

Université de Franche-Comté
UFR DES SCIENCES MEDICALES ET PHARMACEUTIQUES

THESE

présentée par
Brice MOULARI

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Franche-Comté
Mention : Sciences de la Vie et de la Santé

PROPRIETES ANTIMICROBIENNES *IN VITRO* D'EXTRAITS DE DEUX PLANTES AFRICAINES - RÔLE DE L'ASTILBINE - POTENTIALISATION DU POUVOIR ANTIBACTERIEN PAR NANOENCAPSULATION.

soutenue le 22 Juin 2005

Membres du jury :

J-P. CHAUMONT	Professeur à l'Université de Franche-Comté	(Président du jury)
Ph. BOUCHET	Professeur à l'Université de Reims	Rapporteur
F. PIROT	Maître de Conférences - HDR à l'Université de Lyon I	Rapporteur
J. MILLET	Professeur à l'Université de Franche-Comté	(Directeur de Thèse)
Y.C. GUILLAUME	Professeur à l'Université de Franche-Comté	
F. MUYARD	Maître de Conférences - HDR à l'Université de Franche-Comté	

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
UFR DE MEDECINE-PHARMACIE DE BESANÇON

DOYEN

Professeur Hugues BITTARD

ASSEESSEURS MEDECINE

Professeur Daniel **SECHTER**
Professeur Patrick **HERVE**
Professeur Georges **MANTION**
M. Christian **MOUSSARD**

ASSEESSEURS PHARMACIE

Professeur Jean-François **ROBERT**
Professeur Yves **GUILLAUME**
Professeur Estelle **SEILLES**
M. Eric **CAVALI**

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

Mme Sylvie **SCHEUBEL**

DOYENS HONORAIRES

Professeur Paul **LAUGIER**
Recteur Pierre **MAGNIN**
Professeur Louis **COTTE**
Professeur Jacques **BERTHELAY**
Professeur Pierre **GRANDMOTTET**
Professeur Gabriel **CAMELOT**
Professeur Dominique **FELLMANN**

DIRECTEURS HONORAIRES DE L'UERBEM

Professeur Claude **BUGNON**
Professeur Jean-Pierre **MAURAT**
Professeur André **PETERS**

PROFESSEURS HONORAIRES

Professeur Jean-Pierre **CARBILLET**
Professeur Paul **GILE**
Professeur Michel **GILLET**
Professeur Christiane **GUINCHARD**
Professeur Michel **GUIDET**
Professeur Alain **NEIDHARDT**
Professeur Michel **LAB**
Professeur Michel **ONIMUS**
Professeur André **OPPERMANN**
Professeur Gérard **PAGEAUT**
Professeur Jacques **PANOUSE**
Professeur André **ROTH**
Professeur Raoul **STEIMLE**
Professeur Christiane **TEYSSIER-COTTE**
Professeur Francis **WEILL**

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Docteur Thérèse **BARALE**
Docteur Yvette **BECHTEL**
Madame Nicole **CARDOT**
Docteur Marie-Jeanne **DUPOND**
Docteur Robert **LENYS**
Docteur Monique **NEIDHARDT**

MEDECINE

PROFESSEURS

M. Hubert **ALLEMAND**
M. Didier **AUBERT**
M. François **AUBIN**
M. Jean-Pierre **BASSAND**
Mme Yvette **BERNARD**
M. Hugues **BITTARD**
M. Paul **BIZOUARD**
Mme Annie **BOILLOT**
M. Jean-François **BONNEVILLE**
M. Jean-François **BOSSET**
M. Jean-Luc **BRESSON**
M. Gabriel **CAMELOT**
M. Gilles **CAPELLIER**
M. Franck **CARBONNEL**
M. Jean-Claude **CARDOT**
M. Jean-Marc **CHALOPIN**
M. Jean-Claude **CHOBAUT**
M. Sydney **CHOCRON**
M. Jean-Luc **CHOPARD**
M. Joël **COMBE**
M. Alain **CZORNY**
M. Jean-Charles **DALPHIN**
M. Benoît **DE BILLY**
M. Bernard **DELBOSC**
M. Alain **DEPIERRE**
M. Gilles **DUMOULIN**
M. Jean-Louis **DUPOND**
M. Joseph **ETIEVENT**
M. Dominique **FELLMANN**
M. Patrick **GARBUJO**
M. Jean-Pierre **GAUME**
Mme Solange **HADNI-BRESSON**
M. Georges **HERBEIN**
M. Patrick **HERVE**
M. Bruno **HEYD**
M. Bruno **HOEN**
M. Philippe **HUMBERT**
Mme Bernadette **KANTELIP**
M. Jean-Pierre **KANTELIP**
M. Bruno **KASTLER**
M. René **LAURENT**

EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
CHIRURGIE INFANTILE
DERMATOLOGIE
CARDIOLOGIE ET MALADIES VASCULAIRES
CARDIOLOGIE ET MALADIES VASCULAIRES
UROLOGIE
PEDOPSYCHIATRIE
ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
RADIOTHERAPIE
BIOLOGIE DU DEVELOPPEMENT ET DE LA REPRODUCTION
CHIRURGIE VASCULAIRE
REANIMATION MEDICALE
GASTROENTEROLOGIE
BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
NEPHROLOGIE
OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE
MEDECINE LEGALE
CHIRURGIE VASCULAIRE
NEUROCHIRURGIE
PNEUMOLOGIE
CHIRURGIE INFANTILE
OPHTALMOLOGIE
PNEUMOLOGIE
PHYSIOLOGIE
MEDECINE INTERNE
CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE
HISTOLOGIE CYTOLOGIE
CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIE
MEDECINE GENERALE
HEPATHOLOGIE
VIROLOGIE
HEMATOLOGIE
CHIRURGIE GENERALE
MALADIES INFECTIEUSES
DERMATO-VERNEREOLOGIE
ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
RADIOLOGIE IMAGERIE MEDICALE
DERMATO-VERNEREOLOGIE

Mme Danièle **LENYS**

M. Robert **MAILLET**

M. Georges **MANTION**

M. Jacques **MASSOL**

M. Alain **MENGET**

M. Jean-Philippe **MIGUET**

M. Guy **MONNIER**

M. Michel **MONTARD**

Mme Christiane **MOUGIN**

M. Thierry **MOULIN**

M. Georges **NARBONI**

M. Bernard **PARATTE**

M. Renaud **PIARROUX**

M. Xavier **PIVOT**

M. Patrick **PLESIAT**

M. Jacques **REGNARD**

M. Bernard **RICBOURG**

M. Christophe **ROUX**

M. Lucien **RUMBACH**

M. Yves **SAINT-HILLIER**

M. Emmanuel **SAMAIN**

M. François **SCHIELE**

M. Daniel **SECHTER**

M. Pierre **TIBERGHIE**

M. Yves **TROPET**

M. Jean-François **VIEL**

M. Daniel **WENDLING**

HISTOLOGIE ET CYTOLOGIE

GYNECOLOGIE ET OBSTETRIQUE

CHIRURGIE MEDICALE

THERAPEUTIQUE

PEDIATRIE

HEPATHOLOGIE

ANATOMIE

OPHTALMOLOGIE

BIOLOGIE CELLULAIRE

NEUROLOGIE

ENDOCRINOLOGIE ET MALADIES METABOLIQUES

MEDECINE PHYSIQUE

PARASITOLOGIE MYCOLOGIE

ONCOLOGIE FONDAMENTALE

BACTERIOLOGIE, VIROLOGIE

PHYSIOLOGIE

STOMATOLOGIE ET CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE

BIOLOGIE DU DEVELOPPEMENT ET DE LA REPRODUCTION

NEUROLOGIE

NEPHROLOGIE

ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATIONCHIRURGICALE

CARDIOLOGIE ET MALADIES VASCULAIRES

PSYCHIATRIE D'ADULTES

IMMUNOLOGIE

CHIRURGIE PLASTIQUE, RECONSTRUCTIVE ET
ESTHETIQUE

BIostatistiques ET Informatique MEDICALE

RHUMATOLOGIE

PROFESSEURS EMERITES

M. François **BARALE**

M. Pierre **BECHTEL**

Mme Suzanne **BERTHELAY**

M. Roland **BIDET**

M. Michel **BITTARD**

M. Claude **BUGNON**

M. Pierre **CARAYON**

M. Claude **COLETTE**

M. Henry **DUVERNOY**

M. Pierre **GRANDMOTTET**

M. Jean-Charles **HENRY**

M. Robert **LECONTE DES FLORIS**

M. Pierre **MAGNIN**

M. Jean-Pierre **MAURAT**

ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE

PHARMACOLOGIE CLINIQUE

PHYSIOLOGIE

BIOPHYSIQUE TE TRAITEMENT DE L'IMAGE

UROLOGIE

HISTOLOGIE, EMBRYOLOGIE, CYTOGENETIQUE

GASTROENTEROLOGIE

GYNECOLOGIE ET OBSTETRIQUE

ANATOMIE

THERAPEUTIQUE

BIOCHIMIE

HEMATOLOGIE

PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE

CARDIOLOGIE

M. Yvon **MICHEL-BRIAND**
M. André **RAFFI**
M. Philippe **VICHARD**
Mme Dominique **VUITTON**

BACTERIOLOGIE, VIROLOGIE
PEDIATRIE
TRAUMATOLOGIE
IMMUNOLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Martine **BENEDINI**
Mme Annie-Claude **BIDET**
Mme Malika **BOUCHADDI**
M. Hatem **BOULAHDOUR**
Mlle Marie-Claire **CLAVEQUIN**
M. Alain **COAQUETTE**
M. Benoît **CYPRIANI**
M. Siamak **DAVANI**
M. Alain **DEVEVEY**
M. François **DUMEL**
Mme Marie-Jeanne **DUPONT**
Mme Françoise **GAYET**
M. Roger **GIBEY**
Mme Andrée **GOUGET**
Mme Maryse **HADJIYIASSEMIS**
M. Emmanuel **HAFFEN**
M. Didier **HOCQUET**
M. Frédéric **MAUNY**
Mme Laurence **MILLON**
Mme Elisabeth **MONNET**
M. Christian **MOUSSARD**
M. Patrice **MURET**
M. Uyen **NGUYEN NHU**
M. Alfred **PENFORNIS**
M. Jean-LUC **PRETET**
Mme Evelyne **RACADOT**
Mme Elisabeth **RANFAING**
M. Daniel **TALON**
M. Laurent **TATU**
M. Fabrice **VUILLIER**
M. Jean-Pierre **WOLF**

BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
PHYSIOLOGIE
BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
HISTOLOGIE CYTOLOGIE
VIROLOGIE
BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
PHARMACOLOGIE
PSYCHOLOGIE
MEDECINE GENERALE
BACTERIOLOGIE
MEDECINE GENERALE
BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
HISTOLOGIE CYTOLOGIE
HISTOLOGIE CYTOLOGIE
PSYCHIATRIE D'ADULTE
BACTERIOLOGIE
BIostatISTIQUES
PARASITOLOGIE
EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
PHARMACOLOGIE
PHYSIOLOGIE
THERAPEUTIQUE
BIOLOGIE CELLULAIRE
HEMATOLOGIE
ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
BACTERIOLOGIE, HYGIENE
ANATOMIE
ANATOMIE
PHYSIOLOGIE

PHARMACIE

PROFESSEURS

M. Michel BAUD	BIOPHYSIQUE ET INFORMATIQUE
M. Alain BERTHELOT	PHYSIOLOGIE
Mme Françoise BEVALOT	PHARMACOGNOSIE
M. Jean-Pierre CHAUMONT	BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE
M. Yves GUILLAUME	CHIMIE ANALYTIQUE
M. Alain JACQUESON	TOXICOLOGIE
M. Dominique MEILLET	PARASITOLOGIE
Mme Mariette MERCIER	BIOMATHEMATIQUES ET BIOSTATISTIQUES
Mme Joëlle MILLET	PHARMACIE GALENIQUE
Mme Lysiane RICHERT	BIOLOGIE CELLULAIRE
M. Jean-François ROBERT	CHIMIE ORGANIQUE, CHIMIE THERAPEUTIQUE
M. Bernard REFOUVELET	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
Mme Estelle SEILLES	IMMUNOLOGIE (BACTERIOLOGIE, VIROLOGIE)
Mme Marie-Christine WORONOFF-LEMSI	PHARMACIE CLINIQUE
M. Alain XICLUNA	CHIMIE ORGANIQUE, CHIMIE THERAPEUTIQUE

MAITRES DE CONFERENCES

M. Laurent BERMONT	BIOCHIMIE
M. Eric CAVALLI	CHIMIE PHYSIQUE ET MINERALE
M. Jean-Patrick DASPET	BIOPHYSIQUE ET INFORMATIQUE
Mme Céline DEMOUGEOT	PHYSIOLOGIE
Mme Sylvie DEVAUX	PHYSIOLOGIE
Mme Corinne GIRARD	PHARMACOGNOSIE
M. Lhassanne ISMAILI	CHIMIE ORGANIQUE
M. Safwat MAKKI	PHARMACIE GALENIQUE
Mlle Myriam MATOGA	CHIMIE ANALYTIQUE
M. Jean-Louis MOZER	BIOCHIMIE
M. Frédéric MUYARD	PHARMACOGNOSIE
Mme Laurence NICOD	BIOLOGIE CELLULAIRE
M. Yann PELLEQUER	PHARMACIE GALENIQUE
Mme Nathalie RETEL	BIOMATHEMATIQUES ET BIOSTATISTIQUES
M. Philippe SAAS	IMMUNOLOGIE
Mme Marianne SANDOZ	PHARMACODYNAMIQUE
M. Tong TRUONG THANH	CHIMIE ANALYTIQUE

PROFESSEUR AGREGE DU SECOND DEGRE, PROFESSEURS ASSOCIES A TEMPS PARTIEL

Mme Sandra CHAVIN	ANGLAIS
Mme Nicole AVIS	PHARMACIE GALENIQUE
Mme Frédérique ROUSSEY	ANGLAIS

A Madame le Professeur Joëlle MILLET

Responsable du laboratoire de Galénique, Biopharmacie et Cosmétologie, Université de Franche-Comté

Qui nous a ouvert les portes de son Laboratoire et a dirigé ce projet avec compétence, bienveillance et grande disponibilité, elle nous a toujours apporté du soutien tout au long de la réalisation de ce travail. Par son aide de tous les instants, sa patience, ses encouragements et la qualité humaine de l'ensemble de son service, elle a su nous passionner pour la Galénique. Nous lui exprimons notre plus grande reconnaissance et attachement.

A Monsieur le Professeur Jean-Pierre CHAUMONT

Responsable du laboratoire de Botanique et Cryptogamie, Université de Franche-Comté

Qui a co-dirigé ce projet avec compétence, disponibilité, et bienveillance. Ses connaissances en Botanique et en Microbiologie nous ont servi tout au long de cette thèse. Qu'il trouve ici le témoignage de notre plus grande reconnaissance et gratitude.

A Monsieur Frédéric MUYARD, Maître de Conférences – HDR

Laboratoire de Pharmacognosie, Université de Franche-Comté

Qui a toujours porté un vif intérêt à l'égard de ce travail et a montré une grande disponibilité. Par son aide, son amitié et ses précieux conseils, il a contribué à l'avancement de ce travail, il nous a initié aux techniques d'analyse chimique des extraits de plantes et a su nous faire aimer la Pharmacognosie. Nous lui exprimons du fond du cœur nos sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Philippe BOUCHET

Responsable du Laboratoire de Botanique et Mycologie, Université de Reims

Vous nous faites l'honneur de juger ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de notre plus grand respect et nos sincères remerciements.

A Monsieur Fabrice PIROT, Maître de Conférences – HDR

Université de Lyon I

Vous nous faites l'honneur de juger ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de notre plus grand respect et nos sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Yves GUILLAUME

Responsable du Laboratoire de Chimie Analytique et de l'Equipe Sciences Séparatives et Biopharmaceutiques EA-3924, Université de Franche-Comté

Qui nous accueilli au sein de son Equipe. Pour avoir accepté de juger ce travail, qu'il trouve ici le témoignage de notre respectueuse gratitude.

Nous tenons aussi à remercier :

Madame Laura MICHEL, Ingénieur d'Etudes au Laboratoire de Pharmacie Galénique

Qui nous a beaucoup aidée et nous a initiée aux techniques de formulations conventionnelles des médicaments. Par son dynamisme, sa gentillesse, sa bonne humeur et sa disponibilité, elle a su maintenir une atmosphère conviviale au sein du Laboratoire. Qu'elle trouve ici le témoignage de notre grande amitié et nos sincères remerciements.

Monsieur le Docteur Hassan LBOUTOUNNE, Laboratoire de Pharmacie galénique

Qui nous a initié aux techniques de vectorisation, et a contribué, par ses connaissances en formulation de type nanoparticulaire, à l'avancement de ce travail. Nous lui exprimons nos plus sincères remerciements et qu'il trouve ici le témoignage de notre plus grande amitié.

Monsieur Safwat MAKKI, Maître de Conférence au Laboratoire de Pharmacie Galénique

Qui s'est intéressé à notre travail et n'a cessé de nous encourager et prodiguer de conseils. Sa disponibilité, son optimisme et sa bonne humeur, nous ont aidé durant ces années de thèse. Qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude.

Monsieur Yann PELLEQUER, Maître de Conférences au Laboratoire de Pharmacie Galénique

Qui s'est, dès son arrivée au laboratoire, intéressé à notre travail. Ses précieux conseils et son pragmatisme nous ont beaucoup aidé. Qu'il trouve ici l'expression de notre plus grande amitié et nos sincères remerciements.

Madame Nicole AVIS, Enseignant au Laboratoire de Pharmacie Galénique

Pour ses encouragements, son amitié et sa gentillesse, qu'elle trouve ici le témoignage de nos sincères remerciements.

Les thésards du Laboratoire de Galénique (**Anothai et Suzy**) pour l'amitié dont elles nous ont témoigné durant ces années de thèse. Qu'elles trouvent ici nos vifs remerciements.

Madame Corinne GIRARD, Maître de Conférences au Laboratoire de Pharmacognosie

Qui par sa disponibilité et sa gentillesse a également apporté sa contribution à ce travail. Nous lui exprimons nos sincères remerciements.

Le personnel du Laboratoire de Pharmacognosie, qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude pour l'accueil chaleureux qu'ils ont toujours manifesté à notre égard pendant nos nombreux passages dans ce laboratoire, ce travail est aussi le vôtre.

Monsieur Koffi KOBA, Docteur à l'université de Lomé (TOGO)

Qui nous a procuré les plantes utilisées dans ce travail, et initié aux techniques de réalisation de coupes botaniques. Pour son aide précieuse et l'excellente humeur qui l'a toujours caractérisée, nous lui exprimons notre profonde gratitude et notre grande amitié.

Myriam, Laurence, François, Shankar et Raphaël pour leur amitié.

Nous dédions ce travail

A nos parents, Philippe et Henriette,

A nos sœurs Evelyne et Dianne,

A Chinalda,

A ya Auguy

A Jean-Omer et Michelle KIFOUANI,

A Monsieur et Madame MAKAYA,

A Odilon, Alexis, Ferdinand, Prisca, Maixent, Eric, Rodolphe et Guy-Bernard,

A tous nos amis,

Qu'ils trouvent ici le témoignage de notre reconnaissance et notre plus grand attachement.

TABLE DES MATIERES

TABLES DES MATIERES.....	1
ABREVIATIONS, FORMULES ET SYMBOLES.....	7
INTRODUCTION GENERALE.....	9
PREMIERE PARTIE : TRAVAUX ANTERIEURS.....	13
CHAPITRE I: Etude ethnobotanique de <i>Cassytha filiformis</i> L. (<i>Lauraceae</i>) et d'<i>Harungana madagascariensis</i> Lam. ex Poir.....	14
Introduction.....	15
1. <i>Cassytha filiformis</i> L. (<i>Lauraceae</i>).....	16
2. <i>Harungana madagascariensis</i> Lam. ex Poir. (<i>Hypericaceae</i>).....	22
CHAPITRE II : Etude des microflores fongiques cutanées, et bactériennes cutanées et muqueuses.....	31
A. Microflores fongiques cutanées.....	32
Introduction.....	33
1. Mycoses cutanées.....	34
1.1. Les dermatophyties.....	34
1.2. Les candidoses.....	36
1.3. La cryptococcose.....	36
1.4. Les aspergilloses et les hyphomycoses.....	36
1.5. Les pityrospores.....	37
2. Caractères culturels des champignons.....	37
2.1. Les dermatophytes.....	37
2.2. Les champignons filamenteux imparfaits.....	42
2.3. Les levures.....	44
3. Les antifongiques.....	46
3.1. Les antimycosiques d'origine naturelle.....	46
3.2. Les antimycosiques synthétiques.....	48
3.3. Substances antimycosiques naturelles ou isolées des plantes.....	50
B. Microflores bactériennes cutanées et muqueuses.....	52
Introduction.....	53
1. Microflore bactérienne de la peau.....	53

1.1.	Flore résidente.....	53
1.2.	Flore transitoire.....	53
1.3.	Facteurs de variation de la flore cutanée.....	54
1.4.	Equilibre de la flore cutanée.....	54
1.5.	Microflore du pied.....	55
1.6.	Microflore des aisselles.....	56
1.7.	Cas particulier de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59
2.	Flore microbienne de la bouche.....	59
2.1.	Flore de la muqueuse buccale.....	59
2.2.	Flore de la plaque dentaire.....	60
2.3.	Infections de la cavité buccale.....	60
3.	Agents thérapeutiques utilisés contre les infections bucco-dentaires.....	62
3.1.	Chlorhexidine.....	62
3.2.	Autres bis-biguanides.....	62
3.3.	Lauryl sulfate de sodium.....	63
3.4.	Fluorures d'amines.....	63
3.5.	Zinc.....	63
C.	Pathologies causées par les associations bactériennes et fongiques.....	64
CHAPITRE III : Techniques d'études des activités antimicrobiennes.....		65
Introduction.....		66
1.	Méthode de diffusion.....	66
1.1.	Principe et protocole expérimental.....	66
1.2.	Applications et limites.....	67
2.	Méthode des dilutions.....	67
2.1.	Méthode des dilutions en milieu liquide.....	68
2.2.	Méthode des dilutions en milieu solide.....	68
2.3.	Application et limites.....	68
3.	Méthodes bioautographiques.....	69
3.1.	Bioautographie de contact.....	69
3.2.	Bioautographie directe.....	69
3.3.	Bioautographie par immersion.....	70
CHAPITRE IV : Systèmes particuliers.....		71
Introduction.....		72
1.	Vecteurs colloïdaux.....	72
2.	Polymères biodégradables à intérêt médical.....	73

2.1.	PCL et copolymères.....	74
2.2.	PLA et copolymères (PLGA).....	75
2.3.	Autres polyesters utilisés dans les préparations médicamenteuses.....	76
2.4.	Avantages et inconvénients des acides polylactiques et du polycaprolactone...	76
3.	Acide poly (d,l-lactide-co-glycolide) (PLGA).....	78
3.1.	Propriétés physico-chimiques.....	78
3.2.	Synthèse chimique et biodégradation.....	78
4.	Méthodes de preparation des vecteurs nanoparticulaires.....	79
4.1.	Formation des nanosphères.....	80
4.2.	Formation des nanocapsules.....	82
4.3.	Nanoparticules et extraits de plantes.....	83
4.4.	Caractérisation physico-chimique des nanoparticules.....	84
5.	Intérêt des nanoparticules.....	86
6.	Applications des vecteurs particuliers en infectiologie.....	87
7.	Structure de la peau.....	88
8.	Administration et pénétration cutanées.....	90
9.	Conclusion.....	91
 DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS.....		93
 CHAPITRE V : Etude botanique et microbiologique de <i>Cassythia filiformis</i> et d'<i>Harungana madagascariensis</i>.....		94
Introduction.....		95
1.	Etude botanique micrographique.....	96
1.1.	Matériel.....	96
1.2.	Etude anatomique des organes de plantes utilisées : technique de réalisation des coupes.....	96
1.3.	Résultats.....	96
1.4.	Interprétation.....	99
1.5.	Conclusion.....	101
2.	Extraction.....	102
2.1.	Description de l'appareil de Soxhlet et principe d'extraction.....	102
2.2.	Extraction des feuilles et écorces d' <i>Harungana madagascariensis</i>	103
2.3.	Extraction des tiges de <i>Cassythia filiformis</i>	104
2.4.	Conclusion.....	105
3.	Etudes antifongiques et antibactériennes.....	106
3.1.	Matériel fongique et bactérien.....	106

3.2. Méthodes.....	111
3.2.1. Tests antifongiques.....	111
3.2.2. Tests antibactériens.....	112
3.3. Résultats et discussion.....	114
3.3.1. Activités antifongiques.....	114
3.3.1.1. Essais préliminaires.....	114
3.3.1.2. Détermination des CMI des extraits à l'acétate d'éthyle d' <i>Harungana</i> <i>madagascariensis</i> et <i>Cassytha filiformis</i>	116
3.3.1.3. Evolution de la CMI en fonction du temps.....	118
3.3.2. Activités antibactériennes.....	119
3.3.2.1. Essais préliminaires.....	119
3.3.2.2. Détermination de la CMI des extraits d' <i>Harungana madagascariensis</i> et de <i>Cassytha filiformis</i>	120
3.3.2.3. Etude comparative des extraits à l'acétate d'éthyle des feuilles et écorces d' <i>Harungana madagascariensis</i>	121
3.4. Conclusion.....	123
 CHAPITRE VI : Etude approfondie de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'<i>Harungana madagascariensis</i>	 125
Introduction.....	126
1. Etude bactériostatique et bactéricide.....	126
1.1. Matériel et méthodes.....	126
1.2. Résultats et discussion.....	127
1.3. Conclusion.....	130
2. Etude antimicrobienne sur <i>Staphylococcus intermedius</i> et <i>Malassezia</i> <i>pachydermatis</i>	131
2.1. Résultats et discussion.....	131
2.2. Conclusion.....	132
3. Etude chimique.....	133
3.1. Remarques préliminaires.....	133
3.2. Analyse chimique préliminaire de l'extrait à l'acétate d'éthyle.....	135
3.2.1. Méthode.....	135
3.2.2. Résultats et discussion.....	135
3.3. Fractionnement et bioguidage.....	136
3.3.1. Fractionnement de l'extrait à l'acétate d'éthyle.....	136
3.3.1.1. Méthodes.....	137
3.3.1.2. Résultats et discussion.....	137

3.3.2. Bioguidage ou détermination de la fraction active de l'extrait à l'acétate d'éthyle.....	139
3.3.2.1. Méthodes.....	139
3.3.2.2. Résultats et discussion.....	140
3.4. Purification du composé actif.....	142
3.4.1. Méthodes.....	142
3.4.2. Résultats et discussion.....	142
3.5. Détermination de la structure du composé bioactif.....	143
3.5.1. Résultats et discussion.....	143
3.5.2. Données spectrales.....	150
3.6. Activité antibactérienne de l'astilbine isolée des feuilles d' <i>Harungana madagascariensis</i>	151
3.6.1. Résultats et discussion.....	151
3.6.2. Conclusion.....	152
CHAPITRE VII : Potentialisation <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i> de l'activité antibactérienne des extraits des feuilles d' <i>Harungana madagascariensis</i> à l'aide des nanosphères de PLGA.....	153
Introduction.....	154
1. Potentialisation de l'activité antibactérienne par les nanosphères d'extrait éthanolique des feuilles d' <i>Harungana madagascariensis</i> (EEFHM).....	155
1.1. Matériel.....	155
1.2. Méthodes.....	156
1.2.1. Fabrication des nanosphères (NS) de PLGA chargées d'EEFHM.....	156
1.2.2. Caractérisation physico-chimique des NS d'EEFHM.....	157
1.2.3. Etude <i>in vitro</i> de l'activité antibactérienne des NS d'EEFHM.....	159
1.2.4. Etude <i>ex vivo</i> de l'activité antibactérienne des NS d'EEFHM	159
1.3. Résultats.....	161
1.4. Discussion.....	166
1.5. Conclusion.....	169
2. Potentialisation de l'activité antibactérienne par les nanosphères d'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d' <i>Harungana madagascariensis</i> (EAFHM).....	169
Introduction.....	169
2.1. Matériel et méthodes.....	170
2.2. Résultats et discussion.....	170

3. Nanosphères d'EEFHM et d'EAFHM : Etude comparative.....	172
3.1. Résultats et discussion.....	172
3.1.1. Analyse chimique qualitative.....	172
3.1.2. Etude bactéricide <i>in vitro</i>	173
3.2. Conclusion.....	174
4. Conclusion du chapitre VII.....	174
 DISCUSSION GENERALE.....	 176
 CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	 181
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	 184
 ANNEXES.....	 207

ABREVIATIONS, FORMULES ET SYMBOLES

CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
CMB	: Concentration Minimale Bactéricide
CMF	: Concentration Minimale Fongicide
QMI	: Quantité Minimale Inhibitrice
µg/ml	: microgramme par millilitre
UFC	: Unité Formant Colonies
EEFHM	: Extrait Ethanolique des Feuilles d' <i>Harungana madagascariensis</i>
EAFHM	: Extrait à l'Acétate d'éthyle des Feuilles d' <i>Harungana madagascariensis</i>
NS	: nanosphères
NP	: nanoparticules
CIP	: Collection de l'Institut Pasteur
NCTC	: National Collection of Type Culture London
ATCC	: American Type Culture Collection
PLGA	: Acide Poly (d,l-Lactide-co-Glycolide)
PCL	: Poly (ε-caprolactone)
PLA	: Acide Polylactique
IP	: Indice de Polydispersité
MEB	: Microscope Electronique à Balayage
R _f	: facteur de retention
MTT	: Méthyl Thiazolyl Tétrazolium.
CCM	: Chromatographie sur Couche Mince
CC	: Chromatographie sur Colonne ouverte
F	: Fractions
UV	: Ultra Violet
IR	: Infra Rouge
SM-Z spray	: Spectrométrie de Masse en mode Z spray
RMN ¹ H	: Résonance Magnétique Nucléaire du proton
RMN ¹³ C	: Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13
COSY	: Spectroscopie de corrélation
HMBC	: Heteronuclear Multiple Bond correlations
HMQC	: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
TMS	: Tétraméthylsilane
eV	: électron Volt
mV	: milli Volt

Hz	: Hertz
MHz	: Mégahertz
nm	: nanomètre
min	: minute
s	: singulet
d	: doublet
dd	: doublet dédoublé
t	: triplet
q	: quadruplet
Rdt	: rendement
$\lambda^{\text{MeOH}}_{(\text{Max})}$	: longueur d'onde d'absorption maximale dans le méthanol
m/z	: masse/charge d'un ion en Spectrométrie de Masse
δ	: déplacement chimique
J	: constante de couplage
ppm	: partie par million
v/v	: volume par rapport au volume
MeOH	: méthanol
EtOH	: éthanol
CH ₂ Cl ₂	: dichlorométhane
CHCl ₃	: chloroforme
HCOOH	: acide formique
AcOEt	: acétate d'éthyle
C ₅ D ₅ N	: pyridine

INTRODUCTION GENERALE

La thérapeutique par des plantes, pratique longtemps connue et utilisée de l'Homme, continue encore de nos jours à faire recette dans beaucoup de pays en voie de développement, 70% selon Adjanohoun, 1989. Parallèlement, on assiste actuellement en occident à un retour vers cette forme de médecine : la Phytothérapie. Dans ce contexte, les milliers d'années d'expériences populaires et de coutumes, peuvent fournir un arsenal très large des plantes actives dans tous les domaines pharmacologiques y compris celui des pathogénies infectieuses cutanées et unguéales, nosocomiales et bucco-dentaires auxquelles ce travail est consacré.

En effet, les affections cutanées dues aux champignons d'une part, et les affections nosocomiales provoquées par des bactéries saprophytes d'autre part, représentent une source importante de morbidité chez l'Homme. Ces affections se sont dramatiquement accrues ces 20 dernières années et ceci en raison de la recrudescence du nombre de patients immunodéprimés, de l'utilisation de médicaments immunosuppresseurs, de l'utilisation de cathéters intravasculaires, de l'utilisation d'antifongiques et d'antibiotiques à large spectre d'action entraînant une perturbation de la flore microbienne saprophyte normale, et l'apparition de phénomènes de résistance de certaines espèces fongiques et bactériennes (Franklin, 1993 ; Odds, 1996).

D'un autre côté les pathogénies bucco-dentaires, particulièrement la carie dentaire, représentent un véritable problème de santé publique. En effet, troisième fléau mondial selon l'OMS après les maladies cardio-vasculaires et le cancer, la carie touche la majorité des enfants dans le monde. En France, à 12 ans, 12,9% seulement d'enfants ont une denture saine (Enquête UFSBD, 1987).

Face à ces problèmes de santé publique (affections cutanées, affections nosocomiales et bucco-dentaires), nous ne disposons pourtant que d'un arsenal thérapeutique restreint. Cependant, le règne végétal est une alternative intéressante, il reste un potentiel gigantesque de source de nouvelles substances thérapeutiques. Ce travail a été élaboré suite à ces considérations.

De plus, ces dernières années la pharmacie galénique s'est orientée vers le développement de nouvelles formes pharmaceutiques en vue d'optimiser les effets thérapeutiques des principes actifs. Ainsi, de nombreuses études ont montré l'intérêt des vecteurs nanoparticulaires notamment pour l'administration cutanée et orale des principes actifs. Ces vecteurs peuvent augmenter et/ou réguler le transport du principe actif du site d'administration au site d'action, entraînant une amélioration de sa biodisponibilité, avec pour conséquence la potentialisation de l'effet thérapeutique du principe actif.

Dans l'optique de chercher des substances antimicrobiennes à partir des plantes médicinales et d'optimiser l'effet thérapeutique des extraits de plantes, les objectifs de ce travail ont été :

- tout d'abord de dresser une liste la plus complète possible de plantes utilisées comme antimicrobiens en médecine traditionnelle Africaine en général et Congolaise en particulier. Les critères de sélection ont été variés, nous avons choisi des plantes : fréquemment utilisées en médecine traditionnelle africaine, largement répandues et non détruites par le prélèvement d'un ou de plusieurs organes, ayant fait l'objet de peu d'études biologiques antérieurement et renfermant des métabolites secondaires (substances connues pour être biologiquement actives). Ainsi deux plantes ont retenu notre attention et ont été sélectionnées : ***Harungana madagascariensis* (Hypericaceae)** et ***Cassitha filiformis* (Lauraceae)** ;
- de réaliser une étude micrographique des organes de plantes utilisés afin de contribuer à la caractérisation complète de ces plantes ;
- de réaliser un screening antimicrobien *in vitro* des extraits des plantes sélectionnées sur des champignons pathogènes et des bactéries saprophytes de la flore cutanée ;
- d'évaluer le spectre d'activité à l'égard des bactéries pathogènes de la plaque dentaire de l'Homme de l'extrait le plus actif après les tests réalisés sur les microorganismes de la flore cutanée ;
- d'isoler et de caractériser le principe actif contenu dans l'extrait le plus actif
- de proposer une formulation galénique susceptible de potentialiser l'activité antimicrobienne des extraits de plantes testés en réalisant une étude comparative entre l'extrait vectorisé dans les nanosphères d'acide poly (d, l-lactide-co-glycolide) et l'extrait non vectorisé.

Dans la première partie de ce travail, il s'est avéré nécessaire de :

- donner un aperçu des travaux antérieurs réalisés sur les plantes utilisées ;
- donner un aperçu sur les microflore fongiques et bactériennes cutanées et muqueuses ;
- présenter brièvement des composés antifongiques et antibactériens existant sur le marché, utilisés en thérapie humaine contre les mycoses et dans les soins bucco-dentaires respectivement;
- présenter de manière succincte les composés antimicrobiens isolés à partir d'espèces végétales ;
- donner un aperçu sur les pathologies causées par les associations bactériennes et fongiques ;
- discuter des méthodes de détection d'activités antifongiques et antibactériennes *in vitro* actuellement à disposition, avec un regard critique sur leurs limites d'application ;

- présenter de manière brève les vecteurs colloïdaux polymériques en insistant sur leur mode de formation, leur caractérisation physico-chimique et leur mode d'administration.

En conclusion un bilan général du travail est dressé laissant entrevoir des perspectives pour l'avenir.

PREMIERE PARTIE : TRAVAUX ANTERIEURS

CHAPITRE I

ETUDE ETHNOBOTANIQUE

1. ***CASSYTHA FILIFORMIS* L.**
2. ***HARUNGANA MADAGASCARIENSIS* LAM. EX
POIR.**

INTRODUCTION

Après une étude bibliographique des plantes connues pour leurs propriétés thérapeutiques, nous avons dressé une liste non exhaustive de celles utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes en médecine traditionnelle africaine en général, et congolaise en particulier (Tableau I). Ensuite, une sélection des plantes à utiliser dans le présent travail a été faite sur la base des critères énoncés dans l'introduction générale. Ainsi, notre choix s'est porté sur *Cassytha filiformis* L. (Lauraceae) et *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (Hypericaceae). En effet, ces deux plantes, en plus de répondre aux critères de sélection, appartiennent à des familles qui sont présentes aussi bien en Afrique qu'en Europe, et dont les intérêts ne sont plus à démontrer. Elles sont en effet largement utilisées dans diverses médecines traditionnelles. Nous allons dans ce chapitre rapporter les résultats des travaux antérieurs réalisés sur ces deux plantes.

Tableau I : Quelques plantes utilisées comme antimicrobiens en médecine traditionnelle congolaise d'après Bouquet (1969).

Familles	Noms de la plante
Acanthaceae	<i>Thomandersia laurifolia</i> Bail.
Apocynaceae	1- <i>Rauwolfia obscura</i> K. Schum 2- <i>Tabernaemontana crassa</i> Benth. 3- <i>Voacanga africana</i> Stapf.
Asclepiadaceae	<i>Tylophora sylvatica</i> Decne.
Cesalpiniaceae	1- <i>Cassia occidentalis</i> Linn. 2- <i>Disthemonanthus benthamianus</i> Bail. 3- <i>Erythrophleum guineense</i> G. Don
Composeae	1- <i>Ageratum conyzoides</i> Linn. 2- <i>Emilia coccinea</i> (Sims) G. Don
Dioscoreaceae	<i>Dioscorea bulbifera</i> Linn.
Euphorbiaceae	1- <i>Alchornea floribunda</i> Müll. Arg. 2- <i>Alchornea cordifolia</i> Müll. Arg. 3- <i>Hymenocardia acida</i> Tul. 4- <i>Manniophytum fulvum</i> Müll. Arg. 5- <i>Ricinodendron heudelotii</i> Bail.
Hypericaceae	<i>Harungana madagascariensis</i> Lam. ex Poir.
Lauraceae	<i>Cassytha filiformis</i> Linn.
Papilionaceae	<i>Milletia laurentii</i> de Wild.
Rubiaceae	1- <i>Morinda lucida</i> Benth. 2- <i>Rothmania hispida</i> K. Schum
Rutaceae	<i>Vepris louisii</i> G. Gilbert
Simarubaceae	<i>Quassia africana</i> Bail.

1. CASSYTHA FILIFORMIS L.

Cassytha filiformis est une plante appartenant à la famille des *Lauracées*. Cette famille occupe une bonne place dans la matière médicale grâce à des espèces riches en essence (cannelier, camphrier, sassafras, laurier) (Kerharo et Adam, 1974) répandues dans les régions tropicales et subtropicales. Ces mêmes espèces renferment également fréquemment des matières grasses (Kerharo et Adam, 1974).

1.1. Noms en langues africaines

- En langues congolaises

Nsingwa wa leembo baandu (liane sans pied) ou *yele ngyengye* en Laari.

- En langues gabonaises

Ozasa wa gelo en Nkomi

- En langues sénégalaises

kamul bop ou *somat u gej* en Wolof ; *samédalo* en Mandingue et en Socé ; *alla nyon* en Bambara.

1.2. Description botanique (Walker et Sillans, 1974 ; Kerharo, 1971 ; Kerharo et Adam, 1974)

Herbe hémiparasite, vivace, pantropicale, volubile, pouvant atteindre 4 à 5 m, *Cassytha filiformis* L. est constituée de nombreuses tiges vertes ou jaune orangé, filiformes, ramifiées, glabres ou pubérulentes (poils tecteurs) fixées sur les hautes graminées ou les arbustes au moyen de suçoirs.

Ses feuilles sont réduites à de petites écailles, tandis que ses fleurs sont petites et blanchâtres. Le fruit sphérique de 5 mm de diamètre environ, est quant à lui complètement enclos dans un réceptacle charnu, globuleux et blanchâtre à maturité (Walker et Sillans, 1974 ; Kerharo et Adam, 1974) (Figure 1).



Aspect général (caractère envahissant)



Tiges et fruits

Figure 1 : *Cassytha filiformis* L. (http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast?onda=N17800538)

1.3. Habitat (Walker et Sillans, 1974 ; Bouquet, 1969 ; Kerharo et Adam, 1974)

Assez commune dans les buissons de savane, *Cassytha filiformis* L. est une plante également rencontrée en bordure des mers. Plante parasite, elle est réputée très envahissante.

1.4. Répartition géographique

Cassytha filiformis L. est une espèce très abondante dans les régions à climat tropical et subtropical. On la trouve en Afrique, en Asie, en Amérique latine, en Océanie et dans les Caraïbes, comme le montre la figure 2. La répartition géographique de cette plante en Afrique est donnée dans la figure 3.

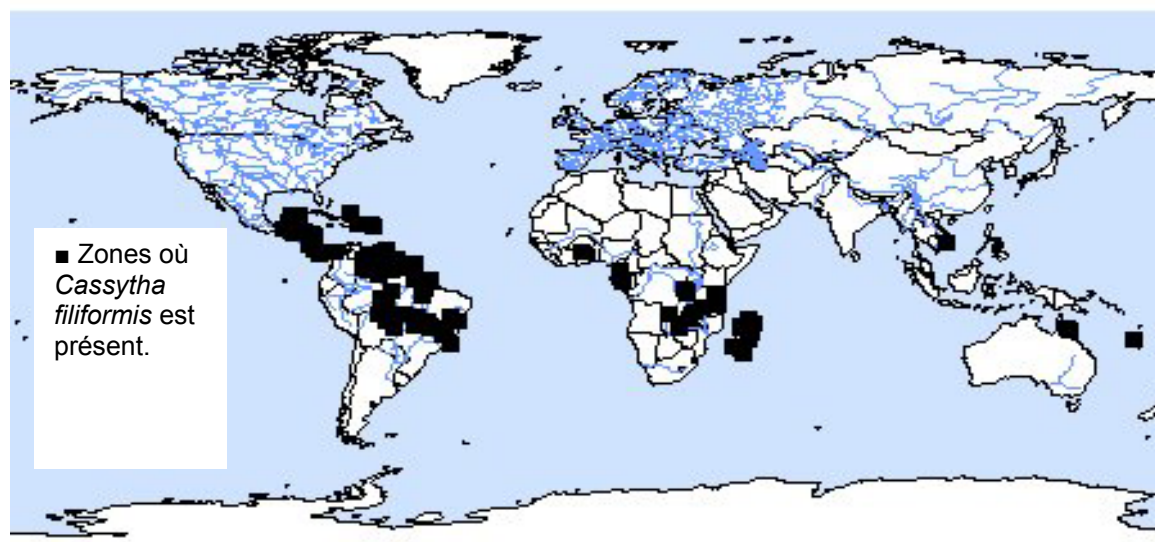


Figure 2 : Répartition géographique mondiale de *Cassytha filiformis* L.
(http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast?onda=N17800538)

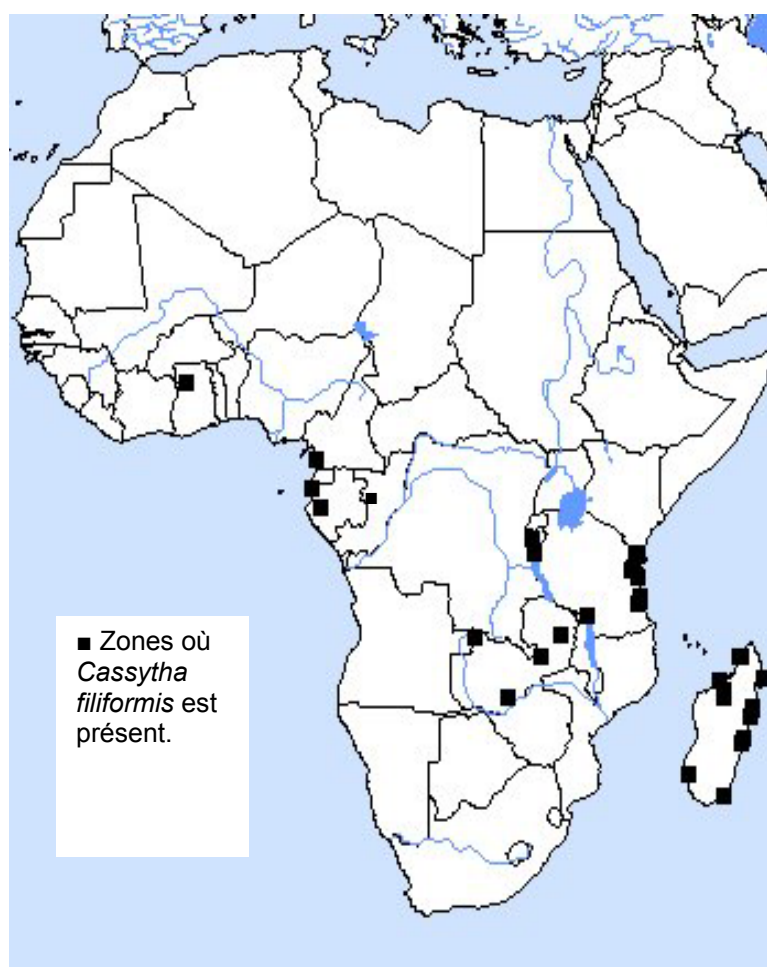


Figure 3 : Répartition géographique de *Cassytha filiformis* L. en Afrique et Madagascar.
(http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast?onda=N17800538)

1.5. Usages thérapeutiques

Le caractère parasite de *Cassytha filiformis* L. semble avoir particulièrement frappé guérisseurs et féticheurs africains.

Kerharo (1971) signale qu'elle est employée par certaines ethnies du Sénégal pour des traitements médico-magiques, au cours desquels les invocations au végétal et aux divinités tutélaires jouent un grand rôle.

Au Congo-Brazzaville, porté autour du poignet ou de la cheville, un bracelet fait avec des morceaux de liane tressés entre eux, permettrait d'éviter les maladies et d'obtenir gain de cause auprès des tribunaux, selon Bouquet (1969).

Au Gabon, les Nkomi (Ethnie gabonaise) attribuent à *Cassytha filiformis* L. la vertu de porter bonheur à la pêche. A cet effet, ils exposent leurs filets et autres engins de pêche à la fumée des brindilles qu'ils font brûler sur un boucan (Walker et Sillans, 1974).

Hormis ces pouvoirs magiques, elle est aussi donnée en tisane aux malades souffrant d'affections pulmonaires ou gastro-intestinales. Le jus de la plante, en revanche, aurait une action sur les mycoses cutanées (Bouquet, 1969). Chez les Wolof et Niominka du Sénégal, il est donné à petites doses en qualité de diurétique (Kerharo, 1971 ; Perry, 1980), et utilisé en bain et boissons (décocté) contre les brûlures du troisième degré (Kerharo, 1971 ; Adjanohoun et al., 1979). La décoction est aussi employée contre l'amaigrissement des enfants (Adjanohoun et al., 1979). Bouquet et Debray (1974) mentionnent qu'elle est utilisée en Côte d'Ivoire en friction contre les œdèmes et les dermatoses, alors qu'en Chine elle est utilisée contre la syphilis selon Perry (1980).

1.6. Composition chimique

Les investigations phytochimiques menées sur *Cassytha filiformis* L. ont permis à Wu et al. (1997) d'isoler les alcaloïdes suivants (Figure 4a) : la cathafiline **1**, la cassythine **2**, alcaloïde également isolé par Tomita et al. (1966) et par Johns et al. (1966), la cathaformine **3**, l'actinodaphnine **4**, la lysicamine **5** et l'isoboldine **6**. Chang et al. (1998) ont à leur tour confirmé que *Cassytha filiformis* était une riche source d'alcaloïdes aporphinoïdiques, en isolant la filiformine **7**, la cassyformine **8**, la prédicentrine **9**, la laurotétanine **10** et l'ocoteïne **11**. D'autres dérivés aromatiques, tels que la vanilline **12** et l'isovanilline **13**, ainsi qu'un lignane : le diasyringasinol **14** ont été isolés plus récemment des tiges de *Cassytha filiformis* par Chang et al. (1998) (Figure 4b).

Cette composition chimique est résumée dans le Tableau II (page suivante).

Tableau II : Composition chimique de *Cassytha filiformis* L.

Composés	Organes	Auteurs	Année
Cathafile (1)	Tiges	Wu et al.	1997
Cassythine (2)	Tiges	Wu et al.	1997
		Tomita et al.	1966
		Johns et al.	1966
Cathaformine (3)	Tiges	Wu et al.	1997
Actinodaphine (4)	Tiges	Wu et al.	1997
Lysicamine (5)	Tiges	Wu et al.	1997
Isoboldine (6)	Tiges	Wu et al.	1997
Filiformine (7)	Tiges	Chang et al.	1998
Cassyformine (8)	Tiges	Chang et al.	1998
Prédicentrine (9)	Tiges	Chang et al.	1998
Laurététanine (10)	Tiges	Chang et al.	1998
Ocotéine (11)	Tiges	Chang et al.	1998
Vanilline (12)	Tiges	Chang et al.	1998
Isovanilline (13)	Tiges	Chang et al.	1998
Diasyringasinol (14)	Tiges	Chang et al.	1998

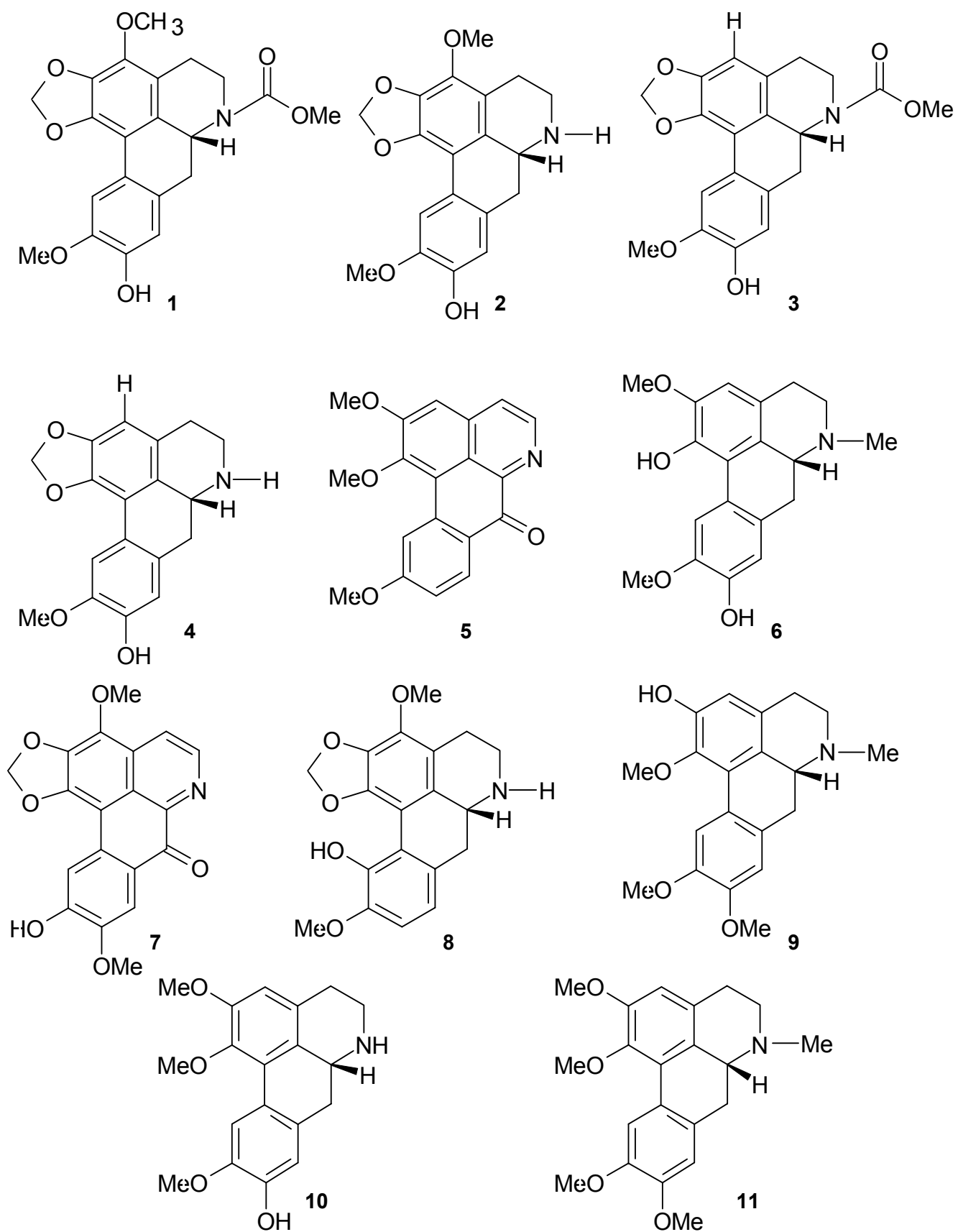


Figure 4a: Alcaloïdes isolés de *Cassytha filiformis* L.

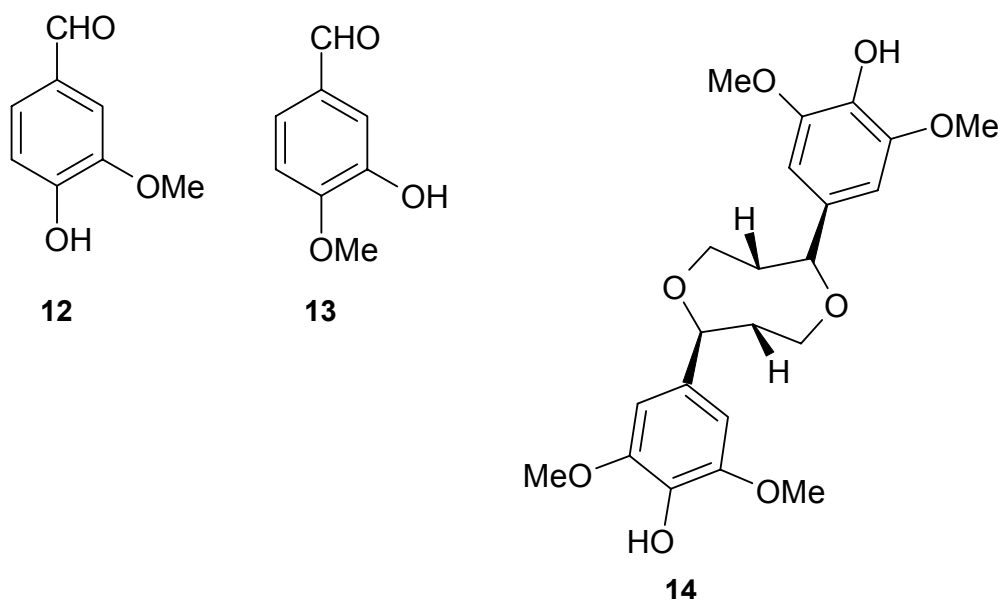


Figure 4b : Autres composés isolés de *Cassytha filiformis* L.

1.7. Pharmacologie

La laurotétanine, alcaloïde isolé de *C. filiformis*, est un poison tétanisant puissant. La dose létale, par voie intra veineuse (IV), pour le crapaud est de 1 mg, pour la poule, par voie sous cutanée, de 15 mg avec mort en 10 min, et pour le cobaye, toujours par voie sous cutanée, de 30 mg avec mort en 30 min selon Manske et Holmes (1950-1971). La laurotétanine a été testée par voie IV pour son action anticancéreuse, mais les résultats n'ont pas été vraiment significatifs (Abbot et al., 1966). Heal et Rogers (1950) ont mis en évidence les propriétés insecticides de *Cassytha filiformis* L.

Chang et al. (1997) ont, en outre, mis en évidence le rôle vasoconstricteur de l'ocotéine, alcaloïde isolé de *Cassytha filiformis* L.

2. HARUNGANA MADAGASCARIENSIS LAM. EX POIR.

Plante de la famille des *Hypericaceae*, elle est largement répandue dans les régions tempérées et chaudes. Cette famille est aussi représentée par les genres *Psorospermum*, *Vismia* et *Hypericum*.

Les *Hypericaceae* sont généralement des arbustes ou des sous-arbrisseaux contenant une résine jaunâtre ou orangée (Kerharo et Adam, 1974). Ces plantes sont caractérisées par leur appareil sécréteur contenant des canaux et poches schyzogènes, producteurs d'essences et/ou de résines.

2.1. Noms en langues africaines

- En langues congolaises

mutunu ou *ntunu* en Laari ; *nsasa* ou *musasa* en Beembe, Yoombe et Vili ; *musasé* ou *musasa* en Laali, Lumbu, Nzabi et Tsaangi ; *mubenberi* en M'bôchi.

- En langues gabonaises

osakadi en Apindji ; *nsasa* en Loango ; *musasa* en Eshira et en Punu ; *isaha* en Bakôta.

- En langues sénégalaises

uliyolo en Mandingue ; *sumbala* en Bambara et Peul ; *fumiseg* ou *oussouye* en Diola.

- En langues togolaises

ehouti en Ewé ; *amiti* en Akposso.

2.2. Description botanique (Kerharo et Adam, 1974 ; Bouquet et Debray, 1974 ; Walker et Sillans, 1974 ; Kerharo, 1971 ; Adjanohoun et al., 1979).

Arbre de petite taille, ramifié et très feuillé, pouvant atteindre 4 à 5 m de haut, *Harungana madagascariensis* possède de larges feuilles opposées, ovales, arrondies, courtement cunées ou parfois subcordées à la partie inférieure (Figure 5). Elles sont régulièrement acuminées au sommet, avec une dizaine de nervures latérales très proéminentes à la face inférieure. Elles mesurent environ 13 cm de long sur 7 cm de large. Le pétiole est long de 1,5 à 2 cm. Les fleurs sont blanches, petites et odorantes, groupées en panicules terminales denses. Les inflorescences sont brunâtres, tandis que les fruits sont des petites drupes sphériques de 3 mm de diamètre contenant 2 à 4 graines. De l'écorce striée, lamelleuse, foncée et profondément crevassée, suinte un liquide visqueux orange.



Feuilles et fleurs (<http://users.chello.be/sf16063/pauwels/HaruMada.jpg>)



Feuille séchée



Ecorces séchées

(Photographe : Brice MOULARI)

Figure 5 : Feuilles et écorces d'*Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir.

2.3. Habitat (Kerharo et Adam, 1974 ; Walker et Sillans, 1974 ; Bouquet, 1969).

Arbuste très répandu en Afrique, *Harungana madagascariensis* est commun dans toutes les formations secondaires, les plantations abandonnées, les broussailles en terrain humide et les zones dégradées qu'il repeuple rapidement.

2.4. Répartition géographique

Harungana madagascariensis est très répandue dans les régions chaudes, on la trouve dans plusieurs pays d'Afrique noire et à Madagascar, alors qu'elle est absente dans les autres régions du monde, comme le montrent les Figures 6 et 7.

