méthyl-1,4 naphthoquinone (fig.04) (**Gupta et al., 1992**), alors que d'autres auteurs l'attribuent à la Lawsone (**Ali et al., 1995**). **Khare, 2007** rapporte que l'écorce de la tige et les racines possèdent une activité anti-inflammatoire qui est due la présence de l'isoplumbagin et le lawsaritol.

Les extraits de la plante et de ses composés purifiés ont fait l'objet de plusieurs tests d'évaluation de leurs activités biologiques (**Handa et al., 1997**). Dans une étude récente, il a été révélé que l'extrait brut et éthanolique des feuilles de *L.inermis* montrent à dose dépendante un effet analgésique, antipyrétique et anti inflammatoire chez les rats (**Bhuvanewari et al., 2002**). Il a été rapporté que l'extrait éthanol-eau (1: 1) de l'écorce de tige montre une activité hépatoprotective vis-à-vis d'une toxicité provoquée par le CCl<sub>4</sub> (**Ahmed et al., 2000 ; Khare, 2007**).

Dans une recherche récente faite par **Syamsudin et al., 2008**, l'extrait éthanol-eau (70 :30) des feuilles de la plante *L.inermis* révèle une activité hypoglycémique (**Gbolade, 2009**) et hypolipidémique, après une administration orale chez des rats diabétiques.

En plus, il a été rapporté que les feuilles de *L.inermis* exhibent une activité antioxydante comparable à celle de l'acide ascorbique (**Botros et al., 2004**).

Vis à vis de la chevelure, il a été montré que la plante *L.inermis* a une action inhibitrice des teignes tondantes et on considère qu'elle stimule la croissance des cheveux et les rend moins cassants (**Forestier et al., 1982**).

### **I.7.3. Autres usages**

En artisanat, *L.inermis* était utilisée pour l'apprêt des peaux fines destinées à la maroquinerie de luxe et pour la teinture de la laine et de la soie, après addition d'alun, de tartre et de sulfate de fer (**Badri et Burkinshaw, 1993**). D'autres applications apparaissent dans certaines régions de l'Afrique du Nord et du sud-ouest d'Asie où le henné est largement cultivé comme plante ornementale de haie et colorante (**Siddiqui et Kardar, 2001**).

### **I.7.4. Effets secondaires**

L'usage du henné pour prévenir ou embellir peut être à l'origine, dans certains cas, de l'apparition de certaines pathologies telles que l'anémie hémolytique due à une déficience de la glucose-6-phosphate déshydrogénase, ainsi que de nécrose tubulaire rénale chez les animaux (**Kök et al, 2004**). Cette anémie conduit dans certaines situations à une hyperbilirubinémie néonatale inexplicée (**El-Shaer et al., 2007**).

Certains cas isolés de réactions allergiques de type immédiat ont été signalés lors de l'utilisation de teinture de la préparation de henné mélangé avec d'autres composants à base de paraphenylenediamine (PPD) (**Frosch et Hausen, 1986**). Lorsque le PPD pénètre dans la peau, via le tatouage, il se fixe sur les cellules cutanées. Et c'est finalement cette fixation qui est à l'origine des réactions allergiques causées par les préparations du henné. En revanche, la poudre de henné pur sans additif ne donnait pas de réactions, infirmant la sensibilisation à *L.inermis* (**Le Coz, 2001**).

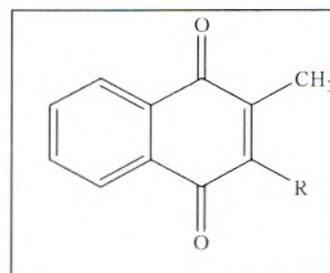
## II.2. Généralités sur les quinones et les naphtoquinones

Les composés chimiques ayant la structure quinonique sont des composés largement répandus dans la nature. Ce sont des composés connus pour leurs diverses activités biologiques jouant ainsi des rôles importants dans la nature (Vaysse, 1990). Les quinones constituent un groupe d'environ 400 colorants allant du jaune, rouge, brun et au noir qui se retrouvent chez les micro-organismes, les algues, les lichens, les champignons supérieurs, les plantes et même chez quelques insectes (Otten et Rosazzag, 1983 ; Velíšek et al., 2007).

L'exemple le plus représentatif dans la famille des quinones est le coenzyme Q représenté par l'ubiquinone. Ce coenzyme joue un rôle important chez les animaux, les plantes et les micro-organismes par sa faculté à transporter les électrons. Beaucoup de quinones naturelles sont sous forme d'oligomères constitués de deux ou plusieurs noyaux (Paul et al., 1984).

Pigments jaunes ou orangés essentiellement chez les végétaux, les naphtoquinones font partie des quinones caractéristiques de certaines familles d'Angiospermes. Ce sont toujours des 1,4-naphtoquinones, très rarement des 1,2-naphtoquinones. Les substituants les plus fréquents sont des hydroxyles et des méthyles, en 2 et/ou sur le noyau aromatique (Bruton, 1993).

L'exemple le plus significatif de la famille des naphtoquinones est la vitamine K (fig.08), connue pour ses propriétés antihémorragiques. Cette famille de composés à déjà fait l'objet de travaux d'évaluation de leur activité antimicrobienne.



**Figure 08.** Structure de la vitamine K

Quelques structures ont révélé des activités antimicrobiennes et sont employées commercialement comme des agents antimicrobiens tels que *L'atovaquone*, (Wellvone) un médicament du groupe des hydroxy-naphtoquinones connu par son efficacité sur la toxoplasmose, la famille des *Ansamycins* (Bryskier, 1999), la *frenolicin*, la Marinone et la debromomarinone (Zhang et Arnold, 2005).

Les naphoquinones forment une sous classe des composés phénoliques capables d'exercer leur effet antimicrobien par divers mécanismes: la liaison aux adhésines, la complexification avec la paroi cellulaire, inactivation des enzymes ... etc (Cowan, 1999).

Selon Do Campo *et al.*, 1978 et Ferreira *et al.*, 2006, les naphthoquinones montrent une activité antiprotozoaire par la génération de radicaux de l'oxygène actif, ce qui cause une peroxydation des lipides et donc le changement du transport d'électrons avec l'inhibition de la respiration cellulaire.

### **II.3. Caractéristiques de la Lawsone (SCCNFP, 2004)**

No. CAS 83.72.7 (Forestier *et al.*, 1982)

#### **II.3.1. Synonyme**

2-hydroxy-1,4-naphthoquinone  
1,4-naphthalenedione, 2-hydroxy-  
1,4-naphthoquinone, 2-hydroxy-  
2-hydroxy-1,4-naphthalenedione  
2-hydroxynaphthoquinone  
CI Natural Orange 6

#### **II.3.2. Formule empirique**

Formule empirique :  $C_{10}H_6O_3$

Poids moléculaire : 174.16 g/ mol

#### **II.3.3. Propriétés physique**

Apparence : poudre de couleur Jaune –moutarde

Point de fusion : 194.5°C

#### **II.3.3. Solubilité**

Insoluble dans l'eau à 0.2%

Soluble dans l'éthanol 95% à 0.5%

Soluble dans le méthanol à 1% (50°C)

Soluble dans l'éthylène glycol à 5% (80°C)

Soluble dans le diméthyl formamide à 5%

### II.3. Biosynthèse de la Lawsone

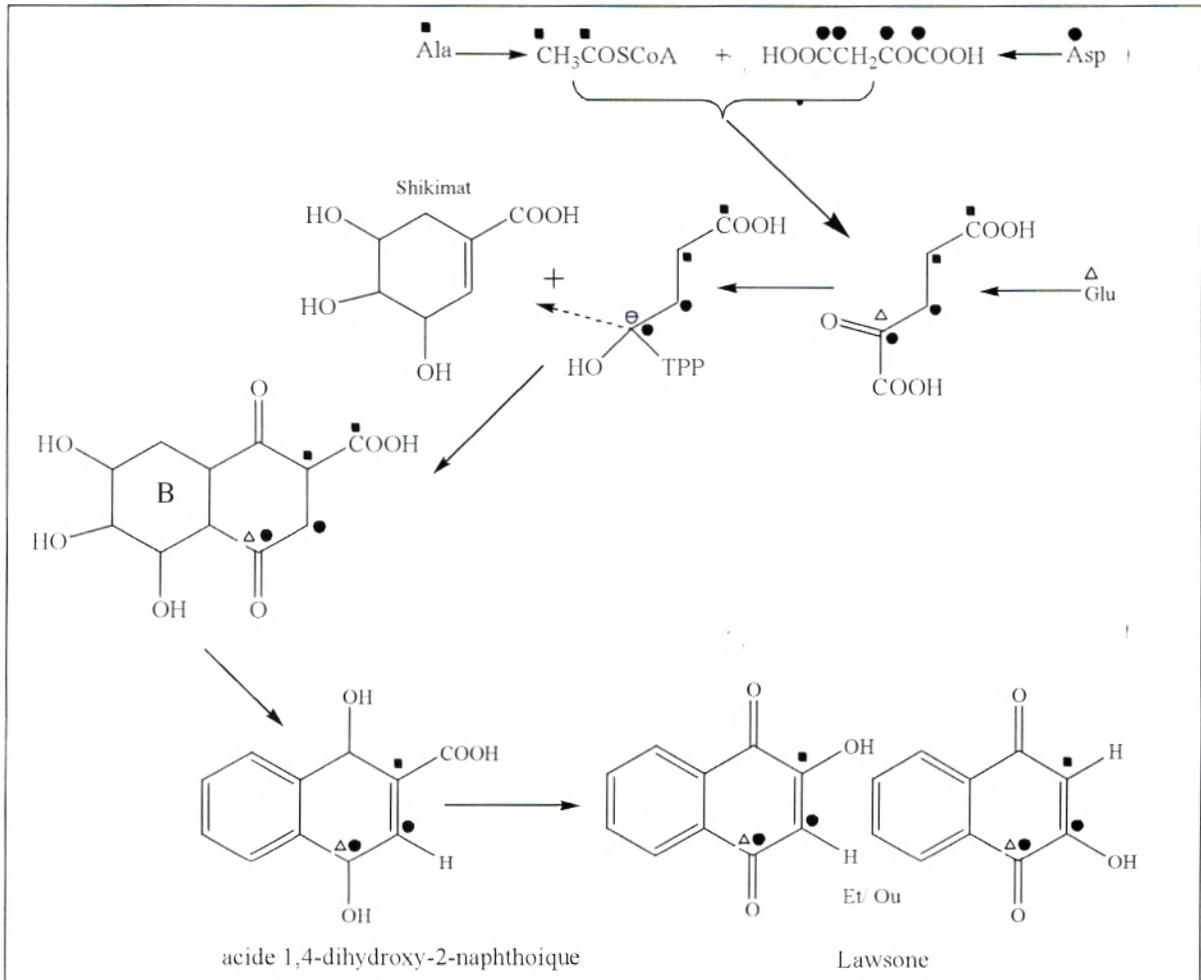
La présence de la Lawsone a été mise en évidence dans plusieurs plantes telles que *Lawsonia inermis*, *Ammannia baccifera* Linn (Khare, 2007), *Juglans regia* (Grotzinger et Campbell, 1974), *Impatiens gladiolifera*, *Impatiens parviflora* (Babula et al., 2006) *Lomatia ferruginea* (Mehendale et Thomson, 1975) et dans *Impatiens noli-tangere* L (Hatcher, 2003). Au niveau de la plante *L.inermis* la Lawsone s'accumule dans la partie aérienne (Bakkali, 1999).

Les différentes études quant à l'extraction et la mise en évidence de la Lawsone ont permis de proposer un modèle de sa biosynthèse. Ce modèle a pu être généralisé pour la biosynthèse des systèmes à noyaux naphthoquinonique comme celui de la vitamine K (Grotzinger et Campbell, 1972).

Les résultats issus d'un effort de plusieurs recherches sur l'origine des naphthoquinones ont montré que l'acide D-shikimique constitue le précurseur direct de la partie aromatique du noyau naphthoquinone et des trois atomes non carboxyliques du glutamate (Campbell, 1969 ; Dansette et Azerad, 1970 ; Robins et al., 1970 ; Campbell et al., 1971).

Le dérivé 4-(2'-carboxyphenyl)-4-oxobutyrate (schéma 09) s'est avéré un intermédiaire important dans la voie de biosynthèse du noyau naphthoquinone de la Lawsone (Grotzinger et Campbell, 1972). Ainsi, une tendance fiable à des propositions originales sur l'étape initiale de la construction de cycle B du noyau est la condensation du shikimate avec le complexe thiamine pyrophosphate du semialdéhyde succinyl (Guérin et al., 1970). Cet anion pourrait être formé par la première enzyme du complexe kétoglutarate désydrégénase du cycle de Krebs.

La biosynthèse de la Lawsone dans *L.inermis* et de son isomère de position la juglone (5-hydroxynaphtho-1,4-quinone retrouvé principalement chez *Juglans regia*) s'effectue par l'intermédiaire de l'acide 1,4-dihydroxy-2-naphthoic, vraisemblablement par une séquence oxydative dans laquelle l'hydroxyle remplace la fonction carboxylique (Schéma 09) (Grotzinger et Campbell, 1974 ; Velisek et al., 2007).



**Schéma 09.** Biosynthèse de la lawsone dans la plante *Impatiens balsamina* (Grotzinger et Campbell, 1972).

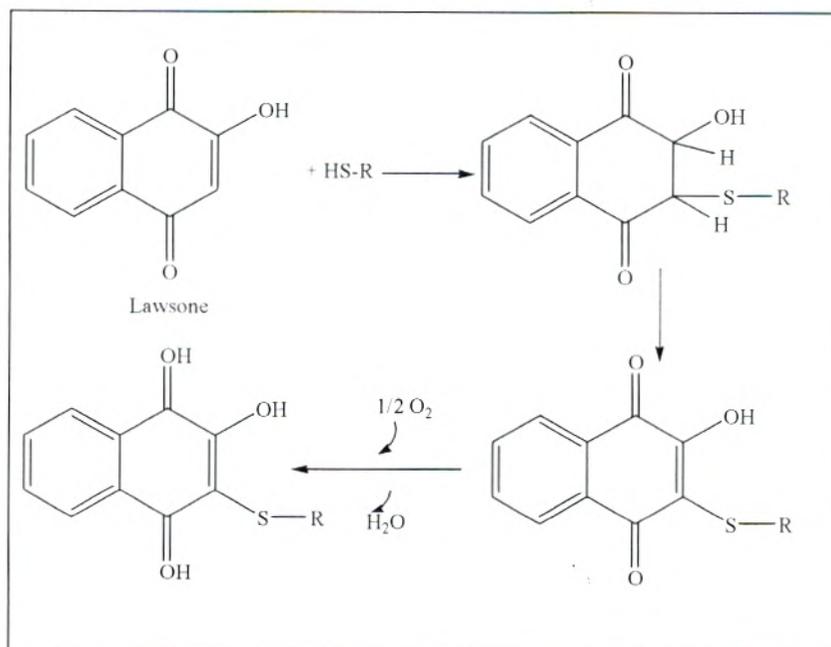
## II.5. Propriétés biologiques de la Lawsone

### II.5.1. Propriétés cosmétiques

La Lawsone est une molécule qui est employée comme un agent antioxydant de coloration des cheveux, teignant à une concentration maximum de 1.5% dans le produit cosmétique fini (SCCNFP, 2004).

Elle est utilisée pour teindre, du brun-orangé au rouge-cuivre les ongles, les cheveux, la paume des mains, la plante des pieds et même la barbe des hommes. Cependant, contrairement à d'autres colorants tels que les colorants métalliques qui forment un enduit, la liaison de la Lawsone à la protéine, la kératine (c.-à-d., peau, cheveux, ongles, etc...) permet de donner la couleur et ceci dans des solutions acides (Dweck, 2002). Cette fixation se réalise selon un mécanisme qui suggère qu'il y a principalement création d'une liaison entre le carbone 3 de la Lawsone et les fonctions libres -SH ou -NH<sub>2</sub> de la kératine (Jelly *et al.*, 2008).

Après une réaction d'addition la forme quinonique est retrouvée par oxydation spontanée par l'oxygène de l'air (schéma10). Cette hypothèse s'appuie sur plusieurs travaux, notamment ceux de Fieser sur la fixation de la cystéine sur la 2-méthyl-1,4-naphtoquinone (Forestier *et al.*, 1982 ; Wichtl, 1999).



**Schéma 10.** Hypothèse concernant la fixation de la lawsone sur la kératine (Forestier *et al.*, 1982)

## II.5.2. Propriétés thérapeutiques

Les propriétés thérapeutiques des naphtoquinones ainsi que celle de la Lawsone ont fait l'objet de plusieurs recherches d'évaluation de leurs activités biologiques. Plusieurs données expérimentales ont permis de mettre en évidence pour la Lawsone certaines propriétés biologiques tels que l'activité antibactérienne, antifongique et antispasmodique (Hoffmann *et al.*, 1947 ; Fahim et Hossein, 1954 ; Bakkali *et al.*, 1997 ; Shaukat *et al.*, 2008).

Dans une étude réalisée par Ali *et al.*, 1995, la Lawsone extrait à partir de henné a montré *in vivo* une activité anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique chez les rats. En plus, il a été prouvé cliniquement que la Lawsone et certains de ses dérivés présentent des propriétés thérapeutiques contre la toxoplasmose cérébrale des enfants et adultes infectés par le virus du HIV. Ils ont aussi vérifié que la Lawsone peut agir comme étant un inhibiteur de la respiration pour certaines cellules tumorales (Morello *et al.*, 1995). En plus, certains auteurs rapportent que la Lawsone possède des propriétés contraceptives féminines intéressantes (Rostkowska *et al.*, 1998).