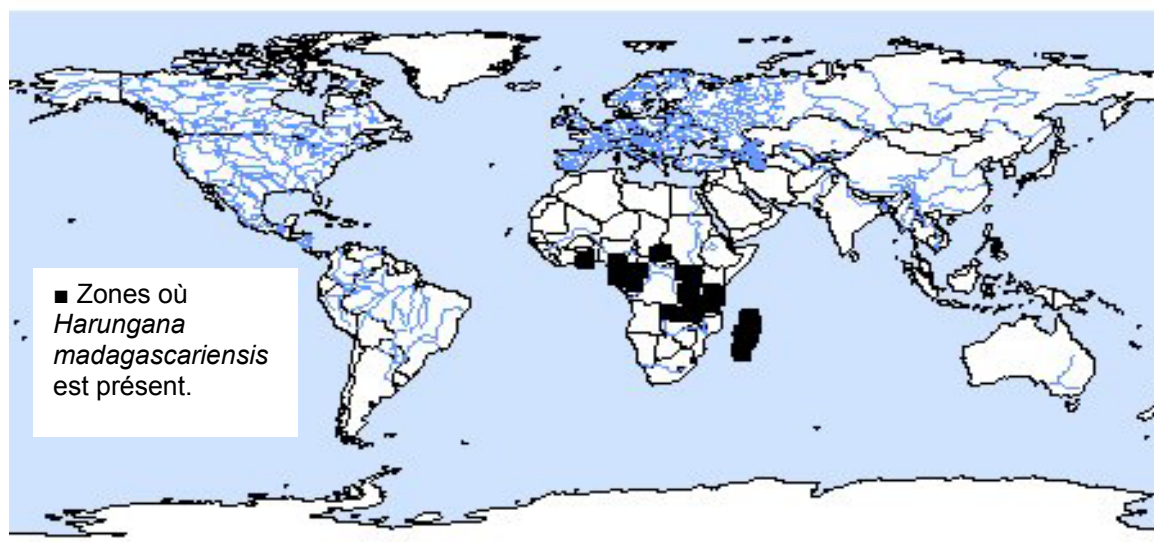


Figure 6 : Répartition géographique mondiale d'*Harungana madagascariensis*
(<http://mobot.mobot.org/w3T/search/image/iix187.html>)

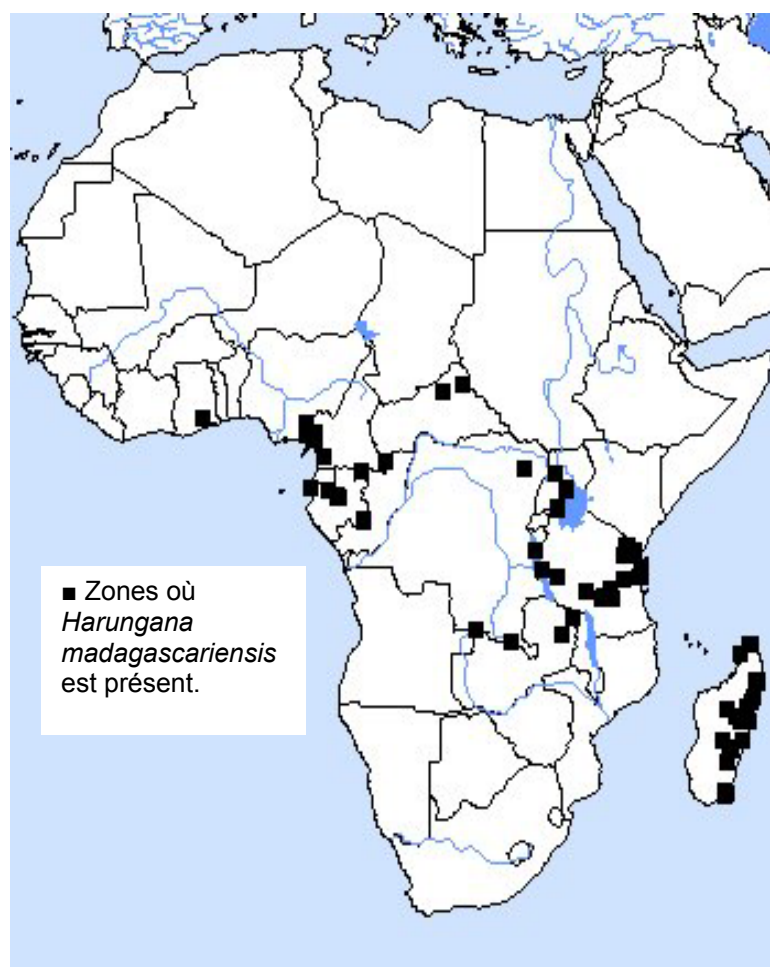


Figure 7 : Répartition géographique d'*Harungana madagascariensis* en Afrique et à Madagascar. (<http://mobot.mobot.org/w3T/search/image/iix187.html>)

2.5. Usages thérapeutiques

Harungana madagascariensis est largement utilisée en médecine traditionnelle africaine, ses indications sont très nombreuses et variées. Elles concernent les feuilles, l'écorce de tiges, le latex et les racines.

Bouquet (1969) signale que la décoction aqueuse des écorces, associée au jus de la plante, sert à soigner la gale, les teignes, les mycoses cutanées et la lèpre.

La décoction des racines ou des écorces, ou encore des feuilles, est utilisée contre la dysménorrhée et les troubles de l'ovulation (Bouquet, 1969 ; Kerharo et Adam, 1974).

Walker et Sillans (1974) signalent que le décocté des feuilles ou des écorces est employé comme antidyssentérique, expectorant ou vomitif ; il est aussi indiqué dans le traitement des affections bronchiques et la toux.

Les jeunes feuilles sont par ailleurs consommées contre la tachycardie (Bouquet, 1969). Le décocté des écorces est utilisé en lavement contre les menstruations douloureuses ; additionné de feuilles de *Cajanus indicus* (*Ambrevadées*), il faciliterait l'accouchement, selon Walker et Sillans (1974). Bouquet et Debray (1974) signalent, en outre, la réputation qu'a cette plante d'être un puissant aphrodisiaque.

2.6. Composition chimique

Bien que largement utilisée en médecine traditionnelle africaine, les premières études phytochimiques concernant *Harungana madagascariensis* datent de 1962.

A cette époque, Stout et al. (1962) ont décelé, dans l'écorce, un pigment phénolique orangé dénommé Harunganine, qui fût par la suite isolé par Ritchie et Taylor (1964). Fisel et al. (1966) ont quand à eux isolé des anthrones au niveau des feuilles : l'hypéricine **15** et la pseudohypéricine **16**. Imuna et al. (1995), travaillant sur les racines, tiges et feuilles, ont isolé les composés anthraquinones et anthrones suivantes (Figure 8a) : la 1,3,8-trihydroxy-4,5-diisoprényl-7-méthylantrone ou harunganol A **17**, la 1,3,8-trihydroxy-4,5,7-triisoprényl-6-méthylantrone ou harunganol B **18**, la 1,8-dihydroxy-2-isoprényl-3-méthoxy-6-méthylantrone **19**, la madagascine ou l'émodol 3-isoprényl éther **20**, composé également isolé par Messerschmidt (1966), le chrysophanol **21**, la vismiaquinone ou 1,8-dihydroxy-2-isoprényl-3-méthoxy-6-méthylantraquinone **22**, l'aloé-émodol **23**. Ils ont également isolé des dérivés et composés flavoniques (Figure 8b) : le quercetol **24**, l'astilbine ou le 3-O-rhamnoside de taxifoline **25**, composés isolés également par Fisel et al. (1966), la 1,3,4-trihydroxy-2-méthoxyxanthone **26** et la 1,7-dihydroxyxanthone **27**. Par ailleurs, Persinos et al. (1967), Tona et al. (1998), Olagunju et al. (2000), et, plus récemment Capasso et al. (2003), ont à leur tour mentionné la présence, dans les écorces et feuilles, de tanins, stéroïdes, terpènes, saponosides et alcaloïdes, et confirmé celle des dérivés anthracéniques. Cette composition chimique est résumée dans le Tableau III.

Tableau III : Composition chimique d'*Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir.

Composés	Organes	Auteurs	Année
Harunganine	Ecorces	Stout et al. Ritchie et Taylor	1962 1964
Hypéricine (15)	Feuilles	Fisel et al.	1966
Pseudohypéricine (16)	Feuilles	Fisel et al.	1966
Harunganol A (17)	Feuilles, racines et tiges	limuna et al.	1995
Harunganol B (18)	Feuilles, racines et tiges	limuna et al.	1995
1,8-dihydroxy-2...(19)	Feuilles, racines et tiges	limuna et al.	1995
Madagascine (20)	Feuilles, racines et tiges	limuna et al. Messerschmidt	1995 1966
Chrysophanol (21)	Feuilles, racines et tiges	limuna et al.	1995
Vismiaquinone (22)	Feuilles, racines et tiges	limuna et al.	1995
Aloe émodol (23)	Feuilles, racines et tiges	limuna et al.	1995
Quercetol (24)	Feuilles, racines et tiges	limuna et al. Fisel et al.	1995 1966
Astilbine (25)	Feuilles, racines et tiges	limuna et al. Fisel et al.	1995 1966
1,3,4-trihydroxy-2...(26)	Feuilles, racines et tiges	limuna et al.	1995
1,7-dihydroxy... (27)	Feuilles, racines et tiges	limuna et al.	1995

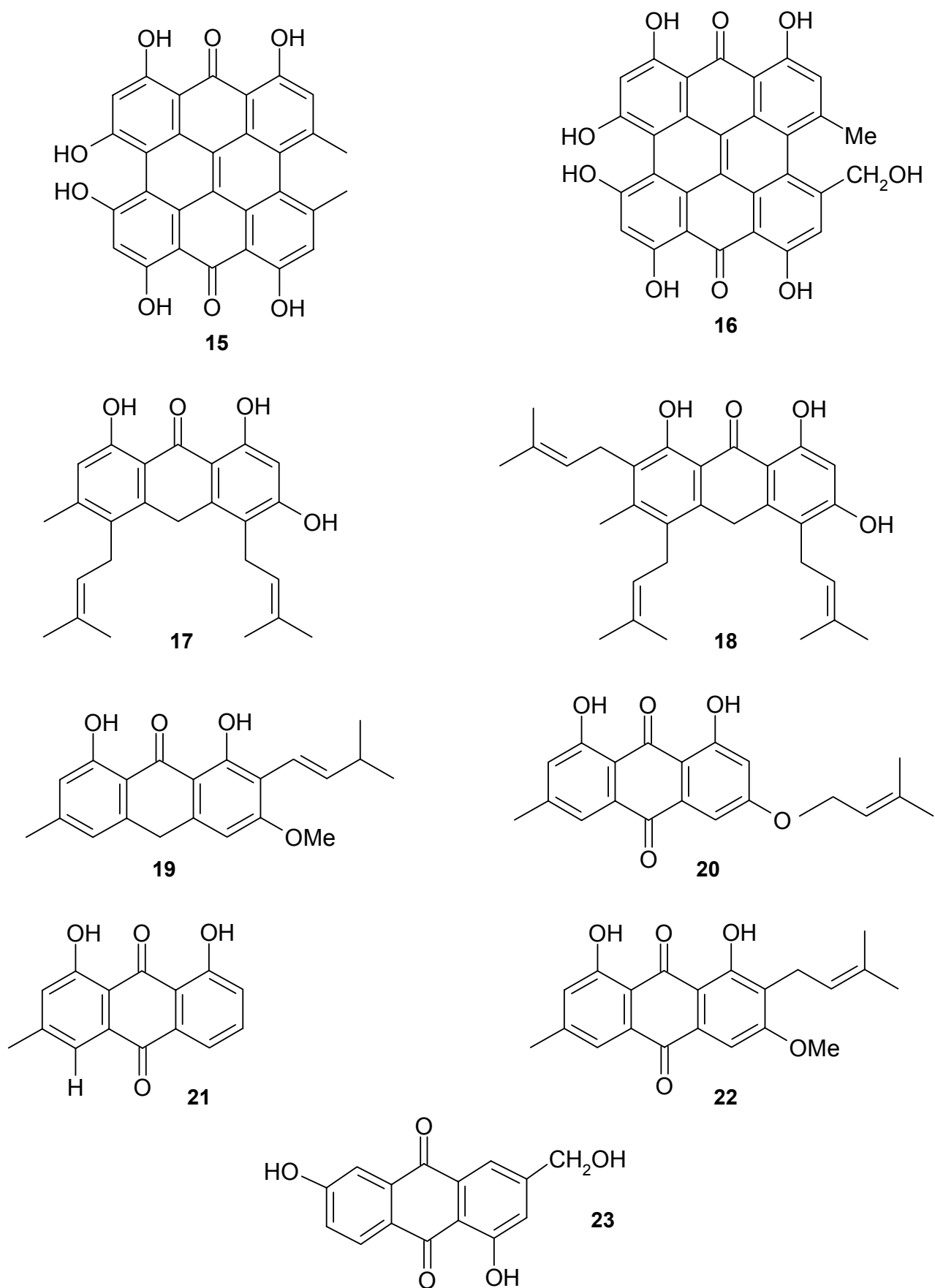


Figure 8a : Anthrones et anthraquinones isolés d'*Harungana madagascariensis*

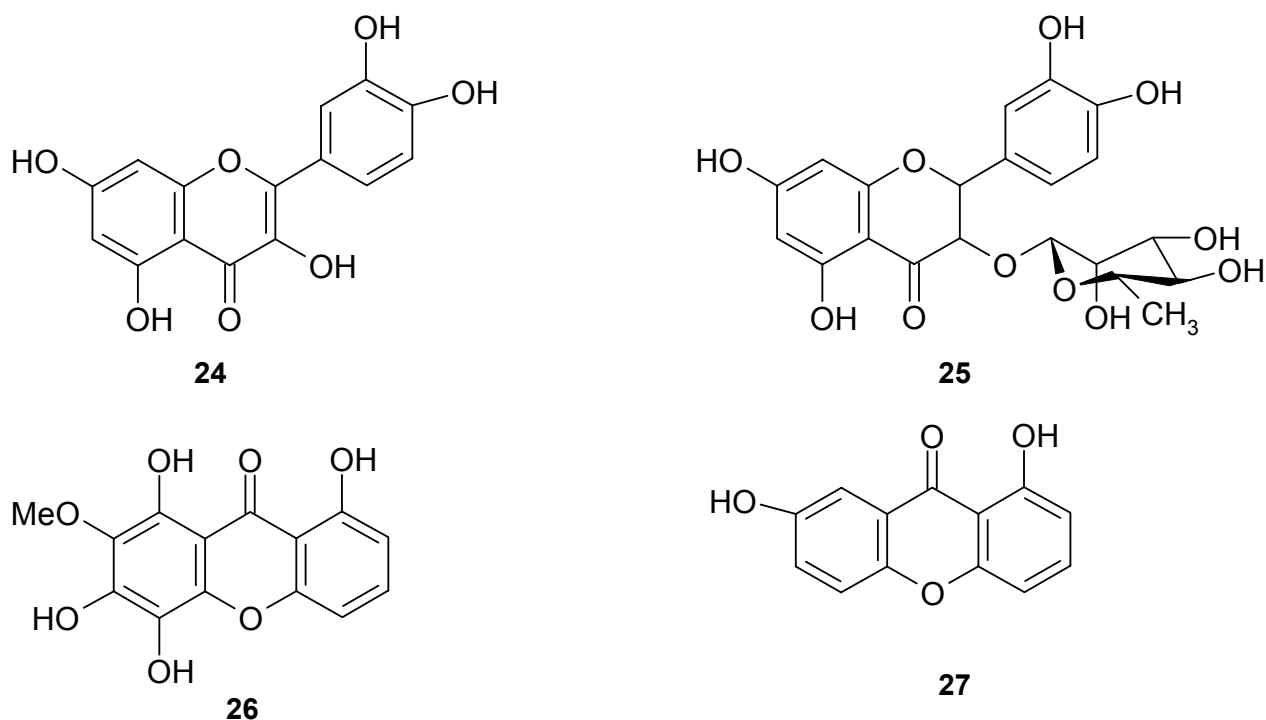


Figure 8b : Flavonoïdes isolés d'*Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir.

2.7. Pharmacologie

Les extraits aqueux des feuilles et écorces d'*Harungana madagascariensis* ont été expérimentés par Fisel et al. (1966), dans le traitement des gastralgies et des pancréopathies ainsi que sur les fonctions digestives. Selon ces auteurs, ceux-ci stimulent les fonctions digestives et la fonction exocrine du pancréas.

Kemeny (1971a) a montré que, chez la souris, l'extrait aqueux de feuilles à 3,5 ou 20% n'est pas toxique, et que ses effets se caractérisent, en particulier, par une augmentation considérable des taux d'acide ribonucléique et de protéines du pancréas et du duodénum ainsi que de l'activité esterasique. Il a également montré que l'extrait total à 0,5% administré à des rats, réduit de façon marquée l'effet hépatotoxique du CCl_4 et du bromobenzol. Son effet hépatoprotecteur paraît supérieur à celui de la cystéine (Kemeny, 1971b). D'autre part, l'administration continue de cet extrait aqueux de feuilles *per os* augmente l'activité de l'estomac, de l'intestin, du foie, et du pancréas (Kemeny, 1971).

Des propriétés antimicrobiennes, vis à vis de *Sarcina lutea* et *Staphylococcus aureus*, ont été reconnues aux écorces de tiges par Malcom et Sofowora (1969). Madubunyi et al. (1995) ont montré que les feuilles présentent une activité semblable vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus flavus* et *Candida albicans*. La décoction d'écorce présente un pouvoir amoebicide, avec une CMI à 62,5µg/ml selon Tona et al.

(1998). L'isosaline, isolée des feuilles et écorces, présente une action sur le foie et le rein des rats identique à celle présentée par les phosphatases selon Olagunju et al. (2000).

CHAPITRE II

ETUDE DE MICROFLORES FONGIQUES CUTANEEES, ET BACTERIENNES CUTANEEES ET MUQUEUSES (PARASITES OU SAPROPHYTES)

- A. MICROFLORES FONGIQUES CUTANEEES**
- B. MICROFLORES BACTERIENNES CUTANEEES
ET MUQUEUSES**
- C. PATHOLOGIES CAUSEES PAR LES
ASSOCIATIONS FONGIQUES ET
BACTERIENNES**

A. MICROFLORES FONGIQUES CUTANEEES

- 1. MYCOSES CUTANEEES**
- 2. CARACTERES CULTURAUX DES CHAMPIGNONS**
- 3. ANTIFONGIQUES**

INTRODUCTION

Les mycoses sont des maladies infectieuses causées par la présence et le développement de champignons dans l'organisme. Les champignons ou mycètes sont des organismes eucaryotes uni ou pluricellulaires inclus dans la classe des cryptogames et appartenant à l'embranchement des thallophytes (Bouchet, 1979). Ce sont des organismes inférieurs, dépourvus de pigments assimilateurs donc incapables de réaliser la photosynthèse chlorophyllienne (Segretain et al., 1987). Ils ont une vie toujours saprophytique ou symbiotique et éventuellement parasitaire. Ils vivent le plus souvent sur les matières végétales ou animales mortes ou vivantes (Brumpt, 1949 ; Callot et Helluy, 1957).

Formés de cellules uni ou plurinucléées toutes semblables, les champignons se reproduisent par des spores de manière sexuée ou asexuée (Bouchet, 1979). Leur classification repose sur l'organisation de leur appareil végétatif et de leur structure cellulaire. Mais aussi et surtout sur leur mode de reproduction (Bouchet et al., 1989). Ainsi on distingue :

- les archimycètes regroupant les myxomycètes et les phycomycètes ou champignons imparfaits. Ils se multiplient de manière asexuée, bien que la reproduction sexuée soit souvent présente.
- les eumycètes ou champignons vrais, à reproduction sexuée prédominante, regroupant les zygomycètes, les ascomycètes, les basidiomycètes et les *fungi imperfecti* ou adélomycètes sans reproduction sexuée.

La plupart de champignons responsables de mycoses sont cosmopolites et pénètrent dans l'organisme humain, soit par voie pulmonaire, soit par voie digestive, soit par voie cutanée. Les affections humaines dues à des champignons sont nombreuses et diverses, nous nous sommes intéressés plus spécialement aux pathologies touchant l'être humain et occasionnellement les animaux de compagnie.

Généralement les principaux champignons pathogènes de l'Homme et des animaux sont classés en fonction de leurs caractéristiques botaniques. Ainsi on distingue : les dermatophytes (filamenteux ascomycètes), les champignons filamenteux imparfaits et les levures (champignons normalement unicellulaire).

Les mycoses, en général, sont en nette progression dans le monde entier. Les réactions immunologiques des êtres humains diminuent de plus en plus et les champignons opportunistes touchent de plus en plus les organismes ainsi affectés.

Dans ce chapitre, nous allons passer en revue les mycoses les plus courantes, nous donnerons les caractères culturels des champignons impliqués mais également les antifongiques les plus souvent utilisés.

1. MYCOSES CUTANÉES

Elles sont localisées sur la peau, les phanères (ongles et cheveux) et sur les muqueuses. La pathologie dermatologique est essentiellement causée par des dermatophytes, et de plus en plus par des champignons imparfaits et certaines levures opportunistes.

1.1. Les dermatophyties

Elles sont dues à des dermatophytes, champignons connus pour leur affinité particulière pour la kératine, et qui se développent au niveau de l'épiderme et des phanères. Parmi les dermatophyties les plus fréquentes on peut citer :

1.1.1. Les teignes

ce sont des infections des régions pileuses (cuir chevelu, barbe) débutant par une atteinte de la couche cornée de la peau, l'atteinte pileuse étant secondaire car ne survenant qu'après multiplication du dermatophyte et progression des filaments mycéliens vers un orifice pileux. On distingue les teignes tondantes, suppuratives et faviques, leurs aspects cliniques sont spécifiques de l'agent causal.

- **Les teignes tondantes** peuvent être causées par diverses espèces, le genre *Microsporum* est plutôt responsable des teignes tondantes qualifiées de **microsporiques** dont *M. canis* représente 80% des cas en France. Elles sont caractérisées par des plaques alopeciques de grande taille, peu nombreuses, de forme arrondie et recouvertes de squames grisâtres. Le genre *Trichophyton* est, de son côté, responsable des teignes tondantes **trichophytiques** caractérisées par de petites plaques alopeciques et dont les espèces responsables les plus rencontrées sont *T. violaceum*, *T. soudanense* et *T. tonsurans*, espèces qui sévissent principalement sous les tropiques. Les plaques alopeciques sont contagieuses.

- **Les teignes suppuratives**, localisées sur le cuir chevelu mais surtout sur la barbe et la moustache, elles sont dues à *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* et *T. ochraceum*. Elles sont caractérisées par une plaque érythro-squameuse circulaire qui s'étend pendant quelques jours puis la région atteinte gonfle et rougit. Les orifices pileux sont dilatés et suppuratifs, les poils et les cheveux sont détruits par un processus inflammatoire.

- **Les teignes faviques** causées par *T. schoenleinii* sont caractérisées par des alopecies définitives.

1.1.2. Les épidermophyties

Elles correspondent à l'attaque de la peau glabre par un dermatophyte qui pénètre dans l'épiderme à la suite d'une lésion cutanée. Parmi les épidermophyties on peut citer :

- **L'herpes circiné**, comporte des lésions pouvant siéger sur n'importe quelle région de la peau, il s'observe aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte. Il est caractérisé par une plaque rouge circulaire desquamante, bien limitée par un léger bourrelet périphérique de microvésicules uniques ou multiples qui peuvent confluer et donner des placards à contours polycycliques. Les agents responsables sont surtout *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, *T. ochraceum*, *E. floccosum* et *M. canis*.

- **L'eczéma marginé de Hebra ou lésions des grands plis** sont des lésions siégeant au niveau des plis de la région unguinocrurale sous forme des plaques érythémateuses, extensives, prurigineuses et symétriques de part et d'autre du pli, elles peuvent également s'étendre vers les cuisses et le pli interfessier. Très rares chez l'enfant mais en revanche fréquentes chez l'adulte, ces lésions sont souvent secondaires à une mycose des pieds ou à un onyxis et sont causées par *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* et *E. floccosum*.

- **Les lésions des petits plis** sont très courantes chez l'adulte et touchent préférentiellement les hommes (sportifs réalisant le pied d'athlète). Ce sont des intertrigos interdigitopalmaires et interdigitoplantaires qui débutent au niveau du 4^{ème} espace inter-orteil puis s'étendent aux autres espaces, atteignant parfois les faces dorsale et plantaire. Elles sont caractérisées par des squames sèches qui recouvrent le fond du pli, les ongles pouvant aussi être affectés.

T. rubrum et *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* sont les deux espèces souvent isolées dans ce type de lésions.

1.1.3. Les onyxis

Les onyxis mycosiques sont des affections touchant les ongles et pouvant aboutir à la destruction totale de celui-ci. Cependant on distingue :

- **Les onyxis dermatophytiques** qui touchent principalement les ongles des orteils et dont l'agent le plus fréquent est le *T. rubrum* (> 70% des cas) ;

- **Les onyxis à champignons filamenteux imparfaits** qui deviennent de plus en plus fréquents avec une mention spéciale pour le *Scopulariopsis brevicaulis* et les différentes espèces d'*Aspergillus* (Badillet, 1991 ; Rashid et al., 1995). Ils affectent très souvent les ongles des orteils.

- **Les onyxis à levures** qui siègent surtout au niveau des ongles des mains et dont le principal agent causal est le *Candida albicans*.

1.1.4. Diagnostic mycologique des dermatophyties

L'examen direct des prélèvements montre la phase parasitaire du champignon, alors que la culture sur milieu solide de Sabouraud à une température de 20 à 30°C permet une identification des dermatophytes en 10 à 30 jours.

L'examen anatomo-pathologique permet l'observation microscopique du champignon dans les lésions de squames et de phanères (Badillet et Sene, 1989 ; Badillet, 1991).

1.2. Les candidoses

Ce sont des mycoses cosmopolites, à développement localisé dont l'agent responsable dans 70 à 80% des cas est la levure *Candida albicans*, champignon opportuniste vivant à l'état saprophytique dans le tube digestif et le vagin. Il est responsable des atteintes cutanées et muqueuses. En effet, les atteintes des muqueuses, allant du muguet à des atteintes digestive et uro-génitale, constituent les formes les plus répandues des candidoses. Mais nous ne traiterons ici que des candidoses cutanées.

Les candidoses cutanées sont très souvent des intertrigos ou atteintes des plis dont l'aspect clinique présente un érythème suintant avec un enduit crémeux blanchâtre au fond du pli qui est souvent crevassé, et dont la bordure est en général mal délimitée. Les lésions sont prurigineuses, souvent bilatérales et surinfectées (Bouchet, 1979 ; Pierrard et al., 1993). Elles se localisent au niveau interfessier, inguinal, sous mammaire et axillaire pour les grands plis, et au niveau interdigito plantaire et palmaire pour les petits plis.

1.3. La cryptococcose

Classiquement associée aux maladies malignes telles que les leucoses, les cancers, les sarcoïdoses, mais aussi aux maladies infectieuses ou parasitaires, la cryptococcose survient préférentiellement en cas de déficit d'immunité cellulaire. Son épidémiologie est aujourd'hui bouleversée par l'infection par le VIH qui représente actuellement le principal facteur favorisant. C'est une mycose profonde dont l'agent responsable est *Cryptococcus neoformans*, mais la forme cutanée peut exister. L'atteinte peut être primitive et résulter de l'inoculation traumatique de la levure, mais bien souvent les éruptions cutanées observées ne sont que des extériorisations d'une mycose profonde (Dupont, 1992 ; Verden et Vandermer, 1992). Les lésions cutané-muqueuses siègent principalement au visage (paupières, narines, lèvres).

1.4. Les aspergilloses et hyphomycoses

Les aspergilloses sont des maladies iatrogènes, souvent nosocomiales, survenant par surinfection de certaines infections respiratoires guéries ou non. Ces infections sont causées

par *Aspergillus sp.* qui est un champignon opportuniste chez l'Homme et un véritable agent pathogène chez les animaux. Leur pathogénicité chez l'Homme n'apparaît que lorsque le système immunitaire est déficient. La transmission se fait généralement par voie aérienne, par les spores produites en grandes quantités, ce qui explique les nombreux cas d'attaques des voies respiratoires par ces champignons. Cependant, on distingue d'autres types d'aspergilloses : oculaire, nasale et sinusienne, auriculaire, cutanée et sous-cutanée. L'atteinte de la peau et des ongles est parfois provoquée par un *Aspergillus* mais également par d'autres hyphomycètes filamenteux tels que *Scopulariopsis brevicaulis* et *Fusarium sp.* (Badillet et al., 1987). L'ongle du gros orteil est certainement le plus touché, notamment à partir de 60 ans et chez les sportifs. Des conditions locales d'environnement : troubles circulatoires périphériques (veineux, artériels, lymphatiques), ainsi que des dispositions anatomiques particulières (chevauchement des orteils), seraient éventuellement à l'origine de cette localisation.

Les infections mixtes avec implication de bactéries sont aussi rencontrées.

1.5. Les pityrospores

La pityrospore est une affection cutanée relativement fréquente et due à *Malassezia furfur* (Bastide et al., 1988) qui présente deux formes culturelles : *Pityrosporum ovale* et *Pityrosporum orbiculare*. Il est à l'origine du pityriasis qui est une mycose superficielle caractérisée par des lésions pigmentées sur le thorax, le dos et les bras. Sur peau bronzée elle est caractérisée par des lésions dépigmentées. C'est une levure lipophile, très abondante sur les peaux grasses et particulièrement présente dans les régions chaudes, et aussi à l'origine des états pelliculaires.

2. LES CARACTERES CULTURAUX DES CHAMPIGNONS

2.1. Les dermatophytes

Ils font partie de la classe des *Ascomycètes* et de la famille des *Gymnoascaceae*. Ce sont des champignons filamenteux parasites de la peau et des phanères se retrouvant tant chez l'Homme que chez les animaux où ils sont responsables de tout un ensemble d'affections superficielles.

Emmons et al. (1977), se basant sur des critères essentiellement botaniques les regroupe en 3 genres : *Epidermophyton (E)*, *Microsporum (M)* et *Trichophyton (T)*.

Notre travail a porté sur six (6) dermatophytes : *T. rubrum*, *T. mentagrophytes var. mentagrophytes*, *T. mentagrophytes var. interdigitale*, *T. soudanense*, *M. gypseum* et *M. canis*.

2.1.1. *Trichophyton rubrum*

Décrit par SABOURAUD en 1911, *T. rubrum* est un dermatophyte dont la forme sexuée n'est pas connue (St-Germain and Summerbell, 1996 ; Sutton et al., 1998). Ses colonies en culture sur milieu de Sabouraud gélosé sont blanches, parfois légèrement rosées, duveteuses ou jaune (Figure 9a). Le revers de la culture est assez rarement incolore, il est le plus souvent rouge foncé (Badillet, 1991 ; Vanbreuseghem et al., 1978). La croissance est toujours assez rapide.

Microscopiquement, *T. rubrum* se présente sous forme de macroconidies allongées en forme de saucisses et de nombreuses microconidies rassemblées en grappes (Figure 9b) (Badillet, 1991 ; Larone, 1995 ; St-Germain and Summerbell, 1996 ; Sutton et al., 1998 ; De Hoog et al., 2000).

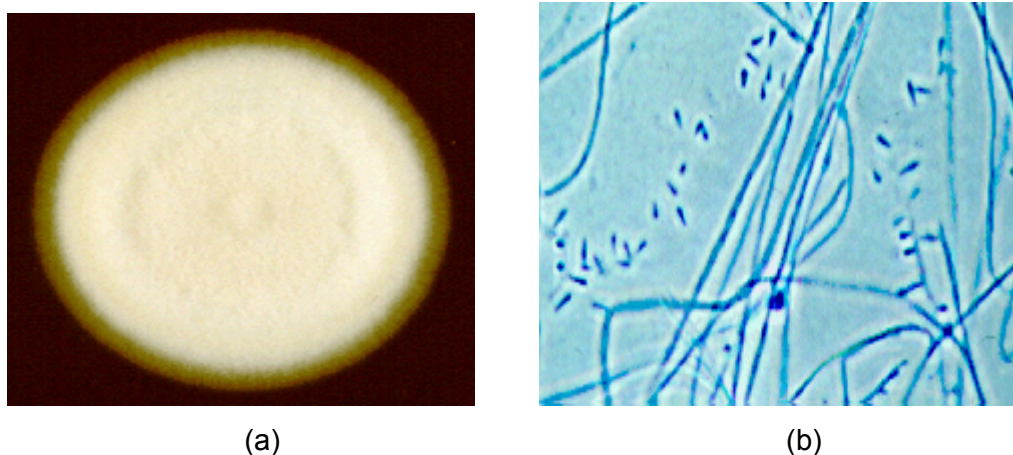
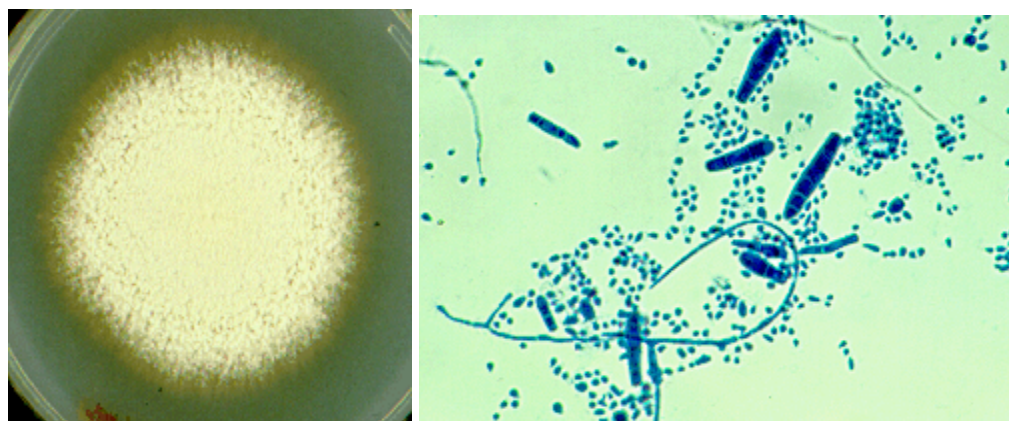


Figure 9 : *Trichophyton rubrum* (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>)

2.1.2. *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*

Décrit en 1893 par SABOURAUD, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* présente deux formes parfaites : *Arthroderma benhamiae* et *Arthroderma vanbreuseghemii*, difficilement différenciables (Vanbreuseghem et al., 1978). Ses colonies en milieu de culture de Sabouraud gélosé sont blanches, poudreuses, à pourtour étoilé (Figure 10a). Le revers de la culture est de couleur beige à brunâtre (Vanbreuseghem et al., 1978 ; Larone, 1995 ; St-Germain and Summerbell, 1996 ; Sutton et al., 1998 ; De Hoog et al., 2000).

Au microscope, on observe des macroconidies en fuseaux et des microconidies plus ou moins en grappes très abondantes de forme ronde (Figure 10b) (Badillet, 1991 ; Vanbreuseghem et al., 1978). Il se présente aussi sous forme de nombreux filaments en forme de vrille (Vanbreuseghem et al., 1978).



(a)

(b)

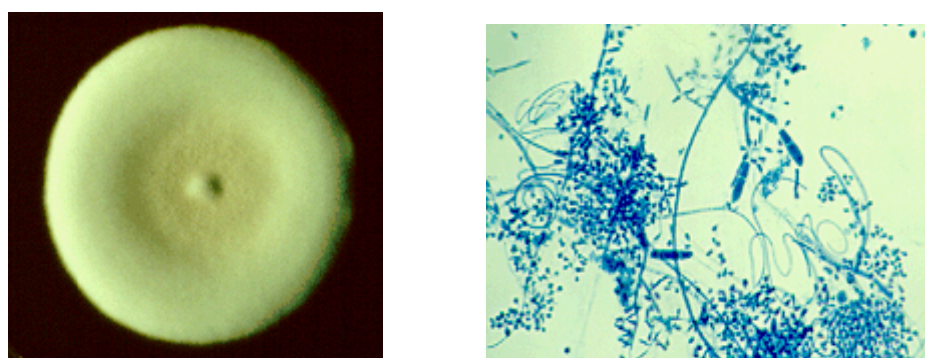
Figure 10 : *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*

(<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>)

2.1.3. *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*

Décrit en 1917 par PRIESTLEY et souvent rattaché à *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* dont la forme sexuée est à 20% des souches *Arthroderma vanbreuseghemii* (Vanbreuseghem et al., 1978) présente sur milieu nutritif de Sabouraud des colonies plates à contours arrondis ou finement frangés, poudreuses à grains blanc crème (Figure 11a). Le revers de la culture est également blanc crème (Vanbreuseghem et al., 1978 ; Badillet, 1991).

Au microscope *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* se présente sous forme de microconidies rondes, en grappes, moins grosses que celles de *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* (Figure 11b). Les macroconidies présentent des parois lisses et des formes irrégulières (Vanbreuseghem et al., 1978 ; Larone, 1995 ; St-Germain and Summerbell, 1996 ; Sutton et al., 1998 ; De Hoog et al., 2000).



(a)

(b)

Figure 11 : *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*

(<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>)

2.1.4. *Trichophyton soudanense*

Décrit par JOYEUX en 1912, *T. soudanense*, champignon de forme sexuée inconnue (St-Germain and Summerbell, 1996 ; Sutton et al., 1998), présente en culture sur milieu de Sabouraud des colonies de couleur jaune rouille non duveteuses (Figure 12a). La culture est sèche et pousse plus ou moins lentement selon les souches (Badillet, 1991 ; Vanbreuseghem et al., 1978 ; Larone, 1995 ; St-Germain and Summerbell, 1996 ; Sutton et al., 1998 ; De Hoog et al., 2000). Le revers de la culture est aussi jaune rouille.

Au microscope, on observe des filaments ayant un aspect buissonneux spécifiques de ce dermatophyte (Figure 12b). On note également la présence d'arthrospores intercalaires et terminales dans les vieilles cultures (Badillet, 1991 ; Vanbreuseghem et al., 1978).

Il y a peu ou pas de microconidies et absence de macroconidies (Vanbreuseghem et al., 1978).

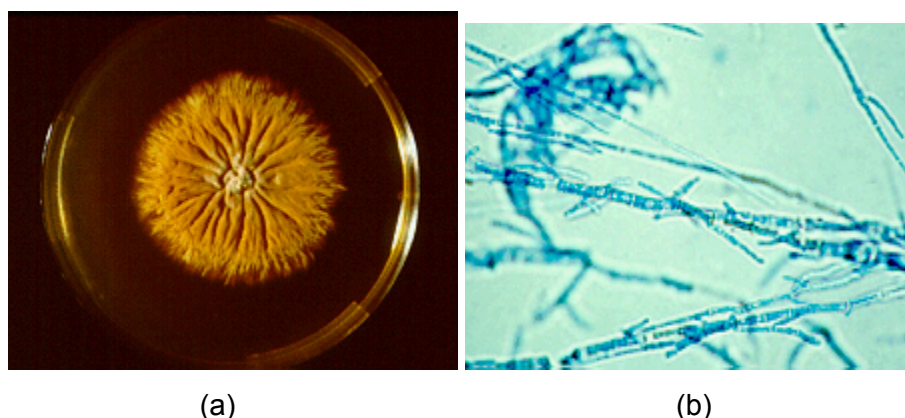


Figure 12 : *Trichophyton soudanense* (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>)

2.1.5. *Microsporum gypseum*

Décrit par BODIN en 1928 (St-Germain and Summerbell, 1996 ; Pier and Moriello, 1998 ; Caffara and Scagliarini, 1999), *M. gypseum* présente en culture sur milieu de Sabouraud solide des colonies poudreuses, granuleuses et planes de couleur beige (Figure 13a). Le revers de la culture est également beige (Vanbreuseghem et al., 1978).

Au microscope, on note la présence de macroconidies extrêmement nombreuses de forme elliptique typique à paroi assez mince, échinulée, en grappes. Certaines souches présentent de nombreuses microconidies piriformes (Figure 13b) (Badillet, 1991 ; Vanbreuseghem et al., 1978).

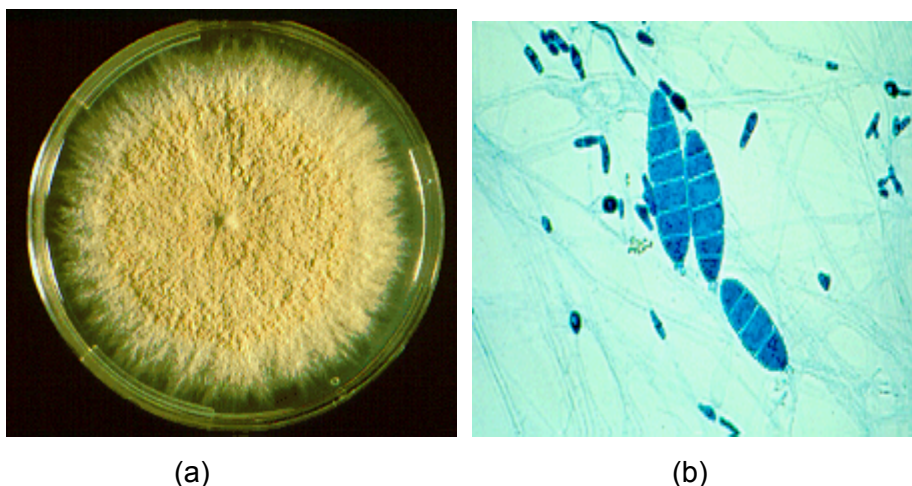


Figure 13 : *Microsporium gypseum* (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>)

2.1.6. *Microsporium canis*

Décrit par BODIN en 1902 (St-Germain and Summerbell, 1996 ; Pier and Moriello, 1998 ; Caffara and Scagliarini, 1999), *M. canis* présente en milieu de culture de Sabouraud solide des colonies duveteuses, cotonneuses et planes plus ou moins épaisses de teinte chamois à jaune orangé (Figure 14a). Le revers de la culture est aussi de couleur jaune ou orangé mais moins net que le recto (Badillet, 1991 ; Vanbreuseghem et al., 1978 ; Larone, 1995 ; St-Germain and Summerbell, 1996 ; Sutton et al., 1998).

L'observation microscopique révèle la présence de nombreuses macroconidies en fuseau avec des parois épaisses, des cloisons multiples et des extrémités pointues (Figure 14b). Les microconidies sont piriformes en nombre variable (Badillet, 1991 ; Vanbreuseghem et al., 1978 ; Larone, 1995 ; St-Germain and Summerbell, 1996 ; Sutton et al., 1998).

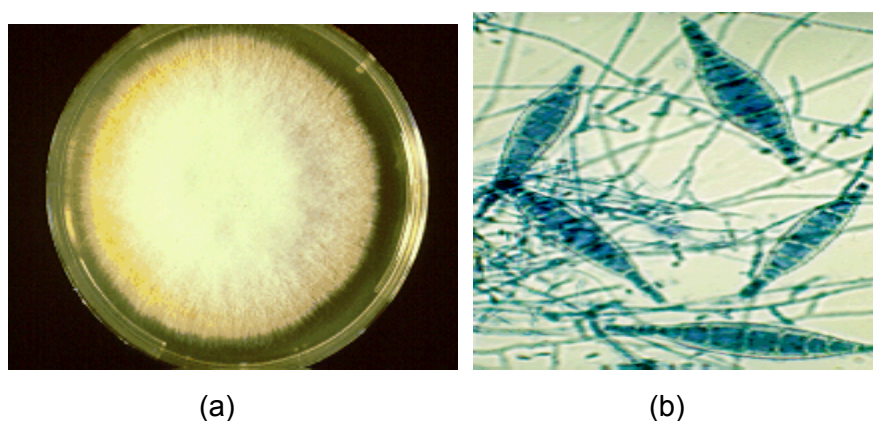


Figure 14 : *Microsporium canis* (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>)

2.2. Les champignons filamenteux imparfaits

Ils représentent avec les levures, à une fréquence moindre que celles-ci, les champignons impliqués dans les mycoses à champignons opportunistes (Bouchet et al., 1989). Cependant depuis dix ans leur fréquence est en forte progression. Les *Aspergillus* dont la responsabilité dans certaines affections est connue depuis fort longtemps, occupent de loin la première place dans les affections opportunistes, parmi les champignons de ce groupe (Bouchet et al., 1989). A côté des *Aspergillus* il faut rattacher les genres *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Scopulariopsis*, ..., qui appartiennent tous à la classe des *Hyphomycètes*.

Aspergillus fumigatus, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Fusarium sp.*, ont été choisies pour être soumises aux tests de recherche d'activités antifongiques.

2.2.1. *Aspergillus fumigatus*

Champignon filamenteux de la classe des *Hyphomycètes*, de l'ordre des *Plectascineae*, et de la famille des *Phialosporeae*, il a été décrit en 1809 par MICHELI ex LINK. Il se présente à l'état parasitaire sous forme de filaments hyalins segmentés (Vanbreuseghem et al., 1978).

En culture sur milieu de Sabouraud solide, les colonies sont d'aspect poudreux à duveteux de couleur vert foncé à grisâtre, puis brun foncé à noirâtre en vieillissant (Figure 15a). Le revers de la culture est incolore à jaunâtre, de brun foncé à rougeâtre avec l'âge (Vanbreuseghem et al., 1978, ; Segretain et al., 1987).

Au microscope, on observe des conidiophores lisses de longueur variable qui se renflent à leurs extrémités, des spores rondes à ovalaires finement échinulées (Figure 15b).

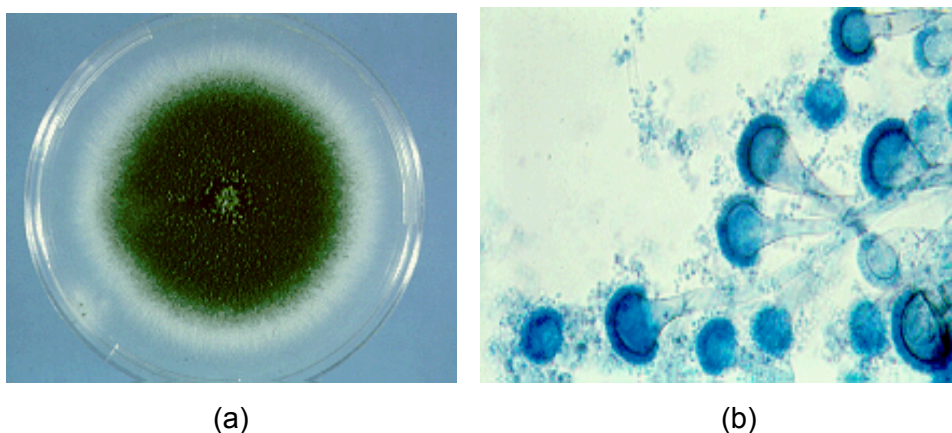


Figure 15 : *Aspergillus fumigatus* (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>)

2.2.2. *Scopulariopsis brevicaulis*

C'est un champignon de la classe des Hyphomycètes, de la famille des Phialosporeae et dont la forme sexuée est connue. *Scopulariopsis brevicaulis* a été décrit en 1907 par BAINIER (Larone, 1995 ; Sutton et al., 1998), il présente des colonies planes, poudreuses, plissées au centre et de couleur beige à l'endroit et brun miel au revers sur milieu de Sabouraud solide (Figure 16a) (Larone, 1995 ; Sutton et al., 1998 ; De Hoog et al., 2000).

A l'état parasitaire, il se présente sous forme de filaments et conidies souvent en chaînettes (Vanbreuseghem et al., 1978).

Au microscope, on observe des filaments ramifiés et arthrosporés, de nombreuses conidies arrondies à base tronquée, échinulées et disposées en chaînettes (Figure 16b) (Vanbreuseghem et al., 1978, ; Segretain et al., 1987 ; Larone, 1995 ; Sutton et al., 1998 ; De Hoog et al., 2000).

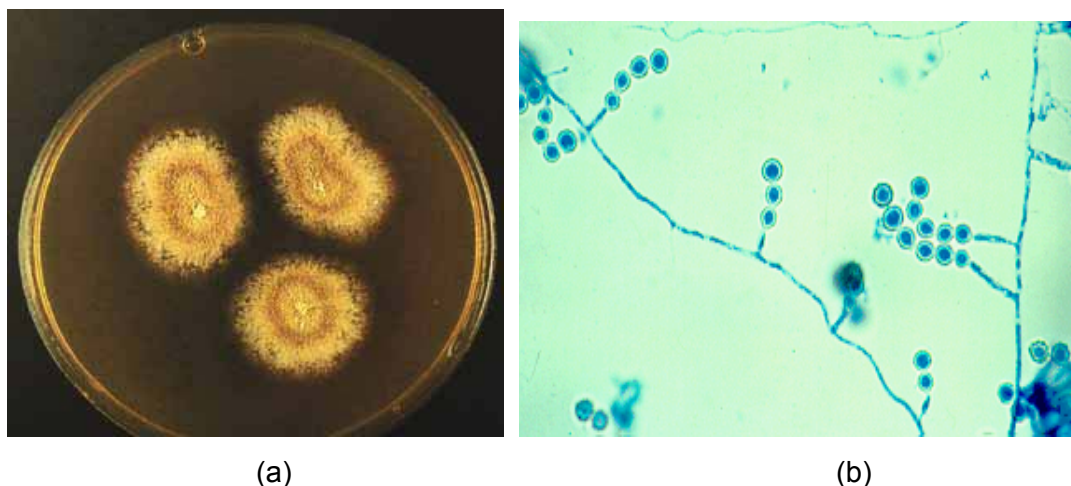


Figure 16 : *Scopulariopsis brevicaulis* (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>)

2.2.3. *Fusarium sp.*

Décrit par LINK ex GRAY en 1821 (Larone, 1995) le genre *Fusarium* est représenté par des champignons filamenteux imparfaits dont les colonies sont habituellement à croissance rapide sur milieu de Sabouraud gélosé. Elles ont un aspect pâle ou brillamment coloré selon les espèces. Les *Fusarium* peuvent présenter un mycélium cotonneux aérien (Sutton et al., 1998 ; De Hoog et al., 2000). Certains *Fusarium* sécrètent un pigment rougeâtre.

Au microscope, *Fusarium sp.* présente des macroconidies en fuseau de 3 ou 4 cellules. On note également la présence de microconidies dans certaines espèces (Badillet et al., 1991 ; Larone, 1995 ; Sutton et al., 1998 ; De Hoog et al., 2000).

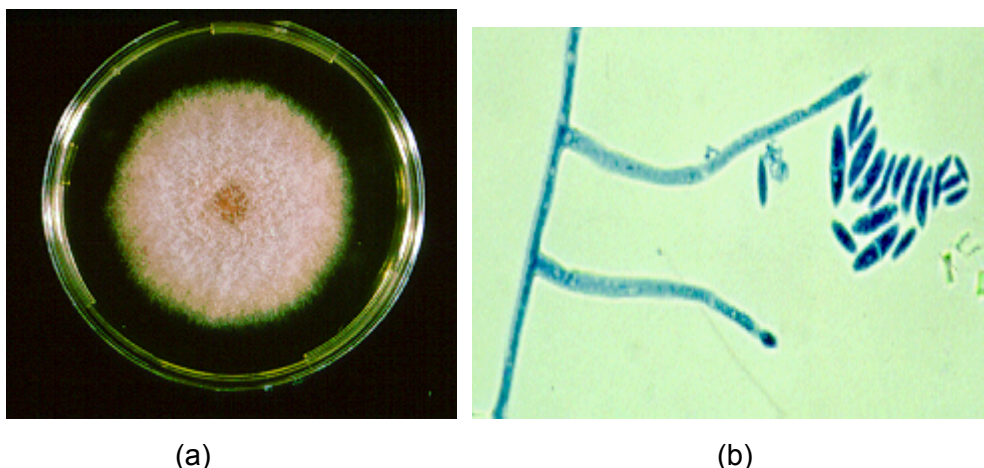


Figure 17: *Fusarium* sp. (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>)

2.3. Les levures

Ce sont des champignons de forme arrondie, se présentant en principe normalement à l'état unicellulaire et se reproduisant par bourgeonnement au moyen de blastospores, parfois sexuellement par l'intermédiaire d'ascospores (Bouchet, 1979 ; Vanbreuseghem et al., 1978 ; Meyohas et al. ; 1989). Leur biologie est instable et varie selon les genres, voire selon les espèces.

Normalement saprophytes et inoffensives, elles peuvent devenir pathogènes lorsque l'organisme hôte présente les conditions favorables, on parle alors d'espèces opportunistes (Drouhet et Dupont, 1985).

Le genre *Candida* est de loin le plus représentatif des levures avec environ 200 espèces dont une dizaine seulement rencontrée en pathologie humaine (Rahalison, 1994).

A côté de ce genre existent les genres *Cryptococcus*, *Torulopsis*, *Trichosporon* et *Pityrosporum* ou *Malassezia*.

Deux (2) levures ont fait l'objet d'essais dans le présent travail, *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*.

2.3.1. *Candida albicans*

Champignon commensal le plus couramment mis en cause dans la pathologie fongique humaine, mais dont la pathogénicité est plus liée à la déficience immunitaire de l'hôte qu'à sa propre virulence (Rahalison, 1994). Selon Ruechel (1990), le facteur qui contribuerait le plus à sa virulence serait sa capacité à persister sur les muqueuses.

Décrit en 1853 par BODIN qui lui avait donné le nom de *Oidium albicans* (Koné, 1984), il appartient au groupe des levures anascosporées sans reproduction sexuée connue, à la sous classe des protoascomycètes, à la classe des Ascomycètes, à l'ordre des Endomycétales et à la famille des Saccharomycetacées (Morigbe, 1980 ; Koné, 1984).

C. albicans présente en culture sur milieu gélosé de Sabouraud des colonies de couleur blanc cassé à crème, plus ou moins bombées, d'aspect humide et visqueux (Figure 18a) (Segretain et al., 1987 ; Vanbreuseghem et al., 1978 ; Larone, 1995 ; Sutton et al., 1998 ; Kiraz et al., 2000). Le revers de la culture est de couleur crème.

A l'état parasitaire, il se présente sous forme d'éléments arrondis, ovoïdes bourgeonnants ou non, ou sous forme de pseudomycélium (Figure 18b) (Segretain et al., 1987 ; Vanbreuseghem et al., 1978 ; Larone, 1995 ; Sutton et al., 1998).

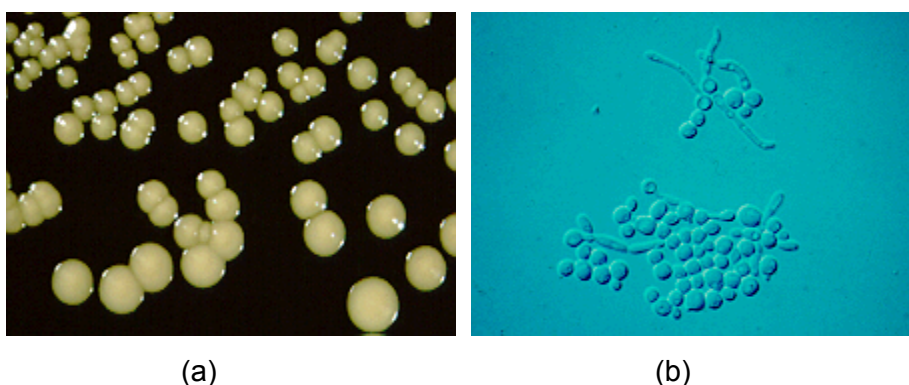


Figure 18 : *Candida albicans* (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>)

2.3.2. *Cryptococcus neoformans*

Rattaché à la classe des Basidiomycètes, à l'ordre des Sporidiales et à la famille des *Cryptococcacées*, *Cryptococcus neoformans* a été décrit en 1901 par VUILLEMIN.

En culture sur milieu de Sabouraud solide sans actidione, les colonies sont planes de couleur beige pouvant devenir ocre en vieillissant (Figure 19a) (Vanbreuseghem et al., 1978 ; Larone, 1995). Le revers de la culture est de couleur blanc à crème.

A l'état parasitaire, il se présente sous forme d'éléments ronds à ovoïdes possédant une grosse capsule mise en évidence à l'encre de chine (Figure 19b) (Segretain et al., 1987 ; Vanbreuseghem et al., 1978).

Au microscope, on observe ni mycélium ni pseudomycélium. On note toutefois la présence de blastospores (Figure 19b) (Larone, 1995).

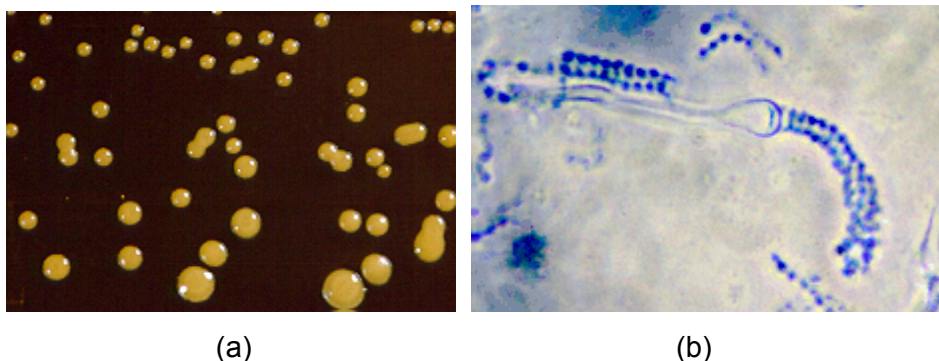


Figure 19 : *Cryptococcus neoformans* (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>)

3. LES ANTIFONGIQUES

Toute substance capable d'inhiber la croissance d'un champignon ou de le tuer peut être qualifiée d'antifongique. Parmi ces composés ceux agissant sur les champignons responsables de mycoses humaines ou animales prennent le nom d'antimycosiques. Ces médicaments peuvent être fournis par la chimie de synthèse ou par le biais de la chimie extractive végétale.

3.1. Les antimycosiques d'origine naturelle ou antibiotiques

Les antifongiques d'origine naturelle proviennent, pour la plupart, des microorganismes tels les antibiotiques bactériens d'où le nom « d'antibiotique antifongique » qui leur est donné. Dans ce groupe les polyènes et la griséofulvine sont les deux principales classes de molécules qui entrent dans la composition des médicaments antimycosiques.

- **les polyènes**

Ils sont principalement produits par les souches de *Streptomyces* et caractérisés par la présence d'une partie polyhydroxylée et de doubles liaisons conjuguées dans leur cycle lactone. Plusieurs antifongiques figurent dans cette classe, mais seul l'amphotéricine® B, dont la structure est donnée par la Figure 20, est largement utilisé en thérapeutique et demeure un antifongique majeur (Perrier et al., 1988).

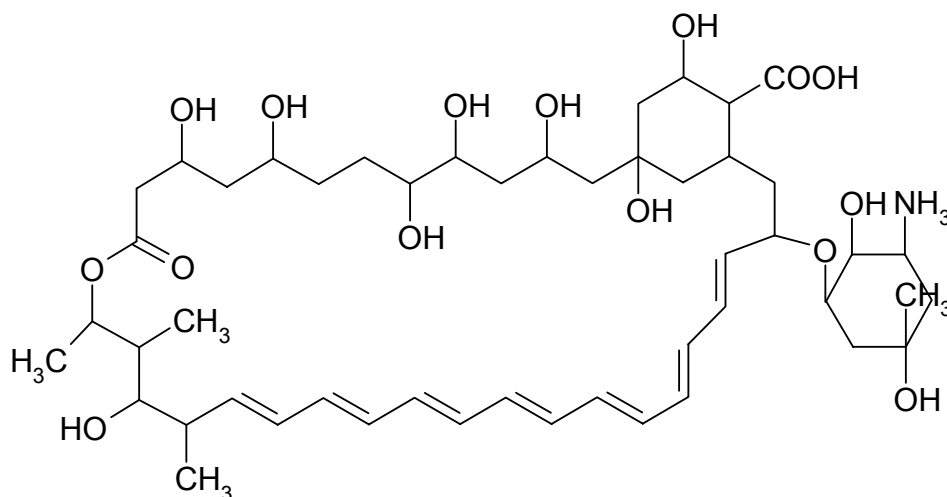


Figure 20 : Structure de l'amphotéricine B

Les polyènes inhibent la croissance d'un nombre important de champignons levuriformes ou filamenteux, saprophytes ou pathogènes et demeurent sans action sur les Actinomycètes, les virus et les bactéries (Briand, 1987).

Les polyènes ont une forte affinité pour l'ergostérol, principal stérol de la membrane des champignons. Ces deux molécules interagissent déstabilisant la structure de la membrane plasmique, avec formation de pores, ce qui conduit à la fuite des constituants cytoplasmiques essentiels. Cependant, le mécanisme exact par lequel les deux molécules interagissent est encore mal connu.

- **la griséofulvine**

Antifongique isolé à partir de *Penicillium griseofulvum*, la griséofulvine (Figure 21) était au départ destinée à l'agriculture. Elle a été utilisée pour la première fois en thérapeutique, en 1958, par Gentles et administrée par voie orale dans le traitement de la teigne du cobaye puis des teignes humaines (Drouhet et Dupont, 1989 ; Espinel-Ingroff et Shadomy, 1989).

C'est une molécule de faible spectre d'activité utilisée uniquement dans le traitement des dermatophyties. Elle se concentre au niveau de la kératine (Linas et Seguela, 1989), et son mécanisme d'action mal connu pourrait découler d'action antiméiotique liée à une inhibition de synthèse protéique et à une altération de la paroi cellulaire (Al Awad, 1993). A forte dose, elle présente une action anti-inflammatoire.

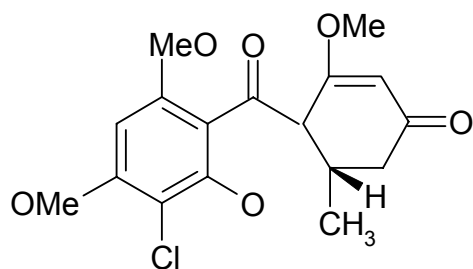


Figure 21 : Structure de la griséofulvine

3.2. Les antimycosiques synthétiques

Ce sont des analogues de bases pyrimidiques (5-fluorocytosine), de dérivés azolés (imidazole et triazole) et de dérivés allylaminiques.

- **la 5-fluoro-cytosine (5-FC)**

Active sur les levures (*Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*) et sur les champignons filamenteux (*Aspergillus*), la 5-fluorocytosine est une base pyrimidique analogue de la cytosine dont elle diffère seulement par le remplacement d'un atome d'hydrogène par un atome de fluor (Figure 22). Quasiment non toxique, sauf chez les immunodéprimés, (Drouhet et Dupont, 1989), elle possède une grande et rapide diffusion dans les liquides biologiques. C'est un inhibiteur de l'ADN. Son mécanisme d'action décrit par Perrier et al. (1988) montre qu'elle entre en compétition avec les bases puriques et pyrimidiques au niveau d'un transporteur commun : la cytosine perméase. Elle est ensuite transformée en sa forme toxique, le 5-fluoro-uracile par la cytosine désaminase.

Différentes réactions aboutissent à la formation du 5-fluoro-uridine-triphosphate (5-FUTP) qui est incorporé dans l'ARN, ce qui empêche la synthèse de la protéine fongique normale.

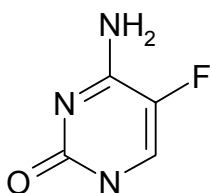


Figure 22 : Structure de la 5-fluorocytosine

- **les dérivés azolés**

Ce sont des antifongiques à large spectre, actifs sur les levures, les dermatophytes, les moisissures et les champignons dimorphiques. Leur découverte par Wooley (1944) a

révolutionné la thérapeutique antimycosique (Perrier et al., 1988). Ils se subdivisent en deux sous-famille : les imidazoles (exemple : kétoconazole, Figure 23) et les triazoles (exemples : itraconazole et fluconazole, Figures 24 et 25). Bien que leurs structures chimiques soient différentes, les dérivés azolés possèdent tous la même cible biochimique dans la cellule fongique : la voie de biosynthèse de l'ergostérol. C'est une voie très complexe dans laquelle toutes les activités enzymatiques et les mécanismes de régulation n'ont pas encore été complètement identifiés. La cible principale des azolés est la C14 α -déméthylase, l'une des enzymes nécessaires à la conversion du lanostérol en ergostérol.

Les dérivés azolés constituent une part importante des antimycosiques. La plupart des agents antifongiques nouveaux mis sur le marché appartiennent à cette classe de substances (Prous, 1993).

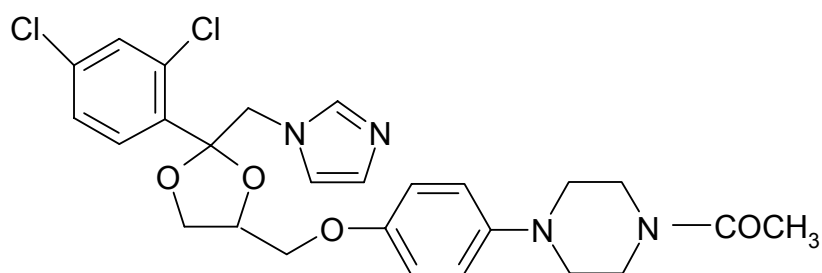


Figure 23 : Structure du kétoconazole

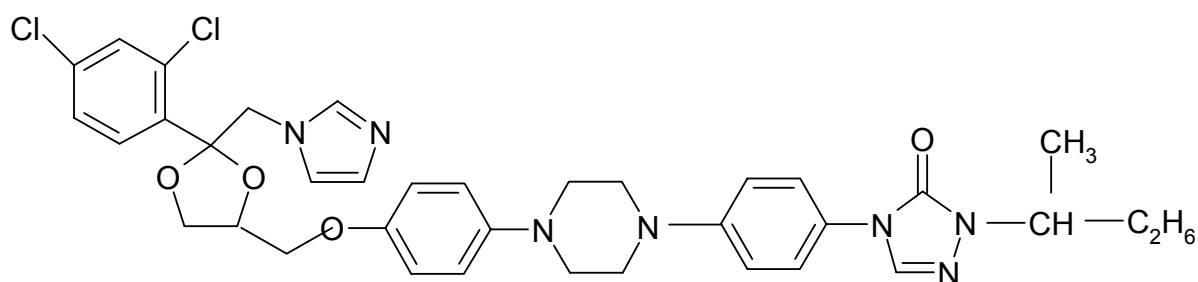


Figure 24 : Structure de l'itraconazole

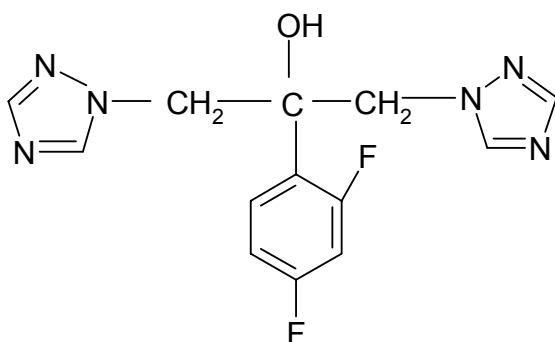


Figure 25 : Structure du fluconazole

• Les dérivés allylaminiques

La terbinafine (Figure 26), issue de la recherche des laboratoires Sandoz, est l'un des antifongiques les plus utilisés et appartenant à cette famille. Elle agit *per os* ou en topique sur de nombreux agents fongiques par un mécanisme très spécifique qui lui confère une grande efficacité et une très bonne tolérance. Elle a été commercialisée en France pour la première fois en 1996 sous forme de comprimé et de crème (Lamisil®) dans le traitement d'onychomycoses, de dermatophyties chroniques à *T. rubrum*, de teignes non inflammatoires du cuir chevelu et de candidoses (Rashid et al., 1995 ; Vidal, 2003).

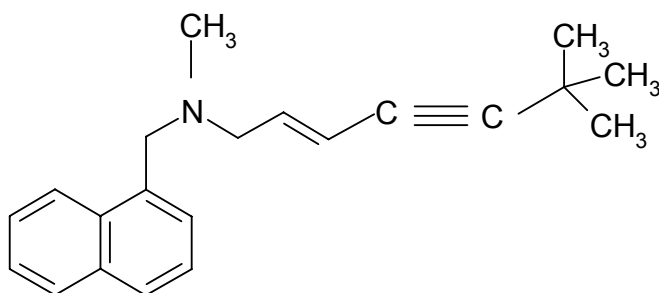


Figure 26 : Structure de la terbinafine

3.3. Substances antimycosiques naturelles ou isolées à partir des plantes

La majorité des antibiotiques d'origine naturelle étaient, jusqu'en 1952, isolés à partir de souches de *Streptomyces sp.* Les plantes, comme source de nouvelles molécules, étaient à peine exploitées (Rahalison, 1994). En 1982 76 antibiotiques tiraient leur origine des plantes à fleurs et d'algues marines (Mitscher et al., 1987).

Depuis, de nombreux travaux ont été effectués en vue d'isoler de nouvelles molécules antifongiques à partir des plantes supérieures (Stephen et Nigel, 1994 ; Favel et al., 1994 ; Balansard et al., 1995 ; Binutu et al., 1996). Mitscher et al. (1987) ont montré que ces

molécules appartiennent pour la plupart à toutes les classes des métabolites secondaires (alcaloïdes, flavonoïdes, quinones, dérivés anthracéniques, saponines et terpènes).

B. MICROFLORES BACTERIENNES CUTANEEES ET MUQUEUSES

- 1. MICROFLORE BACTERIENNE DE LA PEAU**
- 2. FLORE BACTERIENNE DE LA BOUCHE**
- 3. AGENTS THERAPEUTIQUES UTILISES CONTRE LES INFECTIONS BUCCO-DENTAIRES**

INTRODUCTION

Dans ce chapitre, les microflore cutanées et muqueuses sont étudiées. Une attention toute particulière sera également portée sur le genre *Pseudomonas* ainsi que sur les médicaments antibactériens actuellement disponibles sur le marché.

1. MICROFLORE BACTERIENNE DE LA PEAU

La peau est un organe normalement colonisé par de nombreux microorganismes pouvant être classés en deux groupes :

- les bactéries pathogènes qui représentent une très faible proportion et entraînent toujours une infection ;
- les bactéries habituellement non pathogènes qui sont adaptées aux conditions hostiles régnant à la surface cutanée et peuvent être considérées comme commensales. Elles ont la faculté d'adhérer aux squames épithéliales et peuvent atteindre les orifices et la profondeur des follicules pileux ou des glandes sébacées.

Ces bactéries dites non pathogènes, donc saprophytes, protègent l'hôte de l'implantation des bactéries pathogènes en formant une barrière écologique. Cependant, une fois cet équilibre écologique rompu, soit par altération des mécanismes de résistance, soit par altération du revêtement cutané, certaines de ces bactéries deviennent pathogènes en profitant de cette opportunité, d'où le nom de « pathogènes opportunistes » qui leur est donné (Leyden et al., 1987 ; Aviril et al., 1988 ; Regnault, 1990 ; Berche et al., 1991). Cependant cette flore commensale est composée, comme toutes les flores, d'une flore résidente et d'une flore transitoire (Leyden et al., 1987 ; Marshall et al., 1987).

1.1 Flore résidente

Elle est composée par :

- **des cocci Gram⁺** principalement des Microcoques qui sont des aérobies stricts et les premières bactéries à se développer sur la peau du nouveau-né, et des staphylocoques qui sont des hôtes habituels des zones humides, comme le creux axillaire ou le périnée, de la peau humaine ;
- **des bacilles Gram⁺** principalement des Corynéformes (ou Corynébactéries) qui sont soit aérobies, soit anaérobies. Ils sont souvent localisés dans les zones grasses de la peau, notamment le visage.

1.2. Flore transitoire

Elle est composée des bactéries pouvant survivre et se multiplier sur la peau et qui appartiennent à des flores microbiennes environnantes. Les genres représentatifs de cette

flore sont : *Staphylococcus* (*Staphylococcus aureus*), *Streptococcus* (*Streptococcus pyogenes*), *Bacillus*, *Neisseria*, *Clostridium* et des bacilles Gram⁻. Ces bactéries, incapables de survivre plusieurs heures sur la peau saine, sont rapidement éliminées par les mécanismes de défense de l'hôte, mais deviennent résidentes pendant une courte durée (quelques jours à quelques semaines) en cas d'altération cutanée et peuvent provoquer une infection.

1.3. Facteurs de variation de la flore cutanée

La flore cutanée varie selon les endroits et les sujets, ces différences sont dues à divers facteurs (Hewit, 1976 ; Elabaze et Ortome, 1988 ; Berche et al., 1991) :

- Age du sujet

Il est aujourd'hui établi que la flore des sujets jeunes (nouveaux-nés) se met en place progressivement au contact du milieu extérieur alors que celle des personnes âgées s'appauvrit progressivement avec l'âge ;

- Etat pathologique du sujet

Chez des sujets immunodéprimés la prolifération de bacilles Gram⁻ au niveau de la peau est très fréquente, ce qui peut engendrer des infections graves voire des septicémies (Le Chat et al., 1990).

Chez des diabétiques non ou mal équilibrés, on observe une modification de la flore cutanée normale avec une augmentation de la colonisation des germes et des infections (Le Chat et al., 1990) ;

- Territoire cutané

La fréquence des germes présents sur la peau varie en fonction des zones considérées. Ainsi la surface de la peau est majoritairement colonisée par les *Staphylocoques* et les *Corynébactéries* aérobies qui sont incapables de traverser le stratum corneum si celui-ci est intact, la profondeur de la peau est surtout colonisée par des bactéries anaérobies. Dans les follicules pilo-sébacés, de grandes quantités de germes sont présentes. Notons que l'abondance des germes est plus importante dans les régions humides et grasses (creux axillaires, région périnéale, tête).

1.4. Equilibre de la flore cutanée

La cohabitation à la surface de la peau entre les bactéries non pathogènes de la flore résidente et les germes de l'environnement nécessite un équilibre. Ainsi trois mécanismes s'associent pour maintenir l'équilibre écologique de la peau : mécanismes physiques, chimiques et biologiques.

• Mécanismes physiques

La desquamation permet, par un renouvellement permanent du revêtement cutané, de limiter le nombre de bactéries présentes à la surface de la peau. En effet, les bactéries adhérant aux squames épithéliales sont éliminées.

• Mécanismes chimiques

Les lipides, présents dans les sécrétions des glandes sébacées et sudoripares, exercent une action inhibitrice vis-à-vis de certaines bactéries et champignons. Il est aussi établi que la sécheresse de la peau est le principal facteur limitant la prolifération des bactéries. En effet, l'humidité modifie le pH cutané normalement acide, qui devient neutre et donc propice à la prolifération des bactéries.

Les anticorps excrétés dans la sueur (Ig A sécrétoires) préviennent la pénétration cellulaire des microorganismes.

• Mécanismes biologiques

Les relations que les différentes espèces bactériennes établissent entre elles sont complexes et encore mal connues. De nombreuses observations attestent que les bactéries résidentes s'opposent au développement des bactéries pathogènes (Elabaze et Ortome, 1988 ; Berche et al., 1991). Ainsi les infections du nouveau-né seraient favorisées par l'absence de flore cutanée.

1.5. Microflore du pied

Les facteurs contrôlant l'écologie microbienne sont discutés, mais il semble y avoir des relations entre le pH, le degré d'hydratation, la température et la densité microbienne de la peau. En effet, il a été montré que l'occlusion de la peau, responsable de l'augmentation du taux d'hydratation, permet la prolifération des bactéries. Le niveau d'hydratation de la peau pourrait ainsi expliquer les variations observées entre les différents sites (Marples, 1965).

1.5.1. Composition

Des Corynéformes aérobies, des Staphylocoques (*S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. cohnii*), des Microcoques (*M. luteus*, *M. sedentarius*) sont trouvés en nombre important au niveau du pied selon Marshall et al. (1988). Les bactéries Gram⁻ appartenant aux genres *Alcaligenes*, *Moraxella* et *Acinetobacter* sont en quantité moindre. Ces bactéries se répartissent de manière différente sur le pied. Ainsi Marshall et al. (1988) ont étudié la répartition de ces germes au niveau de la face dorsale, de la plante du pied et du 4^{ème} espace interdigital. Il ressort de cette étude une variation quantitative et qualitative des germes entre les sites (Tableau IV).

Tableau IV : Pourcentage de germes prédominants sur chacun des 3 sites du pied d'après Marshall et al., 1988.

Organismes	Site dorsal	Plante du pied	4 ^{ème} espace interdigital
Staphylocoques	50,8	86,4	22
Corynéformes aérobies	30,6	11,9	78
Microcoques	18,6	1,7	0

D'un point de vue quantitatif, la population bactérienne croît du 4^{ème} espace interdigital à la face dorsale. On observe que les Staphylocoques colonisent majoritairement la plante du pied et la région dorsale, alors que les Corynéformes aérobies prédominent au niveau du 4^{ème} espace interdigital où les Microcoques sont absents.

1.5.2. Odeur du pied

Une étude comparative entre la microflore cutanée d'un pied normal ayant une faible odeur et celle d'un pied ayant une forte odeur, a été réalisée par Marshall et al. (1987 et 1988). Les résultats obtenus montrent que les pieds présentant une forte odeur possèdent une densité de Staphylocoques et de Corynéformes aérobies au dessus de la moyenne. Ces bactéries y compris les microcoques sont capables de produire des exoenzymes, lipases et protéinases, dont l'activité intense conduit à la dégradation du stratum corneum, avec libération de matériel de faible poids moléculaire, qui va être assimilé par la flore cutanée en fonction des besoins énergétiques de chaque bactérie. Les composés qui sont libérés en excès vont conduire à la formation de composants volatils odorants pouvant être responsable de l'odeur du pied. Des études en vue de trouver des antimicrobiens ayant une action sélective sur les bactéries générant cette mauvaise odeur, tout en épargnant la flore saprophyte utile, ont été menées par quelques auteurs. Ainsi Chaumont et al. (1989) ont montré que certains composés d'origine végétale, possédaient cette action sélective sur la microflore des pieds.

1.6. Microflore des aisselles

1.6.1. Composition

La flore épidermique axillaire est constituée de bactéries aérobies et anaérobies dont la densité par cm² est quasiment la même sur les deux aisselles, 5×10^5 à 10^6 , selon Leyden et al. (1987). Cette flore est constituée selon Rennie et al. (1991) de :

- Corynéformes aérobies
- Propionibactéries
- Staphylocoques (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. saprophyticus*)

- Microcoques (*M. luteus* est le seul microcoque isolé)

1.6.2. Odeur des aisselles

Le corps humain produit un nombre considérable d'odeurs (pieds, cheveux, haleine) qui sont caractéristiques et reconnaissables. Cependant de toutes ces odeurs, celle des aisselles est souvent la plus forte et la plus facilement identifiable. Shelley et al. (1953) ont montré que l'odeur des aisselles provient des glandes sudoripares apocrines qui présentent une synergie d'action avec les bactéries saprophytes de l'aisselle. Des études réalisées par Rennie et al. (1989, 1990, 1991) montrent que toutes les bactéries de la microflore axillaire ne sont pas impliquées dans la production de l'odeur. En effet, il semble que cette propriété soit réservée aux Corynéformes aérobies notamment ceux appartenant à l'espèce *Corynebacterium xerosis*.

Il faut également signaler que la présence des poils au niveau des aisselles n'intervient nullement dans l'intensité de l'odeur, ils ne sont pas un bon substrat pour la croissance des bactéries.

1.6.3. Mécanisme de la formation de l'odeur

L'hypothèse faite par Rennie et al. (1989) sur le mécanisme de la formation de l'odeur repose sur la relation étroite entre l'odeur, la densité de Corynéformes aérobies et le métabolisme des stéroïdes. Parmi les Corynéformes isolés 71,4% se sont montrés capables de produire une odeur et appartiennent à l'espèce *Corynebacterium xerosis*. Cette bactérie possède une enzyme (5 α -reductase) capable de métaboliser les stéroïdes comme la testostérone. Ces auteurs ont également montré qu'il existe dans la sueur apocrine, d'autres précurseurs capables d'être dégradés en molécules malodorantes par la flore axillaire.

Les Corynébactéries aérobies favorisent les réductions, avec formation des composés les plus odorants (5 α -androstanédione et 3 α -androstanédiol) à partir des composés les moins odorants (androsténédione et androsténédiol), en utilisant les androst-16-ène toujours présents à la surface axillaire ou dans les sécrétions apocrines stériles (Figure 27). Il n'y a donc pas synthèse de *novo* de ces stéroïdes par les bactéries.

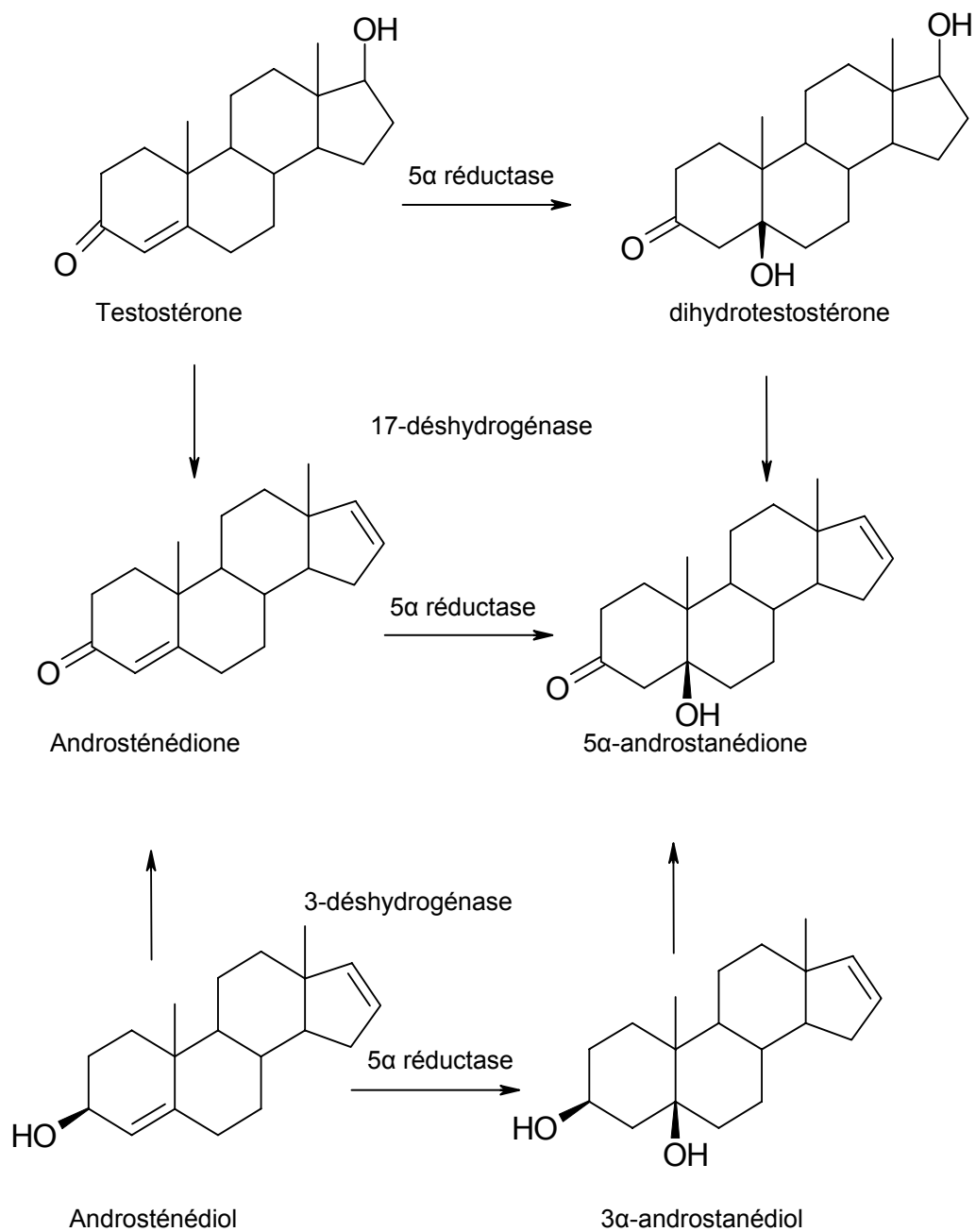


Figure 27 : Transformation de la testostérone par *Corynebacterium Xerosis* d'après Rennie et al. (1990)

1.7. Cas particulier de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa communément appelé bacille pyocyanique vit à l'état saprophytique dans l'eau, le sol humide et sur les végétaux et résiste peu à la dessiccation. C'est une bactérie saprophyte peu courante du conduit auditif externe de l'Homme qui peut également vivre en commensale dans son tube digestif. 1% des individus sains en sont porteurs (Pouzaud, 1992). Pathogène opportuniste, *P. aeruginosa* est responsable de plusieurs infections nosocomiales et également des :

- infections locales de l'œil ou de l'oreille (isolé chez 45 à 65% des personnes ayant une otite et en particulier chez des sujets diabétiques),
- infections urinaires,
- infections des plaies et brûlures,
- méningites,
- infections pulmonaires,
- gastro-entérites aiguës et des septicémies.

Il possède une grande capacité naturelle, ou acquise, de résistance aux antibiotiques existants sur le marché (Franklin, 1993).

2. FLORE MICROBIENNE DE LA BOUCHE

Avec plus de 300 espèces bactériennes répertoriées, la flore bucco-dentaire reste très complexe. Il existe schématiquement deux écosystèmes dans la bouche : la flore de la muqueuse buccale et celle de la plaque dentaire (Lindhe, 1986).

La colonisation des surfaces de la dent par certains des microorganismes, appartenant à ces flores, aboutit à deux maladies pandémiques de nos sociétés :

- la carie qui résulte de la dissolution de l'émail par des acides provenant de la dégradation des hydrates de carbones alimentaires par des bactéries ;
- et la maladie parodontale qui est une réponse inflammatoire de la gencive et des tissus connexes à l'accumulation de bactéries et de la plaque à la surface de la dent.

Dans ce chapitre, nous allons passer en revue la flore de la muqueuse buccale et celle de la plaque dentaire en insistant sur leur responsabilité dans l'apparition des caries et de la maladie parodontale.

2.1. Flore de la muqueuse buccale

Elle est essentiellement constituée de certaines espèces du genre *Streptococcus* qui adhèrent aux cellules de l'épithélium lingual et jugal (*Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitior*, *Streptococcus milleri*,...). D'autres espèces leur sont fréquemment associées

notamment *Bacteroides melanogenicus*, *Micrococcus mucilagenosus*, *Fusobacterium sp.* (Berche, 1991).

2.2. Flore de la plaque dentaire

Composée de glycoprotéines provenant de la salive et de polymères insolubles de glucose sécrétés localement, la plaque dentaire apparaît, au microscope électronique, constituée de nombreuses bactéries insérées dans une matrice organique. Elle se constitue en quelques heures et peut se calcifier ou se compliquer en évoluant vers une carie dentaire ou une parodontite. Les bactéries de la plaque dentaire sont là encore des streptocoques (*S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitior*, *S. millieri*, *S. salivarius*), avec un rôle particulier pour *S. mutans* dans l'apparition des caries dentaires. On trouve également des bacilles *Gram*⁺ (*Actinomyces israeli*, *A. odontolyticus*), des *Veillonella* et des *Bacteroides* (Regnault, 1990 ; Berche et al., 1991).

Dans le tableau V sont représentés quelques genres et espèces bactériennes identifiées au niveau de la cavité buccale.

2.3. Infections de la cavité buccale

Les infections de la cavité buccale sont, pour la plupart, d'origine dentaire et causées par les bactéries de la plaque dentaire ou celles du sillon gingivo-dentaire qui colonisent le parodonte. Les infections rencontrées sont la carie dentaire et les parodontites.

La carie est une affection bactérienne qui atteint les tissus durs de la dent, d'abord en surface puis en profondeur. Elle est liée à la colonisation des surfaces dentaires par les bactéries appartenant aux genres *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Actinomyces* qui ont la capacité de métaboliser les carbohydrates et de produire des acides à des concentrations suffisantes pour déminéraliser l'émail. Cependant le genre *Streptococcus*, avec *S. mutans*, forme le groupe le plus incriminé dans l'apparition des caries dentaires (Klock et Krasse, 1979 ; Emilsson et Krasse, 1985 ; Loesche et Straffon, 1979 ; Loesche, 1986 ; Alaluusua et al., 1989).

Les maladies parodontales sont causées par une accumulation des bactéries à la surface de la dent et sous la gencive et se caractérisent par un saignement de la gencive au brossage et à la mastication. Elles sont associées aux bactéries des genres *Actinomyces*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Campylobacter*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus* et *Fusobacterium* (Moore et al., 1987). Elles peuvent être réduites par une bonne hygiène orale.

Tableau V : Quelques genres et espèces bactériennes identifiées au niveau de la cavité buccale d'après Lindhe (1986).

	Bactéries Gram positif		Bactéries Gram négatif	
	Aérobies et anaérobies facultatifs	Anaérobies	Aérobies et anaérobies facultatifs	Anaérobies
COCCI	Streptococcus <i>S. milleri</i> <i>S. mitis</i> <i>S. mutans</i> <i>S. salivarius</i> <i>S. sanguis</i>	Streptococcus <i>S. constellatus</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. morbillorum</i>	Neisseria <i>N. flavescens</i> <i>N. mucosa</i> <i>N. sicca</i> <i>N. subflava</i>	Veillonella <i>V. alcalescens</i> <i>V. parvula</i>
	Staphylococcus <i>S. epidermidis</i>	Peptostreptococcus <i>P. anaerobius</i> <i>P. micros</i>	Branhameila <i>B. catarrhalis</i>	Acidaminococcus <i>A. fermentans</i>
	Micrococcus	Peptococcus <i>P. magnus</i> <i>P. prevotti</i>		
BACILLES	Actinomyces <i>A. naeslundii</i> <i>A. viscosus</i>	Actinomyces <i>A. israelii</i> <i>A. meyeri</i> <i>A. odontolyticus</i>	Haemophilus <i>H. aphrophilus</i> <i>H. influenzae</i> <i>H. parainfluenzae</i> <i>H. paraprophilus</i> <i>H. segnis</i>	Bacteroïdes <i>B. asaccharolyticus</i> <i>B. buccae</i> <i>B. buccalis</i> <i>B. capillus</i> <i>B. denticola</i>
	Bacterinema <i>B. matruchotii</i>	Arachnia <i>A. propionica</i>	Actinobacillus <i>A. actinomycet-</i> <i>emcomitans</i>	<i>B. gingivalis</i> <i>B. gracilis</i> <i>B. loescheii</i>
	Rothia <i>R. deptocariosa</i>	Eubacterium <i>E. alactolyticum</i> <i>E. brachy</i> <i>E. lentum</i> <i>E. nodatum</i> <i>E. saburreum</i> <i>E. timidum</i>	Capnocytophaga <i>C. gingivalis</i> <i>C. ochracea</i> <i>C. sputigena</i>	<i>B. melanogenicus</i> <i>B. oris</i> <i>B. oralis</i> <i>B. pentosaceus</i>
	Lactobacillus <i>L. acidophilus</i> <i>L. brevis</i> <i>L. buchneri</i> <i>L. casei</i> <i>L. cellobiosus</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. salivarius</i>	Lactobacillus <i>L. catenaeforme</i> <i>L. crispatus</i> Rifidobacterium <i>R. dentium</i> <i>R. eriksonii</i> Propionibacterium <i>P. acnes</i> <i>P. freudenreichii</i> <i>P. jensenii</i> Clostridium	Elkenella <i>E. corrodens</i> Campylobacter <i>C. sputorum</i>	Fusobacterium <i>F. naviforme</i> <i>F. nucleatum</i> Leptotrichia <i>L. buccalis</i> Campylobacter <i>C. consisus</i> Selenomonas <i>S. sputigena</i> Wolinella <i>W. recta</i>

3. AGENTS THERAPEUTIQUES UTILISES CONTRE LES INFECTIONS BUCCO-DENTAIRES

Pour lutter contre la flore buccale pathogène et la formation de la plaque dentaire, de nombreux agents chimiques, possédant des propriétés antiseptiques, sont utilisés. Ces agents sont incorporés à des solutions de rinçage, à des gels, à des dentifrices ou à des gommages à mâcher (Kandelmann, 1989). Nous allons ici citer quelques unes des molécules utilisées.

3.1. La chlorhexidine

C'est un antiseptique du groupe des bis-biguanides, elle est peu irritante et semble peu ou pas toxique. Ses sels les plus fréquemment utilisés sont : le digluconate de chlorhexidine (présent à 0,1 ou 0,2% dans la composition des bains de bouches) et le dihydrochlorure de chlorhexidine (incorporé dans la plupart des pansements parodontaux) (Rateitschak et al., 1986). Malgré son affinité considérable pour les structures de la cavité buccale et son action antiplaque, la chlorhexidine présente quelques limites et inconvénients (Giertsens et al., 1988).

♦ Limites

L'utilisation de la chlorhexidine comme agent thérapeutique des infections bucco-dentaires présente quelques limites (Kandelmann, 1989) :

- persistance d'une faible colonisation bactérienne ;
- reprise de la croissance de la plaque dès que les rinçages à la chlorhexidine sont interrompus, il n'y a donc pas d'effet rémanent ;
- inefficacité de la chlorhexidine sur la plaque sous-gingivale ;
- faible efficacité une fois incorporée dans les dentifrices.

♦ Inconvénients

Les inconvénients de l'utilisation de la chlorhexidine sont les suivants :

- goût très amer et déplaisant
- coloration brunâtre de la langue et des dents, réversible avec l'arrêt du traitement ;
- desquamation sévère et douloureuse, lorsqu'elle est utilisée à forte dose.

3.2. Les autres bis-biguanides

Les bis-biguanides alcoylés (alexidine, octihexidine, nonabutidine,...) sont des composés dans lesquels les groupements chlorophényl de la chlorhexidine ont été substitués par des chaînes alcoylées linéaires ou ramifiées. Leur action thérapeutique est comparable à celle

de la chlorhexidine dans la prévention de la formation des plaques in vitro (Baker et al., 1987).

3.3. Le lauryl sulfate de sodium

C'est le détergent le plus couramment utilisé dans les compositions des dentifrices, à une concentration variant habituellement entre 1 et 3%, il inhibe la formation de la plaque dentaire (Giertsen et al., 1989).

3.4. Les fluorures d'amines

Ils sont utilisés pour leur action contre les microorganismes impliqués dans l'étiologie des caries et des pathologies parodontales. Ils adhèrent à la dent formant ainsi une barrière qui empêche l'accumulation des microorganismes, et inhibent également certaines réactions enzymatiques de la glycolyse, réduisant ainsi la quantité d'acide produite par les bactéries de la plaque (Kay and Wilson, 1988 ; Banoczy et al., 1989).

3.5. Le zinc

Les ions zinc inhibent in vitro l'accumulation et la production d'acides des streptocoques oraux, et in vivo la formation de la plaque, ainsi que l'acidogénicité de la plaque établie (Giertsen et al., 1989). Le zinc et les autres ions métalliques peuvent être partiellement retenus dans la cavité buccale et au niveau de la plaque dentaire par des liaisons ioniques. Ces liaisons sont des facteurs importants du mécanisme antiplaque, car elles permettent un effet bactériostatique prolongé sur les microorganismes de la plaque (Gierstsen et al., 1989).

C. PATHOLOGIES CAUSEES PAR LES ASSOCIATIONS BACTERIENNES ET FONGIQUES

De nombreux agents pathogènes pour l'Homme sont apparus au XX^{ème} siècle. Cependant, il convient d'observer que les dernières grandes alertes dues aux maladies infectieuses (Sida, maladie de la vache folle, SRAS, grippe aviaire,...) sont toutes d'origine animale. Les agents responsables de ces pathologies ont franchi, pour certains, la barrière d'espèces. C'est pourquoi, une extension de notre étude à un complexe bactério-fongique très important en médecine vétérinaire, où les animaux de compagnie peuvent s'avérer porteurs de germes pathogènes pour l'Homme (par exemple les *Pseudomonas*), nous a semblé nécessaire.

En effet, les pathologies causées par les associations bactériennes et fongiques sont très nombreuses dans le règne animal. Ainsi les chiens et chats sont souvent victimes de mycoses mixtes où les champignons sont associés aux bactéries pathogènes. Tel est le cas des otites externes connues pour être des affections rebelles, ce qui se comprend quand on connaît l'anatomie sinueuse des organes atteints. Dans cette affection la levure *Malassezia pachydermatis* est très souvent retrouvée en association avec plusieurs bactéries. Ainsi Nobre et al. (1998), Sharma and Rhodes (1975), ont montré que la prévalence de *Malassezia pachydermatis*, de *Staphylococcus sp.*, de *Pseudomonas sp.*, de *Proteus mirabilis*, de *Streptococcus sp.* dans l'apparition des otites externes de chiens était respectivement de 82%, 24,5%, 18,1%, 3,9% et de 5,2%. D'autres champignons notamment *Candida sp.*, *Cryptococcus sp.* et *Aspergillus sp.* sont également rencontrés.

A côté des otites externes d'autres pathologies sont causées et/ou aggravées par ces associations telles que:

- les dermatites chroniques chez les chiens (Omodo-Eluk et al., 2003)
- les pyodermites chez les canins (Cobb et al., 2005)
- la pneumonie hémorragique du vison (Hammer et al., 2003)
- les ulcères de la cornée chez les animaux de compagnie (Prado et al., 2004).

La complexité de ces associations bactériennes et fongiques ainsi que la spécificité des sites affectés expliqueraient la virulence de ces pathologies.

CHAPITRE III

TECHNIQUES D'ETUDE DES

ACTIVITES ANTIMICROBIENNES

- 1. METHODE DE DIFFUSION**
- 2. METHODE DES DILUTIONS**
- 3. METHODES BIOAUTOGRAPHIQUES**

INTRODUCTION

Les tests antimicrobiens *in vitro* sont dans les grandes lignes similaires qu'il s'agisse des champignons ou des bactéries (Holt, 1975). Dans ce chapitre, nous allons nous limiter aux tests antimicrobiens appliqués aux produits naturels. Trois méthodes principales sont actuellement utilisées : la méthode de diffusion, la méthode des dilutions et la bioautographie. Les deux premières sont couramment appliquées en microbiologie médicale pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques et antifongiques de souches de microorganismes isolés en milieu hospitalier.

Dans le cadre de la recherche de composés actifs à partir de plantes supérieures, ces méthodes ont été adaptées pour mettre en évidence des activités antimicrobiennes dans des extraits bruts et dans des fractions ou produits purs végétaux (Rios et al., 1988).

1. METHODE DE DIFFUSION

1.1. Principe et protocole expérimental

C'est la méthode la plus utilisée dans les laboratoires de microbiologie (antibiogrammes et antifongigrammes) pour faire le screening et l'isolement guidé par l'activité.

Le principe de cette méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide à partir d'un point précis, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme. L'effet du composé antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Dans la technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester (Broadasky et al., 1976).

Le protocole expérimental de cette méthode, appliquée aux produits naturels, a été résumé par Rios et al. (1988) de la manière suivante :

- le test se fait en boîte de Petri ;
- une culture du microorganisme, diluée à une concentration donnée, est mise en route ;
- le milieu de culture est inoculé de microorganismes soit à l'aide d'un écouvillon, soit à l'aide d'un râteau ;
- le milieu ainsiensemencé est gardé de manière à ce qu'aucune croissance notable ne commence jusqu'à ce que les produits à tester soient déposés dans la boîte de Petri ;
- les produits à tester sont préparés dans les excipients adéquats (le solvant étant choisi de manière à ce que lui-même n'ait pas d'activité) et mis en contact avec le microorganisme par imprégnation de disques ou par remplissage de puits ou de cylindres stériles faits avec un matériau approprié ;

- certains auteurs préconisent une pré-incubation de 1-4 heures entre 0-4°C pour favoriser la diffusion ;
- les boîtes sont alors incubées à la température appropriée (selon le microorganisme) pendant 18 heures environ ;
- les zones d'inhibition sont mesurées.

1.2. Applications et limites

Théoriquement, tous les produits peuvent être testés par cette technique s'ils diffusent bien dans l'agar. Cependant plusieurs facteurs peuvent influencer les résultats obtenus : la densité de l'inoculum, la composition du milieu gélosé, les caractéristiques de croissance des souches, la température d'incubation, le temps d'incubation, le temps d'application des produits à tester et la concentration de produit sur disque / puits / réservoir.

Si théoriquement la méthode de diffusion est applicable à toute classe de substances et tout microorganisme, certains auteurs mentionnent que les résultats des tests d'huiles essentielles ne sont pas toujours comparables d'un groupe à l'autre puisque certaines diffusent très mal dans la gélose solide. En plus on énumère des sources d'erreurs possibles dues à des mesures du diamètre d'inhibition, à des contaminations par d'autres microorganismes et à la quantité de microorganismes étalée si celle-ci n'est pas contrôlée.

Cette méthode a l'avantage d'être simple et rapide. Elle permet d'évaluer un grand nombre d'échantillons à la fois (4 / boîte). Cependant, les résultats ne sont pas exprimés par une unité standard reconnue et les problèmes de diffusion des produits limitent par contre son application. En effet, dans le domaine des produits d'origine végétale par exemple, on est souvent confronté à des composés de polarité variable qui diffusent plus ou moins bien dans l'agar.

2. METHODE DES DILUTIONS

Elle permet d'évaluer qualitativement mais surtout quantitativement l'activité d'une substance. Le principe de la technique consiste à diluer directement le produit à tester dans le milieu de culture liquide ou gélosé et à inoculer par la suite ce milieu avec les microorganismes. En effet, en diluant différentes concentrations du produit à tester, on peut définir la valeur la plus faible à laquelle on observe encore une inhibition de croissance des microorganismes : c'est la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).

La procédure pour ensemer le milieu dépend de la nature du microorganisme, d'où les différentes variantes de la méthode.

2.1. Méthode des dilutions en milieu liquide

La technique consiste à réaliser des dilutions successives, dans le milieu de culture, à partir d'une solution mère du produit à tester. A ces dilutions, une suspension du microorganisme est ajoutée. Après l'ensemencement l'ensemble est incubé pendant un temps et à une température donnés, la croissance ou l'inhibition du microorganisme est alors déterminée. La lecture des résultats se fait visuellement ou par mesure de la turbidité au spectrophotomètre.

2.2. Méthode des dilutions en milieu gélosé solide

La démarche est la même que précédemment sauf que la dilution se fait dans un milieu de culture gélosé préalablement fondu et maintenu en surfusion à 45°C pour pouvoir incorporer et mélanger le produit à tester. L'ensemencement est réalisé soit par inondation à partir d'une suspension de microorganisme préparée de façon à ce qu'il soit le plus homogène possible, soit par dépôt ponctuel à l'aide d'un inoculateur automatique (par exemple le multiensemenceur de Steers dans le cas des levures et bactéries) . La lecture des résultats se fait visuellement par observation de la croissance ou de l'inhibition du microorganisme.

2.3. Applications et limites

Dans l'application de cette technique, des paramètres tels que le milieu de culture et la concentration de l'inoculum peuvent être fixés. Les microorganismes peuvent être ensemencés différemment car il n'existe pas de mode d'inoculation standard.

Dans le choix d'une des deux variantes de la méthode de dilution, celle en milieu gélosé solide aurait, d'après Barry (1986), trois avantages majeurs sur celle en milieu liquide :

- faire croître un plus grand nombre de microorganismes (bactéries aérobies ou champignons);
- permettre d'observer plus facilement les éventuelles contaminations ou hétérogénéité de populations;
- permettre d'incorporer plus facilement certains suppléments indispensables à des microorganismes donnés. C'est le cas par exemple du *Pityrosporum ovale* qui pour sa croissance a besoin de sérum et de l'huile d'olive.

La méthode par dilution est la plus appropriée pour les évaluations quantitatives d'activité (CMI). Elle reste toutefois assez fastidieuse et longue avec les procédures de dilutions en série à faire. Mais elle présente l'avantage de ne pas faire intervenir un gradient de diffusion puisque le produit à tester est mélangé directement avec l'inoculum, ainsi la substance et la cible se trouvent en contact direct.

Dans le cas des produits végétaux, la limitation se situerait au niveau de la dissolution des composés.

Notons que ces méthodes de dilution permettent également de mesurer les concentrations minimales fongicide et bactéricide (CMF et CMB). Pour ce faire, des microorganismes sont, dans un premier temps, ensemencés dans du milieu de culture liquide, repartit dans des tubes ou dans des microtubes puis incubés à une température et pendant une durée adéquates. Ensuite, on réalise une subculture sur milieu gélosé par prélèvement des tubes ne présentant pas de croissance. Après incubation pendant une durée déterminée, la plus faible concentration du composé à tester pour laquelle la subculture est négative correspond à la CMF ou à la CMB.

3. METHODES BIOAUTOGRAPHIQUES

Elles ont été à l'origine mises au point pour faire l'analyse de mélanges d'antibiotiques qui étaient insolubles dans l'eau et qui diffusaient mal dans la gélose, mais dont il fallait pourtant déterminer l'activité. Ces méthodes impliquent à la fois une chromatographie sur couche mince (CCM) des composés à tester suivie d'une révélation par des microorganismes cibles comme révélateurs. Cette combinaison CCM/révélateur biologique fut par la suite exploitée comme test antifongique et antibactérien de produits naturels.

Il existe trois variantes de bioautographie selon Rios et al. (1988), chacune d'elle diffère de l'autre par la manière de faire « la révélation biologique ».

3.1. Bioautographie de contact

La CCM est mise en contact avec la surface d'un milieu de culture infesté de microorganismes de façon homogène, de manière à ce qu'il y ait comme une empreinte sur cette surface. Les produits qui ont diffusé depuis la CCM vont agir sur les microorganismes en milieu nutritif gélosé et les zones d'inhibition sont observées.

La principale limite de cette méthode est la mauvaise résolution des spots d'inhibition (Rahalison, 1994). De plus les produits devant diffuser depuis un support, ceux qui ont une faible capacité de diffusion ne peuvent pas être testés par cette technique.

3.2. Bioautographie directe

La CCM est directement révélée à l'aide d'une suspension de microorganismes en milieu liquide ou en milieu nutritif semi-solide. Les zones d'inhibition sont observées après un temps et une température d'incubation adéquats.

Elle se limite aux microorganismes que l'on peut mettre en suspension et qui ont la capacité de pousser sur couche mince (bactéries, spores de champignons filamenteux).

3.3. Bioautographie par immersion

La CCM est immergée dans un milieu de culture liquide, ou gélosé maintenu en surfusion à 45°C, infesté de microorganismes.

La résolution des spots d'inhibition n'est pas bonne non plus avec cette méthode.

L'immersion en milieu liquide limite l'application à quelques microorganismes.

Les méthodes bioautographiques ont l'avantage qu'apporte l'utilisation de la CCM (analyse de mélanges complexes, grand choix de solvants pour dissoudre les échantillons, visualisation in situ). Ce sont les méthodes les plus appropriées pour la détection d'activité dans les extraits végétaux complexes.

Les résultats des tests bioautographiques sont par ailleurs semi-quantitatifs puisqu'ils sont exprimés en terme de quantité minimale d'échantillon déposé sur la plaque, qui inhibe encore la croissance des microorganismes.

L'optimisation de la visualisation des zones d'inhibition, lors des tests bioautographiques, est effectuée en exploitant la propriété qu'ont certains microorganismes à réduire des sels de tétrazolium, ainsi ceux-ci sont utilisés comme révélateurs supplémentaires (Rahalison et al., 1994 ; Nostro et al., 2000).

CHAPITRE IV

SYSTEMES PARTICULAIRES

- 1. VECTEURS COLLOÏDAUX**
- 2. POLYMERES BIODEGRADABLES A INTÉRÊT MEDICAL**
- 3. ACIDE POLY (D,L-LACTIDE-CO-GLYCOLIDE) :
POLYMERE DE CHOIX**
- 4. METHODES DE PREPARATION DES VECTEURS
NANOPARTICULAIRES**
- 5. INTÉRÊT DES NANOPARTICULES**
- 6. APPLICATIONS DES VECTEURS PARTICULAIRES EN
INFECTIOLOGIE**
- 7. STRUCTURE DE LA PEAU**
- 8. ADMINISTRATION ET PENETRATION CUTANEEES DES
VECTEURS NANOPARTICULAIRES**

INTRODUCTION

Ces dernières années, la pharmacie galénique s'est orientée vers le développement de nouvelles formes pharmaceutiques en vue d'optimiser les effets thérapeutiques des principes actifs. Ainsi les vecteurs colloïdaux visent à maîtriser la distribution dans l'organisme de substances actives en améliorant leur affinité pour la cible à atteindre et en minorant leurs effets secondaires. Parmi leurs nombreux avantages citons :

- la protection des substances encapsulées des interactions potentielles avec les autres constituants de la formulation ;
- la protection des molécules fragiles d'une biodégradation trop rapide dans l'organisme.
- l'amélioration de la biodisponibilité : les vecteurs se comportent comme des réservoirs de principe actif ;
- l'amélioration de la pénétration de certaines molécules actives.

Ainsi dans ce chapitre, nous allons présenter brièvement les vecteurs colloïdaux en insistant sur leur mode de préparation, leur caractérisation physico-chimique, leurs applications en infectiologie et sur leur administration et leur pénétration cutanées.

1. LES VECTEURS COLLOÏDAUX

Les vecteurs colloïdaux peuvent être classés en fonction de leur taille et de leur consistance en : particules fluides de taille généralement de l'ordre du micromètre (liposomes, émulsions, microémulsions), particules solides de taille supérieure au micromètre (les microsphères à structure matricielle et les microcapsules) et en particules solides de taille de l'ordre du nanomètre (les nanosphères et les nanocapsules) (Tableau VI).

De tous ces vecteurs colloïdaux, les liposomes sont les plus étudiés et de nombreux travaux ont montré leur usage potentiel comme vecteurs colloïdaux biocompatibles. Les méthodes de préparation des liposomes sont nombreuses et peuvent aboutir à la formation de plusieurs types de vésicules qui diffèrent par leur taille, leur structure et leur capacité d'encapsulation. Ainsi selon la méthode utilisée on distingue des vésicules de type multilamellaires (MLV), ou unilamellaires grandes ou petites (LUV et SUV). Par contre, la sensibilité de leur membrane à une dégradation rapide ou à l'oxydation des phospholipides, a limité leur développement et leur commercialisation (Couvreur, 1988 ; Grit et al., 1989). Le développement des nanoparticules apparaît comme une alternative très intéressante comme forme pharmaceutique nouvelle. Elles ont une bonne stabilité physico-chimique au contact des liquides biologiques, surtout en présence des sels biliaires, et durant leur stockage (Quintanar-Guerrero et al., 1998). Leur fabrication est reproductible, ce qui rend leur production à grande échelle industrielle possible.

Cependant, tous ces vecteurs destinés, très souvent, à la voie intraveineuse (IV) ne remplissent que partiellement certains de leurs avantages, puisque même les systèmes les plus stables *in vitro*, sont plus ou moins rapidement éliminés par le système réticulo-endothélial après administration par IV (Juliano, 1988 ; Allen et Hansen, 1991 ; Gref et al., 1996). Ainsi depuis plusieurs années, les travaux de recherche sur les vecteurs ont tenté de réduire leur instabilité, tout en se tournant vers les autres voies d'administration notamment orale et cutanée.

Tableau VI : Classification des vecteurs colloïdaux (*) par rapport aux systèmes conventionnels

Systèmes	Taille en nm	Aspect physique	Etat de matière
Solutions vraies	0,1	Transparent	Liquide
Solutions micellaires	0,5	Limpide	Liquide
Emulsions	5-20	Limpide	Fluide
Liposomes (SUV) *	20-50	Opalescent	Fluide
Nanosphères polymères (SPN) *	100-500	Opalescent à blanc laiteux	Solide
Nanosphères lipides (SLN) *	100-500	Opalescent à blanc laiteux	Solide
Nanocapsules *	100-500	Opalescent à blanc laiteux	Solide
Liposomes (LUV) *	200-500	Opalescent	Fluide
Liposomes (MLV) *	200-1000	Opalescent	Fluide
Microémulsions	1000-5000	Limpide	Fluide
Microsphères *	1000-5000	Opalescent à blanc laiteux	Solide
Microcapsules *	1000-5000	Opalescent à blanc laiteux	Solide

2. POLYMERES BIODEGRADABLES A INTERET MEDICAL

Les avantages de disposer de systèmes médicamenteux susceptibles de disparaître d'eux-mêmes de l'organisme, expliquent l'intérêt considérable porté ces dernières années aux polymères biodégradables. Ils peuvent être répartis en six groupes : les polyesters, les polyamides, les polyphosphates esters, les polyphosphazènes, les polyorthoesters et les polyanhydrides. Parmi cette multitude de polymères biodégradables, les polyesters sont les plus utilisés dans les préparations médicamenteuses. Ainsi, seuls les polyesters les plus

souvent utilisés (acide polylactique et copolymères, polycaprolactone et copolymères) seront traités dans ce paragraphe.

2.1. Poly (ϵ -caprolactone) ou PCL et copolymères

Le PCL est un polymère aliphatique, biodégradable et biocompatible (Corden et al., 2000).

2.1.1. Aspects physico-chimiques

De structure chimique semi-cristalline (Figure 28), le PCL est relativement rigide, peu hydrophile, son point de fusion est d'environ 63°C et sa température vitreuse se situe entre -60 et -70°C. Il se trouve à l'état caoutchouteux à température physiologique. Sa synthèse chimique se fait par polymérisation anionique et cationique ou par polymérisation par coordination de l' ϵ -caprolactone (6-1-hexanolide) (Figure 29), et radicalaire de 2-méthylène-1,3-dioxepane (Ni-Bailey et al., 1982).

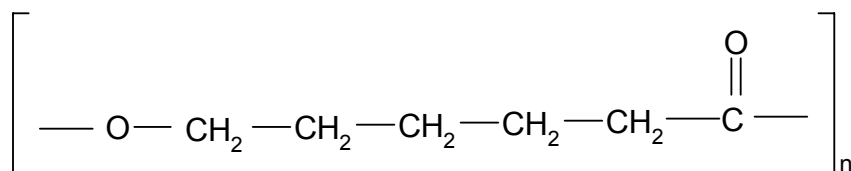


Figure 28 : Structure chimique du motif répétitif de Poly (ϵ -caprolactone)

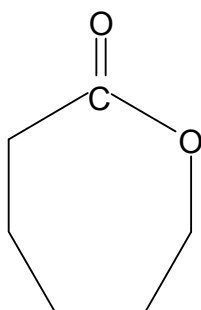


Figure 29 : Structure chimique de l' ϵ -caprolactone (6-1-hexanolide)

2.1.2. Biodégradabilité

La biodégradation du PCL comme celle de ses copolymères est de type non enzymatique, similaire à celle des acides polylactiques. Elle dépend de la taille, du poids moléculaire, de la cristallinité et de l'épaisseur du système. Plus le poids moléculaire est élevé, moins bonne est la cristallinité du polymère, plus fragiles sont les liaisons esters et plus importante est la vitesse de biodégradation (Pit et al., 1981). La vitesse de biodégradation des copolymères de la poly (ϵ -caprolactone) avec l'acide DL-lactique est plus importante que celle des deux homopolymères correspondants comme dans le cas des acides polylactiques.

2.2. Acide polylactique (PLA) et copolymères (PLGA)

L'utilisation de l'acide polylactique, qui apparaît pour la première fois dans un brevet français de 1913 (n° 456824), et de ses copolymères avec l'acide glycolique comme vecteurs de médicaments date des années 1970-71 (Wise, 1970 ; Blake et al., 1971). Ils ont été associés à plusieurs molécules bioactives parmi lesquelles nous pouvons citer : des stéroïdes (Wise et al., 1978), des anticancéreux (Strobel et al., 1987), des peptides et protéines (Maulding, 1987) et des antibiotiques (Tice et al., 1986).

2.2.1. Aspects chimiques

L'acide lactique à la différence de l'acide glycolique (figure 1c) contient un carbone asymétrique et existe donc sous deux formes optiquement actives, l'acide L(+)-lactique, dextrogyre et de configuration L, et l'acide D(-)-lactique, lévogyre et appartenant à la série D (Figures 30a et 30b). Il ne s'hydrolyse pas et peut former directement par condensation des polyesters. Ainsi, en solution aqueuse on obtient un mélange de composés linéaires comme le montre la figure 31. Inversement l'acide glycolique est hygroscopique donc trop instable pour constituer le support d'une forme médicamenteuse « vectorisée », c'est pourquoi il est copolymérisé avec le PLA.

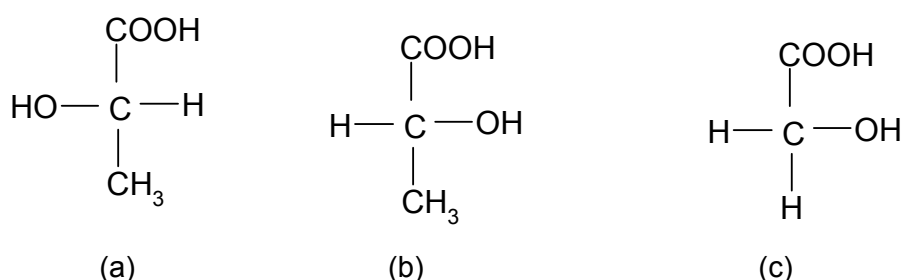


Figure 30 : Structures des acides L-lactique (a), D-lactique (b) et glycolique (c)

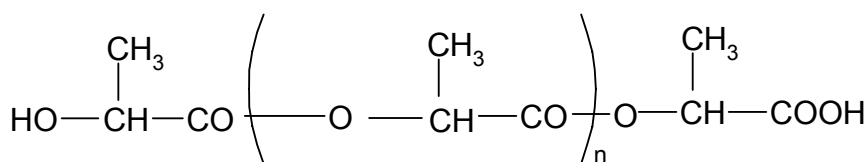


Figure 31 : structure linéaire de l'acide polylactique

2.2.2. Caractéristiques physiques

Les caractéristiques d'un polymère dépendent non seulement de sa composition chimique mais également de sa configuration qui se traduit par : son degré de cristallinité, son point de fusion (T_F), sa température de transition vitreuse (T_V) et sa résistance mécanique (Tableau

VII). Par contre les caractéristiques des copolymères des acides lactique et glycolique (PLGA), dépendent de la proportion de ces deux acides, mais aussi de la configuration de l'acide lactique utilisé (Gilding et Reed, 1979).

Tableau VII : Propriétés des polymères de l'acide glycolique et de l'acide lactique d'après Doelker (1985).

Polymères	Cristallinité (%)	T _F (°C)	T _V (°C)	Propriétés mécaniques
PGA	50	230	36	rigide
L-PLA	37	180	67	rigide
D-PLA	37	180	67	rigide
DL-PLA	37	180	57	rigide

2.2.3. Biodégradabilité et biocompatibilité

La dégradation de l'acide poly DL-lactique, entièrement amorphe, est de type homogène, la scission des chaînes par hydrolyse a lieu de façon uniforme et la masse moléculaire diminue selon une cinétique de premier ordre. Alors que la biodégradation des acides polylactiques de configuration L et D, ainsi que celle de l'acide polyglycolique est plus lente.

2.3. Autres polyesters utilisés dans les préparations médicamenteuses

Les autres polyesters utilisés dans les préparations médicamenteuses sont : le poly-(β -hydroxybutyrate) (PHB), le polydihydropyrane, le poly-(p-dioxanone) et le polypropylène fumarate (PPF) (Graham, 1982 ; Lerwick, 1983 ; Holmes, 1985 ; Domb, 1989).