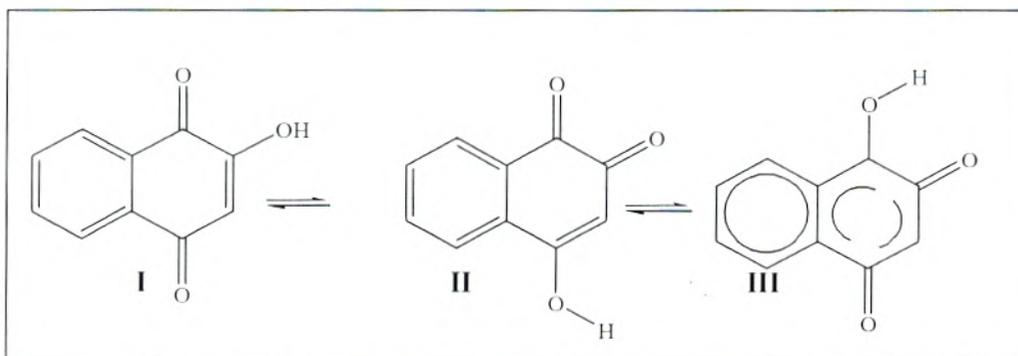
L'absorption de la Lawsone par la peau a fait l'objet d'une étude par le bureau des Sciences pharmaceutiques de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO). Cette étude a prouvé que la Lawsone contenue dans le henné se diffuse dans la peau selon la concentration du henné utilisé et son temps d'application. Il a été montré aussi qu'une dose trop importante de la Lawsone absorbée par la peau est à l'origine de dommages plus ou moins sévères (Kraling *et al.*, 2007 ; Jallad et Espada-Jallad, 2008).

### II.5.3. Propriétés chimiques

La structure naphthoquinonique confère à la Lawsone un potentiel important dans l'absorption des rayons ultraviolets UVB naturels (280-315 nm). Par cette propriété et celle de se fixer aux kératines, la Lawsone est utilisée comme ingrédient dans certains produits cosmétiques. Elle sert dans ces produits comme un filtre dans les formulations d'écran contre les rayons solaires protégeant ainsi la peau et la chevelure des rayonnements ultraviolets (Yan *et al.*, 2000 ; Forestier, 2007 ; Shaukat *et al.*, 2008 ).

En plus, la Lawsone a fait l'objet d'étude sur les bioréacteurs biochimiques. A travers son potentiel redox médiateur important, il a été démontré que la Lawsone représente un bon médiateur dans la génération de l'énergie électrique à partir des bioréacteurs biochimiques (Katz *et al.*, 2003).

La molécule neutre de l'HNQ peut potentiellement adopter trois formes tautomériques différentes (schéma 11). Ainsi, la forme I est la plus stable des trois isomères. Cette stabilité résulte de la liaison intramoléculaire d'hydrogène de la forme isomère I (Rostkowska *et al.*, 1998).



**Schéma 11.** Formes tautomériques de la HNQ (Rostkowska *et al.*, 1998)

## II.6. Toxicité de la Lawsone

De nos jours, l'augmentation de l'usage de la poudre du henné pour différentes applications (colorants, tatouages, shampoing) a fait que les chercheurs se sont intéressés à étudier la toxicité de son principal composant bioactif, la Lawsone et la sécurité de son utilisation dans le domaine industriel (**El-Shaer et al., 2007**).

Les naphthoquinones sont des molécules bioactives largement distribuées dans la nature. Dans une étude réalisée par Munday, il a été rapporté que la Lawsone et ses dérivés alkylés sont à l'origine dans certaines situations d'une anémie hémolytique oxydative, des nécroses tubulaires rénales chez les rats (**Munday et al., 1991**) également observées chez des enfants ayant utilisé la HNQ (**Devecioglu et al., 2001**). Certains auteurs rapportent que la toxicité des dérivés naphthoquinones est due à la présence de deux espèces d'oxygène et qu'elle est produite à travers le cycle redox (**Munday et al., 2007**).

En présence d'oxygène, l'auto-oxydation des naphthoquinones produit un radical anion superoxydé. Les conditions du stress oxydatif favorisent la formation de ce cycle redox quinonique, ceci provoque la déstabilisation des lysosomes, la libération de la cathepsine D et la diminution du potentiel membranaire mitochondrial (**Öllinger et Brunk, 1995 ; Bolton et al., 2000**). En outre, la capacité de produire des radicaux libres est influencée par la nature et par la position des substituants dans la molécule de quinone (**Costa Medina et al., 2008**).

Les membranes cellulaires sont souvent perméables aux naphthoquinones, qui une fois présentes dans la cellule forment des complexes avec l'ADN conduisant à des sites "abasic" et à la formation de simple ou double brin inactif (**Öllinger et Brunmark, 1991 ; Lin et al., 2005**). Les naphthoquinones peuvent également réagir avec les protéines et les lipides menant ainsi à la destruction de leur fonctionnalité et à la mort cellulaire (**Buffiton et al., 1989**).

Le SCCNFP (The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers) a évalué les résultats de plusieurs études sur l'HNQ et a conclu que cette substance n'était pas appropriée pour l'usage comme agent de coloration pour les cheveux. Les données disponibles soutiennent la conclusion que la Lawsone constitue un risque sanitaire. Le SCCNFP considère que Lawsone a le potentiel de génotoxicité /mutagenicité *in vitro* et *in vivo* et qu'aucun seuil sûr pour Lawsone ne peut être établi (**SCCNFP, 2004**).

Cette génotoxicité a été rapportée pour les souches de *salmonella typhimurium* TA98 (Stamberg *et al.*, 1979), alors que la mutagenicité a été rapportée dans l'induction d'une mutation récessive létale chez *Drosophila melanogaster* (Foureman *et al.*, 1994).

Par contre, dans un autre travail, Marzin et Kirkland conclurent que la HNQ ne provoque aucune génotoxicité chez les souris jusqu'à 72 h après administration avec deux véhicules différents et que sa clastogénicité *in vitro* n'est pas liée aux dommages oxydants. Ces résultats confirment que la HNQ peut provoquer un risque négligeable de génotoxicité particulièrement pour la teinture des cheveux (Kirkland et Marzin, 2003 ; Kirkland et Marzin, 2004).

D'une façon générale, entre le risque sanitaire et le risque négligeable les données disponibles ne nous permettent pas d'évaluer la sécurité de son utilisation. Pour cette raison tout usage devrait être vigilant pour les personnes normales et interdit pour les jeunes enfants et pour les individus qui présentent une déficience connue de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (Kazandjieva *et al.*, 2007).

Certains cas isolés de réactions allergiques de type immédiat ont été attribués à la Lawsonie lors de l'utilisation des tatouages à base de la pâte de henné. Mais à l'heure actuelle, il n'y a aucune preuve évidente que la Lawsonie cause ces réactions allergiques (Kaatz *et al.*, 2008).

Lors de cette troisième partie, nous essayerons de donner quelques généralités sur la synthèse organique ainsi que certains modes opératoires de la synthèse de quelques molécules ayant des propriétés médicinales.

### **III. Synthèse organique**

#### **III.1. Généralités**

Dans notre vie quotidienne actuelle, nous sommes tous les jours et à tout instant en contact avec les produits issus de la synthèse. Une grande majorité des matières que nous utilisons aujourd'hui sont constituées de composés organiques: les polymères, les fibres synthétiques, les colorants et les médicaments.

Au cours des cents dernières années, l'évolution de la chimie pharmaceutique a été fulgurante. Une grande partie des innovations est due à l'élaboration de procédures pour améliorer des molécules que la nature nous a livrées. Étant donné que les produits naturels actifs sont présents en quantité considérable dans les plantes, les chimistes organiciens ont tenté de les synthétiser dans le laboratoire et d'améliorer leurs activités biologiques. De nos jours, plusieurs groupes de recherche tentent de reproduire ce que la nature nous donne (**Gerhard Vogel et al, 2002**).

Les quinones sont des composés qui existent en nombre important et largement répandues dans la nature. Ce sont des composés qui n'apportent que peu de contribution à l'élaboration des couleurs naturelles comparées aux caroténoïdes et aux anthocyanes. Les quinones sont classées en trois grands groupes, les anthraquinones (le groupe le plus important), les naphthoquinones et les benzoquinones (**Vaysse, 1990**).

Ces métabolites secondaires ont fait l'objet de nombreuses recherches depuis un certain nombre d'années, en raison de leurs activités biologiques variées (Dos Santos *et al.*, 2003) dans un but de les isoler, les caractériser et les synthétiser dans le laboratoire (Spyridis, 2000). La réactivité des hydroxyquinones en général est liée à la réactivité des quinones. En outre, la partie d'*énol-énone* offre quelques possibilités synthétiques et biologiques intéressantes. Les modèles principaux de la réactivité d'hydroxyquinones sont récapitulés ci-dessous.

Les hydroxyquinones normales changent dans la complexité structurale de l'hydroxynaphtoquinone simple, la Lawsone, aux structures complexes telles que le conocurvone (fig.12) trimérique de hydroxynaphtoquinone, un agent de potentiel anti-*HIV*.

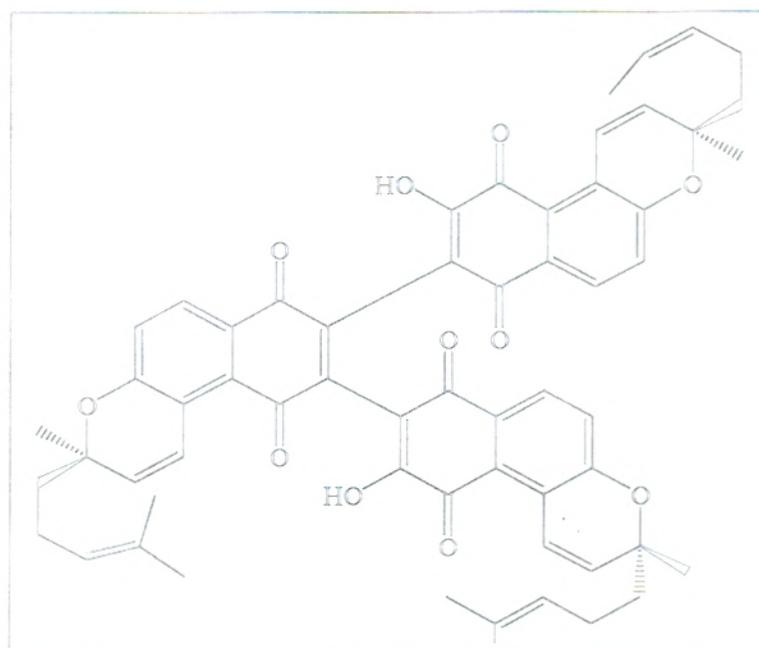


Figure 12. Structure de la Conocurvone

Parmi les molécules biologiquement actives, notre intérêt s'est porté sur les dérivés de quinones et particulièrement les 1,2- et 1,4-naphtoquinones. Ce sont des produits naturels rencontrés dans un grand nombre de plantes mais aussi dans le règne animal.

L'intérêt biologique élevé des dérivés de 1,2 et 1,4-naphtoquinones est lié à la présence du noyau quinonique ainsi qu'à la nature et la position des substituants sur ce noyau. La présence d'un groupement alkyle ou aryle .....etc sur le carbone numéro 3 ou 4 semble être d'un grand apport à l'activité biologique ou pharmacologique. De nombreuses synthèses de dérivés naphtoquinones ont été rapportées dans la littérature.

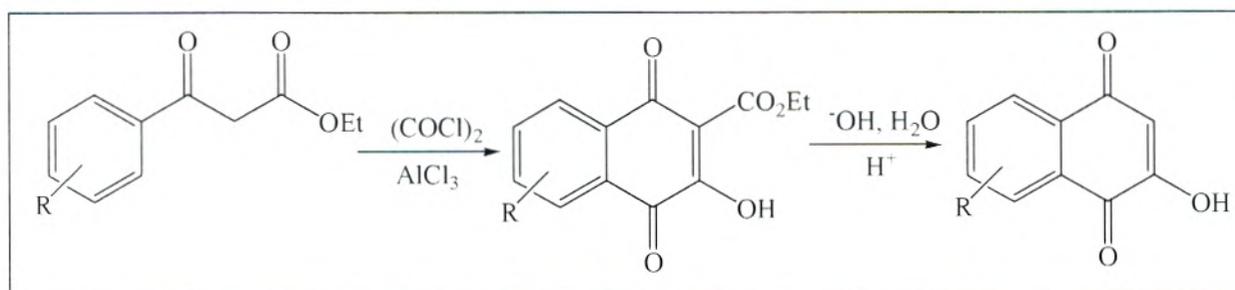
Dans ce chapitre, nous nous limiterons aux cas des composés substitués en position 4 et même sur la synthèse de Lawsone et ses dérivés.

Actuellement, le défi n'est pas seulement de synthétiser une molécule, mais de la préparer de manière simple, rapide et non coûteuse pour pouvoir tester ses activités biologiques. De nombreuses équipes de recherche continuent à développer des méthodologies permettant d'effectuer des conversions récentes.

Afin d'illustrer les principales méthodologies utilisées, seules les synthèses les plus représentatives seront décrites.

### III.2. Synthèse de la Lawsone et ses dérivés

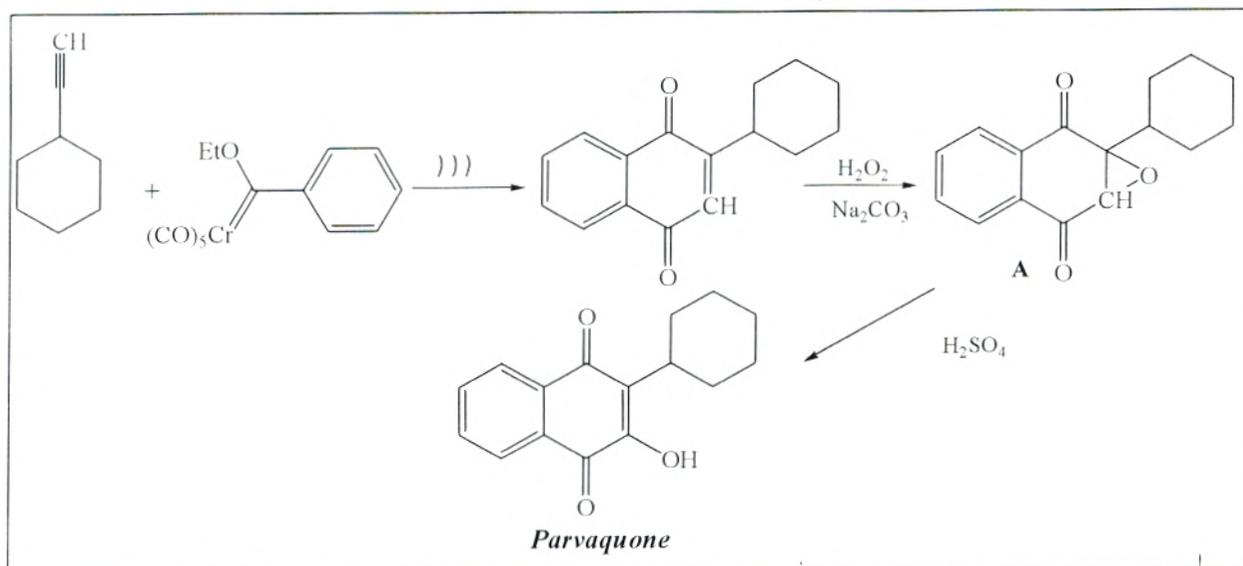
**Sartori *et al.*, 1993** ont établi une nouvelle stratégie de synthèse pour accéder à la Lawsone et ses dérivés en utilisant le processus de cyclisation de Friedel-Métiers. L'addition de chlorure d'Oxalyle sur un  $\alpha$ -céto-ester aromatique, en présence du chlorure d'aluminium, mène au 3-hydroxy-1,4-naphtoquinone-4-carboxylate correspondante. Cette dernière a été hydrolysée et décarboxylé en 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone (schéma 13), la méthode peut également être appliquée pour la préparation des quinones hétérocycliques, qui ne sont pas facilement disponibles par les autres méthodes.



**Schéma 13.** Synthèse de la Lawsone.

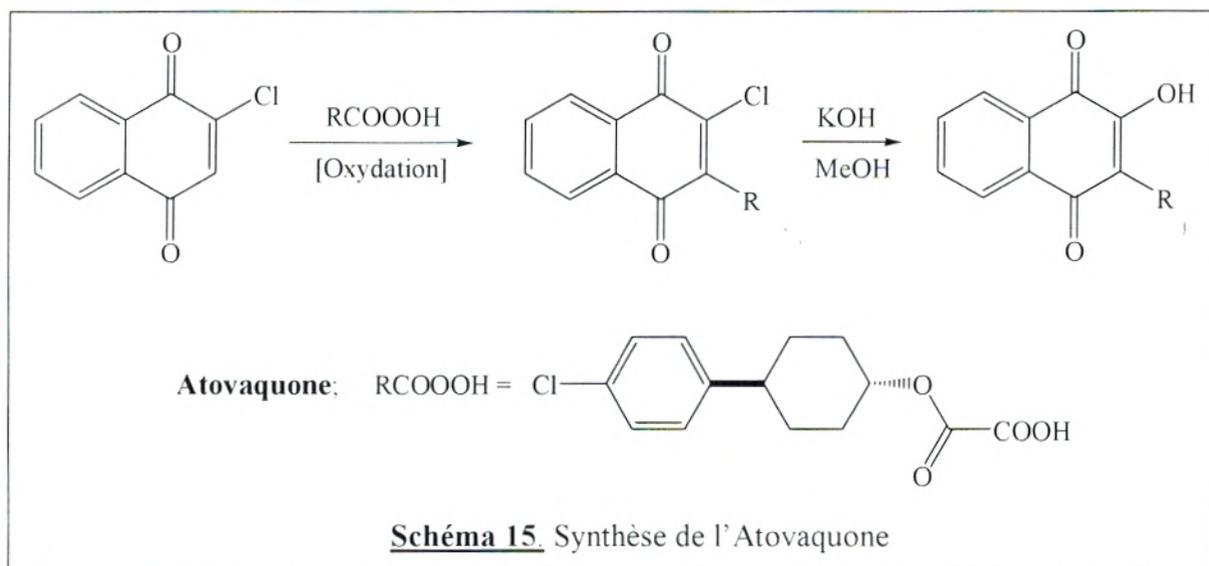
L'insertion d'hydroxyle à l'anneau de quinone peut être effectuée par l'ouverture d'anneau de l'oxiranne (A), obtenue à partir de la réaction d'oxydation du 1,4-naphtoquinone par le peroxyde d'hydrogène dans une solution alcaline. Cette approche a été appliquée par **Harrity *et al.*, 1997** à la synthèse de 3-cyclohexyl-2-hydroxy-1,4-naphtoquinone: la parvaquone, connu pour son activité anti-protozoaire. La naphtoquinone de départ a été préparée par la modification de la réaction de Dötz, comportant des complexes de chrome-carbène et sous ultrasons (schéma 14).

Une autre approche d'accès aux hydroxyquinones par la conversion du chlorure en groupe d'hydroxyle a été décrite par Snapper *et al.*, 1995 qui ont signalé qu'une partie de la chlorométhoxyquinone pourrait être convertie en fonction d'hydroxyle par l'intermédiaire d'échange palladium-chlore par un groupe d'hydroxyle. Cette méthodologie a été utilisée avec succès pour une synthèse alternative de (-)-ilimaquinone et ses analogues (Bruner *et al.*, 1995 ; Radeke *et al.*, 1997).



**Schéma 14.** Synthèse de la Parvaquone.

En 1998, Williams et Clark ont repris la même procédure décrite précédemment pour synthétiser l'atovaquone, en utilisant le chloronaphtoquinone avec du KOH dans le méthanol (schéma 15). L'atovaquone est lancé sur le marché comme drogue de prescription pour le traitement d'un cas spécial de pneumonie (Spyroudis, 2000).



**Schéma 15.** Synthèse de l'Atovaquone

# Chapitre II

## Matériels & Méthodes

Au cours de notre travail, nous nous sommes intéressés à évaluer l'activité antibactérienne et antifongique de :

- Extraits naturels obtenus par macération des feuilles de Henné dans divers solvants.
- La Lawsone pure : ou hydroxynaphtoquinone (principal colorant des feuilles de Henné).
- Plusieurs produits de synthèses, obtenus par modification du noyau naphthoquinone de la Lawsone.

## I. Matériel végétal

### I.1. Plante

La plante du henné "*Lawsonia inermis*" a été fournie par l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) d'Adrar. Sa récolte a été effectuée dans la région d'Adrar durant la période du mois de mars 2008. Depuis, la plante entière a été maintenue à la température ambiante et à l'abri de la lumière dans le laboratoire Antibiotique, Antifongique : physico-chimie synthèse et activité biologique.

### I.2. Extraction

L'extraction a été réalisée à partir des feuilles séchées et broyées à l'aide d'un mortier en verre, au fur et à mesure le jour même de l'extraction. La matière végétale (25g) a été mise en contact avec 100ml de solvant (**Sharma, 1990**).

Différents modes d'extraction ont été réalisés à l'aide de sept différents solvants. L'ensemble des opérations est résumé dans le tableau 01.

L'influence du chauffage sur l'extraction a été étudiée par comparaison à la macération dans l'eau froide.

**Tableau 01.** Solvants et modes d'extractions

| Solvants            | Eau     |         | DMSO    | Ethanol | Acétate d'éthyle | Chloroforme | Ether   |
|---------------------|---------|---------|---------|---------|------------------|-------------|---------|
| Modes de macération | A froid | A chaud | A froid | A froid | A froid          | A froid     | A froid |

Les étapes suivies pour la réalisation de la macération à froid sont comme suit :

- ☒ Sélection et broyage des feuilles qui serviront à la macération (les tiges, les racines, et les graines feront l'objet d'une étude ultérieure).
- ☒ Mise en contact de 25 g de matière végétale avec 100ml de solvant dans un erlenmeyer de 250 ml (**Sharma, 1990**).
- ☒ Agitation à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 24h.

**Remarque :**

En ce qui concerne la macération à chaud, le matériel végétal a été mis en contact avec l'eau distillée, l'ensemble est porté à reflux pendant 6h.

- ☒ Filtration de l'extrait sur papier filtre.
- ☒ Evaporation dans un rotavapor des solvants volatiles : Ethanol, Acétate d'éthyle, Ether di-éthylique et Chloroforme.
- ☒ Calcul du rendement : Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait évaporé du solvant et la masse de la matière végétale initiale ayant servi pour l'extraction.

Exprimé en pourcentage, le rendement est calculé par la formule suivante :

$$\text{rendement} = \frac{m_0}{m_1} \times 100$$

Où :

$m_0$  : Masse en gramme de l'extrait brut évaporé ;

$m_1$  : Masse en gramme de la matière végétale initiale sèche.

**Remarque :**

Les solutions de macération de la matière végétale dans le DMSO et l'eau n'ont pas été évaporées à cause du haut point d'ébullition des ces deux solvants. Elles ont été utilisées telles quelles. Les rendements dans ce cas ne peuvent pas être calculés. Les concentrations finales testées (250 mg/ ml) sont calculées par rapport à la matière végétale prise initialement (25g).

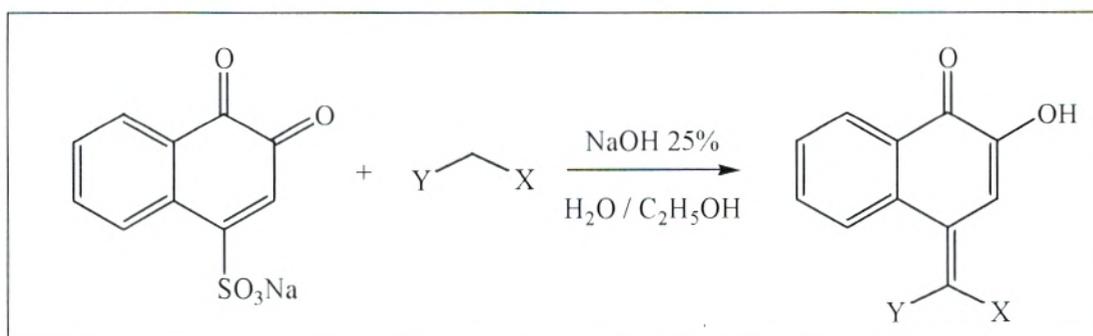
- ☒ Resolubilisation de l'extrait brut dans le DMSO et conservation à 4°C;

## II. La Lawsone

Les tests de l'évaluation de l'activité antimicrobienne de La Lawsone ont été réalisés à partir d'un produit pur commercial (Sigma-Aldrich: C.I.75480, CAS 83-72-7).

## III. La Synthèse organique

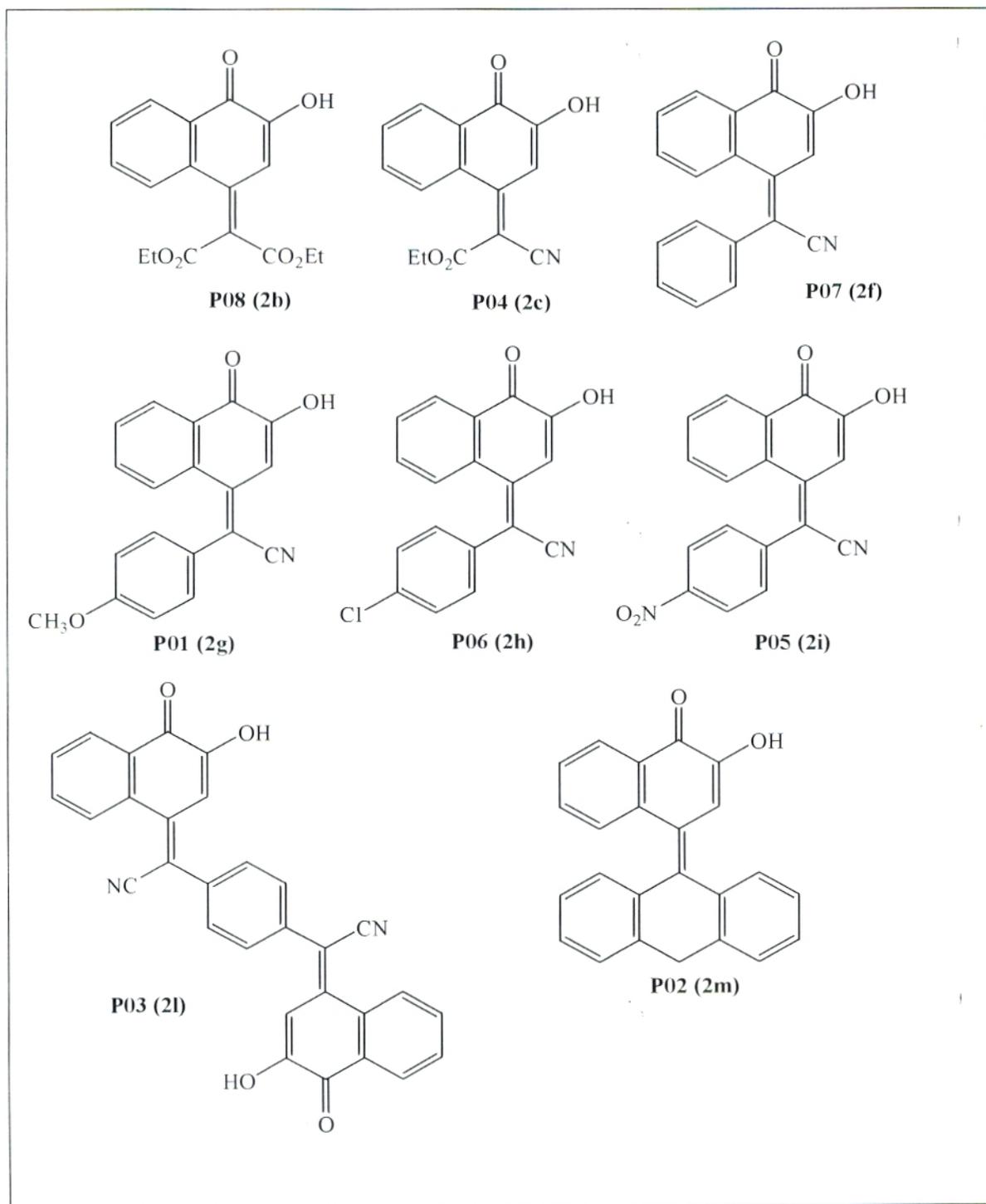
La synthèse des produits testés a été réalisée au laboratoire de Catalyse et Synthèse en Chimie Organique (LCSCO) par Monsieur BENABDELAH Mohammed. Une série de nouvelles molécules de naphthoquinomethanes: [2-(3-hydroxy-4-oxo-4Hnaphthalen-)acétonitriles 1-ylidene]( schéma 16) a été réalisée par une réaction en cascade Michael-élimination du sodium 1,2 naphthoquinone-4-sulfonate avec des acétonitriles substitués dans un mélange eau-éthanol en présence de base dans les conditions de la chimie verte. Les résultats sont regroupés dans le tableau 2 (fig 17).



**Schéma 16.** Schéma réactionnel de la synthèse des dérivés acétonitriles.

**Tableau 2.** Synthèse de 2-hydroxynaphthoquinométhanes dans le solvant aqueux

| Entré | Y                    | X                  | Produits | Rdt (%) |
|-------|----------------------|--------------------|----------|---------|
| 1     | CN                   | 4-methoxyphenyl    | P01      | 92      |
| 2     | 3 Ph                 |                    | P02      | 66      |
| 3     | 9H-fluoren-9-ylidène |                    | P03      | 68      |
| 4     | CN                   | CO <sub>2</sub> Et | P04      | 37      |
| 5     | CN                   | 4-nitrophenyl      | P05      | 67      |
| 6     | CN                   | 4-chlorophenyl     | P06      | 51      |
| 7     | CN                   | Ph                 | P07      | 50      |
| 8     | CO <sub>2</sub> Et   | CO <sub>2</sub> Et | P08      | 56      |



**Figure 17.** Structures des nouvelles molécules de naphthoquinomethanes synthétisées.

### **III. Recherche de l'activité antimicrobienne**

#### **III.1. Evaluation de l'activité antibactérienne**

##### **III.1.1. Souches utilisées**

Les tests de l'évaluation de l'activité antibactérienne ont été réalisés dans le laboratoire Antibiotique, Antifongique : physico-chimie, synthèse et activité biologique.

Les quatre souches bactériennes testées ont été fournies par l'équipe de microbiologie du laboratoire Antibiotique, Antifongique en Novembre 2007. Les bactéries utilisées sont des souches de références:

▣ Deux souches à gram négative:

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

*Escherichia coli* ATCC 25922.

▣ Deux souches à gram positive:

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

*Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

##### **III.1.2. Repiquage, conservation et contrôle de qualité des souches**

Après l'obtention des souches, un repiquage mensuel a été pratiqué. La procédure de revivification est faite successivement sur bouillon nutritif et sur gélose nutritive.

Pour s'assurer de la validité des résultats obtenus, un contrôle de qualité a été effectué par la réalisation d'un antibiogramme de nos souches de référence vis-à-vis de deux antibiotiques la Gentamycine et la Ciprofloxacine. Les résultats sont interprétés par mesure du diamètre en mm de la zone d'inhibition autour du disque et comparés aux limites acceptables des diamètres d'inhibition de la société française de microbiologie (CaSfm, 2008).

Cette opération a deux buts, d'une part elle nous permet de vérifier la sensibilité de nos souches vis-à-vis des antibiotiques et d'autre part de comparer nos résultats à ceux des antibiotiques commerciaux. La procédure de contrôle de qualité n'était possible que pour les souches bactériennes.

### III.1.3. Activité antibactérienne

Les méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne sont inspirées de celles décrites par les recommandations du comité européen des tests de sensibilité antimicrobienne et de la société française de microbiologie (**EUCAST, 2003 ; CaSfm, 2008**).

Le criblage de la Lawsons, des produits de synthèse et des extraits des feuilles de *L.inermis* a été réalisé par deux techniques :

- Technique de diffusion des disques sur milieu solide;
- Technique des dilutions (sur milieu liquide et solide).

Dans un premier temps, les tests ont été réalisés vis-à-vis de toutes les souches.

Les produits qui semblent être actifs, résultat révélé par l'apparition de zones d'inhibitions, ont fait l'objet d'une évaluation de leur activité par la méthode des dilutions pour l'étude de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

Cette CMI a été déterminée, dans un deuxième temps, par la technique des dilutions sur milieu solide pour les extraits et sur milieu liquide pour les dérivés de synthèse.

#### III.1.3.1. Milieu

Les tests ont été réalisés sur milieu gélosé de Mueller-Hinton qui est considéré comme le milieu de référence pour les tests antimicrobiens selon les recommandations nationales et internationales (**EUCAST, 2003 et NCCLS, 2003**) du fait qu'il contient tous les éléments requis pour une bonne croissance des bactéries.

La préparation du milieu a été réalisée selon les instructions du fabricant (Fluka, 70191) (voir annexe I).

#### III.1.3.2. Inoculum

La standardisation de l'inoculum est une étape importante pour la reproductibilité des tests. L'inoculum est préparé à partir d'une culture de 18-24 h sur milieu gélosé non sélectif. 4 ou 5 colonies d'une culture pure sont suspendues sur un bouillon nutritif (ou eau physiologique 0,9 % NaCl), ensuite la suspension est ajustée au standard McFarland 0,5 à l'aide d'un spectrophotomètre, ce qui correspond à une Densité Optique DO entre 0,08 à 0,1 lue à 625nm. Le 0,5McFarland est équivalent à  $10^8$  UFC/ml (**EUCAST, 2003**).

L'inoculum ainsi préparé est ensuite dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans l'eau physiologique. La densité finale de colonie obtenue est équivalente à 10<sup>6</sup> UFC/ ml par la technique de diffusion des disques sur milieu solide et 5 10<sup>5</sup> UFC/ml par la technique des dilutions sur milieu liquide.

### III.1.3.3. Méthode de diffusion des disques sur milieu solide

Cette méthode est réalisée à partir du même principe de l'antibiogramme. Elle est basée sur la diffusion des substances à tester selon un gradient de concentration (Cos *et al*, 2006).

Au cours de cette étude la méthode de diffusion des disques choisis pour réaliser le test est comme suit :

Des disques en papier filtre type wattman n°3, de 6 mm de diamètre (Awadh Ali *et al*, 2001 ; Nath *et al*, 2008) ont été préparés et stérilisés à 121°C pendant 15min. Ces disques ont été imprégnés par 10 µl des solutions de produits à tester (Elgorashi et Van Staden., 2004) (la Lawsons, les produits de synthèse et les extraits). La dose finale sur le disque est de 2,048mg/disque; Les disques témoins sont imprégnés successivement par 10µl d'eau distillée et 10µl de DMSO pur.

Les disques réservés aux antibiotiques de référence sont imprégnés quant à eux par 0,01mg/disque pour la Gentamycine et 0,015mg/disque pour la Ciprofloxacine (EUCAST, 2003).

L'ensemencement est réalisé par inondation à partir d'un inoculum contenant 10<sup>6</sup> UFC/ml (cité ci-dessus). Ensuite, à l'aide d'une pince, les disques chargés par les produits à tester sont transférés dans la boîte inoculée. Les disques sont espacés de 24 mm centre à centre. L'incubation dure 18 à 24 h à 37° C. L'incubation a été prolongée de 12h pour la souche *Enterococcus faecalis* à cause de sa croissance lente.

La mesure des zones d'inhibition pour la lecture est effectuée à l'extérieur de la boîte fermée à l'aide d'une règle graduée. Elle est réalisée en prenant la moyenne de trois mesures différentes de diamètre.

### III.1.3.4. Méthode des dilutions

A la différence de la méthode de diffusion, la méthode de dilution permet de tester les produits directement mélangés avec le milieu de culture.

C'est une méthode quantitative qui nous a permis d'évaluer, dans le cas où il y a présence d'une activité (détectée par la méthode précédente), le seuil minimum de cette activité appelée couramment la concentration minimale inhibitrice ou CMI.

Deux types de méthodes ont été mises en œuvre :

- CMI sur milieu liquide;
- CMI sur milieu solide.

#### III.1.3.4.1. Méthode des dilutions sur milieu liquide

Une série de concentrations allant de 4,096 à 0,016mg/ml des produits testés est préparée directement dans une microplaque stérile. Les produits à tester ont tous été préparés le jour même du test.

Le produit à tester (0,1 ml) est mis en contact avec l'inoculum (0,1 ml) contenant  $10^6$ UFC/ml (le facteur de dilution  $\frac{1}{2}$  est pris en considération dans le calcul de concentrations finales des produits à tester). La concentration de l'inoculum finale est de  $5 \cdot 10^5$  UFC/ml. La microplaque est couverte et incubée à 37°C pendant 24h. Le DMSO doit être à raison de 2% au maximum.

La lecture est effectuée à l'œil nu et la CMI est la plus faible concentration de la substance testée auquel aucun trouble visuel n'est observé. La Ciprofloxacine et la Gentamycine ont été utilisées comme antibiotiques de références (CaSfm, 2008).