2.4. Avantages et inconvénients des acides polylactiques et du polycaprolactone

Les avantages et inconvénients des acides polylactiques et copolymères, ainsi que ceux du polycaprolactone et copolymères, en tant que support des vecteurs de médicaments sont donnés dans le tableau VIII (page suivante).

Tableau VIII : Quelques avantages et inconvénients des acides polylactiques et du polycaprolactone

Polymères	Avantages	Inconvénients
PLA	- système hydrolytiquement stable - dégradation homogène et $\pm$ rapide - $t_{1/2}^*$ d'environ 6 mois - bioadhésivité sur la peau et les bactéries	- biodégradation lente - coût assez élevé
PGA	- dégradation assez homogène - bioadhésivité sur la peau et les bactéries - coût moins élevé que celui du PLA - $t_{1/2}$ d'environ 5 mois	- système trop hygroscopique - système instable - biodégradation lente
PLGA	- système très stable - dégradation homogène et rapide - $t_{1/2}$ d'environ 1 semaine - bioadhésivité sur la peau et les bactéries - approprié pour les principes actifs hydrophiles et hydrophobes	coût élevé
PCL	- dégradation assez rapide - miscible avec de nombreux polymères - bioadhésivité sur la peau et les bactéries - coût moyennement bas	- système relativement peu hydrophile - mauvaise conservation à température ambiante

* : temps de demi-vie, qui est le temps que met un polymère dans l'organisme pour qu'il soit dégradé de moitié.

L'acide poly(d,l lactide-co-glycolide) (PLGA), comparé aux autres polymères du tableau III, présente de nombreux avantages à savoir :

- forte stabilité ;
- approprié pour les principes actifs hydrophiles et hydrophobes ;
- dégradation homogène et rapide ;
- bioadhésivité sur la peau et les bactéries ;
- temps de demi-vie court.

Ces avantages font de lui un polymère biodégradable de choix.

3. ACIDE POLY (D,L-LACTIDE-CO-GLYCOLIDE) (PLGA)

Les polymères biodégradables synthétiques, semi-synthétiques ou naturels ont été développés pour palier les problèmes de toxicité à long terme des polymères non biodégradables dans l'organisme. Ils sont utilisés en application biomédicale en tant que matériaux biocompatibles (Heller et al., 1983). Ces dernières années de nombreux travaux ont montré leur intérêt dans le domaine pharmaceutique (Heller et al., 1984 ; Pitt et al., 1990) et leur facilité à se dégrader au contact des milieux biologiques. Cette dégradation se caractérise par la libération d'oligomères et/ou de monomères non toxiques présents dans les chaînes métaboliques de l'organisme. Parmi les polymères biodégradables, citons les polyesters qui ont été utilisés, ces dernières années, comme système de délivrance topique, dans le but de moduler la pénétration cutanée des filtres solaires (Smith et al., 1998).

Le PLGA est un polyester biodégradable et biocompatible, de structure cristalline possédant un temps de demi-vie court (environ 1 semaine) et une bonne bioadhésivité sur la peau et les bactéries (Bilbruck et al., 1999). Sa rapide dégradation, par rapport à celle d'autres polymères biodégradables, prône en faveur de son utilisation comme matrice.

3.1. Propriétés physico-chimiques

Le PLGA, copolymère des acides lactique et glycolique de masse moléculaire comprise entre 50000 et 70000, est un polyester de structure chimique semi-cristalline (Figure 32) dont les propriétés physico-chimiques dépendent de la proportion de ces deux acides, mais aussi de la configuration de l'acide lactique utilisé (Gilding et Reed, 1979). Leur température de transition vitreuse, qui peut être estimée à partir des valeurs des homopolymères au moyen de l'équation de Fox, décroît très progressivement de 57° à 36°C, lorsque la proportion de l'acide glycolique passe de 0 à 100%.

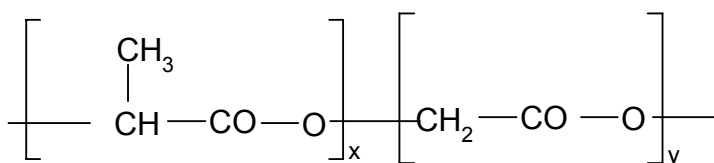


Figure 32 : Structure moléculaire du PLGA

3.2. Synthèse chimique et biodégradation

La synthèse chimique du copolymère PLGA se fait par polymérisation directe des deux acides ou par ouverture des cycles du lactide et du glycolide, dimères cycliques de l'acide

lactique et glycolique, en présence d'un catalyseur. La réaction globale est contrôlée par le nombre de moles d'eau ajoutées au milieu réactionnel (Figure 33).

La biodégradation du PLGA se fait par métabolisation en fin de glycolyse aérobie. Il est métabolisé en CO_2 et H_2O , ainsi la voie pulmonaire est la principale voie d'élimination du PLGA. Sa vitesse de biodégradation dépend de la taille, de la masse moléculaire, de la cristallinité et de l'épaisseur du système.

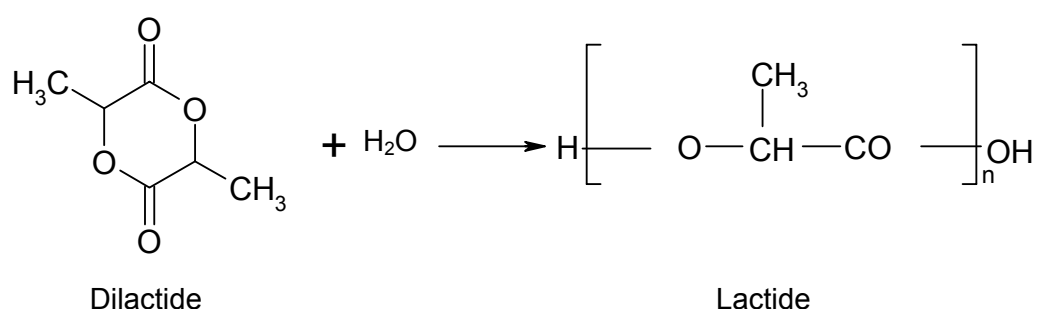


Figure 33 : Ouverture du cycle du dimère de l'acide lactique

4. METHODES DE PREPARATION DES VECTEURS NANOPARTICULAIRES

Les nanoparticules sont sphériques, ce sont soit des vésicules liquides dont le centre est entouré d'une membrane de faible épaisseur : les **nanocapsules** soit des sphères pleines : les **nanosphères** (Figure 34). Leurs suspensions aqueuses sont opalescentes et stables en raison de leur petite taille. Leurs méthodes de préparation sont très variées, elles peuvent être obtenues soit par polymérisation soit par des méthodes utilisant des macromolécules naturelles ou des polymères préformés.

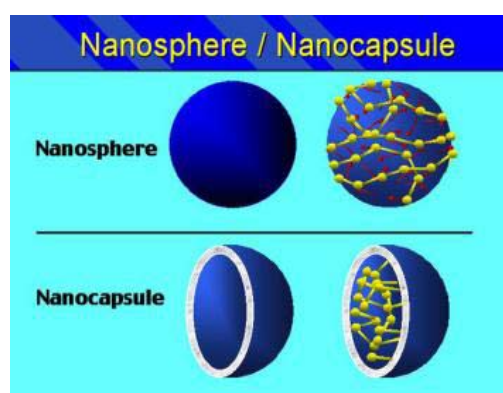


Figure 34 : Structure des nanosphère et nanocapsule (www.canal-u.education.fr/canalu/img/10...)

4.1. Formation des nanosphères

Dans la préparation des nanosphères, l'utilisation d'un polymère donne des nanosphères polymériques solides (SPN), mais on peut aussi utiliser des lipides et obtenir des nanosphères lipidiques solides (SLN). Dans ce paragraphe, nous nous limiterons aux méthodes de préparation des SPN, ainsi en fonction de la nature du polymère utilisé, les nanosphères peuvent être préparées soit par des réactions de polymérisation, soit directement à partir d'une macromolécule naturelle ou d'un polymère synthétique préformé.

4.1.1. Nanosphères obtenues par des réactions de polymérisation

La préparation des nanosphères par polymérisation peut s'effectuer de deux manières : l'émulsification en phase aqueuse continue ou l'émulsification en phase organique continue.

4.1.1.1. Emulsification en phase aqueuse continue

Les monomères, souvent des dérivés acryliques (Tableau IX, page 83), sont émulsionnés en phase aqueuse continue en présence de tensioactifs (polysorbates, oléate d'ammonium, ...), éventuellement de molécules stabilisantes (alcool polyvinylique, méthylcellulose,...), de tampon pH, de colloïdes protecteurs (protéines, caséines, ...) et d'amorceurs solubles en milieu aqueux (eau oxygénée par exemple) ou d'amorceurs physiques tels que l'irradiation γ . L'émulsion est alors constituée d'une phase aqueuse comprenant des molécules de monomères en solution, des micelles de tensioactif ayant solubilisé des monomères et d'une phase organique constituée de monomères sous formes de gouttelettes.

La réaction de polymérisation est amorcée dans la phase continue aqueuse de l'émulsion à l'intérieur ou à la surface des micelles. Les particules grossissent par un apport régulier de monomères qui diffusent, à partir des gouttelettes constituant la phase organique, à travers la phase aqueuse continue (Kreuter et Speiser, 1976 ; Rolland et al., 1986 ; Pimienta et al. 1990). Quand la réaction est terminée, les particules formées contiennent un grand nombre de chaînes polymériques et leur taille dépend étroitement de la concentration initiale en monomères.

4.1.1.2. Emulsification en phase organique continue

Cette technique tout comme la polymérisation en microémulsion reste peu utilisée en raison des taux importants de solvants organiques qu'elles nécessitent et de la difficulté à les éliminer, mais également en raison d'une toxicité potentielle non négligeable des monomères résiduels.

Outre les difficultés de mise en œuvre, ces méthodes par polymérisation présentent des risques toxiques potentiels, d'où l'orientation vers des techniques utilisant des

macromolécules naturelles purifiées ou des polymères synthétiques préformés permettant d'éviter la mise en jeu des réactions de polymérisation.

4.1.2. Nanosphères obtenues à partir de macromolécules naturelles purifiées

Cette technique existe sous deux variantes : l'émulsification et la désolvatation.

4.1.2.1. L'émulsification : elle est réalisée à température ambiante en mélangeant une solution aqueuse de protéine (par exemple l'albumine) à une huile. L'émulsion H/L ainsi obtenue, est introduite de nouveau dans l'huile chauffée à une température $> 110^{\circ}\text{C}$. Il se produit simultanément la vaporisation de l'eau et la dénaturation de la protéine qui précipite sous forme de nanosphères dont la taille est $> 500\text{ nm}$ selon Gallo et al., 1984. La population des particules ainsi obtenue par émulsification est rarement monodisperse, cette technique n'est pas applicable aux substances thermolabiles.

4.1.2.2. La désolvatation : c'est une technique dont le principe consiste à dissoudre le polymère dans une solution organique et à le précipiter par addition d'un sel ou d'un solvant non miscible avec la phase organique (Oppenheim, 1986 ; Bodmeier et al., 1989).

La désolvatation conduit plus à la formation d'un précipité de polymères qu'à des nanoparticules colloïdales.

4.1.3. Nanosphères obtenues à partir des polymères synthétiques préformés

Plusieurs techniques dérivées pour la plupart de celles utilisées avec les macromolécules naturelles ont été développées.

4.1.3.1. Technique par émulsification : le polymère en solution dans un solvant organique chloré est émulsionné dans l'eau en présence d'un surfactif pour donner une émulsion L/H. L'émulsification continue sous agitation à 25°C entraîne l'évaporation du solvant organique et la formation de nanosphères. Le solvant résiduel est ensuite éliminé par évaporation sous pression réduite et le surfactif par dialyse ou lavage. Cette technique est applicable à de nombreux polymères et copolymères (Gurny, 1983 ; Krause et al., 1985. Bodmeier et Chen, 1989) tels que les PLA (acide poly lactide) et PLGA (acide poly lactide-co-glycolide) par exemple.

4.1.3.2. Technique par salting out (relargage) : elle a été utilisée par Ibrahim et al., 1992 ; Alléman et al., 1992 pour pallier à la toxicité des solvants chlorés (technique par émulsification). Le polymère [acétophthalate de cellulose, PLA ou acide poly(méthacrylique) par exemple] en solution dans l'acétone est émulsionné avec une solution aqueuse saturée

par un électrolyte ou un non électrolyte contenant de l'alcool polyvinylique comme agent stabilisant. Une quantité suffisante d'eau distillée est alors ajoutée pour que l'acétone diffuse dans la phase aqueuse externe induisant la formation des nanosphères. La saturation de la solution aqueuse empêche la miscibilité de l'acétone à l'eau.

4.1.3.3. Technique par précipitation : mise au point par Fessi et al. (1986), elle permet de manière simple, l'obtention de nanosphères. Le principe consiste à dissoudre le polymère dans un solvant organique miscible à l'eau et de verser la solution obtenue dans un non solvant du polymère, généralement l'eau ou un mélange hydroalcoolique contenant un surfactif qui assure la stabilisation stérique de la suspension des nanoparticules. Les nanosphères se forment instantanément dans le milieu sous forme de suspension laiteuse qui est concentrée ensuite par évaporation sous vide. Cette technique s'applique à de très nombreux polymères, la préférence allant aux polymères biodégradables (PLA, PLGA, poly caprolactone).

4.2. Formation des nanocapsules

Vecteurs polymériques dont la taille varie entre 100 et 500 nm, les nanocapsules sont fabriquées principalement par polymérisation de monomères (Al Khouri et al., 1986) ou à partir de polymères préformés (Fessi et al., 1987).

4.2.1. Polymérisation de monomères : le monomère (Tableau IX, page suivante) est dissous dans l'éthanol contenant une huile et un mélange de phospholipides. Cette phase est introduite lentement, sous agitation mécanique très faible, dans une phase aqueuse contenant un surfactif non ionique. La dispersion de la phase organique dans l'eau se fait de manière concomitante à la polymérisation du monomère à l'interface Eau/Huile et à la diffusion de l'éthanol dans l'eau. La suspension des nanocapsules obtenues est concentrée par évaporation sous vide modéré.

4.2.2. Formation à partir d'un polymère préformé : proposée pour la première fois par Fessi et al. (1987), cette technique, qui est également adaptée à la préparation de nanosphères, consiste à dissoudre le polymère dans un solvant miscible à l'eau. A cette solution organique, on ajoute la substance active (lipophile), un phospholipide et du benzoate de benzyle en proportions définies. Ce mélange organique est ensuite injecté lentement sous agitation modérée dans l'eau additionnée d'un surfactif non ionique. L'eau étant un mauvais solvant du polymère, une réaction de désolvatation se produit instantanément ainsi qu'une diffusion du solvant organique dans l'eau. La désolvatation du polymère induit le dépôt de celui-ci sous forme d'une fine membrane autour des gouttelettes

huileuses contenant la substance active. Le solvant organique est ensuite éliminé par évaporation sous pression réduite. Les vésicules obtenues sont de petites tailles (de l'ordre de 200 nm).

Tableau IX : Monomères utilisés dans les procédés chimiques d'encapsulation et polymères formés

Monomères	Polymères formés	Procédé de mise en œuvre
1,6 hexaméthylènediamine/chlorure de sébacoyl	Polyamide nylon 6-10	Polycondensation interfaciale
L-lysine/chlorure de téréphtaloyle	Polyamide	Polycondensation interfaciale
Pipérazine/chlorure de téréphtaloyle	Poly (téréphtaloyl pipérazine)	Polycondensation interfaciale
1,6 Hexaméthylènediamine/chlorure de téréphtaloyle	Poly (téréphtalamide)	Polycondensation interfaciale
2,2-bis (4-Hydroxyphényl)-propane/chlorure de sébacoyl	Polyester	Polycondensation interfaciale
Méthylènediisocyanate	Polyurée	Polycondensation interfaciale
1,6 hexaméthylènediamine/Méthylène-diisocyanate	Polyurée	Polycondensation interfaciale
Cyanoacrylate de butyle	Poly (cyanoacrylate de butyle)	Polymérisation anionique en émulsion
Cyanoacrylate d'hexyle	Poly (cyanoacrylate d'hexyle)	Polymérisation anionique en émulsion
Méthacrylate de méthyle	Poly (méthacrylate de méthyle)	Polymérisation anionique en émulsion
Acrylate de butyle	Poly (acrylate de butyle)	Polymérisation anionique en émulsion

4.3. Nanoparticules et extraits de plantes

La recherche sur la thématique « nanoparticules et extraits de plantes » est encore très peu exploitée de nos jours. Les rares travaux traitant le sujet ont montré la possibilité d'association d'extraits végétaux aux nanoparticules (Gröning et al., 2001, 2002, 2003 et 2004 ; Shiv et al., 2003). Les mêmes auteurs ont mis en évidence les interactions présentes dans cette association, interactions qui contribuent à la stabilisation physico-chimique des

particules formées. Gröning et al. (2001) ont également prouvé que la température de fabrication influence la taille moyenne et le nombre de particules formées.

Tableau X : Récapitulatif de quelques avantages et inconvénients des techniques de préparation des nanoparticules utilisant des polymères préformés.

Techniques de préparation	Quelques types de polymères utilisés	Avantages de la technique	Inconvénients de la technique
Emulsification	PLA, PLGA	Applicable à de très nombreux polymères	Utilisation des solvants chlorés
Salting out	Acétophtalate de cellulose, éthylcellulose, copolymère d'acide méthacrylique, PLA	Non utilisation de surfactants, de solvants chlorés et pas de chauffage	technique longue à réaliser, taille des particules influencée par la vitesse de rotation pendant le mélange de différents éléments du processus
Précipitation	Copolymère d'acide méthacrylique, PLA, PLGA, Polycaprolactone (PCL)	Applicable à de très nombreux polymères, technique simple, utilisation de solvants non chlorés miscibles à l'eau, particules de taille très réduite, faible dispersion des particules	Difficulté de définir le système solvant / non solvant miscible

4.4. Caractérisation physico-chimique des nanoparticules

La caractérisation physico-chimique des nanoparticules et l'étude de leur stabilité sont importantes pour leur développement et l'optimisation de leur efficacité. Les principaux paramètres sont:

- la granulométrie des nanoparticules,
- les interactions possibles du principe actif avec le polymère constitutif de la paroi des nanoparticules ou avec les surfactifs,

- l'adsorption du principe actif à la surface des nanoparticules,
- la charge électrique des nanoparticules et leur taux d'encapsulation,
- la cinétique de libération du principe actif.

4.4.1. Granulométrie

La taille des nanoparticules est une caractéristique physique importante qui permet de suivre l'évolution de la stabilité dans le temps (sédimentation, coalescence) d'une suspension colloïdale. Elle dépend de plusieurs facteurs : la nature et la concentration en polymère et en principe actif, la quantité de surfactif, le ratio solvants organiques/eau et la vitesse de diffusion du solvant organique dans l'eau (Chouinard et al., 1991). La spectrophotométrie à auto-corrélation (PCS) est souvent utilisée pour l'évaluation de la taille des nanoparticules. La microscopie électronique permet à la fois de déterminer la taille et d'évaluer la structure des nanoparticules (Quintanar-Guerrero et al., 1998 ; Fessi et al., 1989 ; Fresta et al., 1996).

4.4.2. Potentiel zêta ou charge de surface

Le potentiel zêta d'une particule, est la charge globale que celle-ci acquiert dans le milieu liquide dans lequel elle est plongée (Baratt, 1999), et peut être mesuré avec un Zêtasizer Nano Z ou ZS, ou avec un Zêta Master S. La valeur du potentiel zêta mesurée indique la force de répulsion des particules et permet de prédire leur stabilité à long terme. En effet, la stabilité des dispersions de particules dépend de l'équilibre entre les forces répulsives et attractives existant entre les particules lorsqu'elles s'approchent l'une de l'autre. Si toutes les particules se repoussent mutuellement, la dispersion reste stable. Mais si leur force de répulsion est faible ou nulle, un mécanisme d'instabilité (floculation, agrégation,...) finit par se produire. Ainsi si toutes les particules en suspension ont un potentiel zêta négatif ou positif important, elles tendent à se repousser mutuellement et ne peuvent se rassembler. En revanche, si leur potentiel zêta est faible, aucune force ne les empêche de se rassembler et de flocculer (Derjaguin and Landau, 1941, Verway et al., 1948 ; Hunter, 1988 ; Ross and Morrison, 1988 ; Everett ; 1994 ; Lyklema, 2000)

4.4.3. Pourcentage d'encapsulation

Le pourcentage ou taux d'encapsulation est toujours lié à la quantité de principe actif présente dans les nanoparticules. Cette quantité peut être à l'intérieur et/ou adsorbée à la surface de la particule si le principe actif (PA) montre des affinités de liaisons vis-à-vis de la membrane des nanoparticules (EL-Egakey et al., 1982) (figure 35). Techniquement, l'évaluation de ce taux d'encapsulation est difficile, compte tenu du fait qu'il faut séparer la quantité du principe actif libre de celle incorporée dans les nanoparticules. La technique de

séparation la plus souvent utilisée est celle proposée par Ammouy et al. (1989). Elle associe la centrifugation et l'ultrafiltration.

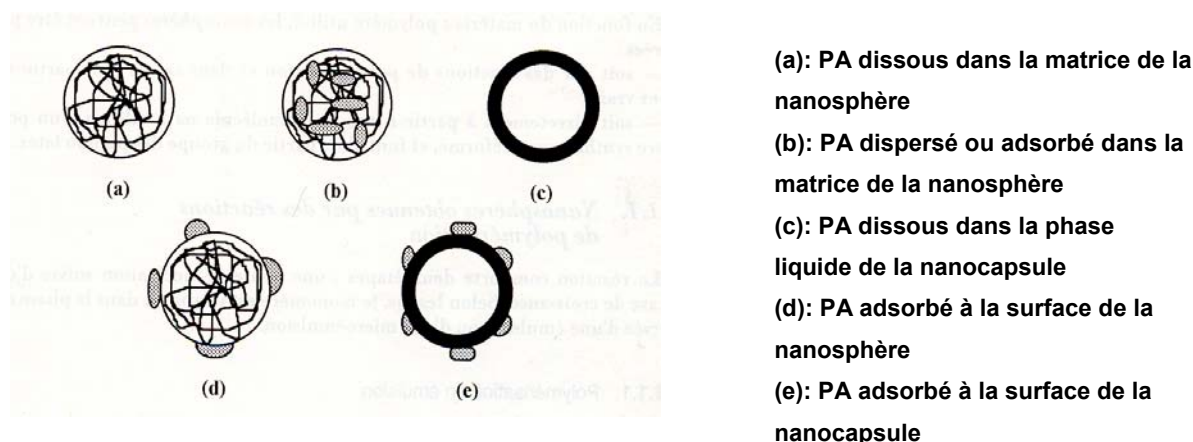


Figure 35 : Association du principe actif avec les nanoparticules d'après Vauthier-Holtzcherer et al. (1991).

5. INTERET DES NANOPARTICULES

La forme galénique influence l'absorption des principes actifs et joue un rôle important pour leur biodisponibilité (Houin, 1990). Ainsi de nombreux travaux ont montré que les vecteurs colloïdaux de petites tailles améliorent la biodisponibilité des molécules (Apranhamian et al., 1987 ; Andrieu et al., 1989 ; Ammouy et al., 1991). Se présentant sous la forme de suspensions colloïdales aqueuses et opalescentes, les nanoparticules sont très souvent stables en raison de leur taille toujours inférieure au micromètre, mais aussi grâce aux forces stériques et électrostatiques de Van der Waals dont la présence à la surface des vecteurs est souhaitable pour garantir leur stabilité. Ces particules peuvent être utilisées en thérapeutique telles que comme adjuvants de vaccins par exemple (Birrenbach et Speiser, 1976 ; Bodmeier et al., 1989 ; Cui et Mumper, 2001, 2002) ou, le plus souvent, comme vecteurs de substances actives. Ainsi l'association d'une molécule active à un vecteur nanoparticulaire permet d'envisager le ciblage de l'activité sur un site choisi. Cette association permet d'introduire artificiellement dans certaines cellules des substances qui ne s'y accumulent pas spontanément (Figure 36, page suivante). Le développement des vecteurs nanoparticulaires poursuit un triple intérêt : **protéger** la molécule active, la **conduire** jusqu'au site d'action, **optimiser** l'effet thérapeutique grâce à une meilleure biodisponibilité.

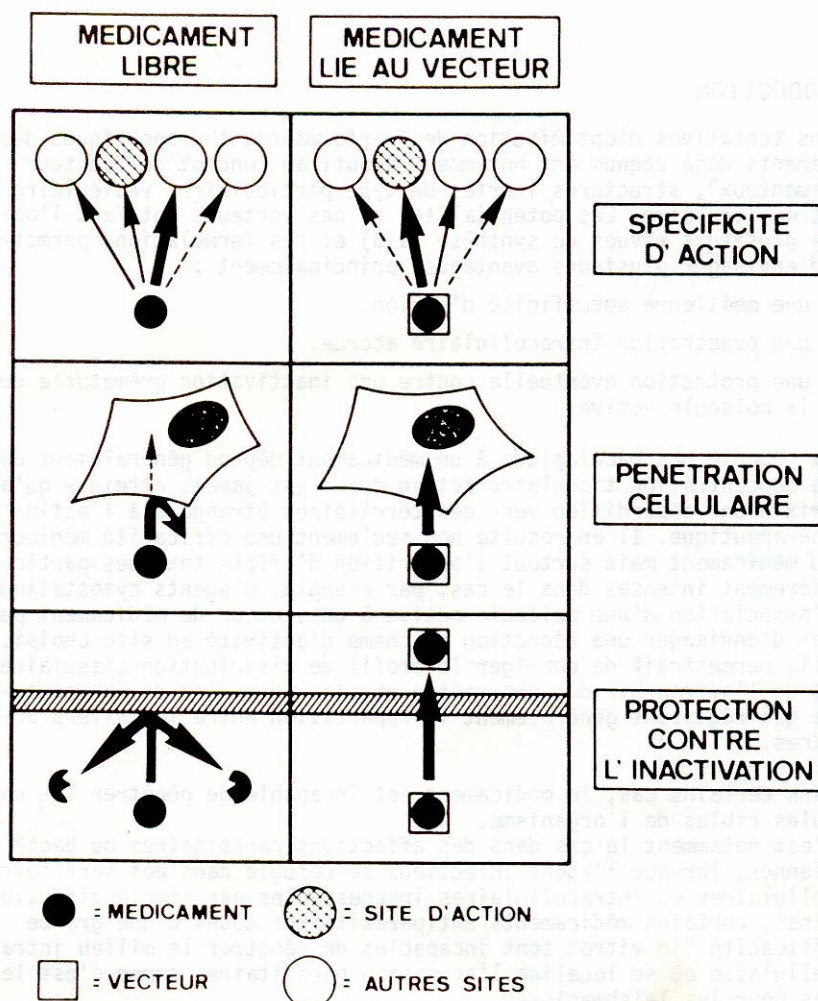


Figure 36 : Avantages potentiels des vecteurs de médicaments (Couvreur, 1985)

6. APPLICATIONS DES VECTEURS PARTICULAIRES EN INFECTIOLOGIE

Les liposomes chargés de molécules anti-infectieuses ont été les premiers vecteurs à être utilisés, par voie intra-veineuse, pour cibler les infections intramacrophagiques (Alving, 1986, 1988 ; Bakker-Woudenberg et al., 1998). L'amphotéricine B, agent antifongique majeur connu pour ses effets néphrotoxiques, a été encapsulé au sein de liposomes. Ces derniers se sont montrés légèrement plus efficaces que l'amphotéricine B libre, mais beaucoup moins toxiques. Ils ont été utilisés avec succès contre les infections causées par *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* (Lopez-Berestein et al., 1985 ; Graybill et al., 1982 ; New et al., 1981). On a également noté une importante amélioration des effets antibiotiques de la

gentamicine et de la ceftazidime associées aux liposomes dans le traitement d'infections causées par *Klebsiella pneumoniae* dans un modèle chez le rat (Bakker-Woudenberg, 1995).

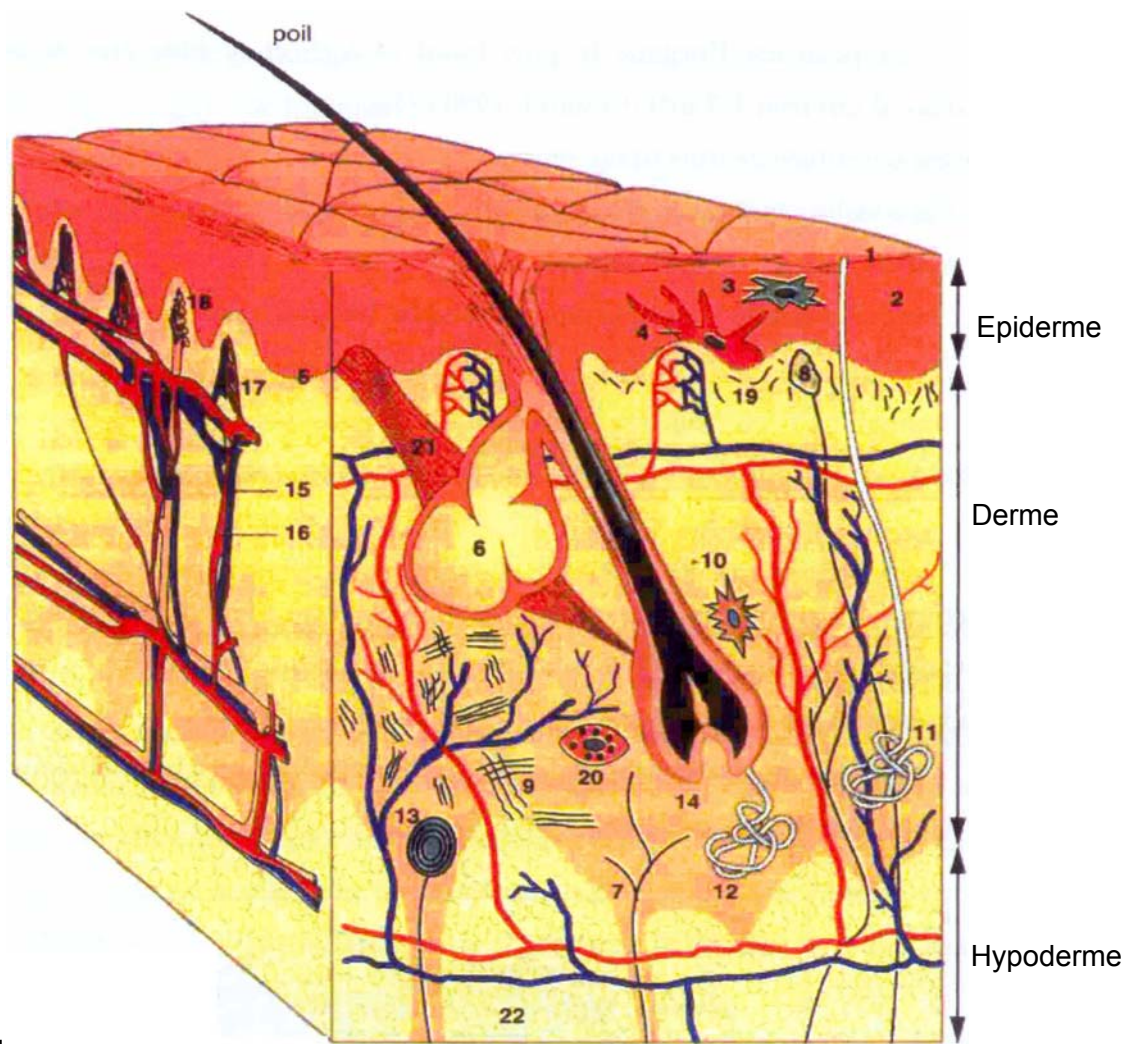
Price et al. (1994) ainsi que Sanderson et al. (1996) ont montré que les liposomes chargés de tobramycine et de gentamycine, appliqués par voie cutanée, réduisaient de manière plus significative le nombre de bactéries que les antibiotiques non associées aux liposomes.

L'amélioration de la biodisponibilité par des vecteurs nanoparticulaires en infectiologie a également fait l'objet de plusieurs travaux (Henry-Michelland et al., 1987 ; Fawaz et al., 1998 ; Alt et al., 2004 ; Sondi et Salopek-Sondi, 2004) . Ainsi Fontana et al. (1998), par exemple, ont montré que les nanoparticules de polyéthylcyanoacrylate (PECA) chargées d'ampicilline, administrées par voie orale, présentaient une meilleure activité antimicrobienne que l'ampicilline libre. Une activité semblable a été constatée avec les nanocapsules de PCL chargées de chlorhexidine et administrées par voie topique (Lboutounne et al., 2002). Alvarez-Roman et al. (2004) ont à leur tour montré que la pénétration et la distribution de molécules, administrées par voie cutanée, étaient meilleures lorsque celles-ci étaient associées aux nanoparticules.

7. STRUCTURE DE LA PEAU

La peau, environ 1,7 m² de superficie, est l'organe le plus lourd (4 kg) et le plus étendu du corps humain (Césarini, 1990). Elle est constituée de trois tissus superposés (Figure 37a) :

- la couche supérieure ou épiderme dont la fonction principale est la protection de l'organisme contre les agressions extérieures. Celle-ci comporte quatre voire cinq couches cellulaires représentant son caractère stratifié (Figure 37b).
- le derme est un tissu conjonctif dense qui joue un rôle important dans la thermorégulation. Il renferme avec l'hypoderme le système vasculaire de la peau (Schmitt, 2000)
- l'hypoderme constitué d'adipocytes, représente environ 15 à 20 % du poids corporel. Il renferme comme le derme des annexes cutanées (glandes sudorales, glandes sébacé et des phanères) et constitue le plus grand réservoir énergétique de l'organisme (Césarini, 1990 ; Kanitakis, 1998).



- 1. lamelles de kératine
- 2. couches de cellules de Malpighi
- 3. cellule de Langerhans
- 4. mélanocyte
- 5. membrane basale
- 6. glande sébacée
- 7. filet nerveux
- 8. corpuscule de Meissner (tactile)
- 9. fibres de collagène

- 10. fibroblaste
- 11. glande sudoripare eccrine
- 12. glande sudoripare apocrine
- 13. corpuscule de Pacini
- 14. bulbe pileux
- 15. vaisseau artériel
- 16. vaisseau veineux

- 17. capillaires
- 18. lymphatique
- 19. faisceaux de fibres collagènes et élastiques
- 20. mastocyte
- 21. muscle arrecteur du poil
- 22. corpuscules adipeux

Figure 37a : Structure de la peau (Césarini, 1990)

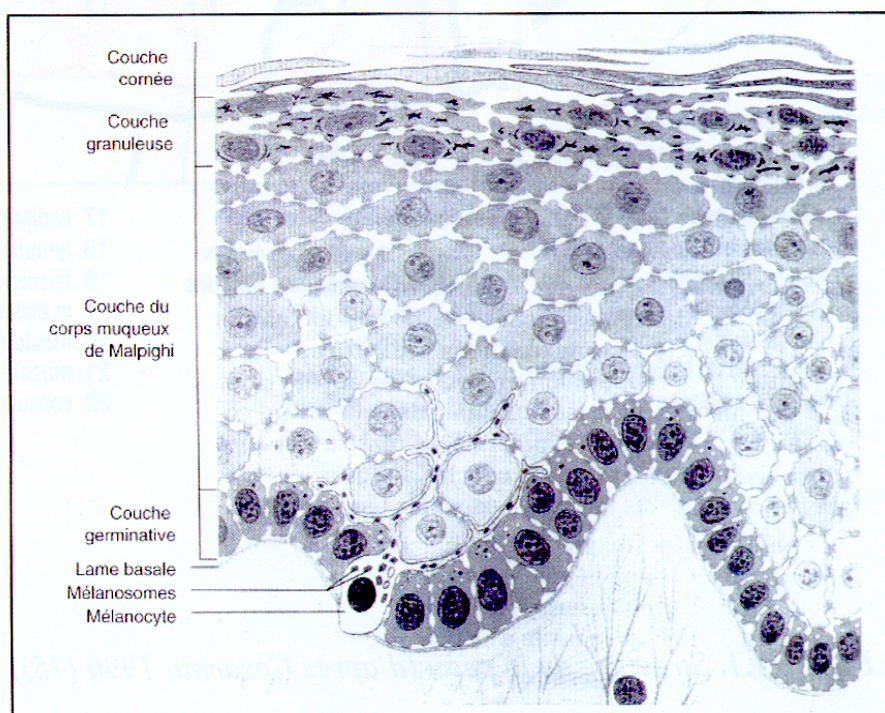


Figure 37b : Structure de l'épiderme (Césarini, 1990)

8. ADMINISTRATION ET PENETRATION CUTANÉES

L'imperméabilité relative de la peau a limité pendant longtemps l'administration cutanée des médicaments (Donbrow, 1992). Mais les particularités pharmacocinétiques de la diffusion percutanée ont depuis milité en faveur de l'utilisation de cette voie pour l'administration des médicaments (Boye et al., 1984 ; Vyas et al., 1991). En effet, cette voie d'administration est justifiée pour de nombreuses substances sensibles au métabolisme hépatique, pour obtenir des effets prolongés, pour diminuer les effets secondaires et pour administrer des substances détruites per os, tels que les peptides. Les études de perméabilité effectuées sur la peau isolée (Michaels et al., 1975 ; Müller et Kreuter, 1999) indiquent que le transport d'une molécule, du site d'administration au site d'action, dépend de sa structure et de ses propriétés physico-chimiques. Cependant deux voies distinctes s'offrent à la pénétration des molécules à travers la peau : l'une, à travers les espaces intercellulaires de la couche cornée ou à travers les cellules cornées elles mêmes (voie transépidermique ou intracellulaire), l'autre empruntant les annexes cutanées (follicules pilo-sébacés et/ou glandes sudoripares) (Bunge et al., 1999) (Figure 38).

Dans la majorité des cas, la pénétration globale est la résultante d'un passage transépidermique et d'un passage par les annexes.

Lorsqu'une molécule est administrée par voie cutanée, trois facteurs essentiels interviennent : la molécule, la peau et la forme galénique. Plusieurs travaux ont fait l'objet d'étude sur la pénétration et la biodisponibilité cutanées des principes actifs vectorisés. L'ensemble de ces travaux (Jacobs et al., 1988 ; Mezei, 1990 et 1993 ; Alonso et al., 1994) montre que les vecteurs particuliers permettent de modifier le devenir des molécules administrées par voie cutanée. Mais leur mécanisme d'action demeure ambigu (Alvarez-Raman et al., 2004).

Quoique peu étudiée, la voie cutanée reste une alternative pour l'administration des substances actives habituellement délivrées par voie orale, car dégradées dans le tractus digestif après administration.

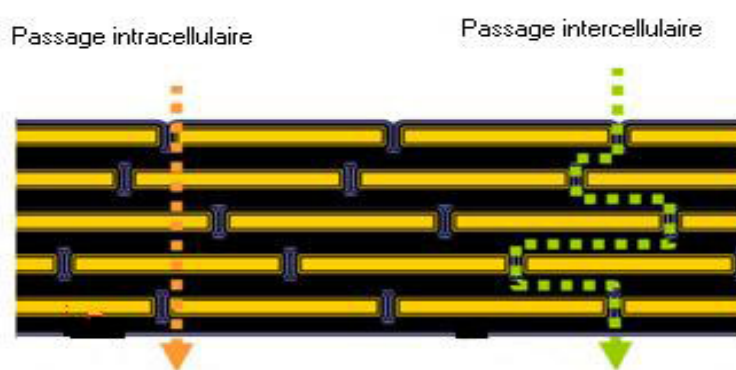


Figure 38 : Représentation schématique de la diffusion intracellulaire (ou transépidermique) et intercellulaire de molécules à travers le stratum corneum d'après Elias (1983).

9. CONCLUSION

Cette revue bibliographique sur les vecteurs colloïdaux et leur application thérapeutique nous a guidé dans le choix du type de vecteur, du polymère et de la méthode de préparation que nous avons utilisés dans nos manipulations.

Les nanosphères ont été choisies comme vecteur nanoparticulaire pour l'encapsulation de l'extrait éthanolique d'*Harungana madagascariensis*. Elles offrent, en tenant compte de la voie d'administration topique, plusieurs avantages qui ont attiré notre attention : leur taille nanométrique, leur charge potentielle en principe actif, leur stabilité physico-chimique à long terme, une libération contrôlée de la substance encapsulée grâce à leur biodégradation, une absence de toxicité des métabolites de biodégradation, leur bioadhésion tissulaire et cellulaire. Tous ces avantages convergent vers notre objectif qui est de potentialiser l'activité antimicrobienne d'un extrait d'*Harungana madagascariensis* en lui offrant une meilleure biodisponibilité avec un effet rémanent et une protection de ses substances actives.

Parmi les nombreux polymères biodégradables, notre choix s'est porté sur le copolymère des acides polylactique et polyglycolique, l'acide poly (D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA). En

effet, le PLGA offre de nombreux avantages (Tableau VIII) : une très bonne stabilité, une dégradation homogène et rapide, un très bon temps de demi-vie ($t^{1/2}$), une bonne bioadhésivité sur la peau et les bactéries, une biocompatibilité pour les principes actifs tant hydrophiles qu'hydrophobes.

La technique de préparation des nanosphères par précipitation a été choisie pour : sa simplicité, son applicabilité à de nombreux polymères, son utilisation de solvants non chlorés miscibles à l'eau et pour les particules de taille réduite et de faible dispersion qu'elle génère.

Les travaux antérieurs pratiqués sur *Harungana madagascariensis* montrent que cette plante renferme une grande richesse en molécules bioactives. Ses multiples usages en médecine traditionnelle en font une plante de choix. Ainsi, nous nous sommes proposés de réaliser une forme galénique à libération contrôlée sous forme d'une suspension aqueuse de nanosphères, afin de prolonger l'effet antimicrobien des extraits de cette plante et de valoriser son intérêt médical.

DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE V

ETUDE BOTANIQUE ET MICROBIOLOGIQUE

- 1. ETUDE BOTANIQUE MICROGRAPHIQUE**
- 2. EXTRACTION DES PLANTES**
- 3. ETUDES ANTIFONGIQUES ET
ANTIBACTERIENNES DES EXTRAITS DES
PLANTES**

INTRODUCTION

Dans cette partie botanique et microbiologique, nos travaux ont consisté dans un premier temps à faire une étude micrographique des organes de plantes utilisées, afin de contribuer à leur caractérisation complète ainsi qu'à leur identification. Leur extraction a été ensuite réalisée par épuisement successif à l'aide de l'appareil de Soxhlet. Puis nous avons recherché l'activité antifongique et antibactérienne de différents extraits vis-à-vis de 7 souches fongiques, choisies parmi les plus représentatives dans la pathologie fongique humaine, de 15 souches de bactéries de la microflore cutanée parmi lesquelles celles responsables de mauvaises odeurs corporelles, de 2 souches du genre *Pseudomonas* (flore transitoire), les plus fréquemment retrouvées dans les infections nosocomiales et réputées très résistantes aux antimicrobiens existants sur le marché, et également vis-à-vis de quelques souches bactériennes de la flore buccale responsables de la carie dentaire.

Un extrait est dit fongistatique ou bactériostatique quand il inhibe ou ralentit la croissance fongique ou bactérienne, le résultat étant exprimé en Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), et fongicide ou bactéricide quand il tue les germes, on parle alors de Concentration Minimale Fongicide (CMF) dans le cas de champignons, et de Concentration Minimale Bactéricide (CMB) dans le cas de bactéries.

Nous avons déterminé le pouvoir antifongique (effet fongistatique et/ou de l'effet fongicide), et le pouvoir antibactérien (effet bactériostatique et/ou bactéricide), de chacun des extraits en utilisant les techniques des dilutions en milieux solide et liquide.

1. ETUDE BOTANIQUE MICROGRAPHIQUE

1.1. Matériel

Les organes végétaux suivants ont été utilisés :

- feuilles et écorces séchées d'*Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (Hypericaceae)
- tiges séchées de *Cassytha filiformis* (Lauraceae).

Ils ont été récoltés à Lomé (TOGO), pour les tiges de *Cassytha filiformis*, et à Agou (800 m d'altitude) (TOGO), pour les feuilles et écorces d'*Harungana madagascariensis*, puis séchés sous climatisation à l'abri de la lumière. Leur identification a été faite par le Dr Koffi Koba (Botaniste à l'université de Lomé). Un *voucher* de chaque spécimen a été déposé. Les codes sont les suivants : FWTA 1:290; AKPAGANA: 386; GUELLY: 128; BRUNEL: 5393.

1.2. Etude anatomique des organes de plante utilisées : technique de réalisation des coupes

Les échantillons des plantes préalablement séchés sont réhydratés pendant 1 à 2 semaines dans un mélange d'égal volume d'alcool, d'eau et de glycérine, puis mis entre deux fragments cylindriques de morceau de moelle de sureau ou de polystyrène, et coupés transversalement en fines lamelles à l'aide d'une lame rasoir.

Les coupes obtenues sont successivement traitées de la manière suivante:

- 15 à 20 min dans l'eau de Javel qui rend les coupes transparentes en les vidant de leur contenu cellulaire et, en ne laissant apparaître que les membranes pectocellulosiques et ligneuses, et parfois d'éventuelles inclusions minérales ;
- 5 min dans l'eau acétique diluée qui permet le mordantage (neutralisation de l'effet de l'eau de Javel) ;
- rinçage à l'eau distillée ;
- 3 min dans le mélange carmin vert d'Iode. Le carmin colore les tissus cellulaires en rose, et le vert d'Iode les tissus lignifiés en vert ;
- rinçage à grande eau ;
- montage entre lame et lamelle des coupes dans une goutte de glycérine ;
- observation des coupes au microscope optique muni d'un adaptateur d'appareil photo numérique, permettant la prise en photo des coupes observées.

1.3. Résultats

Les coupes réalisées ont été prises en photo et sont présentées ci-dessous.

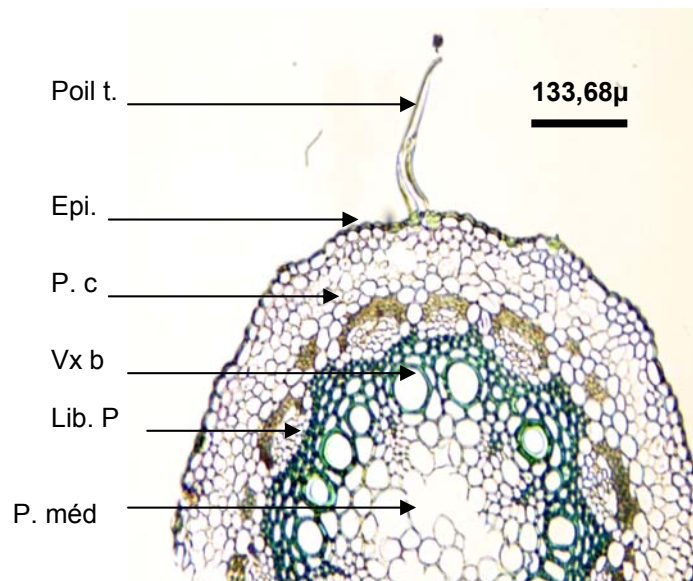


Figure 39 : Coupe transversale de la tige de *Cassytha filiformis*

Epi: épiderme; P. c: parenchyme cortical; C. s: canal sécréteur; Phlo II: phloème secondaire; Poil t: poil tecteur; Vx b: vaisseaux du bois; Lib. P: liber primaire; P. méd: parenchyme médullaire.

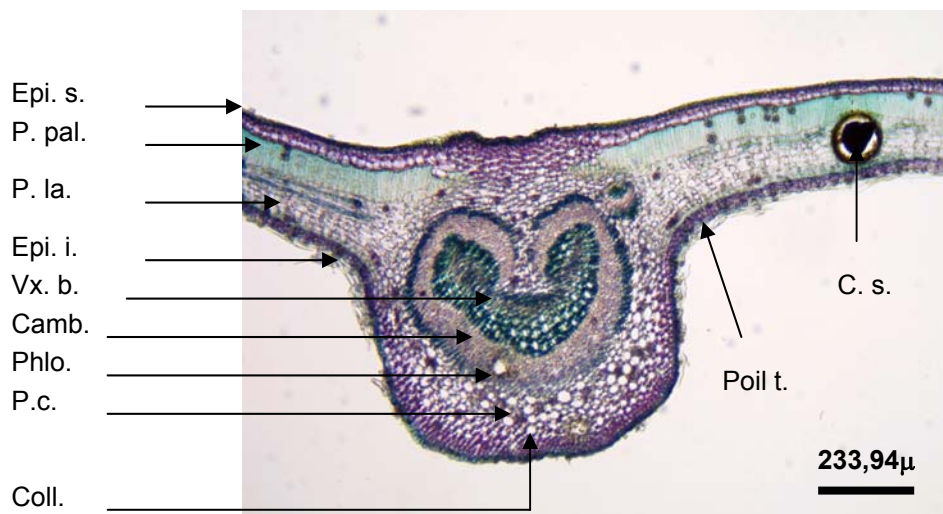


Figure 40 : Coupe transversale de la feuille d'*Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir.

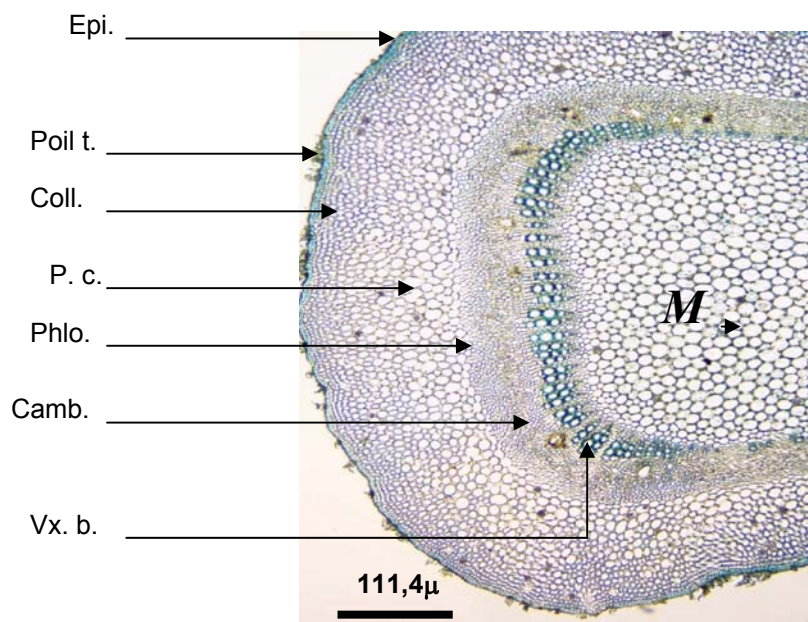
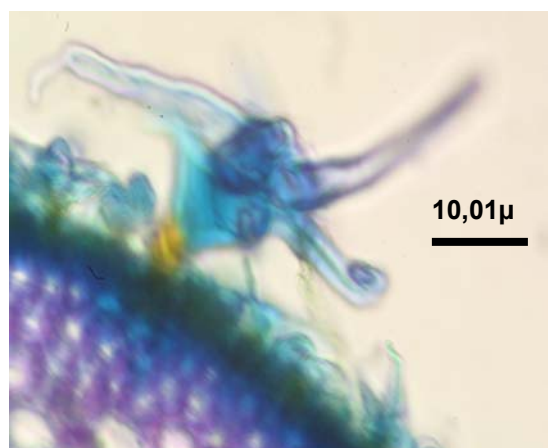


Figure 41 : Coupe transversale de la tige d'*Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir.

Epi. s : épiderme supérieur ; P. pal : parenchyme palissadique ; P. la : parenchyme lacuneux ; Epi. I : épiderme inférieur ; Vx. b : vaisseaux de bois ; Camb : cambium ; Phlo : phloème ; P. c : parenchyme cortical ; Coll : collenchyme ; Epi : épiderme ; Poil t. : poil tecteur.



(a) : Poil tecteur en navette



(b) : Poil tecteur de type étoilé

Figure 42 : Coupe transversale d'un poil tecteur de la feuille d'*H. madagascariensis*.

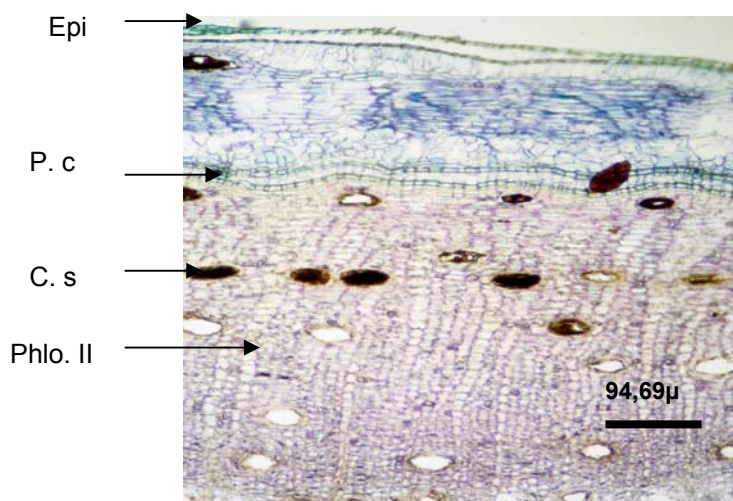


Figure 43 : Coupe transversale de l'écorce d'*Harungana madagascariensis*

Epi: épiderme; P. c: parenchyme cortical; C. s: canal sécréteur; Phlo II: phloème secondaire

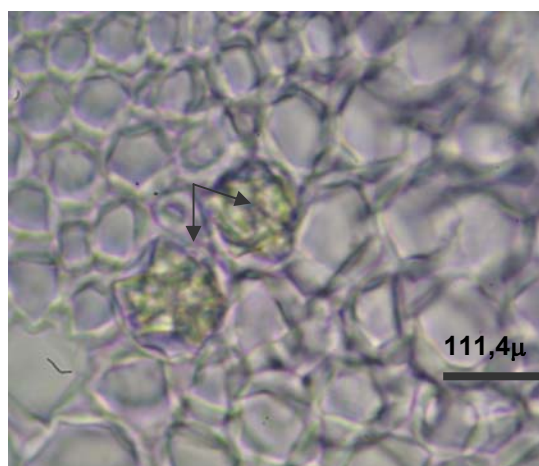


Figure 44 : Coupe transversale de cellules d'oxalate de calcium cristallisées sous forme de prisme présentes dans la feuille d'*Harungana madagascariensis*

1.4. Interprétation

1.4.1. Coupe transversale de la tige de *Cassytha filiformis* L. (Figure 39)

La coupe est de forme sub-circulaire avec un épiderme mince pourvu de poils tecteurs plus ou moins courts.

Le parenchyme cortical de quatre à cinq cellules d'épaisseur est dépourvu de toute pilosité.

Le cylindre central est de structure primaire avec pachyte continu de bois bien individualisé surmonté de nombreux îlots de liber primaire. Chacun de ces îlots est surmonté d'un petit massif de fibres sclérifiées peu cyclique. Le parenchyme médullaire est complet et banal.

Les structures secondaires semblent totalement absentes. Toutefois, dans certains cas, la moelle est lacuneuse.

1.4.2. Coupe transversale de la feuille d'*Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (Figure 40)

La coupe nous montre une structure à mésophile bifaciale.

L'épiderme supérieur à cuticules épaisses est dépourvu de poils tecteurs, poils par contre présents en prenant une forme étoilée (Figure 42b) au niveau de l'épiderme inférieur, chaque branche de l'étoile est constituée d'une cellule flexible.

La face inférieure du limbe est occupée par des poils tecteurs en navette (Figure 42a) de forme très caractéristiques dont les cellules parallèles à l'épiderme, jouent sûrement un rôle protecteur très particulier. La navette est presque contiguë à l'épiderme.

Le parenchyme cortical au niveau de la nervure centrale et le parenchyme collenchymateux en zone sous épidermique contiennent des macles d'oxalate de calcium (Figure 44) en assez grande quantité. Il en existe même groupés souvent par deux entre les cellules du parenchyme palissadique chlorophyllien. On note aussi la présence çà et là de quelques poches sécrétrices dans le parenchyme cortical, poches pouvant aussi se retrouver dans le phloème de la nervure.

La région pérycclique du cylindre central est plus ou moins sclérifiée, de même que la région médullaire centrale.

1.4.3. Coupe transversale de la tige d'*Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (Figure 41)

La coupe présente une section sub-rectangulaire.

L'épiderme est couvert d'un ensemble dense de poils partant à chaque fois d'une cellule basale qui émet une touffe de cellules sub-coniques plus ou moins allongées qui sont soit flexibles, soit aisément déformables.

Aux angles de la tige, on note des massifs de collenchyme peu accusés, le parenchyme cortical est formé de cellules banales, on distingue également quelques cellules renfermant des macles d'oxalate de calcium (Figure 44).

Le cylindre central est formé d'un anneau libéro-ligneux à peu près continu, de formation secondaire. Le phloème secondaire renferme un assez grand nombre de poches sécrétrices volumineuses.

Le parenchyme médullaire est parsemé de quelques cellules à macles d'oxalate de calcium.

1.4.4. Coupe transversale de l'écorce d'*Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (Figure 43)

La récolte a été pratiquée à un stade végétatif où l'assise subero-dermique s'est mise en place, on trouve donc :

- en position externe par rapport à cette assise, des restes des tissus corticaux et de l'épiderme ;
- en position interne par rapport à l'assise, le parenchyme cortical demeure très mince mais, on note la présence de quelques canaux sécréteurs courts et de quelques laticifères.

Tout le reste de l'écorce est occupé par du liber secondaire ou phloème secondaire traversé par de nombreux canaux sécréteurs ainsi que quelques cellules à oxalate de calcium cristallisées sous forme de prisme (Figure 44).

1.5. Conclusion

Dans cette étude botanique micrographique des coupes transversales, des feuilles, tiges et écorces d'*Harungana madagascariensis* ainsi que celle des tiges de *Cassytha filiformis*, ont été réalisées. Elle nous a permis de mettre en évidence l'anatomie des organes utilisés. Cette description micrographique, ajoutée à la description botanique macroscopique, contribue à la caractérisation complète et à l'identification facile de *Cassytha filiformis* et d'*Harungana madagascariensis* qui constituent la base de ce travail de thèse.

2. EXTRACTION

Après séchage, les différents organes végétaux utilisés ont été pulvérisés à l'aide d'un broyeur à cylindres et la poudre obtenue soumise à une série d'extraction à l'appareil de Soxhlet par épuisements successifs à l'éther de pétrole, au dichlorométhane, à l'acétate d'éthyle et à l'éthanol 96% (v/v). Parallèlement, une extraction directe à l'eau a été effectuée pour chaque poudre d'organe végétal.

2.1. Description de l'appareil de Soxhlet et principe d'extraction

Les différentes parties de l'appareil de Soxhlet sont données par la Figure 45.