**Tableau 03.** Résultats des CMI (mg/ml) des antibiotiques de références.

|                       | <i>P.aeruginosa</i> | <i>E.coli</i>         | <i>S.aureus</i>      | <i>E.faecalis</i>   |
|-----------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|
| <b>Gentamycine</b>    | $2 \cdot 10^{-3}$   | $0,5 \cdot 10^{-3}$   | $0,25 \cdot 10^{-3}$ | $8 \cdot 10^{-3}$   |
| <b>Ciprofloxacine</b> | $0,5 \cdot 10^{-3}$ | $0,008 \cdot 10^{-3}$ | $0,25 \cdot 10^{-3}$ | $0,5 \cdot 10^{-3}$ |

#### III.1.3.4.2. Méthode des dilutions sur milieu solide

Une série de dilutions de nos produits allant de 40,48 à 0,16mg/ml a été réalisée. Les tubes à hémolyse correspondants chacun à une dilution (1ml) sont déversés dans une boîte de pétri à laquelle on ajoute 19 ml du milieu Mueller Hinton stérile puis ces boîtes sont maintenues à 45°C jusqu'à solidification de la gélose. Les boîtes témoins sont préparées en

rajoutant respectivement 1 ml d'eau distillée et 1 ml de DMSO. Les boîtes sont bien agitées et solidifiées devant une source de chaleur.

L'ensemencement se fait par spot à partir d'un inoculum dilué au 1/10 du standard 0,5 McFarland. Ensuite 1 à 2  $\mu$ l sont déposés à l'aide d'une micropipette, soit l'équivalent de  $10^4$  UFC par spot. La boîte est séchée devant un bec bunsen.

A travers cette méthode les quatre souches bactériennes sont testées en même temps et sur la même boîte, ce qui à l'avantage d'étudier le comportement des substances vis-à-vis des souches dans des conditions identiques. L'incubation dure pendant 18-24 h à 37° C.

La lecture se fait à l'œil nu et la CMI est alors jugée comme étant la plus faible concentration à laquelle aucune croissance visuelle n'est décelée. La croissance d'une colonie ou d'un film fin est négligée.

## **III.2. Evaluation de l'activité antifongique**

### **III.2.1. La levure**

La levure utilisée pour dans ce test est une souche de référence *Candida albicans* ATTC 10231, multirésistante aux antifongiques. Elle a été fournie par l'équipe de microbiologie du laboratoire Antibiotique, Antifongique en Octobre 2007.

Pour évaluer l'activité des produits vis-à-vis de la souche de *Candida albicans*, la méthode de diffusion sur milieu solide inspirée d'une technique standardisée par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), a été réalisée (**Espinel-Ingroff, 2007**).

Le milieu de culture utilisé est le milieu de Mueller Hinton+2% de glucose+ 0,5 $\mu$ g/ml de bleu de méthylène à un pH de 7,2 à 7,4.

L'inoculum équivalent à 0,5 McFarland est réalisé dans les mêmes conditions que les bactéries sauf que l'absorbance est de l'ordre de 0.12-0.15 à une longueur d'onde de 530nm. L'ensemencement est effectué par inondation. Les disques sont déposés après séchage. Les boîtes sont incubées à 35°C pendant 20 à 24h. La lecture est réalisée de la même façon que celle décrite pour les bactéries.

L'étude de la CMI de la levure est procédée de la même manière que celles des bactéries, sauf que l'inoculum est ajusté à une DO entre 0,12 à 0,15 lue à 530nm, ce qui

correspond à un inoculum équivalent à  $1-5 \cdot 10^6$  UFC. Le milieu utilisé est le bouillon Sabouraud.

### III.2.2. Les moisissures

Les souches de champignons utilisées dans les tests antifongiques sont : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* et *penicillium sp.*

Ces souches ont été fournies et identifiées par l'équipe de mycologie du laboratoire Produits naturels en Novembre 2007. Les souches sont depuis isolées sur milieu Sabouraud pH 5,8 et repiquées d'une manière régulière.

L'activité fongitoxique des produits a été évaluée par la technique d'empoisonnement de la nourriture de **Perrucci et al., 1994 et Singh et al., 2008**. Le milieu de culture utilisé dans ce test est le milieu Sabouraud (**Guerrier et al., 1988**).

Un volume de 1 ml de du produit à tester est bien mélangé avec 19ml du milieu de culture. La boîte contrôle est préparée d'une manière similaire avec 1ml d'eau distillée stérile. L'effet du DMSO est étudié avec des concentrations de 5 et 10 %. Les boîtes préparées sont inoculées aseptiquement par le dépôt d'un disque de 0,6 cm d'une pré-culture de la moisissure de 3 jours.

La lecture est réalisée à partir du 3<sup>ème</sup> jour et le pourcentage d'inhibition mycélienne est calculé par la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition mycélienne} = \frac{dc - dt}{dc} \times 100$$

Où : **dc** : diamètre de la colonie contrôle

**dt** : diamètre de la colonie traitée.

Les valeurs sont la moyenne de trois mesures différentes.

# Chapitre III

## Résultats & Discussion

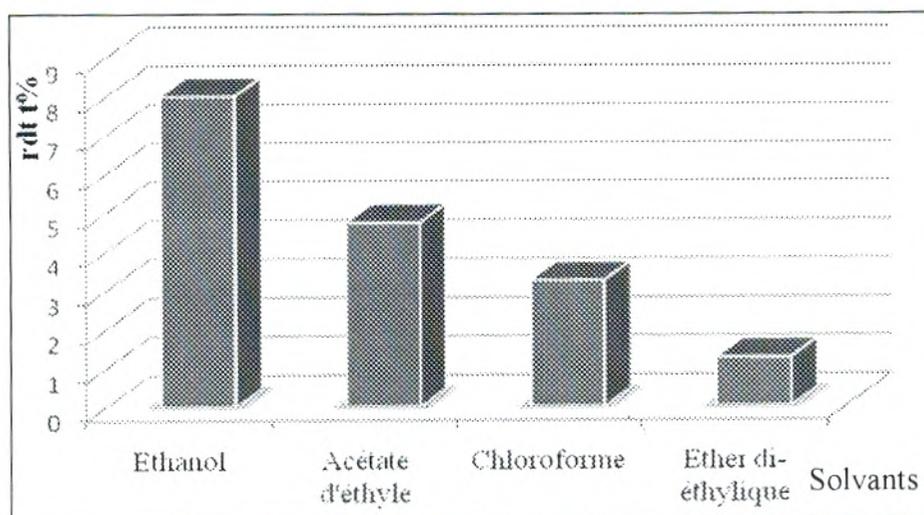
## V. Les différents solvants pour l'extraction

Différents modes d'extraction de la plante *L.inermis* ont été effectués pour la réalisation du criblage antimicrobien. Pour cela, l'eau et cinq solvants organiques ont été utilisés : le DMSO, l'éthanol, l'acétate d'éthyle, le chloroforme et l'éther di-éthylique. L'extraction avec l'eau a été réalisée par macération à chaud et à froid.

Les résultats des différents rendements (fig.19) montrent que le meilleur rendement a été obtenu avec l'éthanol puis avec l'acétate d'éthyle, le chloroforme et enfin avec l'éther di-éthylique. Le DMSO et l'eau étant des solvants difficiles à évaporer, les rendements dans ces cas sont reportés par rapport à la matière végétale initiale et ne peuvent pas être comparés avec ceux des autres solvants (le solvant a été entièrement évaporé).

Le choix des solvants est en accord avec certains travaux qui indiquent que le criblage primaire de l'activité antimicrobienne doit être initié par l'extrait brut aqueux et éthanolique suivi par des solvants moins polaires (Cowan, 1999).

Zhang et Lewis rapportent que presque tous les composants actifs identifiés à partir des plantes pour leurs activité antimicrobienne font partie des composés aromatiques ou les composés organiques saturés et qu'ils sont obtenus par une extraction initiale à l'éthanol ou au méthanol (Zhang et Lewis, 1997).



**Figure 19.** Rendement des extractions par les solvants volatiles utilisés.

## VI. Effet de la concentration du DMSO

Les tests de l'évaluation de l'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) ont été réalisés de telle façon que les produits de synthèse et les extraits bruts soient solubilisés dans le DMSO (utilisé comme solvant de resolubilisation).

En plus de son utilisation fréquente en biologie, le DMSO nous a assuré :

- ✓ Une bonne solubilité des produits de synthèse et des extraits bruts.
- ✓ L'élimination de la contamination microbienne et de ce fait l'annulation de la stérilisation par l'autoclave ou autre méthode qui peut affecter la qualité de nos échantillons.
- ✓ La normalisation de nos travaux avec ceux réalisés sur d'autres produits par d'autres équipes (Tiwari *et al.*, 2005 ; Cos *et al.*, 2006).

Ces mêmes auteurs rapportent que l'usage du DMSO était potentiellement toxique vis-à-vis des micro-organismes. Ce qui nous a amené à vérifier et à évaluer le seuil de cette toxicité. Les tests témoins du DMSO pur sur différentes souches bactériennes ont montré les résultats suivants (tableau 03):

**Tableau 03.** Effet du DMSO sur la croissance des microorganismes utilisés.

| Souches             | Dilutions DMSO |        |        |       |      |       |
|---------------------|----------------|--------|--------|-------|------|-------|
|                     | 50,00%         | 25,00% | 12,50% | 6,25% | 3,12 | 1,56% |
| <i>P.aeruginosa</i> | -              | -      | -      | -     | +    | +     |
| <i>E.coli</i>       | -              | -      | -      | -     | +    | +     |
| <i>S.aureus</i>     | -              | -      | -      | -     | +    | +     |
| <i>E.faecalis</i>   | -              | -      | -      | -     | +    | +     |
| <i>C.albicans</i>   | -              | -      | -      | -     | +    | +     |

(+) : visualisation de croissance ; (-) : non visualisation de croissance

Comme on pouvait s'y attendre, l'usage du DMSO pur dans le milieu de culture s'est avéré toxique vis-à-vis des quatre souches de bactéries et de la levure (tableau03). Toutefois, le seuil minimum de cette toxicité est en dessous de la concentration de 6,25%. Notre travail a été réalisé en tenant compte de la concentration de 2% du DMSO, concentration considérée inactive sur nos souches.

Ceci est en accord avec certains auteurs qui ont rapporté que la concentration du DMSO allant de 10% (Poyraz *et al.*, 2008) jusqu'à 25% (Sarker *et al.*, 2007 ; Nath *et al.*, 2008) n'était pas toxique, alors que d'autres considèrent que la dose 1% est le seuil minimum de la toxicité du DMSO (Cos *et al.*, 2006).

Dans le cas des champignons, les résultats de l'étude de l'effet du DMSO vis-à-vis de la croissance mycélienne (tableau 04) révèlent que l'utilisation du solvant pur dans le milieu de culture a exercé un effet inhibiteur sur la croissance mycélienne des quatre souches. La concentration de 1% n'exerçait aucune activité inhibitrice. Suite à ce résultat, tous nos tests de l'évaluation de l'activité antifongiques (les produits naturels et de synthèse) sont réalisés durant ce travail à la concentration finale de 1% du DMSO.

**Tableau 04.** Effet du DMSO sur la croissance mycélienne des moisissures.

| Concentration du DMSO | Souches            |                |                 |                     |
|-----------------------|--------------------|----------------|-----------------|---------------------|
|                       | <i>F.oxysporum</i> | <i>A.niger</i> | <i>A.flavus</i> | <i>R.stolinifer</i> |
| DMSO à 5%             | 3,57               | 4,25           | 4,12            | 4,67                |
| DMSO à 1%             | 5,27               | 5,45           | 6,5             | 8,5                 |
| Témoin                | 5,22               | 5,5            | 6,63            | 8,5                 |

Les valeurs représentent les pourcentages d'inhibitions de la croissance mycélienne calculées par la formule:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{dc - dt}{dc} \times 100$$

dc= diamètre de boîte échantillons,  
dt= diamètre de la boîte témoin

A partir des résultats obtenus, nous pouvons conclure que l'usage de DMSO aux concentrations 1% et 2% n'est pas toxique vis-à-vis des champignons et bactéries respectivement.

### III. Evaluation de l'activité antibactérienne

Le choix des souches d'étude dépend du but spécifique de la recherche. Dans un criblage primaire, les souches de références sensibles aux médicaments sont de préférence employées et devraient représenter les souches pathogènes communes des différentes classes. Diverses combinaisons peuvent être possibles, mais le panneau devrait au moins se composer d'une bactérie gram positive et d'une gram négative (Cos *et al.*, 2006).

Sur cette base, le choix des souches pour la réalisation des tests antimicrobiens des produits naturels et de synthèse a été fait de façon à avoir au moins un représentant de chaque classe des souches sensibles. De ce fait, quatre bactéries pathogènes sensibles ont été choisies au cours de cette étude dont deux grams négatives : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 et deux grams positives: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Ces mêmes souches sensibles ont servi comme modèle de référence dans plusieurs études préliminaires d'évaluation de l'activité antibactérienne de nombreux produits naturels et de synthèse (Awadh Ali *et al.*, 2001; Tiwari *et al.*, 2006 ; Özçelik *et al.*, 2007 ; Nair et Joseyphus, 2008 ).

#### III.1. Evaluation de l'activité antibactérienne de la Lawsonsone

##### III.1.1. La concentration de l'étude

Nous nous sommes tout particulièrement intéressés dans un premier temps à l'étude de la variabilité des résultats de nos tests obtenus avec deux méthodes différentes de préparation de la Lawsonsone. En effet, une étude comparative a été réalisée entre les CMI obtenues à partir de la préparation d'une solution mère de la Lawsonsone à une concentration de 40,096 mg/ ml de DMSO et une autre préparation de la Lawsonsone préparée à la concentration de 4,096 mg/ml de DMSO (cette dernière préparée le jour même du test).

Les résultats montrent (tableau 05) qu'avec les deux techniques utilisées (sur milieu solide et sur milieu liquide), aucune différence remarquable n'a été signalée entre les CMI obtenues avec les deux préparations de la Lawsonsone (40,96mg/ ml et 4,096mg/ ml). Suite à ce résultat, nous nous sommes alors attachés à réduire la pesée de nos dérivés de synthèse en prenant comme concentration de référence la préparation de **4,096mg/ ml**.

En outre, par comparaison des résultats des CMI obtenues en milieu solide avec ceux obtenues en milieu liquide (tableau 05) nous pouvons remarquer qu'aucune différence significative n'est notée entre les deux méthodes (CMI sur milieu liquide et sur milieu solide). Sur cette base, les deux méthodes peuvent être considérées dans nos tests comme étant révélatrices de résultats identiques.

**Tableau 05.** Etude comparative des CMI (mg/ ml) de la lawsone avec deux méthodes de préparations différentes.

|                       |                     | 40,96 mg/ml | 4,096 mg/ml |
|-----------------------|---------------------|-------------|-------------|
| <b>Milieu Solide</b>  | <i>P.aeruginosa</i> | 2,048       | 2,048       |
|                       | <i>E.coli</i>       | 1,024       | 1,024       |
|                       | <i>S.aureus</i>     | 0,512       | 0,512       |
|                       | <i>E.faecalis</i>   | 2,048       | 2,048       |
| <b>Milieu liquide</b> | <i>P.aeruginosa</i> | 2,048       | 2,048       |
|                       | <i>E.coli</i>       | 1,024       | 0,512-1,024 |
|                       | <i>S.aureus</i>     | 0,512       | 0,512       |
|                       | <i>E.faecalis</i>   | 2,048       | 2,048       |

### III.1.2. Charge du disque

L'activité antimicrobienne des extraits bruts et des dérivés de synthèses peut être détectée en observant la réponse de croissance de divers micro-organismes aux échantillons qui sont mis en contact avec eux. Le choix de la charge du produit à tester est une étape essentielle pour la réalisation des criblages antimicrobiens, qu'il s'agisse de la méthode de diffusion des disques sur milieu solide ou de la méthode des dilutions (Cos *et al*, 2006).

Partant de l'objectif tracé pour cette étude qui est l'évaluation de l'activité antimicrobienne des produits naturels et de synthèse par rapport à celle de la Lawsone, il nous a semblé nécessaire d'effectuer une étude de la concentration minimale inhibitrice de la molécule de référence, la Lawsone. Ensuite, en fonction des résultats obtenus nous pourrions déduire la charge à partir de laquelle tous les tests seront réalisés.

A partir des résultats représentés dans le tableau 05, nous remarquons que la souche *P.aeruginosa* a montré la résistance la plus forte avec une CMI de **2,048 mg/ml**. Ce résultat nous a poussés à réaliser nos tests d'évaluation de l'activité des produits de synthèse par la méthode de diffusion des disques sur milieu solide à la dose de référence de **2,048 mg/disque**.

Cette concentration est en accord avec certains travaux récents qui ont utilisé les doses suivantes : 2,5 mg/disque (**Fang et al., 2006**), 2mg/disque (**Poyraz et al., 2008**), 1,6mg/disque (**Luo et al., 2008**) et 1,024mg/disque (**Özçelik et al., 2007**).

### III.1.3. Evaluation de l'activité antibactérienne de la Lawsone par la méthode de diffusion des disques

La Lawsone est le principal colorant de la plante *L.inermis*, certains lui attribuent principalement l'activité antimicrobienne de la plante (**Sharma, 1990 ; Cowan,1999 ; Shaukat et al., 2008**). Au cours de notre étude, la Lawsone a été aussi le point de départ de la synthèse des dérivés de Lawsone.

Les résultats du test préliminaire de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion des disques (tableau 06) montrent que la Lawsone présente une activité antimicrobienne vis-à-vis des trois souches de bactéries. En effet, une **activité moyenne** a été signalée vis-à-vis des souches *E.coli* et *S.aureus* et une **faible activité** a été enregistrée vis-à-vis de la souche *E.faecalis*. Cependant, la souche *P.aeruginosa* s'est montrée très résistante.

**Tableau 06.** Zones d'inhibition (mm) de la Lawsone.

| Souches                         | <i>P.aeruginosa</i> | <i>E.coli</i> | <i>S.aureus</i> | <i>E.faecalis</i> |
|---------------------------------|---------------------|---------------|-----------------|-------------------|
| Lawsone (2,048mg/ disque)       | 06,0 ±0             | 20,5 ±0,7     | 16,8 ±0,6       | 13,5 ±0,8         |
| Ciprofloxacine (0,005mg/disque) | 31,5 ±0,7           | 33,6 ±3,7     | 28,8 ±0,3       | 30,0 ±0           |
| Gentamycine (0,015mg/disque)    | 20,5 ±3,6           | 24,0 ±0       | 25,5 ±0,2       | 28,0 ±2,1         |

Dans une étude réalisée par **park et al, 2006**, la Lawsone a montré, à la dose de 0,1mg/disque, une **forte activité** antibactérienne vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* ATCC 43504. Le diamètre de la zone d'inhibition obtenu était 43mm.