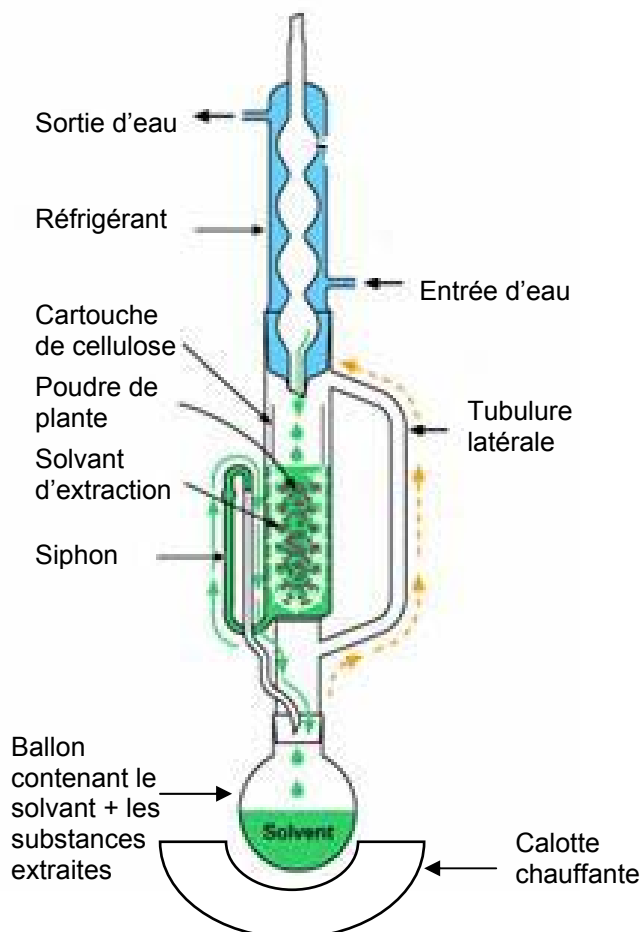


Figure 45 : Extracteur de Soxhlet

Le principe d'extraction en appareil de Soxhlet consiste, dans un premier temps, en l'introduction de la drogue pulvérisée dans une cartouche de cellulose. Ensuite, l'appareil est

monté sur le ballon et on ajoute le solvant jusqu'à ce que celui-ci atteigne la courbure supérieure du siphon. On laisse siphonner puis on met en place le réfrigérant, le solvant est alors porté à ébullition dans le ballon à l'aide d'une calotte chauffante. Les vapeurs s'échappent par la tubulure latérale et se condensent au niveau du réfrigérant pour retomber dans le corps du Soxhlet et extraire la drogue. Lorsque le niveau de solvant atteint la courbure supérieure du siphon, le volume d'extrait contenu dans le corps du Soxhlet est vidangé dans le ballon. Un nouveau cycle peut alors recommencer et la drogue se trouve progressivement épuisée, l'extrait se concentrant dans le ballon.

Après chaque extraction, le marc est séché puis repris par un autre solvant. Les solvants sont utilisés par ordre de polarité croissante.

2.2. Extraction des feuilles et écorces d'*Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (*Hypericaceae*)

100g de poudre de feuilles et d'écorces ont été soumis à extraction à l'appareil de Soxhlet pendant respectivement 14-18H et 18-24 H. Parallèlement, 25 g de poudre de feuilles et d'écorces ont été mis à macérer dans 500 ml d'eau distillée sous agitation magnétique pendant 24 h.

Chaque extrait a été filtré, puis le solvant évaporé sous pression réduite. Le rendement, l'aspect et la couleur de chaque extrait sont notés (Tableau XI).

Les extraits ont été conservés jusqu'à leur utilisation à l'abri de la lumière dans des flacons hermétiquement fermés à 4°C.

Tableau XI : caractéristiques des extraits obtenus avec les feuilles et écorces d'*Harungana madagascariensis*

Extraits	Rendement (%) (m/m)		Couleur		Aspect physique		Durée d'extraction (H)	
	Feuille	Ecorce	Feuille	Ecorce	Feuille	Ecorce	Feuille	Ecorce
Ether de pétrole	4,0	4,8	Vert foncé	Brun foncé	Pâteux	Pâteux	14	18
Dichlorométhane	2,0	4,6	noir	Brun	Pâteux	Pâteux	16	18
Acétate d'éthyle	2,6	2,2	Vert clair	Vert sombre	Solide	Solide	18	18
Ethanol	22,4	19,6	brun	brun	Pâteux	Pâteux	24	24
Aqueux	34,6	18,0	Vert sombre	Brun foncé	Pâteux	Pâteux	24	24

2.3. Extraction des tiges de *Cassytha filiformis* L. (Lauraceae)

100g de poudre de tiges ont été soumis à extraction à l'appareil de Soxhlet pendant 24 H. Parallèlement, 25 g de poudre de tiges ont été mis à macérer dans 500 ml d'eau distillée sous agitation magnétique pendant 24 h. Les rendement, aspect et couleur de chaque extrait sont notés dans le tableau XII.

Les extraits sont conservés jusqu'à leur utilisation à l'abri de la lumière dans des flacons hermétiquement fermés à 4°C.

Tableau XII : caractéristiques des extraits obtenus avec les tiges de *Cassytha filiformis*

Extraits	Rendement (%) (m/m)	Couleur	Aspect physique	Durée d'extraction (H)
Ether de pétrole	2,1	noir	Pâteux	24
Dichlorométhane	1,7	noir	Pâteux	24
Acétate d'éthyle	2,1	vert	Solide	24
Ethanol	9,1	brun	Pâteux	24
Aqueux	9,8	brun	Pâteux	24

2.4. Conclusion

Les rendements de différents extraits sont faibles et parfois très faibles. Cependant, les extraits éthanoliques et aqueux présentent les meilleurs rendements.

3. ETUDES ANTIFONGIQUES ET ANTIBACTERIENNES

Un screening, antifongique et antibactérien, préliminaire de tous les extraits a été réalisé afin de sélectionner les extraits actifs.

3.1. Matériel fongique et bactérien

3.1.1. Souches fongiques

3.1.1.1. Choix et provenance

Cette étude a porté sur des souches fongiques préférentiellement choisies en raison de leur implication fréquente dans les pathologies fongiques humaines en particulier.

Nous avons utilisé onze (11) souches de champignons pathogènes provenant de la mycothèque du laboratoire de **Microbiologie** de l'UFR de Pharmacie Médecine de l'Université de Franche-Comté, souches pouvant être classées en 3 groupes (Tableau XIII).

Tableau XIII : Souches fongiques utilisées

Dermatophytes	Levures	Champignons filamenteux imparfaits
<i>Microsporum canis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Microsporum gypseum</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Fusarium sp.</i>
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>var mentagrophytes</i>		<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>var interdigitale</i>		
<i>Trichophyton rubrum</i>		
<i>Trichophyton soudanense</i>		

3.1.1.2. Entretien et conditions de culture des champignons

Les souches ont été entretenues par repiquage tous les 3 mois dans des boîtes de Petri de 6 cm de diamètre sur milieu gélosé de Sabouraud, pour les dermatophytes et les filamenteux

non dermatophytes puis incubées à 28°C à l'étuve pendant 7 jours. Les levures et l'*Aspergillus fumigatus* ont été repiqués toute les 2 semaines, sur le même milieu que celui des dermatophytes et filamenteux non dermatophytes, puis incubés à 37°C à l'étuve, pendant 2 jours. Les cultures ont ensuite été conservées au réfrigérateur à 4°C.

Pour les tests antifongiques, nous avons utilisé le milieu de Sabouraud solide additionné de chloramphénicol à la concentration de 0,05% (m/v) (inhibiteur bactérien) (Sabouraud Agar, AES Laboratoire, Elancourt, France), dont la composition est donnée dans le Tableau XIV.

Avant chaque test, les souches ont été réensemencées sur le milieu d'entretien pendant 7 jours (dermatophytes et filamenteux non dermatophytes), et pendant deux (2) jours pour les levures et l'*Aspergillus fumigatus*, afin d'avoir des souches en pleine période de croissance.

Tableau XIV : Composition du milieu solide de Sabouraud utilisé

Constituants	Quantités (gramme)
Peptone pepsique de viande	10
Glucose	20
Agar-agar	15
chloramphénicol	0,05
Eau distillée q .s.p.	1000 ml

3.1.2. Souches bactériennes

3.1.2.1. Choix et provenance

Dans cette étude les bactéries utilisées ont été choisies parmi les plus représentatives de la microflore cutanée (flore des pieds, des aisselles et flore transitoire) et de la microflore buccale. Elles sont d'origines différentes, et proviennent notamment de la collection de l'Institut Pasteur de Paris (CIP), du laboratoire de Microbiologie de Leeds (L) et du Zahnärztliches Institut de ZURICH (OMZ). Nous avons utilisé 17 bactéries de la flore cutanée (Tableau XV) et 16 bactéries de la flore buccale (Tableau XVI).

Tableau XV : Bactéries des flores cutanée et transitoire utilisées

Flore de la peau		Flore transitoire
Flore du pied	Flore des aisselles	
<i>Acinetobacter sp.LH5DCI</i>	<i>Corynebacterium xerosis</i> * CIP 52.16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 100720
<i>Alcaligenes sp.LH4TV1</i>	<i>Micrococcus luteus</i> L1C5	<i>Pseudomonas cepacia</i> CIP 80.24
<i>Coryneforme groupe</i> * B2 L16C3	<i>Staphylococcus epidermidis</i> L1S2	
<i>Coryneforme groupe</i> * C L3C3	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> CIP 81.56	
<i>Coryneforme groupe</i> * D2 L19C1	<i>Staphylococcus hominis</i> CIP 81.57	
<i>Micrococcus luteus</i> * L1C5	<i>Staphylococcus xylosus</i> CIP81.66	
<i>Micrococcus sedentarius</i> * L7B5		
<i>Moraxella sp.LH7SV1</i>		
<i>Staphylococcus cohnii</i> * L6S3		
<i>Staphylococcus epidermidis</i> * L1S2		
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> * CIP 81.56		
<i>Staphylococcus hominis</i> * CIP 81.57		

* Bactéries responsables de mauvaises odeurs

Tableau XVI : Bactéries de la flore buccale utilisées

<i>Streptococci</i>	<i>Actinomyces, Haemophilus Lactobacilli, et Staphylococci</i>
<i>Streptococcus milleri</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i> CIP103128
<i>Streptococcus mitior</i> OMZ 89	<i>Actinomyces viscosus</i> OMZ 206
<i>Streptococcus mutans</i> CIP 103220	<i>Haemophilus aphrophilus</i> CIP 70.73
<i>Streptococcus mutans</i> serotype a OMZ 52	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CIP 76.13
<i>Streptococcus mutans</i> serotype b OMZ 51	<i>Lactobacillus casei</i> CIP 107868
<i>Streptococcus mutans</i> serotype c OMZ 64	<i>Staphylococcus epidermidis</i> CIP 81.55T
<i>Streptococcus mutans</i> serotype f	
<i>Streptococcus mutans</i> serotype k OMZ 65	
<i>Streptococcus salivarius</i> OMZ36	
<i>Streptococcus sanguis</i> CIP 103231	

3.1.2.2. Entretien et conditions de culture des bactéries

Les souches bactériennes ont été entretenues par repiquage toutes les deux (2) semaines dans des boîtes de Petri de 6 cm de diamètre contenant le milieu de culture, puis incubées à 37°C pendant 24 heures, en absence d'oxygène pour les anaérobies (*Actinomyces* et *Streptococcus*), avant d'être conservées au réfrigérateur à 4°C.

Les milieux de culture utilisés varient en fonction des souches : la gélose nutritive classique pour les bactéries de la flore cutanée, le Man Rogosa sharp (MRS) agar pour les *Lactobacillus* et le columbia blood agar base pour l'*Actinomyces* et le *Streptococcus*. Avant leur utilisation, elles ont été réensemencées pendant 24 heures sur le même milieu d'entretien, afin d'avoir des souches jeunes en pleine croissance.

Les compositions de différents milieux utilisés sont données dans le Tableau XVII.

Tableau XVII : composition des milieux de culture bactérienne utilisés

Milieux	Constituants	Quantités
Bouillon nutritif à 1,3% (m/m)	- extrait de viande - extrait de levure - peptone - chlorure de sodium - agar - eau distillée q.s.p	1 g 2 g 5 g 5 g 15 g 1000 ml
Sabouraud liquide	- tryptone - peptone pepsique de viande - glucose - eau distillée q.s.p	5 g 5 g 20 g 1000 ml
MRS Lactobacilli	- peptone de protéose n°3 - extrait de bœuf - extrait de levure - dextrose - polysorbate 80 - citrate d'ammonium - sulfate de magnésium - sulfate de manganèse - phosphate dipotassique - agar - eau distillée q.s.p	10 g 10 g 5 g 20 g 1 g 2 g 0,1 g 0,05 g 2 g 15 g 1000 ml
Columbia Blood Agar Base	- digestion pancréatique de caséine - peptone de protéose n°3 - extrait de levure - digestion de cœur de bœuf - amidon de maïs - chlorure de sodium - agar - eau distillée q.s.p	10 g 5 g 5 g 3 g 1 g 5 g 15 g 1000 ml

3.2. Méthodes

Pour les screening antifongique et antibactérien, la méthode de dilution en milieu solide, décrite dans le chapitre III « Techniques d'études d'activités antimicrobiennes, page », a été utilisée. Les tests ont été répétés systématiquement 3 fois pour chaque série d'essais.

3.2.1. Tests antifongiques

3.2.1.1. Technique proprement dite

La technique a consisté à dissoudre chaque extrait de plante dans l'éthanol à 99 %, à le stériliser par filtration à l'aide des filtres millipores (porosité 0,22 µm), puis à le mélanger avec le milieu de culture liquéfié et maintenu en surfusion au bain marie à 45°C de manière à obtenir une concentration en extrait de 1000 µg/ml. L'ensemble a été homogénéisé par une agitation douce au vortex puis coulé dans des boîtes de Petri de 5 cm de diamètre. Ensuite on laisse le mélange se solidifier pendant 24 heures sous la hotte à flux laminaire. Pour chaque extrait deux témoins positifs (éthanol et eau) ont été réalisés.

L'ensemencement a été fait par dépôt d'un fragment de champignon âgé de 7 jours, prélevé à l'aide d'une lame de bistouri, à la surface de la gélose pour les dermatophytes et les filamenteux non dermatophytes (Figure 46) (sauf pour *A. fumigatus*). Un point d'inoculation est réalisé par boîte de Petri. Ensuite les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 10 jours.

Dans le cas des levures et d'*A. fumigatus*, les inoculums ont été préparés avec de l'eau distillée stérile, les champignons étant âgés de 24 heures. L'ensemencement de boîtes de Petri, de 6 cm de diamètre, a été fait par dépôt d'une goutte de suspension de champignon, à l'aide d'une pipette pasteur, suivi d'un étalement uniforme. Les boîtes ont ensuite été placées à l'étuve à 37°C pendant 48 heures.

L'activité antifongique des extraits se manifeste par une inhibition totale (cas de levures) ou partielle (dermatophyte et filamenteux) de la croissance du champignon par comparaison aux témoins positifs.

La manipulation a été réalisée sous hotte à flux laminaire.

3.2.1.2. Lecture des résultats

La mesure des diamètres de différentes colonies, (dermatophytes et filamenteux non dermatophytes), a été faite à l'aide d'un double décimètre puis comparée à celle des témoins solvants.

Les symboles suivants sont utilisés :

0 = Aucune croissance

+++ = Croissance identique à celle des témoins

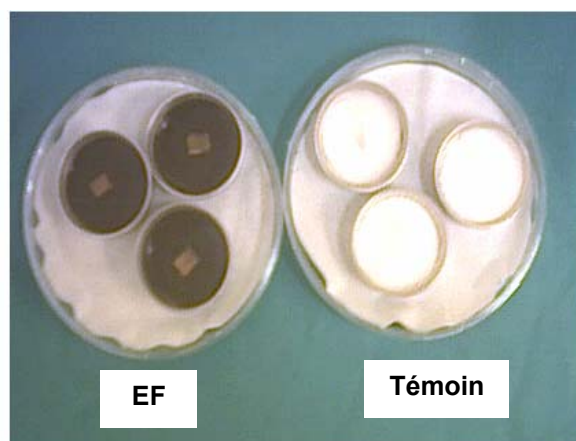


Figure 46: Evaluation de l'activité antifongique de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* (EF) à 1000 µg/ml sur la croissance de *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* après 10 jours.

3.2.2. Tests antibactériens

3.2.2.1. Technique proprement dite

Comme dans le cas des tests antifongiques, l'extrait a été dissous dans l'éthanol 99% (v/v), puis introduit dans des flacons stériles contenant du milieu de culture liquéfié et maintenu en surfusion au bain marie à 45°C. L'ensemble a été homogénéisé par une agitation douce au vortex, puis coulé dans des boîtes de Petri de 9 cm de diamètre. Le mélange se solidifie sous hotte à flux laminaire pour permettre une meilleure diffusion des principes actifs dans la gélose.

L'ensemencement a été réalisé automatiquement grâce au multiensemencieur de Steers (Figure 47), qui permet de réaliser, en une fois, les essais sur toutes les souches bactériennes mises en suspension dans l'eau distillée stérile.

Cet appareil est composé d'une plaque avec 16 tiges métalliques qui vont chacune plonger dans 16 godets contenant chacun une des 16 bactéries en suspension. Chaque tige plongée dans une suspension bactérienne va déposer une gouttelette contenant la bactérie désirée, sur la surface d'une boîte de Petri, on obtient alors 16 impacts par boîte (Figure 48). Les boîtes ont été mises à l'étuve à 37°C pendant 48 heures.

Pour chaque extrait, deux témoins (éthanol et eau), cultivés dans les mêmes conditions que les boîtes contenant l'extrait à tester ont été réalisés.

La manipulation a été réalisée sous hotte à flux laminaire.

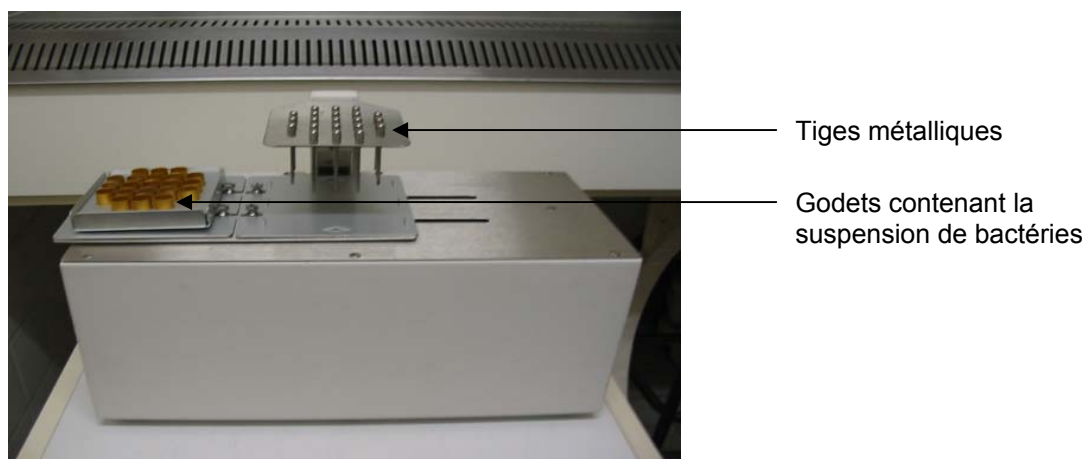


Figure 47 : Multiensemenceur automatique de Steers

3.2.2.2. Lecture des résultats

Elle a été faite après 48 heures par comparaison avec les témoins. L'activité antibactérienne des extraits se manifeste par l'inhibition totale de la croissance des bactéries.

Pour matérialiser cette activité, les symboles suivants ont été utilisés :

0 pour une inhibition totale de la croissance des germes

+++ pour une croissance semblable à celle des témoins (pas d'inhibition).

Pour chaque extrait et pour chaque concentration, le test a été réalisé 3 fois.

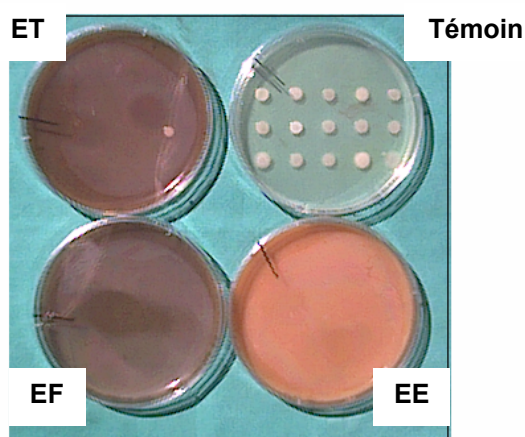


Figure 48 : Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits à l'acétate d'éthyle des feuilles (EF), écorces (EE) d'*H. madagascariensis* et des tiges de *Cassytha filiformis* (ET) à 1000 µg/ml après 48 heures d'incubation.

3.3. Résultats et discussion

Les résultats des activités antifongiques et antibactériennes des extraits sont donnés sous forme de tableaux et figures.

3.3.1. Activités antifongiques

Les résultats des activités antifongiques sont donnés par les tableaux XVIII, XIX, XX et les Figures 49 et 50. Les pourcentages d'inhibition de la croissance des champignons par les extraits, dans le cas des dermatophytes, *S. brevicaulis* et *Fusarium sp.*, ont été calculés par la méthode décrite par Singh et al. (1993).

La technique consiste à mesurer les diamètres de différentes colonies de champignons, après le temps d'incubation requis, puis à résoudre l'équation suivante :

$$I (\%) = \frac{dC - dE}{dC} \times 100$$

Avec I pour inhibition exprimée en pourcentage,

dC pour le diamètre de colonies dans les boîtes « témoins positifs »,

dE pour le diamètre de colonies dans les boîtes contenant l'extrait de plante.

3.3.1.1. Essais préliminaires de détermination des activités antifongiques

Les tests antifongiques préliminaires de nos extraits ont été réalisés à 1000 µg/ml, et les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux XVIII et XIX.

Tableau XVIII : Spectre d'activité antifongique des extraits de tiges de *Cassytha filiformis* L. exprimé en pourcentage d'inhibition (%) à 1000 µg/ml.

Organes de plante utilisés	Extraits	Champignons										
		Ca	Cn	Mg	Mc	Tm	Ti	Tr	Ts	Afu	Fsp	Sbr
		% d'inhibition										
Tiges	Ether de Pétrole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	CH ₂ Cl ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Acétate d'Ethyle	0	0	100	100	100	100	100	100	nt	100	100
	Ethanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Eau	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau XIX : Spectre d'activité antifongique des extraits d'écorces et de feuilles d'*Harungana madagascariensis* exprimé en pourcentage d'inhibition (%) à 1000 µg/ml.

Organes de plante utilisés	Extraits	Champignons										
		Ca	Cn	Mg	Mc	Tm	Ti	Tr	Ts	Afu	Fsp	Sbr
		% d'inhibition										
Ecorces	Ether de Pétrole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	CH ₂ Cl ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Acétate d'Ethyle	0	0	100	100	96	100	100	100	100	100	100
	Ethanol	0	0	83	99	60	51	28,6	62,5	0	99,6	0
	Eau	0	0	62,5	42,8	34,2	22	60	99,5	0	0	8
Feuilles	Ether de Pétrole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	CH ₂ Cl ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Acétate d'Ethyle	0	0	100	100	66,8	100	100	100	100	100	100
	Ethanol	0	0	90	100	66	58	99,2	98,75	0	99,6	0
	Eau	0	0	80	62,8	36,8	33	99,5	100	0	0	20

Ca : *Candida albicans* ; Cn : *Cryptococcus neoformans* ; Mg : *Microsporium gypseum* ; Mc : *Microsporium canis* ; Tm : *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* ; Ti : *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* ; Tr : *Trichophyton rubrum* ; Ts : *Trichophyton soudanense* ; Afu : *Aspergillus fumigatus* ; Fsp : *Fusarium* sp., Sbr : *Scopliariopsis brevicaulis*.

Ces essais préliminaires réalisés à 1000 µg/ml ont permis de sélectionner les extraits actifs. Le tableau XVIII donne l'activité antifongique des extraits de *Cassytha filiformis* à 1000 µg/ml. Seul l'extrait à l'acétate d'éthyle est actif sur les champignons, il inhibe totalement la croissance des germes suivants : *Microsporum gypseum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton soudanense*, *Fusarium sp.* et *Scopulariopsis brevicaulis*.

Le tableau XIX fait apparaître nettement les propriétés antifongiques des extraits des feuilles et écorces d'*Harungana madagascariensis*. On constate que seuls les extraits aqueux, éthanoliques et à l'acétate d'éthyle sont actifs sur les souches de champignons testés, avec une activité maximale (inhibition totale), vis-à-vis de *Microsporum gypseum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton soudanense*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium sp.* et *Scopulariopsis brevicaulis*, des extraits à l'acétate d'éthyle.

On note par ailleurs que tous les extraits testés sont inactifs sur *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*.

Après ce screening antifongique préliminaire des extraits de *Cassytha filiformis* et d'*Harungana madagascariensis* à 1000 µg/ml, les extraits ne présentant aucune ou peu d'activité vis-à-vis des champignons testés ont été éliminés. Seuls les plus actifs (extraits à l'acétate d'éthyle) ont été conservés. Une étude particulière de ces extraits à l'acétate d'éthyle a été réalisée. Elle a consisté à :

- rechercher leurs CMI
- suivre l'évolution de la CMI en fonction du temps de conservation des extraits.

3.3.1.2. Détermination de la CMI des extraits à l'acétate d'éthyle de *Cassytha filiformis* et d'*Harungana madagascariensis*

Des dilutions successives de la solution mère, concentrée à 1000 µg/ml, ont été réalisées, et l'activité antifongique de la gamme de concentration obtenue a été déterminée. Pour chaque souche de champignon la concentration minimale inhibitrice (CMI), exprimée en µg/ml, a été déterminée. Elle a été définie comme la concentration d'extrait pour laquelle aucune croissance fongique n'était possible pendant la durée d'incubation (10 jours pour les dermatophytes, *Fusarium sp.* et *Scopulariopsis brevicaulis* ; et 72 heures pour les levures et *Aspergillus fumigatus*). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XX et la Figure 49.

Tableau XX: CMI des extraits à l'acétate d'éthyle de *Cassytha filiformis* et d'*Harungana madagascariensis* vis à vis de quelques champignons pathogènes.

Organes de plante utilisés	Extraits	Champignons										
		Ca	Cn	Mg	Mc	Tm	Ti	Tr	Ts	Afu	Fsp	Sbr
		CMI (µg/ml)										
Ecorces d' <i>H. madagascar.</i>	Acétate d'éthyle	>1000	>1000	500	500	>1000	750	500	500	1000	500	500
Feuilles d' <i>H. madagascar.</i>	Acétate d'éthyle	>1000	>1000	900	400	>1000	1000	500	700	1000	750	450
Tiges de <i>C. filiformis</i>	Acétate d'éthyle	>1000	>1000	1000	750	1000	1000	950	1000	nt	750	750

Ca : *Candida albicans* ; Cn : *Cryptococcus neoformans* ; Mg : *Microsporium gypseum* ; Mc : *Microsporium canis* ; Tm : *Trichophyton mentagrophytes* var *mentagrophytes* ; Ti : *Trichophyton mentagrophytes* var *interdigitale* ; Tr : *Trichophyton rubrum* ; Ts : *Trichophyton soudanense* ; Afu : *Aspergillus fumigatus* ; Fsp : *Fusarium* sp ; Sbr : *Scopulariopsis brevicaulis* ; nt : non testé.

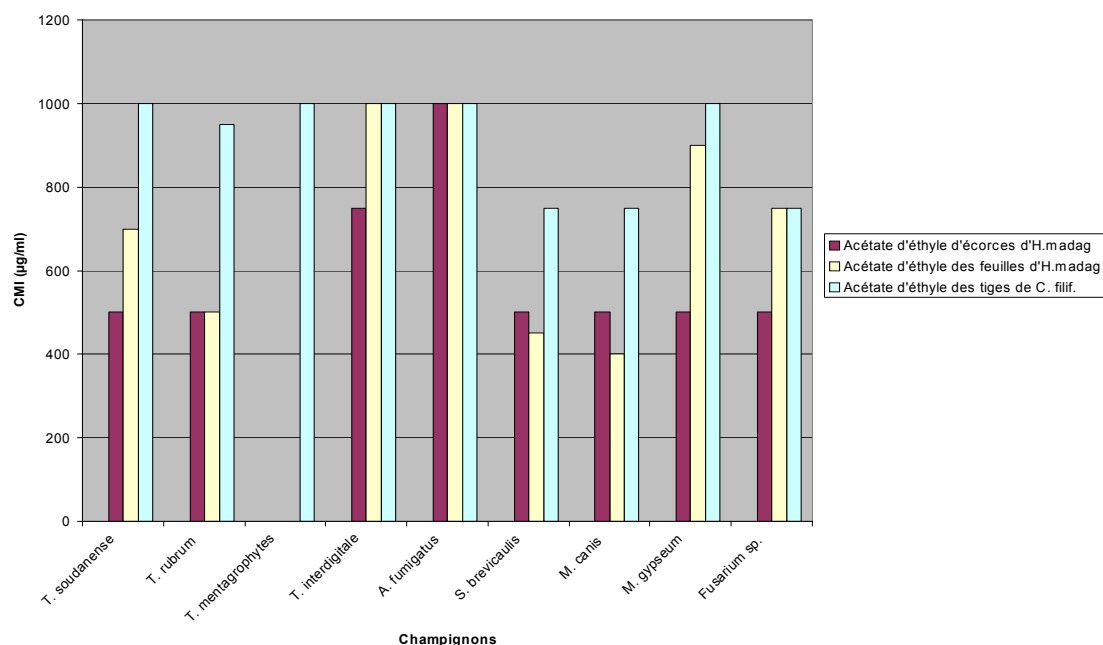


Figure 49 : Etude comparative de l'activité antifongique des extraits à l'acétate d'éthyle de *Cassytha filiformis* et d'*Harungana madagascariensis*.

On constate que l'extrait à l'acétate d'éthyle de *Cassytha filiformis* présente des CMI moins intéressantes, car variant de 750 à 1000 µg/ml (tableau XX). Alors que celles des extraits

d'*Harungana madagascariensis* sont assez intéressantes, les valeurs varient de 400 à 1000 µg/ml pour l'extrait de feuilles, et de 450 à 1000 µg/ml pour l'extrait des écorces. Cette différence de CMI entre les trois extraits à l'acétate d'éthyle est illustrée par la figure 49. Celle-ci montre que les activités antifongiques des extraits à l'acétate d'éthyle d'*Harungana madagascariensis* sont meilleures que celles de *Cassytha filiformis*.

3.3.1.3. Evolution de la CMI en fonction du temps

Les extraits à l'acétate d'éthyle d'*Harungana madagascariensis* se sont montrés plus efficaces que ceux de *Cassytha filiformis*. C'est pourquoi, une étude de l'évolution de leurs CMI en fonction du temps a été effectuée pour vérifier s'ils conserveraient leurs propriétés antifongiques dans le temps. Ils ont donc été conservés durant 9 mois à l'obscurité et à la température du laboratoire. Les tests antifongiques ont été effectués à intervalle de 3 mois sur 3 champignons, choisis en raison de leurs CMI relativement basses. Les résultats obtenus sont présentés dans les Figures 50 et 51.

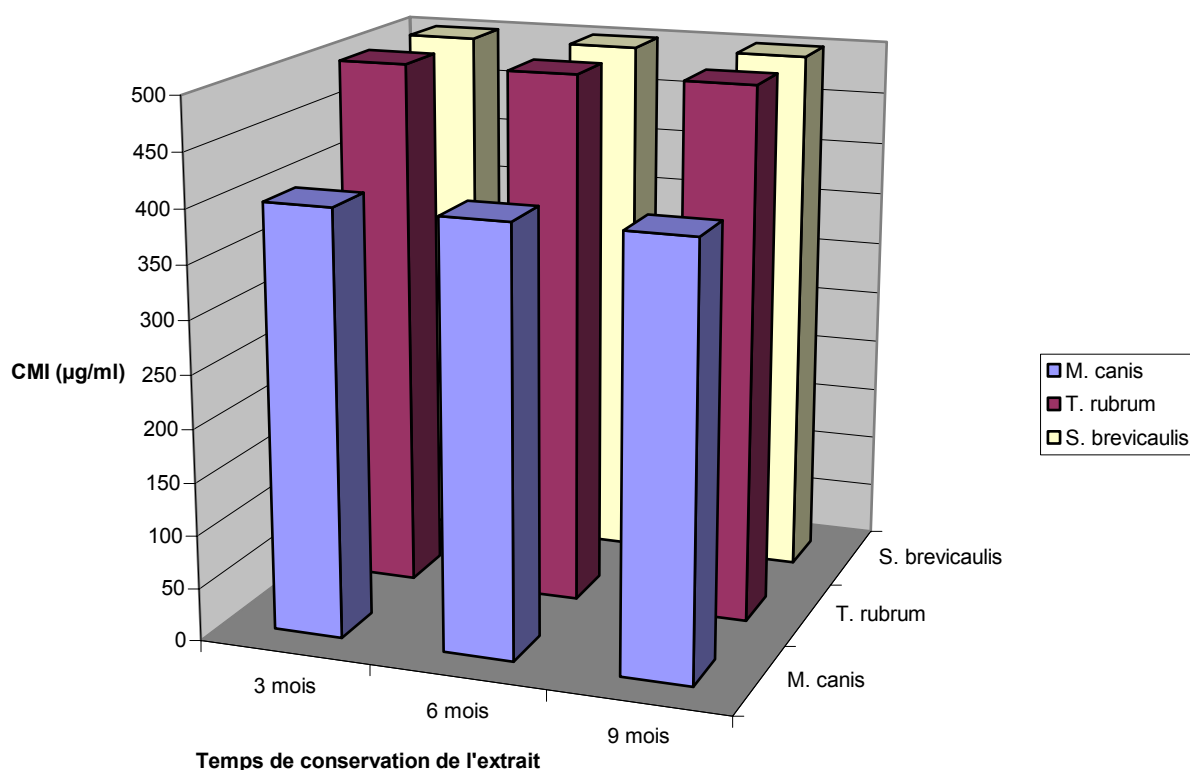


Figure 50 : Activités antifongiques de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* sur trois champignons en fonction du temps de conservation.

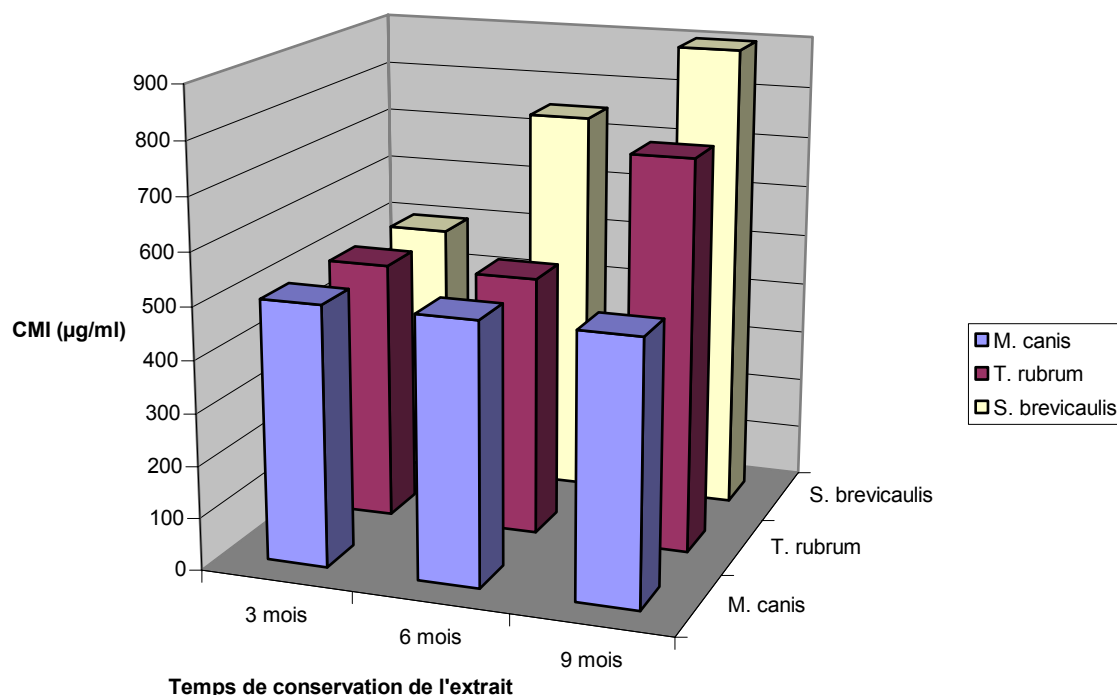


Figure 51 : Activités antifongiques de l'extrait à l'acétate d'éthyle des écorces d'*Harungana madagascariensis* sur trois champignons en fonction du temps de conservation.

Les résultats de la figure 50 font apparaître une conservation de l'activité antifongique de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* en fonction du temps. En effet, l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* a conservé intactes ses propriétés inhibitrices vis-à-vis de *M. canis*, *T. rubrum* et *S. brevicaulis*. Par contre, l'extrait à l'acétate d'éthyle des écorces d'*Harungana madagascariensis* a perdu peu à peu son efficacité après 6 mois de conservation sur *T. rubrum* et *S. brevicaulis*. Cependant ses propriétés inhibitrices vis-à-vis de *M. canis* n'ont pas été altérées par le temps (Figure 51).

3.3.2. Activités antibactériennes

Les activités antibactériennes de nos extraits de plante ont été effectuées sur les bactéries de la microflore cutanée et de la flore transitoire (deux bactéries du genre *Pseudomonas*).

3.3.2.1. Essais préliminaires de détermination des activités antibactériennes

Les tests antibactériens préliminaires de nos extraits ont montré que les extraits éthero-pétroliques et dichlorométhaniques sont inactifs à 1000 µg/ml sur toutes les bactéries

testées. Ainsi dans la suite de ce travail, seuls les extraits éthanoliques et à l'acétate d'éthyle ont été étudiés.

3.3.2.2. Détermination de la CMI des extraits de *Cassytha filiformis* et d'*Harungana madagascariensis*

La solution mère de chaque extrait, concentrée à 1000 µg/ml, a été successivement diluée et une gamme de concentration a été obtenue variant de 15 à 1000 µg/ml. Gamme qui par la suite a fait l'objet de tests antibactériens, les CMI des souches bactériennes ont été déterminées et les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau XXI.

Tableau XXI : CMI des extraits à l'acétate d'éthyle et à l'éthanol de *Cassytha filiformis* et d'*Harungana madagascariensis* vis à vis de la flore bactérienne cutanée et de *Pseudomonas* sp.

Souches bactériennes	Organes de plantes utilisés					
	Feuilles d' <i>Harungana madagascariensis</i>		Ecorces d' <i>Harungana madagascariensis</i>		Tiges de <i>Cassytha filiformis</i>	
	Extraits (CMI en µg/ml)					
	Acétate d'éthyle	Ethanol	Acétate d'éthyle	Ethanol	Acétate d'éthyle	Ethanol
<i>Acinetobacter</i> sp. LH5DCI	100	1000	250	>1000	950	>1000
<i>Alcaligenes</i> sp. LH4TV1	150	1000	250	>1000	950	>1000
<i>Corynebacterium xerosis</i> * CIP 52.16	200	1000	200	1000	350	>1000
<i>Coryneforme</i> groupe B** L16C3	100	1000	250	>1000	750	>1000
<i>Coryneforme</i> groupe C** L3C3	25	400	150	>1000	750	>1000
<i>Coryneforme</i> groupe D2** L19C1	100	900	250	>1000	950	>1000
<i>Micrococcus luteus</i> ** L1C5	50	900	50	1000	900	>1000
<i>Micrococcus sedentarius</i> ** L7B5	250	1000	200	>1000	950	>1000
<i>Moraxella</i> sp. LH7SV1	25	1000	100	>1000	950	>1000
<i>Staphylococcus cohnii</i> ** L6S3	250	1000	250	900	750	>1000
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ** L1S2	250	900	200	1000	950	>1000
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ** CIP 81.56	50	900	50	1000	900	>1000
<i>Staphylococcus hominis</i> ** CIP 81.57	100	1000	200	>1000	>1000	>1000
<i>Staphylococcus xylosus</i> CIP 81.66	25	250	25	900	250	900
<i>Pseudomonas cepacia</i> CIP 80.24	150	>1000	150	>1000	1000	>1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 100720	250	>1000	250	>1000	1000	>1000

* : responsable de l'odeur des aisselles

** : responsables de l'odeur des pieds

Ces résultats montrent que l'ensemble de bactéries testées sont quasiment résistantes, à 1000 µg/ml, aux extraits éthanoliques des tiges de *Cassytha filiformis* et des écorces d'*Harungana madagascariensis* à l'exception des souches de : *Corynebacterium xerosis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus xylosus*, qui sont moyennement sensibles avec des CMI variant de 900 à 1000 µg/ml. Par contre, l'extrait à l'acétate d'éthyle de *Cassytha filiformis* présente une activité inhibitrice assez bonne sur la croissance des bactéries testées (CMI comprises entre 350 et 1000 µg/ml), mais moins bonne comparée à celle donnée par les feuilles et écorces d'*Harungana madagascariensis*. En effet, les extraits à l'acétate d'éthyle des feuilles et écorces d'*Harungana madagascariensis* présentent des propriétés inhibitrices très importantes avec des CMI dont les valeurs sont inférieures ou égales à 250 µg/ml.

3.3.2.3. Etude comparative des extraits à l'acétate d'éthyle des feuilles et écorces d'*Harungana madagascariensis*

Afin de déterminer lequel des deux extraits d'*Harungana madagascariensis* devrait faire l'objet d'une étude plus approfondie, une comparaison de leurs activités inhibitrices a été réalisée. Elle a consisté à comparer leur CMI, mais aussi leur efficacité dans le temps. Les résultats obtenus sont résumés par les Figures 52, 53 et 54.

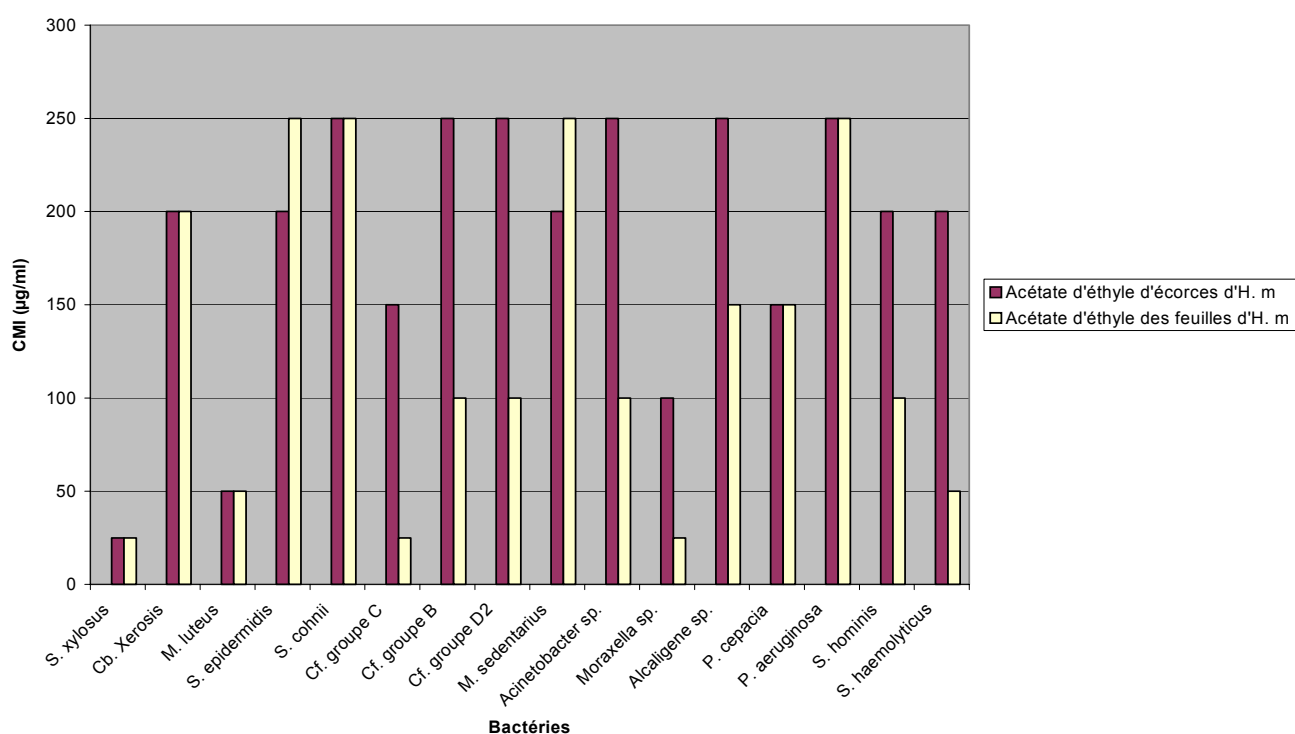


Figure 52 : Etude comparative de l'activité antibactérienne des extraits à l'acétate d'éthyle d'*Harungana madagascariensis* en fonction de leur CMI.

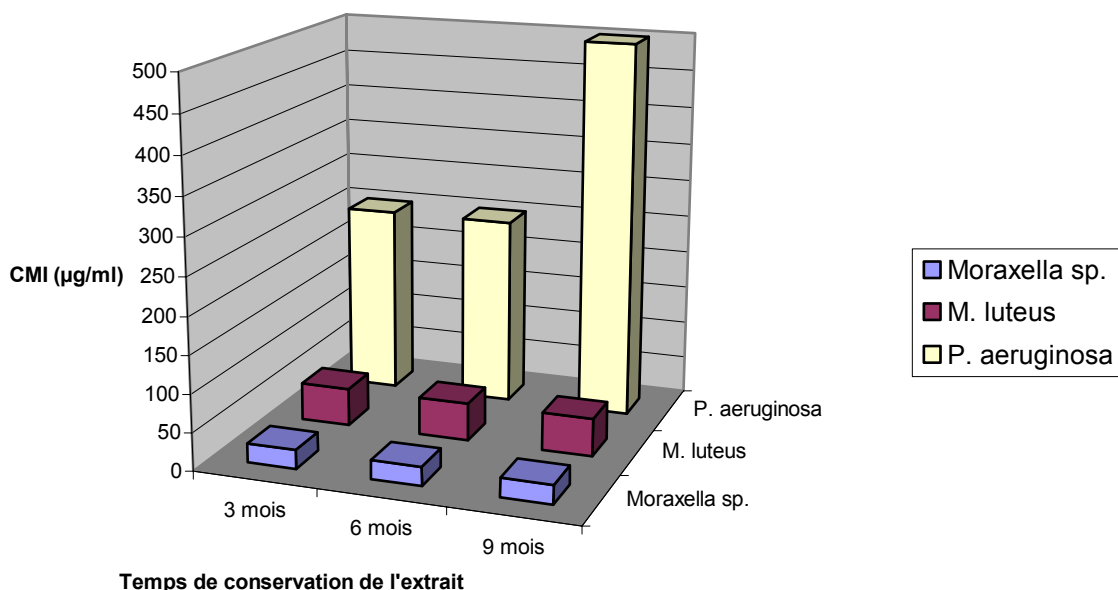


Figure 53 : Activités antibactériennes de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* sur trois souches de bactéries en fonction du temps de conservation.

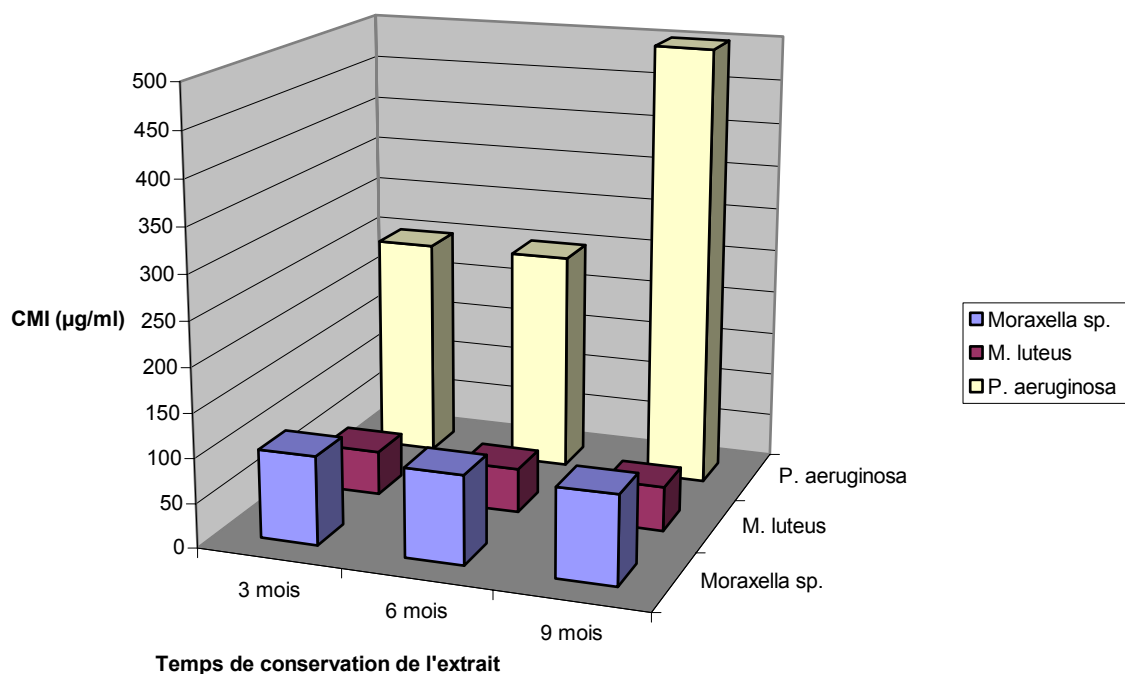


Figure 54 : Activités antibactériennes de l'extrait à l'acétate d'éthyle des écorces d'*Harungana madagascariensis* sur trois souches de bactéries en fonction du temps de conservation.

La Figure 52 montre que, l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles présente des CMI plus basses que celui des écorces, bien que leur action soit assez équivalente sur certaines bactéries. Les Figures 53 et 54 font apparaître nettement une conservation des activités antibactériennes des extraits en fonction du temps vis-à-vis de *Moraxella sp.* et *Micrococcus luteus*, par contre on constate qu'ils perdent peu à peu leur efficacité sur *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie de la flore transitoire réputée très résistante aux antimicrobiens existants sur le marché, après 6 mois de conservation. Cette perte d'efficacité vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* pourrait être due à la disparition d'une synergie liée à un principe actif labile, mais qui est sans effet sur les autres bactéries testées.

3.4. Conclusion

Dans cette étude, les activités antifongiques et antibactériennes de *Cassytha filiformis* (*Lauraceae*) et d'*Harungana madagascariensis* (*Hypericaceae*), deux plantes utilisées en médecine traditionnelle africaine comme antimicrobiens, ont été déterminées *in vitro*. Au total 12 extraits (4 par organe de plante utilisée) ont été testés d'une part sur certains champignons pathogènes de l'homme, et d'autre part sur les bactéries de la microflore cutanée dont celles responsables des mauvaises odeurs. Il apparaît que tous les germes utilisés dans cette étude n'ont pas été sensibles aux extraits apolaires (éthéro-pétroliques et dichlorométhaniques). Ils ont été par contre sensibles aux extraits polaires (éthanoliques et acétate d'éthyle), avec un maximum d'activités inhibitrices pour les extraits à l'acétate d'éthyle. Les études comparatives réalisées entre les trois extraits à l'acétate d'éthyle, (tiges de *Cassytha filiformis*, feuilles et écorces d'*Harungana madagascariensis*), ont fait apparaître clairement que :

- l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* possédait la meilleure activité antifongique et antibactérienne ;
- les propriétés inhibitrices de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* étaient beaucoup plus antibactériennes (CMI variant de 25 à 250 µg/ml) qu'antifongiques (CMI variant de 400 à 1000 µg/ml).

Aussi nous avons choisi, dans la suite de ce travail, de réaliser une étude approfondie sur l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis*.

Cette étude a consisté à :

- ♦ rechercher les effets antibactériens de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* sur d'autres flores bactériennes, notamment la flore buccale et particulièrement sur les bactéries responsables des caries dentaires ;
- ♦ déterminer sa bactéricidie sur les souches bactériennes saprophytes et transitoires de la microflore cutanée et sur celles de la flore buccale ;

♦ identifier, isoler, purifier et caractériser la (ou les) molécule(s) responsable(s) de l'activité antibactérienne constatée.

CHAPITRE VI

ETUDE APPROFONDIE DE

L'EXTRAIT A L'ACETATE D'ETHYLE

DES FEUILLES D'*HARUNGANA*

MADAGASCARIENSIS

- 1. ETUDE BACTERIOSTATIQUE ET BACTERICIDE**
- 2. ETUDE ANTIMICROBIENNE PARTICULIERE SUR
STAPHYLOCOCCUS INTERMEDIUS ET *MALASSEZIA*
*PACHYDERMATIS***
- 3. ETUDE CHIMIQUE**

INTRODUCTION

Les screening antifongique et antibactérien réalisé dans la partie précédente nous ont permis de mettre en évidence les propriétés antifongiques et antibactériennes des extraits à l'acétate d'éthyle d'*Harungana madagascariensis*. Mais également d'orienter la suite de notre travail sur la recherche des activités antibactériennes de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles, compte tenu de ses propriétés inhibitrices plus importantes que celles des autres extraits.

Ainsi, le plan adopté comportera :

- une étude de sa bactéricidie sur les bactéries de la microflore cutanée et de la flore transitoire, suivie d'une étude bactériostatique et bactéricide sur des bactéries de la flore buccale ;
- une étude chimique qualitative préliminaire par CCM, destinée à répertorier les différents groupes chimiques qu'il renferme;
- une étude chimico-biologique quantitative par bioautographie pour déterminer la fraction active ;
- et enfin une étude chimique qualitative approfondie par association des techniques chromatographiques (CCM, colonne ouverte, colonne de verre) et spectrales (UV, IR, RMN du proton et du carbone, spectroscopie de masse) pour isoler, purifier et caractériser la (ou les) molécule(s) active(s) responsable(s) de l'activité antibactérienne.

1. ETUDE BACTERIOSTATIQUE ET BACTERICIDE

Dans le screening antibactérien réalisé précédemment, nous avons montré que l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* possédait une importante activité inhibitrice sur la croissance des bactéries de la microflore cutanée. Ainsi, la suite de cette étude a porté sur la détermination de la bactéricidie de cet extrait sur les germes de la microflore cutanée saprophyte et transitoire, et également d'apprécier ses effets bactériostatiques et /ou bactéricides sur les bactéries de la flore buccale.

1.1. Matériel et méthodes

1.1.1. Matériel

Le matériel utilisé regroupe :

- l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* dont le procédé d'obtention a été décrit dans la partie précédente ;

- les souches bactériennes présentées dans les tableaux XV et XVI, et les milieux de culture dont les compositions sont données dans le tableau XVII (pages 108, 109, 110).

1.1.2. Méthodes

- Tests bactériostatiques

La technique de dilution en milieu solide décrite et utilisée dans la partie précédente a été employée. Les bactéries de la flore buccale ont été cultivées sur milieu MRS pour les souches de *Lactobacillus* et sur Columbia blood agar pour les autres souches (en absence d'oxygène pour *Actinomyces* et *Streptococcus*)

- Tests bactéricides

La méthode de dilution en milieu liquide sur microplaque décrite par le NCCLS (1995) a été utilisée, et la viabilité des souches bactériennes a été vérifiée sur milieu solide.

La technique a consisté à préparer une gamme de concentration de l'extrait par dilutions successives de la solution mère avec du bouillon nutritif (sans agar donc liquide). Les concentrations obtenues ont été réparties dans les puits d'une microplaque de titration à fond en U, à raison de 3 puits par concentration. Ensuite, l'inoculum de chaque bactérie (10^8 UFC/ml) a été ajouté à chaque puit. La microplaque a été par la suite mise à l'étuve à 37°C. Après 24 h d'incubation, une goutte de chaque dilution a étéensemencée sur milieu de culture solide, (MRS pour les *Lactobacillus*, Columbia blood agar pour *Streptococcus* et *Actinomyces*, et gélose nutritive pour les bactéries de la flore cutanée), et coulée dans des boîtes de Petri. Celles-ci ont été ensuite incubées à 37°C pendant 48 h, puis la lecture a été effectuée.

Les concentrations pour lesquelles aucune croissance bactérienne n'a été observée, ont été qualifiées de bactéricides : ce sont les concentrations minimales bactéricides (CMB).

1.2. Résultats et discussion

Les résultats de cette étude sont rapportés dans les Tableaux XXII et XXIII.

Tableau XXII : CMB de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* vis-à-vis des bactéries de la microflore cutanée et de la flore transitoire.

Souches bactériennes	Extrait à l'acétate d'éthyle
	(CMB en µg/ml)
<i>Acinetobacter</i> sp. LH5DCI	250
<i>Alcaligenes</i> sp. LH4TV1	500
<i>Corynebacterium xerosis</i> * CIP 52.16	200
<i>Coryneforme</i> groupe B** L16C3	750
<i>Coryneforme</i> groupe C** L3C3	125
<i>Coryneforme</i> groupe D2** L19C1	100
<i>Micrococcus luteus</i> ** L1C5	100
<i>Micrococcus sedentarius</i> ** L7B5	500
<i>Moraxella</i> sp. LH7SV1	500
<i>Staphylococcus cohnii</i> ** L6S3	250
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ** L1S2	250
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ** CIP 81.56	500
<i>Staphylococcus hominis</i> ** CIP 81.57	250
<i>Staphylococcus xylosus</i> CIP 81.66	100
<i>Pseudomonas cepacia</i> CIP 80.24	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 100720	500

* : responsable de l'odeur des aisselles

** : responsables de l'odeur des pieds

Tableau XXIII : CMI et CMB de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* vis-à-vis de bactéries de la flore buccale.

Souches bactériennes	Extrait à l'acétate d'éthyle	
	CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)
<i>Actinomyces naeslundii</i> CIP103128	50	250
<i>Actinomyces viscosus</i> OMZ 206	50	200
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	125	350
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CIP 76.13	50	125
<i>Lactobacillus casei</i> CIP 107868	250	750
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CIP 81.55T	250	250
<i>Streptococcus milleri</i>	125	350
<i>Streptococcus mitior</i> OMZ 89	125	200
<i>Streptococcus mutans</i> CIP 103220	100	500
<i>Streptococcus mutans</i> serotype a OMZ 52	100	500
<i>Streptococcus mutans</i> serotype b OMZ 51	100	400
<i>Streptococcus mutans</i> serotype C OMZ 64	50	300
<i>Streptococcus mutans</i> serotype f	50	300
<i>Streptococcus mutans</i> serotype k OMZ 65	100	500
<i>Streptococcus salivarius</i> OMZ 36	100	250
<i>Streptococcus sanguis</i>	100	500

Le tableau XXII montre l'effet bactéricide de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* sur les bactéries de la microflore cutanée saprophyte et sur celles de la flore transitoire représentée par les souches de *Pseudomonas*. On constate que les CMB sont comprises entre 125 et 750 µg/ml.

Au niveau de la flore des aisselles (Tableau XV, page 108), la principale bactérie impliquée dans l'apparition des mauvaises odeurs (*Corynebacterium xerosis*) est détruite à 200 µg/ml alors qu'une bonne partie des bactéries saprophytes, non responsables de l'odeur des aisselles, est épargnée (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*).

A 250 µg/ml, la plupart des bactéries responsables des mauvaises odeurs des pieds (Tableau XV, page 108) sont elles aussi détruites, alors que celles de la flore saprophyte non impliquées dans l'apparition de cette odeur sont épargnées sauf la souche d'*Acinetobacter sp.*

Ce tableau fait apparaître également des CMB intéressantes pour les souches de *Pseudomonas*. En effet, les deux souches de *Pseudomonas* utilisées dans cette étude à savoir *Pseudomonas cepacia* et *Pseudomonas aeruginosa* sont respectivement détruites à 250 et 500 µg/ml. Ce qui est intéressant, surtout pour *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie impliquée, seule ou en association avec d'autres bactéries et/ou levures, dans plusieurs pathologies (humaines et animales) mais réputée très résistante aux antimicrobiens existants sur le marché (Franklin, 1991).