L'activité enregistrée pour la Lawsonsone revient probablement du fait que les naphthoquinones sont des composés aromatiques qui possèdent deux fonctions cétone. Ils présentent à travers leurs structures di-cétonique une vraie source de radicaux libres stables. Ce sont des composés capables de se complexer irréversiblement avec les acides aminés nucléophiles des protéines. Cette complexification mène souvent à l'inactivation des protéines et à la perte de leurs activités. Les cibles probables dans les cellules microbiennes sont les adhésines de surface, les polypeptides des parois cellulaires et il y aurait aussi inactivation des enzymes (Stern *et al.*, 1996).

### III.1.4. Etude de la Concentration minimale inhibitrice de la Lawsonsone

L'étude de la CMI de la Lawsonsone vis-à-vis des quatre souches testées par la méthode des disques, a été réalisée par deux techniques: CMI sur milieu solide et sur milieu liquide. Les résultats obtenus (tableau 07) ne sont pas en accord avec ceux de la méthode de diffusion des disques. La souche *S.aureus* s'est montrée la plus sensible, alors que la souche *E.faecalis* a rejoint *P.aeruginosa* dans sa résistance.

**Tableau 07.** CMI de la Lawsonsone (mg/ml).

| Souches        | <i>P.aeruginosa</i> | <i>E.coli</i>         | <i>S.aureus</i>      | <i>E.faecalis</i>   |
|----------------|---------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|
| Lawsonsone     | 2,048               | 1,024-0,512           | 0,512                | 2,048               |
| Ciprofloxacine | $0,5 \cdot 10^{-3}$ | $0,008 \cdot 10^{-3}$ | $0,25 \cdot 10^{-3}$ | $0,5 \cdot 10^{-3}$ |
| Gentamycine    | $2 \cdot 10^{-3}$   | $0,5 \cdot 10^{-3}$   | $0,25 \cdot 10^{-3}$ | $8 \cdot 10^{-3}$   |

Par comparaison des résultats obtenus avec la Lawsonsone et ceux obtenus avec les deux antibiotiques de références utilisés : la Ciprofloxacine et la Gentamycine, nous remarquons que les CMI sont très écartées. Ce qui nous amène à conclure que la Lawsonsone a un potentiel d'activité qui est très faible comparativement aux deux antibiotiques utilisés.

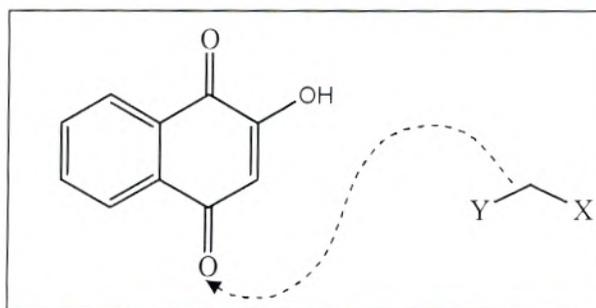
Au cours de cette partie, l'évaluation de l'activité de la Lawsonsone vis-à-vis des quatre souches bactériennes testées nous a montré que la Lawsonsone possède une activité antibactérienne qui est considérée comme étant faible par comparaison aux résultats obtenus avec ceux des deux antibiotiques utilisés dans ces tests.

## III.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des dérivés de synthèse

### III.2.1. Evaluation de l'activité des dérivés de synthèse par la méthode de diffusion des disques

Les dérivés de la 1,4-naphtoquinone sont des substances largement distribuées dans la nature. Certaines plantes contenant ces dérivés ont été utilisées dans la médecine traditionnelle pour la thérapie de maladies diverses, telles que les maladies infectieuses causées par des agents bactériens et fongiques (Munday *et al*, 2007).

Toutefois, certains auteurs rapportent qu'une toxicité des dérivés 1,4 naphtoquinone attribuée à l'espèce "oxygène actif" est produite à travers le cycle redox (Munday *et al*, 1991). Au cours de cette partie du travail nous avons tenté de bloquer un des sites cétones de la Lawsone tout en essayant par cette opération de garder son activité intacte et de diminuer sa toxicité. Pour cela, huit dérivés de la Lawsone ont été synthétisés par un greffage de groupements acétonitrile sur la position 4 du noyau naphtoquinone (Schéma 20).



**Schéma20.** Fixation des dérivés acétonitriles en position 4 du noyau naphtoquinone

Tous les produits synthétisés ont fait l'objet d'un criblage de l'évaluation de l'activité antibactérienne vis-à-vis de deux bactéries à gram (-) et deux à gram (+). Les résultats ont été comparés avec ceux de la molécule de référence : la Lawsone.

Les résultats du test préliminaire par la méthode de diffusion des disques (tableau 08 ; photo21 ; photo 22) montrent que la meilleure zone d'inhibition est attribuée au produit de synthèse **P04** suivie du produit **P05** et **P06**. Les deux produits **P04**, **P05** sont actifs vis-à-vis des deux bactéries gram (+) alors que le produit **P06** est actif simplement vis-à-vis d'*E.faecalis*. Les autres produits : **P01**, **P02**, **P03**, **P7** et **P08** n'ont montré aucune zone d'inhibition et de ce fait aucune activité ne leur est attribuée.

Le produit **P04** peut être classé parmi les produits à *fortes activités* alors que les produits **P05**, **P06** et la Lawsone montrent une *moyenne activité* vis-à-vis de *S. aureus*. Ainsi, les produits **P04**, **P5** et la Lawsone montrent une *forte activité* vis-à-vis d'*E.coli* et une *faible activité* vis-à-vis d'*E. faecalis*

**Tableau 08.** Zones d'inhibition (mm) de la Lawsone et des dérivés de synthèse.

| Produits de synthèse<br>(2,048mg/disque) | <i>P.aeruginosa</i> | <i>E.coli</i>     | <i>S.aureus</i>   | <i>E.faecalis</i> |
|--|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Lawsone</b>                           | 06,0 ± 0            | <b>20,5 ± 0,7</b> | <b>16,8 ± 0,7</b> | <b>13,5 ± 0,7</b> |
| <b>01</b>                                | 06,0 ± 0            | 06,0 ± 0          | 06,0 ± 0          | 06,0 ± 0          |
| <b>02</b>                                | 06,0 ± 0            | 06,0 ± 0          | 06,0 ± 0          | 06,0 ± 0          |
| <b>03</b>                                | 06,0 ± 0            | 06,0 ± 0          | 06,0 ± 0          | 06,0 ± 0          |
| <b>04</b>                                | 06,0 ± 0            | 06,0 ± 0          | <b>22,0 ± 1,4</b> | <b>14,1 ± 0,6</b> |
| <b>05</b>                                | 06,0 ± 0            | 06,0 ± 0          | <b>17,0 ± 2,8</b> | <b>14,5 ± 0,7</b> |
| <b>06</b>                                | 06,0 ± 0            | 06,0 ± 0          | <b>16,0 ± 2,8</b> | 06,0 ± 0          |
| <b>07</b>                                | 06,0 ± 0            | 06,0 ± 0          | 06,0 ± 0          | 06,0 ± 0          |
| <b>08</b>                                | 06,0 ± 0            | 06,0 ± 0          | 06,0 ± 0          | 06,0 ± 0          |
| <b>Ciprofloxacine(0,005mg/disque)</b>    | <b>31,5 ± 0,7</b>   | <b>33,6 ± 3,7</b> | <b>28,8 ± 0,3</b> | <b>30,0 ± 0</b>   |
| <b>Gentamycine (0,015mg/disque)</b>      | <b>20,5 ± 3,5</b>   | <b>24,0 ± 0</b>   | <b>25,5 ± 0,2</b> | <b>28,0 ± 2,1</b> |

06,0 : aucune zone d'inhibition observée

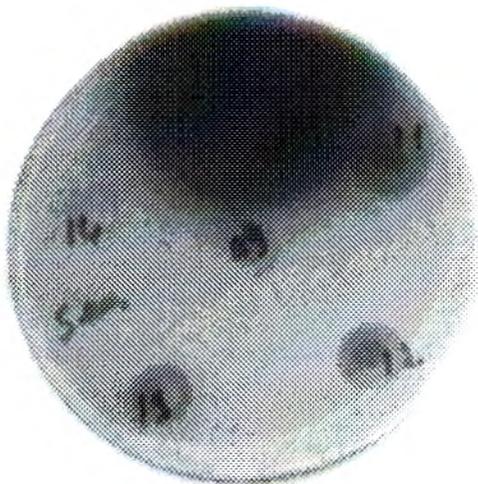
Les bactéries à grams (-) sont toujours plus résistantes que les bactéries à grams (+) et aucune zone d'inhibition n'a été observée chez les bactéries à gram (-) sauf avec la Lawsone. La comparaison entre l'activité antibactérienne des produits de synthèse: **P04**, **P05** et **P06** par rapport à celle de la Lawsone montre que le composé **P04** présente la meilleure activité vis-à-vis de *S. aureus*. Par contre, la différence entre l'activité antibactérienne vis-à-vis d'*E.faecalis* et de *S.aureus* est infime entre les produits **P05**, **P06** et la Lawsone ; De même vis-à-vis d'*E.faecalis*, la différence de l'activité entre le composé **P04** et la Lawsone reste toujours minime.

Par rapport aux antibiotiques, les différences sont significatives sauf vis-à-vis de *S.aureus* où la différence entre les diamètres de la zone d'inhibition entre le produit **P04** et la Gentamycine est semblable.

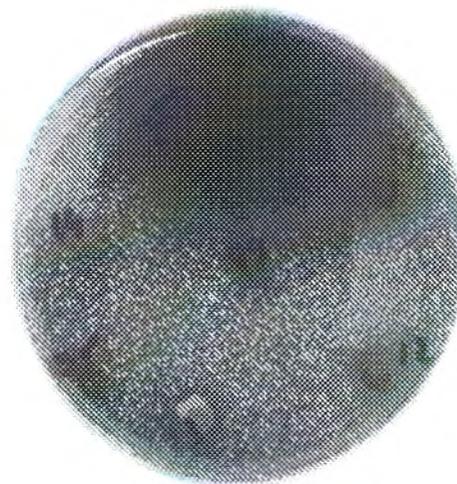
Durant ce test, les bactéries grames à négative exhibent une résistance plus élevée que les grames à positives, résultats dûs certainement à la différence structurale des parois des bactéries à grames positive et à grames négative (**Ahmad et beg, 2000**). La résistance montrée par la souche *P.aeruginosa* était attendue surtout que c'est une souche qui possède une résistance intrinsèque à une large gamme de biocides, associée à la nature lipopolysaccharidique de sa membrane externe. Cette barrière « hydrophilic permeability barrier » la protège des agents externes.

L'antibiogramme a été réalisé avec la Ciprofloxacine (0,005mg/disque) et la Gentamycine (0,015mg/disque) pour le contrôle des souches tout en suivant les recommandations du **Casfm, 2008**. Les résultats obtenus (tableau 08 et tableau 09) concordent avec les limites acceptables des diamètres d'inhibition (**NCCLS, 2003 ; Casfm, 2008**). L'antibiogramme nous a permis, d'une part, de vérifier la conformité de nos souches de références, d'autre part la validité de nos manipulations et de la technique utilisée et enfin la comparaison des résultats obtenus avec ceux des extraits bruts.

Le choix de ces deux antibiotiques était basé sur leur disponibilité dans le commerce ainsi que sur leur utilisation comme référence dans plusieurs travaux récents (**Tiwari et al, 2006 ; Nath et al, 2008**).



**Photo 21.** ; zones d'inhibition des dérivés de synthèse vis-à-vis de *S.aureus*



**Photo 22.** zones d'inhibition des dérivés de synthèse vis-à-vis d'*E.faecalis*

### III.2.2. L'étude de la CMI des dérivés de synthèse

Les composés jugés actifs avec la première technique: **P04**, **P05** et **P06**, ont fait l'objet d'une évaluation de leur CMI. L'étude de la CMI a été réalisée par la méthode des dilutions en milieu liquide vis-à-vis des quatre souches afin de vérifier leur inactivité vis-à-vis des souches à gram (-).

Les résultats (tableau 09) obtenus avec la méthode des dilutions ne semblent pas être en corrélation avec ceux de la méthode de diffusion en milieu solide. Ainsi, pour les zones d'inhibition, **22,0 mm** et **14,1mm** obtenues avec le produit **P04** vis-à-vis *S.aureus* et *E.faecalis* respectivement, aucune CMI n'as été signalée.

**Tableau 09.** Résultats des CMI (mg/ml) des produits actifs et de la Lawsons.

| Produits de synthèse  | <i>P.aeruginosa</i>        | <i>E.coli</i>                | <i>S.aureus</i>             | <i>E.faecalis</i>          |
|-----------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| <b>Lawsons</b>        | <b>2,048</b>               | <b>1,024</b>                 | <b>0,512</b>                | <b>2,048</b>               |
| <b>P04</b>            | ≥ 2,048                    | ≥ 2,048                      | ≥ 2,048                     | ≥ 2,048                    |
| <b>P05</b>            | ≥ 2,048                    | ≥ 2,048                      | <b>0,064</b>                | <b>0,256</b>               |
| <b>P06</b>            | ≥ 2,048                    | ≥ 2,048                      | <b>0,032</b>                | ≥ 2,048                    |
| <b>Gentamycine</b>    | <b>2 10<sup>-3</sup></b>   | <b>0,5 10<sup>-3</sup></b>   | <b>0,25 10<sup>-3</sup></b> | <b>8 10<sup>-3</sup></b>   |
| <b>Ciprofloxacine</b> | <b>0,5 10<sup>-3</sup></b> | <b>0,008 10<sup>-3</sup></b> | <b>0,25 10<sup>-3</sup></b> | <b>0,5 10<sup>-3</sup></b> |

La CMI du produit **P05** est de l'ordre de **0,064 mg/ml** vis-à-vis de *S.aureus* et elle est de l'ordre de **0,256 mg/ml** vis-à-vis d'*E.faecalis*. La meilleure activité est enregistrée pour le produit **p06 (0,032 mg/ml)**. Cette activité a été accentuée huit à seize fois par rapport celle de la Lawsons pour le produit **P06** et quatre à huit fois plus que celle de la Lawsons (**0,512 mg/ml**) pour le produit **P05**. Enfin le composé **P05** a montré une activité quatre fois plus élevée que celle de la Lawsons (**0.256 mg/ml**) vis-à-vis d'*E.faecalis*. La modification de la structure de Lawsons à travers les produits **P05** et **P06a** permis d'améliorer l'activité antibactérienne vis-à-vis de *E.faecalis* et *S.aureus*.

Les résultats (tableau 09 ; photo 23) montrent aussi que même avec la méthode des dilutions, les bactéries à gram (-) sont toujours résistantes aux produits testés. Ceci nous ramène à dire que les que le greffage des groupements acétonitriles dans produits **P04**, **P05** et **P06** ne présente aucune amélioration de l'activité antimicrobienne vis-à-vis des bactéries à gram (-), alors que la Lawsons présente quand même une faible activité antibactérienne.

L'activité montrée par les produits de synthèse, particulièrement **P06** et **P05** peut être expliquée par la présence d'un groupement chloré pour le produit **P06** et d'un groupement nitré pour le **P05**. Quant au produit **P04**, aucune fonction particulière n'a pu nous permettre de justifier son activité.

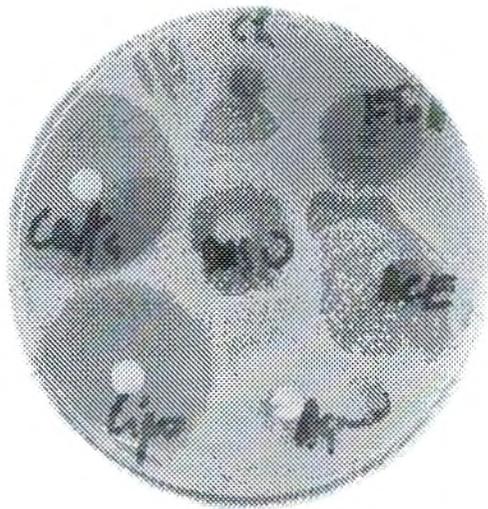
Nous pouvons conclure que, des huit produits synthétisés seuls trois ont présenté une activité antibactérienne plus élevée que celle de la Lawsone vis-à-vis de *S.aureus* (de quatre jusqu'à 16 fois). Ceci nous fait penser que le greffage des groupements acétonitriles sur la position 4 du noyau 1,4 naphthoquinone provoque une diminution de l'activité des dérivés de la Lawsone et que le pôle cétone en position 4 fait partie intégrante du principe actif de la Lawsone et des naphthoquinones d'une manière générale.

Nous suggérons de changer le site greffage et de s'intéresser aux positions 2 et 3 du noyau naphthoquinone tout en utilisant des groupements chlorés et nitrés qui semblent optimiser l'activité antibactérienne.

### III.3 Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits bruts

Ces dernières années, ont été marquées par le peu de nouvelles molécules antibiotiques commercialisées et par l'apparition de la résistance des bactéries pathogènes humaines aux antibiotiques déjà connus. Ceci est dû particulièrement à l'usage abusif des antibiotiques. Cette situation alarmante a fait que de nombreuses études sont actuellement menées pour mettre en valeur de nouvelles drogues antimicrobiennes d'origine naturelle (**Ahmad et beg, 2001**). Les propriétés antimicrobiennes ainsi que l'usage des feuilles de *L.inermis* pour lutter contre certaines maladies infectieuses ont été rapportées dans des études variés (**Malekzadeh, 1968 ; Sharma, 1990 ; Muhammad et Muhammad, 2005**).

Dans cette partie de notre travail, nous avons voulu évaluer l'activité antibactérienne des feuilles de la plante *L.inermis*. Sachant que la plante *L.inermis* est une espèce qui est très riche en composés naphthoquinoniques et que la Lawsone existe dans cette plante de à des proportions variant entre 0,4 à 1,5% de matière sèche organique (**Kirkland et Marzin, 2003 ; McMillan et al., 2004**), nous avons essayé d'illustrer l'implication de la Lawsone dans l'activité de la plante *L.inermis* par la réalisation d'une série de macérations à l'aide de six solvants différents.