Le tableau XXIII résume les propriétés bactériostatiques et bactéricides de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* vis-à-vis de quelques bactéries pathogènes de la flore buccale. On constate que cet extrait possède des propriétés bactériostatiques très marquées. En effet, les CMI sont inférieures ou égales à 250 µg/ml, avec bien évidemment des activités inhibitrices à 50 et 100 µg/ml vis-à-vis respectivement de *Lactobacillus acidophilus* et *Streptococcus mutans*, principaux agents microbiens responsables de la carie dentaire. Les CMB sont elles aussi intéressantes, car leurs valeurs sont comprises entre 125 et 750 µg/ml, avec un minimum pour *Lactobacillus acidophilus*, bactérie très impliquée dans les infections de la cavité buccale.

1.3. Conclusion

Dans cette étude, nous avons déterminé les effets antibactériens (bactériostatiques et bactéricides) de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* (EAFHM) sur quelques souches de la flore buccale et de la microflore cutanée, et sur deux souches du genre *Pseudomonas* (*Pseudomonas cepacia* et *Pseudomonas aeruginosa*). Il apparaît clairement que l'EAFHM a un pouvoir bactériostatique (CMI variant de 50 à 250 µg/ml) et bactéricide (CMB variant de 100 à 750 µg/ml) sur les germes utilisés. Ce pouvoir est d'autant plus intéressant qu'il est important de vérifier cette activité sur des germes responsables des maladies chroniques chez des animaux de compagnie tels que les chiens et les chats, car ces germes sont souvent pathogènes pour l'Homme.

2. ETUDE ANTIMICROBIENNE SUR *STAPHYLOCOCCUS INTERMEDIUS* ET *MALASSEZIA PACHYDERMATIS*

Les dernières grandes alertes, de notre planète, dues aux maladies infectieuses (SIDA, SRAS, grippe aviaire,...) sont toutes d'origine animale, les microorganismes incriminés ont franchi, pour certains la barrière d'espèces. Ainsi une extension de notre étude à un complexe bactério-fongique très important en médecine vétérinaire, où la prévalence de *Staphylococcus intermedius* et *Malassezia pachydermatis* dans les infections est très marquée, nous a semblé nécessaire. En effet ces deux germes sont souvent responsables, en association avec *Pseudomonas aeruginosa* des infections chroniques et graves des animaux de compagnie, telles que les otites et les dermatites chez les chiens.

Dans cette étude nous avons déterminé les activités fongistatique, bactériostatique et bactéricide de l'extrait à l'acétate d'éthyle vis-à-vis respectivement de *Malassezia pachydermatis* et de *Staphylococcus intermedius*, en utilisant les techniques de dilution en milieux solide et liquide décrites précédemment (pages, 68).

Les milieux de culture utilisés ont été les suivants :

- Sabouraud + chloramphénicol pour *Malassezia pachydermatis*
- Bouillon nutritif seul ou additionné d'agar pour *Staphylococcus intermedius* (test bactéricide et bactériostatique)

Les compositions de ces milieux sont données dans les tableaux XIV et XVII (pages, 107 et 110).

2.1. Résultats et discussion

Les résultats de cette étude sont rapportés dans le tableau XXIV.

Tableau XXIV : CMI et CMB de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* vis-à-vis de germes impliqués dans les infections bactério-fongiques chez les animaux de compagnie.

Germes testés	Extrait à l'acétate d'éthyle	
	CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)
<i>Malassezia pachydermatis</i> CIP 2193.93	250	NT
<i>Staphylococcus intermedius</i> CIP 81.60	50	125
<i>Staphylococcus intermedius</i> CIP 81.77	50	125

Le tableau XXIV résume les propriétés fongistatique, bactériostatique et bactéricide de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* (EAFHM) vis-à-vis de deux germes impliqués dans les infections qualifiées de bactério-fongiques chez les animaux de compagnie, notamment chiens et chats. On constate que cet extrait possède des propriétés bactériostatiques et bactéricides très intéressantes sur *S. intermedius*, principale bactérie responsable des otites externes des chiens, avec une CMI égale à 50 µg/ml et une CMB de 125 µg/ml. *Malassezia pachydermatis*, levure associée à *Staphylococcus intermedius* dans l'apparition des otites et dermatites des chiens (Blond et al. 1995 ; Masuda et al., 2000 ; Scott et al., 2001), présente également une sensibilité intéressante à l'EAFHM avec une CMI de 250 µg/ml.

2.2. Conclusion

Il apparaît clairement que l'EAFHM a un pouvoir antimicrobien intéressant (CMI variant de 50 à 250 µg/ml, CMB de 125 µg/ml) sur les germes utilisés. Ce pouvoir est d'autant plus intéressant qu'il est important qu'une étude chimique approfondie de l'EAFHM soit faite, afin d'identifier, isoler, purifier et caractériser la (ou les) molécule(s) responsable(s) de cette activité inhibitrice.

3. ETUDE CHIMIQUE

Compte tenu de l'activité inhibitrice importante de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* vis-à-vis des souches bactériennes, une étude chimique de celui-ci s'imposait. Cette étude poursuit un triple objectif :

- d'abord, mettre en évidence les principaux groupes de substances présents dans cet extrait ;
- ensuite, fractionner l'extrait et cibler la fraction active par des tests antibactériens guidés par bioautographie ;
- et enfin, isoler, purifier et déterminer la (ou les) structure(s) du (ou des) composé(s) responsable(s) de l'activité inhibitrice.

3.1. Remarques préliminaires

3.1.1. Analyse qualitative

Elle est basée sur une extraction du végétal par des solvants de polarité croissante, qui permettent l'extraction des différents groupes chimiques, lesquels sont ensuite identifiés par des réactifs spécifiques. La mise en évidence des constituants chimiques de l'extrait à l'acétate d'éthyle, et leur caractérisation, ont été réalisées en utilisant la chromatographie sur couche mince (CCM).

♦ Les alcaloïdes ont été révélés par le réactif de Dragendorff modifié :

- solution mère : 6 g de sous nitrate de bismuth, 8 g d'iode sublimé, 45 g d'iodure de potassium, eau distillée qsp 100 ml ;
- solution diluée : 10 ml de solution mère, 10 ml d'acide acétique, eau distillée qsp 100 ml.

♦ Les tanins ont été révélés par une solution de chlorure ferrique (FeCl_3) à 1%.

♦ Les anthraquinones et anthrones ont été révélées respectivement par une solution éthanolique à 5% d'hydroxyde de potassium et par une solution de paranitrosodiméthylalanine à 0,1% dans la pyridine.

♦ Les dérivés flavoniques ont été révélés par une solution éthanolique à 1% de chlorure d'aluminium (AlCl_3) suivie par une solution éthanolique à 5% de PEG 4000 et d'une observation aux UV à 366 nm.

3.1.2. Fractionnement et purification bioguidés

Les différentes méthodes chromatographiques analytiques et préparatives utilisées pour fractionner l'extrait à l'acétate d'éthyle et obtenir le (ou les) composé(s) à l'état pur sont les suivantes :

♦ Chromatographie sur colonne ouverte (CC) :

- support : gel de silice Merck 60 ; granulométrie 0,063-0,2 mm (70-230 mesh ASTM), référence 7734 ;
- éluant : série éluotrope avec gradient de polarité CH_2Cl_2 /méthanol
- diamètre de la colonne : 2,1 cm.

♦ Chromatographie sur colonne de Sephadex :

- support : gel de Sephadex LH-20
- éluant : éthanol à 80%
- diamètre de la colonne 1,5 cm

♦ Chromatographie sur couche mince préparative (CCM prép.) : les plaques ont été étalées au laboratoire.

- support : gel de silice Merck 60 F_{254}S ; épaisseur 0,5 mm ; référence 13794 ;
- éluant : chloroforme/n-propanol/acide formique/eau (15:10:3:1 v/v).

♦ Chromatographie sur couche mince analytique (CCM) :

- support gel de silice Merck 60 PF_{254} (épaisseur 0,2 mm) ; référence 1.05554 ;
- éluant : chloroforme/n-propanol/acide formique/eau (15:10:3:1 v/v).

La mise en évidence des fractions et composés actifs a été réalisée par bioguidage par utilisation de la bioautographie directe, technique décrite dans le chapitre III (page 69). Le principe de la méthode consiste à réaliser des CCM des différentes fractions et à les pulvériser avec un milieu de culture semi-solide infesté de bactéries. Les plaques sont ensuite incubées à 37 °C pendant 48 h, puis révélées avec une solution de méthyl thiazolyl tétrazolium (MTT).

3.1.3. Détermination de la structure du composé bioactif

L'étude des constantes et des données spectrales a permis de déterminer la structure du composé bioactif isolé. L'appareillage suivant a été utilisé :

♦ Le spectre UV

L'enregistrement a été effectué dans le méthanol sur un spectromètre SHIMADZU UV 160A. Les valeurs des maxima d'absorption sont exprimées en nanomètre (nm). Les spectres sont enregistrés dans la gamme d'onde 200-400 nm.

♦ Le spectre de RMN ^1H

Ils ont été effectués dans la pyridine ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) avec le TMS comme référence interne, à l'aide d'un spectromètre BRUKER AC 400 à 400 MHz.

♦ Le spectre RMN ^{13}C

Ils ont été réalisés dans le $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ avec le TMS comme référence interne, à 100 MHz sur un spectromètre BRUKER AC 400.

♦ La RMN Bidimensionnelle

Les spectres de RMN de corrélations ^1H - ^1H (COSY) et ^{13}C - ^1H (HMBC, HMQC) ont été effectués à l'aide du même appareillage en utilisant les microprogrammes BRUKER.

♦ Le spectre de masse

Ils ont été enregistrés en mode Z-spray (source electrospray) sur un spectromètre WATERS QTOF1.

♦ Le spectres infra-rouge (IR)

Ils ont été réalisés, à partir de pastilles de KBr, sur un spectrophotomètre SCHIMADZU FTIR-8201 PC.

3.2. Analyse chimique préliminaire de l'extrait à l'acétate d'éthyle

Elle a consisté à réaliser des tests spécifiques destinés à mettre en évidence les différents groupes chimiques présents dans l'extrait.

3.2.1. Méthode

Une CCM de l'extrait a été réalisée, l'élution ayant été faite dans le système chloroforme/n-propanol/acide formique/eau (15:10:3:1 v/v). Après séchage des plaques à la température ambiante, leur révélation a été faite par **pulvérisation** des réactifs spécifiques, puis par examen en **lumière visible** et sous **lumière UV à 254 et 366 nm**. Chaque groupe chimique, au contact d'un réactif donne une coloration bien précise, comme le décrit Harborne (1973).

3.2.2. Résultats et discussion

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XXV (page suivante).

Tableau XXV : Investigation phytochimique qualitative de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis*.

Réactifs pulvérisés	Observation	Métabolites secondaires
Dragendorff	Présence de tâches colorées en rouge orangé dans le visible	• Alcaloïdes
Solution éthanolique de KOH à 5%	Présence de tâches colorées en rouge à 254 nm	• Anthraquinones
Solution de FeCl ₃ à 1%	Présence de tâches colorées en bleu sombre à 254 nm	• Tanins
Solution éthanolique de AlCl ₃ à 1%	Présence de tâches colorées en jaune claire à 254 nm	• Flavonoïdes
NP/PEG	Présence de tâches fluorescentes colorées en orange à 366 nm	• Flavonols • Flavones
Solution de paranitrosodiméthylalanine pyridine à 0,1%	Présence de tâches de couleur grise à 254 nm	• Anthrones

Cette analyse qualitative de la composition chimique de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* a permis de mettre en évidence la présence d'alcaloïdes, d'anthraquinones, d'anthrones, de flavonoïdes, de flavonols et flavones.

On note, sur la base de l'intensité des tâches sur la plaque de CCM, une forte teneur en flavonoïdes. Les autres classes chimiques sont peu abondantes.

3.3. Fractionnement et bioguidage

3.3.1. Fractionnement de l'extrait à l'acétate d'éthyle

Le fractionnement de l'extrait a été réalisé par chromatographie sur colonne ouverte de silice (CC).

3.3.1.1. Méthodes

Après préparation et coulage du gel de silice (32 fois le poids de l'échantillon), 800 mg d'extrait, dissous dans 2 ml de CH_2Cl_2 , ont été déposés à la surface du gel présent dans la colonne. L'élution des fractions a été effectuée par des solvants de polarité croissante, d'abord le CH_2Cl_2 puis des mélanges CH_2Cl_2 /méthanol, dans les proportions suivantes : 99:1 ; 98:2 ; 97:3 ; 96:4 ; 95:5 et 90:10 v/v. Des fractions de 15 ml ont été recueillies, puis leurs profils chromatographiques déterminés par CCM dans chloroforme/ n-propanol/acide formique/eau (15:10:3:1). Les fractions présentant les mêmes profils ont été rassemblées, évaporées à cécité puis pesées.

3.3.1.2. Résultats et Discussion

188 fractions ont été obtenues de ce fractionnement et ont été regroupées en 11 réunions de fractions (F1 à F11). Le diagramme de séparation est présenté par la Figure 55 (page 138). Ces résultats montrent qu'au total, 470 mg ont été récupérés en sortie de colonne, soit un rendement de 58,75% par rapport à la masse d'extrait de départ. Il est à noter que les fractions F7 à F11 contiennent le même composé majoritaire, à des degrés de pureté variables.

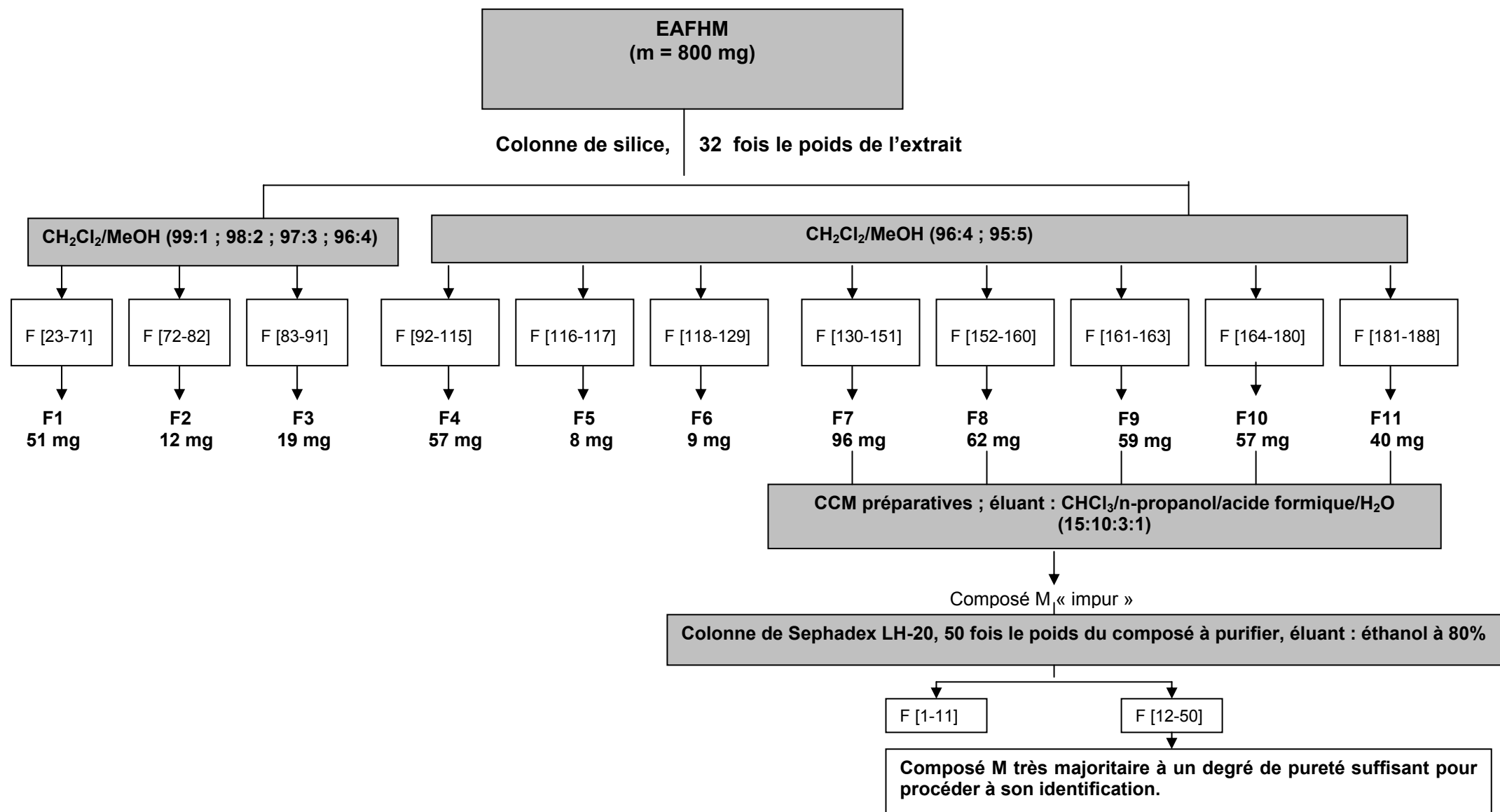


Figure 55 : Etapes du fractionnement de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* et de la purification du composé bioactif M (F pour réunion de fractions)

3.3.2. Bioguidage ou détermination de la fraction active de l'extrait à l'acétate d'éthyle

La technique de bioguidage utilisée pour déterminer la (ou les) fraction(s) active(s) de l'extrait à l'acétate d'éthyle (EAFHM) est la bioautographie directe dont le principe a été donné dans les remarques préliminaires.

3.3.2.1. Méthodes

♦ Migration sur plaques de CCM

L'EAFHM, les 11 réunions de fractions obtenues et le chloramphénicol ont été séparément dissous dans l'éthanol à 99%. Les dépôts effectués en CCM correspondent à des quantités en produits variant, de 1 à 10 µg pour le chloramphénicol (produit de référence) et de 10 à 250 µg pour les fractions de l'EAFHM. L'élution a été réalisée dans chloroforme/ n-propanol /acide formique/eau (15:10:3:1 v/v) pour les fractions d'EAFHM et dans chloroforme/ méthanol (8:2 v/v) pour le chloramphénicol. Les plaques ont été par la suite séchées sous une hotte à flux laminaire pendant 24 h.

♦ Préparation de l'inoculum bactérien

Les colonies bactériennes de 24 h d'âge ont été mises en suspension dans 5 ml d'eau distillée stérile. Après une agitation au vortex, la concentration bactérienne de la suspension a été déterminée par spectrophotométrie à 600 nm par mesure de la densité optique (DO). Celle-ci est ajustée à 1, ce qui correspond à 10^7 UFC/ml selon Rahalison et al. (1994).

♦ Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture bactérienne utilisé (bouillon nutritif additionné d'agar) est préparé comme indiqué dans le tableau XVII (page 110). Il est ensuite dilué au 1/2 puis stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 30 min.

♦ Réalisation de la bioautographie

50 ml du milieu de culture, (bouillon nutritif additionné d'agar), maintenu en surfusion à 45°C, ont été mis dans un flacon gradué, puis 2 ml de la suspension bactérienne y ont été ajoutés. Après une homogénéisation par agitation, le mélange a été pulvérisé, de manière uniforme, sur les plaques de CCM. Les plaques ont été séchées à la température de la salle de culture, puis placées dans des boîtes de Petri contenant du papier filtre préalablement imbibé d'eau distillée. Les boîtes ont été ensuite incubées à 37°C pendant 48 h.

La révélation des plaques a été faite par pulvérisation d'une solution de MTT concentrée à 2,5 mg/ml, suivie d'une incubation de 4 h à 37°C. En effet, le MTT a la faculté de colorer les cellules vivantes en bleu-violet, et de laisser les cellules mortes incolores. Pour la lecture de nos résultats, nous avons utilisé cette propriété du MTT pour identifier les fractions et

composés actifs. Ainsi, les zones non colorées, après pulvérisation de la solution du MTT, correspondent donc aux composés possédant des propriétés antibactériennes.

3.3.2.2. Résultats et discussion

Les résultats des tests bioautographiques sont présentés dans le Tableau XXVI et la Figure 56, et sont exprimés en quantité minimale inhibitrice (QMI). La QMI correspond à la quantité minimale d'une fraction, déposée sur la plaque de CCM, à partir de laquelle une inhibition de la croissance des bactéries est constatée. Elle est obtenue en multipliant la concentration de la fraction par son volume nécessaire appliqué sur la plaque de CCM.

$$\text{QMI (en } \mu\text{g)} = \text{C (en } \mu\text{g}/\mu\text{l)} \times \text{V (en } \mu\text{l)}$$

Avec C pour concentration et V pour volume.

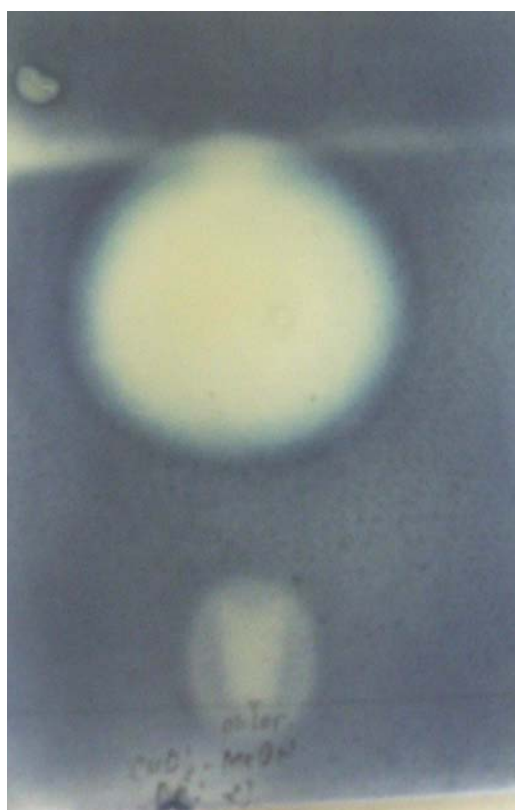
Tableau XXVI : Spectre d'activité antibactérienne des onze fractions d'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* exprimé en quantité minimale inhibitrice (QMI).

Souches bactériennes	Fractions												
	QMI en μg												
	Témoin	Chl	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>Acinetobacter sp.</i>	+++	5	>250	>250	>250	>250	>250	>250	100	100	100	100	100
<i>Alcaligene sp.</i>	+++	5	>250	>250	>250	>250	>250	>250	100	100	100	100	100
<i>C. xerosis</i>	+++	10	>250	>250	>250	>250	>250	>250	75	75	100	100	100
<i>Coryneforme B</i>	+++	10	>250	>250	>250	>250	>250	>250	100	100	100	100	100
<i>Coryneforme C</i>	+++	1	250	>250	>250	>250	>250	>250	50	50	50	50	100
<i>Coryneforme D2</i>	+++	1	250	>250	>250	>250	>250	>250	50	50	50	50	100
<i>M. luteus</i>	+++	1	>250	>250	>250	>250	>250	>250	100	50	100	100	100
<i>M. sedentarius</i>	+++	10	>250	>250	>250	>250	>250	>250	100	100	100	100	50
<i>Moraxella sp.</i>	+++	10	>250	>250	>250	>250	>250	>250	100	100	100	100	50
<i>S. cohnii</i>	+++	10	>250	>250	>250	>250	>250	>250	50	50	50	50	50
<i>S. epidermidis</i>	+++	10	>250	>250	>250	>250	>250	>250	50	50	50	50	100
<i>S. haemolyticus</i>	+++	10	>250	>250	>250	>250	>250	>250	50	50	50	100	50
<i>S. hominis</i>	+++	10	>250	>250	>250	>250	>250	>250	100	50	50	50	50
<i>S. intermedius</i>	+++	1	250	>250	>250	>250	>250	>250	100	100	100	100	200
<i>S. xylosus</i>	+++	1	>250	>250	>250	>250	>250	>250	100	100	100	100	100
<i>P. cepacia</i>	+++	10	>250	>250	>250	>250	>250	>250	100	100	100	100	100
<i>P. aeruginosa</i>	+++	10	>250	>250	>250	>250	>250	>250	100	100	100	100	100

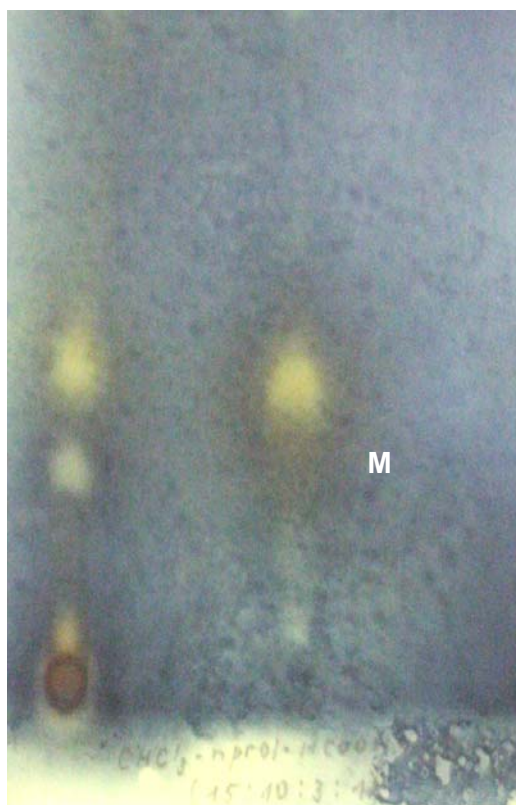
Chl : chloramphénicol, +++ : croissance normale (toute la plaque CCM est colorée en bleu violet après pulvérisation du MTT)



(a)



(b) 10 µg



EAFHM
100 µg

F7
100 µg (c)

Figure 56: Mise en évidence par bioautographie de l'inhibition de la croissance de *Pseudomonas aeruginosa*. (a) : biochromatogramme du témoin, (b) : biochromatogramme du chloramphénicol, (c) : biochromatogramme d'EAFHM et de la fraction F7.

Le tableau XXVI fait apparaître nettement l'activité antibactérienne des fractions testées. On constate que toutes les souches bactériennes testées ne sont pas sensibles aux fractions F1, F2, F3, F4, F5 et F6, à l'exception des souches de *Coryneforme* C et D2, et de *Staphylococcus intermedius* qui sont inhibées par la fraction F1 à 250 µg (Tableau XXVI). Par contre les fractions F7, F8, F9, F10 et F11 présentent toutes une activité antibactérienne vis-à-vis des souches testées avec des QMI variant de 50 à 100 µg. *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie réputée très résistante aux antimicrobiens existants sur le marché, est inhibée à 100 µg. Notons également que ces fractions actives contiennent toutes le composé majoritaire « M », composé dont l'activité antibactérienne est mise en évidence par la figure 55. Ainsi, l'activité antibactérienne, des fractions F7, F8, F9, F10 et F11, pourrait s'expliquer par la présence de « M » en leur sein.

3.4. Purification du composé actif « M »

Les techniques de chromatographie sur couche mince préparative et de chromatographie sur colonne de Sephadex ont été utilisées pour isoler et purifier le composé bioactif de l'EAFHM.

3.4.1. Méthodes

Les fractions F7, F8, F9, F10 et F11 ont été solubilisées dans le méthanol puis déposées (sous la forme d'un trait continu) sur des plaques de CCM préparatives. Après migration et séchage, le composé bioactif M repéré sous lumière UV à 366 nm a été récupéré par grattage à la spatule, dissous dans un mélange acétate d'éthyle/méthanol (1:1), et filtré sous vide à l'aide du verre fritté, puis évaporé sous pression réduite.

Le composé bioactif M récupéré à ce stade ne présentait pas un degré de pureté suffisant. Il a donc été purifié par chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20. 1,5 g de Sephadex ont été mis en suspension dans 15 ml d'éthanol à 80%, puis coulé dans la colonne. Le composé M, dissous dans l'éthanol à 80%, a été déposé à la surface du gel de Sephadex. En sortie de colonne, des fractions de 15 ml ont été recueillies et leurs profils chromatographiques déterminés par CCM. Les fractions ne contenant que le composé M ont été rassemblées, puis concentrées par évaporation sous pression réduite. La masse de M a été par la suite déterminée.

3.4.2. Résultats et discussion

Le composé M se présente sous forme d'un solide jaune, sa masse est de 29 mg. La quantité initiale à purifier étant de 30,4 mg, nous avons obtenu un rendement de 98%. Les différentes étapes résumant la purification de M sont présentées dans la Figure 55 (page 138).

La détermination de la structure de M a été par la suite effectuée grâce aux méthodes spectrales habituellement utilisées en chimie structurale.

3.5. Détermination de la structure du composé bioactif M

L'étude des constantes et des données spectrales a permis de déterminer la structure du composé bioactif M. L'appareillage et les conditions expérimentales ont été énoncés dans les remarques préliminaires (paragraphe 3.1., page 133).

3.5.1. Résultats et discussion

Le composé M se présente sous forme d'un solide jaune et présente une révélation positive au réactif NP-PEG caractéristique des flavonoïdes.

♦Spectre UV

Le spectre UV présente, dans le méthanol, deux maxima à 291 nm (bande II) et 325 nm (bande I) en accord avec le spectre caractéristique d'une flavanone (Harborne, 1973).

♦ Spectre de masse

Le spectre de masse réalisé en mode Z-spray (electrospray) indique deux pics à m/z 473 $[M + Na]^+$ et m/z 451 $[M + H]^+$ nous suggérant la formule brute $C_{21}H_{22}O_{11}$.

♦ Spectre de RMN 1H

Le spectre de RMN du proton (Figure 58), réalisé dans la pyridine- d_5 , présente :

- deux doublets de un proton chacun ($J = 2,0$ Hz) centrés sur 6,32 et 6,44 ppm représentant deux protons aromatiques respectivement en positions 6 et 8 ;
- deux doublets de un proton chacun centrés sur 7,18 ppm ($J = 8,0$ Hz) et 7,62 ppm ($J = 1,6$ Hz) et un doublet dédoublé de un proton à 7,20 ppm ($J = 1,6$ Hz et 8,0 Hz) caractéristiques d'un groupement phényle substitué en positions *méta* et *para* ;
- deux doublets ($J = 10,4$ Hz) de un proton à 5,16 et 5,45 ppm tout à fait spécifiques des protons respectivement en 3 et 2 d'un noyau flavanone ou dihydroflavone.

De plus, ce spectre révèle la présence d'une unité osidique, et plus particulièrement d'un rhamnosyle, avec un singulet large à 5,00 ppm, correspondant au proton anomérique directement fixé sur le noyau flavanone, un ensemble de signaux entre 4,30 et 5,10 ppm intégrant quatre protons, et un doublet ($J = 6,4$ Hz) de trois protons correspondant au groupement méthyle en 6 du sucre.

♦ Spectres de RMN du ^{13}C , de corrélations COSY, HMBC et HMQC

L'étude des spectres de RMN du ^{13}C , de corrélation ^1H - ^1H COSY, et ^1H - ^{13}C HMBC et HMQC (Figures 59, 60, 61 et 62) nous a permis d'attribuer sans ambiguïté les signaux des protons du sucre ainsi que les signaux de tous les carbones.

Ainsi, une corrélation importante, sur le spectre HMBC, entre le proton anomérique du rhamnose (5,00 ppm) et le carbone à 77,0 ppm (C-3), nous a permis d'affirmer que l'unité osidique est fixée en position 3 de la flavanone.

Ceci nous a permis d'attribuer sans ambiguïté la structure de l'astilbine au composé M, composé déjà isolé d'*Harungana madagascariensis* (Iimuna et al., 1995).

De plus, les travaux de De Britto et al. (1995) nous ont permis de préciser la stéréochimie de la génine. Ainsi, le déblindage important du proton en 5'' du rhamnose, la valeur de la constante de couplage entre H-2 et H-3 ($J = 10,4 \text{ Hz}$) associés à une valeur d' α_D négative, nous ont indiqué que le composé M est :

La (-)-2R,3R-astilbine

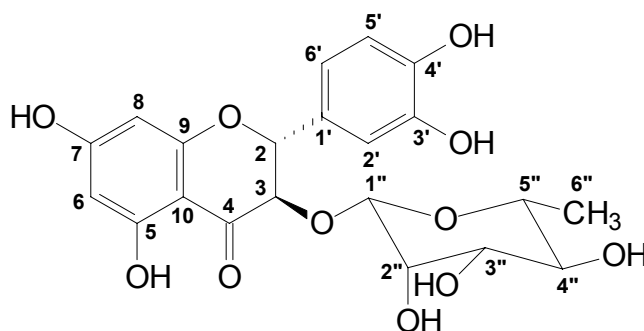


Figure 57 : Structure moléculaire de la (-)-2R,3R-astilbine

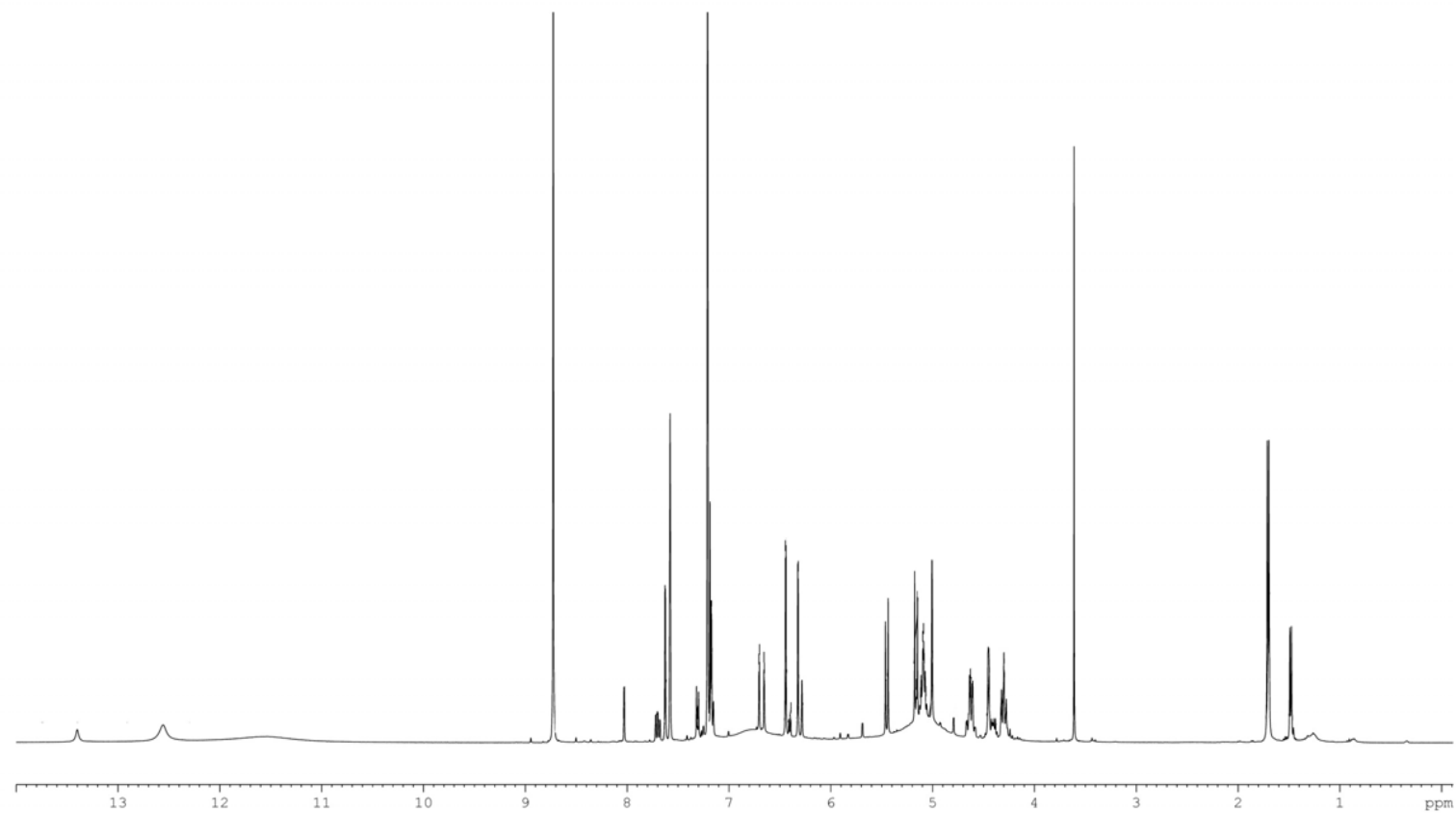


Figure 58 : Spectre RMN- ^1H du composé M ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 400 MHz)

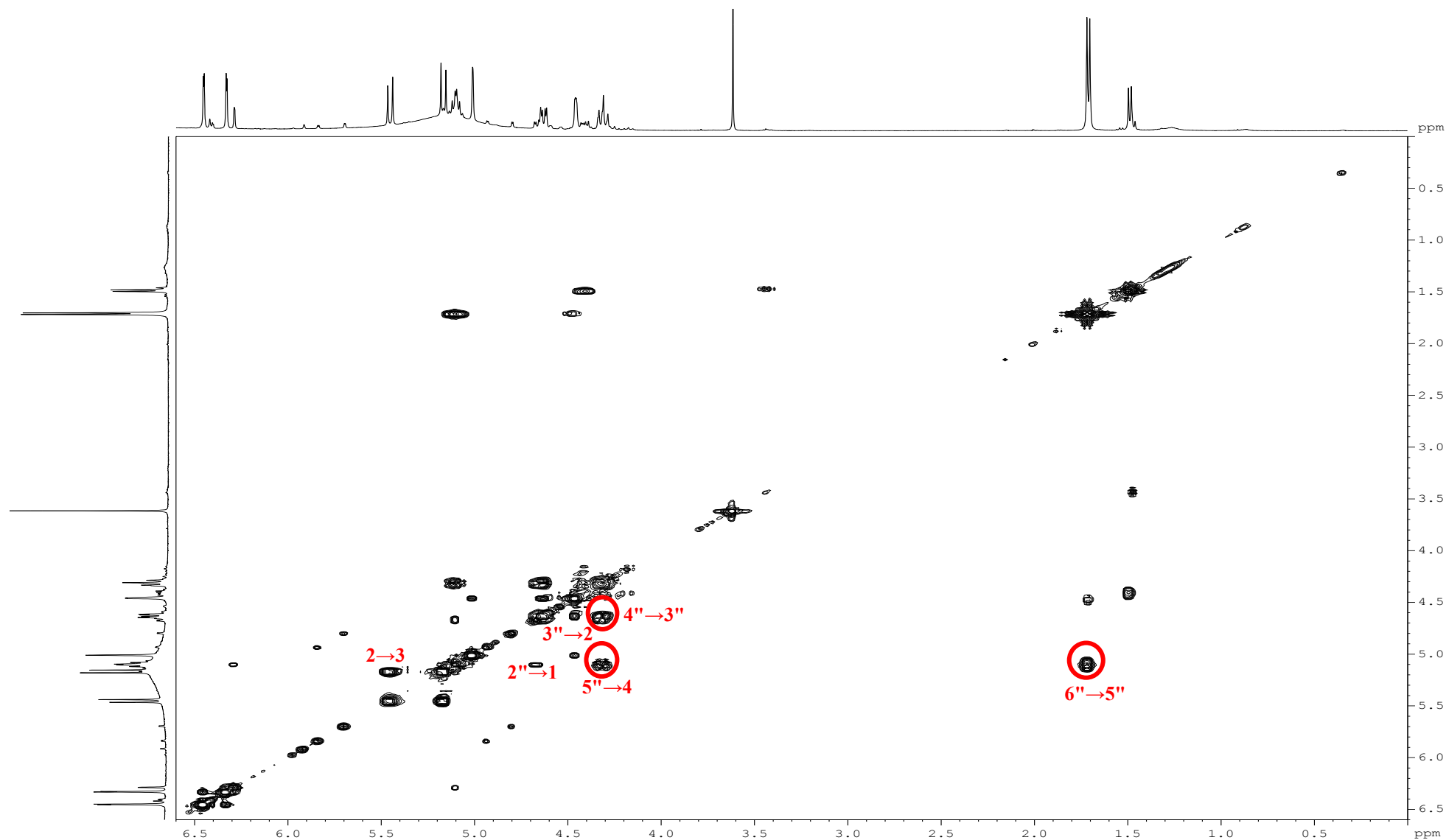


Figure 59 : Spectre ^1H - ^1H cosy du composé M ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 400 MHz)

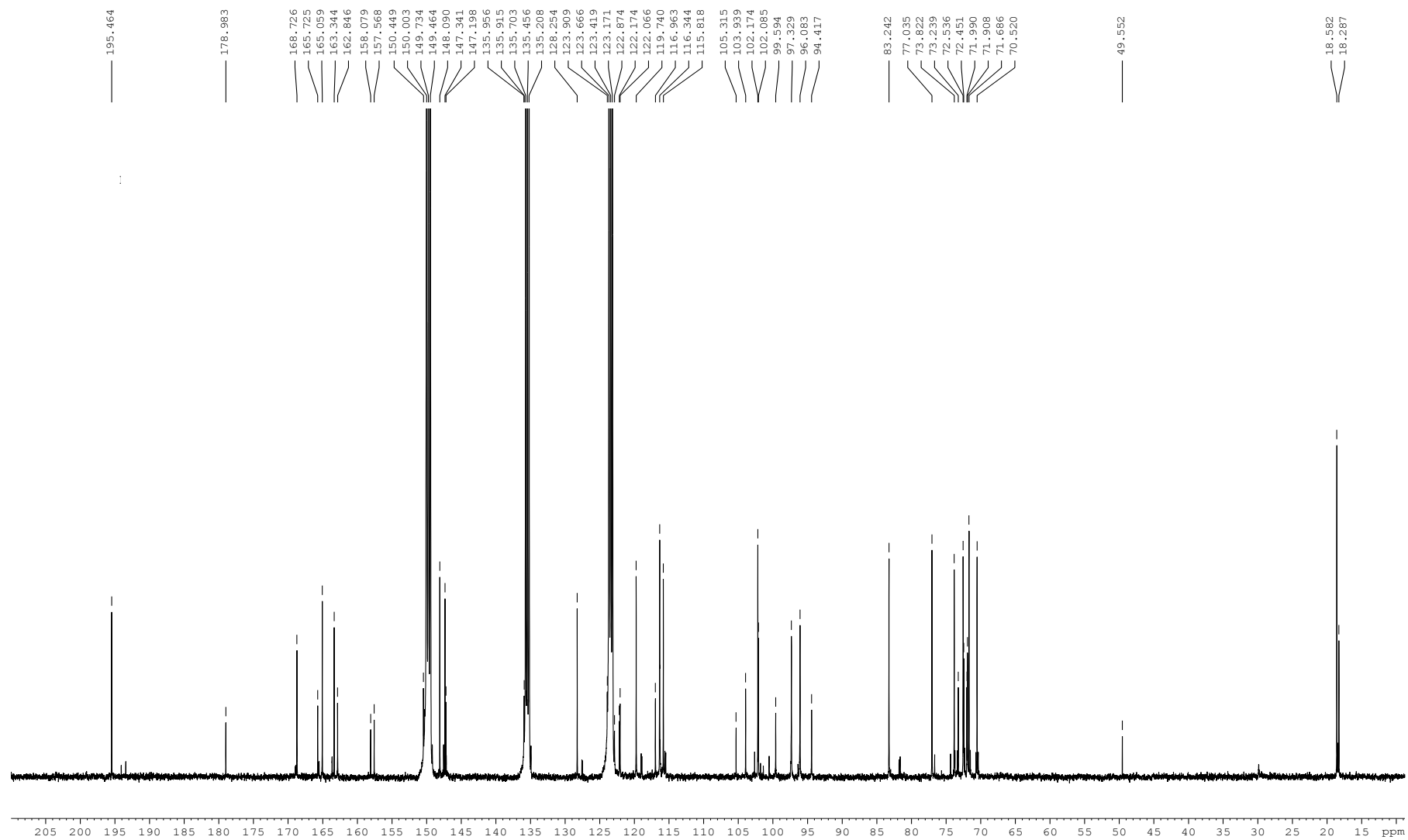


Figure 60 : Spectre RMN- ^{13}C du composé M ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 100MHz)

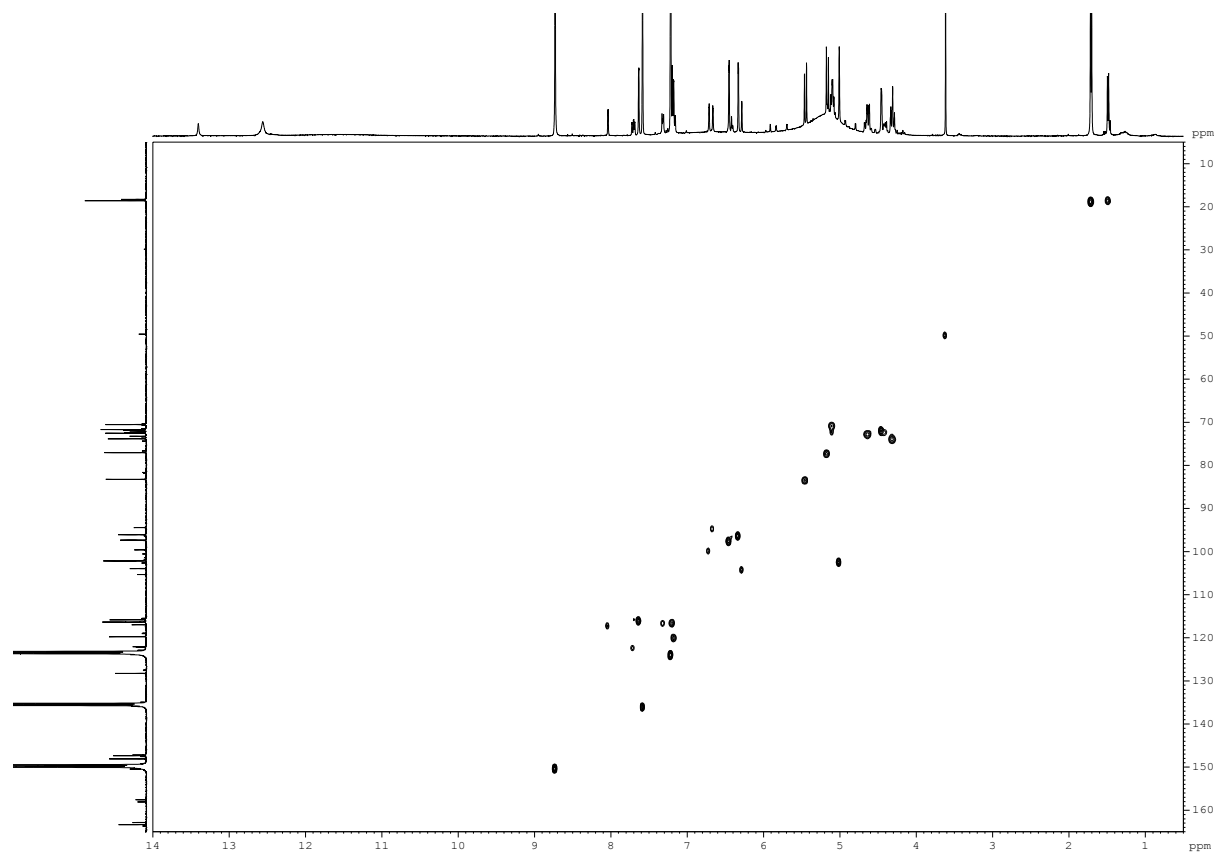


Figure 61 : Spectre HMQC du composé M (400 MHz, C₅D₅N)

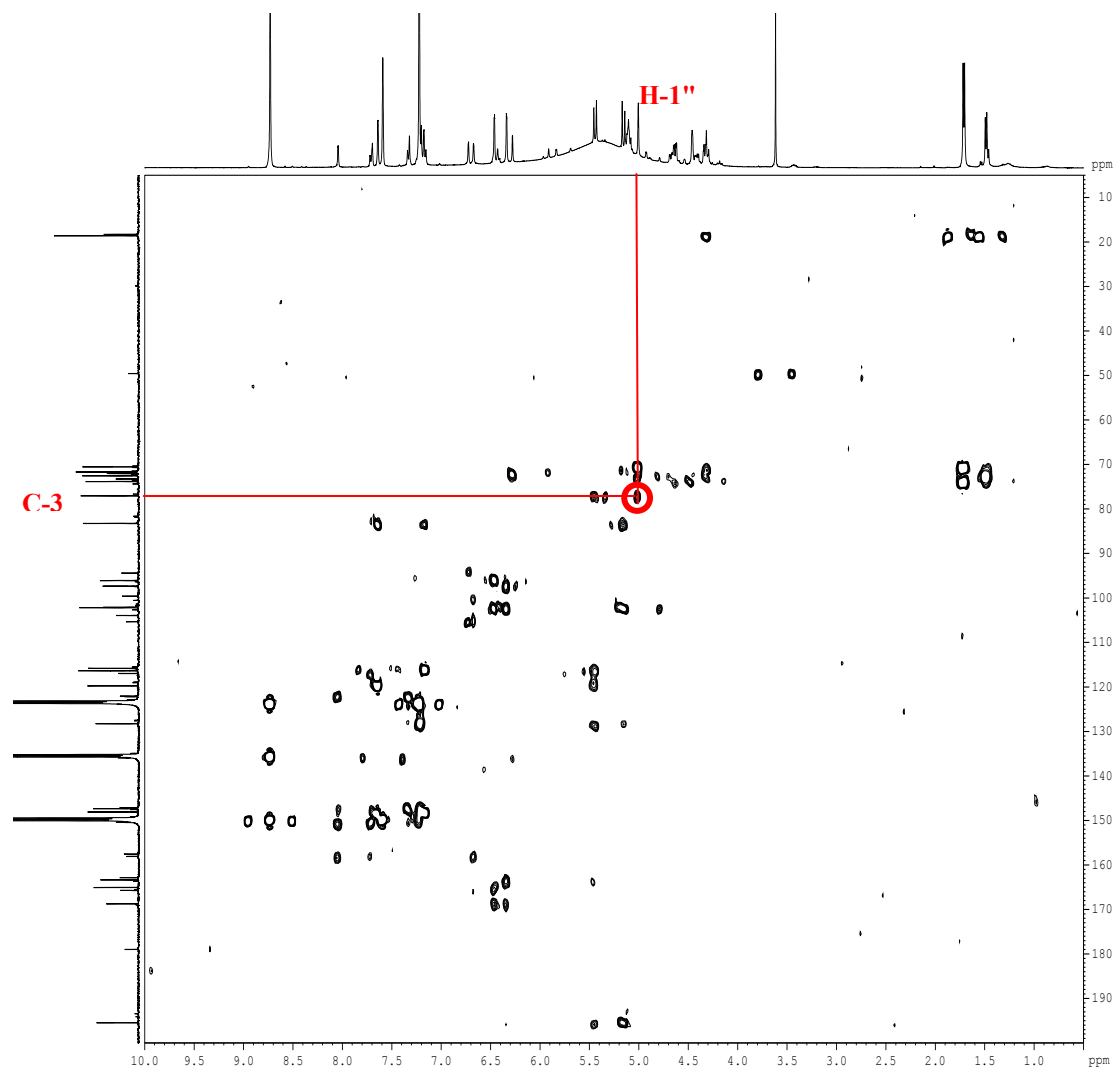


Figure 62 : Spectre HMBC du composé M (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

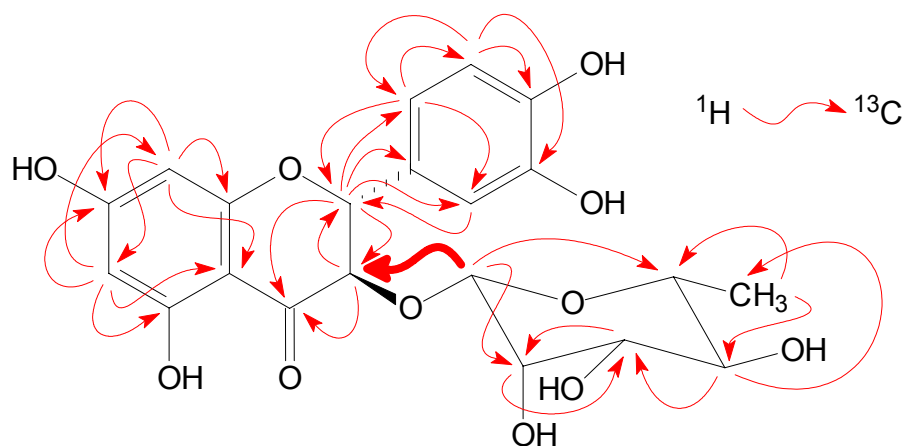


Figure 63 : Corrélations ^1H - ^{13}C observées sur le spectre HMBC du composé M

3.5.2. Données spectrales

♦ α_D^{25} (MeOH) : -44°

♦ UV : λ_{max} (nm) (MeOH) : 291 (log ϵ 3,30), 325 (log ϵ 3,20)

♦ SM (en mode electrospray-Z-spray) m/z: 473[M+Na] $^+$, 451[M+H] $^+$, 303[M-Rha-H] $^+$

♦ RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 400 MHz, TMS)

δ (ppm)	Multiplicité (J en Hz)	Position
5,45	d (10,4)	H-2
5,16	d (10,4)	H-3
6,32	d (2,0)	H-6
6,44	d (2,0)	H-8
7,62	d (1,6)	H-2'
7,20	dd (1,6 ; 8,0)	H-5'
7,18	d (8,0)	H-6'
5,00	s large	H-1''
4,45	d large (3,1)	H-2''
4,62	dd (9,2 ; 3,1)	H-3''
4,30	t (9,2)	H-4''
5,10	dq (9,2 ; 6,4)	H-5''
1,70	d (6,4)	H-6''

♦ RMN ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 100 MHz, TMS)

δ (ppm)	Position	δ (ppm)	Position
82,2	C-2	147,3	C-3'
77,0	C-3	148,0	C-4'
195,4	C-4	115,8	C-5'
165,7	C-5	119,7	C-6'
97,3	C-6	102,1*	C-1''
168,7	C-7	71,7	C-2''
96,1	C-8	72,5	C-3''
102,0*	C-9	73,8	C-4''
165,0	C-10	70,5	C-5''
128,2	C-1'	18,6	C-6''
116,3	C-2'		

* signaux pouvant être échangés.

3.6. Activité antibactérienne de l'astilbine purifiée

Afin de vérifier et confirmer l'activité antibactérienne de l'astilbine isolée d'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis*, nous l'avons soumis à un test antibactérien, par bioautographie, contre les souches bactériennes de la microflore cutanée les plus incriminées dans les infections nosocomiales : *Acinetobacter sp.*, *Micrococcus luteus*, *Moraxella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus epidermidis*.

Le chloramphénicol a été utilisé comme témoin négatif.

3.6.1. Résultats et discussion

Les résultats des tests antibactériens réalisés sur l'astilbine sont présentés dans le tableau XXVII (page suivante), ils sont exprimés en quantité minimale inhibitrice (QMI).

Tableau XXVII : Spectre d'activité antibactérienne de l'astilbine isolée des feuilles d'*Harungana madagascariensis*.

Souches bactériennes	QMI (µg)		
	Témoin positif	Chloramphénicol	Astilbine
<i>Acinetobacter sp.</i>	+++	5	50
<i>Micrococcus luteus</i>	+++	1	25
<i>Moraxella sp.</i>	+++	10	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+++	10	75
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+++	10	50

Les résultats obtenus, variant de 25 à 75 µg, confirment l'effet inhibiteur de l'astilbine contre la croissance bactérienne. Cette activité antibactérienne de l'astilbine (flavanone) pourrait être due à sa structure chimique. En effet, plusieurs auteurs ont établi la relation existante entre l'activité antimicrobienne et la structure des flavonoides (Tsuchiya et al., 1996 ; Chacha et al., 2005). Pour les flavanones, Chacha et al. (2005) ont montré que la présence des groupements hydroxyles en position 3' et 4' est essentielle à leur activité antimicrobienne, tout comme ceux en position 5 et 7 selon Tsuchiya et al. (1996).

3.6.2. Conclusion

Ainsi l'activité antimicrobienne de l'astilbine serait due à la présence dans sa structure chimique des groupements hydroxyles en positions 3', 4', 5 et 7 (Figure 57 page 144).

CHAPITRE VII

POTENTIALISATION *IN VITRO* DE

L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

DES EXTRAITS DE FEUILLES

D'*HARUNGANA*

***MADAGASCARIENSIS* A L'AIDE DE**

NANOSPHERES DE PLGA

1. **EXTRAIT ETHANOLIQUE (EEFHM)**
2. **EXTRAIT À L'ACETATE D'ETHYLE (EAFHM)**
3. **NANOSPHERES D'EEFHM ET D'EAFHM : ETUDE COMPARATIVE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE**

INTRODUCTION

La pharmacie galénique moderne développe des systèmes colloïdaux d'administration de principe actif, susceptibles de promouvoir le passage transmembranaire et/ou intracellulaire tout en le protégeant d'une trop rapide dégradation. En effet, aucun médicament ne peut exercer une activité thérapeutique si la molécule biologiquement active qu'il renferme n'est pas capable de franchir les barrières biologiques qui séparent le site d'administration du site d'action. Des nanoparticules susceptibles de protéger les molécules actives auxquelles elles sont associées, et d'assurer leur transport jusqu'à leur cible biologique, ont été réalisées avec des extraits de feuilles d'*Harungana madagascariensis*. D'abord l'extrait éthanolique (EEFHM) en raison de son important rendement d'extraction (22,4%) qui permet de réaliser l'étude sans faire l'économie du principe actif, ensuite l'extrait à l'acétate d'éthyle (EAFHM) de faible rendement d'extraction (2,6%). Le but principal de cette étude étant de chercher à potentialiser l'effet antibactérien des extraits éthanolique et à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* par leur inclusion dans des nanoparticules (NP) d'acide poly (d, l-lactide-co-glycolide) (PLGA). Les nanoparticules, nanosphères (NS) dans notre étude, ont été fabriquées par la technique de nanoprécipitation décrite par Fessi et al. (1986), puis caractérisées par spectroscopie par corrélation de photons à l'aide d'un granulomètre laser Malvern et par microscopie électronique à balayage de type JEOL JSM 5600. Nous avons également déterminé leur charge de surface (potentiel zêta) par des mesures électrophorétiques. Une analyse chimique qualitative des NS d'EEFHM et d'EAFHM a également été réalisée par chromatographie couche mince (CCM). Ensuite, dans un premier temps nous avons réalisé des études comparatives de l'activité antibactérienne, *in vitro* et *ex vivo*, de l'EEFHM libre et de NS d'EEFHM sur *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus* et *Moraxella sp.* Ces bactéries ont été choisies d'une part en raison des CMI élevées que nous avons obtenues lors des premiers essais (tests antimicrobiens) réalisés avec l'EEFHM libre et d'autre part, à cause de leur implication fréquente dans les infections nosocomiales.

Dans un deuxième temps, nous avons vérifié la potentialisation de l'activité antibactérienne par les NS d'EAFHM par comparaison de leur bactéricidie à celle d'EAFHM non associé aux NS vis-à-vis des bactéries de la plaque dentaire largement impliquées dans l'apparition des caries dentaires. Enfin une comparaison des activités bactéricides des NS d'EEFHM et d'EAFHM vis-à-vis des souches de *Streptococcus mutans*, bactérie ayant une grande influence dans l'apparition des caries dentaires, a été réalisée.

1. POTENTIALISATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE D'EXTRAIT ETHANOLIQUE (EEFHM) A L'AIDE DE NANOSPHERES DE PLGA

1.1. Matériel

L'extrait éthanolique des feuilles d'*Harungana madagascariensis* (EEFHM) a été utilisé dans cette étude comme principe actif (voir chapitre sur la préparation des différents extraits, page 103). A côté de cet extrait végétal les composés suivants ont été mis en œuvre pour la fabrication des nanosphères :

- un polymère : le PLGA (85 :15), qui joue le rôle de matrice protectrice de l'EEFHM ;
- un phospholipide : la lécithine (Emulmetik® 900) dont le rôle, en raison de son affinité avec les membranes des bactéries (Jones et al., 1997), est de renforcer la bioadhésion des nanosphères (NS) sur les bactéries ;
- un tensioactif hydrophile : le polysorbate 80 (Tween® 80) dont le rôle est de stabiliser la formulation ;
- un solvant organique miscible à l'eau : l'acétone qui permet de solubiliser les composés hydrophobes de la formule (polymère, EEFHM, phospholipide) ;
- l'eau distillée utile pour la mise en suspension des NS.