**Photo 24.** L'activité antibactérienne des différents extraits des feuilles de *L.inermis* vis-à-vis de *S.aureus*



**Photo 25.** L'activité antibactérienne des différents extraits des feuilles de *Linermis* vis-à-vis d'*E.faecalis*

### III.3.2 Etude de la CMI des différents extraits bruts

L'ensemble des extraits bruts des feuilles de *L.inermis* a fait l'objet d'une deuxième étude qui a porté sur l'évaluation de leur activité antibactérienne par le biais de la méthode des dilutions sur milieu solide ou CMI en milieu solide.

Les résultats de cette étude (tableau 12) concordent avec ceux obtenus dans la première méthode vis-à-vis des bactéries à gram positive et non pas vis-à-vis des souches à grams négative.

Ainsi, tous les extraits qui ont montré une zone d'inhibition précédemment ont révélé une inhibition de la croissance à l'intervalle de concentration utilisée. Cette fois ci toutes les souches se sont montrées sensibles à la différence de la méthode de diffusion où simplement les bactéries à grams positives étaient sensibles.

**Tableau 12 :** CMI (mg/ml) des différents extraits bruts des feuilles de *L.inermis*

| Composés                  | <i>P.aeruginosa</i>   | <i>E.coli</i>          | <i>S.aureus</i>       | <i>E.faecalis</i>    |
|---------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|
| Lawsonie                  | 2,048                 | 1,024                  | 0,512                 | 2,048                |
| Extrait DMSO *            | 4,690                 | 3,120                  | 3,120                 | 3,120                |
| Extrait aqueux à froid *  | -                     | -                      | -                     | -                    |
| Extrait aqueux à chaud*   | -                     | -                      | -                     | -                    |
| Extrait éthanolique       | 3,45                  | 2,30                   | 2,30                  | 2,30                 |
| Extrait Acétate d'éthyle  | 3,50                  | 2,62                   | 2,62                  | 2,6                  |
| Extrait Ether diéthylique | -                     | -                      | -                     | -                    |
| Extrait chloroforme       | -                     | -                      | -                     | -                    |
| Ciprofloxacine            | 0,25 10 <sup>-3</sup> | 0,008 10 <sup>-3</sup> | 0,25 10 <sup>-3</sup> | 0,5 10 <sup>-3</sup> |
| Gentamycine               | 10 <sup>-3</sup>      | 0,5 10 <sup>-3</sup>   | 0,25 10 <sup>-3</sup> | 8 10 <sup>-3</sup>   |

- : pas de CMI observée à l'intervalle de concentration utilisée

\* : résultats par rapport au poids de la matière végétale

L'extrait par le DMSO s'avère toujours actif auquel on attribue la meilleure activité (CMI = 3,120-4,690mg/ml par rapport au poids de la matière végétale). Cependant toutes les souches révèlent une sensibilité à un niveau presque identique, aux deux extraits par l'éthanol et par l'acétate d'éthyle. Les CMI obtenues avec ces deux extraits sont quantitativement plus élevées que celles obtenues avec l'extrait par le DMSO. On peut penser que ces deux solvants : l'éthanol et l'acétate d'éthyle, extraient les mêmes composés qui sont à l'origine de l'activité antibactérienne des feuilles de la plante. Cependant, les extraits bruts chloroformiques, aqueux à froid et aqueux à chaud semblent être inactifs à l'intervalle de concentration utilisée.

Les résultats de la CMI de la Lawsonie ne semblent pas être très éloignés de ceux obtenus pour les extraits bruts. Sachant que le taux de Lawsonie dans nos extraits est d'environ 0,1-0,38mg, on peut suggérer que l'activité antimicrobienne des feuilles du henné est largement influencée par l'action de la Lawsonie. Toutefois, la Lawsonie n'est pas le seul composé qui est responsable de la totalité de cette activité, du moins sous la forme libre sachant que la Lawsonie existe dans les feuilles sous forme d'hétéroside (Brunton, 1999).

## VII. L'évaluation de l'activité antifongique

Le choix des souches de champignons est une étape importante dans l'étude du criblage antifongique. Ce choix doit être porté dans un premier temps sur des souches de références sensibles. En ce qui nous concerne, la non disponibilité au niveau de notre laboratoire des souches de références sensibles nous a poussés à mener les tests sur une levure multirésistante de *Candida albicans* de référence ATTC 10231 (Özçelik *et al.*, 2007, Nath *et al.*, 2008) d'une part et sur cinq souches sauvages de moisissures, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* et *penicillium sp* d'autre part.

### IV.1 Evaluation de l'activité antifongique de la Lawsonsone

Le choix de la concentration pour l'étude de l'activité antifongique a été effectué par la réalisation de la CMI de la Lawsonsone vis-à-vis des quatre souches de moisissures par la technique de l'empoisonnement de la nourriture (technique basée sur le mélange du produit à tester avec le milieu de culture des souches). Les résultats (tableau 13 ; photo 26 et photo 27) montrent une inhibition totale de la croissance mycélienne des cinq souches testées à la concentration de **0,2 mg/ml** (concentration de la Lawsonsone dans le milieu de culture), mis à part la souche *R.stolonifer*. Cependant, à une concentration plus basse que **0,2mg/ ml** la croissance débutait pour certaines souches (*F.oxysporum* et *A.flavus*).

Les résultats de l'activité l'antifongique de la substance de référence : l'AmphotéricineB à la concentration de **0,2 mg/ml**, sont les mêmes que ceux de la Lawsonsone vis-à-vis des quatre souches : *F.oxysporum*, *A.niger*, *A. flavus* et *penicillium sp*. Alors qu'à la même concentration que celle de la Lawsonsone (0,2 mg/ml), la souche *R.stolonifer* a montré une sensibilité pour l'Amphotéricine B.

## IV.2. Evaluation de l'activité des dérivés de synthèse

L'intervention des dérivées 1,4 naphtoquinoniques dans l'activité antifongique est une propriété qui a été rapportée par plusieurs auteurs (Meazza *et al.*, 2003, Munday *et al.*, 2007) particulièrement les composés possédant un noyau hydroxy-1,4-naphtoquinone (Wichtl, 1999). Ce qui nous a donc encouragés à tester nos dérivés de synthèse sur les champignons et à essayer d'évaluer cette activité pour vérifier l'apport de la synthèse organique dans l'amélioration de l'activité antifongique.

### IV.2.1. Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis de la levure

L'évaluation de l'activité antifongique des dérivées de synthèse vis-à-vis de la souche multirésistante de *C.albicans* a été réalisée par la technique de diffusion sur milieu solide inspirée des recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (Espinel-ingroff, 2007).

Les résultats obtenus (tableau 14) ne nous montrent aucune zone d'inhibition intéressante de la Lawsone et des dérivés de synthèse vis-à-vis de la souche *C.albicans* à la différence de l'antifongique de référence : Amphotéricine B qui montre une *bonne activité*.

**Tableau 14.** Zones d'inhibition (mm) des dérivés de synthèse vis-à-vis de *C.albicans*.

|                           | Amph B | L     | P01  | P02  | P03  | P04  | P05  | P06  | P07  | P08  |
|---------------------------|--------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <b>Zones d'inhibition</b> | 22,2   | 08,00 | 06,0 | 06,0 | 06,0 | 06,0 | 06,0 | 06,0 | 06,0 | 06,0 |

disques chargés avec 0,2mg/disque

Ces résultats nous amènent à conclure que les dérivés de synthèse sont complètement inactifs vis-à-vis de *C.albicans* ATTC 10231, alors que la Lawsone paraît dotée une légère activité contre la levure *C.albicans*.

produits testés ont exercé un léger retardement de la croissance (au minimum 1,54%), mais ces résultats ne sont pas pris en considération.

La souche *R.Stolinife*, est la souche la plus résistante rencontrée dans notre étude et qui ne montre aucune sensibilité vis-à-vis de tous les produits testés sauf pour l'AmphotéricineB.

D'après les résultats obtenus avec la Lawsone, nous pouvons dire que la synthèse n'a pas contribué à l'amélioration de l'activité antifongique. En fait, la Lawsone est un dérivé de la famille des naphtoquinones qui détient de ce fait deux extrémités cétone libres. La synthèse des produits avait pour objectif de bloquer l'un des deux sites cétones. Par cette action nous pensions diminuer la toxicité et améliorer l'activité de la Lawsone, ce qui s'est révélé être erroné.

A travers ces observations, nous rejoignons certains auteurs qui précisent que les dérivés naphtoquinones possèdent une activité antimicrobienne et que le pôle dicétone est responsable principalement de l'altération des fonctions vitales des microorganismes par leurs facultés de se lier au adhésines, aux polypeptides membranaires et aux enzymes (Cowan, 1999).

Les résultats obtenus avec les champignons joignent ceux obtenus avec les bactéries et confirment que la structure di-cétonique de la Lawsone est un dispositif important dans la génération de son activité.

### IV.3. Evaluation de l'activité antifongique des extraits bruts

Les infections fongiques opportunistes, y compris les mycoses invasives connaissent une augmentation de leurs incidences durant ces deux dernières décennies en raison de la prédominance des conditions d'immunosuppression tel que le HIV-SIDA, la transplantation des organes, le cancer...etc. La recherche de nouveaux médicaments antifongiques d'origine naturelle est intensifiée ces dernières années car les thérapies actuelles ont montré leurs limites et les souches résistantes aux médicaments disponibles sont de plus en plus fréquentes (Liu *et al.*, 2007). En plus des ces propriétés antibactériennes, les feuilles de *L.inermis* sont également connues pour la prévention de l'infection fongique de la peau et du cuir chevelu (Guerrier *et al.*, 1988).

### IV.3.1. Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis de la levure

#### IV.3.1.1. Méthode de diffusion des disques

Dans cette partie du travail, une première étude a été réalisée sur la levure *C.albicans* par la méthode de diffusion en milieu solide. Les six extraits bruts des feuilles de *L.inermis* ont été testés. Les résultats (tableau 16) montrent des zones d'inhibition très rapprochées entre les extraits par le DMSO et l'éthanol comparés à ceux de la Lawsone à **0,2 mg/ml**. Les extraits aqueux à froid, à chaud, éther di-éthylique et chloroforme ne montrent aucune zone d'inhibition.

**Tableau 16.** Zones d'inhibitions (mm) des différents extraits bruts des feuilles de *L.inermis* vis-à-vis de *C.albicans*.

|                                | Amph B* | L*   | DMSO | Aqueux à froid | Aqueux à chaud | EtOH | Ether | chf  |
|--------------------------------|---------|------|------|----------------|----------------|------|-------|------|
| <b>Zones d'inhibition (mm)</b> | 22,2    | 08,0 | 11,7 | 06,0           | 06,0           | 10,0 | 06,0  | 06,0 |

\*Amphotéricine B et Lawsone à 0,2 mg/disque

En terme d'activité, l'extrait par le DMSO peut être classé parmi les produits à *faible activité* alors que l'extrait par l'éthanol et la Lawsone sont classés parmi les produits à *petite activité*.

D'après le tableau 12, on peut penser à écarter l'implication des coumarines, les flavonoïdes et les tanins dans l'activité anti-candida des feuilles de *L.inermis*.

D'après **Guerrier et al., 1988**, l'extrait réalisé par une suspension de 10% de poudre henné du commerce dans l'eau distillée est inactif vis-à-vis d'une souche sensible de *C.albicans*. D'autres travaux (**Abd-el-Malek et al., 1973** et **Habbal et al., 2005**) rapportent que l'extrait éthanolique réalisé à partir des feuilles de henné ne montre aucune activité vis-à-vis d'une souche de *C.albicans* sauvage.

Ceci est en accord avec nos résultats, ce qui nous fait penser que la souche de *C.albicans*, utilisée dans notre travail, résiste fortement aux extraits bruts des feuilles de *L.inermis*. Ce comportement est probablement dû à son potentiel multirésistant ou peut être à l'inactivité probable de nos extraits et de la Lawsone sous sa forme libre (c'est à dire sous forme de 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone) (**Wichtl, 1999**).

L'extrait par l'éthanol a montré la meilleure activité par rapport aux autres extraits testés, notamment avec une inhibition de presque **72%** de la croissance de la souche *F.oxysporum* et à la concentration de **3,7 mg/ml**.

**Tableau 18.** Pourcentages d'inhibitions de la croissance mycélienne des moisissures par différents extraits bruts des feuilles de *L.inermis*.

|                                    | <i>F.oxysporum</i> | <i>A.flavus</i> | <i>A. niger</i> | <i>R.stolonifer</i> | <i>Penicillium sp</i> |
|------------------------------------|--------------------|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------------|
| <b>Lawsonie (0,2 mg/ml)</b>        | 88,29 ± 0,4        | 87,47 ± 1,6     | 90,62 ± 0       | 00,00 ± 0           | 69,02 ± 3,2           |
| <b>Extrait DMSO</b>                | 18,96 ± 0,6        | 00,00 ± 0       | 00,00 ± 0       | 00,00 ± 0           | 21,19 ± 1,4           |
| <b>Extrait aqueux à froid</b>      | 00,00 ± 0          | 00,00 ± 0       | 00,00 ± 0       | 00,00 ± 0           | 00,00 ± 0             |
| <b>Extrait aqueux à chaud</b>      | 00,00 ± 0          | 00,00 ± 0       | 00,00 ± 0       | 00,00 ± 0           | 00,00 ± 0             |
| <b>Extrait éthanol</b>             | <b>71,95 ± 0,7</b> | 00,00 ± 0       | 09,46 ± 0,4     | 00,00 ± 0           | 25,01 ± 2,9           |
| <b>Extrait chloroforme</b>         | 10,65 ± 0          | 00,00 ± 0       | 03,95 ± 0,5     | 00,00 ± 0           | 14,31 ± 2,4           |
| <b>Extrait acétate d'éthyle</b>    | 16,31 ± 1,3        | 00,00 ± 0       | 00,00 ± 0       | 00,00 ± 0           | 10,01 ± 1,7           |
| <b>Extrait éther diéthylique</b>   | 14,73 ± 1,3        | 00,00 ± 0       | 00,00 ± 0       | 00,00 ± 0           | 18,44 ± 2,4           |
| <b>Amphotéricine B (0,2 mg/ml)</b> | 88,29 ± 0,4        | 87,47 ± 1,6     | 90,62 ± 0       | 79,64 ± 0           | 69,02 ± 3,2           |

Les valeurs représentent les pourcentages d'inhibitions de la croissance mycélienne calculées par la formule :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{dc - dt}{dc} \times 100$$

dc= diamètre de boite échantillons, dt= diamètre de la boite témoin

Les autres extraits bruts, à leur tour n'ont montré aucune activité intéressante vis-à-vis de toutes les souches utilisées. Ceci est dû peut être soit à la faible masse de la matière végétale utilisée pour réaliser la macération, soit à la résistance des souches sauvages utilisées dans ce criblage, ou bien la plante *L.inermis* ne présente aucune activité antifongique vis-à-vis des cinq souches utilisées.

En effet, certains travaux indiquent que la teinture du henné est employée comme médicament pour le traitement des mains et des pieds contre les mycoses et que l'activité antimycosique due à Lawsonie (Khare, 2007). Mais rares sont les auteurs qui précisent les souches vis-à-vis desquelles *L.inermis* présente l'activité antifongique. Cependant, l'étude réalisée par Muhammad et Muhammad sur les feuilles de *L.inermis* testées vis-à-vis des

souches *A.niger* et *F.oxysporum* d'origine hospitalière, montre que l'extrait brut aqueux n'est actif qu'à partir de la concentration de 80mg/ml vis-à-vis de *A.niger* et à partir de 30 mg/ml vis-à-vis de *F.oxysporum* (Muhammad et Muhammad, 2005).

A partir du tableau 19 et la littérature (Wichtl, 1999 ; Khare, 2007), on peut penser au rôle probable des polyphénols dans l'activité antifongique divulguée par l'extrait brut éthanolique. Cette activité qui persiste très intéressante jusqu'à la concentration de **1,84 mg/ml** lors de l'étude de la CMI de l'extrait par l'éthanol vis-à-vis de la souche *F.oxysporum* (tableau 14).

**Tableau 19.** CMI de l'extrait brut éthanolique vis-à-vis de *F.oxysporum*

|                       |              |             |            |             |            |             |
|-----------------------|--------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|
| <b>[] en mg/ml</b>    | <b>14,72</b> | <b>7,36</b> | <b>3,7</b> | <b>1,84</b> | <b>0,9</b> | <b>0,46</b> |
| <b>% d'inhibition</b> | 89,01        | 89,01       | 72,72      | 55,75       | 25,45      | 09,90       |

Ces résultats, nous permettent de conclure que l'extrait éthanolique de plante *L.inermis* possède une activité antifongique intéressante vis-à-vis de la souche *F.oxysporum* et que la Lawsone joue un rôle dans cette activité. Il serait intéressant par la suite de tester les extraits de la plante sur d'autres souches telles que les dermatophytes ou les mycoses systémiques.

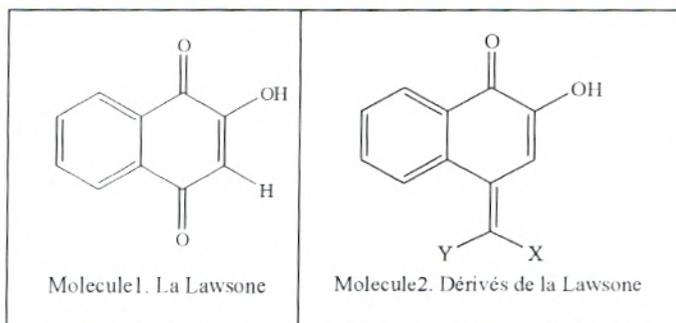


**Photo 28.** L'activité antifongique de l'extrait par l'éthanol vis-à-vis de *F.oxysporum*

# Conclusion & Perspectives

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) de quelques produits de synthèses dérivées naphthoquinoniques et de quelques extraits bruts de la plante *Lawsonia inermis* (le Henné) puis de comparer ces activités à ceux de la Lawsone (principale colorant des feuilles de Henné).

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à évaluer l'activité antimicrobienne de la Lawsone pure obtenue commercialement (molécule 1) et de quelques produits de synthèse (molécule 2) obtenus par greffage de groupements acétonitriles sur la position 4 du noyau 1,4 naphthoquinone de la Lawsone.



La modification du noyau naphthoquinone nous a permis d'obtenir huit produits qui ont été testés sur différentes souches: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *C.albicans* (ATCC 10231), *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* et *penicillium sp.*

Deux méthodes ont été suivies pour réaliser les tests:

- La technique de diffusion sur disques, nous a permis de mettre en évidence une activité intéressante pour la Lawsone vis-à-vis d'*E.coli*, *S.aureus* et *E.faecalis* et pour les produits nommés P04, P05 et P06 vis-à-vis de *S.aureus*.

- L'étude de la concentration minimale inhibitrice (CMI) nous a permis de révéler des CMI intéressantes pour deux produits **P06 (0,032mg/ ml** vis-à-vis de *S.aureus*) et **P05** (0,032mg/ ml vis-à-vis de *S.aureus*) et **P05** (0,256mg/ ml vis-à-vis d'*E. faecalis*)

**Elgorashi E.E. et Van Staden J., 2004.** Pharmacological screening of six Amaryllidaceae species. *Journal of Ethnopharmacology*; 90 : 27–32.

**Epsinel-ingroff.A., 2007.** Standardized Disk Diffusion Method for yeasts. *Clinical Microbiology Newsletter* 29: 97-100.

**Ernst E., 2000.** Adverse effects of herbal drugs in dermatology. *British Journal of Dermatology*; 143: 923-929.

**European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Eucmid), 2003.**

## **F**

**Fahim I. et Hossein A.M., 1954.** A contribution to the study of *Lawsonia inermis*. *Proc. Pharm. Soc. Egypt, Sci. Ed*; 36: 101–107 in **Bakkalil A. T., Jaziri M., Foriers A., Vander Heyden Y., Vanhaelen M. et Hom J., 1997.** Lawsone accumulation in normal and transformed cultures of henna, *Lawsonia inermis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*; 51: 83–87.

**Fang M., Chena J., Xubi., Yang P., Hildebr et Hartmut F., 2006.** Antibacterial activities of inorganic agents on six bacteria associated with oral infections by two susceptibility tests. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 27 : 513–517.

**Ferreira.R. A., Oliveira.A.B., Ribeiro.M.B., Tafuri W.L. et Vitor R.W., 2006.** *Toxoplasma gondii*: In vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 2-hydroxy-3-(1-propen-3-phenyl)-1,4-naphthoquinone alone or combined with sulfadiazine. *Experimental Parasitology*; 113 ; 125–129

**Forestier J.P., 2007.** Henna. Sorption of lawsone by hair. *International Journal of Cosmetic Science*; 4 : 153 – 174.

**Forestier J.P., 1981.** Un séné, *Cassia obovata*, utilisé comme cosmétique: le 'henné neutre'. *International Joirrnalof Cosmetic Science*; 3: 211-226.

**Fouremant P., Mason. J.M., Valencia. R. et Zimmering. S., 1994.** Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. IX. Results of 50 coded compounds tested for the National Toxicology Program, *Environ. Mol. Mut*; 23 :51–63.

**Frosch P.J. et Hausen B.M., 1986.,** Allergologie 9 (8), 351, In **Wichtl Max, 1999.** Plantes thérapeutiques : Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique 3<sup>ème</sup> édition. Edition française par Robert Anton. *Technique et documentation*.

## **G**

**Gallo F., Multari G., Giambenedetti M. et Federici E., 2008.** Chemical Fingerprinting of *Lawsonia inermis* L. using HPLC, HPTLC and Densitometry. *Phytochemical Analysis*; 19: 550–559.

**Gbolade A.A., 2009.** Inventory of antidiabetic plants in selected districts of Lagos State, Nigeria. *Journal of Ethnopharmacolog*;121 : 135–139

**Gerhard Vogel H., Wolfgang Vogel H., Schölkens Bernward A., Jürgen Sandow, Günter Müller et Wolfgang Vogel F., 2002.** Drug discovery and evaluation: *pharmacological assays*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, second edition.

**Ginolhac A., 2006.** Métagénomique et Bioinformatique: Etude des Polykétides Synthèses bactériennes. Thèse de doctorat, l'université LYON I – CLAUDE BERNARD.

**Grotzinger E. et Campbell M. I., 1974.** 4-(2'-carboxyphenyl)-4-oxobutyrate: an obligatory intermediate in Lawsone biosynthesis. *Phytochemistry*; 13 : 923 -926.

**Grotzinger E. et Campbell M. I., 1972b.** Intermediate symmetry in Lawsone biosynthesis. *Phytochemistry*; 11: 675 - 679.

**Guerrier C.J.W., Abdulwahab A., Basr N. et Reville S., 1988.** Henna as an antimicrobial agent. *International Journal of Cosmetic Science*;10: 131-136.

**Gupta S., Ali M., Alam M., Niwa M. et Sakai T., 1992.** 24,β ethylcholest-4-en-3β-ol from the roots of *Lawsonia inermis*. *Phytochemistry*; 31: 2558 -2560.

**Gupta S., Ali M. et Alamo M.S., 1993.** A naphthoquinone from *lawsonia inermis* stem bark. *Phytochemistry*; 33: 723-724.

**Guérin M., Leduc M. M. et Azerad R.G., 1970.** Biosynthèse du noyau naphthoquinonique des menaquinones bactériennes. *Eur. J. Biochem* ;15 : 421-427.

## H

**Habbal.O.A., Al-Jabri.A.A., El-Hag.A.H., Al-Mahrooqi.Z.H. et Al-Hashmi.N.A., 2005.** In-vitro antimicrobial activity of *Lawsonia inermis* Linn (henna). A pilot study on the Omani henna. *Saudi-Med-J*; 26: 69-72.

**Handa G., Kapil A., Sharma S., et Singh J. 1997.** Lawnermis acid a new anticomplementary triterpenoid from *Lawsonia inermis* seeds. *Indian J. Chem. Sect*; 36, 252-256.

**Harrity J. P. A., Kerr W. J. Middlemiss, D. et Scott J. S., 1997.** Total synthesis of parvaquone and the serendipitous discovery of a novel chromium-mediated method for α-lactone formation. *J. Organomet. Chem*; 532: 219-227.

**Hatcher P.E., 2003.** Biological Flora Of The British Isles : *Impatiens noli-tangere* L. *Journal of Ecology*; 91, 147-167.

**Hoffmann O, Ostenhof W. et Krappup O., 1947.** Bacteriostatic quinones and other antibiotics. *Monatsh. Chem*; 77: 86-96.

## J

**Jain S.K., 1973.** Medicinal Plants. *National Book Trust*, India, p. 91.

**Jallad K.N. et Espada-Jallad C., 2008.** Lead exposure from the use of *Lawsonia inermis* (Henna) in temporary paint-on-tattooing and hair dying. *Science of the total environment*;397: 244-250.

**Jelly R., Lewis S. W., Lennard C., Lim K.F. et Almog J., 2008.** Lawsone: a novel reagent for the detection of latent fingermarks on paper surfaces. *Chem. Commun*; 3513–3515.

**Joy P.P., Thomas J., Mathew S., et Skaria B.P. 2001.** Medicinal Plants. Tropical Horticulture Vol. 2. (eds. Bose, T.K., Kabir, J., Das, P. and Joy, P.P.). *Naya Prokash, Calcutta*, pp. 449-632.

## K

**Kaatz M., Elsner P. et Bauer A., 2008.** Body-modifying concepts and dermatologic problems: tattooing and piercing. *Clinics in Dermatology*; 26, 35–44

**Kandil H.H., Al-Ghanem M.M., Sarwat M.A. et Al-Thallab F.S., 1996.** Henna (*Lawsonia inermis* Linn.) inducing haemolysis among G6PD-deficient newborns. A new clinical observation. *Ann Trop Paediatr*, 287–91  
**Kök A. N., Ertekin M. V., Ertekin V. et Avci B., 2004.** Henna (*Lawsonia inermis* Linn.) induced haemolytic anaemia in siblings. *Ltd Int J Clin Pract*; 58: 530–532.

**Katz E., Shipway N. A. et Willner I., 2003.** Handbook of Fuel Cells – Fundamentals, Technology and Applications, Edited by Wolf Vielstich, Hubert A. Gasteiger, Arnold Lamm. Volume 1: *Fundamentals and Survey of Systems*. John Wiley & Sons, Ltd.

**Kazandjieva.J., Grozdev.I. et Tsankov.N., 2007.** Temporary henna tattoos. *Clinics in Dermatology*; 25, 383–387.

**Khare C.P., 2007.** Indian Medicinal Plants. *Springer Science+BusinessMedia, LLC*.

**Kök A. N., Ertekin M. V., Ertekin V. et Avci B., 2004.** Henna (*Lawsonia inermis* Linn.) induced haemolytic anaemia in siblings. *Ltd Int J Clin Pract*; 58: 530–532.

**Kumar R. T., Singh D., Singh J., Yadav V., Pathak A.K., Dabur R., Chhillar A.K., Singh R., Sharma G.L., Chandraa R. et Verma A.K., 2006.** Synthesis and antibacterial activity of substituted 1,2,3,4-tetrahydropyrazino [1,2-*a*] indoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 16: 413–416.

**Kraling M.E.K, Jung C.T. et Bronaugh R.L., 2007.** Absorption of lawsone through human skin. *Cutan Ocul Toxicol*; 26(1): 45  
**Jallad Karim N. et Espada-Jallad Cyntia., 2008.** Lead exposure from the use of *Lawsonia inermis* (Henna) in temporary paint-on-tattooing and hair dying. *Science of the total environment*; 397: 244-250.

## L

**Laval R., 2008.** LE HENNÉ, La plante aux multiples usages. [http://www.imderplam.com/interplantin/fiches\\_plantes/henne.htm](http://www.imderplam.com/interplantin/fiches_plantes/henne.htm)

**Le Coz C. J., 2001.** Risques des peintures cutanées ou tatouages labiles au « henné noir ». *Rev Fr Allergol Immunol Clin* ; 41 : 504-9.

**Lekouch N., Sedki A., Nejmeddine A., et Gamon S., 2001.** Lead and traditional Moroccan pharmacopoeia. *The Science of the Total Environment*; 280 ; 39-43.

**Lin P.H., Pan W.C., Kang Y.W., Chen Y.L., Lin C.H., Lee M.C., Chou Y.H. et Nakamura J., 2005.** Effects of naphthalene quinonoids on the induction of oxidative DNA

damage and cytotoxicity in calf thymus DNA and in human cultured cells, *Chem. Res. Toxicol*; 18: 1262–1270.

**Liu M., Seidel V., Katerere D.R. et Gray A.I., 2007.** Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. *Methods*; 42 : 325–329.

**Luo W., Meng X., Xiang J. , Duan Y., Cheng G. et Ji Z., 2008.** Synthesis, characterization and bioactivity of four novel trinuclear copper(II) and nickel(II) complexes with pentadentate ligands derived from N-acylsalicylhydrazide. *Inorganica Chimica Acta*; 361 :2667–2676.

## **M**

**Malekzadeh F., 1968.** Antimicrobial Activity of *Lawsonia inermis* L. *Applied MicroBioLoGy*; 16: 663-664.

**Malekzadeh F. et Shabestari P. P., 1989.** Therapeutic effects and in vitro activity of an extract from *Lawsonia inermis*. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*; 1: 7-12

**Matulich J. et Sullivan J., 2005.** A temporary henna tattoo causing hair and clothing dye allergy. *Contact Dermatitis*; 53: 33–36.

**McMillan D.b.C., Snehal D. S., John E. Oatis, J.r. et David J. J., 2004.** Role of Oxidant Stress in Lawsons-Induced Hemolytic Anemia. *toxicological sciences*; 82: 647–655.

**Meazza G., Dayan F.E. et Wedge D.E., 2003.** Activity of quinones on *Colletotrichum* species. *J. Agric. Food Chem.* 51: 3824–3828 in **Munday Rex, Smith Barry L. et Munday Christine M., 2007.** Structure-activity relationships in the haemolytic activity and nephrotoxicity of derivatives of 1,2- and 1,4-naphthoquinone . *J. Appl. Toxicol*; 27: 262–269.

**Mehendale A.R. et Thomson R.H., 1975.** Binaphthoquinones in *Lomatia Ferruginea*. *Phytochemistry* ;14: 801-802.

**Merad Chiali R., 1973.** Contribution à la connaissance de la pharmacopée traditionnelle Algérienne. Les eventaires du Grand-Alger; Partie II. *Thèse de Doctorat d'état en pharmacie, Université d'Alger, Institut des Sciences Médicales*: p142-144.

**Morello A., Pavani M., Garbarino J.A., Chamy M.C., Frey C., Mantilla J., Guerrero A., Repetto Y. et Ferreira J., 1995.** Effects and mode of action of 1,4-naphthoquinones isolated from *Calceolaria sessilis* on tumoral cells and *Trypanosoma parasites*. *Camp. Biochem. Physiok* ; 112 : 119-128.

**Muhammad H. S. et Muhammad S., 2005.** The use of *Lawsonia inermis* linn. (henna) in the management of burn S. *wound infections African Journal of Biotechnology* ;4 : 934-937.

**Munday R., Smith, B.L. et Fowke E.A., 1991.** Haemolytic activity and nephrotoxicity of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone in rats. *J. Appl. Toxicol.* 11: 85–90.

**Munday R., Smith B.L. et Munday C.M., 2007.** Structure-activity relationships in the haemolytic activity and nephrotoxicity of derivatives of 1,2- and 1,4-naphthoquinone . *J. Appl. Toxicol*; 27: 262–269.

## N

**National Clinical Committee Laboratory Standards (NCCLS), 2003.** Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests ; *Approved Standard-Eight Edition*, 23. M2-A8.

**Nair S.M. et Joseyphus S.R., 2008.** Synthesis and characterization of Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes of tridentate Schiff base derived from vanillin and dl- $\alpha$ -aminobutyric acid. *Spectrochimica Acta Part A* ; 70 : 749–753.

**Nath M., Song X., Eng G. et Kumar A., 2008.** Synthesis and spectral studies of organotin(IV) 4-amino-3-alkyl-1,2,4-triazole-5-thionates: *In vitro* antimicrobial activity. *Spectrochimica Acta Part A* ; 70 : 766–774.

**Nils B., Ole C. H. et Steen F. H., 2005.** Survey of chemical substances in kohl and henna products. *Danish Ministry of the Environment, environmental Protection agency*.

**Nohynek G. J., Fautz R., Benech-Kieffer F. et Toutain H., 2004.** Toxicity and human health risk of hair dyes. *Food and Chemical Toxicology* ; 42 : 517–543.

## O

**Ogunbinu A.O., Ogunwande I.A., Walker T.M. et Setzer W.N., 2007.** Study on the essential oil of *Lawsonia inermis* (L) Lythraceae. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* ; 10: 184-188.

**Oliveres-Ghouti C., 2006.** Les risques des tatouages : de l'éphémère à l'éternel... *Journal de pédiatrie et de puériculture* ; 19: 268–271.

**Öllinger K. et Brunmark A., 1991.** Effect of hydroxy substituent position on 1,4-naphthoquinone toxicity to rat hepatocytes. *J. Biol. Chem*; 266: 21496–21503.

**Öllinger K. et Brunk U.T., 1995.** Oxidative stress-induced cellular injury is mediated through lysosomal damage. *Free Radical Biol. Med*; 19:565–574.

**Osman A.M. et Van Noort P.C.M., 2003.** Evidence for Redox Cycling of Lawsone (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone) in the Presence of the Hypoxanthine/Xanthine oxydase System. *J.Appl.Toxicol*; 23: 209-212.

**Otten L. S. et Rosazzag P. J., 1983.** Oxidative Ring Fission of the Naphthoquinones Lapachol and Dichloroallyl Lawsone by *Penicillium notatum*. *The Journal Of Biological Chemistry*; 258: 1610-1613.

**Oyedeji A.O., Ekundayo O. et Koenig W.A., 2005.** Essential Oil Composition of *Lawsonia inermis* L. Leaves from Nigeria. *Journal of Essential Oil Research: JEOR*.

**Özçelik B., Gürbüz I., Karaoglu T. et Yeşilad E., 2007.** Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. *ssp. Microbiological Research*. doi:10.1016/j.micres.2007.05.006.

## P

**Park B.S., Lee H.K., Lee S.E., Piao X.L., Takeoka G.R., Wong R. Y., Ahn Y.J. et Kim J.H., 2006.** Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology*; 105: 255–262

**Paul I., 2001.** Encyclopédie des plantes médicinales. *Dorling Kindersley Limited, Londres*, p: 226.

**Paul L. C., David E. L., Martyn T. S., Lars E. et Bruce N. A., 1984.** Mutagenicity of quinones: Pathways of metabolic activation and detoxification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 1696-1700.

**Pengelly A., 1997.** The constituents of medicinal plants: an Introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicines. *Sunflower Herbals 2<sup>nd</sup> edition*.

**Perrucci S., Mancianti F., Ciont P.L, Flamini G., Morelli I. et Macchioni G., 1994.** *In vitro* antifungal activity of essential oils against some isolates of *Microsporum canis* and *M.gypseum*. *Planta Medi*; 60:184–187.

**Poyraz M., Sari M., Demirci F., Kosar M., Demirayak S. et Büyükgüngör O., 2008.** Synthesis, crystal structure and biological activity of 1-(1H-benzoimidazol-2-yl)-ethanone thiosemicarbazone and its cobalt complex. *Polyhedro*; 27: 2091–2096.

## R

**Radeke H. S., Digits, C.A., Bruner S. D. et Snapper M. L., 1997.** New tools for studying vesicular-mediated protein trafficking: Synthesis and evaluation of illimaquinone analogs in a nonradioisotope-based antisecretory assay. *J. Org. Chem*;62, 2823-2831.

**Robins D. J., Campbell I. M. et Bentley R., 1970.** Glutamate-a precursor for the naphthalene nucleus of bacterial menaquinones. *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 39:1081-1086.

**Roques H., 1960.** Précis de botanique pharmaceutique: Phanérogamie. *Librairie Maloine S.A.*: p 546.

**Rostkowska H., Nowak. M.J., Lapinski L. et Adamowicz.L., 1998.** Molecular structure and infrared spectra of 2-hydroxy-1,4- naphthoquinone; Experimental matrix isolation and theoretical Hartree–Fock and post Hartree–Fock study. *Spectrochimica Acta Part A* ; 54 : 1091–1103.

## S

**Saadaoui B., Bekir J., Akrouf J., Ammar S., Mahjoub A. et Mars M., 2004.** Etude de la composition et du pouvoir antioxydant des composés phénoliques de quelques espèces végétales de l'aride tunisien. *Revue des Régions Arides - Numéro spécial - Actes du séminaire international « les Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales » (SIPAM)* : 316-321.