Les bactéries utilisées sont présentées dans le tableau XXVIII et proviennent de la collection de l'Institut Pasteur de Paris (CIP) et du département de Microbiologie de l'université de Leeds (H).

Tableau XXVIII : Souches bactériennes utilisées

Bactéries	Références	Références internationales
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (Gram ⁺)	CIP 55.109	NCTC 98.55
<i>Micrococcus luteus</i> (Gram ⁺)	CIP 53.45	ATCC 93.45
<i>Moraxella sp.</i> (Gram ⁻)	H7SV1	

NCTC : National Collection of Type Culture London

ATCC : American Type Culture Collection

Deux milieux de culture, (gélases nutritives solide et liquide de Sabouraud), dont les compositions sont données dans les tableaux XIV et XVII (pages 107 et 110) sont utilisés dans cette étude.

1.2. Méthodes

1.2.1. Fabrication des nanosphères de PLGA chargées d'EEFHM

Les NS de PLGA chargées d'EEFHM ont été préparées selon la technique par précipitation mise au point par Fessi et al. (1986).

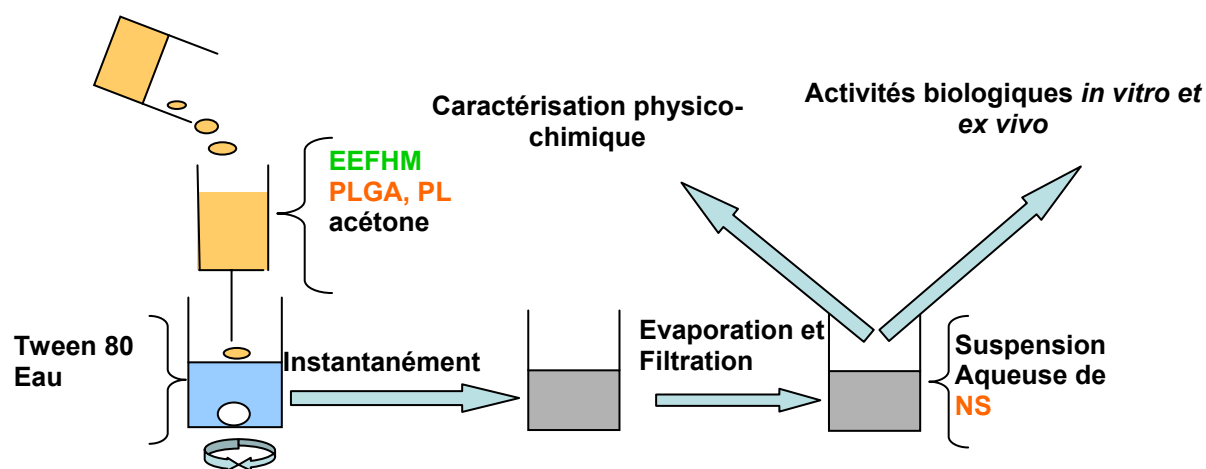
Deux phases, dont les compositions sont données dans le tableau XXIX, ont été constituées dans 2 béchers en verre :

Tableau XXIX : Composition des deux phases nécessaires à la préparation des nanosphères d'EEFHM.

Phase organique	Phase aqueuse
200 mg de PLGA (85 :15)	50 ml d'eau distillée
100 mg d'Emulmetik® 900 (Phospholipide, PL)	75 mg de Tween® 80 (Tw 80)
25 ml d'acétone	
50 mg (pour les NS concentrées à 1000 µg/ml)	
25 mg (pour les NS concentrées à 500 µg/ml)	

Les deux phases ont été séparément mises sous agitation magnétique, à 40°C pour la phase organique et à la température du laboratoire pour la phase aqueuse, jusqu'à homogénéisation complète. Puis la phase organique a été versée dans la phase aqueuse, sous agitation magnétique forte pendant 20 min (Figure 64). La suspension laiteuse obtenue, renfermant les nanosphères qui se sont formées instantanément, a été concentrée à 10 ml au rotavapor de BUCCHI puis filtrée sur verre fritté et conservée à 4°C jusqu'à utilisation.

NANOPRECIPITATION (Fessi et al., 1986)



Agitation magnétique forte (20 min)

Figure 64 : Formation des nanosphères d'EEFHM par précipitation.

1.2.2. Caractérisation physico-chimique des NS

1.2.2.1. Taille et indice de polydispersité (IP)

La taille moyenne des NS d'EEFHM et l'indice de polydispersité ont été mesurés par spectroscopie par corrélation de photons à l'aide d'un granulomètre laser Malvern Zetamaster S équipé d'une diode de 4 mW (longueur d'onde = 670 nm, indice de réfraction de la phase dispersante (eau) = 1,33), la température d'expérimentation a été fixée à 20°C. L'angle de détection de la lumière est de 90°. 10 µl de la suspension des NS, dilués dans 1 ml d'eau distillée, et introduits dans une cuve porte échantillon ont été nécessaires pour effectuer nos analyses. L'expérience, d'une durée de 30 s, a été répétée à 3 reprises, les moyennes de la taille des particules et de leur distribution (indice de polydispersité) ont été calculées.

1.2.2.2. Charge de surface ou potentiel zêta des NS d'EEFHM

Le potentiel zêta des NS d'EEFHM, qui est la charge globale que celles-ci acquièrent dans le milieu liquide dans lequel elles sont plongées, a été mesuré à l'aide d'un Zetamaster S Malvern utilisant la spectroscopie par corrélation de photons et des mesures électrophorétiques (constante diélectrique d'échantillon = 79 ; champ de la cellule électrophorétique = 28 Vcm⁻¹). 50 µl de la suspension des NS d'EEFHM, dilués dans 5 ml

d'eau distillée, ont été injectés dans la cellule d'électrophorèse. Et les valeurs du potentiel zêta ont été mesurées.

1.2.2.3. Observation microscopique des NS d'EEFHM

Le microscope électronique à balayage (MEB) de type JEOL JSM 5600 a été utilisé pour observer la morphologie des nanosphères d'EEFHM. 10 µl de la suspension des NS d'EEFHM mis dans un flacon et dilués dans 1 ml d'eau distillée ont été placés, pendant 5 min, dans une cuve à ultrasons SHE-5000C (LABO-MODERNE, France) afin d'obtenir une meilleure individualisation des particules. Une goutte de la suspension a été par la suite déposée sur un film de carbone puis séchée à la température du laboratoire à l'abri de la poussière avant d'être recouverte d'une fine couche d'or. L'échantillon a alors été introduit dans l'appareil où sa surface a été balayée par un faisceau monocinétique d'électrons.

1.2.2.4. Rendement "d'encapsulation" ou quantité d'EEFHM associée aux NS

Le rendement "d'encapsulation" des NS d'EEFHM a été calculé en utilisant la méthode modifiée de Gröning et al. (2003). 10 ml des NS chargées d'EEFHM ont été filtrés sur verre fritté (porosité : 9-15 µm, ces pores permettent le passage des NS à travers le filtre), le résidu retenu par le filtre contenant l'EEFHM non associé aux NS, a été récupéré. Il a été séché, pesé et sa masse notée. Le rendement d'encapsulation (Rdt) a été calculé de la manière suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{Q_{\text{initiale EEFHM}} - Q_{\text{EEFHM non associée aux NS}}}{Q_{\text{initiale EEFHM}}} \times 100$$

Q = quantité exprimée en g

1.2.2.5. Analyse chimique qualitative des NS d'EEFHM

L'analyse chimique qualitative des NS d'EEFHM a consisté à identifier par chromatographie couche mince (CCM) les fractions d'EEFHM présentes dans les nanosphères. La suspension des NS obtenue après filtration sur verre fritté a été ultrafiltrée, à l'aide d'ultrafiltres de type ultrafree MC (Millipore, Bradford, USA), par centrifugation (14000 tr/min) pendant 30 min. Les NS séparées de la phase aqueuse ont été récupérées sur la membrane du filtre puis traitées au dichlorométhane de manière à solubiliser le polymère. Des dépôts, de l'extrait éthanolique d'HM (référence), du résidu (récupéré sur le verre fritté et solubilisé dans le dichlorométhane) et de la solution dichlorométhanique de NS, ont été réalisés sur plaque de CCM silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Germany). Le système chloroforme : n-propanol :

acide formique : eau (15 :10 :3 :1 v/v) a été utilisé comme phase mobile et la révélation faite sous UV à 254 nm.

1.2.3. Etude *in vitro* de l'activité antibactérienne des NS d'EEFHM

1.2.3.1. Préparation de l'inoculum bactérien

Les colonies bactériennes de 24 h d'âge ont été mises en suspension dans 5 ml d'eau distillée stérile. Après une agitation au Vortex, la concentration bactérienne de la suspension est déterminée par spectrophotométrie à 600 nm par mesure de la densité optique (DO). Celle-ci est ajustée à 1, ce qui correspond à 10^7 UFC/ml selon Rahalison et al. (1994).

1.2.3.2. Technique proprement dite

L'activité antibactérienne des NS d'EEFHM a été comparée à celle de l'extrait de HM pur *in vitro* en utilisant la technique de dilution en milieu liquide décrite dans le chapitre III (page 68).

La technique consiste à réaliser des dilutions successives à partir d'une solution ou d'une suspension mère. 1 ml de la suspension de NS, ou de la solution éthanolique d'EEFHM (éthanol à 99%), est introduit dans des tubes à essai contenant 3 ml de gélose liquide de Sabouraud. Le mélange obtenu est homogénéisé par agitation douce au Vortex puis infesté par 1 ml d'une suspension de bactéries (10^7 UFC/ml) préparée à partir de colonies âgées de 24 h. Les concentrations finales d'EEFHM dans chaque tube à essai sont de 500 µg/ml et 1000 µg/ml pour la solution d'EEFHM et la suspension de NS, et de 2×10^6 UFC/ml pour la suspension de bactéries. Des témoins contenant la même quantité d'éthanol que celle utilisée dans la solution d'EEFHM et des témoins de NS blanches (non chargées d'EEFHM) ont été réalisés. Les tubes ont été enfin incubés à l'étuve à 37°C pendant 24, 48 et 72 h.

1.2.3.3. Lecture des résultats

Elle a été réalisée par la méthode de dénombrement des colonies. Après chaque temps d'incubation, un prélèvement d'1 µl du contenu de chaque tube est effectué puis dilué au 1/1000 et réensemencé sur de la gélose nutritive solide de Sabouraud, coulée dans des boîtes de Petri. Après 24 h d'incubation à 37°C, les colonies sont comptées et leur nombre multiplié par le facteur de dilution (10^3) est noté.

1.2.4. Etude *ex-vivo* de l'activité antibactérienne des NS d'EEFHM

Harungana madagascariensis étant une plante utilisée en médecine traditionnelle africaine contre les dermatoses cutanées, il nous a semblé intéressant en plus des tests *in vitro*, de réaliser une étude *ex vivo*. En effet, cette dernière à la différence d'étude *in vitro*, présente l'avantage d'être faite dans des conditions physiologiques approchant celles de l'organisme

humain. Cette étude a été réalisée en utilisant la technique décrite par Messenger et al. (2001) et Lboutounne et al. (2002).

1.2.4.1. Préparation des fragments de peau humaine utilisés

Les fragments de peau utilisés proviennent d'abdominoplasties pratiquées chez des sujets de sexe féminin. Les échantillons sont congelés à -18°C immédiatement après l'intervention. La veille de l'expérimentation, ils sont placés sur une feuille d'aluminium et mis à décongeler à la température de 4°C , et moins d'une heure avant l'expérimentation, la partie grasseuse de l'hypoderme est retirée soigneusement à l'aide de ciseaux courbes et de pinces à griffes.

1.2.4.2. Utilisation de la cellule de FRANZ

Elle a servi pour étudier l'activité antibactérienne *ex vivo* des NS d'EFHM. C'est une cellule en verre constituée de deux parties (maintenues en contact par une pince à vis), entre lesquelles sont placés le fragment de peau et un joint torique qui assure l'étanchéité. Le volume de la cellule de FRANZ est de 10 ml et sa surface de $3,14\text{ cm}^2$ (Figure 65).

La cellule de Franz a été adaptée à cette étude pour assurer, de manière aisée, l'hydratation des fragments de peau.

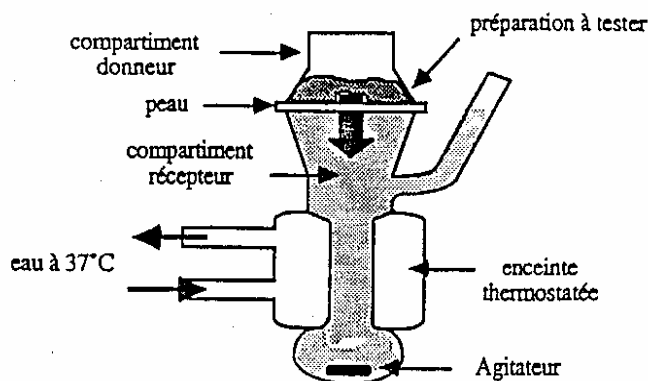


Figure 65 : Cellule de FRANZ (Franz, 1975)

1.2.4.3. Technique proprement dite

Le principe de la technique consiste dans un premier temps à fixer le fragment de peau dégraisée sur la cellule de Franz ($S = 2,54\text{ cm}^2$). Le stratum corneum (SC) étant orienté vers le compartiment donneur ouvert et exposé à la température ambiante, le derme vers le compartiment récepteur contenant 10 ml d'une solution saline, qui évite la déshydratation de la peau tout au long de l'expérimentation (représente le liquide interstitiel de la peau), agitée

par un barreau magnétique et dont la température est maintenue à 37°C par un bain marie. Dans un deuxième temps 200 µl de suspension de NS ou de solution d'EFHM, de concentrations connues (500 et 1000 µg/ml), sont appliqués sur le SC pendant 5 min. Ensuite l'excès de la préparation est enlevé avec une seringue et une première contamination artificielle, d'une durée de 4 h, est effectuée en appliquant 200 µl d'une suspension de *Staphylococcus epidermidis* (2X10⁶ UFC/ml) sur le SC. Au terme des 4 h de contact entre le SC traité et la suspension bactérienne, 100 µl sont prélevés puis dilués au 1/1000 avec de l'eau distillée stérile avant d'être ensemencés sur de la gélose nutritive solide de Sabouraud. L'excès de la 1^{ère} contamination étant enlevé, une seconde contamination de 4 h est effectuée, par application de 200 µl de la même suspension bactérienne, sur le SC. Après prélèvement et ensemencement dans les mêmes conditions que précédemment une troisième contamination d'une durée de 4 h est réalisée. Au terme de celle-ci, 100 µl de la suspension bactérienne sont prélevés, dilués et ensemencés. Et, une fois l'excès enlevé, le SC est appliqué pendant 1 min contre de la gélose nutritive solide de Sabouraud préalablement coulée dans des boîtes de Petri. Les boîtes ensemencées sont ensuite mises à l'étuve à 37°C pendant 24 h.

La lecture des résultats est effectuée par dénombrement des colonies bactériennes comme dans l'étude *in vitro*. Les étapes principales de la technique sont résumées dans le schéma ci-dessous (Figure 66).

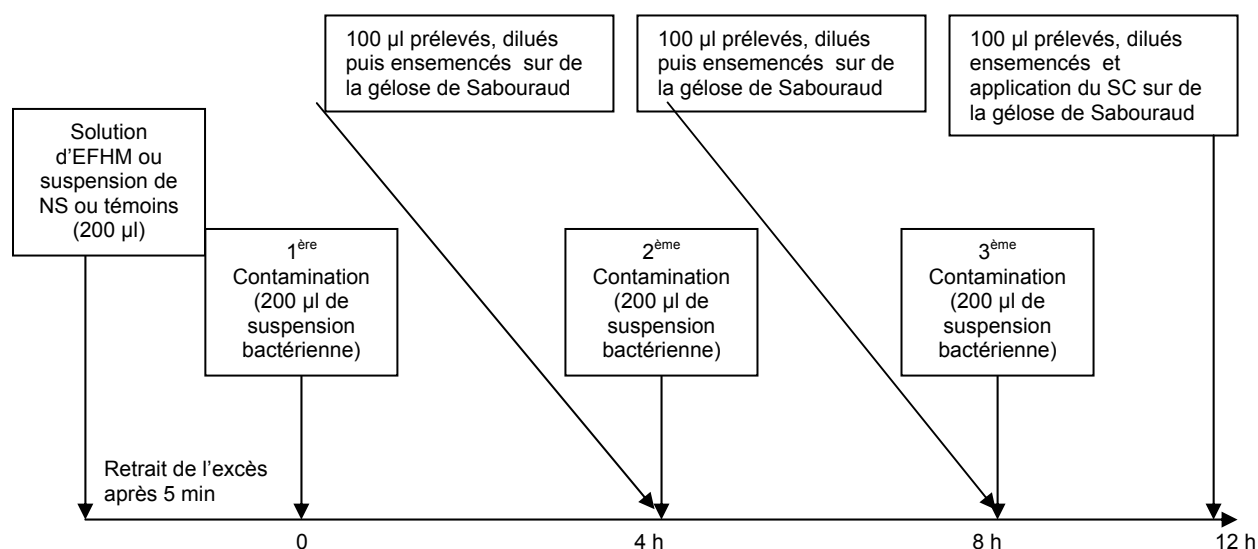


Figure 66 : Schéma résumant les principales étapes de l'étude antibactérienne *ex vivo*.

1.3. Résultats

Nous rapportons ici les résultats de la caractérisation physico-chimique des NS d'EEFHM, ainsi que ceux des études *in vitro* et *ex-vivo* qui sont présentés sous forme de tableaux et

figures. Ils sont exprimés en moyenne $\pm$ écart type. Le test de Student (test t) utilisant l'analyse de la variance (ANOVA), a été choisi pour l'interprétation statistique des résultats obtenus.

1.3.1. Caractérisation physico-chimique de nanosphères d'EEFHM

1.3.1.1. Détermination de la taille, du potentiel zêta, de l'indice de polydispersité et du rendement "d'encapsulation".

Tableau XXX: Taille, potentiel zêta, indice de polydispersité et rendement "d'encapsulation" de nanosphères de PLGA.

Concentration en EEFHM de NS ($\mu\text{g/ml}$)	Taille (nm)	Potentiel zêta (mV)	Indice de Polydispersité (IP)	Rendement d'encapsulation (%)
1000	$298,0 \pm 26,2$	$-31,9 \pm 0,9$	$0,22 \pm 0,05$	$82 \pm 2,65$
500	$255,0 \pm 31,1^{\dagger}$	$-31,1 \pm 0,4$	$0,20 \pm 0,07$	$75 \pm 5,00$
0	$184,7 \pm 23,7^{\ddagger}$	$-30,0 \pm 1,0$	$0,19 \pm 0,02$	-

† $p < 0,05$ par comparaison avec les NS concentrées à 500 $\mu\text{g/ml}$ d'une part et à 1000 $\mu\text{g/ml}$ d'autre part (test de Student).

‡ $p > 0,05$ par comparaison avec les NS concentrées à 1000 $\mu\text{g/ml}$ (test de Student).

A l'analyse de ce tableau, on constate que la taille des particules augmente avec la concentration des NS en EEFHM. Cette augmentation de taille est particulièrement significative lorsque l'on compare la taille des NS chargées à celle des non chargées ($p < 0,05$).

L'indice de polydispersité par contre varie de manière non significative, que les particules soient chargées ou non d'EEFHM ($p > 0,05$). La distribution de la taille des particules est dans ce cas identique pour les trois formulations.

Les valeurs du potentiel zêta des particules sont quasiment identiques pour toutes les formulations et sont toutes chargées négativement.

On constate également que le rendement "d'encapsulation" est fonction de la concentration des NS en EEFHM, plus la concentration est élevée, meilleur est le rendement d'encapsulation.

1.3.1.2. Observation de nanosphères par microscopie électronique à balayage

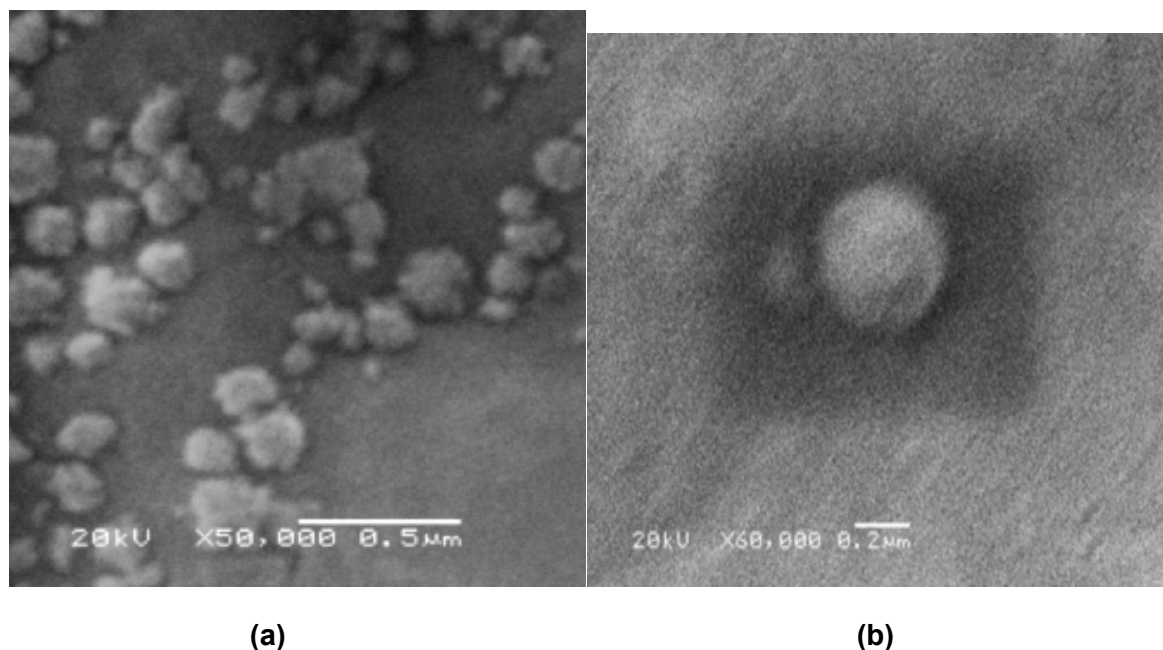


Figure 67: Observation par le MEB de la morphologie des nanosphères de PLGA chargées d'EEFHM G X50000 (a) et G X60000 (b).

Les Figures ci-dessus (67a et 67b) obtenues avec le microscope électronique à balayage (MEB) montrent la structure plus ou moins globulaire des particules.

1.3.1.3. Analyse chimique qualitative des nanosphères d'EEFHM par CCM

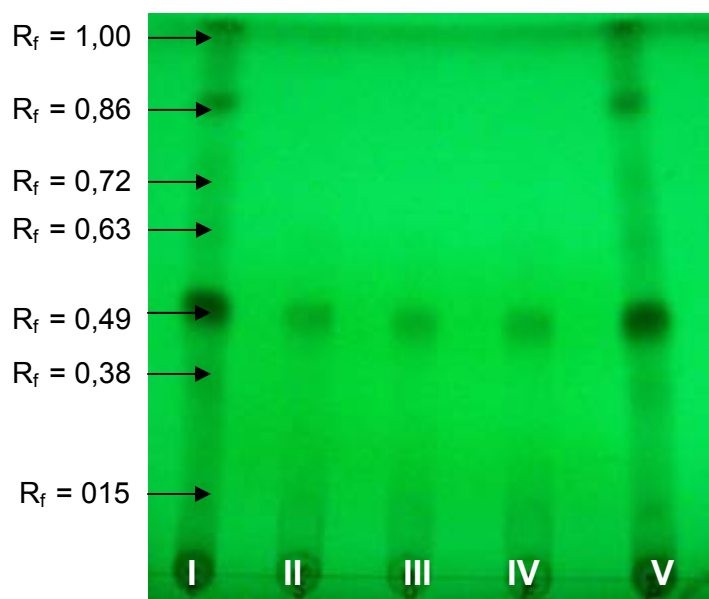


Figure 68 : CCM d'EEFHM (I), du résidu (V) et de nanosphères d'EEFHM (II, III, IV) à 254 nm.

On constate que les chromatogrammes des dépôts I et V qui correspondent respectivement à l'EEFHM (extrait éthanolique des feuilles d'*Harungana madagascariensis*, utilisé comme référence) et au résidu récupéré sur le verre fritté (extrait non associé à la suspension des NS), sont identiques, mais différent de celui des nanosphères (dépôts II, III et IV). Les composés chimiques dont les valeurs de R_f sont supérieures à 0,49 sont absents des nanosphères, alors qu'on les retrouve dans l'EEFHM et le résidu.

Il convient de noter que le composé majoritaire de R_f 0,49 présent dans les nanosphères d'EEFHM est également, de façon majoritaire, présent dans l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* (EAFHM). En effet, des analyses chimiques qualitatives par CCM réalisées sur les extraits éthanolique et à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* ont confirmé qu'il s'agit du même et unique composé, caractérisé précédemment : l'astilbine (partie chimique, page 144).

1.3.2. Activité antibactérienne *in vitro*

Tableau XXXI : Etude comparative *in vitro* de l'activité antibactérienne d'EEFHM libre et d'EEFHM associé aux NS à 500 et 1000 µg/ml après 24 h, 48 h et 72 h d'incubation à 37°C dans le milieu de culture liquide.

Formulations	Croissance bactérienne en 10 ³ UFC/ml								
	<i>S. epidermidis</i> (Gram ⁺)			<i>M. luteus</i> (Gram ⁺)			<i>Moraxella</i> sp. (Gram ⁻)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Témoin	18,4±3,4	24,8±7	26,41±4,7	38,4±10	42,8±5,4	42,4±4,45	34±8,43	66,2±7,2	62,16±12
Témoin alcool	20,6±3,7	23,2±4,34	27,56±5,7	36±7,85	42±4,53	40,91±3,9	35±9,18	64,4±3,4	63,5±4,5
EEFHM 500 µg/ml	8,6±1,83	9,4±4,54	10,29±0,9	7,2±1,1	7,4±3,3	9,3±6,61	6,8±1,51	7,8±2,07	7,55±2,9
EEFHM 1000 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NS non chargées	18,4±1,83	20,8±3,62	21,38±2,8	26,8±6	29,37±18	34,87±9	21±0,1	28,4±3,9	28,2±3,6
NS d'EEFHM 500 µg/ml	0,41±0,24	0,3±0,18	0	0	0	0	0	0	0
NS d'EEFHM 1000 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Quatre observations peuvent être faites à l'analyse de ces résultats :

- les milieux de culture utilisés couvrent, dans les conditions expérimentales de notre étude, les besoins nutritifs des bactéries. En effet, on note une croissance normale des bactéries dans les tubes témoins, ce fait confirme l'absence d'activité antibactérienne des composants utilisés dans la fabrication des NS non chargées (polymère, tensioactif et phospholipide) ;

- les bactéries testées sont sensibles à l'EEFHM libre et aux NS d'EEFHM à 1000 µg/ml. La croissance bactérienne reste nulle, à cette concentration, quelque soit la durée d'incubation ;

- après 72 h d'incubation, les bactéries testées demeurent très sensibles aux NS d'EFHM à 500 µg/ml et de moins en moins sensibles à l'EEFHM libre ;

- enfin l'activité antibactérienne des NS est d'autant meilleure que la durée d'incubation est importante.

1.3.3. Activité antibactérienne ex vivo

Tableau XXXII : Etude comparative ex vivo de l'activité antibactérienne d'EEFHM libre et d'EEFHM associé aux NS à 500 µg/ml sur *S. epidermidis*.

Contaminations Artificielles (CA)	Formulations			
	Témoin éthanol	EEFHM (500 µg/ml)	NS non chargées	NS d'EEFHM (500 µg/ml)
	Colonies de <i>S. epidermidis</i> (Gram ⁺) ayant survécues en 10 ³ UFC/ml			
Première (4 heures)	393,3 ± 32,1	290 ± 10	390 ± 20	66,3 ± 12,7
Deuxième (8 heures)	398 ± 28,8	326,6 ± 15,3	393,3 ± 25,2	160,3 ± 26,3
Troisième (12 heures)	393,7 ± 34	383,3 ± 15,3	393,3 ± 25,2	279 ± 29,5

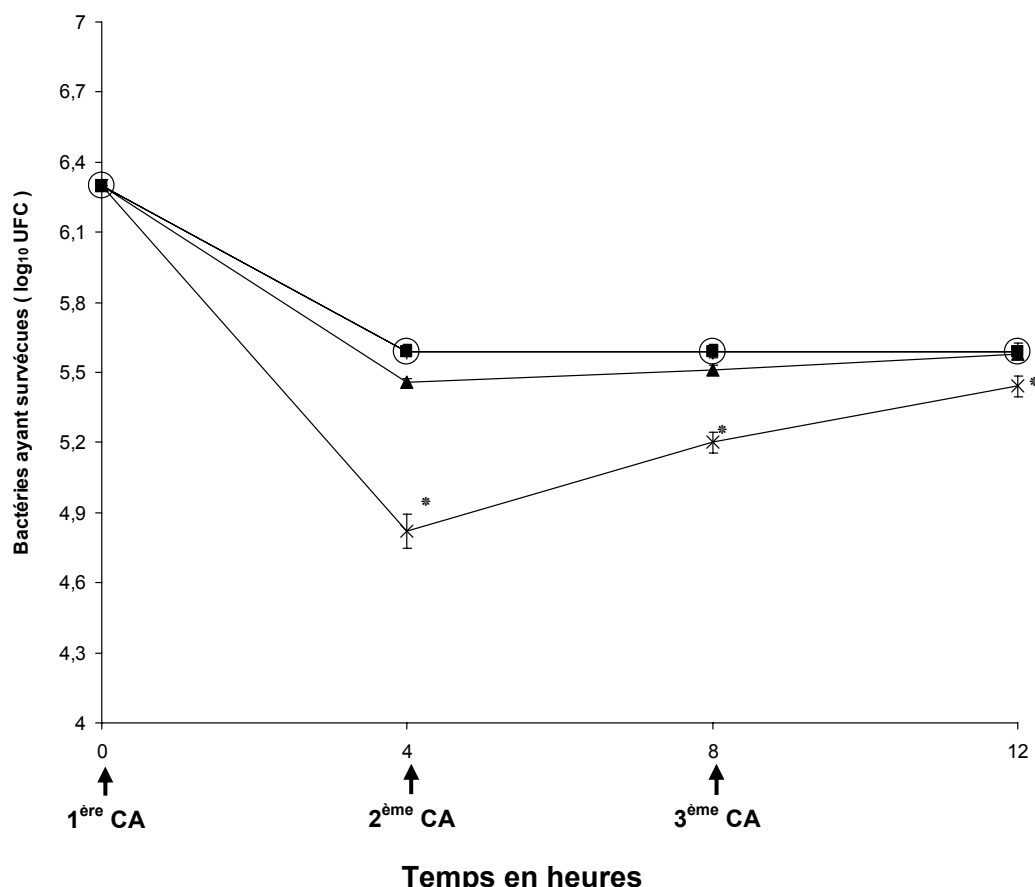


Figure 69: Courbe de survie de *Staphylococcus epidermidis*, exprimée en $\log_{10}$ UFC, après traitement à l'EEFHM libre (500 $\mu\text{g/ml}$) (▲), aux NS d'EEFHM (500 $\mu\text{g/ml}$) (×), au témoin éthanol (○), aux NS non chargées (■), *p < 0,05 (comparaison avec EEFHM et NS blanches).

Les résultats des tests *ex vivo* présentés dans le tableau XXXII et la Figure 69 montrent une baisse considérable du nombre de colonies de *Staphylococcus epidermidis*, sur les fragments de peau préalablement traités par les NS d'EEFHM, après 4 h de contamination artificielle. Ce nombre croît ensuite, à chaque fois que la contamination artificielle est renouvelée mais reste statistiquement significativement différent de celui obtenu avec l'EEFHM libre ou avec les témoins (Ethanol et NS non chargées) (p < 0,05).

1.4. Discussion

Dans cette étude, nous avons préparé des nanosphères de PLGA chargées d'extrait éthanolique de feuilles d'*Harungana madagascariensis* (EEFHM) puis réalisé leur caractérisation physico-chimique. Ensuite les activités antibactériennes *in vitro* et *ex vivo* de l'EEFHM libre et associé aux nanosphères ont été testées.

Au niveau de la caractérisation physico-chimique de nanoparticules (Tableau XXX), on observe que leur taille augmente avec la quantité d'EEFHM. En effet, la quantité d'EEFHM qui s'associe aux nanoparticules (par adsorption, complexation ou dispersion) est d'autant plus grande que sa concentration initiale est élevée.

Les valeurs assez élevées du potentiel zêta, de charges négatives et comprises entre 30 et 31,9 mV, garantissent la bonne stabilité physique des nanosphères d'EEFHM en les empêchant de s'agréger ou de flocculer. En effet, plus le potentiel zêta possède une valeur positive ou négative élevée, meilleur est l'équilibre existant entre les forces répulsives et attractives des particules lorsque celles-ci s'approchent les unes des autres. Lorsque le potentiel zêta est faible, aucune force n'empêche les particules de se rassembler et de flocculer (Verway et al., 1948 ; Hunter, 1988 ; Everett, 1994).

L'indice de polydispersité (IP), qui renseigne sur l'état de la distribution de la taille des particules, présente des valeurs qui sont inférieures ou égales à 0,22 et varie de manière non significative selon que les particules sont chargées ou non d'EEFHM ($p > 0,05$). Ces observations montrent d'une part, que la distribution de la taille des particules d'EEFHM est monodisperse. En effet selon les travaux de Müller et Schuhmann (1996), une distribution est qualifiée de monodisperse lorsque les valeurs de l'IP sont inférieures ou égales à 0,2. D'autre part, que cette distribution est identique pour les nanoparticules chargées et non chargées d'EEFHM.

On note également que le rendement "d'encapsulation" des nanosphères est fonction des quantités d'EEFHM utilisées. Plus la quantité d'EEFHM est importante, meilleur est le rendement "d'encapsulation" et vice versa. Ceci confirme le fait que la taille des particules d'EEFHM soit proportionnelle à la quantité initiale d'extrait mis en oeuvre. Les valeurs de ce rendement "d'encapsulation" sont autour de 75% (500 µg/ml) et 80% (1000 µg/ml), ce qui est très important pour la bioactivité des nanoparticules, car plus élevé est le rendement "d'encapsulation", meilleur est la potentialisation de l'activité antibactérienne.

La figure 62 montre les chromatogrammes de l'EEFHM, du résidu et de nanosphères d'EEFHM obtenus par CCM. Ces résultats indiquent que l'EEFHM et le résidu (I et V) présentent le même profil chromatographique composé de 7 fractions dont les valeurs de R_f sont les suivantes : 0,15 ; 0,38 ; 0,49 ; 0,63 ; 0,72 ; 0,86 et 1. Alors que le profil chromatographique des nanosphères (II, III et IV) ne présente que deux fractions de R_f respectifs 0,15 et 0,49. On peut également constater que les fractions ayant des R_f dont les valeurs sont supérieures à 0,49 sont absentes des nanosphères. Cette différence de profil chromatographique entre l'EEFHM et les nanosphères pourrait être due à la méthode utilisée pour la préparation de ces dernières. Cette méthode met en jeu une phase aqueuse dans laquelle les différents constituants chimiques d'EEFHM absents des nanosphères seraient insolubles ou moins solubles, ce qui entraînerait leur reprécipitation, et expliquerait

par conséquent leur rétention par le verre fritté (porosité : 9-15 μm), et donc leur absence dans la structure des nanosphères. Cette absence pourrait aussi être imputée à un manque d'affinité chimique de ces composés pour la matrice polymérique (PLGA). On note également la présence, aussi bien dans l'extrait que dans les nanoparticules, du composé de Rf 0,49. Ce dernier, présent également dans l'EEFHM (Figure 70), avait été caractérisé dans la partie chimique, et son activité antimicrobienne mise en évidence par bioautographie (page 151), il s'agit de l'astilbine (flavanone).

Au niveau biologique (activités antibactériennes *in vitro* et *ex vivo*), les résultats obtenus avec l'EEFHM associé aux nanoparticules de PLGA sont, de loin, meilleurs que ceux donnés par l'EEFHM libre. Cela peut être expliqué d'une part par le rôle de protection et de réservoir des nanosphères et d'autre part par l'effet de bioadhésion tant sur le stratum corneum que sur les bactéries, dû à la nature du polymère formant les nanoparticules (Bilbruck et al., 1999).

En effet, plusieurs travaux réalisés antérieurement montrent que les vecteurs colloïdaux renforcent la stabilité des substances actives auxquelles ils sont associés en les protégeant contre une dégradation trop rapide. Ainsi Nihant et al. (1995), Kang et Singh (2003), Gröning et al. (2003) ont montré que la stabilité de substances actives associées aux vecteurs colloïdaux est la conséquence des interactions physico-chimiques présentes dans cette association, et qu'elle est due en partie à des mécanismes stériques et électrostatiques (Duro et al., 1999).

Il a été également montré que l'encapsulation de molécules bioactives dans les nanoparticules polymériques contrôlerait et faciliterait leur libération et leur diffusion (Pinto-Alphandary et al., 2000 ; Alvarez-Román et al., 2004).

Outre les mécanismes de protection et de libération des substances actives, la potentialisation et la rémanence de l'activité antibactérienne des nanoparticules d'EEFHM pourraient aussi être dues aux propriétés bioadhésives du PLGA. En effet, l'adhérence des polymères sur les bactéries dépend en grande partie des propriétés de leurs membranes et du caractère hydrophobe du polymère (Bilbruck et al., 1999). Ainsi Freter et al. (1981) ont montré que les particules protégées avec une membrane hydrophobe adhèrent facilement à la membrane bactérienne. Il est aujourd'hui établi que les nanoparticules de PLGA constituent une matrice hydrophobe dans laquelle plusieurs substances actives peuvent être adsorbées ou dispersées. Selon Butler et al. (1999), Capan et al. (1999), Li et al. (2001) ce caractère hydrophobe est essentiellement dû aux groupes carboxylique et ester présents dans la structure du PLGA. De plus, la présence de lécithine (Emulmetik), qui selon Jones et al. (1997) aurait une affinité pour les membranes bactériennes, de la formulation des NS d'EEFHM pourrait améliorer le potentiel bioadhésif. Ainsi, le caractère hydrophobe du PLGA associé à l'action de la lécithine, garantiraient un temps de résidence plus long des

nanoparticules sur les bactéries et au niveau cutané, d'où l'effet thérapeutique meilleur et prolongé constaté, *in vitro* et *ex vivo*, par comparaison avec l'EEFHM non associé aux nanosphères (Tableaux XXXI et XXXII).

Les résultats des tests *in vitro* (Tableaux XXXI) montrent par ailleurs une optimisation de l'activité antibactérienne des nanosphères d'EEFHM en fonction du temps d'incubation. En effet, plus le temps d'incubation est long, meilleure est l'activité des nanosphères d'EEFHM. Ces résultats tendent à démontrer qu'une partie d'EEFHM est présente à la surface des nanosphères (adsorbée ou complexée à la matrice), et libérée très rapidement, alors qu'une autre partie, à l'intérieur des nanoparticules, n'est libérée que progressivement, d'où la potentialisation de l'effet thérapeutique en fonction du temps.

Ce fait, ajouté aux propriétés bioadhésives du PLGA pourrait également expliquer la rémanence de l'activité antibactérienne des nanosphères d'EEFHM sur 12 h constatée *ex vivo* (Figure 63).

1.5. Conclusion

La comparaison de l'efficacité antimicrobienne d'EEFHM libre et encapsulé a été faite *in vitro* contre *S. epidermidis*, *M. luteus* et *Moraxella sp.*, et *ex vivo* sur les fragments de peaux humaines contaminés par une souche de *S. epidermidis*. Ces études biologiques *in vitro* et *ex vivo* ont prouvé notamment que l'encapsulation d'EEFHM augmentait de manière significative l'effet antibactérien, tant du point de vue quantitatif que sur la durée, par rapport à une forme libre d'EEFHM. *Ex vivo* à 4 h et 8h on a une diminution de la croissance bactérienne respectivement de 83 % et 60% par rapport aux témoins.

2. POTENTIALISATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE D'EXTRAIT A L'ACETATE D'ETHYLE (EAFHM) A L'AIDE DE NANOSPHERES DE PLGA

INTRODUCTION

L'étude précédente ayant prouvé la potentialisation de l'effet antibactérien *in vitro* (détermination de l'effet bactériostatique) de l'extrait éthanolique, il nous a semblé intéressant de chercher à savoir si cette potentialisation pouvait s'appliquer à la bactéricidie (détermination des CMB). Nous avons donc appliqué cette recherche à l'extrait à l'acétate

d'éthyle qui comme nous l'avons démontré précédemment possède des propriétés antibactériennes supérieures à celles de l'extrait éthanolique.

2.1. Matériel et méthodes

L'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* (EAFHM) a été utilisé dans cette étude comme principe actif. Les autres composés entrant dans la préparation des nanosphères sont les mêmes que ceux nommés dans la fabrication des nanosphères d'extrait éthanolique (page 155).

Les bactéries utilisées présentées dans le Tableau XVI (voir page 109) sont responsables de la formation de la plaque dentaire et proviennent de la collection de l'Institut Pasteur de Paris (CIP) et du Zahnärzliches Institut de ZÜRICH (OMZ).

2.1.1. Fabrication des nanosphères de PLGA chargées d'EAFHM

Les nanosphères d'EAFHM ont été préparées de la même manière que celles d'EEFHM par utilisation de la technique par précipitation (Fessi et al., 1986) (voir page 157).

2.1.2. Activité bactéricide *in vitro* des nanosphères d'EAFHM

La méthode de dilution en milieu liquide sur microplaque décrite par le NCCLS (1995) a été utilisée, et la viabilité des souches bactériennes a été vérifiée sur milieu solide.

La technique a consisté à préparer une gamme de concentration de la suspension de NS d'EAFHM par dilutions successives de la suspension initiale avec du bouillon nutritif. Les concentrations obtenues ont été réparties dans les puits d'une microplaque de titration à fond en U, à raison de 3 puits par concentration. Ensuite, l'inoculum de chaque bactérie (10^8 UFC/ml) a été ajouté à chaque puits. La microplaque a été par la suite mise à l'étuve à 37°C sous CO₂. Après 24 h d'incubation, 100 µl de chaque dilution ont étéensemencés sur milieu de culture solide, (MRS pour les *Lactobacillus*, Columbia blood agar pour *Streptococcus*, *Haemophylus* et *Actinomyces*), puis incubés à 37°C, toujours sous CO₂, pendant 48 h suivie de la lecture des résultats.

Les concentrations pour lesquelles aucune croissance bactérienne n'a été observée, ont été qualifiées de bactéricides : ce sont les concentrations minimales bactéricides (CMB).

Les témoins ont été réalisés avec des nanosphères blanches et la solution éthanolique à 99%.

2.2. Résultats et discussion

Les résultats obtenus sont rapportés dans le Tableau XXXIII (page suivante). Pour mieux apprécier la différence avec l'extrait à l'acétate d'éthyle non encapsulé dans les nanosphères

de PLGA, et le rôle « potentialisateur d'activité » des NS de PLGA, nous avons également rapporté ici les résultats des tests bactéricides obtenus précédemment avec l'extrait seul (EAFHM).

Tableau XXXIII : Bactéricidie d'EAFHM seul et associé aux nanosphères de PLGA (EAFHM-NS-PLGA) après 48 h d'incubation à 37°C.

Souches bactériennes	EAFHM	EAFHM-NS-PLGA
	CMB (µg/ml)	
<i>Actinomyces naeslundii</i>	250	75
<i>Actinomyces viscosus</i>	200	75
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	125	37,5
<i>Lactobacillus casei</i>	750	187,5
<i>Streptococcus milleri</i>	350	112,5
<i>Streptococcus mitior</i>	200	37,5
<i>Streptococcus mutans</i>	500	150
<i>Streptococcus mutans serotype a</i>	500	150
<i>Streptococcus mutans serotype b</i>	400	75
<i>Streptococcus mutans serotype c</i>	300	75
<i>Streptococcus mutans serotype f</i>	300	56,25
<i>Streptococcus mutans serotype k</i>	500	150
<i>Streptococcus salivarius</i>	250	150
<i>Streptococcus sanguis</i>	500	187,5

Les résultats obtenus avec l'EAFHM associé aux nanosphères de PLGA (EAFHM-NS-PLGA) sont, de loin, meilleurs que ceux donnés par l'EAFHM seul (Tableau XXXIII). On note une optimisation de l'activité bactéricide des nanosphères d'EAFHM et ceci pour les mêmes raisons que celles évoquées, dans la première partie de ce chapitre (page 168), avec les nanosphères d'EEFHM. En effet, le rôle de protection et de réservoir des nanoparticules et leur effet de bioadhésion sur les bactéries, dû à la nature du polymère formant les nanoparticules (Bilbruck et al., 1999), contribuent à potentialiser leur activité bactéricide. Ainsi, les nanosphères d'EAFHM permettent de lutter efficacement contre la formation de la plaque dentaire.

3. NANOSPHERES D'EEFHM ET D'EAFHM : ETUDE COMPARATIVE

Après l'étude des activités antibactériennes des nanosphères des extraits éthanolique et à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis*, il nous a semblé intéressant de réaliser une étude comparative tant de leur composition chimique que de leur bactéricidie. Ainsi dans cette partie nous avons, dans un premier temps, réalisé une analyse chimique qualitative par CCM des NS d'EAFHM, la technique utilisée est la même que celle décrite dans le cas de l'analyse chimique des NS d'EEFHM (page 158). Les résultats de cette analyse chimique ont été comparés à ceux précédemment obtenus avec des NS d'EEFHM (page 163). Dans un deuxième temps, une étude de la bactéricidie des nanosphères d'EEFHM vis-à-vis de différents sérotypes de *Streptococcus mutans*, choisies en raison de leur grande influence dans l'apparition des caries dentaires, a été réalisée en utilisant la méthode de dilution en milieu liquide (NCCLS, 1995), précédemment décrite (page 170), les souches de *Streptococcus mutans* utilisées sont celles présentées dans le Tableau XVI (page 109) et provenant de la collection de l'Institut Pasteur de Paris (CIP) et du Zahnärzliches Institut de ZURICH (OMZ). Les résultats obtenus ont été comparés à ceux des nanosphères d'EAFHM rapportés dans la deuxième partie de ce chapitre (page 171).

3.1. Résultats et discussion

3.1.1. Analyse chimique qualitative

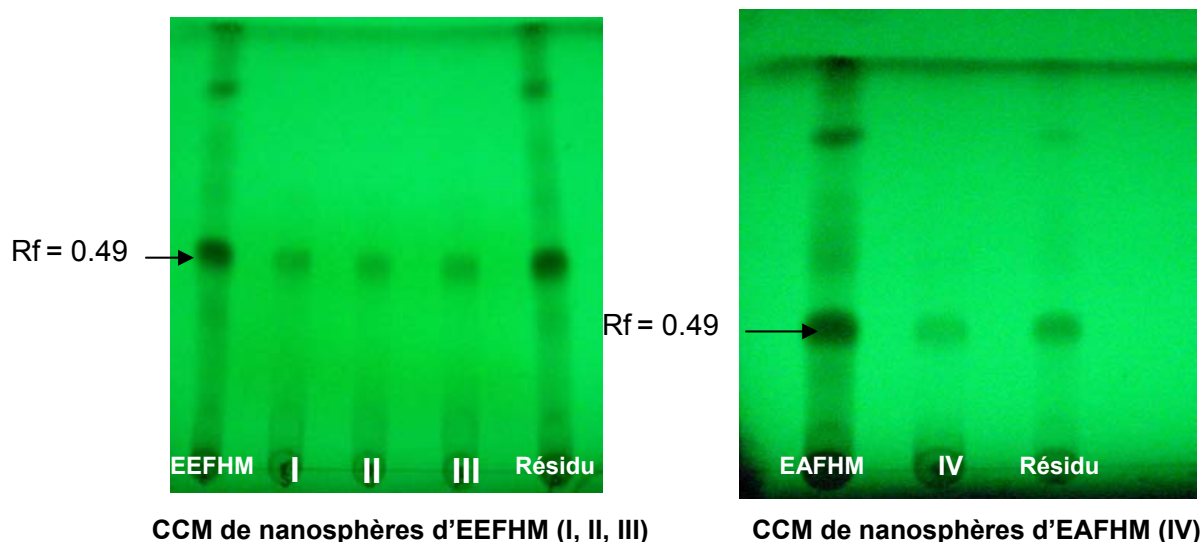


Figure 70 : Comparaison des profils chromatographiques des nanosphères d'EEFHM et d'EAFHM.

Les chromatogrammes des nanosphères d'EEFHM (I, II, III) d'une part et des nanosphères d'EAFHM (IV) d'autre part montrent les mêmes profils. On constate également que le composé majoritaire de Rf 0,49 correspondant à l'astilbine, dont la bioactivité a été mise en évidence dans le chapitre VI page 151, présent aussi bien dans l'EEFHM que dans l'EAFHM est encapsulé dans les deux cas. L'encapsulation d'astilbine se fait sans nul doute dans des proportions différentes selon qu'on est en présence d'EEFHM ou d'EAFHM, ce qui pourrait en outre expliquer la différence d'activité antimicrobienne entre les nanosphères d'EEFHM et celles d'EAFHM, avec une meilleure bioactivité pour celles qui auraient encapsulées plus d'astilbine.

En outre, une étude chimique complémentaire réalisée, par CCM, sur des quantités identiques d'EEFHM et d'EAFHM a montré que les deux extraits présentaient les mêmes profils chromatographiques avec des teneurs en composés chimiques plus importantes dans l'EAFHM sur la base de l'intensité des tâches comme le montre la Figure 71 (page suivante). Ce fait explique la meilleure bioactivité d'EAFHM par rapport à l'EEFHM.

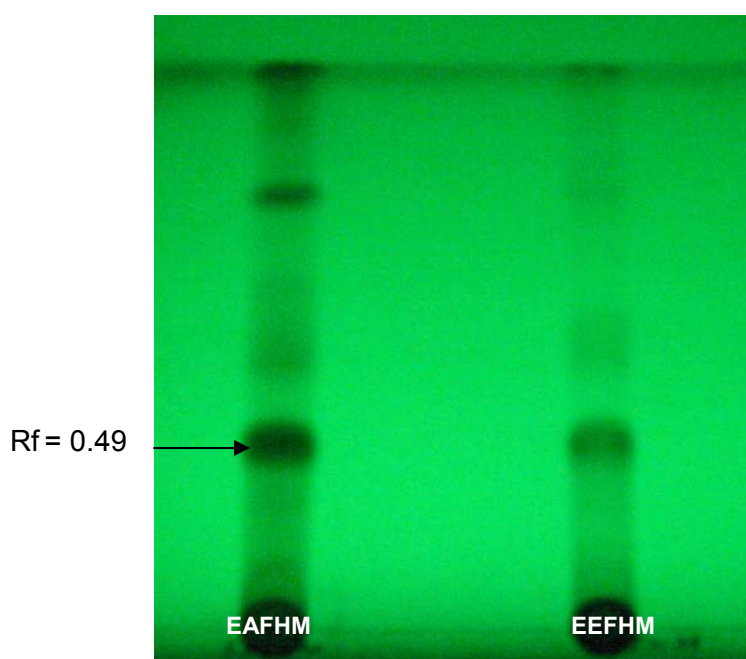


Figure 71 : Comparaison des profils chromatographiques d'EAFHM et d'EEFHM (CHCl₃:n-propanol :HCOOH :H₂O/ 15 :10 :3 :1 v/v).

3.1.2. Etude bactéricide *in vitro*

Les résultats obtenus sont rapportés dans le Tableau ci-dessous et ont été obtenus après 48 h d'incubation à 37°C sous CO₂.

Tableau XXXIV : Comparaison de la bactéricidie entre les nanosphères d'EEFHM et celles d'EAFHM.

Souches bactériennes	EEFHM-NS-PLGA	EAFHM-NS-PLGA
	CMB (µg/ml)	
<i>Streptococcus mutans</i>	750	150
<i>Streptococcus mutans</i> serotype a	750	150
<i>Streptococcus mutans</i> serotype b	750	75
<i>Streptococcus mutans</i> serotype c	750	75
<i>Streptococcus mutans</i> serotype f	500	56,25
<i>Streptococcus mutans</i> serotype k	750	150

Les résultats obtenus avec l'EAFHM associé aux nanosphères de PLGA (EAFHM-NS-PLGA) sont, de loin, meilleurs que ceux donnés par les nanosphères d'EEFHM (EEFHM-NS-PLGA) (Tableau XXXIV). En effet, on constate que les CMB varient de 56,25 à 150 µg/ml et de 500 à 750 µg/ml respectivement pour les nanosphères d'EAFHM et celles d'EEFHM. Ces résultats confirment l'importante activité antibactérienne de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* par rapport à celle de l'extrait éthanolique, mise en évidence dans les chapitres précédents (pages 106 et 125).

3.2. Conclusion

Cette étude comparative a permis de montrer d'une part que les nanosphères d'EEFHM et d'EAFHM présentaient les mêmes profils chromatographiques, et d'autre part que l'activité bactéricide des nanosphères d'EAFHM était meilleure que celle des nanosphères d'EEFHM.

4. CONCLUSION

De nombreux travaux ont montré l'intérêt des formes particulières micro et nanoparticulaires en tant que vecteurs pour l'administration cutanée et transcutanée de principes actifs. Ces systèmes permettent de moduler la pénétration de molécules actives et contrôlent leur libération.

Dans notre travail, nous avons encapsulé des extraits éthanolique et à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* (EEFHM et EAFHM) dans des nanosphères d'acide poly (D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA). Ces nanosphères présentaient une taille comprise entre 250-300 nm, et une charge électrique de surface (potentiel zêta) négative. Nous avons

montré que la taille de nos nanoparticules était proportionnelle à la quantité d'extrait encapsulée, et que leur distribution était monodisperse. Plus la quantité à encapsuler était importante, plus grande était la taille des nanoparticules. Le rendement "d'encapsulation" était supérieur ou égal à 75%. Nous avons également réalisé une analyse chimique qualitative des nanoparticules d'EEFHM et d'EAFHM par CCM. Par celle-ci, nous avons montré que seuls deux constituants chimiques parmi les sept présents sur le profil chromatographique d'EEFHM et d'EAFHM étaient encapsulés dont le composé de Rf 0,49 (l'astilbine). Ce composé possède un effet antibactérien mis en évidence par bioautographie, ce qui par ailleurs justifie l'activité antibactérienne des nanoparticules d'EEFHM et d'EAFHM en dépit de l'absence de certains constituants chimiques des extraits libres. Ainsi l'encapsulation semble être une approche prometteuse pour la formulation et la valorisation des plantes médicinales.

DISCUSSION GENERALE

La médecine par des plantes est une pratique aussi vieille que la civilisation humaine, et représente une alternative pour la découverte de nouvelles molécules pharmacologiquement actives. Cependant l'approche ethnopharmacologique, menée, ces dernières décennies, dans la perspective de découvrir de nouvelles molécules bioactives, a beaucoup plus privilégié l'inventaire descriptif des plantes et leurs recettes. Par contre peu d'informations sur leurs principes actifs et leur formulation galénique sont disponibles. L'ensemble des travaux que nous avons réalisés nous amène à discuter particulièrement des points suivants :

1. Apport de nos travaux à la valorisation des plantes médicinales

Au cours de nos travaux, nous avons choisi 2 plantes traditionnellement utilisées comme agents antimicrobiens dans les formules de la médecine traditionnelle Congolaise. Il s'agit de *Cassytha filiformis* L. (*Lauraceae*) et d'*Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (*Hypericaceae*).

Le screening antifongique des extraits de plantes, quoique assez limité en ce qui concerne le nombre de microorganismes, démontre que les CMI de l'extrait à l'acétate d'éthyle de *Cassytha filiformis* sont moins intéressantes, car variant de 750 à 1000 µg/ml. Alors que les extraits à l'acétate d'éthyle d'*Harungana madagascariensis* présentent des CMI assez intéressantes dont les valeurs varient de 400 à 1000 µg/ml pour l'extrait de feuilles, et de 450 à 1000 µg/ml pour l'extrait des écorces. Cette activité inhibitrice est conservée en fonction du temps (9 mois) contre *M. canis*, *T. rubrum* et *S. brevicaulis*, pour l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis*. Nous avons également noté lors de ce screening antifongique que, les extraits éthéro-pétrolique et dichlorométanique d'une part, aqueux et éthanolique de l'autre ont été respectivement inactifs et moins actifs sur les champignons aux concentrations testées.

Le screening antibactérien a montré que l'ensemble des bactéries testées sont quasiment résistantes, à 1000 µg/ml, aux extraits éthanoliques des tiges de *Cassytha filiformis* et des écorces d'*Harungana madagascariensis* à l'exception des souches de : *Corynebacterium xerosis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus xylosus*, qui sont moyennement sensibles avec des CMI variant de 900 à 1000 µg/ml. L'extrait à l'acétate d'éthyle de *Cassytha filiformis* présente des propriétés antibactériennes moyennes contre les bactéries de la flore cutanée, les valeurs de CMI sont comprises entre 350 et 1000 µg/ml.

Par contre, l'extrait à l'acétate d'éthyle de feuilles d'*Harungana madagascariensis* (EAFHM) présente des propriétés inhibitrices très importantes, contre les bactéries testées (flores cutanée et buccale), avec des CMI dont les valeurs sont inférieures ou égales à 250 µg/ml, les CMB sont comprises entre 125 et 750 µg/ml. L'extrait d'écorces présente des effets

inhibiteurs assez importants contre les germes de la flore cutanée. Toutefois, les résultats n'étant pas supérieurs à ceux obtenus avec l'extrait de feuilles, nous n'avons pas poursuivi l'étude sur les écorces pour des raisons écologiques évidentes.

L'EAFHM présente en outre une activité bactéricide intéressante contre *Pseudomonas aeruginosa*, qui est détruite à 500 µg/ml (Tableau XXII, page 128), ce qui est important compte tenu du fait qu'elle est réputée très résistante aux antimicrobiens existants sur le marché (Franklin, 1993) et largement impliquée dans les infections nosocomiales (Bergogne-Bérezin, 1995). Ainsi, l'EAFHM pourrait être une alternative pour lutter contre les souches multi-résistantes rencontrées dans les infections nosocomiales.

On note également des effets bactériostatique et bactéricide, *in vitro*, intéressants de l'EAFHM contre les souches bactériennes impliquées dans l'apparition des caries dentaires (*Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* et *Lactobacilli*) (Tableau XXIII, page 129). L'EAFHM pourrait être proposé comme principe actif dans la formulation de bains de bouche, afin de prévenir et traiter la carie dentaire.

Ces résultats, antifongiques et antibactériens, confirment et justifient les indications et les utilisations thérapeutiques traditionnelles de *Cassytha filiformis* et surtout d'*Harungana madagascariensis*. Concernant *Harungana madagascariensis*, nos travaux confirment ses vertus antimicrobiennes énoncées par Okoli et al. (2002).