**Sarker S.D., Nahar L.b et Kumarasamy Y. 2007.** Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* ; 42 : 321–324.

**Sartori G., Bigi, F., Canali G., Maggi R., Casnati G. et Tao X., 1993.** Friedel-Crafts coordinated processes: Highly selective synthesis of hydroxynaphthoquinones. *J. Org. Chem*; 58, 840-843.

**Sauriasari R., Wang D.H., Takemura Y., Tsutsui K., Masuoka N., Sano K., Horita M., Wang B.L. et Ogino K. 2007.** Cytotoxicity of lawsone and cytoprotective activity of antioxidants in catalase mutant *Escherichia coli*. *Toxicology*; 235 :103–111.

**Scientific Committee on Consumer Products (SCCP), 2005.** Opinion on *Lawsonia inermis* (Henna) COLIPA N° C169. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General. Adopted by the SCCP during the 6th plenary meeting of 13.

**Shaukat A., Tanveer H. et Rakhshanda N., 2008.** Optimization of alkaline extraction of natural dye from Henna leaves and its dyeing on cotton by exhaust method. *Journal of Cleaner Production xxx* : 1–6.

**Sharma V.K., 1990.** Tuberculostatic activity of henna (*Lawsonia inermis* Linn.). *Tubercle*; 71, 293-295.

**Singh B.K., Bhojak N., Mishra P. et Garg B.S., 2008.** Copper(II) complexes with bioactive carboxamide: Synthesis, characterization and biological activity. *Spectrochimica Acta Part A* ; 70 : 758–765.

**Shivananda N. B., Isitor.G., Davis. E. M. et Pillai. G. K., 2007.** The Evidence based Wound Healing Activity of *Lawsonia inermis* Linn. *Phytotherapy Research*; 21, 827– 831.

**Siddiqui B.S. et Kardar M.N., 2001.** Triterpenoids from *Lawsonia alba*. *Phytochemistry*; 58: 1195–1198.

**Spyroudis S., 2000.** Hydroxyquinones: Synthesis and Reactivity. *Molecules*; 5. 1291-1330.

**Stamberg J., Werczberger R. et Koltin Y., 1979.** Non-mutagenicity of the hair dye Henna in the Ames test, *Mut. Res*; 62 :383–387.

**Stern, J. L., Hagerman A. E., Steinberg P. D. et Mason P. K., 1996.** Phlorotannin-protein interactions. *J. Chem. Ecol*; 22:1887–1899.

**Sung W.S. , Jung H.J. , Park K., Kim H. S., Lee I.S. , Lee D. G., 2007.** 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (DMHF); antimicrobial compound with cell cycle arrest in nosocomial pathogens. *Life Sciences 80* : 586–591.

**Syamsudin I. et Hending W., 2008.** The effect of Inai (*Lawsonia inermis* Linn) leaves Extract on Blood Sugar Level: An experimental Study. *Research Journal of Pharmacology*; 2: 20-23.

## T

**Talaat S. M. et Hanke M. E., 1961.** The Biochemistry And Physiology Of Henna (*Lawsonia Alba*) : Its Use As A Remedy For Intestinal Amoebiasis. *Transactions of the royal society of Tropical medicine and hygiene.* 55: 56-62.

**Tariq M., Mossa J.S., Al-Yahya M.A., Parmar N.S. et Ageel A.M., 1987.** Evaluation of *Artemisia inculta* for anti-inflammatory activity in rats. *Am. J. ChinMed*;15:127-132 in  
**Dweck A.C., 2002.** Natural ingredients for colouring and styling. *International Journal of Cosmetic Science*; 24, 287-302.

**The Scientific Committee On Cosmetic Products And Non-Food Products Intended For Consumers (SCCNFP), 2004.** Opinion concerning lawsone colipa n° c146.

**Tikkanen L., Matsushima T., Natori S. et Yoshihira K., 1983.** Mutagenicity of natural naphthoquinones and benzoquinones in the Salmonella/microsome test. *Mutat Res*;124 : 25-34.

**Tripathi R.D., Srivastava H.S. et Dixit S.N.,1978.** A fungitoxic principle from the leaves of *Lawsonia inermis lam.* *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*; 34: 51-52.

## V

**Vaysse L., 1990.** Synthèses de Benzoquinones et de naphthoquinones à activité cutanée potentielle. *Thèse de doctorat, Strasbourg, France*: P 10-12.

**Velíšek J. Davídek J. et Cejpek K., 2007.** Biosynthesis of Food Constituents: Natural pigments, part 1 – a review. *Czech J. Food Sci*; 25 : 291–315.

## W

**Wikipédia, 2008.** [www.Wikipédia.com](http://www.Wikipédia.com)

**Wichtl M., 1999.** Plantes thérapeutiques : Tradition, pratique officinale. Science et thérapeutique 3<sup>ème</sup> édition. Edition française par Robert Anton. *Technique et documentation.* p: 262-264.

**Wolfgang K., Johannes H., Monika L., 2000.** Kinetics of inhibition of human and rat dihydroorotate dehydrogenase by atovaquone, lawsone derivatives, brequinar sodium and polyporic acid. *Chemico-Biological Interactions 124*: 61–76.

**Wong K. C. et Teng Y. E., 1995.** Volatile components of *Lawsonia inermis L.* flowers. *Journal of Essential Oil Research*; 7: 425-8.

**Y**

**Yan Y, Xiao F.S., Guodong Z., Kaiji Z. et Chiguang F., 2000.** Selective catalytic oxidation of naphthol to 2-hydroxyl-1,4-naphthoquinone by hydrogen peroxide over metalloporphyrin catalysts. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*; 157 :65–72.

**Yongmoon H, 2007.** Synergic effect of grape seed extract with amphotericin B against disseminated candidiasis due to *Candida albicans*. *Phytomedicine*; 14 : 733–738.

**Yogisha S., Samiulla S. D., Prashanth D., Padmaja R., Amit A., 2002.** Trypsin inhibitory activity of *Lawsonia inermis*. *Fitoterapia*; 73 :690–691.

**Z**

**Zhang L. et Arnold L. D., 2005.** Natural Products : Drug Discovery and Therapeutic Medicine. *Humana Press Inc.*

**Zhang Y. et Lewis K., 1997.** Fabatins: new antimicrobial plant peptides. *FEMS Microbiol. Lett* ; 149:59–64.

Source des photo de henné:

[http://www.iavcha.ac.ma/galleries\\_photo/1178809685.jpg](http://www.iavcha.ac.ma/galleries_photo/1178809685.jpg)



# Annexes

## Annexe I : Milieux de culture

### **Bouillon Nutritif (BN, Fluka, BioChemika)**

#### Formule (en g/l)

|                    |        |
|--------------------|--------|
| Extrait de viande  | 3,0    |
| Peptone            | 5,0    |
| Chlorure de sodium | 5,0    |
| Eau Distillée      | qsp 1L |

pH= 7,2 ( $\pm 0,2$ ) à 37°C

Suspendre 13g de la poudre dans un litre d'eau distillée, en suite stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15min.

### **Gélose Nutritive (GN, Fluka, BioChemika, 70148)**

#### Formule (en g/l)

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| Extrait de viande de bœuf | 1,0    |
| Extrait de levure         | 2,0    |
| Peptone                   | 5,0    |
| Chlorure de sodium        | 5,0    |
| Agar                      | 15,0   |
| Eau Distillée             | qsp 1L |

pH = 7,2 ( $\pm 0,2$ ) à 37°C

Suspendre 28g de la poudre dans un litre d'eau distillée ensuite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15min

### **Gélose Mueller Hinton (Fluka BioChemika, 70191)**

#### Formule (en g/l)

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| Infusion de viande de bœuf | 4,0    |
| Hydrolysate de caseine     | 17,5   |
| Amidon                     | 1,5    |
| Agar                       | 15,0   |
| Eau Distillée              | qsp 1L |

pH= 7,4 ( $\pm 0,2$ ) à 37°C.

Suspendre 38g de la poudre dans un litre d'eau distillée ensuite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15min.

---

### **Bouillon au cœur cerveau (BHIB, INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE)**

#### Formule (en g/l)

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Extrait de cerveau  | 7,8    |
| Extrait de cœur     | 9,7    |
| Peptone             | 10,0   |
| NaCl                | 5,0    |
| di-sodium Phosphate | 2,5    |
| Dextrose            | 2,0    |
| Eau Distillée       | qsp 1L |

pH= 7,4 ( $\pm 0,2$ ) à 37°C.

Suspendre 37g de la poudre dans un litre d'eau distillée, chauffer si c'est nécessaire pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15min.

### **Bouillon Sabouraud**

#### Formule (en g/l)

|                  |        |
|------------------|--------|
| Peptone pepsique | 10     |
| Glucose          | 20     |
| Eau Distillée    | qsp 1L |

pH= 5,8 ( $\pm 0,2$ ) à 37°C.

Suspendre 30g de la poudre dans un litre d'eau distillée, chauffer si c'est nécessaire pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15min.

### **Gélose Sabouraud**

#### Formule (en g/l)

|                  |        |
|------------------|--------|
| Peptone pepsique | 10     |
| Glucose          | 20     |
| Agar             | 15     |
| Eau Distillée    | qsp 1L |

pH=5,8 ( $\pm 0,2$ ) à 37°C.

Suspendre 45g de la poudre dans un litre d'eau distillée ensuite chauffé sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et la stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 15min.

## Annexe II : Tableaux

**Tableau 21.** Les rendements obtenus avec les différents solvants.

| Solvants | DMSO | Ethanol | Acétate<br>d'éthyle | Chloroforme | Ether di-<br>éthylique | Eau |   |
|----------|------|---------|---------------------|-------------|------------------------|-----|---|
| Rdt en % | -    | 8,03    | 4,75                | 3,25        | 1,25                   | -   | - |

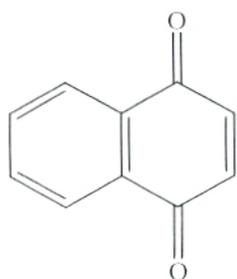
**Tableau 21:** Limites inférieurs des diamètres d'inhibitions des produits de synthèse  
vis-à-vis *F.oxysporum*

| Concentrations mg/ml | 0,200 | 0,150 | 0,100 | 0,050 | 0,025 | 0,0125 |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| <b>Lawsone</b>       | 88,95 | 69,30 | 42,35 | 17,12 | 7,36  | 5,34   |
| <b>p 01</b>          | 50,35 |       | 43,64 | 44,75 | 41,06 |        |
| <b>p 02</b>          | 52,63 | -     | -     | -     | -     | -      |
| <b>p 03</b>          | 50,00 |       | 29,46 | 23,92 | 7,85  | -      |
| <b>p 05</b>          | 56,13 | -     | -     | -     | -     | -      |
| <b>p 06</b>          | 37,54 | 33,36 | 30,25 | 21,36 | 17,12 | 12,85  |

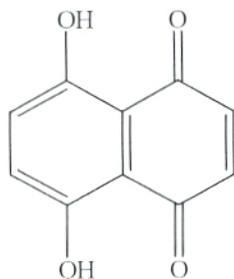
**Tableau 22.** Limites inférieurs des diamètres d'inhibitions des produits de synthèse  
vis-à-vis *A.flavus*

| Concentrations mg/ml | 0,200 | 0,150 | 0,100 | 0,050 | 0,025 | 0,0125 |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| <b>Lawsone</b>       | 91,42 | 61,32 | 35,28 | 00,00 | 00,00 | 00,00  |
| <b>p 09</b>          | 51,1  | 08,21 | 00,00 | 00,00 | 00,00 | 00,00  |
| <b>p 11</b>          | 50,00 | 00,00 | 00,00 | 00,00 | 00,00 | 00,00  |
| <b>p 12</b>          | 44,19 | 00,00 | 00,00 | 00,00 | 00,00 | 00,00  |

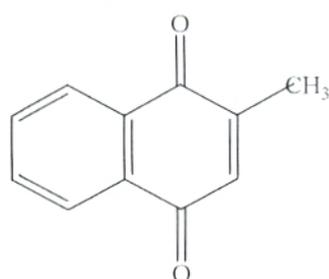
### Annexe III : Structures chimiques



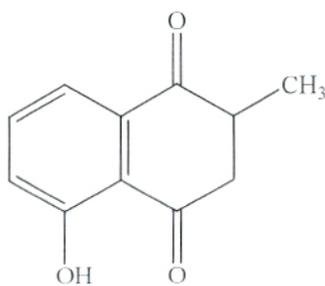
1,4 naphthoquinone



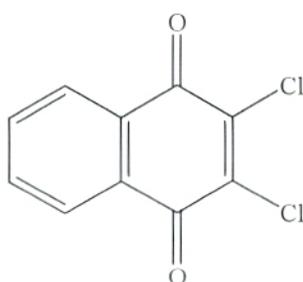
Naphthazarin



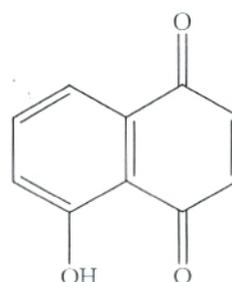
Ménadione



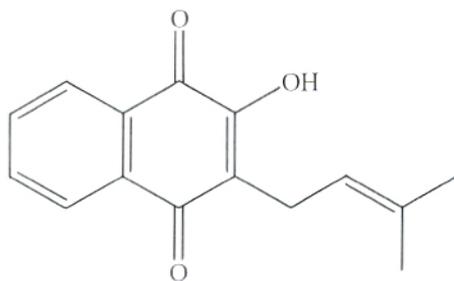
Plumbagin



Dichlone



Juglone



Lapachol

Figure 29. Structure chimiques des dérivés 1,4 naphthoquinones





تهتم هذه الدراسة بتقييم النشاط المضاد للبكتيريا و النشاط المضاد للفطريات ل :

- لوسون (Lawson) نقية أو هيدروكسي نפטوكينون (hydroxynaphtoquinone) (الملون الرئيسي لأوراق الحناء).
- العديد من المنتجات المركبة الناتجة عن طريق التعديلات لنواة النפטوكينون (naphtoquinone) للوسون.
- المستخلصات الطبيعية التي حصل عليها عن طريق نقع أوراق الحناء في مختلف المذيبات.
- نوعين من الطرق تم تنفيذها :
- تقنية إنتشار الأقراص ، التي أظهرت وجود نشاط جيد للوسون ضد *E.coli* و *E.feacalis* و *S.aureus* و نشاط متوسط إتجاه المنتجين i2 (p5) و h2 (6) ضد *S.aureus*.
- الحد الأدنى للتركيز المثبط ، للمنتجات الثلاث التي أبدت فعالية أكثر . التركيز الأدنى المثبط المتحصل عليه هو كالتالي  $0.032 = p06$  ملغ / مل ضد *S.aureus* و  $0.064 = p05$  ملغ / مل ضد *S.aureus*.
- النتائج التي تم الحصول عليها تجاه الفطريات لم تكشف عن أي نشاط للمنتجات المركبة . لذا نستنتج أن تعديل نواة النפטوكينون لن يحسن من نشاط الوسون المضادات للميكروبات.
- النتائج التي تم الحصول عليها من المستخلصات الطبيعية تسمح لنا أن نستنتج أوراق الحناء تملك نشاط مضاد للميكروبات ، و الذي يرجع للمكون الرئيسي : لوسون

الكلمات المفتاحية : لوسون ، مضاد البكتيريا ، مضاد الفطريات ، *Lawsonia inermis* (الحناء) ، المنتجات المركبة

## Résumé

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à évaluer l'activité antibactérienne et antifongique de :

- La Lawsone pure : ou hydroxynaphtoquinone (principal colorant des feuilles de Henné).
- Huits produits de synthèses, obtenus par modification du noyau naphtoquinone de la Lawsone.
- Extraits naturels obtenus par macération des feuilles de Henné dans divers solvants.

Deux types de méthodes ont été mis en œuvre :

- la technique de diffusion sur disques, nous a permis de mettre en évidence une bonne activité pour la Lawsone vis à vis d'*E.coli*, *S.aureus* et *E.feacalis* et une activité moyenne des deux produits nommés 2i (5) et 2h (6) vis-à-vis de *S.aureus*.
- L'étude de la concentration minimale inhibitrice, a été effectuée sur les trois produits qui ont montré les activités les plus intéressantes. Les CMI obtenues sont considérées dans ce travail comme étant intéressantes (CMI du  $p06 = 0,032 \text{mg/ml}$  vis-à-vis de *S.aureus*, CMI du  $p05 = 0,064 \text{mg/ml}$  vis-à-vis de *S.aureus*).

Les résultats obtenus vis-à-vis des champignons n'ont révélé aucune activité intéressante des dérivés de synthèse. Ce ce qui nous a ramener à conclure que la modification par voie de synthèse du noyau naphtoquinone n'augmenterait pas d'avantage l'activité antimicrobienne de la Lawsone.

Les résultats des extraits naturels obtenus nous ont permit de conclure que les feuilles de Henné possèdent bien un pouvoir antimicrobien et que cette activité serait due à son principal colorant : la Lawsone.

Mots clés : Lawsone, activité antibactérienne, Activité antifongique, *Lawsonia inermis* (Henné), Produits de synthèse.

## Abstract

In our work, we were initially interested to evaluate the antimicrobial activity of:

- Pure Lawsone or hydroxynaphtoquinone (principal colouring of Henna leaves).
- Eight synthetic products obtained by modification of the Lawsone naphtoquinone ring.
- Natural extracts obtained by maceration of Henna leaves in various solvents.

Two types of methods have been implemented:

- The diffusion disk technique, allowed us to demonstrate a good activity of Lawson against *E. Coli*, *S.aureus* and *E.faecalis* and an average activity of the two products named 2i (5) and 2h (6) against *S.aureus*.
- The study of minimum inhibitory concentration was carried out on three products that have shown the most interest qctivity. MICs obtained are considered in this work as interesting (MIC of  $p06 = 0.032 \text{mg/ml}$  against *S.aureus*, CMI of  $p05 = 0:064 \text{mg/ml}$  against *S.aureus*).

The results obtained against the fungi did not reveal any interesting activity of synthetic derivatives. This what we bring to conclude that the modification through synthesis of the naphtoquinone ring would not benefit the antimicrobial activity of Lawson.

The results of natural extracts obtained permit us to conclude that the leaves of henna have much antimicrobial power and that is due to its major dye: the Lawson.

Key words: Lawsone, antibacterial activity, antifongic Activity, *Lawsonia inermis* (Henna), synthesis product.