2. Activité thérapeutique et respect de la micro-écologie cutanée

Dans la plupart des cas, si l'extrait est actif sur l'ensemble des germes pathogènes de la peau, il risque de déstabiliser aussi son équilibre écologique normal. Notons que cet équilibre est toutefois superficiel et sujet lui-même, dans les conditions naturelles normales, à des variations. Dans les microflore des différents organes il est difficile de trouver le produit idéal qui conserve la totalité de la microflore commensale intacte, cependant, nous avons trouvé des extraits actifs sur les bactéries pathogènes qui ne déstabilisent pas trop la microflore commensale. Les meilleurs résultats ont été obtenus dans le cas de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* (EAFHM), car cet extrait est plus bactéricide sur les germes responsables des fermentations du pied et des aisselles que sur le reste de la microflore normale de la peau. En effet, à 200 µg/ml, *Corynebacterium xerosis*, principale souche impliquée dans les mauvaises odeurs des aisselles (Marshall et al., 1987 et 1988) est détruite, alors que la flore saprophytique utile est épargnée (*Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis* et *Staphylococcus epidermidis*) (Tableau XXII, page 128). La même observation s'applique aux bactéries responsables des mauvaises odeurs des pieds, notamment *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus hominis*, qui sont détruites à 250 µg/ml, alors qu'une partie de la flore saprophytique utile (*Alcaligenes sp.* et *Moraxella sp.*), est épargnée (Tableau XXII, page 128). De ce point de

vue, cet extrait pourrait servir de principe actif dans la formulation des déodorants et intéresser les dermatologues et les phytothérapeutes.

3. Corrélation entre la composition chimique des plantes et leur bioactivité

Il est aujourd'hui établi que les plantes riches en métabolites secondaires ont des propriétés bioactives très marquées (Scalbert et al., 1991). Chacun de ces composés agit seul ou en synergie avec les autres (Havsteen et al., 1983). Dans le cas de nos travaux, nous avons montré qu'*Harungana madagascariensis* est une riche source de métabolites secondaires confirmant ainsi les travaux d'Imuna et al. (1995), Olagunju et al. (2000) et de Capasso et al. (2003). En effet, nous avons noté la présence d'alcaloïdes, de flavonoïdes, de dérivés anthracéniques et de tanins dans les feuilles d'*Harungana madagascariensis* (Tableau XXV, page 136) et démontré que leur activité antimicrobienne était essentiellement due à une flavanone : l'astilbine.

4. Relation structure-activité : cas de l'astilbine, flavanone bioactive isolée des feuilles d'*Harungana madagascariensis*.

Les flavonoïdes métabolites largement distribués dans le règne végétal, ont des propriétés biologiques très variées : antiallergique, anti-inflammatoire, anticarcinogène, antimicrobienne, ...

Leur propriété antimicrobienne est connue de par leur rôle dans les mécanismes de défense des plantes.

Plusieurs flavonoïdes bioactives ont été antérieurement isolées des plantes, tel est le cas de la pendulétine, dotée d'une activité antivirale et isolée de *Psiadia trinervia* par Wang (1991).

La relation structure-activité a beaucoup été étudiée pour la propriété antimicrobienne des flavonoïdes. Il a été mentionné, récemment, que pour les flavanones la présence des groupements hydroxyles en positions 3', 4', 5 et 7, est essentielle à leur fonction antimicrobienne (Tsuchiya et al., 1996 ; Chacha et al., 2005). Ainsi l'activité antimicrobienne de l'astilbine isolée des feuilles d'*Harungana madagascariensis* pourrait être due à ces hydroxylations.

5. Relation forme galénique-efficacité thérapeutique : cas d'extraits éthanolique et d'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* (EFHM et EAFHM)

La relation entre forme galénique et activité biologique n'est plus à démontrer. En effet, il ne suffit pas d'administrer un certain nombre de prises unitaires parfaitement dosées en principe actif pour avoir l'effet thérapeutique désiré. Il faut de plus que la forme galénique

envisagée libère le principe actif pour le mettre à disposition de l'organisme, et ceci dans des limites de vitesse et de concentration déterminées. Ainsi, la biodisponibilité et par suite l'efficacité d'un principe actif sont directement fonction de sa forme galénique ; plusieurs médicaments ont donné des effets thérapeutiques différents pour des modifications de formulations. Parmi ceux-ci nous pouvons citer la griséofulvine, la tétracycline, le chloramphénicol,...C'est ainsi par exemple que plusieurs spécialités à base de chloramphénicol ont été retirées de la vente aux USA du fait d'une efficacité insuffisante (Le Hir, 1986). Il a été constaté que pour ces produits les changements d'effets étaient dus à des variations diverses (taille des particules, forme physique du sel du principe actif, nature et proportion des excipients,...).

Cependant, de nombreuses études ont montré l'intérêt des formes nanoparticulaires en tant que formes galéniques à forte biodisponibilité d'une part, et vecteurs pour l'administration cutanée et transcutanée des principes actifs d'autre part (Fawaz et al., 1998 ; Pinto-Alphandary et al., 2000 ; Lboutounne et al., 2002 et 2004 ; Alt et al., 2004 ; Alvarez-Román et al., 2004 ; Kholi et Alpar, 2004 ; Moulari et al., 2005). Ces systèmes permettent de moduler la pénétration de molécules à travers le stratum corneum et contrôlent la libération du principe actif. Dans notre travail, nous avons encapsulé l'EFHM et l'EAFHM dans les nanosphères d'acide poly (d,l-lactide-co-glycolide) (PLGA). Nous avons montré que les extraits encapsulés augmentaient quantitativement et durablement l'activité antimicrobienne *in vitro* et *ex vivo*, par rapport à des formes libres d'extrait (Tableaux XXXI, XXXII, XXXIII pages, 164 165, 171). Cette potentialisation de l'activité antimicrobienne des formes encapsulées pourrait être due aux rôles protecteur et bioadhésif du polymère utilisé.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Notre étude a consisté, dans un premier temps, à soumettre, *in vitro*, de nombreuses souches de champignons et de bactéries, isolées du corps humain, à l'action d'extraits de plantes, et à identifier, isoler puis caractériser le composé bioactif. Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une formulation galénique de deux des extraits testés. La forme galénique utilisée a été choisie dans le but de garantir la meilleure biodisponibilité des extraits et par conséquent d'assurer la potentialisation de leur bioactivité.

Ainsi, le présent travail a permis d'une part de confirmer que l'on peut trouver, dans la nature, des plantes potentiellement intéressantes quant à leurs activités antimicrobiennes. Les espèces que nous avons testées avaient été sélectionnées sur la base d'informations issues de la médecine traditionnelle. Leur utilisation dans ce contexte a ainsi été, d'une certaine façon, justifiée. D'autre part, de confirmer que l'encapsulation dans les nanoparticules polymériques des extraits de plantes est possible et permet d'optimiser, *in vitro* et *ex vivo*, leur bioactivité.

Le screening effectué au début de ce travail avait montré d'une part que les extraits apolaires (éthero-pétroliques et dichlorométhaniques) des 2 plantes utilisées n'étaient pas actifs sur les microorganismes testés, et que d'autre part tous les extraits testés étaient inactifs aux concentrations utilisées sur *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*. Nous avons également constaté que les extraits testés étaient plus antibactériens qu'antifongiques. Les extraits polaires d'*Harungana madagascariensis* ont été plus bioactifs que ceux de *Cassytha filiformis*. Les meilleurs résultats étant obtenus avec l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* (EAFHM). Son investigation biologique et chimique à l'aide des différents tests antibactériens, par bioautographie directe, ainsi qu'à l'aide de techniques chromatographiques et spectroscopiques a permis d'isoler son principe actif : l'Astilbine (flavanone). Ce composé pourrait ainsi être exploité à des fins thérapeutiques. L'extrait de départ possède lui aussi des propriétés intéressantes, il n'est pas exclu non plus de l'utiliser à ces mêmes fins.

Il serait en effet plus avantageux, surtout pour les pays en voie de développement, d'exploiter les propriétés d'un extrait brut, le processus d'isolement pour l'obtention de composés purs étant souvent très coûteux.

Pour cette flavanone, il serait intéressant de faire l'étude du mécanisme d'action. Les espoirs d'obtenir des molécules plus efficaces sont en effet fondés sur la découverte de nouvelles substances avec des mécanismes d'action différents de ceux des agents existant déjà. De plus, la connaissance du mécanisme d'action est très importante pour la compréhension des phénomènes de résistance des souches microbiennes.

Sur le plan galénique, l'encapsulation d'extraits de plantes dans les nanoparticules polymériques, a permis d'optimiser, *in vitro* et *ex vivo*, leurs effets antibactériens. Ainsi la

vectorisation constitue une approche prometteuse pour la formulation des extraits de plantes bioactifs, et pour la valorisation de la médecine traditionnelle.

Des études *in vivo*, sur l'animal, d'extrait à l'acétate d'éthyle et d'astilbine encapsulés, dans les nanoparticules devraient être envisagées dans le futur pour déterminer leur absence de toxicité, afin de pouvoir les utiliser en thérapie moderne.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

PAR ORDRE ALPHABETIQUE

- 1- Abbott B. J., Leiter J., Hartwel L., Caldwell M. E., Beal J. L., Perdue R. E., Schepartz Jr., Schepartz S. A. (1966).** Screening data from the cancer chemotherapy national service center screening laboratories. Plants extracts. Cancer Res. 2, suppl. part 2.

- 2- Adjanohoun E. j., Aké Assi L., Floret J. J., Guinko S., Kouamé M., Ahyi A. M. R., Raynal J. (1979).** Médecine traditionnelle et pharmacopée. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Mali. ACCT, Paris.

- 3- Adjanohoun E. J. (1989).** Les expéditions ethnobotaniques de l'agence de Coopération culturelle et Technique (ACCT) : objectif, résultats et perspectives. Bull. Soc. Bot. Fr. 136, 9-12.

- 4- Alaluusua S., Myllarniemi S., Kalljo M. (1989).** *Streptococcus mutans* infection level and caries in a group of five year old children. Caries res. 23, 190-194.

- 5- Al Awad M. (1993).** Etude de l'action antifongique des substances d'origines naturelles sur la croissance de *Microsporum gypseum* cultivé *in vitro*. Observation en microscopie photonique et en microscopie électronique à transmission. Th. Doc, Reims.

- 6- Al Khouri-Fallouh N., Roblot-Treupeul L., Fessi H., Devissaguet J.P., Puisieux F. (1986).** Development of a new process for the manufacture of poly isobutyl cyanoacrylate nanocapsules. *Int. J. Pharm.* 28, 125-132.

- 7- Alléman E., Doelker E., Gurny R. (1992).** Drug loaded poly (lactic acid) nanoparticles produced by a reversible salting-out process: purification of an injectable dosage form. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 39, 13-18.

- 8- Allen T.M., Hansen C. (1991).** Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: Effect of dose. *Biochim. Biophys. Acta* 1068, 133-141.

- 9- Alonso M.J., Calvo P., Montero A., Vila Jato J.L. (1994).** Comparative in vitro and in vivo evaluation of several colloidal carriers for topical ocular administration. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 21, 567-568.

- 10- Alt V., Bechert T., Steinrücke P., Wagener M., Seidel P., Dingeldein E., Domann E., Schnettler R. (2004).** An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials* 25, 4383-4391.
- 11- Alvarez-Román R., Naik A., Kalia Y.N., Guy R.H., Fessi H. (2004).** Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J. Control. Rel.* 99, 53-62.
- 12- Alving C.R. (1986).** Liposomes as drug carriers in leishmaniasis and malaria. *Parasitol. Today* 2, 101-107.
- 13- Alving C.R. (1988).** Macrophages as target for delivery of liposomes-encapsulated antimicrobial agents. *Adv. Drug. Del. Rev.* 2, 107-128.
- 14- Ammoury N., Fessi H., Devissaguet J.P., Puisieux F., Benita S. (1989).** Physicochemical characterization of polymeric nanocapsules and in vitro release evaluation of indomethacin as a drug model. *STP. Pharma.* 5, 647-651.
- 15- Ammoury N., Fessi H., Devissaguet J.P., Dubrasquet M., Benita S. (1991).** Jejunal absorption, pharmacological activity and pharmacokinetic evaluation of indomethacin-loaded poly (D,L lactide) and poly (isobutyl cyanoacrylate) nanocapsules in rats. *Pharm. Res.* 8, 101-105.
- 16- Andrieu V., Fessi H., Dubrasquet M., Devissaguet J.P., Benita S. (1989).** pharmacokinetic evaluation of indomethacin nanocapsules. *Drug. Des. Deliv.* 4, 295-302.
- 17- Apanhamian M., Michel C., Humbert W., Devissaguet J.P., Damge C. (1987).** Transmucosal passage of polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as a new drug carrier in small intestine. *Biology of the cell* 61, 69-76.
- 18- Aviril J. L., Daubernat M., Denis F., Monteil M. (1988).** Bactériologie clinique. Ed. Marketing, Paris, 510p.
- 19- Badillet G. (1991).** Dermatophyties et dermatophytes. Atlas clinique et biologique, 3^{ème} éd., Varia, Paris, 303p.
- 20- Badillet G., De Bievre C., Gueho E. (1987).** Champignons contaminants des cultures : champignons opportunistes. Atlas clinique et biologique, Varia, Paris, Tome 1, 131p. et Tome 2, 228p.

- 21- Badillet G., Sene S. (1989).** Le diagnostic des mycoses unguéales : apport de la technique histologique. Bull. Soc. Fr. Mycol. Méd. 18, 237-244.
- 22- Bailey W.J., Ni Z., Wu S.R. (1982).** Synthesis of poly(acetone) via a free radical mechanism. Free radical ring-opening polymerization of 2-methylene-1,3-dioxepane. J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed, 20, 3021-3030.
- 23- Baker P.J., Coburn R. A., Genco R. J. et al. (1987).** Structural determinants of activity of chlorhexidine and alkyl bisbiguanides against the human oral flora. J. Dent. Res. 66, 1099-1106.
- 24- Bakker-Woudenberg I.A.J.M., Ten Kate M.T., Stearne-Cullen L.E.T., Woodle M.C. (1995).** Efficacy of gentamicine or ceftazidine entrapped in liposomes with prolonged blood circulation and enhanced localization in *Klebsiella pneumoniae* infected lung tissue. J. Infect. Dis. 171, 938-947.
- 25- Bakker-Woudenberg I.A.J.M., Storm G., Woodle M.C. (1998).** Antibacterial therapy with sterically stabilized liposomes formulations. In: Long circulating liposomes: Old Drugs, New therapeutics. Woodle M.C., Storm G. (eds), Springer, New York, 177-183.
- 26- Balansard G., Regli P. Angenot L. (1995).** Screening for in vitro antifungal activities of some indole alkaloids. Planta Med. 61, 475-477.
- 27- Banoczy J., Szoke J., Kertesz P. et al. (1989).** Effect of amine fluoride / stannous fluoride – containing toothpaste and mouthrinsings on dental plaque and enamel accumulation. Caries Res. 23, 284-288.
- 28- Barratt G. (1999).** Characterization of colloidal drug carrier systems with zeta potential measurements. Pharmaceut. Technol. Eur.
- 29- Barry A. L. (1986).** Procedure for testing antimicrobial agents in agar media: theoretical considerations in antibiotics in laboratory medicine. 2nd Ed by Lorian, V. Williams et Wilkins, Baltimore, 1-26.
- 30- Bastide J.M., Mallie M., Montes B. (1988).** Morphologie et physiologie des *Malassezia*. Bull. Soc. Fr. Mycol. Méd. 17, 233-244.

- 31- Berche P., Gallard J. L., Simonei M. (1991).** Bactériologie: bactéries des infections humaines. Ed Flammarion, Paris, 660p.
- 32- Bilbruck, J., Hanlon G. W., Martin G. P. (1999).** The effects of poly *HEMA* coating on the adhesion of bacteria to polymers monofilaments. *Int. J. Pharm.* 99, 293-301.
- 33- Binutu O. A., Adesogan K. E., Okogun J. I. (1996).** Antibacterial and antifungal compounds from *Kigelia prinnata*. *Planta Med.* 62, 352-353.
- 34- Birrenbach G., Speiser P. (1976).** Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. *J. Pharm. Sci.* 65, 1763-1766.
- 35- Blake D.A., Yoles S., Helrich M., Cascorbi H.F., Eagan M.J. (1971).** Release of cyclazocine from subcutaneously implanted polymeric matrices. Abstract Academy of Pharmaceutical Sciences, San Francisco.
- 36- Bodmeier R., Chen H., Paeratakul O. (1989).** A novel approach to the oral delivery of micro or nanoparticles. *Parm. Res.* 6, 413-417.
- 37- Bodmeier R., Chen H. (1989).** Preparation and evaluation of drug containing polymeric nanosuspension. *Proc. 5th Int. Congr. Pharm. Technol. II*, 265-268.
- 38- Bond, R., Saijonmaa-Koulumies, L.E.M., Lloyd, D.H. (1995).** Population sizes and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal sites on healthy dogs. *J. Small Anim. Pract.* 36, 147-150.
- 39- Bouchet P. (1979).** Abrégé de cryptogamie, éd. Masson, pp. 21-179.
- 40- Bouchet P., Guignard J. L., Madullo L., Regli P. (1989).** Mycologie générale et médicale, Ed. Masson, pp. 107-160.
- 41- Bouquet A. (1969).** Féticheurs et médecines traditionnelles du Congo (Brazzaville) Mémoires ORSTOM 36, Paris.
- 42- Bouquet A. et Debray M. (1974).** Plantes médicinales de la Côte d'Ivoire. Travaux et documents de l'ORSTOM 32, Paris.

- 43- Boye T., Gurny R., Buri P. (1984).** Développement et évaluation d'un nouveau type de forme ophtalmique à libération prolongée. Proc. Eur. Congr. Biopharm. Pharmacokinet., Vol. 2.
- 44- Briand Y. M. (1987).** Mécanismes moléculaire de l'action des antibiotiques. Masson, Paris.
- 45- Brodasky T. F., Lewis C., Eble T. E. (1976).** Bioautographic thin layer chromatographic analysis of antibioticcs and their metabolites in the whole animal. I Clindamycin in the rat. J. Chromatogr. 123, 33-44.
- 46- Brumpt E. (1949).** Précis de parasitologie, éd. Masson, tome II, p. 1656.
- 47- Butler S. M., Tracy M. A., Tilton R. D. (1999).** Adsorption of serum albumin to thin films of poly (lactide-co-glycolide). J. Control. Rel. 58, 335-347.
- 48- Caffara M. and Scagliarini A. (1999).** Study of deseases of the grey squirrel (*Sciuris carolinensis*) in Italy. First isolation of the dermatophyte *Microsporum cookei*. Med. Mycol. 37, 75-77.
- 49- Caillot J., Helluy J. (1957).** Parasitologie médicale, éd. Médicale Flammarion, pp. 557-563.
- 50- Capan Y., Woo B., H., Gebrekidan S., Ahmed S., Deluca P. P. (1999).** Influence of formulation parameters on the characteristics of poly (lactide-co-glycolide) microspheres containing poly (L-lysine) complexed plasmid DNA. J. Control. Rel. 60, 279-286.
- 51- Capasso F., Gagniella T.S., Grandolini G., Izzo A.A. (2003).** Plants and the digestive system. In: Phytotherapy: A quick reference to herbal medicine. Eds Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. pp 262-263.
- 52- Césarini J.P. (1990).** La peau , (ed) PUF, paris.
- 53- Chacha M., Bojase-Moleta G., Majinda R. R. T. (2005).** Antimicrobial and radical scavenging flavonoids from the stem wood of *Erythrina latissima*. Phytochemistry 66, 99-104.

- 54- Chaumont J. P., Leger D., Marshall J. (1989).** Intérêt de la distinction entre les propriétés antifongiques et antibactériennes de certains composés d'origine végétale :cas de la microflore des pieds. Bull. Soc. Fr. Mycol. Méd. 18, 379-384.
- 55- Chang C. W., Ko F. N., Su M. J., Wu Y. C., Teng C. M. (1997).** Pharmacological evaluation of ocoteine, isolated from *Cassytha filiformis*, as an alpha 1-adrenoceptor antagonist in rat thoracic aorta. Japan. J. Pharmacol. 73, 207-214.
- 56- Chang F. R., Chao Y. C., Teng C. M., Wu Y. C. (1998).** Chemical constituents from *Cassytha filiformis* II. J. Nat. Prod. 61, 863-866.
- 57- Chouinard F., Kan F.W., Leroux J.C., Foucher C., Lenaerts V. (1991).** Preparation and purification of polyisohexylcyanocrylate nanocapsules. Int. J. Pharm. 72, 211-217.
- 58- Cobb M. A., Edwards H. J., Jagger T. D., Marshall J., Bowker K. E. (2005).** Topical fusidic acid/betamethasone-containing gel compared to systemic therapy in the treatment of canine acute moist dermatitis. Vet. J. 169, 276-280.
- 59- Corden T.J., Jones I.A., Rudd C.D., Christian P., Downes S., Mc Dougall K.E. (2000).** Physical and biocompatibility properties of poly(ϵ -caprolactone) produced using in situ polymerization: a novel manufacturing technique for long-fibre. Composite materials 21, 713-724.
- 60- Couvreur P. (1985).** Vecteurs nanoparticulaires de médicaments. Dans : Formes Pharmaceutiques nouvelles : Aspects technologique, biopharmaceutique et médical. Buri P., Puisieux F., Doelker E., Benoît J.P., (eds) Lavoisier, Tec et Doc, Paris, 577-611.
- 61- Couvreur P. (1988).** Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst. 5, 1-20.
- 62- Cui Z., Mumper R.J. (2001).** Chitosan-based nanoparticles for topical immunization. J. Control. Rel. 75, 409-419.
- 63- Cui Z., Mumper R.J. (2002).** Topical immunization using nano-engineered genetic vaccines. J. Control. Rel. 81, 173-184.

- 64- De Britto J., Manickam V.S., Gopalakrishnan S., Ushioda T., Tanaka N. (1995).** Determination of aglycone chirality in dihydroflavonol 3-O- α -L-rhamnosides by ^1H -NMR Spectroscopy. Chem. Pharm. Bull. 43, 338-339.
- 65- De Hoog G. S., Guarro J., Gene J., Figueras M. J. (2000).** Atlas of clinical fungi 2nd éd. Vol. 1. Centraalbureau voor schimmel cultures, utrecht, the Netherlands.
- 66- Derjaguin B.V., Landau L. (1941).** Acta Physiochem. Vol. 14, p. 633, URSS.
- 67- Doelker E. (1985).** Propriétés des polymères et principes de préparation des systèmes médicamenteux polymériques. Dans : Formes Pharmaceutiques nouvelles : Aspects technologique, biopharmaceutique et médical. Buri P., Puisieux F., Doelker E., Benoît J.P., (eds) Lavoisier, Tec et Doc, Paris, 25-54.
- 68- Domb A. (1989).** Poly(propylene glycol fumurate) composition for biomedical applications. U.S. Patent 4, 888, 413.
- 69- Donbrow M. (1992).** Introduction and overview. In: Donbrow M. (ed), Microcapsules and nanocapsules in Medecine and Pharmacy, 1-14, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- 70- Drouhet E., Dupont B. (1985).** Les champignons levuriformes d'intérêt médical. Laborama 21, 3-14.
- 71- Dupont B. (1992).** Traitement de la cryptococcose au cours du SIDA. J. Mycol. Méd. 2 (suppl. 1), 15-22.
- 72- Duro, R., Souto, C., Gomez-Amoza, J. L., Martinez-Pacheco, R., Concheiro, A. (1999).** Interfacial adsorption of polymers and surfactants: implications for the properties of disperse systems of pharmaceutical interest. Drug Dev. Ind. Pharm. 25, 817-829.
- 73- Elbaze P., Ortome J.P. (1988).** La flore cutanée, les antiseptiques, les antibiotiques locaux. Encyclopédie Médico-chirurgicale (EMC). Dermato. 12235 D¹⁰, 12p.
- 74- El-Egakey A.M., Speiser P. (1982).** Drug-loading studies on ultrafine solid carriers by sorption procedures. Pharma. Acta. Helv. 57, 236-240.
- 75- Elias P.M. (1983).** Epidermal lipids barrier function and desquamation. J. Invest. Dermatol. 80, 44S-49S.

- 76- Emilsson C. G., Krasse B. (1985).** Support for and implications of the specific plaque hypothesis. Scand. J. Dent. Res. 93, 96-104.
- 77- Emmons C. W., Bindford C. H., Utz J-P. Kwon-Chang J. (1977).** Medical Mycology. Lea and Febiger eds, Philadelphia.
- 78- Espinel-Ingroff A., Shadomy S. (1989).** *In vitro* and *in vivo* evaluation of antifungal agents. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 8, 352-361.
- 79- Everett D.H. (1994).** Basic principles of colloid science. The Royal Society of Chemistry, UK.
- 80- Favel A., Steunmetz M. D., Regli P. (1994).** In vitro antifungal activity of triterpenoid saponins. Planta Med. 60, 50-53.
- 81- Fawaz F., Bonini F., Maugein J., Lagueny A.M. (1998).** Ciprofloxacin-loaded polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles: pharmacokinetics and in vitro antimicrobial activity. Int. J. Pharm. 168, 255-259.
- 82- Fessi H., Devissaguet J.P., Puisieux F., Thies C. (1986).** Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanoparticules. Brevet d'Invention Français. PV 86 18446.
- 83- Fessi H. Puisieux F., devissaguet J.P. (1987).** Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. Eur. Pat. 274961.
- 84- Fessi H., Puisieux F., Devissaguet J.P., Ammouy N., Benita S. (1989).** Nanoparticles formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. Int. J. Pharm. 55, R1-R4.
- 85- Fisel J., Gäbler H., Schwöbel H., Trunzler G. (1966).** Haronga madagascariensis Chois. Botanik Pharmakognosie, Chemie und Therapeutische Anwendung. Dshe Apotheker Ztg 106, 1053-1060.
- 86- Fontana G., Pitarresi G., Tomarchio V., Carlisi B., San Biagio P.L. (1998).** Preparation, characterization and in vitro antimicrobial activity of ampicilin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles. Biomaterials 19, 1009-1017.

- 87- Franklin I.J. (1993).** Bacterial resistance to antibiotics. In: Pharmaceutical Microbiology, Blackwell Scientific Publications. Eds W.B. Hugo, A.D. Russel. London. pp. 208-229.
- 88- Franz T. J. (1975).** Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. J. Invest. Dermatol. 64 : 190-195.
- 89- Fresta M., Cavallaro G., Giammona G., Wehrli E., Puglesi G. (1996).** Preparation and characterization of polyethyl-2-cyanoacrylate nanocapsules containing antiseptic drugs. Biomaterials 17, 751-758.
- 90- Freter R., O'Brien P.C., Macsai M.S. (1981).** Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal mucosa: in vivo studies. Infect. Immun. 34, 234-240.
- 91- Giertsen E., Scheie A.A., Rolla G. (1988).** Inhibition of plaque formation and plaque acidogenicity by zinc and chlorhexidine combinations. Scand. J. Dent. Res. 96, 541-550.
- 92- Giertsen E., Scheie A. A., Rolla G. (1989).** Plaque inhibition by a combination of zinc citrate and sodium lauryl sulfate. Caries Res. 23, 278-283.
- 93- Gilding D.K., Reed A.M. (1979).** Biodegradable polymers for use in surgery-polyglycolic/poly(lactic acid) homo- and copolymers: 1. Polymer 20, 1459.
- 94- Graham N.B. (1982).** Proc. Int. Symp. Controlled Rel. Bioact. Mater., p.16.
- 95- Graybill J.R., Craven P.C., Taylor R.L. (1982).** Treatment of murine cryptococcosis with liposome-associated amphotericin B. J. Infect. Dis. 145, 748-752.
- 96- Gref R., Minamitake Y., Peracchia M.T., Langer R. (1996).** poly (ethylene glycol)-coated biodegradable nanoparticles for intravenous drug administration. In: Microparticulate systems for the delivery of proteins and vaccines. Cohen S. and Bernstein H. (eds) Marcel Dekker, New York, 279-306.
- 97- Grit M., De Smidt J.H., Struijke A., Crommelin J.A. (1989).** Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. Int. J. Pharm. 50, 1-6.

- 98- Gröning R., Breitzkreutz J., Baroth V., Müller R.S. (2001).** Nanoparticles in plant extracts: factors which influence the formation of nanoparticles in black tea infusions. *Die Pharmazie* 56, 790-792.
- 99- Gröning R., Breitzkreutz J., Baroth V., Müller R.S. (2002).** Nanoparticles in plant extracts: influence of drugs on the formation of nanoparticles and precipitates in black tea infusions. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15, 149-155.
- 100- Gröning R., Breitzkreutz J., Müller R. S. (2003).** Physico-chemical interactions between extracts of *hypericum perforatum* L. and drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56, 231-236.
- 101- Gröning R., Adesina S., Müller R. S. (2004).** Formation of particles in aqueous infusions of the medical plant *Harungana madagascariensis*. *Die Pharmazie* 59, 279-281.
- 102- Gurny R. (1983).** Latex systems. In: Breimer D.D., Speiser P. (eds), *Topics in Pharmaceutical Science*, 277-288, Elsevier, Amsterdam.
- 103- Hammer A.S., Pedersen K., Andersen T.H., Jorgensen J.C., Dietz H.H. (2003).** Comparison of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from mink by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 94, 237-243.
- 104- Havsteen, B. (1983).** Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* 95, 412-427.
- 105- Heal R.F., Rogers E.F. (1950).** A survey of plants for the insecticidal activity. *Lloydia* 13, 89-162.
- 106- Heller J., Penhale D.W.H., Fritzinger B.K., Rose J.E., Helwing R.F. (1983).** Controlled release of contraceptive steroids from biodegradable poly (ortho esters). *Contracept. Deliv. Syst.* 4, p. 43.
- 107- Heller J., Penhale D.W.H., Fritzinger B.K., Ng S.Y. (1984).** Controlled release of contraceptive agents from poly (ortho esters). In: long-acting contraceptive delivery systems, Zatuchni G.I., Goldschmith A., Shelton J.D., Sciarra J., ed., Harper et Row Publishers, Philadelphia, pp. 113-128.

- 108- Henry-Michelland S., Alonso M.J., Andremont A., Maincent P., Sauzieres J., Couvreur P. (1987).** Attachement of antibiotics to nanoparticles : preparation, drug release and antimicrobial activity in vitro. *Int. J. Pharm.* 35, 121-127.

- 109- Hewit J. (1976).** La peau : ses fonctions, ses lésions, ses relations pathologiques. Ed Glaxa, 93p.

- 110- Holmes P.A. (1985).** Application of PHB: a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Phys.Technol.* 16, 32-36.

- 111- Holt R. J. (1975).** Laboratory tests of antifungal drugs. *J. Clin. Path.* 28, 767-774.

- 112- Houin G. (1990).** Pharmacocinétique. (eds), *Ellipse*, 7-19.

- 113- Hunter R.J. (1988).** Zeta potential: In colloid Science, Principles and applications. Academic Press, UK.

- 114- Ibrahim H., Bindchaedler C., Doelker E., Buri P., Gurny R. (1992).** Aqueous nanodispersions prepared by salting-out process. *Int. J. Pharm.* 87, 239-246.

- 115- Iinuma M., Tosa H., Ito T., Tanaka T., Aqil M. (1995).** Two prenatalated anthrones in *Harungana madagascariensis*. *Phytochemistry* 40, 267-270.

- 116- Jacobs M., Martin G.P., Martin M.C. (1988).** Effects of phosphatidylcholine on the topical bioavailability of corticosteroids assessed by human skin blanching assay. *J. Pharm. Pharmacol.* 40, 829-833.

- 117- Johns S.R. and Lamberton J.A. (1966).** Cassytha alkaloids I New apomorphine alkaloids from Cassytha filiformis L. *Austral. J. Chem.* 19, 297-303.

- 118- Jones, M.N., Song, Y. H., Kaszuba, M., Reboiras, M. D. (1997).** The interaction of phospholipid liposomes with bacteria and their uses in the delivery of bactericides. *J. Drug Targeting* 5, 25-34.

- 119- Juliano R.L. (1998).** Factors affecting the clearance kinetics and tissue distribution of liposomes, microspheres and emulsions. *Adv. Drug. Del. Rev.* 2, 31-54.

- 120- Kang, F., Singh, J. (2003).** Conformational stability of model protein (bovine serum albumin) during primary emulsification process of PLGA microspheres synthesis. *Int. J. Pharm.* 260, 149-156.
- 121- Kanikatis J. (1998).** Immunohistochemistry of normal human skin. *Eur. J. Dermatol.* 8, 539-547.
- 122- Kandelmann D. (1989).** La dentisterie préventive. Ed Masson, Paris, 314p.
- 123- Kay H.M., Wilson M. (1988).** The *in vitro* effects of amine fluorides on plaque bacteria. *J. Periodontol.* 59, 266-269.
- 124- Kemeny T. (1971a).** Tierexperimentelle Untersuchungen zum Nachweis der verdauungsregulierenden Nucleinsäure und Einweisgchalt von leber, Pankreas, Duodenumepithel und bei mäuse. *Arzneimittel Forsch.* 21, 101-104.
- 125- Kemeny T. (1971b).** Tierexperimentelle Untersuchungen zum Nachweis der verdauungsregulierenden Eigenschaften von Haronga madagascariensis untersuchungen über die antihepatotoxische wirkungdes Haronga. Gesamtextraktes. *Arzneimittel Forsch.* 21, 421-424.
- 126- Kemeny J. (1971).** Tierexperimentelle Untersuchungen zum Nachweis der verdauungsregulierenden Eigenschaften von Haronga madagascariensis. Gevonnenen Gesamtextraktes auf die Magen, Leber-und Pankreastätigkeit bei Ratten. *Arzneimittel Forsch.* 21, 271-274.
- 127- Kerharo J. (1971).** Recherches ethnopharmacognosiques sur les plantes médicinales et toxiques de la pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Thèse n°21, fac. Mixte de Méd. Et Pharma., univ. Dakar.
- 128- Kerharo J. et Adam J.G. (1974).** La pharmacopée sénégalaise traditionnelle, plantes médicinales et toxiques. Ed. vigot et frères, Paris.
- 129- Kiraz N., Aug O., Akgun Y., Erturan Z. (2000).** Phenotypic variation and antifungal susceptibility patterns of *Candida albicans* strains isolated from neutropenic patients. *Mycoses* 43, 119-123.

- 130- Klock B., Krasse B. (1979).** A comparaison between different methods of prediction of caries activity. Scand. J. Dent. Res. 87, 129-139.
- 131- Kohli A.K., Alpar H.O. (2004).** Potential use of nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery : effect of particle size and charge. Int. J. Pharm. 275, 13-17.
- 132- Koné L.P. (1984).** Contribution à l'étude du mécanisme d'action cellulaire et de l'activité *in vitro* d'un nouvel antifongique imidazolé : le Tioconazole. Th. Doc. n°2998, Fac des Sciences, Toulouse, 100p.
- 133- Krause H.J., Schwartz A., Rohdewald P. (1985).** Polylactic acid nanoparticles, a colloidal drug delivery system of lipophilic drugs. Int. J. Pharm. 27, 145-155.
- 134- Kreuter J., Speiser P. (1976).** In vitro studies of poly (methyl methacrylate) adjuvants. J. Pharm. Sci. 65, 1624-1627.
- 135- Larone D. H. (1995).** Medically important fungi. A guide to identification, 3rd éd. ASM press Washington, D. C.
- 136- Lboutounne H., Chaulet J.F., Ploton C., Falson F., Pirot F. (2002).** Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorexidine in poly (ϵ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. J. Control. Rel. 82, 319-334.
- 137- Lboutounne H., Guillaume Y.C., Michel L., Makki S., Humbert Ph., Millet J. (2004).** Study and development of encapsulated forms of 4,5',8-trimethylpsoralen for topical drug delivery. Drug Dev. Res. 61, 86-94.
- 138- Le Chat P., Calvo F., De Crenoux P., Giroult J.P. et al. (1990).** Pharmacologie médicale 5^e éd., Masson, Paris, 741p.
- 139- Le Hir A. (1986).** Abrégé de Pharmacie Galénique, 5^e éd. Masson, Paris, New York, Barcelone, Milan, Mexico, Sao Paulo, 376p.
- 140- Lerwick E. (1983).** Studies on the efficacy and safety of polydioxanone monofilament absorbable suture. Surg.Gynecol. Obstet. 156, 51.

- 141- Li, Y. P., Pei, Y. Y., Zhang, X. Y., Gu, Z. H., Zhou, Z. H., Yuan, W. F., Zhou, Y. J., Zhu, J., H., Gao, X. J. (2001).** PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J. Control. Rel.* 71, 203-211.

- 142- Linas M. D., Seguela P. P. (1989).** Méthode de détermination de l'activité *in vitro* et de dosage des antifongiques. *Rev. Fr. Lab.* 188, 47-57.

- 143- Lindhe J. (1986).** Manuel de parodontologie clinique. Ed CDP, Paris, 536p.

- 144- Leyden J.J., Mc Ginley K.J., Nordstrom K.M., Webster G.F. (1987).** Skin microflora. *J. Invest. Dermatol.* 3 (march suppl.), 65-72.

- 145- Loesche W.J., straffon L.H. (1979).** Longitudinal investigation of the role of *Streptococcus mutans* in human fissure decay. *Infect. Immun.* 26, 498-507.

- 146- Loesche W.J. (1986).** Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.* 50, 353-380.

- 147- Lopez-Berestein G., Fainstein V., Hopfer R. (1985).** Liposomal amphotericin B for the treatment of fungal infections in patients with cancer: a preliminary study. *J. Infect. Dis.* 151, 704-710.

- 148- Lyklema J. (2000).** Fundamentals of Interface and Colloid Science: Volume 1, Academic Press, UK.

- 149- Madubunyi I.I, Obi S.K.C., Nwebube N.I., Chime A.B. (1995) .** The antimicrobial and antihepatotoxic activities of the leaf extracts of *Harungana madagascariensis* were tested *in vivo* and *in vitro*. *Int. J. Pharmacogn.* 33, 129-134.

- 150- Malcolm S.A. and Sofowora E.A. (1969).** Antimicrobial activity of selected nigerian folk remedies and their constituent plants. *Lloydia* 32, 512-517.

- 151- Manske R.H.F. and Holmes H.L. (1950-1971).** The alkaloids: Chemistry and Physiology 13, Academic press, New York, Londres.

- 152- Marples R.R. (1965).** The effect of hydratation of the bacterial flora of the skin. In: Maibach H.I., Hildick-Smith G. Ed. Bacteria and their role in infection. New York, Mc Graw-Hill, 33-41.
- 153- Marshall J., Leeming J.P., Holland K.T. (1987).** The cutaneous microbiology of normal human feet. J. Appl. Bacteriol. 62, 139-146.
- 154- Marshall J., Holland K.T., Gribbon E.M. (1988).** A comparative study of the cutaneous microflora of normal feet with low and high levels of odour. J. Appl. Bacteriol. 65, 61-68.
- 155- Masuda, A., Sukegawa, T., Mizumoto, N., Tani, H., Miyamoto, T., Sasai, K., Baba, E. (2000).** Study of lipid in the ear canal in canine otitis externa with *Malassezia pachydermatis*. J. Vet. Med. Sci. 62, 1177-1182.
- 156- Maulding H.V. (1987).** Prolonged delivery of polypeptides by microcapsules. J. Controlled Rel. 6, 167.
- 157- Messenger S., Goddard P.A., Dettmar P.W., Maillard J.Y. (2001).** Determination of the antibacterial efficacy of several antiseptics tested on skin by an ex vivo test. J. med. Microbiol. 50, 284-292.
- 158- Messerschmidt W. (1966).** Die bestimmung der borntragerpositiven anthracenderivate in der rin de von Haronga madagascariensis Chois. Dtshe spotheke, Ztg, 106, 1431-1436.
- 159- Meyohas M. C. , Roux P., Poirot J. L. (1989).** Infection à Candida et Toruplosis. Actes 34^e Journées Internationales de Biologie 89, 1-22.
- 160- Mezei M. (1990).** Administration of drug with multiphase liposomal drug delivery system. Brevet U.S. 4, 897, 269.
- 161- Mezei M. (1993).** Techniques for the study of liposome-skin interaction. In: Gregoriadis G. (ed), liposome technology, 91-106, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- 162- Michaels A.S., Chandraserkaran S.K., Shaw J.E. (1975).** Drug permeation through human skin: theory and in vitro experimental measurement. Am. Inst. Chem. Eng. J. 21, 985-996.

- 163- Mitscher L.A., Drake S., Gollapudi S.R., Okwute S.K. (1987).** A modern look at folkloric use of anti-infective agents. *J. Nat. Prod.* 50, 1025-1040.
- 164- Moore L.V.H., Moore W.E.C., Cato E.P., Smibert M.R., Burmeister J.A., Best A.M., Ranney R.R. (1987).** Bacteriology of human gingivitis. *J. Dent. Res.* 66, 989-995.
- 165- Morigbe S.P. (1980).** Evaluation de l'activité antifongique *in vitro* de 10 plantes de la famille des *Papilionaceae* et *Solanaceae*. Th. Dipl. d'Etat Doc. Pharm. n° 77, Fac de Pharmacie, Abidjan, 173p.
- 166- Moulari B., Pirot F., Lboutounne H., Pellequer Y., Guillaume Y.C., Millet J. (2005).** Vectorization of *Harungana madagascariensis* Lam. Ex Poir. (*Hypericaceae*) ethanolic leaf extract by using PLG-nanoparticles: Antibacterial activity assessment. *Drug Dev. Res.* (Sous presse).
- 167- Müller R.H., Schuhmann R. (1996).** In: Teilchengrößenmessung in Der Laborpraxis. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, pp. 25-39.
- 168- Müller B., Kreuter J. (1999).** Enhanced transport of nanoparticle associated drugs through natural and artificial membranes: a general phenomenon. *Int. J. Pharm.* 178, 23-32.
- 169- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (1995).** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: tentative standard, NCCLS, Document M27-T, Villanova, pa.
- 170- Nihant N., Schugens C., Granfils C., Jerome R., Teyssie Ph. (1995).** Polylactide microparticles prepared by double emulsion-evaporation. II. Effect of the poly (lactide-co-glycolide) composition on the stability of primary and secondary emulsions. *J. Coll. interface Sci.* 173, 55-65.
- 171- New R.R.C., Chance M.L., Thomas S.C., Heath S. (1981).** Antileishmanial activity of amphotericin and other antifungal agents entrapped in liposomes. *J. Antimicrob. Chemother.* 8, 371-381.
- 172- Nobre M., Meireles M., Gasper L.F., Pereira D., Schramm R., Schuch L.F., Souza L. (1998).** *Malassezia pachydermatis* and other infectious agents in otitis externa and dermatitis in dogs. *Ciencia Rural* 28, 447-452.

- 173- Nostro A., Germanó M.P., D'Angelo V., Marino A., Cannatelli M.A. (2000).** Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 379.
- 174- Odds F.C. (1996).** Resistance of clinically important yeasts to antifungal agents. *Int. J. Antimicrob. Agents* 6, 145-147.
- 175- Okoli A.S., Okeke M.I., Iroegbu C.U., Ebo P.U. (2002).** Antibacterial activity of *Harungana madagascariensis* leaf extracts. *Phytother. Res.* 16, 174-179.
- 176- Olagunju J.A., Oladunni S.O., Oladimeji M.S. (2000).** Status of phosphatase activities in the liver and kidney of rats treated with isosaline leaf and stem-bark extracts of *Harungana madagascariensis* Lam. *Cytobios* 103, 17-24.
- 177- Omodo-Eluk A.J., Bakker K.P., Fuller H. (2003).** Comparaison of two sampling techniques for the detection of *Malassezia pachydermatis* on the skin of dogs with chronic dermatitis. *Vet. J.* 165, 119-124.
- 178- Oppenheim R.C. (1986).** Nanoparticles drug delivery systems based on gelatine and albumin. In: Guiot P., Couvreur P. (eds), *polymeric nanoparticles and microspheres*, 1-26, CRC Press, Boca Raton, Florida USA.
- 179- Perrier F., Grillot R., Lebeau B., Galop J. (1988).** Mycoses et antifongiques. *Monit. Internat* 6, 71-87.
- 180- Perry L. M. (1980).** Medicinal plants of East and Southeast Asia.
Persinos G. J. and Quimby M. W. (1967). Nigerian plants III. Phytochemical screening for alkaloids saponins and tanins. *J. pharm. Sc.* 11, 1512-1515.
- 181- Pier A.C., Moreillo K.A. (1998).** Parasitic relationship between *Microsporium canis* and The cat *Med. Mycol.* 36, 271-275.
- 182- Pierrard G.E., Caumes E., Franchimont C., Arrese-Estrada J. (1993).** Dermatologie tropicale, Edition de l'Université de Bruxelles/ AUPELF, pp. 273-291.

- 183- Pimienta C., Lenaerts V., Cadieux C., Raymond P.H., Juhasz J., Simard M.A. (1990).** Mucoadhesion of hydroxy propyl methacrylate nanoparticles to rat intestinal ileal segments *in vitro*. Pharm. Res. 7, 49-53.
- 184- Pinto-Alphandary H., Andremont A., Couvreur P. (2000).** Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. Int. J. Antimicrob. Agents 13, 155-168.
- 185- Pitt C.G., Chassalow F.I., Hibionada Y.M., Klimas D.M., Schindler A. (1981).** Aliphatic polyesters I. The degradation of poly (ϵ -caprolactone) in vivo. J. Appl. Pol. Sci. 26, 3779-3789.
- 186- Pitt C.G. (1990).** Poly (ϵ -caprolactone) and its copolymers. In: Biodegradable polymers as drug delivery systems, Mark Chasin and Robert Langer (eds). pp. 71-120.
- 187- Pouzaud F. (1992).** Cahier thérapeutique : O.R.L. en hiver. Monit. Pharm. Lab. 2004, 1-8.
- 188- Prado M.R., Brito E.H.S., Girão M.D., Monteiro A.J., Sidrim J.J.C., Rocha M.F.G. (2004).** Higher influence of *Malassezia pachydermatis* in the eyes of dogs with corneal ulcer than in healthy dogs. Vet. Microbiol. 100, 115-120.
- 189- Price C.I., Horton J.W., Baxter C.R. (1994).** Liposome encapsulation: a method for enhancing the effectiveness of local antibiotics. Surgery 115, 480-487.
- 190- Prous J.R. (1993).** The year's news drugs. Drug News Perspect. 6, 95-106.
- 191- Quintanar-Guerrero D., Allemanne E., Doelker E., Fessi H. (1998).** Preparation and characterization of nanocapsules from performed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. Pharm. Res. 15, 1056-1062.
- 192- Rajaonarivony M., Vauthier C., Couarraze G., Puisieux F., Couvreur P. (1993).** Development of a new drug carrier made from alginate. J. Pharm. Sci. 82, 912-917.
- 193- Rahalison L., Hamburger M., Monod M., Frenk E., Hostettmann K. (1994).** Antifungal tests in phytochemical investigations: comparison of bioautographic methods using phytopathogenic and human pathogenic fungi. Planta Med. 60, 41-44.

- 194- Rashid A., Scott E. A., Richardson M.D. (1995).** Inhibitory effects of terbinafine on the invasion of nails by *Trichophyton mentagrophytes*. J. Am. Acad. Dermatol. 33, 718-723.
- 195- Rashid A., Scott E. A., Richardson M. D. (1995).** Early events in the invasion of the human plate nail by *Trichophyton mentagrophytes*. Br. J. Dermatol. 133, 932-940.
- 196- Rateitschak K.H., Rateitschak E.M., Wolf H.F. (1986).** Atlas de parodontologie. Ed Flammarion, Paris, 320p.
- 197- Regnault J.P. (1990).** Microbiologie générale. Ed Vigot, Paris, 959p.
- 198- Rennie P.J., Holland K.T., Mallet A.I., Watkins W.J., Gower D.B. (1989).** Interconversion of androst-16-ene steroid by human axillary aerobic coryneform bacteria. Bioch. Soc. Trans. 17, 1027-1028.
- 199- Rennie P.J., Holland K.T., Mallet A.I., Watkins W.J. (1990).** The skin microflora and the formation of human axillary odour. Int. J. Cosmet. Sci. 12, 197-207.
- 200- Rennie P.J., Gower D.B., Holland K.T. (1991).** *In vitro* and *in vivo* studies of human axillary odour and the cutaneous microflora. Br. J. Dermatol. 124, 596-602.
- 201- Rios J.L., Recio M.C., Villar A. (1988).** Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of literature. J. Ethnopharmacol. 23, 127-149.
- 202- Ritchie E. and Taylor W.C. (1964).** The constituents of *Harungana madagascariensis* Poir Tetrahedron lett. 33, 1431-1436.
- 203- Rolland A., Gibassier D., Sado P., Le Verge R. (1986).** Méthodologie de préparation de vecteurs nanoparticulaires à base de polymères acryliques. J. Pharm. Belg. 41, 83-93.
- 204- Ross S., Morrison I.D. (1988).** Colloidal Systems and Interfaces, John Wiley and Sons (Eds), USA.
- 205- Ruechel R. (1990).** Virulence factors of *Candida albicans* in oral candidosis. Samaranayake eds, Londres, pp. 47-65.

- 206- Sanderson N.M., Jones M.N. (1996).** Encapsulation of vancomycin and gentamicin within cationic liposomes for inhibition of growth of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Drug Target.* 4, 181-189.
- 207- Scalbert A. (1991).** Antifungal properties of tannic acid and aqueous extracts of *Sorindea warneckei*. *Odonto. Stomato. Trop.* 13, 117-120.
- 208- Schmitt (2000).** La peau, Ed *Masson*, Lyon.
- 209- Scott, D.W., Miller, W.H., Griffin, C.E. (2001).** Environmental skin diseases. In: *Small Animal Dermatology*. 6th edn. Eds Muller and Kirk's Philadelphia: WB Saunders Co, pp. 1073-1111.
- 210- Segretain G., Drouhet E., Mariat F. (1987).** Diagnostic de laboratoire en mycologie médicale. 5^{ème} éd. Maloine, pp. 1-73.
- 211- Sharma V.D., Rhodes H.E. (1975).** The occurrence and microbiology of otitis externa in the dog. *J. Small Anim. Pract.* 16, 241-247.
- 212- Shelley W.B., Hurley H.J., Nicholas A.C. (1953).** Axillary odor: experimental study of the role of bacteria apocrine sweat and deodorants. *Arch. Dermatol. Syph.* 68, 430.
- 213- Shiv S. S., Absar A., Murali S. (2003).** Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles. *Biotechnol. Progr.* 19, 1627-1631.
- 214- Smith R., O'connor A., Siegfried R. (1998).** Polyesters as topical delivery systems. *Cosmetics and toiletries* 113, 77-87.
- 215- Sondi I., Salopek-Sondi B. (2004).** Silver nanoparticles as antimicrobial agent : a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J. Coll. Int. Sci.* 275, 177-182.
- 216- St-Germain G., Summerbell R. (1996).** Identifying filamentous fungi. A clinical Laboratory Handbook. First éd. Star publishing company, Belmont, California.
- 217- Stephen D., Nigel B. (1994).** Antifungal hydroxy acetophenone from the New-Zeland Liverwort, *Plagiochila fasciculata*. *Planta Med.* 60, 386-387.

- 218- Stout G.H., Alden R.A., High D.F. (1962).** Harunganin : A crystallographic determination of an unknown structure. J. Amer. Chem. Soc. 84, 2653-2655.
- 219- Strobel J.D., Laughin T.J., Ostroy F., Lilly M.D., Perkins B.H., Dunn R.L. (1987).** Controlled release systems for anticancer agents. Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 14, 261.
- 220- Sutton D.A., Fothergill A.W., Rinaldi M.G. (1998).** Guide to clinically significant fungi. 1st éd. Williams and Wilkins, Baltimore.
- 221- Tice T.R., Rowe C.E., Gilley R.M., Setterstrom J.A., Mirth D.D. (1986).** Development of microencapsulated antibiotics for topical administration. Proc.Int. Symp.Controlled Rel. Bioact. Mater. 13, 169.
- 222- Tomita M., Sheng-Teh Lu, Sam-jyi Wang (1966).** Etude des alcaloïdes des lauracées de formose. Alcaloïdes de *Cassytha filiformis* L. Structure d'un nouvel alcaloïde du type de l'apomorphine, la cassythine (en japonais) in Bull. Signal, CNRS 27.
- 223- Tona L., kambu K., Ngimbi N., Cimanga K., Vlietinck A.J. (1998).** Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. J. Ethnopharmacol. 61, 57-65.
- 224- Tsuchiya H., Sato M., Miyazaki T., Fujiwara S., Tanigaki S., Ohyama M., Tanaka M., Iinuma M. (1996).** Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Ethnopharmacol. 50, 27-34.
- 225- Union Française de la Santé Bucco-dentaire (UFSBD) (1987).** Bulletin d'enquête, Paris.
- 226- Vanbreunseghem R., Devroey C., Takashio M. (1978).** Guide pratique de mycologie médicale et vétérinaire, 2^{ème} éd. Masson, pp. 1-165.
- 227- Vauthier-Holtzcherer C., Benabbou S., Spenlehauer G., Veillard M., Couvreur P. (1991).** Methodology for the preparation of ultra-dispersed polymer systems. *S.T.P Pharma*. 1, 109-116.

- 228- Verden S.G.S., Van der Mer J.M.W. (1992).** Les infections fongiques au cours de la maladie due au virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). J. Mycol. Méd. 2 (suppl. 1), 1-4.
- 229- Verway E.J.W., Overbeek J.T. (1948).** Theory of the stability of lyophobic colloids, Elsevier, Amsterdam.
- 230- Vidal (2003).**
- 231- Vyas S.P., Gogoi P.J., Jain S.K. (1991).** Development and characterization of pseudo latex based transdermal drug delivery system of diclofenac. Drug. Del. Ind. Pharm. 17, 1041-1048.
- 232- Walker A. and Sillans R. (1974).** Les plantes utiles du Gabon, Ed. Lechevalier, Paris.
- 233- Wise D.L. (1970).** Reports on dynatech contract with the city of New York, "development of sustained release system for treatment of narcotic patients".
- 234- Wise D.L., Gregory J.B., Newberne P.M., Bartholow L.C., Stanbury J.B. (1978).** Results on biodegradable cylindrical subdermal implants for fertility control. In: Polymeric delivery systems, Kostelnik R.J., ed., Gordon and Breach Science Publishers, New York, Londres, paris, pp. 121-138.
- 235- Wooley D.W. (1944).** Some biological effects produced by benzimidazole and their reversal by purines. J. Biol. Chem.152, 225.
- 236- Wu C.Y., Chao Y.C., Chang F.R., Chen Y.Y. (1997).** Alkaloids from *Cassytha filiformis*. Phytochemistry 46, 181-184.

LES SITES INTERNET CONSULTES

- 1- http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast?onda=N17800538 (01/ 2005)
- 2- <http://users.chello.be/sf16063/pauwels/HaruMada.jpg> (11/ 2004)
- 3- <http://mobot.mobot.org/w3T/search/image/iix187.html> (01/ 2005)
- 4- <http://www.mycology.adelaide.edu.au/> (03/ 2003)
- 5- http://www.canal-u.education.fr/canalu/contenu_10.php?programme_id=764849237 (04/ 2005)

ANNEXES

LISTE DES PUBLICATIONS ACCEPTEES ET SOUMISES

PUBLICATIONS ACCEPTEES :

B. MOULARI, F. PIROT, H. LBOUTOUNNE, Y. PELLEQUER, Y. C. GUILLAUME, and J. MILLET. Vectorization of *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (*Hypericaceae*) ethanolic leaf extract by using PLG-nanoparticles: Antibacterial activity assessment. **Drug Development Research** (Sous presse).

PUBLICATIONS SOUMISES:

1. B. MOULARI, H. LBOUTOUNNE, Y. PELLEQUER, J-P CHAUMONT, Y.C. GUILLAUME and J. MILLET. Potentialization of the bactericidal activity of *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (*Hypericaceae*) leaf extract against oral bacteria using poly (d, l-lactide-co-glycolide)-nanoparticles: *in vitro* study. **Archives of Oral Biology**.

2. B. MOULARI, Y. PELLEQUER, H. LBOUTOUNNE, J-P. CHAUMONT, Y. C. GUILLAUME AND J. MILLET. *In vitro* antimicrobial activities of leaf extract of the medicinal plant *Harungana madagascariensis* against representative strains causing otitis externa in pets. **Phytotherapy Research**.

3. Brice MOULARI, Yann PELLEQUER, Hassan LBOUTOUNNE, Corinne GIRARD, Jean-Pierre CHAUMONT, Joëlle MILLET AND Frédéric MUYARD. Isolation and *in vitro* antibacterial activity of astilbin, the bioactive flavanone from the leaves of *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (*Hypericaceae*). **FEMS Microbiology**.

COMMUNICATIONS

- 1: "Antibacterial activity of *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir (Hypericaceae) leaves extract loaded-nanoparticles". B. Moulari, H. Lboutounne, Y. Pellequer, JP. Chaumont, Y. Guillaume, J. Millet. X^{ième} forum des jeunes chercheurs. BESANCON (France) Juin 2004.
- 2: "Specific antimicrobial activities of Mediterranean essential oils". B. Moulari, L. Michel, J. Millet, JP. Chaumont. 3rd conference on medicinal and aromatic plants of South East European countries. NITRA (Slovak Republic), September 2004. ISBN 80-8069-396-X.
- 3: "In vitro specific antimicrobial properties of balkanic *Artemisia* extracts". B. Moulari, L. Michel, E. Genova, M. Nikolova, J. Millet, JP. Chaumont. 3rd conference on medicinal and aromatic plants of South East European countries. NITRA (Slovak Republic), September 2004. ISBN 80-8069-396-X.
- 4 : « Potentialisation de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique des feuilles d' *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir (Hypericaceae) par les nanoparticules de PLGA » . B. Moulari, H. Lboutounne, Y. Pellequer, A. Tangersuramjit, JP. Chaumont, J. Millet. XIX^{èmes} Journées Scientifiques du Groupe Thématique de Recherche sur la Vectorisation (GTRV). PARIS (France) Décembre 2004.

RESUME

L'émergence de plus en plus fréquente de souches fongiques et bactériennes résistantes aux antimicrobiens existants sur le marché, contribue de façon sensible à amplifier la gravité des infections fongiques et bactériennes (cutanées et profondes) d'où la nécessité de développer des nouvelles molécules à visée thérapeutique. Dans cette optique, les plantes, source principale des drogues utilisées en médecine traditionnelle, représentent une alternative intéressante.

Cassytha filiformis L. (Lauraceae) et *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (Hypericaceae) sont deux espèces de plantes largement utilisées en médecine traditionnelle africaine dans le traitement des mycoses, des dermatoses cutanées et de la lèpre. Dans ce travail, elles ont fait l'objet d'une étude pharmaceutique pluridisciplinaire.

Nous avons réalisé des screening antimicrobiens *in vitro* des extraits de ces deux plantes sur des champignons pathogènes et des bactéries (saprophytes et pathogènes) de la flore cutanée de l'Homme. Les CMI des extraits actifs ont été déterminées.

Les extraits des feuilles d'*Harungana madagascariensis* se sont montrés plus actifs avec des CMI très intéressantes sur les bactéries, ainsi une étude approfondie de l'extrait à l'acétate d'éthyle a été réalisée.

Cette étude a permis :

- d'évaluer l'activité bactériostatique et bactéricide de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* sur les bactéries de la microflore cutanée et de la flore buccale ;
- de déterminer par bioautographie directe le composé bioactif ;
- de procéder, par des méthodes chromatographiques et spectroscopiques, à la caractérisation du composé bioactif : l'astilbine (flavanone).

Enfin une potentialisation du pouvoir antibactérien, *in vitro*, des extraits éthanolique et à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Harungana madagascariensis* par des nanosphères de l'acide poly (d,l-lactide-co-glycolide) (PLGA) a été obtenue.

MOTS CLES : *Cassytha filiformis*, *Harungana madagascariensis*, antimicrobien, bioautographie, astilbine, potentialisation, nanosphères, acide poly (d,l-lactide-co-glycolide).